(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0005872
(43) 공개일자 2024년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6841 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6841 (2018.05)
C12Q 2523/109 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7041959
(22) 출원일자(국제) 2022년05월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/028012
(87) 국제공개번호 WO 2022/236011
국제공개일자 2022년11월10일
(30) 우선권주장
63/185,511 2021년05월07일 미국(US)
63/314,873 2022년02월28일 미국(US)

(71) 출원인
더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드
미국 02142 매사추세츠주 캠브리지 메인 스트리트 415
메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77
(72) 발명자
왕, 시아오
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
렌, 징이
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77 메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지 내
젱, 후
미국 02142 매사추세츠 캠브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
(74) 대리인
양영준, 김영

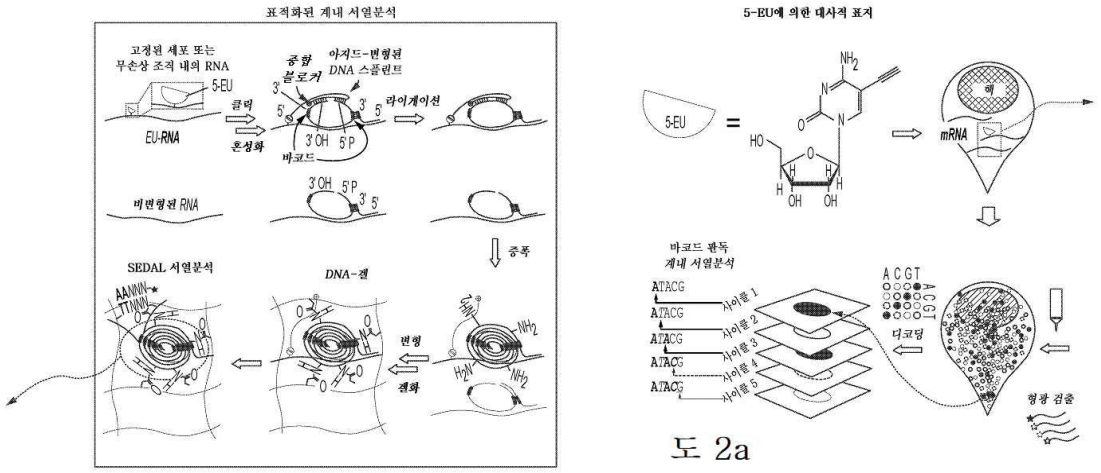
전체 청구항 수 : 총 207 항

(54) 발명의 명칭 **세포하 해상도에서 시공간적으로 해상된 전사체학**

(57) 요 약

본 개시내용은 대상체에서 생체내 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 비롯하여, 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 시공간적 유전자 발현에서 전사후 변형의 역할을 프로파일링하는 방법, 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에서 시공간적 유전자 발현의 역할을 연구하는 방법, 시공간적 유전자 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법, 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법, 및 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법에 유용한 올리고뉴클레오티드 프로브가 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트를 제공한다. 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 시스템이 또한 본 개시내용에 의해 제공된다.

대 표 도



도 2a

(52) CPC특허분류
C12Q 2525/117 (2013.01)
C12Q 2525/307 (2013.01)
C12Q 2531/125 (2013.01)
C12Q 2563/185 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법으로서,

a) 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서:

i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (a)-(h)를 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복하여 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (a)-(h)가 임의로 제3 시간량 t_3 동안 반복되고, 임의로 제4 시간량 t_4 동안 반복되고, 임의로 제5 시간량 t_5 동안 반복되고, 임의로 제6 시간량 t_6 동안 반복되고, 임의로 제7 시간량 t_7 동안 반복되고, 임의로 제8 시간량 t_8 동안 반복되고, 임의로 제9 시간량 t_9 동안 반복되고, 임의로 제10 시간량 t_{10} 동안 반복되는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 시공간적 유전자 발현이 다중 세포에서 동시에 프로파일링되는 것인

방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 시공간적 유전자 발현이 10개 초과의 세포, 20개 초과의 세포, 50개 초과의 세포, 100개 초과의 세포, 200개 초과의 세포, 300개 초과의 세포, 400개 초과의 세포, 500개 초과의 세포 또는 1000개 초과의 세포에서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 세포가 복수의 세포 유형을 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 세포 유형이 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 핍지교세포, 근육 세포, 심근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포, 간 세포, 평활근 및 골격근 세포, 조혈 세포, 림프구, 단핵구, 호중구, 대식세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 및 뉴런으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 투과화된 세포인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 무손상 조직 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 조직이 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직인 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 조직이 단계 (a)의 인큐베이션 동안 및 단계 (b)의 접촉 전에 생체내 존재하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 조직이 단계 (a)의 인큐베이션 후 및 단계 (b)의 접촉 전에 수거된 것인 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 조직이 비-인간 실험 동물 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 비-인간 실험 동물이 마우스, 래트, 개, 돼지 또는 비-인간 영장류인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 핵산이 5-에티닐 우리딘 표지된 핵산인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 시공간적 유전자 발현이 최대 100, 최대 200, 최대 500, 최대 1000, 최대 2000, 최대 3000개, 또는 3000개 초과의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 시공간적 유전자 발현이 최대 1000개의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산이 신생 RNA, 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA (tRNA), 또는 리보솜 RNA (rRNA)인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산이 신생 RNA인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산이 mRNA인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티가 반응성 생물직교 관능기인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티가 아지드, 알킨, 니트론, 알켄, 테트라진 또는 테트라졸을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티가 알킨을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체가 5-에티닐 우리딘, 3'-아지도-3'-데옥시티미딘, C8-알킨-데옥시우리딘, (2'S)-2'-데옥시-2'-플루오로-5-에티닐우리딘 또는 5-에티닐-2'-데옥시시티딘인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 화학적 모이어티가 반응성 생물직교 관능기인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 반응성 화학적 모이어티가 아지드, 알킨, 니트론, 알켄, 테트라진 또는 테트라졸을 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 화학적 모이어티가 아지드를 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오시드 유사체의 화학적 모이어티 및 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 화학적 모이어티의 반응이 클릭 화학 반응을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 클릭 화학 반응이 구리(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (CuAAC) 반응인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 중합 블로커를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 중합 블로커가 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 3' 단부에 존재하는 것인 방법.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 핵산 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 티민 잔기인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 폴리-A 링커 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 폴리-A 링커 서열이 약 2-100, 약 10-90, 약 20-80, 약 30-70 또는 약 40-60개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, 폴리-A 링커 서열이 약 50개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 구조:

5'-[반응성 화학적 모이어티]-[폴리-A 링커 서열]-[제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분]-[중합 블로커]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 40

제37항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-

22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열이 약 1-10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열이 약 5-10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열이 약 5개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브가 구조:

5'-[대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열이 약 1-10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열이 약 5-10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열이 약 5개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 약 1-10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 약 5-10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 약 5개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 56

제1항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 57

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되어 있는 것인 방법.

청구항 59

제1항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 구조:

5'-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 부분]-[제1 바코드 서열]-[대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제2 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 제4 올리고뉴클레오티드 프로브가 형광단을 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 롤링 서클 증폭을 수행하는 단계가 아민-변형된 뉴클레오티드를 제공하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 아민-변형된 뉴클레오티드는 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 내로 혼입되는 것인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계가 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 아민-변형된 뉴클레오티드를 메타크릴산 N-히드록시숙신이미드와 반응시키고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스를 공중합시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스가 히드로겔인 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 히드로겔이 폴리비닐 알콜 히드로겔, 폴리에틸렌 글리콜 히드로겔, 소듐 폴리아크릴레이트 히드로겔, 아크릴레이트 중합체 히드로겔 또는 폴리아크릴아미드 히드로겔인 방법.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 대사적으로 표지된 관심 핵산을 확인하기 위해 사용되는 유전자-특이적 서열인 방법.

청구항 67

제1항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계를 수행하여 대사적으로 표지된 관심 핵산을 확인하는 것인 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산을 확인하는 것이 SEDAL 서열분석을 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, SEDAL 서열분석이 2, 3, 4, 5회 또는 5회 초과로 수행되는 것인 방법.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 영상화하는 단계가 형광 영상화를 포함하는 것인 방법.

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 영상화하는 단계가 공초점 현미경검사 또는 에피형광 현미경검사를 포함하는 것인 방법.

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 내의 추가의 분자를 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 추가의 분자가 RNA, DNA, 단백질, 탄수화물, 소분자, 대사물 및/또는 지질인 방법.

청구항 74

제1항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 시공간적 유전자 발현 프로파일을 다양한 세포 유형의 시공간적 유전자 발현 프로파일을 포함하는 참조 데이터와 비교함으로써, 프로파일링된 세포의 세포 유형을 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 75

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 세포에서 1개 이상의 유전자를 과다발현시키거나 또는 녹아웃시켜

1개 이상의 유전자가 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현에 수반되는지 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 76

세포에서 시공간적 유전자 발현에서 전사후 변형의 역할을 프로파일링하는 방법으로서,

a) 전사후 변형에 수반되는 유전자의 녹다운을 포함하는 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서:

i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

를 포함하며, 여기서 야생형 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 변경은 전사후 변형이 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 조절하는 데 수반된다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 단계 (a)-(h)를 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복하여 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서, 전사후 변형이 7-메틸구아노신, N^6-메틸아데노신 (m^6A), 폴리(A) 테일, 인트론 스플라이싱, 또는 히스톤 mRNA 프로세싱인 방법.

청구항 79

제76항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 전사후 변형이 아데노신의 메틸화를 포함하는 것인 방법.

청구항 80

제76항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 전사후 변형이 m^6A인 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 전사후 변형에 수반되는 유전자가 YTH 도메인 패밀리 (YTHDF) 1, YTHDF2, YTHDF 3, YTH 도메인 함유 (YTHDC) 1, YTHDC2, 메틸트랜스퍼라제 유사 (METTL) 3, 및 METTL14로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 82

제76항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 시공간적 유전자 발현에서 전사후 변형의 역할이 최대 100, 최대 200, 최대 500, 최대 1000, 최대 2000, 최대 3000개, 또는 3000개 초과의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 83

제76항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 시공간적 유전자 발현에서 전사후 변형의 역할이 최대 1000개의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 84

제76항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 단계 (a)의 인큐베이션 동안 및 단계 (b)의 접촉 전에 생체내 조직 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 조직이 단계 (a)의 인큐베이션 후 및 단계 (b)의 접촉 전에 수거된 것인 방법.

청구항 86

제84항 또는 제85항에 있어서, 조직이 비-인간 실험 동물 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 비-인간 실험 동물이 마우스, 래트, 개, 돼지 또는 비-인간 영장류인 방법.

청구항 88

질환 또는 장애의 발생 또는 진행에서 시공간적 유전자 발현의 역할을 연구하는 방법으로서,

a) 이환 조직으로부터의 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서:

i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티

드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

를 포함하며, 여기서 비-이환 세포 또는 비-이환 조직으로부터의 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 변경은 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현에서의 변경이 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에 수반될 수 있음을 나타내는 것인 방법.

청구항 89

제88항에 있어서, 단계 (a)-(h)를 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복하여 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 90

제88항 또는 제89항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환, 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 91

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 이환 조직이 대상체로부터 채취된 것인 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 대상체가 비-인간 실험 동물인 방법.

청구항 93

제91항 또는 제92항에 있어서, 대상체가 마우스, 래트, 개, 돼지 또는 비-인간 영장류인 방법.

청구항 94

제91항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 95

제90항에 있어서, 이환 조직이 단계 (a)의 인큐베이션 동안 및 단계 (b)의 접촉 전에 생체내 존재하는 것인 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 이환 조직이 단계 (a)의 인큐베이션 후 및 단계 (b)의 접촉 전에 수거된 것인 방법.

청구항 97

제95항 또는 제96항에 있어서, 이환 조직이 비-인간 실험 동물 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 비-인간 실험 동물이 마우스, 래트, 개, 돼지 또는 비-인간 영장류인 방법.

청구항 99

시공간적 유전자 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법으로서,

a) 세포를 1종 이상의 후보 작용제 및 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서:

i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

를 포함하며, 여기서 1종 이상의 후보 작용제의 부재 하의 발현에 비해 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 변경은 1종 이상의 후보 작용제가 시공간적 유전자 발현을 조정한다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 단계 (a)-(h)를 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복하여 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 101

제99항 또는 제100항에 있어서, 1종 이상의 후보 작용제가 후보 작용제의 라이브러리를 포함하는 것인 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 후보 작용제의 라이브러리가 수백 개의 후보 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 103

제101항에 있어서, 후보 작용제의 라이브러리가 수천 개의 후보 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 104

제99항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 후보 작용제가 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 및 탄수화물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 105

제99항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 후보 작용제가 1종 이상의 공지된 약물 또는 1종 이상의 FDA-승인된 약물을 포함하는 것인 방법.

청구항 106

제104항에 있어서, 소분자가 항암 치료제인 방법.

청구항 107

제104항에 있어서, 단백질이 항체 또는 그의 단편, 수용체 또는 시토카인인 방법.

청구항 108

제104항에 있어서, 핵산이 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, dsRNA, 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)인 방법.

청구항 109

제99항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 유전자 발현의 조정이 질환 또는 장애의 증상을 감소, 경감 또는 제거하거나, 또는 질환 또는 장애의 발생 또는 진행을 예방하는 것과 연관되는 것인 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환, 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 111

대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 샘플로부터의 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서:

i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

를 포함하며, 여기서 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 변경은 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 비-이환 세포에서의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현이 대조군 실험으로서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 113

제111항에 있어서, 비-이환 세포에서의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현 프로파일이 참조 데이터를 구성하는 것인 방법.

청구항 114

제111항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)-(h)를 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복하여 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 115

제111항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환, 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 116

제111항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 117

제111항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 조직 샘플을 포함하는 것인 방법.

청구항 118

제111항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 생검인 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, 생검이 골, 골수, 유방, 위장관, 폐, 간, 췌장, 전립선, 뇌, 신경, 신장, 자궁내막, 자궁경부, 림프절, 근육, 또는 피부 생검을 포함하는 것인 방법.

청구항 120

제118항 또는 제119항에 있어서, 생검이 종양 생검을 포함하는 것인 방법.

청구항 121

대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 샘플로부터의 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서:

i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계;

h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계; 및

i) 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 발현에 비해 시공간적 유전자 발현에서 변경이 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 122

제121항에 있어서, 비-이환 세포에서의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현이 대조군 실험으로서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 123

제121항에 있어서, 비-이환 세포에서의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현 프로파일이 참조 데이터를 구성하는 것인 방법.

청구항 124

제121항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)-(h)를 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복하여, 치료를 투여하기 전에 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 125

제121항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 치료제를 투여하는 것, 수술 또는 방사선 요법을 포함하는 것인 방법.

청구항 126

제125항에 있어서, 치료제가 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물인 방법.

청구항 127

제125항 또는 제126항에 있어서, 치료제가 공지된 약물 또는 FDA-승인된 약물인 방법.

청구항 128

제126항에 있어서, 소분자가 항암 치료제인 방법.

청구항 129

제126항에 있어서, 단백질이 항체 또는 그의 단편, 또는 항체 변이체인 방법.

청구항 130

제126항에 있어서, 핵산이 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, dsRNA, shRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 방법.

청구항 131

제121항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환, 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 132

제121항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 133

제1 올리고뉴클레오티드 프로브, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브, 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브로서, 여기서

i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 반응성 화학적 모이어티를 포함하고;

ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

iii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고,

여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 134

제133항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 반응성 화학적 모이어티가 반응성 생물직교 관능기인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 135

제133항 또는 제134항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 반응성 화학적 모이어티가 아지드, 알킨, 니트론, 알켄, 테트라진 또는 테트라졸을 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 136

제133항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 반응성 화학적 모이어티가 아지드를 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 137

제133항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 중합 블로커를 추가로 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 138

제137항에 있어서, 중합 블로커가 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 3' 단부에 존재하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 139

제137항 또는 제138항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 핵산 잔기를 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 140

제139항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 티민 잔기인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 141

제133항 내지 제140항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 폴리-A 링커 서열을 추가로 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 142

제141항에 있어서, 폴리-A 링커 서열이 약 2-100, 약 10-90, 약 20-80, 약 30-70, 또는 약 40-60개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 143

제141항 또는 제142항에 있어서, 폴리-A 링커 서열이 약 50개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 144

제141항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 구조:

5'-[반응성 화학적 모이어티]-[폴리-A 링커 서열]-[제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분]-[중합 블로커]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 145

제144항에 있어서, 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 146

제144항 또는 제145항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 147

제144항 내지 제146항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 148

제133항 내지 제147항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 149

제133항 내지 제148항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인

복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 150

제133항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열이 약 1-10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 151

제133항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열이 약 5-10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 152

제133항 내지 제151항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열이 약 5개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 153

제133항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브가 구조:

5'-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 154

제153항에 있어서, 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 155

제153항 또는 제154항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열이 약 1-10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 156

제133항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열이 약 5-10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 157

제133항 내지 제156항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열이 약 5개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 158

제133항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 약 1-10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 159

제133항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 약 5-10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 160

제133항 내지 제159항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 약 5개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 161

제133항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 162

제133항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 163

제133항 내지 제162항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 164

제133항 내지 제163항 중 어느 한 항에 있어서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 165

제133항 내지 제164항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분이 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되어 있는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 166

제133항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 구조:

5'-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 부분]-[제1 바코드 서열]-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제2 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 167

제166항에 있어서, 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커가 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 168

제133항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 추가로 포함하는 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 169

제168항에 있어서, 제4 올리고뉴클레오티드 프로브가 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 170

제133항 내지 제169항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 관심 핵산을 확인하기 위해 사용되는 유전자-특이적 서열인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 171

제169항 또는 제170항에 있어서, 제4 올리고뉴클레오티드 프로브가 형광단을 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클

레오티드 프로브.

청구항 172

관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 173

제172항에 있어서, 제1 바코드 서열이 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열에 상보적인 것인 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 174

제172항 또는 제173항에 있어서, 제1 바코드 서열이 5-10개의 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 175

제172항 내지 제174항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 바코드 서열이 5개의 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 176

제172항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 바코드 서열이 5-10개의 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 177

제172항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 바코드 서열이 5개의 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 178

제172항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분이 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되어 있는 것인 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 179

제172항 내지 제178항 중 어느 한 항에 있어서, 구조:

5'-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 부분]-[제1 바코드 서열]-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제2 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함하는 것인 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 180

제179항에 있어서, 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이인 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 181

제133항 내지 제171항 중 어느 한 항의 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트.

청구항 182

제181항에 있어서, 제121항 내지 제159항 중 어느 한 항의 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 다수개 포함하며, 여기서 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브 각각은 상이한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하기 위해 사용되는 것인 키트.

청구항 183

제181항 또는 제182항에 있어서, 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 또는 1000개 초과의 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트.

청구항 184

제172항 내지 제180항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트.

청구항 185

제184항에 있어서, 제160항 내지 제168항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오티드 프로브를 다수개 포함하며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브 각각은 상이한 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하는 것인 키트.

청구항 186

제184항 또는 제185항에 있어서, 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 또는 1000개 초과의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트.

청구항 187

제181항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 추가로 포함하는 키트.

청구항 188

제181항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 효소를 추가로 포함하는 키트.

청구항 189

제188항에 있어서, 1종 이상의 효소가 리가제를 포함하는 것인 키트.

청구항 190

제188항 또는 제189항에 있어서, 1종 이상의 효소가 폴리머라제를 포함하는 것인 키트.

청구항 191

제181항 내지 제190항 중 어느 한 항에 있어서, 아민-변형된 뉴클레오티드를 추가로 포함하는 키트.

청구항 192

제181항 내지 제191항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스를 제조하기 위한 시약 및 단량체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 193

세포에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 시스템으로서,

a) 세포;

b) 뉴클레오시드 유사체의 풀, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함함;

c) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함함; 및

d) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍, 여기서:

i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드

프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적임

을 포함하는 시스템.

청구항 194

제193항에 있어서, 현미경을 추가로 포함하는 시스템.

청구항 195

제193항 또는 제194항에 있어서, 컴퓨터를 추가로 포함하는 시스템.

청구항 196

제193항 내지 제195항 중 어느 한 항에 있어서, CPU를 추가로 포함하는 시스템.

청구항 197

제193항 내지 제196항 중 어느 한 항에 있어서, 컴퓨터 메모리 및/또는 저장매체를 추가로 포함하는 시스템.

청구항 198

제193항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 카메라를 추가로 포함하는 시스템.

청구항 199

대상체에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법으로서,

a) 뉴클레오시드 유사체의 풀을 대상체에게 시간량 t_1 동안 생체내 투여하여 대상체 내의 1개 이상의 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

b) 대상체로부터 조직 샘플을 수거하는 단계;

c) 수거된 조직 샘플 내의 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

d) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서:

i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

e) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

f) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

g) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

h) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

i) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치

를 결정하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 200

제199항에 있어서, 수거된 조직이 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직인 방법.

청구항 201

제199항 또는 제200항에 있어서, 수거된 조직이 심장 조직인 방법.

청구항 202

제199항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 비-인간 실험 동물인 방법.

청구항 203

제202항에 있어서, 비-인간 실험 동물이 마우스, 래트, 개, 돼지 또는 비-인간 영장류인 방법.

청구항 204

제199항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서, 뉴클레오시드 유사체가 주사에 의해 대상체에게 투여되는 것인 방법.

청구항 205

제204항에 있어서, 주사가 안와후 투여를 포함하는 것인 방법.

청구항 206

제199항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터 조직 샘플을 수거하는 단계가 조직 생검을 채취하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 207

제199항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터 조직 샘플을 수거하는 단계가 대상체로부터 1개 이상의 전체 기관을 수거하는 것을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2021년 5월 7일에 출원된 미국 가출원, U.S.S.N. 63/185,511, 및 2022년 2월 28일에 출원된 미국 가출원, U.S.S.N. 63/314,873에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 조절된 유전자 발현 흐름은 삶의 가장 근본적인 과정을 형성하고, 많은 질환 및 장애의 발생 및 진행에 영향을 미친다. 이들 고도로 제어된 과정은 전사, RNA 프로세싱, 번역, 및 메신저 RNA (mRNA) 및 단백질의 분해를 포함한다. 공간 전사체학 방법의 개발은 유전자 정보를 공간 상황에서 보유하여 세포 조직화 및 조직 구조가 직접 가시화되도록 함으로써 단일 세포 서열분석 기술로의 신속한 패러다임 이동을 생성하였다. 그러나, 공간 전사체학을 위한 현행 방법은 단지 mRNA를 정적인 트랜스크립톰 사진으로서 검출하여, 그의 고도로 동적인 성질을 불분명하게 한다. 또한, 대부분의 현행 방법은 범-세포 수준에 초점을 맞추어, 이종 세포 유형을 결정하고, 이를 다시 조직에 맵핑하지만, 세포내 환경에서의 풍부한 정보는 무시한다. 따라서, 시간 경과에 따라 공간적 맥락에서 유전자 발현을 연구하고, 시공간적 유전자 발현과 세포 발생, 뿐만 아니라 다양한 질환 및 장애의 발생 및 진행 사이의 연관성을 이해하기 위해 공간 전사체학을 시간적 차원과 연관시키는 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0004] 본 개시내용은 세포 또는 다중 세포 (예를 들어, 조직에 존재하는 세포 포함)에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 기재한다. 한 측면에서, 본원에서 "TEMPO맵" (시간적으로 해상된 계내 서열분석 및 맵핑)으로 지칭되는 방법이 기재된다. TEMPO맵 방법은 신생 전사된 RNA를 세포하 해상도에서 해상하고, 시간 해상도를 공간 전사체학 워크플로우 내로 혼입시킴으로써 유전자 발현 (즉, 트랜스크립톰)의 역학을 추적하는 데 사용될 수 있다. 방법은 세포하 수준에서 영상화-기반 단일-세포 설명을 제공하고, 세포내 활동, 예컨대 에피트랜스크립톰 프로세싱, mRNA 트래픽킹, 국부 번역, RNA 번역의 동역학적 파라미터 등을 연구하는 데 사용될 수 있다. TEMPO맵은 또한 무손상 조직을 연구하고 유전자 발현의 변경과 연관된 다양한 질환 및 장애의 발생 및 진행에서의 원인을 이해하고 확인하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 방법은 RNA, 단백질 및 그의 상호작용의 이해를 용이하게 하여, 게놈 정보가 시간 및 공간에서 어떻게 프로세싱되는지를 가시화하기 위한 가치있는 도구를 제공한다. 이들 방법 중 임의의 것은 또한 본원에 추가로 기재된 바와 같이 생체내에서 수행될 수 있다.

[0005] 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은

[0006] a) 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0007] b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0008] c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서:

[0009] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0010] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0011] d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0012] e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0013] f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0014] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0015] h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

[0016] 를 포함하는, 세포에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 제공한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 1회 이상 추가로 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 단계 (a)의 인큐베이션에서 상이한 시간량, t_2를 사용하여 적어도 1회 반복된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 임의로 제3 시간량 t_3 동안 반복되고, 임의로 제4 시간량 t_4 동안 반복되고, 임의로 제5 시간량 t_5 동안 반복되고, 임의로 제6 시간량 t_6 동안 반복되고, 임의로 제7 시간량 t_7 동안 반복되고, 임의로 제8 시간량 t_8 동안 반복되고, 임의로 제9 시간량 t_9 동안 반복되고, 임의로 제10 시간량 t_{10} 동안 반복된다.

[0018] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법 중 임의의 것은 질환 또는 장애를 진단 및/또는 치료하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법 중 임의의 것은 RNA 번역의 동역학적 파라미터를 연구하는 데

유용하다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법 중 임의의 것은 전사후 RNA 변형을 연구하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법 중 임의의 것은 세포 주기 및 세포 복제의 다양한 단계에서 시공간적 유전자 발현을 연구하는 데 유용하다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 시공간적 유전자 발현에서 전사후 변형의 역할을 프로파일링하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 1종 이상의 관심 핵산 (예를 들어, 1종 이상의 RNA 전사체)의 전사후 변형에 수반되는 유전자의 녹다운을 포함하는 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 녹다운 세포에서의 다양한 관심 핵산의 시공간적 발현을 야생형 세포에서의 동일한 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 야생형 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산의 발현에서의 임의의 변경은 전사후 변형이 관심 핵산의 시공간적 발현을 조절하는 데 수반된다는 것을 나타낼 수 있다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에서 시공간적 유전자 발현의 역할을 연구하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 이환 조직 (예를 들어, 대상체로부터 채취한 이환 조직)으로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 이환 조직으로부터의 세포에서의 다양한 관심 핵산의 시공간적 발현을 비-이환 조직으로부터의 세포에서의 동일한 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산의 발현에서의 임의의 변경은 관심 핵산의 시공간적 발현이 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에 수반될 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 관심 핵산 또는 다수의 관심 핵산의 시공간적 유전자 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하에 세포 (예를 들어, 정상 세포 또는 이환 세포)에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 관심 핵산의 시공간적 발현을 1종 이상의 후보 작용제에 노출되지 않은 세포에서의 동일한 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 후보 작용제(들)에 노출되지 않은 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산(들)의 발현에서의 임의의 변경은 관심 핵산(들)의 시공간적 발현이 후보 작용제(들)에 의해 조정된다는 것을 나타낼 수 있다.

[0022] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖거나 또는 가질 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 관심 핵산의 시공간적 발현을 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 동일한 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산의 발현에서의 임의의 변경은 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낼 수 있다.

[0023] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖거나 또는 가질 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 관심 핵산의 시공간적 발현을 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 동일한 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 이어서, 질환 또는 장애에 대한 치료는 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산의 발현에서 임의의 변경이 관찰되는 경우에 대상체에게 투여될 수 있다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은

[0025] a) 뉴클레오시드 유사체의 풀을 대상체에게 시간량 t_1 동안 생체내 투여하여 대상체 내의 1개 이상의 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0026] b) 대상체로부터 조직 샘플을 수거하는 단계;

[0027] c) 수거된 조직 샘플 내의 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0028] d) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서:

[0029] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0030] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0031] e) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0032] f) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0033] g) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0034] h) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0035] i) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

[0036] 를 포함하는, 생체내 대상체에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 제공한다.

[0037] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브, 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하며, 여기서

[0038] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 반응성 화학적 모이어티를 포함하고;

[0039] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0040] iii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고,

[0041] 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적이다.

[0042] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 구조 5'-[반응성 화학적 모이어티]-[폴리-A 링커 서열]-[제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분]-[중합 블로커]-3'를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 구조 5'-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 구조 5'-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 부분]-[제1 바코드 서열]-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제2 부분]-3'를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다.

[0043] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브 중 1개 이상을 포함하는 키트를 제공한다.

[0044] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 시스템을 제공한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 a) 세포; b) 뉴클레오시드 유사체의 풀, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티 (예를 들어, 생물직교 관능기, 예컨대 클릭 화학 핸들)를 포함함; c) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함함; 및 d) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍, 여기서

[0045] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0046] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고,

[0047] 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적임

[0048] 을 포함한다.

[0049] 본 개시내용이 이러한 측면으로 제한되지 않기 때문에, 상기 개념 및 하기 논의된 추가의 개념은 임의의 적합한 조합으로 배열될 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 추가로, 본 개시내용의 다른 이점 및 신규 특색은 첨부 도면과 함께 고려할 경우에 다양한 비제한적 실시양태의 하기 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0050] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 개시내용의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함되며, 이는 본원에 제시된 구체적 실시양태의 상세한 설명과 조합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참조하는 것에 의해 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1은 세포 및 조직에서의 유전자 조절 메카니즘을 세포하 해상도에서 분석하기 위한 시간적으로 해상된 계내 서열분석 및 맵핑 (TEMPO맵) 방법의 개략도를 제공한다. TEMPO맵은 시간 해상도를 공간 전사체학과 통합하여 RNA의 4D 맵을 생성한다. 이 방법은 조정가능한 기간에 걸쳐 3D 공간에서 RNA의 궤적을 맵핑하고, 다양한 생물학적 및 생리학적 과정에서 유전자 조절의 보다 깊은 이해를 가능하게 한다.

도 2a-2e는 TEMPO맵의 원리 및 시공간적으로 해상된 전사체학을 위한 신생 RNA 표지 화학의 사용을 보여준다. 도 2a는 TEMPO맵의 개관을 보여주는 개략도를 제공한다. 5-에티닐 우리딘 (5-EU) 표지된 세포를 제조한 후, 맞춤 3-부분 프로브를 세포 mRNA에 접합 또는 혼성화시켜, 각각의 패드락 서열의 cDNA 앰플리콘으로의 효소적 복제를 발생시킨다. 앰플리콘은 관능화된 아크릴 기를 통해 히드로겔 메쉬에 계내 고정되어 DNA-겔 하이브리드 (파상선)를 생성한다. 각각의 앰플리콘 상의 5-염기 바코드는 5 라운드의 SEDAL 서열분석에 의해 판독된다. 따라서, 멀티플렉스화된 RNA 정량화는 신생 세포하 위치에서 유전자 발현을 밝혀낸다. 도 2b는 상이한 시점을 통합하는 것에 의한 RNA의 시공간적 궤적의 재구축을 보여준다. 도 2c는 3-부분 DNA 프로브 설계의 개략도를 제공한다. DNA 스플린트 프로브는 표지된 RNA에 비-표적화된 방식으로 접합되고, 스플린트 프로브와 패드락 프로브의 쌍형성은 패드락을 환형화하는 데 요구된다. 프라이머 프로브와 패드락 프로브의 제2 쌍형성은 표적-특이적 신호를 증폭시킨다. 도 2d는 신호 증폭이 모든 3개의 프로브의 존재를 필요로 한다는 것을 보여준다. mRNA_I은 ACTB를 나타내고, mRNA_II는 GAPDH를 나타낸다. 모든 4개의 영상은 ACTB (담회색) mRNA 및 HeLa 세포 핵 (암회색)을 보여준다. 비처리된 세포와 비교하여 EU-처리된 세포는 신호-대-잡음 비 30을 생성한다. 도 2e는 펄스-추적 실험의 설계 (좌측) 및 실험으로부터의 형광 영상 세트 (우측)를 보여주며, 이는 1시간 EU 처리 후에 상이한 시간으로 세척한 경우의 ACTB mRNA의 전위를 보여준다.

도 3은 TEMPO맵 3-부분 프로브의 개략도를 제공한다. 스플린트 프로브는 폴리A 절편 및 스플린트-패드락 어닐링 서열 (스플린트 프로브에서 박스로 강조표시된 뉴클레오티드)로 나뉜다. 스플린트 프로브는 증폭 개시를 방지하기 위해 역전된 T (프로브의 3' 단부에 표지된 바와 같음)로 종결된다. 패드락 프로브는 접합부를 갖는 스플린트 프로브 상의 영역에 상보적인 스플린트-패드락 어닐링 서열 (패드락 프로브에서 박스로 강조표시된 스플린트 프로브에 상보적인 뉴클레오티드), 동일한 바코드의 2개의 영역 ("바코드 서열"로 표지됨), mRNA를 표적화하는 20 nt 혼성화 영역 (패드락 프로브에서 박스로 강조표시된 mRNA에 상보적인 뉴클레오티드) 및 프라이머-패드락 어닐링 서열 (패드락 프로브에서 박스로 강조표시된 프라이머 프로브에 상보적인 뉴클레오티드)을 함유한다. 프라이머 프로브는 패드락 프로브 옆의 mRNA 영역을 표적화하는 20 nt 혼성화 영역 (프라이머 프로브에서 박스로 강조표시된 mRNA에 상보적인 뉴클레오티드) 및 패드락 프로브 상의 영역에 상보적인 프라이머-패드락 어닐링 서열 (프라이머에서 박스로 강조표시된 패드락에 상보적인 뉴클레오티드)을 함유한다.

도 4a-4b는 siRNA 형질감염에 의한 7개의 N^6-메틸아데노신 (m^6A) 기록자 또는 판독자의 녹다운의 STAR맵 분석을 보여준다. 도 4a는 야생형 세포와 비교하여 각각의 세포가 1개의 siRNA로 녹다운된 경우의 유전자 발현의 클러스터링된 열지도를 제공한다. 도 4b는 판독물의 카운트 (좌측) 및 세포당 유전자의 카운트 (우측)의 히스토그램을 제공한다.

도 5는 데이터 프로세싱 파이프라인을 보여준다. 원래 STAR맵을 위해 설계된 이러한 프로세싱 파이프라인은 미가공 영상화 데이터로부터 판독물을 추출하는 전형적인 컴퓨터 워크플로우를 보여준다.

도 6a-6b는 시간하 및 세포하 해상도에서 시간적으로 해상된 STAR맵에 대한 개략도를 제공한다. 도 6a는 STAR맵의 원리를 보여준다. 세포 또는 조직이 고정된 후, 세포 내의 세포내 mRNA에 혼성화하는 DNA 프로브는 cDNA 앰플리콘으로서 효소적으로 복제된다. DNA 프로브의 각각의 쌍은 유전자 정체를 코딩하는 바코드 (프로브 상에 표지된 바와 같음)를 함유하고, 이는 계내 서열분석을 통해 형광 색상으로서 판독된다. 도 6b는 시간적으로 해

상된 STAR맵을 보여준다. 전사, 핵 유출 및 분해 속도가 트랜스크립톰 규모로 측정된다. 에티닐-우리딘 (EU)이 새로이 전사된 RNA를 짧은 펄스로 표지하는 데 사용되고, 상이한 사례 지속기간 후에 샘플이 고정된다. 표지된 RNA는 중합성 모이어티에 의해 클릭 화학을 통해 계내 변형된 다음, 아크릴아미드와 공중합되어 히드로겔 네트워크 (파상선) 내에 포매되고, 이어서 비표지된 RNA는 소거된다. 세포 내부의 RNA의 시공간적 궤적은 다중 시점에서 STAR맵 결과를 통합함으로써 재구축된다.

도 7은 TEMPO맵 방법의 워크플로우를 보여주는 추가의 개략도를 제공한다. 관능화된 cDNA 앰플리콘은 폴리아크릴아미드 매트릭스에 공유 연결되어 조직 클리어링 및 생체분자 프로세싱을 가능하게 한다.

도 8a-8b는 펄스-추적 실험에서 HeLa 세포에서의 hACTB의 표적화를 보여준다. 도 8a는 5-EU 표지된 인간 HeLa 세포의 미가공 형광 영상을 제공한다. HeLa 세포를 2시간 동안 표지하고 (펄스), 이어서, 고정 및 계내 서열분석 정량화 전에, 5-EU의 부재 하에 다양한 시간량 동안 배양하였다 (추적: 0, 2, 4, 또는 6시간). 신생 전사된 hACTB RNA의 공간 국재화는 담회색으로 제시되고, 세포 핵의 공간 국재화는 암회색으로 제시된다. 도 8b는 상이한 조건 하에 hACTB RNA 대 세포 핵 (DAPI 염색) 형광 강도의 비의 정량화를 보여준다.

도 9a-9b는 시간 경과 동안 HeLa 세포에서의 4개의 m^6A-관련 RNA의 표적화를 보여준다. 도 9a는 5-EU 표지된 인간 HeLa 세포의 미가공 형광 영상을 제공한다. HeLa 세포를 12시간 동안 표지하고, 표지 직후에 고정시킨 후, 계내 서열분석하였다. 4개의 채널은 각각 4개의 인간 RNA의 국재화를 보여준다. 음성 대조군의 세포는 5-EU 표지 없이 배양하였다. 도 9b는 1-시간 표지된 HeLa 세포에 이어, 고정 전 5-EU의 부재 하의 다양한 시간의 세포 배양 (추적: 0-6시간)의 미가공 형광 영상을 제공한다. 각각의 채널은 1가지 유형의 RNA의 공간 정보를 나타낸다. 범례는 도 9a에 표시된다.

도 10a-10d는 TEMPO맵 개략도 및 검증을 보여준다. 도 10a는 TEMPO맵 워크플로우의 개관: 다중 시점의 계내 신생 RNA 서열분석에 이은 시공간적 RNA 분석을 제공한다. 도 10b는 TEMPO맵 앰플리콘 라이브러리 제조 및 계내 SEDAL 서열분석의 절차를 보여주는 TEMPO맵 실험 워크플로우의 개략도를 제공한다. 도 10c는 3-부분 DNA 프로브 설계에 대한 근거를 보여준다. 앰플리콘의 생성은 스플린트 프로브, 원형화된 패드락 프로브, 및 프라이머 프로브의 존재를 필요로 한다. 도 10d (좌측)는 신호 증폭을 위한 3-부분 프로브 요건을 보여주는, 도 10c의 음성 대조군 실험의 개략도 및 대표적인 형광 세포 영상을 제공한다. mRNA_I은 ACTB를 나타내고, mRNA_II는 GAPDH를 나타낸다. 모든 4개의 영상은 HeLa 세포 (암회색의 DAPI) 내의 ACTB (담회색) mRNA를 보여준다. 우측: 세포당 평균 앰플리콘 판독물을 보여주는 세포 영상의 정량화 (각각의 조건은 ~300개의 세포를 함유하는 5개의 영상을 측정함). ****p < 1e-04. 축척 막대: 10 μm.

도 11a-11e는 단일-세포 및 세포하 트랜스크립톰의 시공간적 분할을 보여준다. 도 11a는 TEMPO맵 펄스-추적 실험의 설계를 보여준다. 도 11b는 STAR맵 프로브-표적화 유전자 발현에 의해 정규화된 각각의 펄스-추적 시점에 대한 세포-당-판독물 (앰플리콘) 카운트를 보여준다. 도 11c는 각각의 시점에서 사이클 1의 대표적인 단일 세포의 확대도와 함께, 공정중 TEMPO맵의 3D 형광 영상을 보여준다. Z-스택 범위: 10 μm. 도 11d는 하나의 대표적인 세포의 세포하 영역 할당 (핵, 중간, 및 주변부) (하단) 및 각각의 시점에서 모든 세포의 각각의 세포하 영역 내의 판독물의 분율을 요약한 박스플롯 (상단)을 보여준다. ****P < 0.001 (n = 1000-2000). 도 11e는 친화도-기반 궤적 포매를 위한 열-확산 잠재력 (PHATE)에 의한 가시화로서 제공되고 펄스-추적 시점별 (I, III) 또는 세포-주기 마커 유전자 발현별 (II, IV)로 채색된 TEMPO맵 단일-세포 (상단 열) 또는 핵세포질 (중간 열) RNA 측정치를 보여준다. RNA 분해 벡터 필드에 의해 추론된 흑색 화살표는 주로 추적 시간 진행의 이행 방향을 보여준다. PHATE 좌표 상에서 분리된 G2/M 기 세포의 대표적인 미가공 영상을 하단 열에 제공한다. 축척 막대: 15 μm.

도 12a-12g는 세포 주기에 걸친 RNA 세포하 역학의 정량적 추정을 보여준다. 도 12a는 RNA 동역학적 파라미터를 추정하기 위한 동적 모델을 보여준다. 각각의 유전자에 대해, RNA 합성 (α) 및 전세포 분해 상수 (β)를 단일-세포 RNA 농도를 사용하여 추정하였다. 유출 상수 (λ), 핵 분해 상수 (βn), 및 세포질 (βc)을 세포하 RNA 농도를 사용하여 추정하였다. 도 12b는 DR-기반 분석을 사용하여 세포질 전위 (γ)를 추정하기 위한 동적 모델을 보여준다. 도 12c는 추정에 사용된 RNA 생활 주기 및 동역학적 가정의 수학적 모델을 보여준다 (하단 우측). 도 12c는 또한 QC를 통과한 모든 유전자에 대한 6개의 파라미터의 히스토그램 및 파라미터와 R 값 (피어슨 상관관계) 및 선형 피팅 곡선 (하단 좌측)의 쌍별 상관관계를 도시한 산점도를 보여준다. 상관관계를 나타내는 파라미터의 쌍은 별표로 강조표시된다 (R > 0.1). 도트의 강도는 국부 밀도를 나타낸다. 도 12d는 3개의 세포-주기 기 (G1, G1/S, G2/M)로부터 단일-세포를 사용하여 추정된 6개의 파라미터의 쌍별 상관관계 매트릭스를 도시한 열지도를 제공한다. 제공된 범례에 따른 음영은 피어슨 상관관계의 값을 나타낸다. 박스 영역은

세포 주기에 걸친 각각의 파라미터의 상관관계를 나타낸다. 도 12e는 세포 주기에 걸쳐 모든 18개의 추정된 파라미터를 사용한 유전자 클러스터링을 보여주는 UMAP 표현 (좌측) 및 열지도 (우측)를 제공한다. 열지도에 제공된 범례에 따른 음영은 파라미터별 z-점수 정규화된 값을 나타낸다. 도 12f는 DAVID를 사용한 도 12e의 각각의 클러스터 내의 유전자의 경로 풍부화 분석을 보여준다. 도 12g는 펄스-추적 시점에 걸친 대표적인 세포에서의 4개의 동역학적 클러스터의 가시화를 제공한다. 축척 막대: 10 μm.

도 13a-13g는 유전자 기능에 의한 차등 RNA 역학 및 전사후 특징을 보여준다. 도 13a는 모든 시점을 합산한 경우의 단일-세포 RNA 공변량에 의한 모든 유전자의 쌍별 상관관계를 도시한 열지도를 제공하며, 여기서 음영은 피어슨 상관관계의 값을 나타낸다. 도 12e로부터의 4개의 동역학적 클러스터는 우측에 음영표시되고, 이는 각각의 유전자가 속하는 클러스터를 나타낸다. 군 1 및 2는 고도로 상관된 유전자 모듈에 대해 강조표시된다. 도 13b는 군 1 (상단) 및 2 (하단)의 확대도를 보여주며, 이는 개별 시점에 걸친 각각의 유전자 모듈의 RNA 공변량의 상관관계를 보여준다. 개별 시점의 완전한 열지도는 도 19a에 제시된다. 도 13c는 군 1 및 2에서의 유전자의 경로 풍부화 분석 결과를 제시한다. 도 13d는 군 1 및 2에서의 RNA 합성 (α, 좌측) 및 전세포 분해 상수 (β, 우측)의 분포를 보여주는 박스 플롯을 제공한다. 도 13e는 DNA-결합, RNA-결합, 및 세포-세포 접합부-관련 유전자에 대해 추정된 6개의 파라미터의 분포를 보여주는 박스 플롯을 제공한다. 도 13f는 세포 주기에 걸친 DNA-결합, RNA-결합, 및 세포-세포 접합부 관련 유전자에 대한 파라미터 상관관계 매트릭스를 보여주는 열지도를 제공한다. 음영은 피어슨 상관관계의 값을 나타낸다. 박스 영역은 세포 주기에 걸친 각각의 파라미터의 상관관계를 나타낸다. 도 13g는 m^6A 및 비-m^6A RNA에 대해 추정된 6개의 파라미터를 비교한 박스 플롯을 보여준다. ** p<0.05, *** p<0.01, **** p<0.001. y-축의 범위는 도 13e 및 13g의 값의 25-75% 사분위수에 대해 선택되었다.

도 14a-14e는 TEMPO맵 실험 설계 및 최적화를 보여준다. 도 14a는 아지드-변형된 스플린트 및 EU-표지된 신생 전사체를 접합시키기 위한 CuAAC-매개된 클릭 화학의 사용을 보여준다. 도 14b는 TEMPO맵 2-프로브 및 3-프로브 설계의 비교를 보여준다. 좌측, 프로브 설계 개략도. 중간, 센스-표적화 및 안티센스-표적화 패드락 및 프라이머로 처리된 세포의 대표적인 형광 영상. 우측, 세포 영상에서의 형광의 정량화 (각각의 측정에 대해 n = 150-200). 도 14c는 TEMPO맵 3-프로브 시스템의 DNA 서열을 보여준다. 도 14d는 개념 증명 펄스-추적 실험 (상단)에 이어, 1시간 EU 처리 후 상이한 시간으로 추적한 경우의 ACTB mRNA의 전위를 보여주는 미가공 세포 영상 (하단)을 보여준다. 세포 핵 (암회색), 앰플리콘 (담회색). 축척 막대: 10 μm. 도 14e는 실험 워크플로우에서 TEMPO맵에 의한 신생 RNA 및 STAR맵에 의한 총 RNA의 동시 맵핑 및 서열분석을 보여준다. TEMPO맵-표적화된 앰플리콘 판독물을 STAR맵-표적화된 RNA의 판독물에 대해 정규화하였다.

도 15a-15d는 TEMPO맵 데이터 프로세싱 및 분석을 보여준다. 도 15a는 TEMPO맵 데이터 분석 파이프라인을 보여준다. 도 15b는 세포하 구획에서의 판독물 할당의 개략도를 제공한다. 도 15c는 세포당 검출된 판독물 (DNA 앰플리콘) (좌측), 및 세포당 유전자 (우측)를 보여주는 히스토그램을 제공한다. 도 15d는 세포질에서의 거리 비 (DR)-기반 세포하 분할의 개략도를 제공한다. 각각의 앰플리콘에 대한 2개의 값을 3D에서 계산하였다: d_1, 핵막까지의 최단 거리; d_2, 세포막까지의 최단 거리. "중간"은 DR = 0 내지 10으로 정의된 영역이다. "주변부"는 DR > 10으로 정의된다.

도 16a-16d는 RNA 세포하 분석 및 세포-주기 기 확인을 보여준다. 도 16a는 6시간 추적 시점에서의 991개 유전자의 앰플리콘 판독물의 핵-대-세포질 비를 보여준다. 유전자를 비에 따라 위에서 아래로 순위화하였다. 도 16b는 TEMPO맵 표지된 RNA 발현을 통해 측정된 세포-주기 유전자 마커에 의한 세포-주기 확인 (G1, G1/S, G2/M)을 보여준다. 세포를 PCA를 통해 가시화하고, 세포-주기 기별로 음영표시하였다 (상단 좌측). 모든 세포-주기 유전자 마커 (하단 좌측) 및 4개의 대표적인 마커 (우측)의 미가공 카운트에서의 변동을 가상시간 분석에 의해 추정하였다. 도 16c는 scEU-seq 데이터세트를 사용한 1시간 표지된 판독물 및 총 판독물에 의한 세포-주기 확인의 비교를 제공하며, 이는 유의한 차이가 없음을 보여준다. 각각의 박스 내의 수는 세포의 수를 나타낸다. 도 16d는 핵세포질 매트릭스의 PHATE 포매에 기초한 세포 클러스터링 결과를 제공한다. 클러스터 1은 미가공 영상의 육안 검사에 의해 M 기의 세포를 통합한다.

도 17a-17h는 RNA 동역학적 파라미터 추정을 보여준다. 도 17a는 세포 부피 (복셀 단위)와 단일-세포 판독물 사이의 상관 관계를 보여주며, 이는 세포 부피에 의한 전사체 수의 영향을 나타낸다. 도 17b는 핵 및 세포질에서의 1가지 RNA 종의 상이한 농도를 보여주는 개략도를 제공한다. 도 17c는 RNA 동역학적 파라미터 (α, β, βn, λ, βc)를 추정하기 위한 수학적 모델 및 계산 및 피팅 절차의 상세한 워크플로우를 보여준다. 주: X(t) = 단일-세포 RNA 농도; N(t) = 핵 RNA 농도; C(t) = 세포질 RNA 농도; p (핵 프로세싱 상수) = βn + λ. 명

확성을 위해, $\beta_n = \beta n$, $\beta_c = \beta c$이다. 도 17d는 $R^2 \sim 1$ (좌측) 및 $R^2 \sim 0.5$ (우측)인 유전자의 시점에 걸친 X(t)의 자연 로그에서의 변화를 보여준다. 추정된 β 및 p는 품질 제어로서 $R^2 > 0.5$의 역치로 필터링되었다. 도 17e는 0-6시간의 추적 시점에 걸친 모든 991개의 유전자에 대한 단일 세포-평균 DR 값의 분포를 보여준다. 도 17f는 모든 유전자에 대한 추정된 γ (세포질 전위) 값의 히스토그램을 제공한다. 파선은 관찰된 전위의 반대 방향을 나타내는 $\gamma > 0$ 및 $\gamma < 0$으로 유전자를 분리한다. 도 17g는, 좌측에서, $\gamma < 0$ ($R^2 > 0.5$)의 12개의 유전자가 세포외 엑소솜 및 막횡단 단백질에서 강하게 풍부화되었음을 보여준다 (9/12). 도 17g는, 중간에서, 대표적인 유전자의 시간-경과 DR 값을 보여준다. 도 17h는 $\gamma < 0$인 유전자의 RNA 전위의 관찰된 내부 방향을 보여주는 개략도를 제공한다.

도 18a-18k는 세포-주기 단계에 걸친 RNA 동역학적 파라미터를 보여준다. 도 18a-18f는 도 12d의 쌍별 상관관계의 예를 제공하며, G1과 G2/M 사이의 관계의 산점도를 보여준다. 좌측에서 우측으로, 상관관계 계수: α (R = 0.99), β (R = 0.77), βn (R = 0.70), λ (R = 0.65), βc (R = 0.36), γ (R = 0.07). R은 피어슨 상관관계의 값을 나타낸다. 도 18g-18h는 각각의 세포-주기 기 (G1, G1/S, G2/M)에 대해 단일-세포 RNA 발현 (도 18g) 및 공개된 scEU-seq 데이터세트 (도 18h)로부터 RNA 합성 (α) 및 분해 (β)가 추정되었음을 보여준다. 도 18i는 각각의 세포-주기 상태에서 추정된 각각의 6개의 파라미터 (좌측에서 우측으로: α, β, βn, λ, βc, γ)의 분포를 보여주는 밀도 플롯을 제공한다. 처음 5개의 파라미터는 RNA 농도로부터 추정되었고, γ는 DR 값으로부터 추정되었으며, 이는 3개의 상태에 걸쳐 전반적인 변화가 없음을 보여준다. 도 18j는 G2 및 M 기에서의 세포의 βn, λ, βc의 분포를 보여주는 바이올린 플롯을 제공한다. M 기는 도 16d에서 확인되었고; G2 기는 나머지 G2/M 세포였다. 도 18k는 각각의 동역학적 클러스터에서 시간 경과에 따른 RNA 판독물의 세포하 분포를 보여주는 박스플롯을 제공한다.

도 19a-19h는 유전자 기능 및 전사후 변형 상태에서의 RNA 동역학의 변동을 보여준다. 도 19a는 0시간, 2시간, 4시간 및 6시간 (좌측에서 우측으로) 추적 시점의 TEMPO맵-측정된 유전자 발현에서의 단일-세포 변이로부터의 쌍별 상관관계 계수의 매트릭스를 보여주는 열지도를 제공한다. 각각의 매트릭스를 따른 유전자 순서는 동일하였고, 4개의 시점을 조합한 매트릭스의 계층적 클러스터링 트리에 의해 결정하였다 (도 13a). 각각의 매트릭스의 측면 막대는 도 12e로부터의 유전자 클러스터의 음영표시된 주석을 보여준다. 도 19b는 유전자 온톨로지에 의해 분석된 991개의 유전자의 주요 분자 기능을 기재한 파이 차트를 제공한다. 도 19c는 유전자 풀에서의 m^6A-RNA 메틸화를 기재한 파이 차트를 제공한다. 도 19d는 유전자 풀에서의 YTHDC1에 대한 관계를 기재한 파이 차트를 제공한다. 도 19e는 3개의 세포-주기 기에 걸쳐 m^6A 및 비-m^6A RNA에 대해 추정된 6개의 파라미터를 비교한 박스 플롯을 제공한다. ** $p<0.05$, *** $p<0.01$. y-축의 범위는 값의 25-75% 사분위수에 대해 선택되었다. 도 19f는 대조군 세포 및 siYTHDC1 세포에서 다른 6개의 STAR맵-표적화된 유전자 (METTL3/14, YTHDC2, YTHDF1-3)의 발현에 의해 정규화된 YTHDC1의 발현을 보여준다. 도 19g는 (좌측에서 우측으로) 0-6시간 추적 시점에서 YTHDC1의 녹다운 후 핵-대-세포질 발현 비에서의 $\log_2$ 배수 변화의 누적 분포를 보여준다. 도 19h는 YTHDC1의 녹다운 후 6개의 파라미터에서의 $\log_2$ 배수 변화의 누적 분포를 보여준다.

도 20a-20b는 생체내 TEMPO맵의 원리를 보여준다. 대사적으로-표지된 살아있는 동물의 시공간적으로 해상된 전사체학에 대한 조직 절편에서의 신생 RNA 표지 화학이 제시된다. 도 20a는 생체내 TEMPO맵 워크플로우를 보여준다. EU-주사된 마우스 (1 mg EU) 및 PBS-주사된 대조군으로부터의 조직을 수거하고, 투여 2시간 후에 고정시켰다. 조직을 절편화하고, DNA 앰플리콘 라이브러리 제조를 위해 TEMPO맵 워크플로우에 의해 화학적으로 프로세싱하였다. 이어서, DNA 앰플리콘을 형광 영상화 라운드에 의해 계내 서열분석하였다. 도 20b (좌측) EU-주사된 심장 절편은 PBS-주사된 대조군과 비교하여 앰플리콘의 신호에서 강한 풍부화를 보여주었고, 이는 생체내 TEMPO맵의 높은 신호-대-잡음 비를 입증한다. 도 20b (우측) 마우스 심장의 2-시간 EU-표지 윈도우에서의 4개의 유전자 (Myh6, Flt1, Dach1, Lamc1)의 신생 전사 신호 및 PBS-주사된 마우스 심장에서의 최소 배경 신호를 보여주는 심장 절편의 대표적인 형광 영상.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 정의

[0052] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참고문헌은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명

에 사용된 많은 용어의 일반적 정의를 제공한다: 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)]. 본원에 사용된 하기 용어는 달리 명시되지 않는 한 그에 대해 부여된 의미를 갖는다.

[0053] 용어 "투여하다", "투여하는" 및 "투여"는 대상체 내에 또는 대상체 상에 치료제 또는 요법제, 또는 치료제 또는 요법제의 조성물을 이식, 흡수, 섭취, 주사, 흡입 또는 달리 도입하는 것을 지칭한다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "앰플리콘"은 증폭 반응 (즉, 유전자 단편 또는 표적 서열의 1개 이상의 카피 생산) 또는 복제 반응의 생성물인 핵산 (예를 들어, DNA 또는 RNA)을 지칭한다. 앰플리콘은, 예를 들어 PCR 또는 다른 중합 반응을 사용하여 인공적으로 형성될 수 있다. 용어 "연쇄된 앰플리콘"은 함께 연결되어 단일 핵산 분자를 형성하는 다중 앰플리콘을 지칭한다. 연쇄된 앰플리콘은, 예를 들어 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 연쇄된 다중 앰플리콘을 포함하는 단일 핵산 분자로서 올리고뉴클레오티드의 다중 선형 카피를 생산하는 롤링 서클 증폭 (RCA)에 의해 형성될 수 있다.

[0055] 용어 "혈관신생"은 기존 혈관으로부터 새로운 혈관이 형성되는 생리학적 과정을 지칭한다. 혈관신생은 중배엽 세포 전구체로부터의 내피 세포의 신생 형성인 혈관생성과 구별된다. 발생 중인 배아에서의 제1 혈관은 혈관생성을 통해 형성되고, 그 후 혈관신생은 정상적 또는 비정상적 발생 동안 대부분의 혈관 성장을 담당한다. 혈관신생은 성장 및 발육, 뿐만 아니라 상처 치유 및 육아 조직의 형성에서 필수적인 과정이다. 그러나, 혈관신생은 또한 양성 상태에서 악성 상태로의 종양 이행에서 근본적인 단계이며, 이는 암의 치료에서 혈관신생 억제제의 사용으로 이어진다. 혈관신생은 혈관신생 단백질, 예컨대 성장 인자 (예를 들어, VEGF)에 의해 화학적으로 자극될 수 있다. "병리학적 혈관신생"은 질환에 이르고/거나 질환과 연관된 비정상적 (예를 들어, 과도하거나 불충분한) 혈관신생을 지칭한다.

[0056] "항체"는 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 당단백질을 지칭한다. 용어 항체 및 이뮤노글로불린은 상호교환 가능하게 사용된다. 일부 예외로, 포유동물 항체는 전형적으로 각각 2개의 큰 중쇄 및 2개의 작은 경쇄를 갖는 기본 구조 단위로 제조된다. 여러 상이한 유형의 항체 중쇄, 및 여러 상이한 종류의 항체가 존재하며, 이들은 이들이 보유하는 중쇄에 기초하여 상이한 이소형으로 함께 그룹화된다. 포유동물에서 5종의 상이한 항체 이소형 (IgG, IgA, IgE, IgD 및 IgM)이 공지되어 있으며, 이는 상이한 역할을 수행하고, 이들이 마주치는 각각의 상이한 유형의 이물질에 대해 적절한 면역 반응을 지시하는 것을 돕는다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 또한 항체 단편 및 나노바디, 뿐만 아니라 항체의 변이체를 포괄한다. 용어 "항체 변이체"는 또한 항체 단편을 포괄하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 변이체는 질환 또는 장애 (예를 들어, 대상체로부터 채취한 세포에서의 시공간적 유전자 발현의 프로파일에서의 변화와 연관된 것)에 대한 치료로서 투여된다. "항암제"는 생물요법 항암제 뿐만 아니라 화학요법제를 포괄한다. 예시적인 생물요법 항암제는 인터페론, 시토카인 (예를 들어, 종양 괴사 인자, 인터페론 α, 인터페론 γ), 백신, 조혈 성장 인자, 모노클로날 혈청요법, 면역자극제 및/또는 면역조정제 (예를 들어, IL-1, 2, 4, 6 또는 12), 면역 세포 성장 인자 (예를 들어, GM-CSF) 및 항체 (예를 들어, 헤르셉틴 (트라스투주맙), T-DM1, 아바스틴 (베바시주맙), 에르비툭스 (세툭시맙), 벡티빅스 (파니투무맙), 리툭산 (리툭시맙), 벡사르 (토시투모맙))를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 화학요법제는 항에스트로겐 (예를 들어, 타목시펜, 랄록시펜 및 메게스트롤), LHRH 효능제 (예를 들어, 고스크르클린 및 류프롤리드), 항안드로겐 (예를 들어, 플루타미드 및 비칼루타미드), 광역학 요법 (예를 들어, 베르토포르핀 (BPD-MA), 프탈로시아닌, 광증감제 Pc4 및 데메톡시-히포크렐린 A (2BA-2-DMHA)), 질소 머스타드 (예를 들어, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 트로포스파미드, 클로람부실, 에스트라무스틴 및 멜팔란), 니트로소우레아 (예를 들어, 카르무스틴 (BCNU) 및 로무스틴 (CCNU)), 알킬술포네이트 (예를 들어, 부술판 및 트레오술판), 트리아젠 (예를 들어, 다카르바진, 테모졸로미드), 백금 함유 화합물 (예를 들어, 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴), 빈카 알칼로이드 (예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신 및 비노렐빈), 탁소이드 (예를 들어, 파클리탁셀 또는 파클리탁셀 등가물, 예컨대 나노입자 알부민-결합된 파클리탁셀 (아브락산), 도코사헥사엔산 결합된-파클리탁셀 (DHA-파클리탁셀, 탁소프렉신), 폴리글루타메이트 결합된-파클리탁셀 (PG-파클리탁셀, 파클리탁셀 폴리글루멕스, CT-2103, XYOTAX), 종양-활성화 전구약물 (TAP) ANG1005 (파클리탁셀의 3개의 분자에 결합된 안지오펩-2), 파클리탁셀-EC-1 (erbB2-인식 펩티드 EC-1에 결합된 파클리탁셀), 및 글루코스-접합된 파클리탁셀, 예를 들어 2'-파클리탁셀 메틸 2-글루코피라노실 숙시네이트; 도세탁셀, 탁솔), 에피포도필린 (예를 들어, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트, 테니포시드, 토포테칸, 9-아미노캄프토테신, 캄프토이리노테칸, 이리노테칸, 크리스나톨, 미토마이신 C), 항대사물, DHFR 억제제 (예를 들어, 메토트렉세이트, 디클로로메

토트렉세이트, 트리메트렉세이트, 에다트렉세이트), IMP 데히드로게나제 억제제 (예를 들어, 미코페놀산, 티아조푸린, 리바비린 및 EICAR), 리보뉴클레오티드 리덕타제 억제제 (예를 들어, 히드록시우레아 및 데페록사민), 우라실 유사체 (예를 들어, 5-플루오로우라실 (5-FU), 플록수리딘, 독시플루리딘, 라티트렉세드, 테가푸르-우라실, 카페시타빈), 시토신 유사체 (예를 들어, 시타라빈 (ara C), 시토신 아라비노시드, 및 플루다라빈), 퓨린 유사체 (예를 들어, 메르캅토퓨린 및 티오구아닌), 비타민 D3 유사체 (예를 들어, EB 1089, CB 1093, 및 KH 1060), 이소프레닐화 억제제 (예를 들어, 로바스타틴), 도파민성 신경독소 (예를 들어, 1-메틸-4-페닐피리디늄 이온), 세포 주기 억제제 (예를 들어, 스타우로스포린), 악티노마이신 (예를 들어, 악티노마이신 D, 닥티노마이신), 블레오마이신 (예를 들어, 블레오마이신 A2, 블레오마이신 B2, 페플로마이신), 안트라시클린 (예를 들어, 다우노루비신, 독소루비신, PEG화 리포솜 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 피라루비신, 조루비신, 미톡산트론), MDR 억제제 (예를 들어, 베라파밀), Ca^{2+} ATPase 억제제 (예를 들어, 탑시가르긴), 이마티닙, 탈리도미드, 레날리도미드, 티로신 키나제 억제제 (예를 들어, 악시티닙 (AG013736), 보수티닙 (SKI-606), 세디라닙 (레센틴(RECENTIN)™, AZD2171), 다사티닙 (스프리셀(SPRYCEL)®, BMS-354825), 에를로티닙 (타르세바(TARCEVA)®), 게피티닙 (이레사(IRESSA)®), 이마티닙 (글리벡(Gleevec)®, CGP57148B, STI-571), 라파티닙 (타이케르브(TYKERB)®, 타이베르브(TYVERB)®), 레스타우르티닙(CEP-701), 네라티닙 (HKI-272), 닐로티닙 (타시그나(TASIGNA)®), 세막사닙 (세막시닙, SU5416), 수니티닙 (수텐트(SUTENT)®, SU11248), 토세라닙 (팔라디아(PALLADIA)®), 반데타닙 (자크티마(ZACTIMA)®, ZD6474), 바탈라닙 (PTK787, PTK/ZK), 트라스투주맙 (헤르셉틴(HERCEPTIN)®), 베바시주맙 (아바스틴(AVASTIN)®), 리툭시맙 (리툭산(RITUXAN)®), 세툭시맙 (에르비툭스(ERBITUX)®), 파니투무맙 (벡티빅스(VECTIBIX)®), 라니비주맙 (루센티스(Lucentis)®), 닐로티닙 (타시그나(TASIGNA)®), 소라페닙 (넥사바르(NEXAVAR)®), 에베롤리무스 (아피니토르(AFINITOR)®), 알렘투주맙 (캄파트(CAMPATH)®), 겜투주맙 오조가미신 (밀로타르그(MYLOTARG)®), 템시롤리무스 (토리셀(TORISEL)®), ENMD-2076, PCI-32765, AC220, 도비티닙 락테이트 (TKI258, CHIR-258), BIBW 2992 (토보크(TOVOK)™), SGX523, PF-04217903, PF-02341066, PF-299804, BMS-777607, ABT-869, MP470, BIBF 1120 (바르가테프(VARGATEF)®), AP24534, JNJ-26483327, MGCD265, DCC-2036, BMS-690154, CEP-11981, 티보자닙 (AV-951), OSI-930, MM-121, XL-184, XL-647, 및/또는 XL228), 프로테아솜 억제제 (예를 들어, 보르테조밉 (벨케이드), mTOR 억제제 (예를 들어, 라파마이신, 템시롤리무스 (CCI-779), 에베롤리무스 (RAD-001), 리다포롤리무스, AP23573 (아리아드(Ariad)), AZD8055 (아스트라제네카(AstraZeneca)), BEZ235 (노파르티스(Novartis)), BGT226 (노파르티스), XL765 (사노피 아벤티스(Sanofi Aventis)), PF-4691502 (화이자(Pfizer)), GDC0980 (제넨테크(Genentech)), SF1126 (세마포에(Semafoe)), 및 OSI-027 (OSI)), 오블리메르센, 겜시타빈, 카르미노마이신, 류코보린, 페메트렉세드, 시클로포스파미드, 다카르바진, 프로카르비진, 프레드니솔론, 덱사메타손, 캄파테신, 플리카마이신, 아스파라기나제, 아미노프테린, 메토프테린, 포르피로마이신, 멜팔란, 류로시딘, 류로신, 클로람부실, 트라벡테딘, 프로카르바진, 디스코데르몰리드, 카르미노마이신, 아미노프테린, 및 헥사메틸 멜라민을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0057] "자가면역 질환"은 신체에 정상적으로 존재하는 물질 및 조직에 대한 대상체의 신체의 부적절한 면역 반응으로부터 발생하는 질환을 지칭한다. 다시 말해서, 면역계는 신체의 일부 부분을 병원체로 오인하고, 그 자신의 세포를 공격한다. 이는 특정 기관에 제한적일 수 있거나 (예를 들어, 자가면역 갑상선염에서), 또는 상이한 장소에서의 특정한 조직을 포함할 수 있다 (예를 들어, 폐 및 신장 둘 다에서 기저막에 영향을 미칠 수 있는 굿패스처병). 자가면역 질환의 치료는 전형적으로 면역억제, 예를 들어 면역 반응을 감소시키는 의약을 사용한다. 예시적인 자가면역 질환은 사구체신염, 굿패스처 증후군, 괴사성 혈관염, 림프절염, 결절성 동맥주위염, 전신 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 건선성 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 건선, 궤양성 결장염, 전신 경화증, 피부근염/다발근염, 항-인지질 항체 증후군, 경피증, 심상성 천포창, ANCA-연관 혈관염 (예를 들어, 베게너 육아종증, 현미경적 다발혈관염), 포도막염, 쇼그렌 증후군, 크론병, 라이터 증후군, 강직성 척추염, 라임병, 길랑-바레 증후군, 하시모토 갑상선염 및 심근병증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "생물직교 관능기"는 시스템 내부의 임의의 천연 생화학적 과정을 방해하지 않으면서 살아있는 시스템 내부 (예를 들어, 세포 내부)의 화학 반응에 사용될 수 있는 관능기를 지칭한다. 생물직교 관능기는, 예를 들어 클릭 화학 핸들을 포함한다. 본원에 사용된 용어 "클릭 화학 핸들"은 클릭 화학 반응에 참여할 수 있는 반응물 또는 반응성 기를 지칭한다. 예시적인 클릭 화학 핸들은 본원에 참조로 포함된 미국 특허 공개 20130266512에 입증되어 있다. 예를 들어, 변형된 알킨, 예를 들어 시클로옥틴은 이것이 변형-촉진된 고리화첨가에 참여할 수 있기 때문에 클릭 화학 핸들이다. 일반적으로, 클릭 화학 반응은 서로 반응할 수 있는 클릭 화학 핸들을 포함하는 적어도 2개의 분자를 필요로 한다. 서로 반응성인 이러한 클릭 화학 핸들 쌍은 때때로 본원에서 파트너 클릭 화학 핸들로 지칭된다. 예를 들어, 아지드는 알킨과 파트너 클릭 화학 핸들이다. 예시적

인 클릭 화학 핸들은 알켄, 디엔, 테트라진, 트랜스-시클로옥텐, 알킨, 아지드, 니트론 및 테트라졸을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 클릭 화학을 통해 접합되는 2개의 분자에 대해, 분자의 클릭 화학 핸들은, 예를 들어 클릭 화학 핸들 중 하나의 반응성 모이어티가 제2 클릭 화학 핸들의 반응성 모이어티와 반응하여 적어도 1개의 공유 결합을 형성할 수 있다는 점에서 서로 반응성이어야 한다. 클릭 화학 핸들의 이러한 반응성 쌍은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.

[0059] 용어 "암"은 제어불가능하게 증식하고 정상 신체 조직을 침윤 및 파괴하는 능력을 갖는 비정상 세포의 발생을 특징으로 하는 질환의 부류를 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [Stedman's Medical Dictionary, 25th ed.; Hensyl ed.; Williams & Wilkins: Philadelphia, 1990]을 참조한다. 예시적인 암은 청신경종; 선암종; 부신암; 항문암; 혈관육종 (예를 들어, 림프관육종, 림프관내피육종, 혈관육종); 충수암; 양성 모노클로날 감마글로불린병증; 담도암 (예를 들어, 담관암종); 방광암; 유방암 (예를 들어, 유방의 선암종, 유방의 유두상 암종, 유방암, 유방의 수질성 암종); 뇌암 (예를 들어, 수막종, 교모세포종, 신경교종 (예를 들어, 성상세포종, 핍지교종), 수모세포종); 기관지암; 카르시노이드 종양; 자궁경부암 (예를 들어, 자궁경부 선암종); 융모막암종; 척삭종; 두개인두종; 결장직장암 (예를 들어, 결장암, 직장암, 결장직장 선암종); 결합 조직암; 상피 암종; 상의세포종; 내피육종 (예를 들어, 카포시 육종, 다발성 특발성 출혈성 육종); 자궁내막암 (예를 들어, 자궁암, 자궁 육종); 식도암 (예를 들어, 식도의 선암종, 바렛 선암종); 유잉 육종; 안구암 (예를 들어, 안내 흑색종, 망막모세포종); 가족성 과다호산구증가증; 담낭암; 위암 (예를 들어, 위 선암종); 위장 기질 종양 (GIST); 배세포암; 두경부암 (예를 들어, 두경부 편평 세포 암종, 구강암 (예를 들어, 경구 편평 세포 암종), 인후암 (예를 들어, 후두암, 인두암, 비인두암, 구인두암)); 조혈암 (예를 들어, 백혈병, 예컨대 급성 림프구성 백혈병 (ALL) (예를 들어, B-세포 ALL, T-세포 ALL), 급성 골수구성 백혈병 (AML) (예를 들어, B-세포 AML, T-세포 AML), 만성 골수구성 백혈병 (CML) (예를 들어, B-세포 CML, T-세포 CML), 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL) (예를 들어, B-세포 CLL, T-세포 CLL)); 림프종, 예컨대 호지킨 림프종 (HL) (예를 들어, B-세포 HL, T-세포 HL) 및 비-호지킨 림프종 (NHL) (예를 들어, B-세포 NHL, 예컨대 미만성 대세포 림프종 (DLCL) (예를 들어, 미만성 대 B-세포 림프종), 여포성 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종 (CLL/SLL), 외투 세포 림프종 (MCL), 변연부 B-세포 림프종 (예를 들어, 점막-연관 림프성 조직 (MALT) 림프종, 결절성 변연부 B-세포 림프종, 비장 변연부 B-세포 림프종), 원발성 종격 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포성 림프종 (즉, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증), 모발상 세포 백혈병 (HCL), 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B-림프모구성 림프종 및 원발성 중추 신경계 (CNS) 림프종; 및 T-세포 NHL, 예컨대 전구체 T-림프모구성 림프종/백혈병, 말초 T-세포 림프종 (PTCL) (예를 들어, 피부 T-세포 림프종 (CTCL) (예를 들어, 균상 식육종, 세자리 증후군), 혈관면역모세포성 T-세포 림프종, 결절외 자연 킬러 T-세포 림프종, 장병증 유형 T-세포 림프종, 피하 지방층염-유사 T-세포 림프종, 및 역형성 대세포 림프종); 상기 기재된 바와 같은 1종 이상의 백혈병/림프종; 및 다발성 골수종 (MM)의 혼합물, 중쇄 질환 (예를 들어, 알파 쇄 질환, 감마 쇄 질환, 뮤 쇄 질환); 혈관모세포종; 하인두암; 염증성 근섬유모세포성 종양; 면역세포성 아밀로이드증; 신장암 (예를 들어, 윌름스 종양으로도 공지된 신모세포종, 신세포 암종); 간암 (예를 들어, 간세포성암 (HCC), 악성 간세포암); 폐암 (예를 들어, 기관지원성 암종, 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 폐의 선암종); 평활근육종 (LMS); 비만세포증 (예를 들어, 전신 비만세포증); 근육암; 골수이형성 증후군 (MDS); 중피종; 골수증식성 장애 (MPD) (예를 들어, 진성 다혈구혈증 (PV), 본태성 혈소판증가증 (ET), 골수섬유증 (MF)으로도 공지된 원인불명 골수화생 (AMM), 만성 특발성 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병 (CML), 만성 호중구성 백혈병 (CNL), 과다호산구성 증후군 (HES)); 신경모세포종; 신경섬유종 (예를 들어, 제1형 신경섬유종증 (NF) 또는 제2형 슈반세포종증); 신경내분비암 (예를 들어, 위장췌장 신경내분비 종양 (GEP-NET), 카르시노이드 종양); 골육종 (예를 들어, 골암); 난소암 (예를 들어, 낭선암종, 난소 배아성 암종, 난소 선암종); 유두상 선암종; 췌장암 (예를 들어, 췌장 선암종, 관내 유두상 점액성 신생물 (IPMN), 도세포 종양); 음경암 (예를 들어, 음경 및 음낭의 파제트병); 송과체종; 원시 신경외배엽 종양 (PNT); 형질 세포 신생물; 부신생물성 증후군; 상피내 신생물; 전립선암 (예를 들어, 전립선 선암종); 직장암; 횡문근육종; 타액선암; 피부암 (예를 들어, 편평 세포 암종 (SCC), 각화극세포종 (KA), 흑색종, 기저 세포 암종 (BCC)); 소장암 (예를 들어, 충수암); 연부 조직 육종 (예를 들어, 악성 섬유성 조직구종 (MFH), 지방육종, 악성 말초 신경초 종양 (MPNST), 연골육종, 섬유육종, 근육종); 피지선 암종; 소장암; 한선 암종; 활막종; 고환암 (예를 들어, 정상피종, 고환 배아성 암종); 갑상선암 (예를 들어, 갑상선의 유두상 암종, 유두상 갑상선 암종 (PTC), 수질성 갑상선암); 요도암; 질암; 및 외음부암 (예를 들어, 외음부의 파제트병)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0060] 본원에 사용된 "세포"는 세포의 집단 (예를 들어, 조직, 기관 또는 유사기관) 내에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포의 집단은 복수의 세포 유형으로 구성된다. 본 개시내용의 방법에 사용하기 위한 세포는

유기체, 유기체로부터 유래된 단일 세포 유형, 또는 세포 유형의 혼합물 내에 존재할 수 있다. 자연 발생 세포 및 세포 집단, 유전자 조작된 세포주, 트랜스제닉 동물로부터 유래된 세포 등이 포함된다. 실질적으로 임의의 세포 유형 및 크기가 본원에 기재된 방법 및 시스템에 수용될 수 있다. 적합한 세포는 박테리아, 진균, 식물 및 동물 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포 (예를 들어, 복합 세포 집단, 예컨대 자연 발생 조직)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간으로부터의 것이다. 특정 실시양태에서, 세포는 의료 절차, 예컨대 생검을 통해 대상체 (예를 들어, 인간)로부터 수집된다. 대안적으로, 세포는 배양된 집단 (예를 들어, 복합 집단으로부터 유래된 배양물 또는 세포가 다중 계통으로 분화된 것인 단일 세포 유형으로부터 유래된 배양물)일 수 있다.

[0061] 본 개시내용의 방법에 사용하기 위해 고려되는 세포 유형은 줄기 및 전구 세포 (예를 들어, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 신경 능선 세포 등), 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 및 골격근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 조혈 세포, 림프구, 예컨대 T-세포 (예를 들어, Th1 T 세포, Th2 T 세포, Th0 T 세포, 세포독성 T 세포) 및 B 세포 (예를 들어, 프리-B 세포), 단핵구, 수지상 세포, 호중구, 대식세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 면역 세포, 뉴런, 간세포, 및 특정한 기관과 관련된 세포 (예를 들어, 흉선, 내분비선, 췌장, 뇌, 뉴런, 신경교, 성상세포, 수지상세포, 및 그의 유전자 변형 세포)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 세포는 또한 상이한 유형의 형질전환된 또는 신생물성 세포 (예를 들어, 상이한 세포 기원의 암종, 상이한 세포 유형의 림프종 등) 또는 임의의 종류의 암성 세포 (예를 들어, 본원에 개시된 임의의 암으로부터의 것)일 수 있다. 상이한 기원의 세포 (예를 들어, 외배엽, 중배엽, 및 내배엽)가 본 개시내용의 방법에서 사용하기 위해 또한 고려된다.

[0062] 본원에 사용된 용어 "유전자"는 코딩 서열 앞의 조절 서열 (5' 비-코딩 서열) 및 뒤의 조절 서열 (3' 비-코딩 서열)을 포함한 단백질을 발현하는 핵산 단편을 지칭한다. "천연 유전자"는 그 자체의 조절 서열을 갖는 자연에서 발견되는 유전자를 지칭한다.

[0063] 본원에 사용된 "유전자 발현"은 유전자로부터의 정보가 유전자 산물의 합성에 사용되는 과정을 지칭한다. 유전자 산물은 단백질 및 RNA 전사체 (예를 들어, 메신저 RNA, 전달 RNA, 또는 소형 핵 RNA)를 포함한다. 유전자 발현은 전사 및 번역을 포함한다. 전사는 DNA의 절편이 RNA 폴리머라제에 의해 RNA로 전사되는 과정이다. 번역은 RNA가 리보솜에 의해 펩티드 또는 단백질로 번역되는 과정이다. 본원에 사용된 용어 "유전자 정보"는 1개 이상의 유전자 및/또는 1개 이상의 RNA 전사체 (예를 들어, 임의의 수의 유전자 및/또는 RNA 전사체)를 지칭한다.

[0064] 용어 "유전 질환"은 대상체의 게놈에서의 하나 이상의 이상으로 인한 질환, 예컨대 대상체의 출생 시부터 존재하는 질환을 지칭한다. 유전 질환은 유전가능할 수 있고, 모체의 유전자로부터 물려받을 수 있다. 유전 질환은 또한 대상체의 DNA 및/또는 RNA의 돌연변이 또는 변화로 인한 것일 수 있다. 이러한 경우, 유전 질환은 배선에서 발생하는 경우에 유전가능할 것이다. 예시적인 유전 질환은 아르스코그-스콧 증후군, 아즈 증후군, 연골무형성증, 선단이골증, 중독, 부신-백질이영양증, 백색증, 무안검-대구증 증후군, 알라질 증후군, 알캅톤뇨증, 알파-1 항트립신 결핍, 알포트 증후군, 알츠하이머병, 천식, 자가면역 다선성 증후군, 안드로겐 불감성 증후군, 안젤만 증후군, 운동실조, 모세혈관확장성 운동실조, 아테롬성동맥경화증, 주의력 결핍 과잉행동장애 (ADHD), 자폐증, 탈모증, 배튼병, 베크위드-비데만 증후군, 베스트병, 양극성 장애, 브라키닥틸), 유방암, 버킷 림프종, 만성 골수성 백혈병, 샤르코-마리-투스병, 크론병, 구순열, 코케인 증후군, 코핀 로우리 증후군, 결장암, 선천성 부신 증식증, 코넬리아 드 랑쥐 증후군, 코스텔로 증후군, 코우덴 증후군, 두개전두비부 이형성증, 크리글러-나자르 증후군, 크로이츠펠트-야콥병, 낭성 섬유증, 난청, 우울증, 당뇨병, 이영양성 이형성증, 디조지 증후군, 다운 증후군, 난독증, 뒤시엔느 근육 이영양증, 두보위츠 증후군, 외배엽 이형성증, 엘리스-반 크레벨드 증후군, 엘러스-단로스, 수포성 표피박리증, 간질, 본태성 진전, 가족성 고콜레스테롤혈증, 가족성 지중해열, 유약 X 증후군, 프리드라이히 운동실조, 고셔병, 녹내장, 글루코스 갈락토스 흡수장애, 글루타르산뇨증, 뇌회형 맥락망막위축, 골드버그 쇼프린텐 증후군 (구개심장안면 증후군), 골린 증후군, 헤일리-헤일리병, 반쪽비대증, 혈색소증, 혈우병, 유전성 운동 및 감각 신경병증 (HMSN), 유전성 비 폴립증 결장직장암 (HNPCC), 헌팅톤병, 고-IgM을 동반한 면역결핍, 소아 발병 당뇨병, 클라인펠터 증후군, 카부키 증후군, 라이병, 긴 QT 증후군, 폐암, 악성 흑색종, 조울증, 마르팡 증후군, 멘케스 증후군, 유산, 뮤코폴리사카라이드 질환, 다발성 내분비 신생물, 다발성 경화증, 근육 이영양증, 근위축성 측삭 경화증, 근긴장성 이영양증, 신경섬유종증, 니만-픽병, 누난 증후군, 비만, 난소암, 췌장암, 파킨슨병, 발작성 야간 혈색소뇨, 펜드레드 증후군, 비골 근육 위축, 페닐케톤뇨 (PKU), 다낭성 신장 질환, 프라더-윌리 증후군, 원발성 담즙성 간경변증, 전립선암, REAR 증후군, 레프숨병, 색소성 망막염, 망막모세포종, 레트 증후군, 산필리포 증후군, 조현병, 중증

복합 면역결핍, 겸상 적혈구성 빈혈, 이분 척추, 척수성 근육 위축, 척수소뇌 위축, 성인 급사 증후군, 탄지에르병, 테이-삭스병, 혈소판감소 요골 무형성 증후군, 타운스-브로크스 증후군, 결절성 경화증, 터너 증후군, 어셔 증후군, 폰 히펠-린다우 증후군, 바르덴부르크 증후군, 위버 증후군, 베르너 증후군, 윌리암스 증후군, 윌슨병, 색소성 건피증 및 젤베거 증후군을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0065] "혈액 질환"은 조혈 세포 또는 조직에 영향을 미치는 질환을 포함한다. 혈액 질환은 이상 혈액 함량 및/또는 기능과 연관된 질환을 포함한다. 혈액 질환의 예는 골수 조사 또는 암에 대한 화학요법 치료로부터 유발되는 질환, 질환, 예컨대 악성 빈혈, 출혈성 빈혈, 용혈성 빈혈, 재생불량성 빈혈, 겸상 적혈구성 빈혈, 철적혈모구성 빈혈, 만성 감염, 예컨대 말라리아, 트리파노소마증, HTV, 간염 바이러스 또는 다른 바이러스와 연관된 빈혈, 골수 결핍으로 인한 골수로성 빈혈, 빈혈로부터 유발된 신부전, 빈혈, 다혈구혈증, 감염성 단핵구증(EVI), 급성 비-림프구성 백혈병 (ANLL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 급성 전골수구성 백혈병 (APL), 급성 골수단핵구성 백혈병 (AMMoL), 진성 다혈구혈증, 림프종, 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 백혈병, 윌름스 종양, 유잉 육종, 망막모세포종, 혈우병, 혈전증의 증가된 위험과 연관된 장애, 포진, 지중해빈혈, 항체-매개 장애, 예컨대 수혈 반응 및 적모구증, 적혈구에 대한 기계적 외상, 예컨대 미세혈관병증성 용혈성 빈혈, 혈전성 혈소판감소성 자반증 및 파종성 혈관내 응고, 기생충, 예컨대 플라스모디움에 의한 감염, 예를 들어 납 중독으로부터의 화학적 손상, 및 비장기능항진증을 포함한다.

[0066] 용어 "염증성 질환" 및 "염증성 상태"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 염증으로 인하거나, 그로부터 유발되거나, 또는 그를 유발하는 질환 또는 상태를 지칭한다. 염증성 질환 및 상태는 통증 (동통, 유해 물질의 생성 및 신경의 자극으로부터), 열 (열, 혈관확장으로부터), 발적 (조홍, 혈관확장 및 증가된 혈류로부터), 종창 (종양, 유체의 과도한 유입 또는 제한된 유출로부터), 및/또는 기능 상실 (기능 손실, 이는 부분적이거나 완전하거나 일시적이거나 영구적일 수 있음)의 징후를 특징으로 하는 질환, 장애 또는 상태를 포함한다. 염증은 많은 형태를 취하며, 급성, 유착성, 위축성, 카타르성, 만성, 경변성, 미만성, 파종성, 삼출성, 섬유소성, 섬유화, 초점성, 육아종성, 과형성성, 비대성, 간질성, 전이성, 괴사성, 폐쇄성, 실질성, 가소성, 생산성, 증식성, 가막성, 화농성, 경화성, 장액형성, 장액성, 단순성, 특이적, 아급성, 화농성, 독성, 외상성 및/또는 궤양성 염증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용어 "염증성 질환"은 또한 비정상적 조직 손상 및/또는 세포 사멸로 이어지는 대식세포, 과립구 및/또는 T-림프구에 의한 과장된 반응을 유발하는 조절이상 염증 반응을 지칭할 수 있다. 염증성 질환은 급성 또는 만성 염증성 상태일 수 있고, 감염 또는 비-감염성 원인으로부터 유발될 수 있다. 염증성 질환은 아테롬성동맥경화증, 동맥경화증, 자가면역 장애, 다발성 경화증, 전신 홍반성 루푸스, 류마티스성 다발근육통 (PMR), 통풍성 관절염, 퇴행성 관절염, 건염, 윤활낭염, 건선, 낭성 섬유증, 관절골염, 류마티스 관절염, 염증성 관절염, 쇼그렌 증후군, 거대 세포 동맥염, 진행성 전신 경화증 (경피증), 강직성 척추염, 다발근염, 피부근염, 천포창, 유천포창, 당뇨병 (예를 들어, 제I형), 중증 근무력증, 하시모토 갑상선염, 그레이브스병, 굿패스처병, 혼합 결합 조직 질환, 경화성 담관염, 염증성 장 질환, 크론병, 궤양성 결장염, 악성 빈혈, 염증성 피부병, 통상성 간질성 폐장염 (UIP), 석면증, 규폐증, 기관지확장증, 베릴륨중독증, 활석증, 진폐증, 사르코이드증, 박리성 간질성 폐렴, 림프성 간질성 폐렴, 거대 세포 간질성 폐렴, 세포성 간질성 폐렴, 외인성 알레르기성 폐포염, 베게너 육아종증 및 혈관염의 관련 형태 (측두 동맥염 및 결절성 다발동맥염), 염증성 피부병, 간염, 지연형 과민성 반응 (예를 들어, 덩굴 옻나무 피부염), 폐렴, 호흡기도 염증, 성인 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 뇌염, 즉시형 과민성 반응, 천식, 고초열, 알레르기, 급성 아나필락시스, 류마티스성 열, 사구체신염, 신우신염, 연조직염, 방광염, 만성 담낭염, 허혈 (허혈성 손상), 재관류 손상, 동종이식편 거부, 숙주-대-이식편 거부, 충수염, 동맥염, 안검염, 세기관지염, 기관지염, 자궁경부염, 담관염, 융모양막염, 결막염, 누선염, 피부근염, 심내막염, 자궁내막염, 장염, 소장결장염, 상과염, 부고환염, 근막염, 섬유조직염, 위염, 위장염, 치은염, 회장염, 홍채염, 후두염, 척수염, 심근염, 신염, 제대염, 난소염, 고환염, 골염, 이염, 췌장염, 이하선염, 심막염, 인두염, 흉막염, 정맥염, 폐장염, 직장염, 전립선염, 비염, 난관염, 부비동염, 구내염, 활막염, 고환염, 편도염, 요도염, 방광염, 포도막염, 질염, 혈관염, 외음염, 외음부질염, 맥관염, 만성 기관지염, 골수염, 시신경염, 측두 동맥염, 횡단성 척수염, 괴사성 근막염 및 괴사성 소장결장염을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 안구 염증성 질환은 수술후 염증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0067] 추가의 예시적인 염증성 상태는 여드름, 빈혈 (예를 들어, 재생불량성 빈혈, 용혈성 자가면역 빈혈), 천식, 동맥염 (예를 들어, 다발동맥염, 측두 동맥염, 결절성 동맥주위염, 다카야스 동맥염), 관절염 (예를 들어, 결정질 관절염, 골관절염, 건선성 관절염, 통풍성 관절염, 반응 관절염, 류마티스 관절염 및 라이터 관절염), 강직성 척추염, 아밀로이드증, 근위축성 측삭 경화증, 자가면역 질환, 알레르기 또는 알레르기 반응, 아테롬성동맥경화증, 기관지염, 윤활낭염, 만성 전립선염, 결막염, 샤가스병, 만성 폐쇄성 폐 질환, 각막근염, 게실염, 당뇨병 (예를 들어, 제I형 당뇨병, 제II형 당뇨병), 피부 상태 (예를 들어, 건선, 습진, 화상, 피부염, 소양증 (가려움

증)), 자궁내막증, 길랑-바레 증후군, 감염, 허혈성 심장 질환, 가와사키병, 사구체신염, 치은염, 과민증, 두통 (예를 들어, 편두통성 두통, 긴장성 두통), 장폐쇄증 (예를 들어, 수술후 장폐쇄증 및 패혈증 동안의 장폐쇄증), 특발성 혈소판감소성 자반증, 간질성 방광염 (통증성 방광 증후군), 위장 장애 (예를 들어, 소화성 궤양, 국한성 장염, 게실염, 위장 출혈, 호산구성 위장 장애 (예를 들어, 호산구성 식도염, 호산구성 위염, 호산구성 위장염, 호산구성 결장염), 위염, 설사, 위식도 역류 질환 (GORD 또는 그의 동의어 GERD), 염증성 장 질환 (IBD) (예를 들어, 크론병, 궤양성 결장염, 콜라겐성 결장염, 림프구성 결장염, 허혈성 결장염, 전환 결장염, 베체트 증후군, 불확정 결장염) 및 염증성 장 증후군 (IBS)으로부터 선택됨), 루푸스, 다발성 경화증, 반상경피증, 중증 근무력증, 심근 허혈, 신증후군, 심상성 천포창, 악성 빈혈, 소화성 궤양, 다발근염, 원발성 담즙성 간경변증, 뇌 장애와 연관된 신경염증 (예를 들어, 파킨슨병, 헌팅톤병 및 알츠하이머병), 전립선염, 두개 방사선 손상과 연관된 만성 염증, 골반 염증성 질환, 재관류 손상, 국한성 장염, 류마티스성 열, 전신 홍반성 루푸스, 경피증(schleroderma, scierodoma), 사르코이드증, 척추관절병증, 쇼그렌 증후군, 갑상선염, 이식 거부, 건염, 외상 또는 손상 (예를 들어, 동상, 화학적 자극제, 독소, 반흔형성, 화상, 물리적 손상), 혈관염, 백반증 및 베게너 육아종증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 염증성 장애는 관절염 (예를 들어, 류마티스 관절염), 염증성 장 질환, 염증성 장 증후군, 천식, 건선, 자궁내막증, 간질성 방광염 및 전립선염으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 염증성 상태는 급성 염증성 상태 (예를 들어, 감염으로 인한 염증)이다. 특정 실시양태에서, 염증성 상태는 만성 염증성 상태 (예를 들어, 천식, 관절염 및 염증성 장 질환으로 인한 상태)이다.

[0068] 용어 "간 질환" 또는 "간성 질환"은 간에 대한 손상 또는 간의 질환을 지칭한다. 간 질환의 비제한적 예는 간내 담즙정체 (예를 들어, 알라질 증후군, 담즙성 간 경변증), 지방간 (예를 들어, 알콜성 지방간, 라이에 증후군), 간정맥 혈전증, 간렌즈핵 변성 (즉, 윌슨병), 간비대, 간 농양 (예를 들어, 아메바성 간 농양), 간 경변증 (예를 들어, 알콜성, 담즙성 및 실험적 간 경변증), 알콜성 간 질환 (예를 들어, 지방간, 간염, 간경변증), 기생충성 간 질환 (예를 들어, 간 포충증, 간질증, 아메바성 간 농양), 황달 (예를 들어, 용혈성, 간세포성, 담즙정체성 황달), 담즙정체, 문맥 고혈압, 간 확장, 복수, 간염 (예를 들어, 알콜성 간염, 동물성 간염, 만성 간염 (예를 들어, 자가면역, B형 간염, C형 간염, D형 간염, 약물 유발 만성 간염), 독성 간염, 바이러스성 인간 간염 (예를 들어, A형 간염, B형 간염, C형 간염, D형 간염, E형 간염), 육아종성 간염, 속발성 담즙성 간경변증, 간성 뇌병증, 정맥류, 원발성 담즙성 간경변증, 원발성 경화성 담관염, 간세포성 선종, 혈관종, 담석, 간부전 (예를 들어, 간성 뇌병증, 급성 간부전), 혈관근지방종, 석회화 간 전이, 낭성 간 전이, 섬유층판성 간암종, 간성 선종, 간세포암, 간성 낭종 (예를 들어, 단순 낭종, 다낭성 간 질환, 간담도 낭선종, 담관 낭종), 중간엽 종양 (중간엽 과오종, 영아 혈관내피종, 혈관종, 간성 골반증, 지방종, 염증성 가성종양), 상피 종양 (예를 들어, 담관 과오종, 담관 선종), 초점성 결절성 증식증, 결절성 재생성 증식증, 간모세포종, 간세포성 암종, 담관암종, 낭선암종, 혈관의 종양, 혈관육종, 카포시 육종, 혈관내피종, 배아성 육종, 섬유육종, 평활근육종, 횡문근육종, 암육종, 기형종, 카르시노이드, 편평세포 암종, 원발성 림프종, 간성 골반증, 적혈구간 포르피린증, 간 포르피린증 (예를 들어, 급성 간헐성 포르피린증, 만발성 피부 포르피린증) 및 젤베거 증후군을 포함한다.

[0069] 용어 "폐 질환" 또는 "폐성 질환"은 폐의 질환을 지칭한다. 폐 질환의 예는 기관지확장증, 기관지염, 기관지폐이형성증, 간질성 폐 질환, 직업성 폐 질환, 기종, 낭성 섬유증, 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS), 천식 (예를 들어, 간헐성 천식, 경도 지속성 천식, 중등도 지속성 천식, 중증 지속성 천식), 만성 기관지염, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 기종, 간질성 폐 질환, 사르코이드증, 석면증, 아스페르길루스종, 아스페르길루스증, 폐렴 (예를 들어, 대엽성 폐렴, 다발성 폐렴, 기관지 폐렴, 간질성 폐렴), 폐 섬유증, 폐결핵, 류마티스 폐 질환, 폐 색전증, 및 폐암 (예를 들어, 비소세포 폐 암종 (예를 들어, 선암종, 편평-세포 폐 암종, 대세포 폐 암종), 소세포 폐 암종)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0070] 용어 "신경계 질환"은 중추 신경계 (뇌, 뇌간 및 소뇌), 말초 신경계 (두개 신경 포함), 및 자율 신경계 (중추 및 말초 신경계 둘 다에 위치하는 부분)에 연루된 질환을 포함한, 신경계의 임의의 질환을 지칭한다. 신경변성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 타우병증 (전두측두엽 치매 포함), 및 헌팅톤병을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 신경 세포의 손실로 나타나는 신경계 질환의 유형을 지칭한다. 신경계 질환의 예는 두통, 혼미 및 혼수, 치매, 발작, 수면 장애, 외상, 감염, 신생물, 신경-안과학, 운동 장애, 탈수초성 질환, 척수 장애, 및 말초 신경, 근육 및 신경근 접합부의 장애를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 중독 및 정신병은 양극성 장애 및 조현병을 포함하나 이에 제한되지는 않고, 또한 신경계 질환의 정의에 포함된다. 신경계 질환의 추가의 예는 후천성 간질양 실어증; 급성 파종성 뇌척수염; 부신백질이영양증; 뇌량의 무발생증; 실인증; 에카르디 증후군; 알렉산더병; 알퍼병; 교대 편마비; 알츠하이머병; 근위축성 측삭 경화증; 무뇌증; 안젤만 증

후군; 혈관종증; 무산소증; 실어증; 실행증; 거미막 낭종; 지주막염; 아놀드-키아리 기형; 동정맥 기형; 아스퍼거 증후군; 모세혈관확장성 운동실조; 주의력 결핍 과잉행동 장애; 자폐증; 자율신경성 기능장애; 요통; 배튼병; 베체트병; 벨 마비; 양성 본태성 안검연축; 양성 초점성 근위축; 양성 두개내 고혈압; 빈스방거병; 안검연축; 블로흐 슐츠베르거 증후군; 상완 신경총 손상; 뇌 농양; 뇌 손상; 뇌 종양 (다형성 교모세포종 포함); 척수 종양; 브라운-세카르 증후군; 카나반병; 손목 터널 증후군 (CTS); 작열통; 중추성 통증 증후군; 중심 뇌교수초용해; 두부 장애; 뇌 동맥류; 뇌 동맥경화증; 뇌 위축; 뇌 거대증; 뇌성 마비; 샤르코-마리-투스병; 화학요법-유발 신경병증 및 신경병증성 통증; 키아리 기형; 무도병; 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증 (CIDP); 만성 통증; 만성 부위 통증 증후군; 코핀 로우리 증후군; 혼수, 예컨대 지속성 식물 상태; 선천성 안면 양측마비; 피질기저 변성; 두개 동맥염; 두개골유합증; 크로이츠펠트-야콥병; 누적 외상 장애; 쿠싱 증후군; 거대세포 봉입체 질환 (CIBD); 시토메갈로바이러스 감염; 춤추는 눈-춤추는 발 증후군; 댄디-워커 증후군; 도슨병; 드 모르시어 증후군; 데제린-클룸프케 마비; 치매; 피부근염; 당뇨병성 신경병증; 미만성 경화증; 자율신경실조증; 쓰기 장애; 난독증; 이상긴장증; 조기 영아 간질성 뇌병증; 빈 안장 증후군; 뇌염; 뇌탈출증; 뇌삼차신경 혈관종증; 간질; 에르브 마비; 본태성 진전; 파브리병; 파르 증후군; 기절; 가족성 경직성 마비; 열성 발작; 피셔 증후군; 프리드라이히 운동실조; 전두측두엽 치매 및 다른 "타우병증"; 고셔병; 게르스트만 증후군; 거대 세포 동맥염; 거대 세포 봉입체 질환; 구상 세포 백질이영양증; 길랑-바레 증후군; HTLV-1 연관 척수병증; 할러보르덴-스파츠병; 두부 손상; 두통; 편측안면 연축; 유전성 경직성 하반신마비; 유전성 다발신경염성 실조; 이성 대상 포진; 대상 포진; 히라야마 증후군; HIV-연관 치매 및 신경병증 (또한 AIDS의 신경계 징후 참조); 완전전뇌증; 헌팅톤병 및 다른 폴리글루타민 반복 질환; 무뇌수두증; 수두증; 고코르티솔증; 저산소증; 면역-매개 뇌척수염; 봉입체 근염; 색소실조증; 영아; 피탄산 축적 질환; 영아 레프숨병; 영아 연축; 염증성 근병증; 두개내 낭종; 두개내 고혈압; 주버트 증후군; 컨스-세이어 증후군; 케네디병; 킨스번 증후군; 클리펠 파일 증후군; 크라베병; 쿠겔베르그-벨란더병; 쿠루병; 라포라병; 램버트-이튼 근무력 증후군; 란다우-클레프너 증후군; 외측 연수 (발렌버그) 증후군; 학습 불능; 라이병; 레녹스-가스타우트 증후군; 레쉬-니한 증후군; 백질이영양증; 루이 소체 치매; 활택뇌증; 잠금 증후군; 루게릭병 (일명 운동 뉴런 질환 또는 근위축성 측삭 경화증); 요추 디스크 질환; 라임병-신경계 후유증; 마차도-요셉병; 대뇌증; 거대뇌증; 멜커슨-로젠탈 증후군; 메니에르병; 수막염; 멘케스병; 이염성 백질이영양증; 소두증; 편두통; 밀러 피셔 증후군; 미니-졸중; 미토콘드리아 근병증; 뫼비우스 증후군; 단일사지 근위축; 운동 뉴런 질환; 모야모야병; 뮤코폴리사카라이드증; 다발경색 치매; 다초점성 운동 신경병증; 다발성 경화증 및 다른 탈수초성 장애; 체위성 저혈압을 동반한 다계통 위축; 근육 이영양증; 중증 근무력증; 수초탈락성 미만성 경화증; 영아의 근간대성 뇌병증; 근간대성경련; 근병증; 선천성 근긴장증; 기면증; 신경섬유종증; 신경이완성 악성 증후군; AIDS의 신경계 징후; 루푸스의 신경계 후유증; 신경근긴장증; 신경 세로이드 리포푸신증; 뉴런 이동 장애; 니만-픽병; 오설리번-맥레오드 증후군 증후군; 후두 신경통; 잠재성 척수유합부전 순서; 오타하라 증후군; 올리브교뇌소뇌 위축; 안진전 근간대성경련; 시신경염; 기립성 저혈압; 과사용 증후군; 감각이상; 파킨슨병; 선천성 이상근긴장증; 부신생물성 질환; 발작성 공격; 패리 롬버그 증후군; 펠리제우스-메르츠바허병; 주기성 마비; 말초 신경병증; 통증성 신경병증 및 신경병증성 통증; 지속성 식물 상태; 전반적 발달 장애; 광 재채기 반사; 피탄산 축적 질환; 픽병; 신경 조임; 뇌하수체 종양; 다발근염; 공뇌증; 소아마비후 증후군; 포진후 신경통 (PHN); 감염후 뇌척수염; 체위성 저혈압; 프라더-윌리 증후군; 원발성 측삭 경화증; 프리온 질환; 진행성; 편측안면 위축; 진행성 다초점성 백질뇌병증; 진행성 경화성 회백질위축증; 진행성 핵상 마비; 가성 뇌종양; 람세이-헌트 증후군 (제I형 및 제II형); 라스무센 뇌염; 반사 교감신경 이영양증 증후군; 레프숨병; 반복 운동 장애; 반복 스트레스 손상; 하지 불안 증후군; 레트로바이러스-연관 척수병증; 레트 증후군; 라이에 증후군; 세인트 비투스 댄스; 샌드호프병; 쉴더병; 분열뇌증; 중격-시신경 이형성증; 흔들린 아기 증후군; 대상포진; 샤이-드래거 증후군; 쇼그렌 증후군; 수면 무호흡; 소토 증후군; 경직; 이분 척추; 척수 손상; 척수 종양; 척수성 근육 위축; 강직-인간 증후군; 졸중; 스터지-웨버 증후군; 아급성 경화성 범뇌염; 지주막하 출혈; 피질하 동맥경화성 뇌병증; 시데남 무도병; 실신; 척수공동증; 지연성 이상운동증; 테이-삭스병; 측두 동맥염; 테더링 척수 증후군; 톰센병; 흉곽 출구 증후군; 동통성 틱; 토드 마비; 투렛 증후군; 일과성 허혈 발작; 전염성 해면상 뇌병증; 횡단성 척수염; 외상성 뇌 손상; 진전; 삼차 신경통; 열대성 경직성 하반신부전마비; 결절성 경화증; 혈관성 치매 (다발경색 치매); 측두 동맥염을 포함한 혈관염; 폰 히펠-린다우병 (VHL); 발렌버그 증후군; 베르드니히-호프만병; 웨스트 증후군; 편타증; 윌리암스 증후군; 윌슨병; 및 젤베거 증후군을 포함한다.

[0071] "신경변성 질환"은 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 타우병증 (전두측두엽 치매 포함), 및 헌팅톤병을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 신경 세포의 손실로 나타나는 신경계 질환의 유형을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 신경변성 질환은 알츠하이머병이다. 알츠하이머병의 원인은 잘 이해되지 않지만, 대부분의 경우

에 유전적 기초를 포함하는 것으로 생각된다. 상기 질환은 뇌 피질에서의 뉴런 및 시냅스의 손실을 특징으로 하며, 이는 이환 영역의 위축을 초래한다. 생화학적으로, 알츠하이머병은 뇌에서의 비정상적으로 폴딩된 아밀로이드 베타 단백질 및 타우 단백질의 플라크 축적으로 인한 단백질 미스폴딩 질환을 특징으로 한다. 알츠하이머병의 증상은 최근 사건을 기억하는 것의 어려움, 언어 문제, 방향감각상실, 기분 동요, 동기 상실, 자기-무시, 및 행동 문제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 궁극적으로, 신체 기능은 서서히 상실되고, 알츠하이머병은 결국 사망으로 이어진다. 치료는 현재 질환으로 인한 인지 문제의 치료 (예를 들어, 아세틸콜린에스테라제 억제제 또는 NMDA 수용체 길항제 사용), 정신사회적 개입 (예를 들어, 행동-지향적 또는 인지-지향적 접근법), 및 일반적 간병을 목표로 한다. 질환의 진행을 완전히 정지 또는 역전시키는 데 이용가능한 치료는 현재 없다.

[0072] "증식성 질환"은 세포의 증식에 의한 비정상적 성장 또는 확장으로 인해 발생하는 질환을 지칭한다 (문헌 [Walker, Cambridge Dictionary of Biology; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1990]). 증식성 질환은 1) 정상 정지 세포의 병리학적 증식; 2) 세포의 그의 정상 위치로부터의 병리학적 이동 (예를 들어, 신생물성 세포의 전이); 3) 단백질분해 효소, 예컨대 매트릭스 메탈로프로테이나제 (예를 들어, 콜라게나제, 젤라티나제 및 엘라스타제)의 병리학적 발현; 또는 4) 증식성 망막병증 및 종양 전이에서와 같은 병리학적 혈관신생과 연관될 수 있다. 예시적인 증식성 질환은 암 (즉, "악성 신생물"), 양성 신생물, 혈관신생, 염증성 질환 및 자가면역 질환을 포함한다.

[0073] 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산", "핵산 분자", "핵산 서열", 및 "올리고뉴클레오티드"는 DNA 및 RNA 내의 일련의 뉴클레오티드 염기 ("뉴클레오티드"로도 불림)를 지칭하고, 2개 이상의 뉴클레오티드의 임의의 쇄를 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 키메라 혼합물 또는 유도체 또는 그의 변형된 버전, 및 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어 분자의 안정성, 그의 혼성화 파라미터 등을 개선시키기 위해 염기 모이어티, 당 모이어티, 또는 포스페이트 백본에서 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 대사적으로 표지된 핵산이다. "대사적으로 표지된 핵산"은 본원에서 1개 이상의 비천연 뉴클레오시드 유사체, 예컨대 5-에티닐 우리딘이 전사 동안 그의 올리고뉴클레오티드 쇄 내로 혼입된 핵산을 지칭한다.

[0074] 본원에 사용된 용어 "전사후 변형"은 전사 후 RNA (예를 들어, RNA 1차 전사체)의 화학적 변형 또는 변경을 지칭한다. 전사후 변형은 진핵 세포 (예를 들어, 인간 세포)에서 흔하고, 종종 성숙한 기능적 RNA 분자를 생산하기 위해 및/또는 RNA 분자를 핵으로부터 이것이 상이한 기능을 수행할 수 있는 세포 내의 다양한 위치로 전위시키기 위해 중요하다. 전사후 변형은 또한 세포가 단백질로 번역될 수 있는 성숙 mRNA로의 mRNA 전사체의 전환에서 중요한 역할을 한다. 전사후 변형은 RNA 전사체의 5' 프로세싱 (예를 들어, 예를 들어 7-메틸구아노신을 사용한 mRNA의 5' 캡핑), RNA 전사체의 3' 프로세싱 (예를 들어, RNA 전사체의 3' 단부의 절단 또는 폴리아데닐화), 인트론 스플라이싱 (즉, 프리-mRNA로부터의 비-코딩 영역 (인트론)의 제거), 및 히스톤 mRNA 프로세싱에 수반되는 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 구체적인 전사후 변형은 7-메틸구아노신 (m^7G), N^6-메틸아데노신 (m^6A), 폴리(A) 테일, 인트론 스플라이싱, 및 히스톤 mRNA 프로세싱을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0075] "단백질", "펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기의 중합체를 포함한다. 상기 용어는 임의의 크기, 구조 또는 기능의 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 단백질은 적어도 3개 아미노산 길이일 것이다. 단백질은 개별 단백질 또는 단백질의 집합을 지칭할 수 있다. 본 발명의 단백질은 바람직하게는 천연 아미노산만을 함유하지만, 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 비-천연 아미노산 (즉, 자연에서 발생하지 않지만 폴리펩티드 쇄에 혼입될 수 있는 화합물) 및/또는 아미노산 유사체가 대안적으로 사용될 수 있다. 또한, 단백질 내의 아미노산 중 하나 이상은, 예를 들어 화학 물질, 예컨대 탄수화물 기, 히드록실 기, 포스페이트 기, 파르네실 기, 이소파르네실 기, 지방산 기, 접합 또는 관능화를 위한 링커의 첨가, 또는 다른 변형에 의해 변형될 수 있다. 단백질은 또한 단일 분자일 수 있거나 또는 다중-분자 복합체일 수 있다. 단백질은 자연 발생 단백질 또는 펩티드의 단편일 수 있다. 단백질은 자연 발생, 재조합, 합성, 또는 그의 임의의 조합일 수 있다.

[0076] "RNA 전사체"는 DNA 서열의 RNA 폴리머라제-촉매된 전사로부터 생산된 산물이다. RNA 전사체가 DNA 서열의 상보적 카피인 경우, 이는 1차 전사체로 지칭되거나, 또는 이는 1차 전사체의 전사후 프로세싱으로부터 유래된 RNA 서열일 수 있고 성숙 RNA로 지칭된다. "메신저 RNA (mRNA)"는 인트론이 없고 세포에 의해 폴리펩티드로 번역될 수 있는 RNA를 지칭한다. "cRNA"는 재조합 cDNA 주형으로부터 전사된 상보적 RNA를 지칭한다. "cDNA"는 mRNA 주형에 상보적이고 그로부터 유래된 DNA를 지칭한다. "신생 RNA"는 세포에 의해 활발하게 전사되는 RNA,

및 세포에 의해 최근에 전사되었지만 아직 어떠한 종류의 전사후 변형도 겪지 않은 RNA를 지칭한다.

[0077] 용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 조직 샘플 (예컨대, 조직 절편, 외과적 생검, 및 조직의 바늘 생검); 세포 샘플 (예를 들어, 세포학적 도말 (예컨대, Pap 또는 혈액 도말표본) 또는 미세절제에 의해 수득된 세포의 샘플); 또는 세포 분획, 단편 또는 소기관 (예컨대, 세포를 용해시키고 그의 성분을 원심분리에 의해 또는 다른 식으로 분리함으로써 수득됨)을 포함한 임의의 샘플을 지칭한다. 생물학적 샘플의 다른 예는 혈액, 혈청, 소변, 정액, 분변물, 뇌척수액, 간질액, 점액, 눈물, 땀, 고름, 생검 조직 (예를 들어, 외과적 생검 또는 바늘 생검에 의해 수득됨), 유두 흡인물, 유액, 질액, 타액, 스왑 (예컨대, 협측 스왑), 또는 제1 생물학적 샘플로부터 유래된 생체분자를 함유하는 임의의 물질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 채취한 외과적 생검, 예를 들어 본원에 기재된 조직 중 임의의 것의 생검이다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 종양 생검 (예를 들어, 암으로 진단되거나, 암을 갖는 것으로 의심되거나, 또는 암을 갖는 것으로 생각되는 대상체로부터의 것)이다.

[0078] 투여가 고려되는 "대상체"는 인간 (즉, 임의의 연령군의 남성 또는 여성, 예를 들어 소아 대상체 (예를 들어, 영아, 소아 또는 청소년) 또는 성인 대상체 (예를 들어, 청년, 중년 성인 또는 노년 성인)) 또는 비-인간 동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물 (예를 들어, 영장류 (예를 들어, 시노몰구스 원숭이 또는 레서스 원숭이) 또는 마우스)이다. 용어 "환자"는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 환자는 인간이다. 인간은 임의의 발달 단계의 남성 또는 여성일 수 있다. 질환 또는 장애의 치료를 "필요로 하는" 대상체 또는 환자는 비제한적으로 질환 또는 장애의 임의의 위험 인자 또는 증상을 나타내는 것들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 개 또는 돼지)이다.

[0079] 치료 또는 치료제의 "치료 유효량"은 상태의 치료에서 치료 이익을 제공하거나 또는 상태와 연관된 1종 이상의 증상을 지연 또는 최소화하기에 충분한 양이다. 치료 또는 치료제의 치료 유효량은 상태의 치료에서 치료 이익을 제공하는, 단독의 또는 다른 요법과 조합된 요법의 양을 의미한다. 용어 "치료 유효량"은 전체 요법을 개선시키고/거나, 상태의 증상, 징후 또는 원인을 감소 또는 회피하고/거나, 또 다른 치료제의 치료 효능을 증진시키는 양을 포괄할 수 있다.

[0080] 본원에 사용된 "조직"은 동일한 기원으로부터의 세포 및 그의 세포외 매트릭스의 군이다. 함께, 세포는 특정 기능을 수행한다. 다중 조직 유형의 연합은 함께 기관을 형성한다. 세포는 상이한 세포 유형일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조직은 상피 조직이다. 상피 조직은 기관 표면 (예를 들어, 피부의 표면, 기도, 연기관, 생식관, 및 소화관의 내부 내층)을 덮는 세포에 의해 형성된다. 상피 조직은 보호 기능을 수행하고, 또한 분비, 배출 및 흡수에 수반된다. 상피 조직의 예는 단순 편평 상피, 중층 편평 상피, 단순 입방 상피, 이행 상피, 가성중층 상피, 원주 상피 및 선상피를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 조직은 결합 조직이다. 결합 조직은 무생물 물질 (예를 들어, 세포외 매트릭스)에 의해 분리된 세포로 구성된 섬유성 조직이다. 결합 조직은 기관에 형상을 제공하고, 기관을 제자리에 유지시킨다. 결합 조직은 섬유성 결합 조직, 골격 결합 조직 및 유체 결합 조직을 포함한다. 결합 조직의 예는 혈액, 골, 힘줄, 인대, 지방, 및 윤문상 조직을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 조직은 근육 조직이다. 근육 조직은 근육 세포로부터 형성된 활성 수축 조직이다. 근육 조직은 힘을 생성하고 운동을 유발하는 기능을 한다. 근육 조직은 평활근 (예를 들어, 기관의 내층에서 발견되는 바와 같음), 골격근 (예를 들어, 전형적으로 골에 부착된 바와 같음), 및 심장 근육 (예를 들어, 심장에서 발견되는 바와 같음, 여기서 이는 수축하여 유기체 전반에 걸쳐 혈액을 펌핑함)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조직은 신경 조직이다. 신경 조직은 중추 신경계 및 말초 신경계를 포함하는 세포를 포함한다. 신경 조직은 뇌, 척수, 두개 신경 및 척수 신경 (예를 들어, 운동 뉴런)을 형성한다. 특정 실시양태에서, 조직은 뇌 조직이다. 특정 실시양태에서, 조직은 태반 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직은 심장 조직이다.

[0081] 용어 "치료", "치료하다" 및 "치료하는"은 본원에 기재된 질환의 역전, 완화, 그의 발병의 지연 또는 그의 진행의 억제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료는 질환의 1종 이상의 징후 또는 증상이 발생하였거나 또는 관찰된 후에 (예를 들어, 예방적으로 (본원에 추가로 기재될 수 있음) 또는 질환의 의심 또는 위험 시에) 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 치료는 질환의 징후 또는 증상의 부재 하에 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료는 증상의 발병 전에 (예를 들어, 대상체 또는 대상체의 가족 구성원에서의 증상의 병력에 비추어) 감수성 대상체에게 투여될 수 있다. 치료는 또한 증상이 해결된 후에, 예를 들어 재발을 지연시키거나 또는 방지하기 위해 계속될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는, 본원에 개시된 방법을 사용하고 건강한 세포 또는 조직과 비교하여

세포 또는 조직에서 1개 이상의 관심 핵산의 시공간적 유전자 발현에서의 변경을 관찰한 후에 투여될 수 있다.

[0082] 본원에 사용된 용어 "종양" 및 "신생물"은 조직의 비정상적 덩어리를 지칭하며, 여기서 덩어리의 성장은 정상 조직의 성장을 능가하고 그와 조화되지 않는다. 종양은 하기 특징에 따라 "양성" 또는 "악성"일 수 있다: 세포 분화의 정도 (형태 및 기능성 포함), 성장 속도, 국부 침습 및 전이. "양성 신생물"은 일반적으로 잘 분화되고, 악성 신생물보다 특징적으로 더 느린 성장을 가지며, 기원 부위에 국재화된 채로 남아있다. 또한, 양성 신생물은 원위 부위로 침윤, 침습 또는 전이되는 능력을 갖지 않는다. 예시적인 양성 신생물은 지방종, 연골종, 선종, 연성섬유종, 노인성 혈관종, 지루성 각화증, 흑색점 및 피지 증식증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 특정 "양성" 종양은 이후에 악성 신생물을 발생시킬 수 있으며, 이는 종양의 신생물성 세포의 하위집단에서의 추가의 유전적 변화로부터 일어날 수 있고, 이들 종양은 "전암성 신생물"로 지칭된다. 예시적인 전암성 신생물은 기형종이다. 대조적으로, "악성 신생물"은 일반적으로 불량하게 분화되고 (역형성), 주위 조직의 진행성 침윤, 침습 및 파괴를 동반하는 특징적으로 급속한 성장을 갖는다. 게다가, 악성 신생물은 일반적으로 원위 부위로 전이하는 능력을 갖는다. 용어 "전이", "전이성" 또는 "전이하다"는 원발성 또는 원래 종양으로부터 또 다른 기관 또는 조직으로의 암성 세포의 확산 또는 이동을 지칭하고, 전형적으로 속발성 (전이성) 종양이 위치하는 기관 또는 조직의 것이 아니라 원발성 또는 원래 종양의 조직 유형의 "속발성 종양" 또는 "속발성 세포 덩어리"의 존재에 의해 확인가능하다. 예를 들어, 골로 이동한 전립선암은 전이된 전립선암으로 언급되고, 골 조직에서 성장 중인 암성 전립선암 세포를 포함한다.

[0083] 특정 실시양태의 상세한 설명

[0084] 본원에 기재된 측면은 구체적 실시양태, 시스템, 조성물, 방법, 또는 구성에 제한되지 않고, 따라서 물론 달라질 수 있다. 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 측면을 기재하기 위한 것이며, 본원에 구체적으로 정의되지 않는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0085] 본 개시내용은 생체내 대상체에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 비롯한, 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 시공간적 유전자 발현에서 전사후 변형의 역할을 프로파일링하는 방법, 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에서 시공간적 유전자 발현의 역할을 연구하는 방법, 유전자 발현을 조정할 수 있는 작용제를 확인하는 방법, 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법, 및 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법 및 시스템에 유용한 올리고뉴클레오티드 프로브가 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 본 개시내용은 또한 본원에 개시된 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트를 제공한다. 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 시스템이 또한 본 개시내용에 의해 제공된다.

[0086] 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법

[0087] 한 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 제공한다 (예를 들어, 도 1 참조). 본원에 개시된 방법에서, 세포는 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 인큐베이션을 통해 대사적으로 표지될 수 있으며, 여기서 각각의 뉴클레오시드 유사체는 시간량 (본원에서 "t_1"로 지칭됨) 동안 반응성 화학적 모이어티 (예를 들어, 임의의 반응성 생물직교 관능기, 예컨대 본원에 추가로 기재된 바와 같은 클릭 화학 핸들)를 포함한다. 이어서, 대사적으로 표지된 핵산을 반응성 화학적 모이어티 (예를 들어, 세포의 전사체 내로 혼입된 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응할 수 있는 임의의 생물직교 관능기)를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시킬 수 있다. 뉴클레오시드 유사체 및 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 반응성 화학적 모이어티는 서로 반응하여, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브를 세포에 의해 생산된 대사적으로 표지된 전사체에 연결시킨다. 이어서, 대사적으로 표지된 핵산을 1개 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 쌍과 접촉시킬 수 있으며, 이는 본원에 추가로 기재되고, 세포에 의해 생산된 전사체를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 데 사용될 수 있다. 이어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키고, 서열분석하여 전사체의 정체 (예를 들어, 본원에 추가로 기재된 바와 같은 SEDAL 서열분석 (동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소를 갖는 서열분석)을 통해) 및 중합체 매트릭스 내의 그의 위치를 결정할 수 있다. 전사체의 위치를 사용하여, 개별 세포, 세포하 위치 및 소기관을 확인할 수 있다. 이어서, 방법을 1회 이상 추가로 반복하여, 세포 및 뉴클레오시드 유사체를 상이한 시간 (즉, t_2, t_3, t_4 등) 동안 인큐베이션함으로써 1개 이상의 핵산의 발현이 시간 경과에 따라 어떻게 변하는지를 결정할 수 있다.

[0088] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은

[0089] a) 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대

사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0090] b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0091] c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서

[0092] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0093] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0094] d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0095] e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0096] f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0097] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0098] h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

[0099] 를 포함하는, 세포에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 제공한다.

[0100] 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 1회 이상 추가로 수행된다. 단계 (a)-(h)를 반복하고, 다양한 시간량 동안 단계 (a)에서 세포 및 뉴클레오시드 유사체의 풀을 함께 인큐베이션하는 것은 대사적으로 표지된 관심 핵산, 또는 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현이 시간 경과에 따라 관찰되도록 하여, 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현이 프로파일링되도록 한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 임의로 제3 시간량 t_3 동안 반복되고, 임의로 제4 시간량 t_4 동안 반복되고, 임의로 제5 시간량 t_5 동안 반복되고, 임의로 제6 시간량 t_6 동안 반복되고, 임의로 제7 시간량 t_7 동안 반복되고, 임의로 제8 시간량 t_8 동안 반복되고, 임의로 제9 시간량 t_9 동안 반복되고, 임의로 제10 시간량 t_{10} 동안 반복된다. 단계 (a)-(h)가 반복될 수 있는 횟수에는 제한이 없다. 또한, 세포 및 뉴클레오시드 유사체의 풀이 단계 (a)에서 함께 인큐베이션되는 시간량에 대한 제한은 없다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)의 인큐베이션은 대략 수분 (예를 들어, 약 1분, 약 2분, 약 5분, 약 10분, 약 20분, 약 30분, 약 40분, 약 50분, 또는 약 60분)의 시간량 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)의 인큐베이션은 대략 수시간 (예를 들어, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 또는 약 24시간)의 시간량 동안 수행된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)의 인큐베이션은 24시간 초과 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)의 인큐베이션은 대략 수일 (예를 들어, 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일 동안, 또는 7일 초과 동안)의 시간량 동안 수행된다.

[0101] 본원에 개시된 방법에서 임의의 세포 유형의 사용이 본 개시내용에 의해 고려된다 (예를 들어, 본원의 정의에 기재된 임의의 세포 유형). 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 암 세포이다. 본 개시내용은 또한 다중 세포에 대해 본원에 기재된 방법을 동시에 수행하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, 시공간적 유전자 발현은 10개 초과의 세포, 20개 초

과의 세포, 50개 초과의 세포, 100개 초과의 세포, 200개 초과의 세포, 300개 초과의 세포, 400개 초과의 세포, 500개 초과의 세포, 또는 1000개 초과의 세포에서 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 방법은 동일한 세포 유형의 다중 세포 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 상이한 세포 유형의 세포 (예를 들어, 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 핍지교세포, 근육 세포, 심근세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포, 간 세포, 평활 및 골격근 세포, 조혈 세포, 림프구, 단핵구, 호중구, 대식세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 뉴런 등)를 포함하는 다중 세포 상에서 수행된다. 특정 실시양태에서, 세포는 HeLa 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포들은 투과화된 세포이다 (예를 들어, 세포는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계 전에 투과화됨). 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포들은 무손상 조직 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 조직 유형, 예컨대 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 및 신경 조직) 내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조직은 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계 전에 생체내 존재한다 (즉, 조직은 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 세포를 인큐베이션하는 단계 동안 생체내 존재함). 일부 실시양태에서, 조직 내의 1개 이상의 세포를 생체내 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 인큐베이션하고, 이어서 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계 전에 조직을 수거한다. 조직을 수거하는 것은 대상체 (예를 들어, 비-인간 실험 동물)로부터 전체 기관을 수거하는 것을 수반할 수 있거나, 또는 조직 생검을 수반할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조직은 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 개, 돼지, 또는 비-인간 영장류 (예를 들어, 원숭이, 유인원 등)) 내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조직은 식물 조직이다.

[0102] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 방법은 생체내에서 수행될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은

[0103] a) 뉴클레오시드 유사체의 풀을 대상체에게 시간량 t_1 동안 생체내 투여하여 대상체 내의 1개 이상의 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0104] b) 대상체로부터 조직 샘플을 수거하는 단계;

[0105] c) 수거된 조직 샘플 내의 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0106] d) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서

[0107] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0108] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0109] e) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0110] f) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0111] g) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0112] h) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0113] i) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

[0114] 를 포함하는, 대상체에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법을 제공한다.

[0115] 일부 실시양태에서, 수거된 조직은 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직이다. 특정 실시양태에서,

수거된 조직은 심장 조직이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 개, 돼지 또는 비-인간 영장류)이다. 뉴클레오시드 유사체는 임의의 적절한 수단, 예를 들어 주사에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체는 안와후 투여에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 조직 샘플을 수거하는 것은 조직 생검을 채취하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체로부터 조직 샘플을 수거하는 것은 대상체로부터 1개 이상의 전체 기관을 수거하는 것을 포함한다.

[0116] 본원에 기재된 방법에서 표지된 세포 (즉, 대사적으로 표지된 세포)의 사용이 또한 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 세포는 뉴클레오시드 유사체로 표지된다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체는 아데노신, 구아노신, 티미딘, 시티딘, 우리딘 및/또는 이노신의 유사체이다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체는 3'-아지도-3'-데옥시티미딘, C8-알킨-데옥시우리딘, (2'S)-2'-데옥시-2'-플루오로-5-에티닐우리딘, 또는 5-에티닐-2'-데옥시시티딘이다. 특정 실시양태에서, 대사적으로 표지된 핵산은 5-에티닐 우리딘 표지된 핵산이다. 일부 실시양태에서, 다중 세포는 본원에 기재된 방법을 사용하여 동시에 프로파일링된다.

[0117] 본원에 기재된 방법은 한 번에 하나의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해, 또는 동시에 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시공간적 유전자 발현은 최대 100, 최대 200, 최대 500, 최대 1000, 최대 2000, 최대 3000개, 또는 3000개 초과의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해 동시에 프로파일링된다. 특정 실시양태에서, 시공간적 유전자 발현은 최대 1000개의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해 동시에 프로파일링된다. 대사적으로 표지된 관심 핵산은 세포의 게놈 DNA로부터 발현된 전사체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산은 신생 RNA, 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA (tRNA), 또는 리보솜 RNA (rRNA)이다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산은 신생 RNA (즉, 세포에 의해 새롭게 생산되거나, 또는 세포에 의해 새롭게 생산되었지만 아직 어떠한 종류의 전사후 변형도 겪지 않은 RNA)이다. 특정 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산은 mRNA이다.

[0118] 다양한 반응성 화학적 모이어티를 갖는 뉴클레오시드 유사체가 본원에 기재된 방법에 사용하기 위해 고려된다. 뉴클레오시드 유사체 상의 반응성 화학적 모이어티는 임의의 반응성 생물직교 관능기 (예를 들어, 본원에 기재된 클릭 화학 핸들 중 임의의 것)일 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 개시된 것들 이외의 다른 생물직교 관능기가 본원에 개시된 방법에 사용하기에 적합하고, 본원에 기재된 생물직교 관능기가 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 것으로 치환될 수 있다는 것을 용이하게 알 것이다. 예를 들어, 미국 특허 공개 20130266512 및 문헌 [Thirumurugan, P. et al. Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical-Biology Applications. Chem. Rev. 2013, 113(7), 4905-4979]에 기재된 것들을 참조한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티는 아지드, 알킨, 니트론, 알켄, 테트라진 또는 테트라졸을 포함한다. 특정 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티는 알킨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체는 3'-아지도-3'-데옥시티미딘, C8-알킨-데옥시우리딘, (2'S)-2'-데옥시-2'-플루오로-5-에티닐우리딘, 또는 5-에티닐-2'-데옥시시티딘이다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체는 5-에티닐 우리딘이다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체는 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부에 존재한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체는 올리고뉴클레오티드 프로브의 3' 단부에 존재한다.

[0119] 본원에 기재된 방법은 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "스플린트 프로브"로도 지칭됨)의 사용을 고려한다. 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 반응성 화학적 모이어티는 세포와 접촉 시 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 세포 내에 존재하는 대사적으로 표지된 전사체에 접합되도록 세포를 대사적으로 표지하는 데 사용되는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응성이어야 한다. 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 반응성 화학적 모이어티는 본원에 기재된 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 생물직교 관능기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 화학적 모이어티는 아지드, 알킨, 니트론, 알켄, 테트라진 또는 테트라졸을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 화학적 모이어티는 아지드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드 유사체의 화학적 모이어티 및 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 화학적 모이어티의 반응은 클릭 화학 반응 (예를 들어, 구리(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (CuAAC) 반응)을 포함한다.

[0120] 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 다양한 다른 성분을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 중합 블로커를 추가로 포함한다. 중합 블로커는 본원에 기재된 방법의 단계 (e)의 증폭에서 프라이머로서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 사용을 방지할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 3' 단부에 존재한다. 중합 블로커는, 예를 들어 폴리머라제가 중합을 위한 프라이머로서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 것을 방지하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 차단된 3' 히드록실 기를 포함하는 (예를

들어, 3' 히드록실 기 상에 산소 보호기를 포함하는) 핵산 잔기이다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 3' 히드록실 기 대신에 수소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 추가의 뉴클레오티드가 첨가되는 것을 방지하는 3' 히드록실 기 대신에 임의의 화학적 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 핵산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 아데노신, 티민, 시토신, 구아노신 또는 우리딘 잔기이다. 특정 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 티민 잔기이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 폴리-아데노신 (폴리-A) 링커 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 링커 서열은 약 2 내지 약 100, 약 10 내지 약 90, 약 30 내지 약 70, 또는 약 40 내지 약 60개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 폴리-A 링커 서열은 약 50개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0121] 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 또는 약 75개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 12개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0122] 5'-[반응성 화학적 모이어티]-[폴리-A 링커 서열]-[제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분]-[중합 블로커]-3',

[0123] 여기서,]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서,]-[는 임의적인 비-뉴클레오티드 링커 (예를 들어, 화학적 또는 펩티드-기반 링커)를 포함한다.

[0124] 본원에 개시된 방법은 또한 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 프로브로서 제공되는 제2 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 사용을 포함한다. 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)는 뉴클레오티드의 특정 서열로 구성된 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 약 5 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 바코드 서열은 약 10개 초과, 약 15개 초과, 또는 약 20개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 5개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 32개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0125] 5'-[대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3',

[0126] 여기서,]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서,]-[는 임의적인 비-뉴클레오티드 링커 (예를 들어, 화학적 또는 펩티드-기반 링커)를 포함한다.

[0127] 본원에 기재된 방법에 사용되는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 각각 뉴클레오티드의 특이적 서열로 구성된 제1 바코드 서열 및 제2 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 약 5 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 바코드 서열은 약 10개 초과, 약 15개 초과, 또는 약 20개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 약 5개의 뉴클레오티드 길이이다. 일

부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 약 5 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 바코드 서열은 약 10개 초과, 약 15개 초과, 또는 약 20개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 약 5개의 뉴클레오티드 길이이다. 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되어 있다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0128] 5'-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 부분]-[제1 바코드 서열]-[대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제2 부분]-3',

[0129] 여기서,]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서,]-[는 임의적인 비-뉴클레오티드 링커 (예를 들어, 화학적 또는 펩티드-기반 링커)를 포함한다.

[0130] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드는 대사적으로 표지된 관심 핵산을 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함한다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드의 사용은, 예를 들어 2019년 10월 17일에 공개된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2019/199579, 및 문헌 [Wang et al., Science 2018, 361, 380]에 추가로 기재되어 있으며, 이들 둘 다는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0131] 일부 실시양태에서, 라이게이션 단계는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부재 하에 수행될 수 없다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계는 반응성 화학적 기로 변형된 뉴클레오티드를 제공하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계는 아민-변형된 뉴클레오티드를 제공하는 것을 추가로 포함한다. 증폭 과정 동안, 아민-변형된 뉴클레오티드는 이들이 생산될 때 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 내로 혼입된다. 생성된 앰플리콘은 1급 아민으로 관능화되고, 이는 또 다른 상용성 화학적 모이어티 (예를 들어, N-히드록시숙신이미드)와 추가로 반응하여 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계를 용이하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계는 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 아민-변형된 뉴클레오티드를 메타크릴산 N-히드록시숙신이미드와 반응시키고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스를 공중합시키는 것을 포함한다.

[0132] 다양한 중합체 매트릭스의 사용이 본 개시내용에 의해 고려되고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘이 포매될 수 있는 임의의 중합체 매트릭스가 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 히드로겔 (즉, 친수성인 가교된 중합체의 네트워크)이다. 일부 실시양태에서, 히드로겔은 폴리비닐 알콜 히드로겔, 폴리에틸렌 글리콜 히드로겔, 소듐 폴리아크릴레이트 히드로겔, 아크릴레이트 중합체 히드로겔 또는 폴리아크릴아미드 히드로겔이다. 특정 실시양태에서, 히드로겔은 폴리아크릴아미드 히드로겔이다.

[0133] 본원에 개시된 방법은 또한 제4 올리고뉴클레오티드 프로브의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 올리고뉴클레오티드 프로브는 형광단을 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이, 제4 올리고뉴클레오티드 프로브는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 대사적으로 표지된 관심 핵산을 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열이다. 일부 실시양태에서, 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계는 대사적으로 표지된 관심 핵산을 확인하기 위해 수행된다. 대사적으로 표지된 관심 핵산을

확인하는 이러한 방법은 동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소를 갖는 서열분석 (SEDAL 서열분석)으로 공지되어 있고, 문헌 [Wang, X. et al. Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. Science 2018, 36, eaat5691] 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2019/199579에 추가로 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, SEDAL 서열분석은 1개 이상의 대사적으로 표지된 관심 핵산을 확인하기 위해 2, 3, 4, 5회 또는 5회 초과로 수행된다.

[0134] 본원에 기재된 방법에 사용되는 (예를 들어, SEDAL 서열분석에 사용되는) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 영상화 기술을 사용하여 판독될 수 있다. 예를 들어, 제4 올리고뉴클레오티드 프로브가 형광단을 포함하는 실시양태에서, 형광단은 대사적으로 표지된 관심 핵산을 확인하기 위해 영상화를 사용하여 판독될 수 있다. 일부 실시양태에서, 영상화하는 단계는 형광 영상화를 포함한다. 특정 실시양태에서, 영상화하는 단계는 공초점 현미경검사를 포함한다. 특정 실시양태에서, 영상화하는 단계는 에피형광 현미경검사를 포함한다.

[0135] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 관심 핵산 이외의 추가의 분자를 프로파일링하는 추가의 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 세포 내의 추가의 분자를 프로파일링하는 것을 추가로 포함한다. 이러한 추가의 분자는 RNA, DNA, 단백질, 탄수화물, 소분자, 대사물 및/또는 지질을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0136] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 세포의 시공간적 유전자 발현 프로파일을 다양한 세포 유형의 시공간적 유전자 발현 프로파일을 포함하는 참조 데이터와 비교함으로써, 프로파일링된 세포의 세포 유형을 결정하는 것을 추가로 포함한다.

[0137] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 세포에서 1개 이상의 유전자를 과다발현 또는 녹아웃시켜 1개 이상의 유전자가 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현에 수반되는지 결정하는 것을 추가로 포함한다.

[0138] 시공간적 유전자 발현에서 전사후 변형의 역할을 프로파일링하는 방법

[0139] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 시공간적 유전자 발현에서 전사후 변형 (예를 들어, 7-메틸구아노신, N^6-메틸아데노신 (m^6A), 폴리(A) 테일, 인트론 스플라이싱, 또는 히스톤 mRNA 프로세싱)의 역할을 프로파일링하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 1개 이상의 대사적으로 표지된 관심 핵산 (예를 들어, 1개 이상의 대사적으로 표지된 RNA 전사체)의 전사후 변형에 수반되는 유전자의 녹다운을 포함하는 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 녹다운 세포에서의 다양한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 야생형 세포에서의 동일한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 야생형 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 임의의 변경은 전사후 변형이 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 조절하는 데 수반된다는 것을 나타낼 수 있다.

[0140] 일부 실시양태에서, 세포에서 시공간적 유전자 발현에서 전사후 변형의 역할을 프로파일링하는 방법은

[0141] a) 전사후 변형에 수반되는 유전자의 녹다운을 포함하는 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0142] b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0143] c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서

[0144] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0145] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0146] d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0147] e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0148] f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0149] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0150] h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

[0151] 를 포함하며, 여기서 야생형 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 변경은 전사후 변형이 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 조절하는 데 수반된다는 것을 나타낸다.

[0152] 일부 실시양태에서, 1개 초과의 세포가 본원에 기재된 방법을 사용하여 동시에 분석된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 1회 이상 추가로 수행된다. 단계 (a)-(h)를 반복하고, 다양한 시간량 동안 단계 (a)에서 세포 및 뉴클레오시드 유사체의 풀을 함께 인큐베이션하는 것은 대사적으로 표지된 관심 핵산, 또는 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현이 시간 경과에 따라 관찰되도록 하여, 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현이 프로파일링되도록 한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 임의로 제3 시간량 t_3 동안 반복되고, 임의로 제4 시간량 t_4 동안 반복되고, 임의로 제5 시간량 t_5 동안 반복되고, 임의로 제6 시간량 t_6 동안 반복되고, 임의로 제7 시간량 t_7 동안 반복되고, 임의로 제8 시간량 t_8 동안 반복되고, 임의로 제9 시간량 t_9 동안 반복되고, 임의로 제10 시간량 t_{10} 동안 반복된다.

[0153] 다양한 전사후 변형의 프로파일링이 본원에 개시된 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 특정 유전자 또는 유전자 세트가 설치에 수반되는 것으로 공지되거나 또는 생각되는 임의의 전사후 변형이 본 개시내용의 방법을 사용하여 프로파일링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 번역후 변형은 전사체의 5' 프로세싱 (예를 들어, 5' 캡의 설치)을 수반한다. 일부 실시양태에서, 전사후 변형은 전사체의 3' 프로세싱 (예를 들어, 전사체의 폴리아데닐화 또는 전사체의 3' 단부의 절단)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 전사후 변형은 7-메틸구아노신, N^6-메틸아데노신 (m^6A), 폴리(A) 테일, 인트론 스플라이싱, 또는 히스톤 mRNA 프로세싱이다. 일부 실시양태에서, 전사후 변형은 아데노신의 메틸화를 포함한다. 특정 실시양태에서, 전사후 변형은 m^6A이다.

[0154] 핵산의 전사후 변형에 수반되는 다양한 유전자를 본원에 기재된 방법을 사용하여 녹다운시키고 연구할 수 있다. 일부 실시양태에서, 전사후 변형에 수반되는 유전자는 YTH 도메인 패밀리 (YTHDF) 1, YTHDF2, YTHDF 3, YTH 도메인 함유 (YTHDC) 1, YTHDC2, 메틸트랜스퍼라제 유사 (METTL) 3, 및 METTL14로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본원에 개시된 방법은 한 번에 하나의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 유전자 발현에 대한, 또는 한 번에 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대한 전사후 변형에 수반되는 유전자의 역할을 연구하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 시공간적 유전자 발현에서의 전사후 변형의 역할은 최대 100, 최대 200, 최대 500, 최대 1000, 최대 2000, 최대 3000개 이하, 또는 3000개 초과의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해 동시에 프로파일링된다. 특정 실시양태에서, 시공간적 유전자 발현에서의 전사후 변형의 역할은 최대 1000개의 대사적으로 표지된 관심 핵산에 대해 동시에 프로파일링된다.

[0155] 일부 실시양태에서, 세포는 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계 전에 생체내 조직 내에 존재한다 (즉, 조직은 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 세포를 인큐베이션하는 단계 동안 생체내 존재함). 일부 실시양태에서, 조직 내의 1개 이상의 세포를 생체내 대상체에서 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 인큐베이션하고, 이어서 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계 전에 대상체로부터 조직을 수거한다. 조직을 수거하는 것은 대상체 (예를 들어, 비-인간 실험 동물)로부터 전체 기관을 수거하는 것을 수반할 수 있거나, 또는 조직 생검을 수반할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조직은 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 개, 돼지, 또는 비-인간 영장류, 예컨대 유인원 또는 원숭이) 내에 존재한다.

[0156] 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에서 시공간적 유전자 발현의 역할을 연구하는 방법

[0157] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에서 시공간적 유전자 발현의 역할을 연구하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 이환 조직 (예를 들어, 대상체로부터 채취한 이환 조직)으로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 이환 조직으로부터의 세포에서의 다양한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 비-이환 조직으로부터의 세포에서의 동일한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 비-이환 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 임의의 변경은 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현이 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에 수반될 수 있음을 나타낼 수 있다.

[0158] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에서 시공간적 유전자 발현의 역할을 연구하는 방법은

[0159] a) 이환 조직으로부터의 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0160] b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키고, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 경향은 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0161] c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서

[0162] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0163] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0164] d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0165] e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0166] f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0167] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0168] h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

[0169] 를 포함하며, 여기서 비-이환 세포 또는 비-이환 조직으로부터의 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 변경은 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현에서의 변경이 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에 수반될 수 있음을 나타낸다.

[0170] 일부 실시양태에서, 다중 세포는 본원에 기재된 방법을 사용하여 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 1회 이상 추가로 수행된다. 단계 (a)-(h)를 반복하고, 다양한 시간량 동안 단계 (a)에서 세포 및 뉴클레오시드 유사체의 풀을 함께 인큐베이션하는 것은 대사적으로 표지된 관심 핵산, 또는 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현이 시간 경과에 따라 관찰되도록 하여, 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현이 프로파일링되도록 한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 임의로 제3 시간량 t_3 동안 반복되고, 임의로 제4 시간량 t_4 동안 반복되고, 임의로 제5 시간량 t_5 동안 반복되고, 임의로 제6 시간량 t_6 동안 반복되고, 임의로 제7 시간량 t_7 동안 반복되고, 임의로 제8 시간량 t_8 동안 반복되고, 임의로 제9 시간량 t_9 동안 반복되고, 임의로 제10 시간량 t_{10} 동안 반복된다.

[0171] 유전자 발현에서의 변경과 연관될 수 있는 임의의 질환 또는 장애에서의 1개 이상의 관심 핵산의 역할은 본원에

기재된 방법을 사용하여 연구될 수 있고, 본원에 기재된 방법은 임의의 특정한 질환 또는 장애의 연구로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환 또는 심혈관 질환이다.

[0172] 본원에 기재된 방법에서 다양한 조직 샘플의 사용이 또한 본 개시내용에 의해 고려된다. 임의의 조직 샘플 (예를 들어, 정의에 열거된 임의의 유형의 조직의 샘플)이 본원에 기재된 방법을 수행할 때 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이환 조직은 대상체로부터 채취한 조직 샘플이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 실험 동물이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 마우스, 래트, 개 또는 돼지이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간 (예를 들어, 연구되는 질환 또는 장애로 진단되었거나, 그에 걸린 것으로 생각되거나, 또는 그에 걸릴 위험이 있는 환자)이다. 일부 실시양태에서, 이환 조직은 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계 전에 생체내 존재한다 (즉, 조직은 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 세포를 인큐베이션하는 단계 동안 생체내 존재함). 일부 실시양태에서, 이환 조직 내의 1개 이상의 세포를 생체내 대상체에서 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 인큐베이션하고, 이어서 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계 전에 이환 조직을 수거한다. 조직을 수거하는 것은 대상체 (예를 들어, 비-인간 실험 동물)로부터 전체 기관을 수거하는 것을 수반할 수 있거나, 또는 조직 생검을 수반할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이환 조직은 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 개, 돼지, 또는 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이 또는 유인원) 내에 존재한다.

[0173] 시공간적 유전자 발현을 조정할 수 있는 작용제에 대한 스크리닝 방법

[0174] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대사적으로 표지된 관심 핵산, 또는 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 유전자 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하에 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포 (예를 들어, 정상 세포, 또는 이환 세포)에서의 다양한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 1종 이상의 후보 작용제에 노출되지 않은 세포에서의 동일한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 후보 작용제(들)에 노출되지 않은 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산(들)의 발현에서의 임의의 변경은 대사적으로 표지된 관심 핵산(들)의 시공간적 발현이 후보 작용제(들)에 의해 조정된다는 것을 나타낼 수 있다.

[0175] 일부 실시양태에서, 시공간적 유전자 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법은

[0176] a) 세포를 1종 이상의 후보 작용제 및 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0177] b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0178] c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서

[0179] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0180] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0181] d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0182] e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0183] f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0184] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0185] h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

[0186] 를 포함하며, 여기서 1종 이상의 후보 작용제의 부재 하의 발현에 비해 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 변경은 1종 이상의 후보 작용제가 시공간적 유전자 발현을 조정한다는 것을 나타낸다.

[0187] 일부 실시양태에서, 다중 세포는 본원에 기재된 방법을 사용하여 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 1회 이상 추가로 수행된다. 단계 (a)-(h)를 반복하고, 다양한 시간량 동안 단계 (a)에서 세포 및 뉴클레오시드 유사체의 풀을 함께 인큐베이션하는 것은 대사적으로 표지된 관심 핵산, 또는 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현이 시간 경과에 따라 관찰되도록 하여, 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현이 프로파일링되도록 한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 임의로 제3 시간량 t_3 동안 반복되고, 임의로 제4 시간량 t_4 동안 반복되고, 임의로 제5 시간량 t_5 동안 반복되고, 임의로 제6 시간량 t_6 동안 반복되고, 임의로 제7 시간량 t_7 동안 반복되고, 임의로 제8 시간량 t_8 동안 반복되고, 임의로 제9 시간량 t_9 동안 반복되고, 임의로 제10 시간량 t_{10} 동안 반복된다.

[0188] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 후보 작용제는 후보 작용제의 라이브러리로서 (예를 들어, 소분자 또는 다른 후보 치료제의 스크리닝 수집물로부터) 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제의 라이브러리는 수백개의 후보 작용제 (예를 들어, 약 100개의 후보 작용제, 약 200개의 후보 작용제, 약 300개의 후보 작용제, 약 400개의 후보 작용제, 약 500개의 후보 작용제, 약 600개의 후보 작용제, 약 700개의 후보 작용제, 약 800개의 후보 작용제, 또는 약 900개의 후보 작용제)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 스크리닝 라이브러리는 수천 개의 후보 작용제 (예를 들어, 약 1000개의 후보 작용제, 약 2000개의 후보 작용제, 약 3000개의 후보 작용제, 약 5000개의 후보 작용제, 약 10,000개의 후보 작용제, 약 20,000개의 후보 작용제, 약 30,000개의 후보 작용제, 약 40,000개의 후보 작용제, 약 50,000개의 후보 작용제, 약 60,000개의 후보 작용제, 약 70,000개의 후보 작용제, 약 80,000개의 후보 작용제, 약 90,000개의 후보 작용제, 약 100,000개의 후보 작용제, 또는 100,000개 초과의 후보 작용제)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포당 1종의 후보 작용제가 스크리닝된다. 특정 실시양태에서, 한 번에 단지 1종의 후보 작용제만이 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝된다.

[0189] 일부 실시양태에서, 1종 이상의 후보 작용제는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 및 탄수화물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 후보 작용제 (예를 들어, 소분자)는 항암 치료제이다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제 (예를 들어, 소분자)는 공지된 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제 (예를 들어, 소분자)는 FDA-승인된 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자는 화합물의 라이브러리를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 수용체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 시토카인이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, dsRNA, 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)이다. 임의의 후보 작용제가 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 특히, 시공간적 유전자 발현을 조정할 수 있는 것으로 생각되는 임의의 후보 작용제가 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 후보 작용제에 의한 대사적으로 표지된 관심 핵산, 또는 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 유전자 발현의 조정은 질환 또는 장애의 증상을 감소, 경감 또는 제거하거나, 또는 질환 또는 장애의 발생 또는 진행을 예방하는 것과 연관된다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제에 의해 조정되는 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환 또는 심혈관 질환이다.

[0190] 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법

[0191] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 것으로 생각

되거나 또는 그에 걸릴 위험이 있는 대상체, 또는 건강하거나 또는 건강한 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서 다양한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포 (예를 들어, 건강한 개체로부터의 세포, 또는 건강한 개체의 집단으로부터의 다중 세포)에서의 동일한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 비-이환 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 임의의 변경은 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낼 수 있다.

[0192] 일부 실시양태에서, 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법은

[0193] a) 대상체로부터 채취한 샘플로부터의 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀은 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0194] b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0195] c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서

[0196] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0197] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0198] d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0199] e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0200] f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0201] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0202] h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계

[0203] 를 포함하며, 여기서 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 변경은 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0204] 일부 실시양태에서, 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현은 대조군 실험으로서 동시에 프로파일링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현 프로파일은 참조 데이터를 구성한다.

[0205] 일부 실시양태에서, 다중 세포는 본원에 기재된 방법을 사용하여 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 1회 이상 추가로 수행된다. 단계 (a)-(h)를 반복하고, 다양한 시간량 동안 단계 (a)에서 세포 및 뉴클레오시드 유사체의 풀을 함께 인큐베이션하는 것은 대사적으로 표지된 관심 핵산, 또는 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현이 시간 경과에 따라 관찰되도록 하여, 관심 핵산의 시공간적 발현이 프로파일링되도록 한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 임의로 제3 시간량 t_3 동안 반복되고, 임의로 제4 시간량 t_4 동안 반복되고, 임의로 제5 시간량 t_5 동안 반복되고, 임의로 제6 시간량 t_6 동안 반복되고, 임의로 제7 시간량 t_7 동안 반복되고, 임의로

제8 시간량 t_8 동안 반복되고, 임의로 제9 시간량 t_9 동안 반복되고, 임의로 제10 시간량 t_{10} 동안 반복된다.

[0206] 임의의 질환 또는 장애의 진단이 본원에 기재된 방법에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환 또는 심혈관 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암이다.

[0207] 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 개, 돼지, 또는 비-인간 영장류, 예컨대 유인원 또는 원숭이)이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 가축이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 조직 샘플을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조직 샘플은 생검 (예를 들어, 골, 골수, 유방, 위장관, 폐, 간, 췌장, 전립선, 뇌, 신경, 신장, 자궁내막, 자궁경부, 림프절, 근육 또는 피부 생검)이다. 특정 실시양태에서, 생검은 종양 생검이다.

[0208] 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법

[0209] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖거나 또는 그에 걸릴 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서 다양한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현을 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 동일한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현과 비교할 수 있다. 이어서, 질환 또는 장애에 대한 치료는 비-이환 세포에서의 발현에 비해 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현에서의 임의의 변경이 관찰되는 경우에 대상체에게 투여될 수 있다.

[0210] 일부 실시양태에서, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법은

[0211] a) 대상체로부터 채취한 샘플로부터의 세포를 뉴클레오시드 유사체의 풀의 존재 하에 시간량 t_1 동안 인큐베이션하여 세포에 의해 합성된 핵산을 대사적으로 표지하는 단계이며, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0212] b) 대사적으로 표지된 핵산을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단과 접촉시키는 단계이며, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함하는 것인 단계;

[0213] c) 대사적으로 표지된 핵산을 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서

[0214] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0215] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0216] d) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0217] e) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0218] f) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0219] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계;

[0220] h) 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 영상화하여 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 위치를 결정하는 단계; 및

[0221] i) 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 발현에 비해 시공간적 유전자 발현에서 변경이 관

찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계

[0222] 를 포함한다.

[0223] 일부 실시양태에서, 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현은 대조군 실험으로서 동시에 프로파일링될 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 발현 프로파일은 참조 데이터를 구성한다.

[0224] 일부 실시양태에서, 1개 초과의 세포가 본원에 기재된 방법을 사용하여 동시에 분석된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 1회 이상 추가로 수행된다. 단계 (a)-(h)를 반복하고, 다양한 시간량 동안 단계 (a)에서 세포 및 뉴클레오시드 유사체의 풀을 함께 인큐베이션하는 것은 대사적으로 표지된 관심 핵산, 또는 다수의 대사적으로 표지된 관심 핵산의 발현이 시간 경과에 따라 관찰되도록 하여, 관심 핵산의 시공간적 발현이 프로파일링되도록 한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 상이한 시간량 t_2 동안 적어도 1회 반복된다. 특정 실시양태에서, 단계 (a)-(h)는 임의로 제3 시간량 t_3 동안 반복되고, 임의로 제4 시간량 t_4 동안 반복되고, 임의로 제5 시간량 t_5 동안 반복되고, 임의로 제6 시간량 t_6 동안 반복되고, 임의로 제7 시간량 t_7 동안 반복되고, 임의로 제8 시간량 t_8 동안 반복되고, 임의로 제9 시간량 t_9 동안 반복되고, 임의로 제10 시간량 t_{10} 동안 반복된다.

[0225] 질환 또는 장애에 대한 임의의 적합한 치료가 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 치료제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 수술을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 영상화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 추가의 진단 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 방사선 요법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물이다. 특정 실시양태에서, 치료제 (예를 들어, 소분자)는 항암 치료제이다. 일부 실시양태에서, 치료제 (예를 들어, 소분자)는 공지된 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료제 (예를 들어, 소분자)는 FDA-승인된 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자는 화합물의 라이브러리를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 수용체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 시토카인이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 DNA이다.

[0226] 임의의 질환 또는 장애의 치료는 본원에 기재된 방법에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환 또는 심혈관 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암이다.

[0227] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 조직 샘플을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조직 샘플은 생검 (예를 들어, 골, 골수, 유방, 위장관, 폐, 간, 췌장, 전립선, 뇌, 신경, 신장, 자궁내막, 자궁경부, 림프절, 근육 또는 피부 생검)이다. 특정 실시양태에서, 생검은 종양 생검이다. 특정 실시양태에서, 생검은 고형 종양 생검이다.

[0228] 올리고뉴클레오티드 프로브

[0229] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 방법 및 시스템에 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "스플린트" 프로브로도 지칭됨), 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨) 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)를 포함하는 복수의 (즉, 세트의) 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하며, 여기서

[0230] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 반응성 화학적 모이어티를 포함하고;

[0231] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0232] iii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고,

[0233] 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에

상보적이다.

[0234] 본원에 기재된 모든 올리고뉴클레오티드 프로브는 언급된 성분 각각의 사이에 다양한 뉴클레오티드 길이의 스페이서 또는 링커를 임의로 가질 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오티드 프로브의 성분은 서로 직접 연결될 수 있다. 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 반응성 화학적 모이어티는 본원에 기재된 또는 관련 기술분야에 공지된 임의의 생물직교 관능기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 화학적 모이어티는 아지드, 알킨, 니트론, 알켄, 테트라진 또는 테트라졸을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 화학적 모이어티는 아지드를 포함한다. 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 다양한 다른 성분을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 본원에 기재된 바와 같은 중합 블로커를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 3' 단부에 존재한다. 중합 블로커는, 예를 들어 폴리머라제가 중합을 위한 프라이머로서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 것을 방지하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 차단된 3' 히드록실 기를 포함하는 (예를 들어, 3' 히드록실 기 상에 산소 보호기를 포함하는) 핵산 잔기이다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 핵산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 아데노신, 티민, 시토신, 구아노신 또는 우리딘 잔기이다. 특정 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 티민 잔기이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 폴리-아데노신 (폴리-A) 링커 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리-A 링커 서열은 약 2 내지 약 100, 약 10 내지 약 90, 약 30 내지 약 70, 또는 약 40 내지 약 60개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 폴리-A 링커 서열은 약 50개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0235] 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 또는 약 75개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 12개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0236] 5'-[반응성 화학적 모이어티]-[폴리-A 링커 서열]-[제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분]-[중합 블로커]-3',

[0237] 여기서,]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서,]-[는 임의적인 비-뉴클레오티드 링커 (예를 들어, 화학적 또는 펩티드-기반 링커)를 포함한다.

[0238] 본원에 개시된 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 제2 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함한다. 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오티드의 특이적 서열로 구성된 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 약 5 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 바코드 서열은 약 10개 초과, 약 15개 초과, 또는 약 20개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 5개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 32개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0239] 5'-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3',

[0240] 여기서,]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서,]-[는 임의적인 비-뉴클레오티드 링커 (예를 들어, 화학적 또는 펩티드-기반 링커)를 포함한다.

[0241] 본원에 기재된 방법에 사용되는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 각각 뉴클레오티드의 특이적 서열로 구성된 제1 바코드 서열 및 제2 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 약 5 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 바코드 서열은 약 10개 초과, 약 15개 초과, 또는 약 20개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 약 5개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 약 1 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 약 5 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 바코드 서열은 약 10개 초과, 약 15개 초과, 또는 약 20개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 약 5개의 뉴클레오티드 길이이다. 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되어 있다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 12개의 뉴클레오티드 길이 (예를 들어, 프로브의 5' 단부 상의 6개의 뉴클레오티드 및 프로브의 3' 단부 상의 6개의 뉴클레오티드)이다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 대사적으로 표지된 관심 핵산에 상보적인 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0242] 5'-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 부분]-[제1 바코드 서열]-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제2 부분]-3',

[0243] 여기서,]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서,]-[는 임의적인 비-뉴클레오티드 링커 (예를 들어, 화학적 또는 펩티드-기반 링커)를 포함한다.

[0244] 일부 실시양태에서, 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브는 제4 올리고뉴클레오티드 프로브를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제4 올리고뉴클레오티드 프로브는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함한다 (즉, 상보적 서열은 본원에 정의된 바와 같은 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열과 동일한 길이임). 특정 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 관심 핵산 (예를 들어, RNA, 예컨대 신생 RNA 또는 mRNA)을 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열이다. 일부 실시양태에서, 제4 올리고뉴클레오티드 프로브는 형광단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 형광단은 제4 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부에 부착된다. 일부 실시양태에서, 형광단은 제4 올리고뉴클레오티드 프로브의 3' 단부에 부착된다.

[0245] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제1 바코드 서열은 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 프로브의 다양한 성분의 길이는 본원에 기재된 제3 올리고뉴클레오티드 프로브에 대한 것과 동일하다.

[0246] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 약 1-10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 5-10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실

시양태에서, 바코드 서열은 약 10개 초과, 약 15개 초과, 또는 약 20개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제1 바코드 서열은 5개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 약 1-10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 5-10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 바코드 서열은 약 10개 초과, 약 15개 초과, 또는 약 20개 초과의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 바코드 서열은 5개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 추가의 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되어 있다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0247] 5'-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 부분]-[제1 바코드 서열]-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[제2 바코드 서열]-[제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제2 부분]-3',

[0248] 여기서,]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 각 경우의 임의적인 뉴클레오티드 링커는 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서,]-[는 임의적인 비-뉴클레오티드 링커 (예를 들어, 화학적 또는 펩티드-기반 링커)를 포함한다.

[0249] 키트

[0250] 키트가 또한 본 개시내용에 포괄된다. 한 측면에서, 제공된 키트는 본원에 기재된 1개 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 용기 (예를 들어, 바이알, 앰플, 병, 및/또는 분배기 패키지, 또는 다른 적합한 용기)를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 임의의 복수의 (즉, 세트의) 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 단일 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 다수개 포함하거나 또는 단일 올리고뉴클레오티드 프로브를 다수개 포함하며, 여기서 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 단일 올리고뉴클레오티드 프로브 각각은 상이한 대사적으로 표지된 관심 핵산의 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 키트는 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 또는 1000개 초과의 본원에 개시된 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브 또는 단일 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 방법을 수행하기 위한 다른 시약 (예를 들어, 세포, 뉴클레오시드 유사체의 풀 (여기서, 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 본원에 추가로 기재된 바와 같은 반응성 화학적 모이어티를 포함함), 리가제, 폴리머라제, 아민-변형된 뉴클레오티드, 및/또는 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 시약)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 세포에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 시공간적 유전자 발현에서 전사 후 변형의 역할을 프로파일링하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 질환 또는 장애의 발생 또는 진행에서 시공간적 유전자 발현의 역할을 연구하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 시공간적 유전자 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 데 유용하다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 키트는 키트의 사용에 대한 지침서를 추가로 포함한다.

[0251] 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 시스템

[0252] 본 개시내용은 또한 세포에서 시공간적 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 시스템을 제공한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 a) 세포; b) 뉴클레오시드 유사체의 풀, 여기서 뉴클레오시드 유사체의 풀 내의 각각의 뉴클레오시드 유사체는 반응성 화학적 모이어티를 포함함; c) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단, 여기서 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 각각의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오시드 유사체의 반응성 화학적 모이어티와 반응하는 화학적 모이어티를 포함함; 및 d) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍, 여기서:

[0253] i) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 바코드 서열 및 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함하고;

[0254] ii) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 집단 내의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 제2 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열에 상보적임

[0255] 을 포함한다.

[0256] 일부 실시양태에서, 시스템은 현미경 (예를 들어, 공초점 현미경)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시

스템은 컴퓨터를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 CPU를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 컴퓨터 저장매체 및/또는 메모리를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 카메라를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 현미경검사를 수행하고/거나 영상 분석을 위한 소프트웨어를 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 리가제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 폴리머라제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 아민-변형된 뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 시약을 추가로 포함한다. 본 개시내용의 시스템 내의 세포는 본원에 개시된 세포 유형 중 임의의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템은 다중 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 상이한 세포 유형의 것이다. 특정 실시양태에서, 세포는 조직 내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조직은 대상체에 의해 또는 대상체로부터 제공된 조직 샘플이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0257] 실시예

[0258] 실시예 1: 시공간적으로 해상된 전사체학에 대한 신생 RNA 표지 화학

[0259] 세포가 그의 공간 상황에서 어떻게 활성을 조절하고 환경적 자극에 반응하는지를 이해하는 것에 대한 중요성이 점점 더 인지되고 있다. 실제로, 생물학적 조직은 특정 기능을 발휘하고 활성을 제어하기 위해 협동적으로 작용하는 방대한 수의 공간적으로 국한된 세포로 구성된다. 유기체 또는 조직 내의 세포의 위치는 세포 분화 및 활성에 영향을 미치고, 유사하게, 이종 세포의 랜드스케이프는 조직의 특화된 발생 및 생리학적 상태에 기여한다.

[0260] 조직 및 다세포 유기체에서 세포 조직화를 연구하는 데 있어서의 급속한 진보는 풀링된 세포에서 mRNA의 전반적 검출 및 정량화를 가능하게 하는 트랜스크립톰 서열분석 기술 또는 RNA-seq의 개발로 시작되었다. 단일-세포 RNA 서열분석 (scRNA-seq)은 개별 세포의 트랜스크립톰을 평가하는 것을 용이하게 하여, 세포 유형 사이의 생물학적 차이가 추론되는 것을 가능하게 하였다. 보다 최근에, 공간적으로 해상된 전사체학 방법은 세포 내 공간 상황을 유지하면서 단일-세포 트랜스크립톰을 검사하는 한 단계를 추가로 진행하였다. 영상-기반 방법, 예컨대 STAR맵은 조직, 유사기관 및 기관을 분석하기 위한 중요한 인자인 순차적 영상화를 사용하여 세포의 3차원 국재화를 검출함으로써 이점을 입증한다. 대형 컨소시엄, 예컨대 휴먼 셀 아틀라스(Human Cell Atlas) 및 브레인 이니셔티브 셀 센서스 네트워크(Brain Initiative Cell Census Network)는, 공간 트랜스크립톰을 충분히 이용함으로써, 인간에서 생명, 건강 및 질환을 이해하기 위한 기초로서 조직의 다양한 세포 유형의 포괄적 참조 "맵"을 생성하는 과정에 있다.

[0261] 조직이 관능화된 세포 유형에 의해 어떻게 구조화되는지에 추가로, 세포 내의 생체분자의 공간 조직화는, 더 많이는 아니라도 유사하게, 세포 기능 및 조직 생리학을 이해하는 데 중요하다. 단백질의 공간 분리는 구획화된 세포 환경을 생성하여, 세포의 효과적이고 규칙적인 기능에 기여한다. 상호작용 충실도 및 열역학적 효율을 보장하기 위해, 이러한 단백질의 이종 조직화는 또한 mRNA의 공간 제어 및 국재화된 단백질 번역을 필요로 한다. 동물 세포에서의 mRNA 세포하 국재화의 공지된 예는 섬유모세포, 뉴런, 펩지교세포, 근육 세포 및 심근세포에서 관찰된 것들을 포함하며, 이는 세포 생물학에서 RNA의 비대칭 분포의 재발 주제를 시사한다. 추가로, 비대칭 mRNA 분포 및 현-부위 단백질 합성의 강력한 증거는 전사 및 번역의 탈커플링을 가능하게 하여, 세포 기능에 대한 mRNA 위치의 중요한 역할을 입증한다. 국재화에 추가로, 단백질 합성이 종종 필요한 만큼의 기간 동안 실행되기 때문에, 시간-의존성 방식의 미세-조정 mRNA 프로세싱이 보편적이다. 두드러진 예는 뉴런에서의 mRNA 수송 및 트래픽킹 및 배아 발생을 포함한다. 따라서, 조직 내의 전반적인 세포 조직화 뿐만 아니라 각각의 세포 유형 내부의 특정 구획화된 활성을 연구하는 것이 필수적이다. 그 결과, 세포내 수준에서의 mRNA, RNA-단백질 상호작용 및 단백질 합성의 시공간적 제어를 이해하는 것은 세포가 서로 어떻게 상이한지를 밝혀내는 데 중요하다.

[0262] 그럼에도 불구하고, 대부분의 공간 전사체학 전략은 여전히 범-세포 수준에 대해 검사하여, 단일 세포를 추적하고 구별해내지만, 세포내 환경에서 mRNA 공간 정보를 조사하지는 않는다. 세포하 수준으로 더 깊게 조사하기 위한 시도로도, 관련 기술분야의 현재 기술 상태는 단지 세포 정상 상태에서의 mRNA 국재화의 스냅샷만을 제공하여, 전사와 전사체 턴오버 사이의 고도로 조절된 균형에 대해 모호하게 한다. mRNA 세포하 위치의 역학은 세포 생물학의 근본적인 이해로부터 건강한 상태와 이환된 상태를 구별하는 데까지 광범위한 영향을 미치기 때문에, 규정된 기간에 걸쳐 유전자 발현을 정확하게 프로파일링하기 위해 단일 세포에서 출현부터 사멸까지 mRNA의 전위를 추적하는 시간-해상된 공간 서열분석 방법에 대한 절실한 필요가 존재한다.

[0263] RNA 역학을 포착하기 위한 한 가지 유망한 접근법은 대사적 표지를 통한 것이다. 뉴클레오티드 유사체를 사용

한 트랜스크립톰의 대사 서열분석은 신생 전사된 RNA의 선택적 표지를 가능하게 한다. 4-티오-우리딘 (4SU), 5-브로모-우리딘 (5BrU), 5-에티닐 우리딘 (5-EU), 뿐만 아니라 아데노신 유사체의 사용은 표지된 RNA 상에 상이한 화학적 핸들의 혼입을 가능하게 하며, 이는 추가로 풍부화되고, 다양한 수단을 통해 비표지된 전사체로부터 단리될 수 있다. 이들 접근법은 유전자 발현의 시간 변화의 모니터링 및 신생 전사체의 동역학적 파라미터의 특징화를 성공적으로 가능하게 하였다. 구체적으로, 5-EU-표지된 RNA는 클릭 화학을 통해 포착 및 분류될 수 있으며, 이는 세포의 화학적 프로세싱에서 생물직교성 및 높은 신호-대-잡음 비를 달성하는 큰 잠재력을 입증한다.

[0264] 대사적 표지를 공간 전사체학에 혼입시킴으로써, TEMPO맵 (시간적으로 해상된 계내 서열분석 및 맵핑)을 개발하였다. TEMPO맵은 시간 차원으로 단일-세포 신생 전사체학을 해상하는 새로운 방법이다. 따라서, 한 세포 또는 다수의 세포 내의 RNA의 "4D 맵"이 생성될 수 있다 (도 1). 이 방법은 히드로겔-조직 화학, DNA 바코딩 및 2-염기 서열분석 방식 (SEDAL 서열분석)을 기반으로 구축된다. 이 방법은 대사적 표지, DNA-RNA 근접 라이게이션 및 3-부분 DNA 프로브 설계의 혼입을 포함하며, 이는 높은 효율 및 낮은 배경으로 신생 전사체의 선택적 포착을 가능하게 한다. TEMPO맵은 RNA에 관한 공간, 시간 및 단일-분자 정보를 트랜스크립톰-전반 규모로 제공할 수 있고, 따라서 신생 전사체의 세포하 국재화가 가시화될 수 있다. 다른 공간 전사체학 방법과 같이, TEMPO맵은 단일 세포의 이종성을 구별해내고 이들을 구조화된 조직에 맵핑하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 상기 방법은 mRNA의 게놈-규모 합성 및 분해 속도의 해상 및 조정가능한 기간에 걸친 이들 전사체의 공간 전위 제약의 동시 관찰을 가능하게 함으로써 단일 세포의 상태 및 세포내 기능에 대한 보다 자세한 설명을 제공한다.

[0265] TEMPO맵은 HeLa 세포에서 신생 전사체를 해상하고 표적화된 트랜스크립톰의 관찰된 역학을 보편적인 에피트랜스크립톰 변형인 N6-메틸아데노신 (m^6A)과 연결함으로써 처음 입증되었다. TEMPO맵은 또한, 뉴런이 mRNA 수송 및 탈중심적 단백질 합성을 필요로 하는 정교한 아키텍처를 갖기 때문에 신경과학의 생화학적 기초를 연구하는 것을 가능하게 한다. 상기 방법은 뉴런이 RNA 국재화, RNA-단백질 상호작용 및 국재화된 번역의 관점에서 환경적 자극에 반응하여 어떻게 적응하고 변화하는지를 결정하는 데 사용된다. TEMPO맵은 다목적 플랫폼이며, 유전자 발현이 많은 상이한 세포 및 조직 유형에서 어떻게 동적으로 프로세싱되는지를 이해하고 전사후 조절의 보다 넓은 영향을 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0266] TEMPO맵 방법 설계 및 원리. 신생 RNA의 선택적이고 효율적인 포착을 입증하기 위해, HeLa 세포를 뉴클레오시드 유사체 5-EU에 노출시켜 표지된 전사체 상에 화학적 핸들을 생성하였다 (도 2a). 이어서, 아지드-변형된 DNA 올리고 또는 DNA "스플린트"를 설계하고, 투과화된 세포와 함께 인큐베이션하고, 구리(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (CuAAC)를 통해 표지된 mRNA에 공유 연결시켰다. 이러한 생물직교성 DNA-RNA 접합은 신생 전사된 RNA의 선택적 변형을 보장하여, 알킨-관능기가 결여된 전사체가 검출되지 않게 둔다. 이어서, mRNA의 엑손 영역을 표적화하는 프라이머 및 패드락 쌍의 라이브러리를 설계하였다. 표적화 mRNA에 대한 프라이머 및 패드락의 혼성화 시에, 5' 인산화된 패드락은 원형화되고, 단지 스플린트가 동일한 mRNA 상에 근접할 때에만 RNA에 연쇄되었다. 추가로, 대부분의 형광 계내 혼성화 (smFISH) 실험에서 자가형광 및 산란을 극복하기 위해, 계내 효소적 반응을 수행하여 주형으로서 패드락 서열을 증폭시켰다. 이를 위해, 동일한 유전자를 표적화하는 프라이머 및 패드락의 쌍을 이용함으로써 단일 프로브의 비특이적 혼성화를 추가로 감소시켜, 프라이머 및 패드락이 동일한 RNA에 독립적으로 혼성화하는 경우에만 롤링 사이클 증폭 (RCA)이 가능하게 하여 cDNA 나노볼 (앰플리콘)이 형성될 수 있도록 하였다. 따라서, 이 3-부분 DNA 프로브 설계 (스플린트, 프라이머 및 패드락)를 사용하여, 2-단계 임계화 전략을 통해 시간- 및 서열-제어된 전사체의 증폭을 달성하였다 (도 2c).

[0267] RCA 동안, 아민-변형된 뉴클레오티드를 증폭 반응에 스파이킹하여 앰플리콘을 아민 기로 관능화시켰다. 이어서, 아크릴아미드 관능기를 메타크릴산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 (MA-NHS)에 의해 아민-앰플리콘에 화학적으로 부가하였다. 내인성 전사체의 물리적 위치를 보존하기 위해, 중합 동안 아크릴아미드-변형된 앰플리콘을 히드로겔 단량체와 가교시켜 앰플리콘을 히드로겔 네트워크에 앵커링시킴으로써 DNA-히드로겔 하이브리드를 생성하였다. 이 하이브리드는 비증폭된 RNA 및 DNA 프로브가 제거되도록 하면서 화학적으로 접합된 앰플리콘을 보유하는 분자 스캐폴드를 구축한다. 추가로, 이는 또한 샘플 안정성을 유의하게 개선시키고, 후속 고해상도 영상화를 가능하게 하였다. 최종적으로, 각각의 패드락 상에서, 고유한 바코드를 패드락의 2개의 측면 상에 코딩하였으며, 여기서 한 측면은 각각의 프라이머에 의한 직교-서열 인식에 사용되고, 다른 측면은 SEDAL 서열분석에 의한 순차적 염기 판독 및 디코딩에 사용되어, 단일-세포 트랜스크립톰의 고도로 멀티플렉스화된 검출을 달성하였다.

[0268] 방법을 펄스-추적 실험과 조합하였다. 대략 1000개의 유전자를 코딩하는 RNA를 상이한 추적 지속기간 후에 포

착하고 추적하여 상이한 시점에서의 그의 위치를 통합함으로써 그의 시공간적 궤적을 재구축하였다 (도 2b). 상기 방법은 대사적으로 표지된 전사체를 풍부화시켰고 (도 2d), 조정가능한 시간 과정에 걸쳐 유전자 발현의 변화를 강건하게 검출하였다는 것 (도 2e)이 입증되었다. 엄격한 2-단계 임계화 원리를 적용한 것을 고려할 때, 이러한 접근법이 높은 신호-대-잡음 비로 게놈-전반에 가까운 트랜스크립톰 판독을 달성하였다는 것이 추가로 입증되었다.

[0269] 3-부분 DNA 프로브 설계. TEMPO맵에 사용된 3-부분 DNA 프로브의 서열 설계가 도 3에 제시된다. 3-부분 프로브는 DNA 스플린트 프로브, 프라이머 프로브 및 패드락 프로브로 구성된다. 스플린트는 2개의 영역: 폴리-A 링커 및 스플린트-패드락 어닐링 영역으로 나누어진다. 폴리-A 링커는 50개의 아데노신 뉴클레오티드를 함유하며, 이는 인근 패드락에 도달하기에 충분한 스플린트 길이를 제공한다. 스플린트-패드락 어닐링 서열은 스플린트와 패드락의 혼성화를 가능하게 하여, 라이게이션 단계에서 실링될 수 있는 "닉"을 갖는 이중-가닥 DNA 영역을 생성한다. 5' 인산화 패드락은 스플린트-패드락 어닐링 영역, 동일한 바코드의 2개의 영역, 프라이머-패드락 어닐링 영역, 관심 mRNA를 표적화하는 20개 nt 혼성화 서열 및 여러 짧은 링커로 구성된다. 라이게이션 시에, 패드락은 원형화되고, 계내 효소적 증폭을 위한 DNA 주형이 된다. 프라이머는 매칭 패드락 상의 바코드에 역 상보적인 유전자-고유 영역, 패드락에 또한 상보적인 4개-염기 서열 및 mRNA를 표적화하는 20개 nt 혼성화 서열을 함유한다. 프라이머 및 패드락 상의 2개의 20개 nt 혼성화 영역은 mRNA 상에서 서로 옆에 1-2개의 염기로 존재한다. 프라이머 및 패드락의 결합 시에, 프라이머는 증폭 개시제로서의 역할을 하고, 패드락의 서열은 증폭되어 cDNA 앰플리콘을 생성한다.

[0270] 표지된 프로브-표적화 유전자의 풍부화를 검증하기 위해, 음성 대조군 조건을 단지 인간 베타-액틴 mRNA (ACTB)만을 표적화하는 시험 조건과 비교하였다. 도 2d에 제시된 바와 같이, 15시간 동안 5-EU로 펄싱되고 TEMPO맵 설계에 따라 프로세싱된 HeLa 세포는 양자화 앰플리콘 신호의 높은 형광 강도를 나타냈으며, 이들 대부분은 세포 주변부에 위치하였다. 이러한 명확한 RNA 국재화 경향은 세포골격의 일부로서 베타-액틴 단백질의 내인성 기능 및 위치를 반영하였고, 또한 인간 ACTB 유전자의 국재화된 번역을 확인하였다. 대조적으로, 5-EU 표지, 스플린트 또는 매칭되는 프라이머 쌍 및 패드락이 없는 대조군은 신호를 나타내지 않거나 거의 나타내지 않았다. 비표지된 신호 대비 표지된 5-EU의 신호-대-잡음 비는 표지된 신생 전사체의 유의한 풍부화를 입증하였다.

[0271] HeLa 세포의 주변부에서의 ACTB mRNA의 발견에 기초하여, 상이한 펄싱 및 추적 시간 과정을 고려하여 상기 방법을 mRNA 유출 및 전위의 역학을 포착하는 그의 능력에 대해 시험하였다. 따라서, HeLa 세포에서, 새로 합성된 RNA를 1시간 동안 5-EU로 펄스 표지하고, 세포를 다양한 기간 동안 세척하였다 (도 1d, 좌측). 이어서, TEMPO맵을 적용하여 상이한 길이의 세척 시간에 걸쳐 ACTB 전사체의 전위를 검출하였다. 영상은 핵에서 세포질로의 유출 궤적의 명확한 경향을 보여주었다 (도 1d, 우측). 따라서, 상기 방법은 실제로 신생 전사체를 포착 및 풍부화하고 이들 RNA의 전위 및 역학을 검출할 수 있는 것으로 결론지었다.

[0272] 실시예 2: RNA m^6A 메틸화 프로파일링

[0273] 고등 진핵생물의 mRNA는 유전자 발현 동안 중요한 전사후 조절에 의해 광범위하게 변형된다. 이들 다양하게 변형된 뉴클레오티드 중에서, N6-메틸아데노신 (m^6A)이 진핵 전사체 상의 가장 보편적인 내부 마크이다. m^6A의 기능 및 특징화가 점차 밝혀졌다. 한 예로 m^6A 부위 모티프를 인식하는 m^6A "판독자"의 군인 RNA-결합 단백질이 발견되었으며, 이는 RNA 조절의 분자 메카니즘에 대한 가치있는 통찰을 제공한다.

[0274] m^6A 판독자의 한 부류는 YTH 도메인 패밀리 1-3 (YTHDF1-3) 및 YTH 도메인 함유 1-2 (YTHDC1-2)를 포함한다. 이들의 공유된 진화적 관계 및 유사한 RNA 기질에도 불구하고, 이들 단백질 각각의 생물학적 기능은 고유하다. 예를 들어, YTHDF2는 그의 표적 RNA를 세포 RNA 붕괴 부위로 끌어냄으로써 그의 안정성을 조절하고; YTHDF1은 번역 인자를 동원함으로써 mRNA의 번역을 촉진하고; YTHDF3은 YTHDF1-2와 협력하여 작용하고 RNA 분해 및 번역 둘 다를 용이하게 하는 것으로 시사된다. 대조적으로, YTHDC1은 스플라이싱 인자 및 핵 유출 어댑터 단백질과 상호작용함으로써 핵 유출 및 mRNA 스플라이싱을 촉진하는 반면, YTHDC2는 정자발생 동안 중요한 역할을 한다. 이들 m^6A 판독자는 협력적으로 그의 기능을 발휘하여 다층 조절을 달성하고 m^6A-변형된 전사체의 표현형 결과를 미세-조정한다.

[0275] m^6A-변형된 mRNA의 조절과 세포 내 그의 공간 위치 사이의 관계는 체계적으로 다루어지지 않았다. RNA의 기능이 그의 세포 국재화 및 트래픽킹과 강하게 연관되기 때문에, TEMPO맵 방법이 에피트랜스크립톰 조절의 분자 메

카니즘에 대한 보다 많은 통찰을 제공할 수 있는지 여부를 조사하였다. 이를 위해, 1000개의 m^6A 프로세싱-관련 유전자의 목록을 선별하고, 이로부터 TEMPO맵을 사용하여 시공간적 역학을 검출 및 프로파일링하도록 표적화 프라이머 및 패드락 프로브를 설계하였다. 이러한 접근법은 공간 및 시간에서의 RNA m^6A 메틸화 프로세싱의 영상-기반 설명을 제공하였고, 이러한 전사후 변형을 조절하는 복잡한 네트워크를 밝혀냈다.

[0276] 1000개의 유전자의 목록은 m^6A 존재비가 극도로 높거나 낮은 RNA 및 YTHDF1-3 및 YTHDC1-2에 의해 강건하게 인식되는 RNA를 코딩하는 유전자를 포함하였다. 목록은 또한 m^6A 프로세싱 (부가, 인식, 제거 등)과 관련된 유전자를 포함한다. 추가로, 세포하 위치 마커로서의 역할을 하는 유전자를 포함시켜 RNA의 국재화를 분석하는 것을 도왔고, 세포 주기에서 활성인 유전자를 또한 포함시켜 상이한 시간 과정에서 세포를 가시화하는 것을 도왔다. 야생형 HeLa 세포에서 상기 언급된 유전자를 연구하는 것에 추가로, RNA 상에 메틸화를 설치하는 YTHDF1-3, YTHFC1-2 및 m^6A 기록자 METTL14 및 METTL3을 표적화하는 짧은 간섭 RNA (siRNA)로 세포를 처리함으로써 7개의 유전자를 독립적으로 녹다운시켰다. 이어서, 대조군 대 녹다운 샘플에서 이들 1000개의 유전자의 계내 발현을 비교하여 전사 및 전사후 계내 프로파일링에 있어서의 변화를 포착하였다. METTL14/3, YTHDF1-3 및 YTHDC1-2의 독립적인 역할에 의해 확인된 바와 같이, mRNA 수송 및 트래픽킹은 유전자 녹다운에 의해 다소 영향을 받을 것으로 가정하였다.

[0277] 이들 siRNA에 의한 유전자 녹다운의 효율을 검증하기 위해, STAR맵을 사용하여 초기 시험을 수행함으로써 siRNA-표적화 유전자의 발현 (또는 발현의 결여)을 검출하고, 이 시험을 비처리 야생형 세포와 비교하였다. 배양된 세포의 각각의 웰을 먼저 한 유형의 siRNA로 처리하고, 세포를 2일 동안 성장시킨 후에, 모든 세포를 하나의 웰에서 함께 풀링하고, 밤새 성장하도록 하였다. 이어서, STAR맵 프로토콜을 적용하여 2회 라운드의 계내 서열분석을 사용하여 단일 세포에서 7개의 유전자의 발현을 검출하였다. 유전자 발현을 분석한 후에 HeLa 세포의 8개의 별개의 클러스터가 발견되었으며, 여기서 7개의 클러스터는 YTHDF1-3, YTHDC1-2 및 METTL14/3 녹다운 세포를 나타내고, 1개의 클러스터는 siRNA 형질감염이 없었다 (도 4). 이 방법은 동일한 군의 siRNA로 처리된 경우 1000개의 유전자의 유전자 발현을 프로파일링하도록 확장될 수 있다.

[0278] siRNA 형질감염의 성공을 확인한 후에, 7개의 유전자의 녹다운 실험 (플러스 대조군 siRNA 형질감염)을 HeLa 세포에서 반복하였다. 6시간의 형질감염 후에, 8개의 세포 집단을 함께 풀링하고, 동등하게 6개의 군으로 나누었다. 이어서, 1개의 군을 고정 전에 ~15시간 동안 200 μM 5-EU로 표지하였다. 다음 날, 나머지 5개의 비표지된 세포 군을 각각 1시간 동안 200 μM 5-EU와 함께 인큐베이션하고, 각각 0, 1, 2, 4 및 6시간 동안 신선한 배지 (200 μM 5-EU 함유)로 대체하였다. 후속적으로, TEMPO맵을 수행하고, 1000개의 유전자를 검출하기 위해 실험을 규모조정하였다. SEDAL 서열분석의 미가공 영상을 수집하였다.

[0279] 상이한 길이의 펄스-추적으로 처리된 6개의 세포 군으로부터의 미가공 영상을 수집한 후에, 먼저 컴퓨터 워크플로우를 사용하여 영상을 사전-프로세싱하여 (도 5) 판독물을 추출하고 검출된 유전자를 정량화하였다. 이어서, 데이터 내의 다층 정보를 분석하였다. TEMPO맵은 시공간적으로 해상된 멀티플렉스화된 계내 RNA 검출을 가능하게 하는 제1 실험 방법이다.

[0280] 데이터의 분석은 다음 2개의 층으로 나누어지며: 단지 비교란된 세포에서만 RNA를 분석하고, 유전자 녹다운을 갖는 세포에서는 RNA의 변화를 분석한다. 제1 층에서는, 상이한 시간으로부터의 RNA 판독물의 위치 및 정량화를 비교함으로써 RNA 전위 및 반감기의 변화를 검사한다. 또한 세포 정상 상태에서의 RNA를 나타내는 15시간 표지 데이터와 펄스-추적 데이터를 비교한다. 이어서, 한 시점에 특정 세포하 영역에서 유전자 풍부화를 검사하고/거나 상이한 세포하 영역에 대한 RNA 이동성/부동성을 검사한다. 또한 유전자의 흥미로운 공동국재화 또는 공동-전위를 데이터 분석에 사용할 수 있다. 유사하게, RNA 반감기 또는 분해 속도를 계산할 수 있고, 반감기와 위치 사이의 특별한 연관성을 추가로 검사할 수 있다. 특정 세포하 영역으로의 전위가 긴/짧은 반감기와 연관되는지 또는 전위 속도 자체가 반감기와 연관되는지 여부를 결정하는 것이 유사하게 가능하다. 후속적으로, 유사한 활성 또는 거동을 공유하는 특정 RNA 군이 GO 용어에서 풍부한지 여부 또는 RNA의 상이한 "클러스터"가 별개의 생화학적 역할을 갖는지 여부를 분석하고, 그로부터, m^6A-프로세싱 경로의 보다 심도있는 기계론적 연구를 RNA 국재화의 관점에서 수행한다.

[0281] 제2 층에서는, 제1 층에서의 비교란된 세포의 분석을 유전자-녹다운 세포의 분석과 조합하여 m^6A 기록자 및 판독자 중 어느 것이 RNA 세포하 트래픽킹, 국재화 및/또는 안정성에 수반되는지 여부를 조사한다. YTHDF1이 표적 mRNA의 리보솜 점유를 촉진하고 YTHDF2가 RNA 안정성에 영향을 미친다는 것이 잘 확인되었고, 이들 관찰된 인과

관계는 아직 발견되지는 않은 공간 RNA 국재화 및 트랜스-국재화에 의해 부분적으로 설명될 수 있을 가능성이 높다. 특정 유전자 녹다운에 의해 유도된 변화를 찾는 것 이외에, m^6A 프로세싱 경로를 따라 임의의 유전자를 억제하는 것이 공간 트랜스크립톰 프로파일에서의 보편적인 변화를 유도한다는 것이 또한 가능하다.

[0282] 본 실시예는 m^6A 대사와 관련된 최대 1000개의 유전자에 대한 mRNA 수준, 반감기 및 전위의 분석을 입증한다. 전사후 변형 이외에, 이 방법은 생체분자의 공간 상황 및 세포의 형태학적 상황에 의해 영향을 받는 임의의 생물학적 현상을 연구하는 데 사용될 수 있다.

[0283] 실시예 3: 뉴런 및 3D 무손상 조직에서의 RNA의 가시화

[0284] TEMPO맵은 또한 신경과학에서 중요한 질문을 해결하기 위해 적용될 수 있다. 뉴런의 축삭 및 수상돌기는 세포체로부터 최대 수십 밀리미터 떨어진 공간에 걸쳐있기 때문에, 이들 영역 내의 프로테옴이 자극을 감지하고 지연 없이 그에 반응한다는 것은 매우 주목할 만하다. TEMPO맵은 뉴런 mRNA 수송 및 원위 RNA-단백질 상호작용을 가시화하는 데 사용될 수 있다. TEMPO맵은 배양된 뉴런에 적용될 수 있고, TEMPO맵의 워크플로우는 무손상 조직을 치료하기 위해 최적화될 수 있다. TEMPO맵은 세포의 10개 층과 동등한 100-마이크로미터 두께 조직의 균일한 검출을 가능하게 하였다. TEMPO맵은 마우스를 외부 자극으로 처리 시 마우스 뇌 절편에 사용될 수 있다.

[0285] 뉴런에서의 TEMPO맵의 능력을 입증하기 위해, 현재 실험 워크플로우를 고정된 뉴런 배양물에 적용할 수 있고, 초기 시험을 수행하여 단지 ACTB mRNA만을 검출할 수 있다. 뉴런을 KCl로 자극할 수 있고, KCl 자극 후에 펄스-추적 실험을 수행할 수 있다. 뉴런 자극 후에 가장 고도로 발현된 활성-조절된 유전자를 표적화하는 TEMPO맵 프로브를 사용하고, 이들 유전자의 역학의 포착을 시험한다. 게놈-전반 CRISPR 스크린을 뉴런에서 수행할 수 있고, mRNA 트래픽킹, RNA-단백질 상호작용 및 국부 번역과 관련된 mRNA를 표적화하는 대략 1000개의 유전자 프로브를, 원위 RNA 전위 및 번역 기구의 메카니즘의 영상-기반 연구를 체계적으로 제공하도록 설계할 수 있다. 추가로, 시냅스에서의 에피트랜스크립톰 프로세싱을 탐구할 수 있다. TEMPO맵의 사용은 mRNA 프로세싱과 뉴런 활성, 예컨대 시냅스생성 및 경험-의존성 가소성 사이의 관계에 대한 보다 많은 통찰을 제공할 수 있다.

[0286] 대안적으로, TEMPO맵의 실험적 워크플로우는 RNA 역학이 또한 조직 생리학에 중요하기 때문에 3D 계내 서열분석의 가능성을 가능하게 하도록 최적화될 수 있다. 따라서, 공간 전사체학의 이점을 활용하여, 방법은 새로운 동적 관점으로부터 세포를 구별해내고 카테고리화하여, 조직에 대한 세포의 맵핑을 가능하게 할 수 있다. 워크플로우에서의 개별 화학적 및 효소적 단계는 3D 가시화에 적합하도록 변형될 수 있다.

[0287] 실시예 4: 세포하 해상도에서의 시공간적으로 해상된 전사체학

[0288] 유전자 발현은 다수의 단계의 RNA 생활 주기: 전사, 프로세싱, 유출, 번역 및 분해에서 동적으로 조절된다. 다세포 유기체 내의 기능적으로 다양한 세포-유형에서의 유전자 조절 메카니즘을 이해하는 것은 RNA 국재화 및 동역학의 세포-유형-특이적 측정을 필요로 한다. 단일-세포 RNA 서열분석 (scRNA-seq) 기술은 전사체학 프로파일에 의해 단일-세포 수준 및 재규정된 세포 유형에서 전사체학 측정을 가능하게 하였다. 공간 전사체학 방법의 최근 개발은 추가로 조직 아키텍처와 관련하여 공간적으로 해상된 분자 세포 유형결정을 위해 계내에서 세포 전사체를 카운팅하고 그의 공간 정보를 추적하는 것을 동시에 가능하게 하였다.[1-11] 이와 병행하여, 단일-세포 대사적 표지 실험은 기존 RNA로부터 신생 트랜스크립톰를 분리하는 것이 RNA 대사 프로그램 및 외부 자극에 반응한 즉각적인 조절 변화를 확인하는 데 필요하다는 것을 밝혀내었다.[12]

[0289] 그러나, RNA의 공간 국재화 및 트랜스크립톰 규모에서의 RNA 생물발생, 유출 및 분해의 동역학을 동시에 측정하는 통합된 방법은 여전히 결여되어 있어, 발생, 환경, 대사 및 병리학적 신호에 의해 촉발되는 동적 조절 체계를 이해하는 능력을 제한한다.

[0290] 이러한 기술 갭을 채우기 위해, 시공간적으로 해상된 전사체학 방법이 개발되었다. 이전에, 화학적으로 관능화된 cDNA 앰플리콘을 폴리아크릴아미드 매트릭스에 공유 연결시켜 엄격한 조직 클리어링 및 생체분자 프로세싱을 가능하게 하는, 공간적으로 해상된 전사체 앰플리콘 판독 맵핑 방법 (STAR맵, 도 6a)[1]이 개발되었다. 본 실시예는 STAR맵에 대한 시간 차원의 부가를 기재하였다. mRNA는 화학적으로 변형된 중합성 뉴클레오시드로 대사적으로 표지되고, 변형된 전사체는 중합체 매트릭스에 직접 연결된다.

[0291] 현재의 STAR맵 프로토콜은 아크릴레이트-변형된 DNA 앰플리콘을, 제한된 mRNA 보유 능력을 입증하는 가교 방법인 폴리아크릴아미드 히드로겔 매트릭스에 공유 연결시킨다. 본 실시예에서는, 대사적으로 표지된 RNA를 히드로겔에 직접 연결시켰다. 이 방법은 가교의 효율을 증가시키기 위한 해결책을 제공하고, 표지된 RNA를 우선적

으로 연결시킴으로써, 시간 과정에 따른 샘플의 분석을 위한 펄스-추적 실험[12]과 상용성이다 (도 6b, t-STAR맵). mRNA를 먼저 5-EU로 대사적으로 표지하고, 표지된 전사체를 클릭 화학을 포함한 2-단계 합성을 통해 폴리아크릴아미드 히드로겔과 가교시킨다. 합성 반응식은 생물직교 표지 전략에서 통상적으로 발견되는 고수율 반응으로 구성되며, 이는 변형된 RNA가 링커의 단부에서 아크릴레이트 기를 통해 아크릴아미드 겔에 연결되는 것을 돕는다. 아크릴레이트 기는 폴리아크릴아미드 매트릭스의 자유 라디칼 중합에 참여하여, 중합 동안 RNA를 폴리아크릴아미드 히드로겔 상에 잠그는 연결로서의 역할을 한다. 화학 반응은 효율적인 RNA-히드로겔 가교를 제공하여 보다 많은 지정된 RNA 분자가 STAR맵에 의해 가시화될 수 있도록 한다.

[0292] 이어서, 펄스 및 추적 실험 (도 2b)을 포유동물 세포 배양 및 동물 모델로 수행한다. 이어서, 데이터를 분석하여 개별 RNA의 시공간적 궤적을 세포 내부에서 컴퓨터로 추가로 재구축한다. t-STAR맵 방법은 중요한 생물학적 질문, 예컨대 자극에 반응한 세포 상태 변화 (예를 들어, 세포 주기, 신경 활성, 바이러스 감염 등) 및 기능적 기관에서의 세포-유형-특이적 유전자 조절 프로그램을 연구하는 데 사용될 수 있다.

[0293] 실시예 5: 시공간적으로 해상된 전사체학을 위한 신생 RNA 표지 화학의 추가의 사용

[0294] 본 실시예는 단일 세포에서의 유전적 및 대사적 활성을 검출 및 정량화하기 위한 시스템을 제공하고, 조직 및 기관에서의 세포 유형, 세포 상태 및 세포-세포 상호작용의 조성 및 변화를 이해하기 위한 플랫폼을 구축하는 신규 영상-기반 계내 RNA 서열분석 방법을 기재한다. 단일-세포 RNA 서열분석에 공간 및 시간 해상도를 제공함으로써, 기술은 관심 세포 활성의 고처리량 다중모드 "체학(omics)" 정보를 제공한다.

[0295] 계내 RNA 혼성화 및 서열분석의 방법이 발명되고 개발되어, 단일 세포에서 유전자 발현의 게놈-전반 프로파일링을 밝혀내고 질환을 이해하는 능력을 유의하게 가속화시키는 도구를 제공한다. 그러나, 특정 시간 프레임에 걸쳐 유전자 발현을 프로파일링하기 위해 단일 세포에서의 RNA 합성, 수송 및 턴오버를 측정하고 예측하는 것에 대한 절실한 필요가 남아있다. 본원에 기재된 방법론은 RNA에 관한 공간, 시간 및 단일-분자 정보를 고처리량 방식으로 제공하는 그의 성질로 인해 고유하다. DNA-전사체 근접 라이게이션은 다양한 기존의 생명공학적 도구, 예컨대 대사적 표지, DNA 바코딩 및 SEDAL 순차적 서열분석[1]과 조합된다.

[0296] 공간적으로 해상된 전사체 앰플리콘 판독 맵핑 (STAR맵)[1]이 개발되었으며, 이는 유전자 발현의 공간적 맵핑을 위한 강건한 계내 전사체학 도구이다. 본 실시예는 단일 세포에서 트랜스크립톰을 가시화할 뿐만 아니라 시간 프레임 내에서 트랜스크립톰의 변화를 추적하는 대안적 방법을 기재한다. 이러한 전략 (도 7)은 mRNA를 화학적으로 변형된 뉴클레오시드, 5-에티닐-우리딘 (5-EU)으로 대사적으로 표지하고, 표지된 mRNA를 아지드-변형된 DNA 프라이머와 구리(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (CuAAC)를 통해 라이게이션시킴으로써 달성된다. 이어서, 이러한 RNA-프라이머 가교 사건은 mRNA에 혼성화하는 패드락 프로브에 의해 인식되고 롤링-사이클 증폭에 의해 증폭된다. 후속적으로, 증폭된 신호는 히드로겔 스캐폴드에 보유된다. 유전자-고유한 식별자를 각각의 패드락 프로브에 코딩하였으며, mRNA의 정체를 SEDAL 서열분석에 의해 가시화하고 디코딩한다.

[0297] 이러한 접근법은 게놈-전반에 가까운 트랜스크립톰 풍부화 및 대사적으로 표지된 전사체의 선택적 보유를 달성하고, 특정 시간 과정에 걸쳐 유전자 발현의 변화를 강건하게 검출할 수 있을 것이다. HeLa 세포에서의 인간 베타-액틴 유전자 (hACTB)의 표적화가 도 8에 제시되며, 이는 5-EU 비표지된 전사체와 비교하여 보유된 전사체의 유의한 풍부화, 뿐만 아니라 상이한 시간 프레임에 걸쳐 전사체를 검출하는 능력을 입증한다.

[0298] RNA 프로세싱, 번역 및 분해에 영향을 미치는 것으로 나타난 풍부한 에피트랜스크립톰 마크인 N6-메틸아데노신 (m^6A)이 있거나 없는 RNA의 역학을 또한 정량화하였다. 이러한 RNA 변형의 영향을, 2개는 m^6A를 함유하는 반면 다른 2개는 m^6A를 함유하지 않는 4개의 대표적인 RNA의 역학을 검출함으로써 연구하였다 (도 9). 영상에서 4개의 색으로 나타내어지는 4개의 유전자가 동시에 검출되었다는 것이 입증되었다. RNA 분해의 영상-기반 측정은 제2-세대 서열분석을 사용하여 이전에 측정된 RNA 반감기와 합리적으로 상관관계가 있고, 영상은 모든 4개의 RNA에 대한 RNA 전위의 경향을 명확하게 보여준다.

[0299] 실시예 6: 시공간적으로 해상된 단일-세포 전사체학은 RNA 생활 주기의 동역학적 스컬프팅을 밝혀낸다

[0300] 세포 트랜스크립톰의 시공간적 조절은 세포 기능의 궁극적인 실행에 대해 단백질 발현을 지시하는 데 중요하다. RNA 합성, 붕괴, 유출 및 전위의 복잡한 세포내 역학은 기존의 전사체학 방법의 제한으로 인해 모호해졌다. 시간적으로 해상된 계내 서열분석 및 맵핑 (TEMPO맵)을 위한 방법이 본원에 기재된다. 이 방법은 단일 세포에서 시간 및 공간에 걸쳐 세포하 유전자 발현을 밝혀내기 위한 고도로 멀티플렉스화된 3차원 계내 맵핑 기술을 나타

낸다. TEMPO맵을 사용하여, 인간 세포에서의 RNA 생활 주기 전반에 걸쳐 수천개의 유전자의 중요 동역학적 파라미터를 결정하였으며, 이는 유전자 기능, 세포하 조직화 및 세포 주기 진행과 관련하여 유전자 발현의 다단계 동역학적 형상화를 밝혀내었다. 이들 시공간적으로 해상된 전사체학 측정은 어떻게 조절 전략이 동역학적 스컬프팅을 통해 시간 및 공간에서 정확한 유전자 발현을 가능하게 하는지에 대한 이해를 깊게 한다.

[0301] 서론

[0302] 세포 상태 및 기능은 유전자 발현의 시공간적 이종 조절에 의해 형상화된다. 시간 및 공간에서 단일-세포 해상된 트랜스크립톰-전반 정보를 체계적으로 프로파일링하는 능력은 세포 및 조직에서의 전사 및 전사후 유전자 조절 메카니즘을 이해하는 데 중요하다. 공간적으로 해상된 전사체학 방법은 조직 형태와 관련하여 이종 세포 유형으로부터의 유전자 발현의 통합된 프로파일링을 가능하게 하였다[13-19]. 그러나, 이들 공간 전사체학 접근법은 단지 세포 및 조직의 정적 스냅샷만을 제공하여, 유전자 발현의 동적 흐름에 대해 모호하게 한다[20]. 대조적으로, 대사적 RNA 표지 접근법은 신생 단일-세포 트랜스크립톰의 프로파일링을 가능하게 하였지만, 공간 정보가 결여되어 있다[21-25]. 추가로, 살아있는-세포 영상화는 세포 내부의 RNA 궤적을 직접적으로 추적할 수 있지만, 멀티플렉스화된 전사체를 동시에 가시화하는 것은 도전과제로 남아있다[26]. 따라서, 세포하 및 단일-세포 해상도에서 출현부터 사멸까지 신생 mRNA를 계내 추적하는, 유전자 발현을 프로파일링하기 위한 시간-해상된 고도로 멀티플렉스화된 공간 맵핑 방법에 대한 절실한 필요가 존재한다.

[0303] 여기서, 시간 및 공간에서 RNA 생활 주기의 시스템-전반 단일-세포 분석을 제공하기 위해, 세포하 해상도에서 시간 경과에 따라 신생 전사체학의 시공간적 진화를 추적하는 방법인 TEMPO맵 (시간적으로 해상된 계내 서열분석 및 맵핑)을 개발하였다 (도 10a). TEMPO맵은 히드로겔-세포 스캐폴드 내에서 200 nm 해상도로 현재의 최신 기술인 3차원 (3D) 계내 RNA 서열분석과 시간-게이팅된 신생 트랜스크립톰의 대사적 표지 및 선택적 증폭을 통합한다[13]. 정확하게 제어된 펄스-추적 표지 실험을 처음으로 설계함으로써, RNA 생활 주기 동안 수천개의 유전자에 대한 동역학적 파라미터의 전체 수집물, 예컨대 전사 속도, 세포하 영역에서의 붕괴, 핵 유출 및 세포질 전위를 동시에 추적하였다. 이들 시공간적 파라미터에 비추어, 상이한 유전자의 mRNA는 RNA 생활 주기의 상이한 단계에서 및 상이한 세포-주기 기에 걸쳐 동역학적으로 분류되며, 이는 궁극적으로 분자 및 세포 기능을 제공한다는 것이 발견되었다.

[0304] 시공간적으로 해상된 전사체학에 대한 TEMPO맵

[0305] TEMPO맵은 5-에티닐 우리딘 (5-EU)에 의한 세포의 대사적 표지로 시작하며[25,27], 이는 표지된 mRNA 상에 생물직교 화학적 핸들을 부가한다 (도 10b). 이어서, 대사적으로 표지된 RNA로부터 유래된 상보적 DNA (cDNA) 앰플리콘을 선택적으로 생성하기 위해 각각의 유전자에 대해 트리-프로브 세트 (스플린트, 패드락 및 프라이머)를 설계하였다 (도 10b-10c 및 14b-14c): (1) 스플린트 프로브는 5-EU 표지된 mRNA에 구리(I)-촉매된 아지드-알킨 고리화첨가 (CuAAC, 도 14a)를 통해 공유 접합된 아지드- 및 쇄-종결인자 변형된 DNA 올리고뉴클레오티드이고, 따라서 후속 cDNA 증폭으로부터 비표지된 RNA를 배제하고; (2) 패드락 프로브는 20-25개의 뉴클레오티드 (nt) cDNA 서열 및 유전자 바코드를 갖는 mRNA 표적을 인식하며, 스플린트 프로브가 근접할 때 원형화될 수 있고; (3) 프라이머 프로브는 패드락 프로브 옆의 이웃하는 20-25개 nt를 표적화하고, 롤링 사이클 증폭 (RCA)을 통해 원형화된 패드락을 계내 증폭시키는 프라이머로서의 역할을 하여, cDNA 나노볼 (앰플리콘)을 형성하고, 이는 표준 형광 계내 혼성화 (smFISH)에서 자가형광 및 산란을 극복하고; (4) 조합으로, 모든 3가지 유형의 프로브에 의해 결합된 mRNA만이 2-단계 임계화 전략을 통해 표지- 및 서열-제어된 방식으로 표지된 mRNA 집단의 선택적 검출을 위해 증폭될 것이다 (도 10c-10d).

[0306] 초기에 설계된 바이-프로브 세트는 스플린트 및 프라이머의 이중 역할을 하는 쇄 종결인자 없이 하나의 유전자-표적화 패드락 프로브 및 하나의 일반적인 아지드-변형된 프로브를 통해 5-EU-표지된 RNA를 인식한다는 것이 주목할 만하다 (도 14b). 그러나, 바이-프로브 설계는 앰플리콘의 강한 배경 신호를 생성하였으며 (도 14b), 이는 단일 유전자-표적화 패드락 프로브가 덜 특이적인 유전자 검출을 달성한다는 것 및 트리-프로브 설계에서의 이중 유전자-표적화 프라이머 및 패드락 쌍이 일부 상황 하에 이상적일 수 있다는 것을 시사한다[13]. TEMPO맵 프로토콜은 구체적으로, 대사적으로 표지된 전사체를 풍부화하고 (도 10d), 조정가능한 시간 과정에 걸쳐 베타-액틴 mRNA (ACTB) 세포하 국재화의 변화를 강건하게 검출하는 것으로 관찰되었다 (도 14d).

[0307] 후속적으로, 계내 생성된 cDNA 앰플리콘 라이브러리를 다중 사이클의 형광 영상화를 위해 히드로겔 매트릭스에

포매시켜 SEDAL (동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소를 갖는 서열분석)을 통해 유전자-코딩 바코드를 디코딩함으로써 (도 10b 및 14c)[13] 수백 내지 수천개의 유전자를 동시에 검출한다. 서열분석 사이클의 완료 후에, 이어서 앰플리콘 판독물을 등록하고, 디코딩하고, 세포하 및 단일-세포 해상된 분석을 위해 3D 분할에 적용한다 (도 11a).

[0308] 단일-세포 해상도에서의 시간 및 공간에서의 RNA 생활 주기

[0309] 이어서, TEMPO맵을 적용하여 인간 HeLa 세포에서 991개 유전자 (981개 코딩, 10개 비-코딩 RNA)의 집중 목록을 프로파일링하였다. STAR맵 프로브[13]에 의한 또 다른 7개의 유전자가 또한 앰플리콘 제조 동안 포함되었으며, 이들은 배치 보정 및 데이터 정규화를 위한 내부 대조군으로서 표지 및 비표지된 RNA 둘 다에 혼성화한다 (도 14e). 이어서, 1시간 (hr) 펄스 표지 및 다양한 추적 시간 (0, 1, 2, 4 및 6시간) 뿐만 아니라 20-시간 펄스 표지에 의한 하나의 정상-상태 참조를 사용하여 펄스-추적 실험[15,28]을 수행하였다 (도 11a). 모든 샘플 내의 바코드를 6회 라운드의 계내 서열분석에 걸쳐 서열분석하고, 이어서 최종 라운드의 세포하 구획 염색 (핵 및 세포질)을 수행하여 세포체를 분할하고 3D에서 19,856개 세포에서의 앰플리콘의 세포하 위치를 할당하였다 (도 11b-11c). 세포질 공간을 거리 비 (DR)-기반 방법을 사용하여 중간 영역 ("중간") 및 주변부로 추가로 분할하였으며 (도 11d): 각각의 앰플리콘을 각각 3D에서 핵막 (dn) 및 세포막 (dc)까지의 그의 최단 거리에 의해 측정하고, DR 값을 dn 대 dn+dc의 비로서 계산한다. 1시간 펄스 표지 후 0시간 내지 6시간 추적 시간에서, 세포당 총 RNA 판독물의 감소, 핵에서 세포질로의 RNA 분포의 점진적인 이동 및 중간 세포질 영역에서 주변 영역으로의 추가의 할당이 관찰되었다 (도 11b-11c). 주목할 만하게, 핵에 보유된 유의한 분율의 판독물 (~40%)이 심지어 6시간 추적 후에도 여전히 관찰되었다. 보유된 RNA 분자에 대한 보다 면밀한 검사는 가장 높은 핵-대-세포질 판독물 비를 갖는 RNA가 긴 비-코딩 RNA (NEAT1, MALAT1)를 포함한다는 것을 밝혀냈으며, 이는 세포 분획으로부터의 RNA의 심층 서열분석에 의해 지지된다 (도 15a)[29,30]. 주목할 만하게, 핵-보유된 mRNA (KIF13A, LENG8, CCNL2, COL7A)가 또한 발견되었다. 이러한 관찰은 세포질 유전자 발현 잡음을 완충하는 조절 역할로서 작용할 수 있는 mRNA의 광범위한 핵 보유라는 이전의 발견을 검증한다[31,32].

[0310] 이어서, 1시간 펄스 조건 하의 모든 세포를 PHATE 및 다이나모(Dynamo) (도 11e, I)를 사용하여 단일-세포 해상된 동적 궤적 분석을 위해 다양한 추적 시점으로 풀링하였다 (18,176개 세포)[33,34]. 결과는 추적 시간의 진행에 따라 명확한 궤적을 보여주었으며, 이는 시간적으로 해상된 단일-세포 전사 상태가 유전자 발현 공간에서 용이하게 구별되고 정렬될 수 있다는 것을 시사한다. 동일한 PHATE 좌표를 RNA 분해 동역학 벡터로 오버레이하는 것은 RNA 생활 주기 진행에 따른 단일-세포 궤적을 추가로 재현하였다[34-36]. 이어서, 펄스-추적 시간선에 의해 규정된 RNA 생활 주기가 세포-주기 진행과 어떻게 정렬되는지를 질문하였다. 이를 위해, 세포를 세포-주기 점수화를 사용하여 마커 유전자의 그의 신생 발현에 기초하여 3개의 세포 주기 기 (G1, G1/S 및 G2/M)로 분류하였다 (도 16b-16c)[37]. 흥미롭게도, 세포-주기 진행의 방향은 펄스-추적 시점 진행에 직교한다 (도 11e, II). 이러한 관찰은 TEMPO맵이 세포 주기에 추가로 RNA 생활 주기에 관한 독립적인 시간적 정보를 제공할 수 있다는 것을 시사한다.

[0311] 이어서, TEMPO맵 데이터세트로부터의 세포하 역학을 추가로 프로빙하였다. 이를 위해, 궤적 분석을 위해 단일-세포 핵 발현을 세포질 발현과 연쇄시킴으로써 핵세포질 유전자별-세포 매트릭스를 생성하였다 (도 11e, 하단). 표지 시점에 따라 단일 세포의 단방향 궤적을 회수하는 것 (도 11e, III)과 별도로, 적은 분율의 G2/M 세포가 좁은 궤적을 형성하고 별개의 공간 내로 투사된 것으로 밝혀졌으며, 이는 이러한 G2/M 세포 군에서의 핵세포질 RNA 분포가 나머지 G2/M 세포와 대폭 상이하다는 것을 시사한다. 이들 공간적으로 별개인 세포는 그의 고유한 RNA 핵세포질 분포를 갖는 유사분열을 겪은 세포인 것으로 의심되었다[38]. 실제로, 이러한 궤적 상의 세포는 상이한 유사분열 기에 있었으며, 그 동안 RNA는 G2 세포에서의 경우와 비교하여 염색질 영역으로부터 대부분 배제되었다 (도 11e, V). 추가로, 이러한 별개의 궤적 웰의 균일한 방향은 유사분열의 시간 진행과 정렬되며 (도 1e, V, 5-8), 이는 시간적 유사분열 이행이 세포하 RNA 국재화 패턴에 의해 추론될 수 있다는 것을 나타낸다. 그 결과, 시간-게이팅된 핵세포질 분포를 함께 사용함으로써, 이 방법은 G2 및 M 세포를 분리할 뿐만 아니라 유사분열의 궤적을 추적하여, G2/M에서 RNA 카피수의 변화가 거의 없지만 유사분열 동안 염색체로부터 극적인 RNA 축출을 겪은 것으로 밝혀진[39] 단일-세포 전사체 발현 상에서 세포-주기 진행의 보다 높은 시간 해상도를 제공한다.

[0312] 세포 주기에 걸친 세포하 RNA 동역학의 정량화

[0313] RNA 생활 주기 동안 개별 동적 단계를 추가로 정량화하기 위해, 각각의 유전자에 대한 6개의 주요 동역학 상수 - 합성 (α), 전세포 분해 (β), 핵 분해 (βn), 핵 유출 (λ), 세포질 분해 (βc) (도 12a) 및 세포질 전위 (γ) (도 12b)를 추정하기 위한 모델을 개발하였다. 세포하 RNA 판독물에 대한 물리적 세포 부피의 잠재적 편향을 최소화하기 위해, 전세포, 핵 및 세포질 내의 각각의 RNA 종의 농도 (판독물/복셀)에 기초하여 상수를 추정하였다 (도 17a-17b). 모델에서, 먼저 α 및 β를 평균 전세포 RNA 농도를 사용하여 추정한 다음, βn, βc 및 λ를 평균 핵 및 세포질 RNA 농도를 함께 사용하여 추정하였다 (도 17c). 모델은 품질 제어를 위한 피팅 임계치 (R^2 >= 0.5인 991개의 유전자 중 911개의 유전자)로, α[28,40]에 대해 0차 동역학 및 β[28,40], βn, βc[32] 및 λ[32,41]에 대해 1차 동역학을 가정하였다 (도 17c). 이와 병행하여, 각각의 유전자의 DR 값을 상이한 시간에 걸쳐 계산하고, 모든 유전자에 대해 일정한 전위 속도를 가정하여 γ를 피팅하였다 (도 12b).

[0314] 주목할 만하게, RNA의 핵 유출은 이전의 RNA 속도-기반 모델에서 일정한 것으로 간주되었지만[40], 이러한 결과는 1차 가정 하의 λ[41]가 상이한 RNA 종에 걸쳐 실질적으로 달라지며, 이는 핵세포질 전사체 존재비의 항상성을 조절할 수 있다는 것을 시사하였다. 추가로, 처음으로, 다수의 유전자의 RNA의 세포질 전위를 1시간 해상도에서 동시에 체계적으로 연구할 수 있었다. 대다수의 유전자는 γ > 0이었으며 (도 17e-17f), 이는 핵막에서 세포질 막으로의 전위 방향을 시사한다. 그러나, γ < 0 (R^2 > 0.5)인 유전자의 작은 하위세트는 엑소솜 및 막 단백질에서 유의하게 풍부화되었으며 (도 17g), 이는 시토졸에서 내형질 세망으로의 가능한 재배치 사건 또는 ER-연관된 RNA보다 비-ER 앵커링된 RNA에 대한 보다 빠른 분해 속도를 나타낸다. 상이한 RNA 분자의 세포질 전위를 지시하는 동역학적 메카니즘을 조사하기 위해 추가의 연구를 수행할 필요가 있다 (도 17h).

[0315] 이어서, 이들 동역학적 파라미터 사이의 관계를 911개의 유전자로 이루어진 매트릭스와의 그의 쌍별 상관관계를 플롯팅함으로써 탐구하였다 (도 12c). 유전자 세트는 3개의 분해 상수에서 양의 상관관계를 나타냈으며 (β 대 βn, βn 대 βc 및 βn 대 βc, 각각 R = 0.86, 0.39 및 0.14), 한편 가장 높은 상관관계는 β 및 βn이었다 (R = 0.86). 이러한 관찰은 RNA 안정성이 주로 고유 특색 (서열, 모티프 등)에 의해 형상화되지만, 상이한 유전자는 핵 대 시토졸 RNA 분해의 할당이 상이하다는 것을 시사하였다. 추가로, 분해와 핵 유출 사이의 유의한 상관관계가 관찰되었으며 (λ 대 β, βn 및 βc에 대해 각각 R = 0.45, 0.36 및 0.14), 이는 RNA 붕괴와 핵 유출 사이의 잠재적 동역학적 커플링을 시사한다. 상기 언급된 상관관계에도 불구하고, 다른 동역학적 파라미터 쌍 사이의 상관관계는 약하며 (R < 0.1), 이는 상이한 세포하 영역에서의 합성, 수송, 붕괴 및 전위의 개별 단계가 RNA 생활 주기 동안 별개의 동역학적 조절에 적용된다는 것을 입증하였다.

[0316] 이어서, RNA 역학이 세포 주기 기에 걸쳐 상이한지 여부를 질문하였다. 이를 위해, 상이한 세포-주기 기에서 6개의 파라미터의 제2 쌍별 상관관계 분석을 수행하였다 (808개의 유전자가 품질 제어를 통과함; 도 12d). 흥미롭게도, RNA 생활 주기의 시공간적 서열분석 후에, 다음과 같이 세포 주기 기에서의 상관관계가 감소하는 경향이 나타난 것으로 관찰되었다: RNA 생산의 초기 단계에서, 3개의 상태의 α는 고도로 상관관계가 있었고 (R ~ 1, 도 18a); 핵에서의 전사후 프로세싱 동안, βn 및 λ 둘 다는 중간 정도의 상관관계를 가졌고 (R ~ 0.7 및 0.6, 도 18c-18d); 최종적으로, RNA 생활 주기의 종료 근처에서, 세포질 상수 βc 및 γ는 훨씬 더 약한 상관관계를 가졌다 (R ~ 0.3 및 0.1, 도 18e-18f). 이러한 관찰은 상이한 RNA 단계에서의 동역학적 분류가 세포 주기의 진행을 따라 점차 전환되고, RNA가 그의 시공간적 조절에 따라, 조절의 보편적인 방향으로부터 상이한 세포 상태에서의 독립적인 조절로의 이동에 적용된다는 것을 밝혀내었다. 따라서, 세포-주기-의존성 RNA 동역학 랜드스케이프의 프로파일링으로부터, 세포의 생활 주기를 조절하는 것과 RNA의 생활 주기를 조절하는 것 사이의 연관성이 입증되었다.

[0317] 이전 연구는 RNA 합성 속도가 G1 기보다 G2/M 기에서 더 높다는 것을 보고하였다는 것이 주목할 만하다[42]. TEMPO맵 데이터 및 공개된 scEU-seq 데이터[25]로부터 세포당 RNA 카피수를 사용하여 α 및 β의 계산을 반복하였을 때, RNA 합성 속도가 G2/M에서 ~15%만큼 더 높은 반면 세포 주기에 걸친 분해 속도는 잠재적으로 상이한 세포주 때문에 2개의 데이터세트 사이에서 상이한 경향을 갖는다는 것을 보여주는 일관된 결과가 관찰되었다 (도 18g-18h). 그러나, RNA 농도 (α의 경우 단위 핵 부피당 RNA 카피수 및 β의 경우 단위 세포 부피당 RNA 카피수)를 사용하여 α 및 β를 추정하였을 때, 상이한 세포-주기 단계에서 α 및 β 값의 분포의 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (도 18i). 세포당 RNA 카피수 대 RNA 농도에 의한 추정된 α 및 β의 대조는 전사 속도가 염색체의 이용가능한 부위에 비례하고 유전자 발현 항상성이 세포 크기에 의해 조절된다는 것을 보여준 이전 연구[43]

와 일치한다. 추가로, 단일-세포 핵세포질 PHATE 포매로부터 G2 및 M 기의 세포를 하위세팅하였을 때 (도 16d), 유의하게 더 높은 λ가 M 기에서 발견되었으며, 이는 유사분열 동안 염색체로부터의 RNA 축출의 관찰을 추가로 확인시켜 준다 (도 18j, 도 11e, V).

[0318] 동역학적 상수와 잠재적 공동-조절 메카니즘 (예를 들어, 공유된 RNA 모티프 및 RNA-결합 단백질) 사이의 상관관계를 고려하여, 이어서 상이한 유전자가 RNA 생활 주기 및 세포 주기와 관련하여 공유된 동역학적 패턴을 진화시킬 수 있는지 여부를 질문하였다. 18개의 파라미터 (3개의 세포 주기 단계에 걸쳐 6개의 동역학적 상수)를 사용한 클러스터링 분석은 4개의 별개의 동역학적 랜드스케이프 군을 밝혀내었다 (도 12e). 클러스터의 보다 면밀한 검사는 보다 느린 합성 (낮은 α), 보다 큰 안정성 (낮은 β) 및 보다 느린 유출 (λ)을 갖는 유전자가 헬리카제 활성 및 다른 ATP-결합 기능에서 풍부화되었고 (클러스터 0); 보다 낮은 α 및 중간 정도의 β 및 λ를 갖는 유전자 (클러스터 1)가 전사에서 강하게 풍부화되었고; 불안정하고 급속하게-유출된 RNA (높은 β 및 λ)를 갖는 유전자 (클러스터 2)가 유비퀴틴화 및 막 단백질과 관련된 관점에서 풍부화되었고; 보다 빠른 합성 (높은 α), 보다 큰 안정성 (낮은 β) 및 보다 빠른 유출 (높은 λ)을 갖는 유전자 (클러스터 3)가 mRNA 스플라이싱 및 미토콘드리아 기능과 같은 구성적 세포 과정에서 풍부화되었다는 것을 보여준다 (도 12f). 추가로, 이들 유전자 군의 공간 패턴을 비교하였다 (도 12g). 클러스터 0 및 3의 유전자는 세포질에서 더 우세한 것으로 나타난 반면, 클러스터 1 및 2는 시간 과정에 따라 핵에서 더 보유된 것으로 관찰되었다. 3개의 세포하 영역 내의 4개의 클러스터의 RNA 판독물이 이러한 관찰을 추가로 지지하였으며, 이는 동역학적으로 분류된 유전자가 별개의 시공간적 분포를 유발할 수 있다는 것을 나타낸다 (도 18h).

[0319] 유전자 기능에 의한 차등 RNA 동역학적 분류

[0320] RNA 동역학에 의해 규정되는 유전자 클러스터로부터의 GO 용어의 차등 풍부화를 고려하여 (도 12f), 어떻게 RNA 생활 주기의 동역학적 특색이 유전자 기능을 제공하는지를 추가로 조사하였다. 먼저 상기 언급된 펄스-추적 HeLa 세포 샘플 (1시간 펄스, 0-6시간 추적, 도 13a)로부터의 991개 유전자의 쌍별 단일-세포 공변량 분석을 통해 잠재적으로 공동-조절된 RNA를 확인하였다. 열지도 상의 모든 시점에 걸쳐 매트릭스 내의 공동 유전자 분류를 사용하여, 2개의 유전자 군이 유의한 유전자간 상관관계로 확인되었고, 이의 상관관계 계수는 0에서 6시간 추적까지 계속 증가하였으며 (도 13b, 도 19a), 이는 RNA 프로세싱 및 붕괴에 의한 유전자 공동-조절 패턴의 잠재적인 동역학적 스컬프팅을 나타낸다. 주목할 만하게, 군 1 및 2 유전자 둘 다는 세포-주기-관련 기능에서 풍부화되지만 (도 13c, 우측 하단, 군 1의 경우 $p < 0.05$; 군 2의 경우 $p < 1e-04$), 이들은 RNA 동역학에서는 다음과 같이 유의하게 상이하였다: 군 1은 유전자 공변량 패턴이 합성 0 내지 2시간 후에 즉시 명백한 보다 빠른 RNA 프로세싱을 갖는 동역학적 클러스터 2 및 3 내의 유전자로 구성되었고; 대조적으로, 군 2는 공변량 패턴이 합성 2시간 내지 6시간 후에 점차 발생한 보다 느린 RNA 프로세싱을 갖는 동역학적 클러스터 0 및 1로부터의 유전자로 풍부화되었다 (도 12e, 도 13b 및 13d). 이러한 관찰은 전사 및 전사후 단계에서 별개의 동적 특색을 갖는 RNA가 세포 주기 진행을 함께 형상화하도록 조율한다는 것을 시사한다.

[0321] 이어서, RNA의 동역학적 랜드스케이프를 상이한 분자 기능 카테고리에 걸쳐 체계적으로 비교하였다. 991개-유전자 목록에서 상위 3개의 기능적 카테고리 (도 19b)는 DNA-결합 (97개의 유전자), RNA-결합 (28개의 유전자) 및 세포-세포 접합부 (25개의 유전자)이다. 3개의 유전자 카테고리에 걸쳐 6개의 동역학적 파라미터를 비교하면, DNA-결합 유전자가 RNA-결합 유전자 및 세포-세포 접합부의 분자 기능을 갖는 유전자보다 유의하게 더 빠른 RNA 붕괴를 갖는 것으로 밝혀졌다 (도 13e, $p = 4.6e-03$ 및 0.036). 세포 주기 단계에 걸친 3개의 기능적 카테고리로부터의 동역학적 파라미터의 추가의 유전자 상관관계 분석은 RNA 동역학의 별개의 공동-조절 패턴을 밝혀내었다 (도 13f). 구체적으로, RNA 생활 주기의 상류에서 하류로, DNA-결합 단백질로서 기능하는 유전자는 핵 RNA 분해까지 높은 상관관계를 가졌고 (β_n, $R \sim 0.8$); RNA-결합 기능의 유전자는 세포질 RNA 분해까지 동역학적으로 상관관계를 가졌고 (β_c, $R \sim 0.6$), 반면 세포-세포 접합부에 대한 유전자는 세포질 전위에서 연장된 높은 상관관계를 나타냈으며 (γ, $R \sim 0.5$), 이는 이들 유전자가 DNA-결합 단백질과 비교하여 세포질 RNA 붕괴 및 국재화에서 추가의 공동-조절을 갖는다는 것을 나타낸다. 이러한 관찰은 RNA가 그의 분자 기능을 제공하도록 동역학적으로 분류된다는 개념을 추가로 지지한다.

[0322] 최종적으로, RNA 동역학을, 필수적 역할을 하는 RNA의 중요한 전사후 화학적 변형인 N^6-메틸아데노신 변형 (m^6A)과 관련하여 탐구하였다[44,45]. m^6A는 RNA 붕괴를 가속화하는 것으로 공지되어 있지만, 그러나 m^6A-RNA에 대한 동역학적 조절의 전체 랜드스케이프는 체계적으로 다루어지지 않았다. 이를 위해, m^6A 변형이 있는 및 없는 RNA (m^6A- 또는 비-m^6A-RNA, 도 19c)를 코딩하는 유전자를 분리하였다. 이전 보고와 일치하게, m^6A-RNA는 덜 안

정하였다 (더 높은 β, 도 13g)[46]. 추가로, 각각 m^6A 대 비-m^6A의 βn 및 βc를 비교했을 때 동일한 경향이 관찰되었으며, 이는 m^6A-메틸화의 조절이 핵 및 세포질 RNA 붕괴 둘 다에 의해 달성되고, 이는 세포-주기 기들에 걸쳐 또한 일관된다는 것을 시사한다 (도 19e). 대조적으로, λ의 유의한 차이는 2개의 군 사이에서 관찰되지 않았다. 이전 연구는 YTHDC1에 의해 매개된 mRNA 유출에서의 m^6A의 조절 역할을 제안하였다[47]. 따라서, YTHDC1의 세포 역할을 확인하기 위해, HeLa 세포를 대조군 siRNA 및 YTHDC1 mRNA에 대한 siRNA로 처리하고, 대조군 및 녹다운 세포를 다른 6개의 기능적으로 관련된 유전자 (METTL3/14, YTHDF1-3, YTHDC2, 도 19f)의 발현에 대해 정규화된 단일-세포 YTHDC1 판독물에 기초하여 분리하였다. 이전 연구와 일치하게, YTHDC1-표적화 유전자의 핵-대-세포질 비는 시간 경과에 따라 비-표적의 것보다 일관되게 더 높았으며, 이는 YTHDC1 녹다운 시 RNA의 핵 축적을 시사한다 (도 19d, 19g). 추가로, 이들 결과는 YTHDC1 녹다운에 의해 유도된 핵-대-세포질의 이러한 변화가 핵 RNA 유출의 다양한 속도에 기인한다는 것을 확인시켜 주었다 (도 19h). 이 연구는 TEMPO맵이 유전적 교란 (예를 들어, RNAi)과 조합되어 전례없는 해상도에서 RNA-결합 단백질의 기능을 설명할 수 있다는 것을 예시한다.

[0323] 논의

[0324] TEMPO맵은 이전에 달성되지 않았던 세포하 해상도에서의 다중모드 단일-세포 전사체학 기술인 단일 세포에서의 시간- 및 공간-해상된 전사체학을 동시에 프로파일링하는 신규 계내 전사체학 플랫폼을 구축한다. TEMPO맵을 사용하여, 본원에 기재된 연구는 조정가능한 시간 과정에 걸친 세포 및 RNA 조절의 포괄적인 설명을 제공하고, 세포 주기 및 RNA 주기가 복잡한 생활 기구를 위해 어떻게 구성되는지를 관리하는 법칙을 밝혀낸다. RNA 동역학적 패턴과 유전자 기능의 강한 상관관계가 관찰되었고, RNA 생활 주기의 이러한 기능-지향적 조절은 생존 및 에너지 제약 하에 진화하여 시공간적 유전자 발현을 정확하고 경제적인 방식으로 제어할 수 있었다[48]. TEMPO맵은 또한 고처리량 단일-세포 기능적 게노믹스 (예를 들어, CRISPR 스크린[49])와 조합되어 RNA 생활 주기의 동역학적 랜드스케이프에 영향을 미치는 주요 분자 인자를 결정할 수 있다. 추가로, 대사적 표지 조건의 최적화로[27, 50, 51], 이러한 방법론은 조직 생물학에서 동적 사건을 체계적으로 프로파일링하기 위해 생체외 또는 생체내 조직 샘플에 적합화될 수 있다.

[0325] 방법

[0326] 화학물질 및 효소. 화학물질 및 효소는 하기 명칭 (공급업체, 카탈로그 번호)으로서 열거된다: 겔 슬릭 용액 (론자(Lonza), 50640). 플러스원 결합-실란 (지이 헬스케어(GE Healthcare), 17-1330-01). 폴리-D-리신 용액, 50 μg/mL (써모피셔(ThermoFisher), A3890401). 초순수 증류수 (인비트로젠(Invitrogen), 10977-015). 유리 바닥 24-웰 플레이트 (그라이너 바이오-원(Greiner Bio-One), 662892 및 매트텍(MatTek), P24G-1.5-13-F). #2 마이크로 커버글라스, 12 mm 직경 (일렉트론 마이크로스코프 사이언시스(Electron Microscope Sciences), 72226-01). 16% PFA, EM 등급 (일렉트론 마이크로스코프 사이언시스, 15710-S). HPLC용 메탄올 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 34860-1L-R). PBS, 7.4 (깁코(Gibco), 1x의 경우 10010-023 및 10x의 경우 70011-044). 트윈-20, 10% 용액 (칼바이오켐(Calbiochem), 655206). 트리톤-X-100, 10% 용액 (시그마-알드리치, 93443). 옴니푸르 포름아미드 (칼바이오켐, 75-12-7). 20xSSC 완충제 (시그마-알드리치, S6639). 리보뉴클레오시드 바나딜 복합체 (뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), S1402S). 효모 tRNA (인비트로젠, AM7119). SUPERase·In (인비트로젠, AM2696). 5-에티닐 우리딘 (5-EU) (인비트로젠, E10345). 1.5X 클릭 완충제 (루미프로브(Lumiprobe), 61150). L-아스코르브산 (시그마-알드리치, A5960). T4 DNA 리가제, 5 바이스 U/μL (써모 사이언티픽(Thermo Scientific), EL0011). Phi29 DNA 폴리머라제 (써모 사이언티픽, EP0094). 10 mM dNTP 믹스 (인비트로젠, 100004893). BSA, 분자 생물학 등급 (뉴 잉글랜드 바이오랩스, B9000S). 5-(3-아미노알릴)-dUTP (인비트로젠, AM8439). BSPEG9 (써모 사이언티픽, 21582). 메타크릴산 NHS 에스테르, 98% (시그마-알드리치, 730300). DMSO, 무수 (몰레큘라 프로브스(Molecular Probes), D12345). 아크릴아미드 용액, 40% (바이오-라드(Bio-Rad), 161-0140). 비스 용액, 2% (바이오-라드, 161-0142). 과황산암모늄 (시그마-알드리치, A3678). N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민 (시그마-알드리치, T9281). 옴니푸르 SDS, 20% (칼바이오켐, 7991). 안타르크티카 포스파타제 (뉴 잉글랜드 바이오랩스, M0289S). DAPI (몰레큘라 프로브스, D1306). 플라밍고 형광 단백질 겔 염색 (바이오-라드, 1610491). DMEM (써모피셔, 11995). FBS (하이클론(HyClone), SH3007103). 리포펙타민 RNAiMAX (인비트로젠, 13778075). 아지도부티르산 NHS 에스테르 (루미프로브(Lumiprobe), 63720). 바이오-스핀(Bio-Spin)® P-6 칼럼, SSC 완충제 (바이오-라드,

7326002).

[0327] TEMPO맵 트리-프로브의 설계 및 구축. TEMPO맵 트리-프로브를 3개의 별개의 DNA 올리고뉴클레오티드 프로브: 스플린트, 프라이머 및 패드락의 세트를 함유하도록 설계하였다. 40 μM 5' 아미노-변형된 스플린트 올리고(인티그레이티드 DNA 테크놀로지스(Integrated DNA Technologies) (IDT)에 의해 제조됨)를 0.1 M $NaHCO_3$ 중 25 mM 아지도부티르산 NHS 에스테르 (아지드-NHS)와 함께 실온에서 밤새 인큐베이션하여 DNA 스플린트를 제조하였다. 생성물을 에탄올 침전에 의해 정제하고, 바이오-스핀® P-6 칼럼 (SSC 완충제)을 통해 전개시켰다.

[0328] 대표적인 서열 그래프가 도 14c에 제시된다. 프로브를 하기와 같이 설계하였다: (1) 5' 아지드-변형된 스플린트를 2개의 영역으로 나누었다: 12개-nt 스플린트-패드락 어닐링 서열에 연결된 50개의 아데노신 뉴클레오티드를 함유하는 링커. 효소적 증폭으로부터 보호되기 위해, 스플린트는 3' 말단 역전된 dT 및 올리고의 3'-단부에서 마지막 3개의 뉴클레오티드 상에 포스포로티오에이트 결합을 함유한다. 스플린트-패드락 어닐링 서열은 스플린트와 동일한 RNA 상의 패드락의 혼성화를 가능하게 하여, 라이게이션 단계에서 실링될 수 있는 "닉"을 갖는 이중-가닥 DNA 영역을 생성한다. (2) 5' 인산화된 패드락은 상보적 스플린트-패드락 어닐링 서열, 동일한 5개-nt 바코드의 2개의 영역, 10개-nt 프라이머-패드락 어닐링 서열, 특이적 RNA 결합을 위한 19-25개 nt 표적 영역 및 여러 짧은 링커로 구성된다. (3) 프라이머는 또 다른 19-25개 nt 표적 영역, 2개-nt 미스매치 염기, 5개-nt 링커 및 매칭 패드락 상의 바코드에 역 상보적인 5개-nt 유전자-고유 서열을 함유한다. 프라이머 및 패드락의 각각의 세트 내의 2개의 표적 영역은 동일한 mRNA 종 상에서 서로 옆에 1-2개의 염기로 존재한다.

[0329] 프라이머 및 패드락 상의 표적 영역 선택의 상세한 절차를 이전에 기재된 바와 같이 적용하였다[13]. 간략하게, 비-코딩 RNA를 제외한 가장 짧은 이소형 및 코딩 영역만이 고려되었다. 픽키(Picky) 2.2를 사용하여 40-46개 nt의 길이 범위를 갖는 각각의 프로브 쌍 상의 표적 서열을 설계하고, 6개의 서열을 각각의 유전자에 대해 선택하였다. 선택된 영역의 상보적 DNA (cDNA) 서열을 0-2개 nt에 의해 분리된 20-25개 nt의 절반으로 분할하였으며, 이는 용융 온도의 최상의 매치를 함유하였다. 프로브를 풀링하고, IDT에 의해 주문 및 제조하였다. SEDAL 서열분석에 사용된 판독 및 디코딩 프로브를 문헌 [Wang et al., 2018]에 따라 설계하고 주문하였다.

[0330] TEMPO맵 바이-프로브의 설계 및 구축. TEMPO맵 바이-프로브 (스플린트 및 패드락)를 구축하기 위해, 스플린트 프로브의 설계는 트리-프로브 섹션에 기재된 바와 동일하였다. 각각의 패드락 프로브는 트리-프로브 설계에 기재된 바와 같이 선택된 40개-nt 표적 영역을 함유하며, 5개의 서열을 각각의 유전자에 대해 선택하였다.

[0331] HeLa 세포 배양 및 siRNA 녹다운. 이 연구에 사용된 인간 HeLa 세포주를 ATCC (CCL-2)로부터 구입하고, 10% FBS로 보충된 DMEM (깁코, 11995) 배지에서 성장시켰다. 세포를 24-웰 전처리된 유리 바닥 플레이트 (처리는 다음 섹션에 기재됨) 상에 플레이팅하고, siRNA 녹다운 전에 37℃에서 5% CO_2 하에 성장시켰다. 퀴아젠(Qiagen)으로부터의 올스타 음성 대조군 siRNA (SI03650318)를 녹다운 실험에서 대조군 siRNA로서 사용하였다. YTHDC1 siRNA를 퀴아젠으로부터 주문하였다 (SI04225851). siRNA에 대해 리포펙타민 RNAiMAX (인비트로젠)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 형질감염을 수행하였다.

[0332] si대조군 대 siYTHDC1 (KD) 세포를 비교하는 하류 분석을 위해, 계내 서열분석 및 TEMPO맵 데이터세트 프로세싱 (하기 참조) 후에, 먼저 대조군 및 KD 세포를 STAR맵 프로브에 의해 표적화된 다른 6개의 기능적으로 관련된 유전자 (METTL3/14, YTHDF1-3, YTHDC2, 도 14e)의 평균 RNA 발현에 대해 정규화된 단일-세포 YTHDC1 판독물에 기초하여 분리하였다. 이어서, 대조군 세포로서 상위 25% 정규화된 YTHDC1 판독물 (n ~ 5000) 및 KD 세포로서 하위 25% (n ~ 5000)로 세포를 사용하였다.

[0333] TEMPO맵 실험 절차. 24-웰 유리 바닥 플레이트를 세포 플레이팅 전에 1% 메타크릴옥시프로필트리메톡시실란 (결합-실란) 및 폴리-D-리신 용액으로 순차적으로 처리하였다. 이어서, 세포를 코팅된 플레이트 상에 플레이팅하고, 37℃에서 5% CO_2 하의 가습 배양 인큐베이터 내에서 성장 배지 (10% FBS를 함유하는 DMEM) 중에 유지하였다. 펄스-추적 실험을 200 μM 5-EU로 수행하고, 지정된 양의 시간 동안 세포 배지로 세척하였다. 대사적 표지 및 세척 후에, 세포를 10분 동안 PBS 중 1.6% PFA로 고정시키고, -80℃에서 30분 동안 사전-냉각된 (-20℃) 메탄올로 투과화하였다. 이어서, 샘플을 -80℃로부터 취하고, 실온으로 평형화시키고, 10 mM 트리스 pH 7.5 및 0.1 mg/mL 효모 tRNA로 보충된 PBSTR (PBS 중 0.1% 트윈-20, 0.1 U/μL SUPERase·In)을 함유하는 완충제로 10분 동안 켄칭하였다.

[0334] 신생 에티닐화 RNA를 관능화하기 위해, 5' 아지드-변형된 DNA 스플린트 (5 μM)를 1X 루미프로브 클릭 화학 완충제에 첨가하였다. 아스코르베이트 (800 μM)를 첨가하여 CuAAC를 개시하였다. 반응 혼합물을 37℃에서 1시

간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 37℃에서 10분 동안 PBSTR로 2회 세척하였다.

[0335] TEMPO맵 프라이머 및 패드락 프로브의 라이브러리 (991개의 유전자를 표적화함) 및 STAR맵 SNAIL 프로브의 세트 (METTL3/14, YTHDF1-3을 표적화함)를 개별적으로 풀링하고, IDT로부터 주문하였다. 4개의 프로브 풀 모두를 저장하기 위해 초순수 RNase-무함유 물 중에 올리고당 100 nM로 용해시켰다. 이어서, 프로브 혼합물을 90℃에서 5분 동안 가열하고, 얼음 상에서 냉각시켰다. 후속적으로, 샘플을 올리고당 2 nM의 TEMPO맵 프로브 및 올리고당 10 nM의 STAR맵 프로브로 보충된 1X 혼성화 완충제 (2X SSC, 10% 포름아미드, 1% 트윈-20, 20 mM RVC, 0.1 mg/mL 효모 tRNA, 0.2 U/μL SUPERase·In) 중에 넣어 40℃ 가습 오븐 내에서 14-16시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 37℃에서 각각의 세척당 20분 동안 PBSTR로 2회 및 높은 염 완충제 (PBSTR 중 4X SSC)로 1회 세척하고, 세척 후에 PBSTR로 1회 더 헹구었다. 이어서, 샘플을 T4 DNA 라이게이션 혼합물 (T4 DNA 리가제의 1:20 희석물, 1X BSA 및 0.2 U/μL SUPERase·In)과 함께 실온에서 2시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하고, 이어서 PBSTR로 2회 세척하였다. 후속적으로, 샘플을 RCA 혼합물 (Phi29 DNA 폴리머라제의 1:20 희석물, 250 μM dNTP, 20 μM 5-(3-아미노알릴)-dUTP, 0.2 U/μL SUPERase·In, 1X BSA)과 함께 30℃에서 2시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하고, 이어서 PBST (PBS 중 0.1% 트윈-20)로 2회 세척하였다. 이어서, 샘플을 0.1 M $NaHCO_3$ 중 25 mM 메틸아크릴산 NHS 에스테르 (MA-NHS)로 실온에서 2시간 동안 처리하고, 이어서 PBST로 1회 세척하였다.

[0336] 겔을 캐스팅하기 위해, 샘플을 먼저 0.2% TEMED로 보충된 단량체 완충제 (4% 아크릴아미드, 0.2% 비스-아크릴아미드, 2X SSC)와 함께 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 완충제를 제거하고, 30 μL 중합 혼합물 (단량체 완충제 중에 용해된 0.2% 황산암모늄, 0.2% TEMED)을 샘플의 중앙에 천천히 첨가하였으며, 이를 즉시 겔 슬릭-코팅된 커버슬립으로 덮었다. 샌드위치된 중합 혼합물을 N_2 하에 1시간 동안 인큐베이션하고, 이어서 PBST로 2회 세척하였다. 이어서, 겔화된 샘플을 탈인산화 혼합물 (안타르크틱 포스파타제의 1:100X 희석물, 1X BSA)로 실온에서 밤새 처리하고, 이어서 PBST로 2회 세척하였다.

[0337] TEMPO맵 샘플 영상화 및 계내 서열분석. TEMPO맵 영상화 및 계내 서열분석을 문헌 [Wang et al. (2018)]에 기재된 바와 같이 하되 변형을 가하여 수행하였다. 간략하게, 998개 유전자 측정을 위해 4색 공초점 영상화의 6회 라운드를 수행하였으며, 이에 더하여, 제조업체의 설명서에 기재된 바와 같이 DAPI로 염색된 핵 검출, 플라밍고로 염색된 세포 형태 및 콘카나발린 A로 염색된 내형질 세망 (ER) 영역을 포함하는 마지막 1회 라운드를 수행하였다. 영상화의 각각의 라운드는 샘플을 서열분석 혼합물 (T4 DNA 리가제의 1:25 희석물, 1X BSA, 10 μM 판독 프로브 및 5 μM 형광 디코딩 올리고)과 함께 실온에서 3시간 동안 인큐베이션함으로써 시작하고, 이어서 영상화 전에 세척 및 영상화 완충제 (2X SSC, 10% 포름아미드)로 각각 5분 동안 3회 헹구었다. 영상 획득 후, 샘플을 스트리핑 완충제 (60% 포름아미드, 0.1% 트리톤 X-100)로 10분 동안 2회 처리하고, 이어서 PBST로 3회 세척하였다. 영상화의 6회 라운드 후에, DAPI로 염색된 세포 핵, 플라밍고 형광 겔 염색으로 염색된 세포질 및 콘카나발린 A로 염색된 ER을 이어서 영상화하였다. 405 다이오드, 백색광 레이저 및 40x 유침 대물렌즈가 장착된 레이카(Leica) SP8 공초점 현미경 (NA 1.3)을 사용하여 영상을 획득하였다. 각각의 라운드에 대해, 30개의 초점면에서 488 nm, 546 nm, 594 nm 및 647 nm 조명으로 영상을 획득하였다. 영상화의 복셀 크기는 200 nm X 200 nm X 350 nm였다.

[0338] 영상 프로세싱 및 앰플리콘 디코딩. 영상 프로세싱을 문헌 [Wang et al. (2018)]에 기재된 바와 같이 하되 변형을 가하여 수행하였다. 먼저, 휘겐스 에센셜(Huygens Essential) v20.10.1p2를 사용하여 영상 디컨볼루션을 적용하였다. 이어서, 디컨볼루션된 영상을 Min-Max 전략에 의해 정규화하고, 히스토그램 균등화에 의해 추가로 조정하였으며, 여기서 제1 서열분석 라운드에서의 영상을 참조로서 사용하였다. 추가로, 맞춤형 탑햇 필터링을 적용하여 형광 신호를 증진시켰다. 각각의 cDNA 앰플리콘의 바코드를 보다 잘 확인하기 위해, 사전프로세싱된 영상에 대해 전역 정합(global registration) 및 비-강체 정합(non-rigid registration) 둘 다를 수행하였다. 모든 변환 오프셋에서 2개의 영상 부피 사이의 상호-상관관계를 컴퓨터 계산하기 위해 3차원 고속 푸리에 변환(FFT)을 사용하여 전역 영상 정합을 달성하였다. 최대 상관관계 계수의 위치를 확인하고, 오프셋을 보상하기 위해 영상 부피를 변환하는 데 사용하였다. 비-강체 정합을 MATLAB 2020b에서 'imregdemons' 함수에 의해 달성하였다. 등록 후에, 서열분석의 제1 라운드에서 각각의 색 채널에서 개별 앰플리콘을 확인하였다. 이 실험을 위해, MATLAB 함수 'imregionalmax'를 사용하여 3D에서 국부 최대치를 발견함으로써 앰플리콘 도트를 확인하였다. 중심점에서의 강도가 임계치 미만인 도트를 제거하였다. 앰플리콘 크기의 추정에 기초하여, 각각의 라운드에서의 모든 4개의 채널에 걸쳐 각각의 도트에 대한 우세한 색을 도트 중심점 주위의 5x5x3 복셀 부피에 의해 결정하였다. 각각의 채널 내의 복셀 부피의 통합된 강도를 색 결정에 사용하였다. 이 경우에, 각각의 라운드

에서의 각각의 도트는 4개의 요소를 갖는 L2 정규화된 벡터를 가졌다. 각각의 도트의 색을 벡터에서 가장 높은 값을 갖는 상응하는 채널에 의해 결정하였다. 벡터에서 다수의 최대 값을 갖는 도트는 폐기하였다. 이어서, 먼저 도트를 품질 점수 (모든 서열분석 라운드에 걸쳐 -log(우세한 채널에서의 색 벡터 값)의 평균)에 기초하여 필터링하였다. 품질 점수는 각각의 서열분석 라운드에서의 각각의 도트가 색의 혼합물보다는 하나의 색으로부터 유래된 정도를 정량화하였다. 바코드 DNA 서열의 2개-염기 코딩 후 예상된 색 순서에 기초하여 바코드 코드북을 색 공간으로 전환시켰다. 도트는 품질 임계치를 통과하였고, 코드북에서 매칭된 바코드 서열은 유지되었으며; 모든 다른 도트는 거부되었다. 필터링된 도트의 물리적 위치 및 유전자 정체 둘 다를 하류 분석을 위해 저장하였다.

[0339] 단일 세포 및 세포하 영역에 대한 영상 분할. 셀프로파일러(CellProfiler) v4.1.3 및 MATLAB 내의 다른 맞춤형 스크립트를 사용하여 영상 분할을 수행하였다. DAPI 염색 영상 및 앰플리콘 채널과 플라밍고 형광 겔 염색 영상을 조합한 복합 영상 둘 다에 대해 맞춤형 파이프라인에 의해 2D 참조 분할 마스크를 생성하였다.

[0340] 3D 분할을 위해, 먼저 상이한 세포 구획을 표적화하는 영상을 중앙값 필터에 의해 프로세싱하고, 오츠(Otsu) 방법으로 이진화하였다. 100개 미만의 픽셀을 갖는 모든 연결된 성분 (대상)을 이진 영상으로부터 제거하였다. 이어서, 영상을 반경이 3인 디스크 구조 요소로 확장시켰다. 마지막으로, 이전 단계로부터의 이진 영상과 2D 참조 세포 분할 사이의 요소별 곱셈 과정에 의해 각각의 세포 영역을 표적화하는 3D 분할 마스크를 생성하였다. 핵 영역을 3D 세포 분할 마스크로부터 제거하여 세포질 분할을 생성하였다.

[0341] 이어서, 3D에서 각각의 분할된 세포 영역과 중첩되는 필터링된 앰플리콘을 특정 세포하 영역에 할당하여 (도 15b), 각각의 세포 구획에서 세포당 유전자 발현 매트릭스를 계산하였다.

[0342] 거리-비 (DR) 계산을 통한 RNA 세포하 분포 분석. 세포질 내부의 판독물의 상대 위치를 정량화하기 위해, 각각의 세포질 판독물에 대해 거리-비 (DR)를 계산하였다. 세포 내의 RNA 판독물에 대한 DR 값은, 핵 분할에 의해 규정된 핵에 대한 판독물의 최단 거리 (d_1)를, 이러한 거리와 세포 분할에 의해 규정된 세포막에 대한 최단 거리 (d_2)의 합계에 의해 정규화한 것으로 규정하였다 (도 15d). 최단 거리는 사이피(Scipy)에서 제공된 유클리드 거리 변환 함수로 계산하였다. 10의 컷오프 DR 값을 사용하여, TEMPO맵 데이터세트에서 시점에 걸친 세포하 분포 RNA 판독물의 상세한 검사를 위해 세포질 영역을 '중간' 및 '주변부'로 추가로 분할하였다.

[0343] RNA 세포질 전위 (γ)의 동적 모델링. RNA 세포질 전위 파라미터 γ를 상이한 펄스-추적 시점에 걸쳐 각각의 유전자에 대한 평균 DR 값 (세부사항은 상기 기재됨)에 대한 선형 회귀로 추정하였다 (도 16b). 각각의 유전자에 대해, 모든 상응하는 세포에서의 모든 판독물의 DR 값을 평균내어 특정한 시점에서의 그의 세포질 국재화를 나타내는 평균 DR 값을 얻었다. 파이썬(Python)에서 사이피의 'linregress' 함수를 사용하여 각각의 유전자에 대해 모든 시점에 걸쳐 선형 회귀를 수행하였다.

[0344] 단일-세포 및 세포하-해상된 유전자 발현 매트릭스에 기초한 PHATE를 통한 세포 클러스터링 가시화. 단일 세포 클러스터링을 세포별-유전자 발현 매트릭스에 대해 수행하고, 동일한 수의 세포 총 판독물에 대해 정규화하였다. 세포하-해상된 클러스터링을 수평적으로 연쇄된 핵 및 세포질 발현 매트릭스 (둘 다 세포별-유전자 발현 매트릭스와 동일한 차원을 가짐)에 대해 수행하고, 상기와 동일한 방법으로 정규화하였다. 두 매트릭스에 대해, PHATE (친화도-기반 궤적 포매를 위한 열-확산 잠재력)를 클러스터링 및 가시화 방법으로서 사용하였으며, 이는 데이터의 국부적 및 전반적 구조 둘 다를 보존하는 것으로 제시된 바 있다. PHATE에서 30의 이웃 파라미터를 두 분석에 사용하였다.

[0345] RNA 분해 동역학 벡터 가시화 및 다이나모에 의한 트랜스크립톰 벡터 필드 아미노화. PHATE 좌표 상의 도트로 오버레이된 화살표 (도 11e, I 및 III)를 단일 세포에서의 총 RNA 분해 동역학을 고려하여 트랜스크립톰 역학을 모델링함으로써 구축하였다. 벡터 가시화를 위한 총 RNA 분해 속도를 -분해 속도 * 신생 RNA에 의해 추정하였다.

[0346] 트랜스크립톰 벡터 필드 아미노화를 다이나모를 사용하여 상기 기재된 바와 동일한 RNA 분해 동역학으로부터 구축하였다[35].

[0347] 세포-주기 기 분류 및 검증. 단일 세포의 3개의 세포-주기 기 (G1, G1/S, G2/M)를 스캔피(scanpy)에서 세포-주기 점수화 함수 'score_genes_cell_cycle'를 통해 TEMPO맵 신생 RNA 발현을 사용하여 분류하였다. 1시간-표지된 신생 트랜스크립톰이 세포-주기 기를 정확하게 할당할 수 있는지 여부를 검증하기 위해, 이전에 공개된 scEU-seq 데이터세트로부터의 1시간-펄스 및 총 전사체 (22시간-펄스 및 0시간-추적)를 사용하여 세포-주기 점

수화 분석을 반복하고, 할당된 세포-주기 결과의 상관관계 분석을 수행하였다 (도 16c).

[0348] RNA 합성 (α), 분해 (β, βn, βc) 및 유출 (λ) 상수의 동적 모델링 및 피팅

[0349] RNA 농도의 계산. 단일 세포의 핵 및 세포질에서 991개 유전자 각각의 RNA 카피수를 수득한 후, 판독물을 먼저 6개의 대조군 유전자 (즉, STAR맵 프로브에 의해 표적화된 유전자: METTL3, METTL14, YTHDC2, YTHDF1-3)의 평균낸 판독물에 대해 상이한 추적 시점에 걸쳐 정규화하였으며, 이들은 각각의 유전자의 총 RNA가 표적화되었기 때문에 상이한 펄스-추적 조건 하에 균일한 발현을 나타내는 것으로 가정하였다. 이어서, 각각의 할당된 영역 내의 정규화된 RNA 카피수 (도 15b)를 단위 세포 부피 (복셀), 단위 핵 부피 (복셀) 및 단위 세포질 부피 (복셀)로 나누어, 각각 단일 세포 (X(t)), 핵 (N(t)) 및 세포질 (C(t)) 내의 RNA 농도를 계산하였다. RNA 농도는 판독물/복셀의 단위를 갖고, 하기 섹션에서 [RNA]로서 표시될 것이다.

[0350] 모델링. α를 전사 상수 ([RNA]/h)로 하고, β를 전세포 분해 상수 (1/h)로 하고, βn을 핵 분해 상수 (1/h)로 하고, λ를 유출 상수 (1/h)로 하고, βc를 세포질 분해 상수 (1/h)로 한다. 1시간 펄스에서의 X(t)는 1차 동적 방정식에 의해 기재되고:

[0351] $dX(t)dt = \alpha - \beta * X(t)$ (1)

[0352] 후속 추적 시점 동안의 X(t)의 시간 전개는 하기와 같이 기재되며:

[0353] $dX(t)dt = -\beta * X(t)$ (2)

[0354] 여기서 1시간 펄스 후에 합성된 새로운 RNA는 없는 것으로 가정하였다. 방정식 (1) 및 (2)를 사용하여, 전세포 RNA 농도로부터의 시간-의존성 α 및 β를 각각의 유전자에 대해 추정하였으며, 여기서 α 및 β는 펄스 및 추적 기간 동안 대략 일정한 것으로 가정하였다.

[0355] 이어서, 나머지 동적 파라미터 (βn, λ 및 βc)를 추정하기 위해, 전사 후, RNA가 핵에서 분해되거나 세포질로 유출될 수 있으며, 이는 하나의 파라미터 p (핵 프로세싱 상수)로 수학적으로 조합될 수 있는 것으로 가정하였다. 따라서, N(t)의 시간 전개는 하기에 의해 기재되며:

[0356] $dN(t)dt = -p * N(t)$ (3)

[0357] 반면에

[0358] $p = \beta n + \lambda$ (4)

[0359] 여기서 (1) 모든 세포 RNA는 핵에서 세포질로 단방향으로 이동하여, λ의 값이 모두 양성이고; (2) βn, λ 및 βc는 시간-의존성이며 일정한 것으로 가정하였다. 방정식 (3)을 사용하여, 각각의 유전자에 대해 p를 추정하였다. 이어서, 전세포 분해 속도가 핵 분해 및 세포질 분해의 합계와 동일하다는 가정을 하였다. 따라서, 하기 식이 제공된다:

[0360] $X(t)*\beta = N(t)*\beta n + C(t)*\beta c$ (5)

[0361] (4)에 기초하여,

[0362] $X(t)*\beta = N(t)*(p - \lambda) + C(t)*\beta c$ (6)

[0363] 이에 따라, 세포질 분해 (βc) 및 유출 (λ)을 추정하였다. 각각의 유전자에 대해 추정된 p로, 이어서 핵 분해 (βn)를 계산하였다. 1시간 펄스-1시간 추적 조건에서의 데이터는, 잠재적으로 세척 후 세포 내의 잔류 EU 때문에, 선형 모델의 이상치인 것으로 밝혀졌다는 것을 주목해야 한다. 따라서, 세포를 1시간 추적으로부터 제거하고, 0, 2, 4, 6시간 추적으로부터의 세포만을 모델링에 사용하였다.

[0364] 피팅 및 임계화. 추정된 β 및 p에 대해, R^2를 사용하여 데이터에 대한 모델의 피팅을 평가하였다. 따라서, 모델은 (1) 모든 추정된 파라미터의 양의 값을 나타냄으로써 음의 값의 적어도 1개의 파라미터를 갖는 모든 유전자를 제거하고; (2) 방정식 (2) 및 (3)을 각각 상응하는 데이터에 피팅하여 β 및 p를 추정하는 경우에 $R^2 >= 0.5$를 갖는 유전자로 제한되었다. 따라서, 시간 경과에 따른 RNA 농도의 일정한 분해 (β) 및 핵 프로세싱 (p) 계수를 가정하였다. 모든 세포-주기 기를 조합하였을 때 모든 5개의 파라미터에 대한 피팅 임계치를 통과한 915개의 유전자를 수득하였고, 세포가 상이한 기로 분리되었을 때 모든 15개의 파라미터 (3개의 기에 걸쳐 5개의 파라미터)에 대한 808개의 유전자를 수득하였다.

[0365] 동역학적 파라미터 추정의 검증. 이들 모델을 검증하기 위해, TEMPO맵 데이터세트 및 공개된 scEU-seq 데이터세트 (1시간 펄스, 0, 2, 4, 6시간 추적)의 세포당 RNA 카피수를 사용하여 합성 (α) 및 전세포 분해 (β)의 계산을 반복하였으며, 여기서 549개의 중첩 유전자를 수득하였다. 이어서, 이들 2개의 데이터세트로부터의 결과를 차원 감소 및 유전자 클러스터링에 의해 비교하고, 추정된 유전자 클러스터 비율의 변동으로부터 유도된 z-점수를 열지도에 의해 가시화하였다 (도 18h-18j). 유전자 클러스터링 및 가시화의 방법 세부사항은 다음 섹션에 기재되어 있다.

[0366] 동역학적 파라미터 상관관계 및 클러스터링 분석. R을 사용하여 세포-주기-조합된 6개의 파라미터 (915개의 유전자로 이루어짐) 및 세포-주기-해상된 18개의 파라미터 (808개의 유전자로 이루어짐) 둘 다에 대해 추정된 동역학적 파라미터의 쌍별 상관관계 계수를 기재하는 매트릭스를 구축하였고, 이어서 이를 각각 산점도 매트릭스 (도 12c) 및 열지도 (도 12d)에 의해 가시화하였다. 세포-주기-해상된 18개의 파라미터의 상관관계의 일부 주요 예를 또한 도 18a-18f에 산점도로서 가시화하였다.

[0367] 이어서, UMAP을 사용하여 808개의 유전자의 세포-주기-해상된 18개의 동역학적 파라미터에 대해 차원 감소를 수행한 다음, UMAP에 기초하여 세우라트(Seurat) v4에 포매된 루바인(Louvain)에 의해 유전자 클러스터링을 수행하였으며, 여기서 4개의 유전자 클러스터가 확인되었다. 동역학적 파라미터에 걸친 범위는 상이한 세포-주기 기에서의 동일한 파라미터의 분산보다 더 크게 달라진다는 것을 주목하였다. 따라서, 4개의 클러스터 사이의 동역학적 차이를 보다 잘 가시화하기 위해, 3개의 세포-주기 기에서 모든 유전자에 대해 계산된 각각의 동역학적 파라미터에 대해 z-점수를 계산하고, z-점수를 도 12e, 우측에 열지도로서 플롯팅하였다.

[0368] UMAP 분석에 의해 확인된 4개의 클러스터 각각에 대해, DAVID (david.ncifcrf.gov/content.jsp?file=citation.htm)를 사용하여 배경으로서의 TEMPO맵 991개-유전자 목록에 대해 UMAP 분석에 의해 확인된 4개의 클러스터 각각 내의 유전자에 대해 유전자 온톨로지 (GO)를 수행하였다. 통계적 유의성을 갖는 모든 GO 용어 (p 값은 0.05 이하에 가까움)가 도 12f에 제시된다.

[0369] 파이썬에서 맞춤형 스크립트를 사용하여 대표적인 세포에서의 4개의 클러스터의 가시화를 수행하였다.

[0370] 시간 경과에 따른 단일-세포 신생 RNA 발현의 공변량 분석. 시간 경과에 따른 단일-세포 RNA 발현에서의 공변량 분석을 위해 (도 13a, 도 19a), 먼저 0, 2, 4 및 6시간 추적으로부터의 모든 세포를 사용하여 각각의 유전자 쌍 사이의 발현 수준의 상관관계를 기재하는 매트릭스를 구축하였다. 이어서, R을 사용하여 이들 시간-조합된 세포에서 유전자를 그의 상관관계 계수에 기초하여 조직화는 계층적 클러스터링을 수행하였다. 매트릭스를 클러스터링 결과에 의해 재정렬하고, 열지도에 의해 가시화하였다 (도 13a, 좌측). 이어서, 모든 매트릭스에서 유전자의 동일한 군분류 및 순서를 유지하면서 각각의 개별 시점에서의 발현 수준의 상관관계 계수를 기재하는 열지도를 생성하였다 (도 19a). 4개의 시점에 걸쳐 열지도를 비교하면, 모든 시점을 조합할 때 상관관계가 있는 발현을 나타내지만 또한 개별 시점에 따라 달라지는 2개의 작은 유전자 클러스터가 확인되었다 (도 13a에 1 및 2로 주석이 달려있음) (도 19a). DAVID를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 배경 유전자 목록에 대해 2개의 클러스터 각각 내의 유전자에 대해 GO 분석을 수행하였다.

[0371] TEMPO맵 유전자 목록에서의 m^6A 및 YTHDC1 표적 확인. m^6A-관련 유전자 표지에 대해, 이전에 보고된 PAR-CLIP 및 면역침전 (IP) 데이터에 의해 고-신뢰도 m^6A-변형된 전사체를 코딩하는 유전자를 확인하였다. 간략하게, m^6A-RNA는 (1) 비-단편화된 m^6A RIP-seq에서 적어도 1배 풍부화를 갖고, (2) PAR-CLIP의 각각의 반복에서 결합된 전사체인 것으로 정의되었다. 유사하게, 비 m^6A-RNA는 (1) 비-단편화된 m^6A RIP-seq에서 <0의 풍부화를 갖고, (2) PAR-CLIP의 반복에서 피크를 갖지 않는 전사체인 것으로 정의되었다. 이들 기준을 사용하여, m^6A-RNA를 코딩하는 573개의 유전자 및 비 m^6A-RNA를 코딩하는 111개의 유전자를 TEMPO맵 유전자 목록으로부터 확인하였다.

[0372] YTHDC1 표적-관련 유전자 표지에 대해, 이전에 보고된 YTHDC1 PAR-CLIP 및 IP 데이터에 의해 고-신뢰도 표적을 코딩하는 유전자를 확인하였다. 간략하게, YTHDC1 표적은 (1) YTHDC1-IP 측정에서 적어도 1배 풍부화를 갖고, (2) IP 측정에서 p 값이 유의하며, (3) PAR-CLIP의 각각의 반복에서 결합된 전사체인 것으로 정의되었다. 이어서, 비-표적은 (1) 비-단편화된 m^6A RIP-seq에서 <0의 풍부화를 갖고, (2) PAR-CLIP의 반복에서 피크를 갖지 않는 전사체인 것으로 정의되었다. 이들 기준을 사용하여, 표적 전사체를 코딩하는 158개의 유전자 및 비-표적을 코딩하는 160개의 유전자를 확인하였다.

[0373] 실시예 7: 생체내 TEMPO맵

[0374] 이어서, 전체 동물의 조직 (예를 들어, 심장 조직)에서 시공간적 전사체학을 해상하기 위해 생체내에서 TEMPO맵을 시험하였다. 이를 위해, 1 mg의 EU를 안와후 투여를 통해 마우스에 주사하고, 기관을 2시간 후에 수거하였다. PBS-투여된 마우스를 대조군으로서 사용하였다. 기관 (예를 들어, 심장)을 20 μm 조직으로 극저온-절편화하고, 이를 TEMPO맵 워크플로우를 사용하여 화학적으로 프로세싱하였다 (도 20a). 심장 조직 절편에서의 생체내 TEMPO맵의 적용가능성이 제시된다. 심장에서 고도로 발현되는 4개의 유전자 (Myh6, Flt1, Dach1 및 Lamc1)의 표적화가 도 20b에 제시된다. 결과는 PBS-투여된 대조군 조직과 비교하여 신생-전사된 RNA 신호의 유의한 풍부화를 보여주었고, 따라서 살아있는 동물의 조직 절편 상에서 대사적으로-표지된 RNA를 검출 및 측정하기 위한 TEMPO맵의 능력을 입증한다. 따라서, TEMPO맵 방법은 시스템, 조직, 유사기관 및 기관에서 멀티플렉스화된 시공간적 전사체학을 해상하기 위해 생체내 적용될 수 있다.

[0375] 참고문헌

1. Wang, X. *et al.* Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* **361**, eaat5691 (2018).
2. Codeluppi, S. *et al.* Spatial organization of the somatosensory cortex revealed by osmFISH. *Nat. Methods* **15**, 932 (2018).
3. Moffitt, J. R. *et al.* Molecular, spatial, and functional single-cell profiling of the hypothalamic preoptic region. *Science* **362**, eaau5324 (2018).
4. Shah, S., Lubeck, E., Zhou, W. & Cai, L. *In situ* transcription profiling of single cells reveals spatial organization of cells in the mouse hippocampus. *Neuron* **92**, 342 (2016).
5. Achim, K., Pettit, J., Saraiva, L. *et al.* High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin. *Nat Biotechnol* **33**, 503 (2015).
6. Lee, J. *et al.* Highly Multiplexed Subcellular RNA Sequencing *in Situ*. *Science* **343**, 1360 (2014).
7. Stahl, P. *et al.* Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* **353**, 78 (2016).
8. Zechel, S., Zajac, P., Lönnerberg, P. *et al.* Topographical transcriptome mapping of the mouse medial ganglionic eminence by spatially resolved RNA-seq. *Genome Biol* **15**, 486 (2014).
9. Gao, S., Yan, L., Wang, R. *et al.* Tracing the temporal-spatial transcriptome landscapes of the human fetal digestive tract using single-cell RNA-sequencing. *Nat Cell Biol* **20**, 721 (2018).
10. Chen, K. *et al.* Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* **348**, 6233 (2015).
11. Crosetto, N., Bienko, M. & van Oudenaarden, A. Spatially resolved transcriptomics and beyond. *Nat Rev Genet* **16**, 57 (2015).
12. Battich, N. *et al.* Sequencing metabolically labeled transcripts in single cells reveals mRNA turnover strategies. *Science* **367**, 1151 (2020).
13. Wang, X. *et al.* Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* (*80*), **361** (2018).
14. Chen, K. H., Boettiger, A. N., Moffitt, J. R., Wang, S. & Zhuang, X. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* (*80*), **348**, aaa6090–aaa6090 (2015).

[0376]

15. Codeluppi, S. *et al.* Spatial organization of the somatosensory cortex revealed by osmFISH. *Nat. Methods* **15**, 932–935 (2018).

16. Ståhl, P. L. *et al.* Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* vol. 353, 78–82 (2016).

17. Lee, J. H. *et al.* Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*. *Science* (*80*). **343**, 1360–1363 (2014).

18. Shah, S., Lubeck, E., Zhou, W. & Cai, L. *In Situ* Transcription Profiling of Single Cells Reveals Spatial Organization of Cells in the Mouse Hippocampus. *Neuron* **92**, 342–357 (2016).

19. Stickels, R. R. *et al.* Highly sensitive spatial transcriptomics at near-cellular resolution with Slide-seqV2. *Nat. Biotechnol.* **39**, 313–319 (2021).

20. Buxbaum, A. R., Haimovich, G. & Singer, R. H. In the right place at the right time: Visualizing and understanding mRNA localization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 16 95–109 (2015).

21. Erhard, F. *et al.* scSLAM-seq reveals core features of transcription dynamics in single cells. *Nature* **571**, 419–423 (2019).

22. Qiu, Q. *et al.* Massively parallel and time-resolved RNA sequencing in single cells with scNT-seq. *Nat. Methods* **17**, 991–1001 (2020).

23. Cao, J., Zhou, W., Steemers, F., Trapnell, C. & Shendure, J. Sci-fate characterizes the dynamics of gene expression in single cells. *Nat. Biotechnol.* **38**, 980–988 (2020).

24. Hendriks, G.-J. *et al.* NASC-seq monitors RNA synthesis in single cells. *Nat. Commun.* **10**, 3138 (2019).

25. Battich, N. *et al.* Sequencing metabolically labeled transcripts in single cells reveals mRNA turnover strategies. *Science* (*80*). **367**, 1151 (2020).

26. Braselmann, E., Rathbun, C., Richards, E. M., & Palmer, A. E. Illuminating RNA Biology: Tools for Imaging RNA in Live Mammalian Cells. *Cell Chem. Biol.* **27**, 891–903 (2020).

27. Jao, C. Y. & Salic, A. Exploring RNA transcription and turnover *in vivo* by using click chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 15779–15784 (2008).

28. Rabani, M. *et al.* Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 436–442 (2011).

[0377]

29. Djebali, S. *et al.* Landscape of transcription in human cells. *Nat. 2012 4897414* **489**, 101–108 (2012).

30. Bhatt, D. M. *et al.* Transcript Dynamics of Proinflammatory Genes Revealed by Sequence Analysis of Subcellular RNA Fractions. *Cell* **150**, 279–290 (2012).

31. Battich, N., Stoeger, T., & Pelkmans, L. Control of Transcript Variability in Single Mammalian Cells. *Cell* **163**, 1596–1610 (2015).

32. Bahar Halpern, K. *et al.* Nuclear Retention of mRNA in Mammalian Tissues. *Cell Rep.* **13**, 2653–2662 (2015).

33. Moon, K. R. *et al.* Visualizing structure and transitions in high-dimensional biological data. *Nat. Biotechnol. 2019 3712* **37**, 1482–1492 (2019).

34. Qiu, X. *et al.* Mapping transcriptomic vector fields of single cells. *Cell* (2022) doi:10.1016/J.CELL.2021.12.045.

35. La Manno, G. *et al.* RNA velocity of single cells. *Nature* **560**, 494–498 (2018).

36. Bergen, V., Lange, M., Peidli, S., Wolf, F. A. & Theis, F. J. Generalizing RNA velocity to transient cell states through dynamical modeling. *Nat. Biotechnol.* **38**, 1408–1414 (2020).

37. Tirosh, I. *et al.* Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science (80)*, **352**, 189–196 (2016).

38. Sharp, J. A., Perea-Resa, C., Wang, W. & Blower, M. D. Cell division requires RNA eviction from condensing chromosomes. *J. Cell Biol.* **219** (2020).

39. Tanenbaum, M. E., Stern-Ginossar, N., Weissman, J. S., & Vale, R. D. Regulation of mRNA translation during mitosis. *Elife* **4** (2015).

40. Xia, C., Fan, J., Emanuel, G., Hao, J., & Zhuang, X. Spatial transcriptome profiling by MERFISH reveals subcellular RNA compartmentalization and cell cycle-dependent gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 19490–19499 (2019).

41. Chen, T. & Steensel, B. van. Comprehensive analysis of nucleocytoplasmic dynamics of mRNA in Drosophila cells. *PLOS Genet.* **13**, e1006929 (2017).

42. Berry, S., Müller, M., & Pelkmans, L. Nuclear RNA concentration coordinates RNA production with cell size in human cells. *bioRxiv* 2021.05.17.444432 (2021) doi:10.1101/2021.05.17.444432.

43. Padovan-Merhar, O. *et al.* Single Mammalian Cells Compensate for Differences in Cellular Volume and DNA Copy Number through Independent Global Transcriptional Mechanisms. *Mol. Cell* **58**, 339–352 (2015).

[0378]

44. Shi, H., Wei, J. & He, C. Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers. *Mol. Cell* **74**, 640–650 (2019).

45. Roundtree, I. A., Evans, M. E., Pan, T. & He, C. Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. *Cell* **169**, 1187–1200 (2017).

46. Wang, X. *et al.* N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* **505**, 117–120 (2014).

47. Roundtree, I. A. *et al.* YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs. *Elife* **6**, (2017).

48. Schwanhüusser, B. *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337–342 (2011).

49. Dixit, A. *et al.* Perturb-Seq: Dissecting Molecular Circuits with Scalable Single-Cell RNA Profiling of Pooled Genetic Screens. *Cell* **167**, 1853-1866.e17 (2016).

50. Akbalik, G. *et al.* Visualization of newly synthesized neuronal RNA *in vitro* and *in vivo* using click-chemistry. *RNA Biol.* **14**, 20–28 (2017).

51. Sant, L. J. van't, White, J. J., Hoeijmakers, J. H. J., Vermeij, W. P. & Jaarsma, D. *In vivo* 5-ethynyluridine (EU) labelling detects reduced transcription in Purkinje cell degeneration mouse mutants, but can itself induce neurodegeneration. *Acta Neuropathol. Commun. 2021 91* **9**, 1–20 (2021).

[0379]

[0380] 참조로 포함됨

[0381] 본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 과학 학술지 논문, 및 다른 공개물을 언급하며, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다. 본 발명의 하나 이상의 실시양태의 세부사항이 본원에 제시된다. 본 발명의 다른 특색, 목적 및 이점은 상세한 설명, 도면, 실시예 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

[0382] 등가물 및 범주

[0383] 단수형태는 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 포함하는 실시양태 또는 기재는 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 군 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 경우에 충족된 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 실시양태를 포함한다. 본 발명은 군 구성원 중 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 실시양태를 포함한다.

[0384] 또한, 본 개시내용은 열거된 청구항 중 하나 이상으로부터의 하나 이상의 제한, 요소, 조항 및 서술적 용어가 또 다른 청구항에 도입된 모든 변형, 조합 및 순열을 포괄한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 종속항인 임의의 청구항은 동일한 기본 청구항에 종속항인 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 요소가 목록으로서, 예를 들어 마쿠쉬 군 포맷으로 제시되는 경우에, 요소의 각각의 하위군이 또한 개시되고, 임의의 요소(들)는 군으로부터 제거될 수 있다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발명의 측면이 특정한 요소 및/또는 특색을 포함하는 것으로 언급되는 경우에, 본 개시내용의 특정 실시양태 또는 본 개시내용의 측면은 이러한 요소 및/또는 특색으로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 단순성의 목적을 위해, 이들 실시양태는 본원에 구체적으로 제시되지 않았다. 또한, 용어 "포함하는" 및 "함유하는"은 개방적이고 추가의 요소 또는 단계의 포함을 허용하는 것으로 의도됨에 주목한다. 범위가 주어지는 경우, 종점이 포함된다. 또한, 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥 및 관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해로부터 명백하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은 본 발명의 상이한 실시양태에서 언급된 범위 내의 임의의 구체적 값 또는 하위범위를, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 범위의 하한치 단위의 1/10까지 가정할 수 있다.

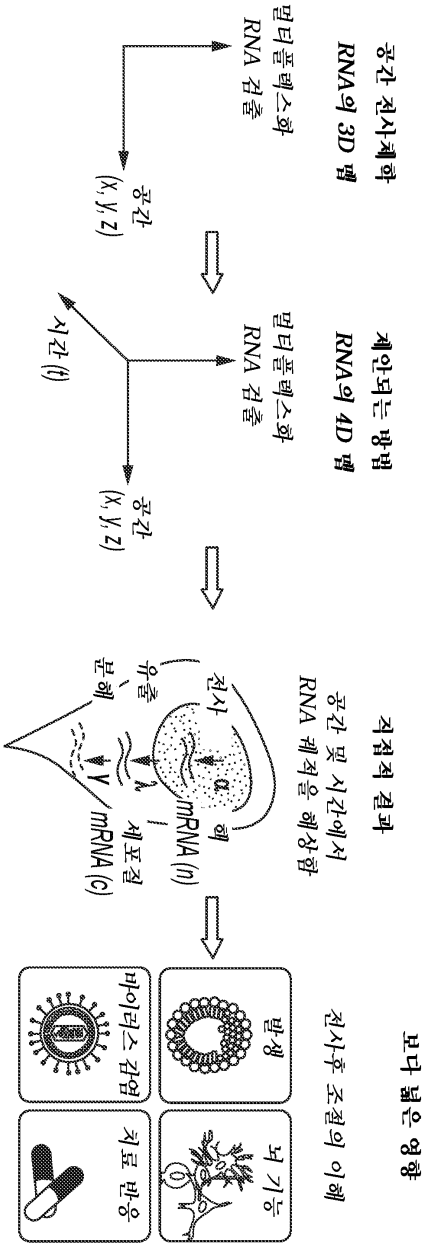
[0385] 본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개 특허 출원, 학술지 논문 및 다른 공개물을 언급하며, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다. 임의의 포함된 참고문헌과 본 명세서 사이에 상충이 존재하는 경우, 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 선행 기술에 속하는 본 발명의 임의의 특정한 실시양태는 실시양태 중 어느 하나 이상으로부터 명백하게 배제될 수 있다. 이러한 실시양태는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 것으로 여겨지기 때문

에, 이들은 배제가 본원에 명백하게 제시되지 않더라도 배제될 수 있다. 본 발명의 임의의 특정한 실시양태는 선행 기술의 존재와 관련되든 관련되지 않든 임의의 이유로 임의의 실시양태로부터 배제될 수 있다.

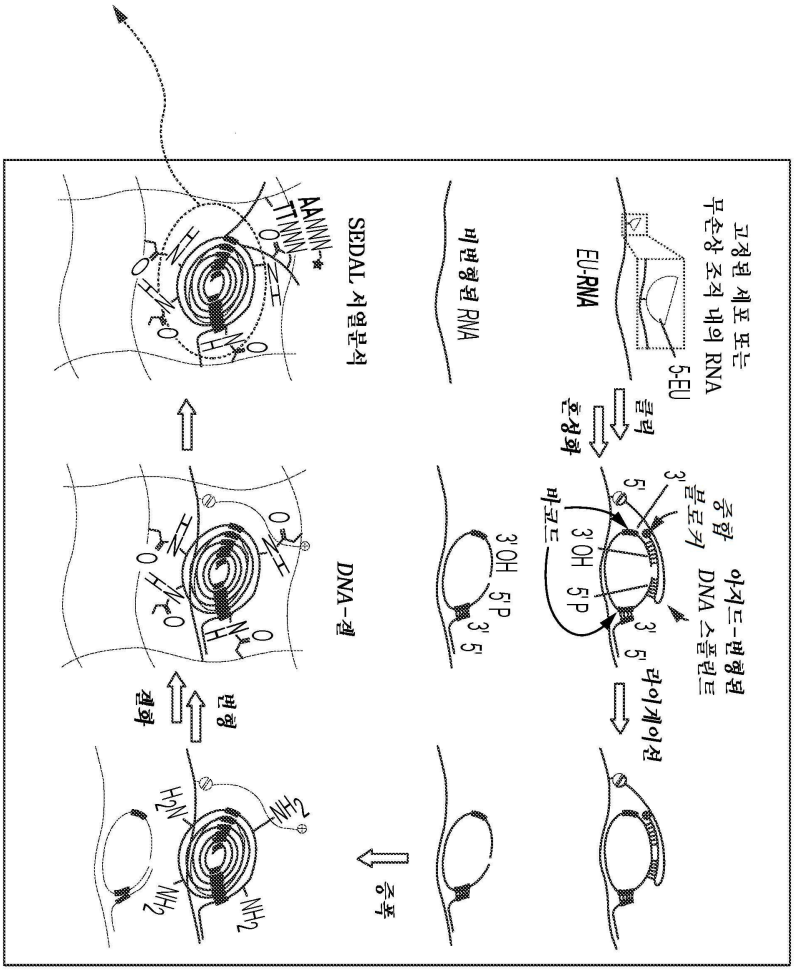
[0386] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험만을 사용하여 본원에 기재된 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태의 범주는 상기 설명에 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 오히려 첨부된 실시양태에 제시된 바와 같다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 하기 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 취지 또는 범주로부터 벗어나지 않으면서 본 설명에 대한 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음을 인지할 것이다.

도면

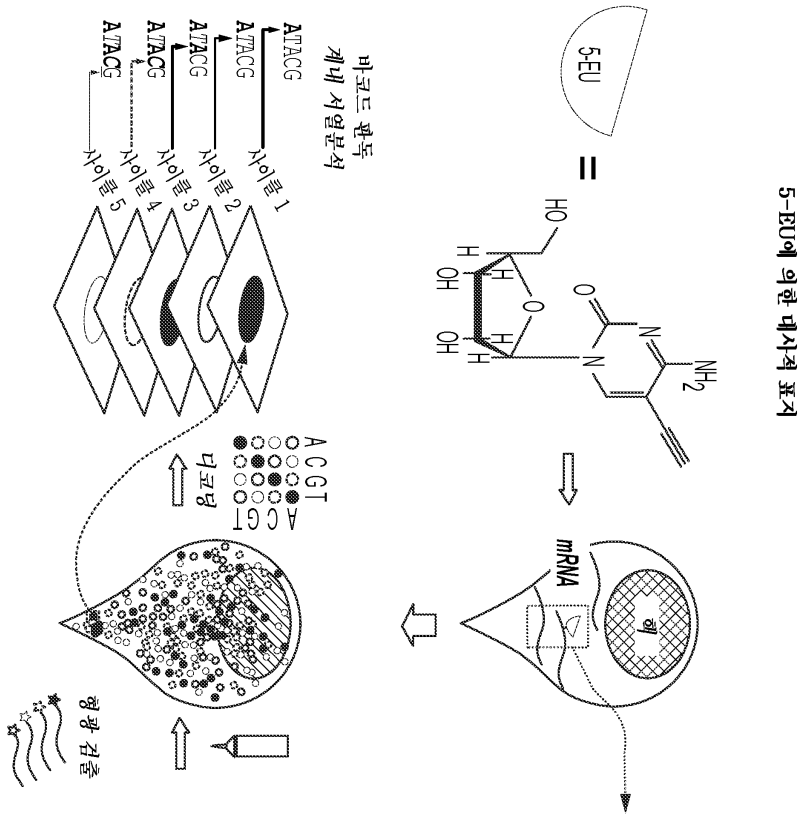
도면1



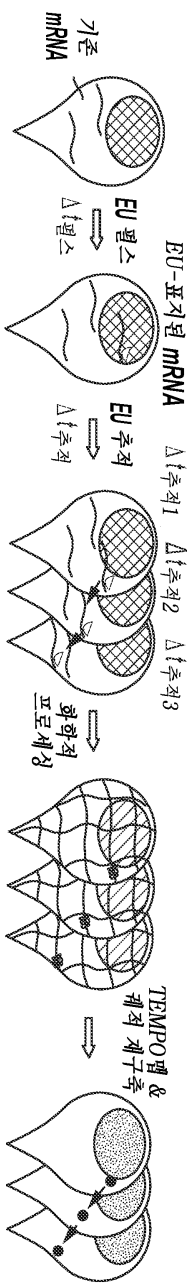
도면2aa


표적화된 게놈 서열분석
고정된 세포 또는
무손상 조직 내의 RNA
5-EU
EU-RNA
클릭
혼성화
중합
블로커
아지드-변형된
DNA 스플린트
3'OH
바코드
5'P
라이게이션
비변형된 RNA
증폭
DNA-겔
변형
겔화
SEDAL 서열분석

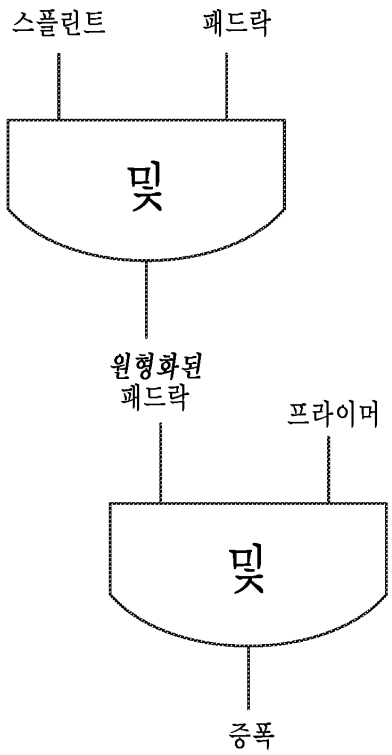
도면2ab


5-EU에 의한 대사체 표지
5-EU
mRNA
핵
바코드 분독
케미 서열분석
ATACG
사이클 1
사이클 2
사이클 3
사이클 4
사이클 5
A C GT
다크닝
형광 검출

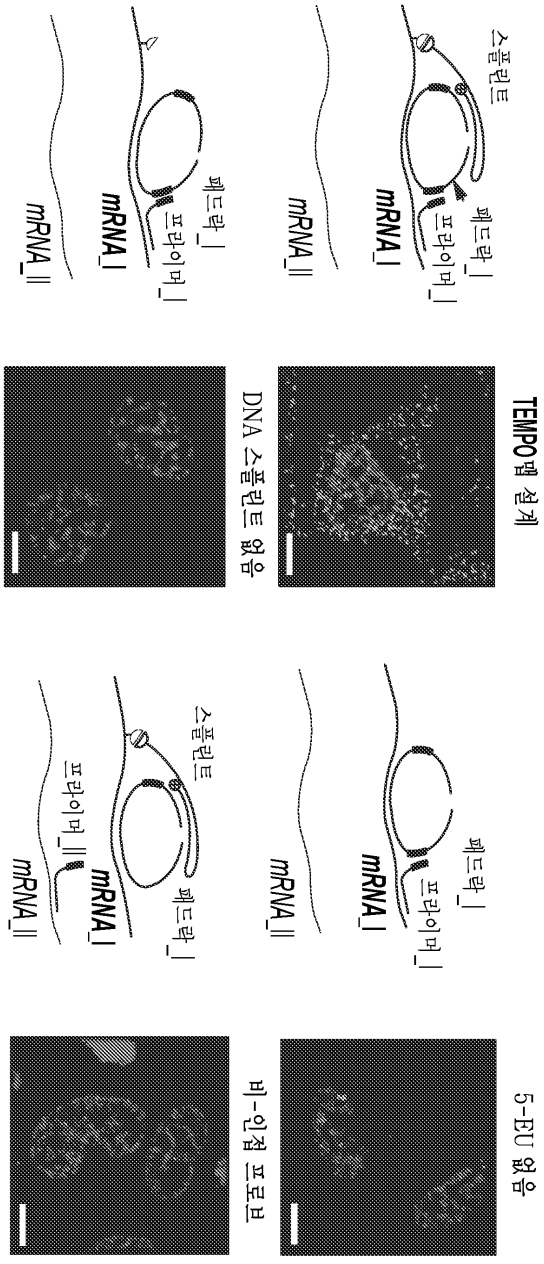
도면2b


기존 mRNA
EU 펄스
Δt펄스
EU-표지된 mRNA
EU 추적
Δt추적
Δt추적1
Δt추적2
Δt추적3
화학적 프로세싱
TEMPO멥 & 캐처 제구축

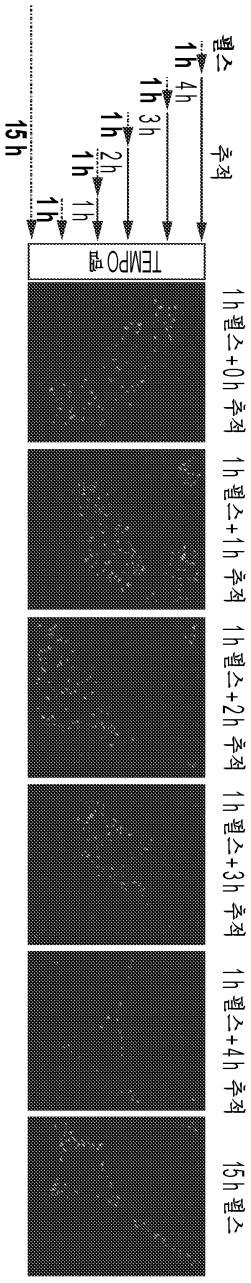
도면2c



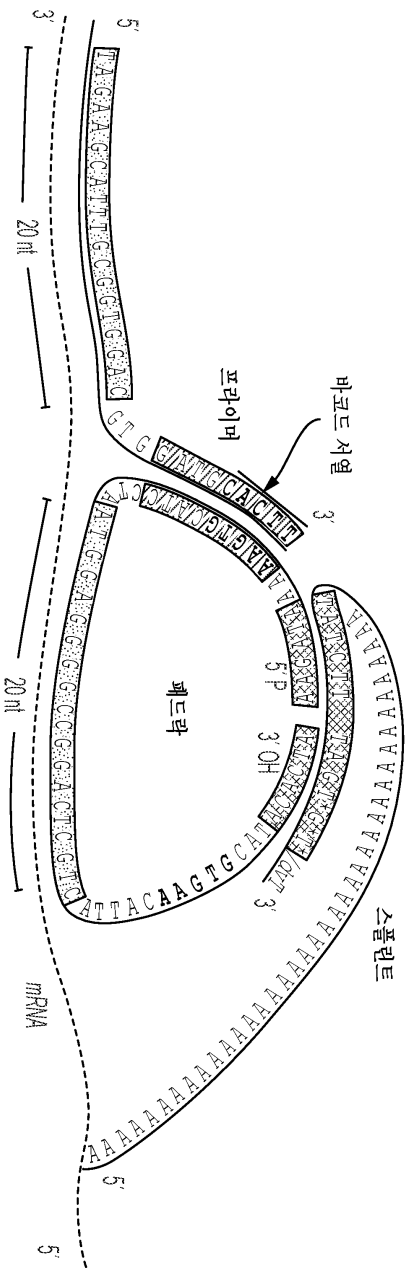
도면2d


TEMPO맵 설계
DNA 스플린트 없음
5-EU 없음
비-인접 프로브
스플린트
페드락_I
프라이머_I
mRNA_I
mRNA_II
프라이머_II

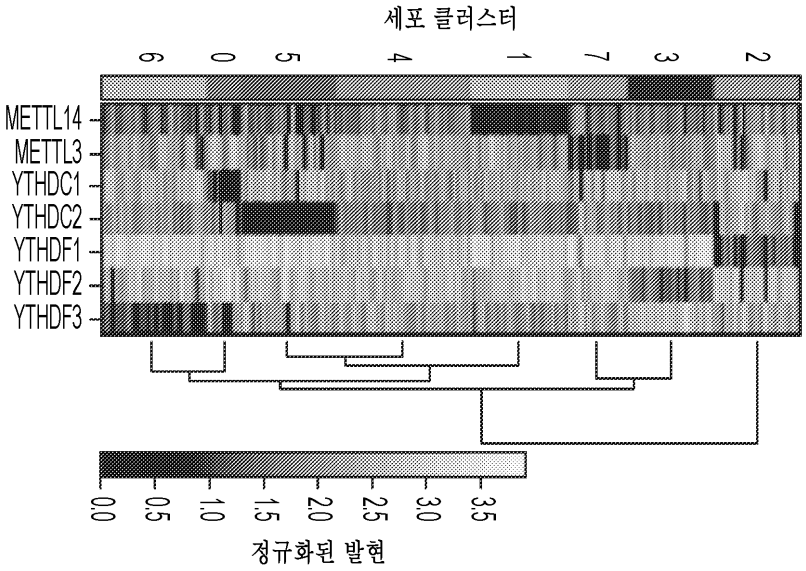
도면2e


펄스
1h
4h
1h
3h
1h
2h
1h
1h
1h
추적
15h
TEMPO 팹
1h 펄스+0h 추적
1h 펄스+1h 추적
1h 펄스+2h 추적
1h 펄스+3h 추적
1h 펄스+4h 추적
15h 펄스

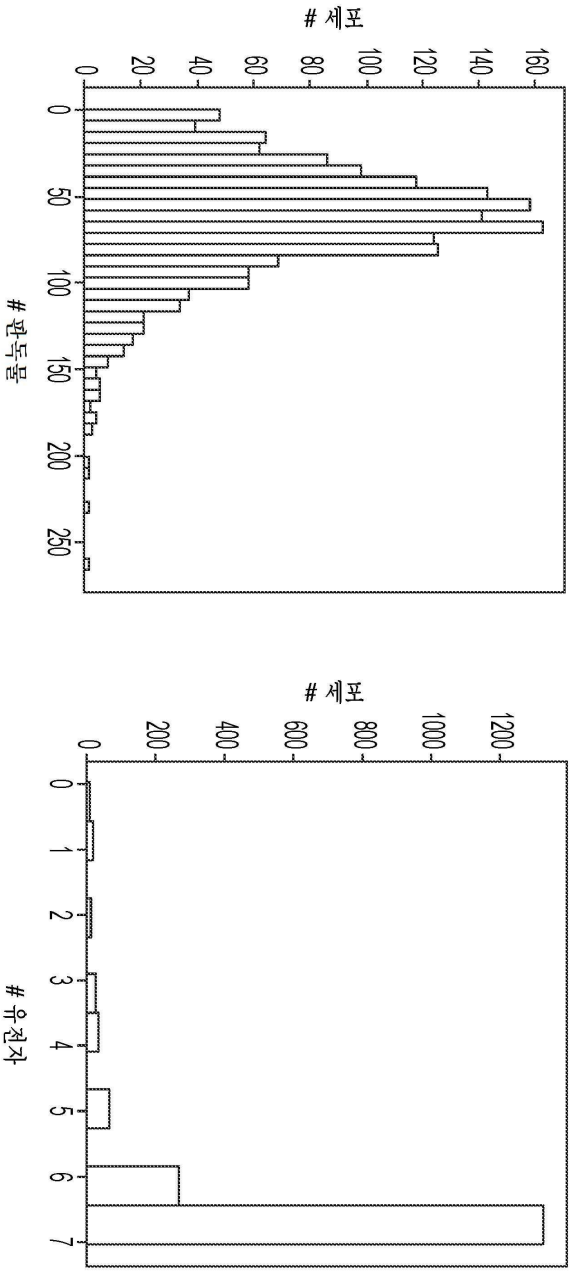
도면3



도면4a


세포 클러스터
6
0
5
4
1
7
3
2
METTL14
METTL3
YTHDC1
YTHDC2
YTHDF1
YTHDF2
YTHDF3
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
정규화된 발현

도면4b

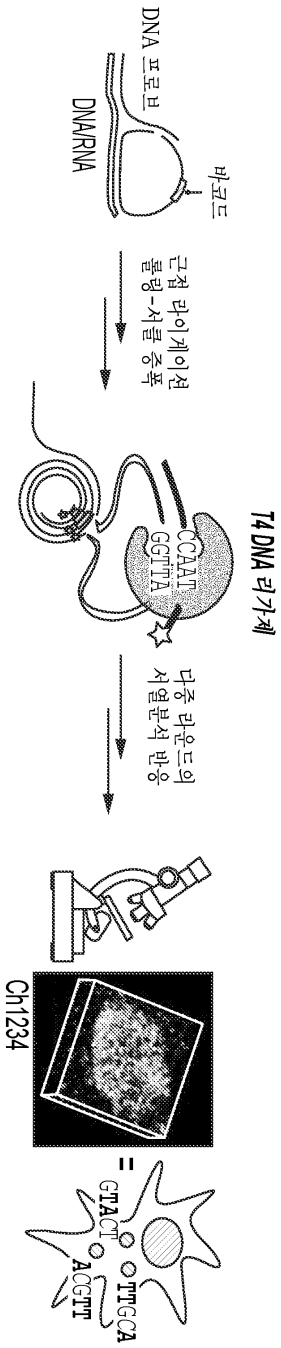

세포
0
20
40
60
80
100
120
140
160
편도물
0
50
100
150
200
250

세포
0
200
400
600
800
1000
1200
유전자
0
1
2
3
4
5
6
7

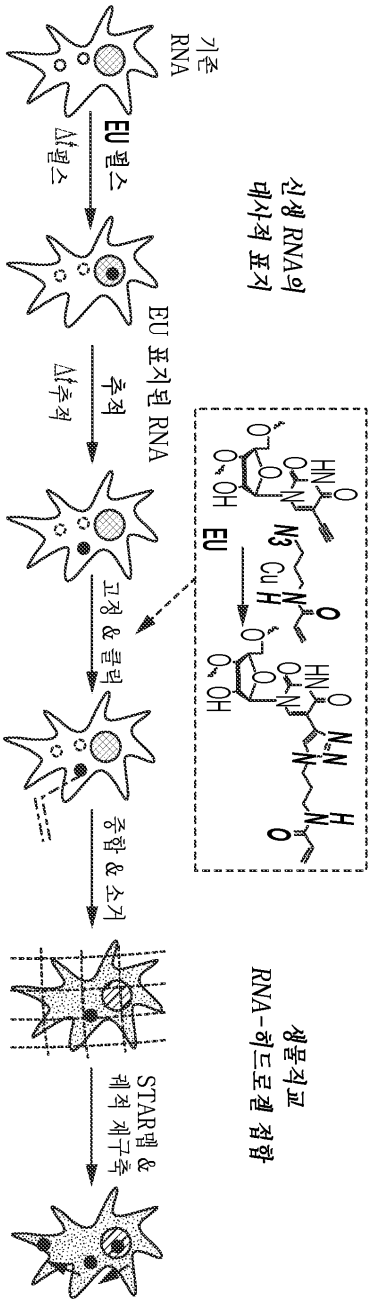
도면5

1. 영상화
2. 정합
3. 스팟 발견
4. 관독물 호출
5. 세포 검출
6. 세포 정량화
Ch 1, Ch 2, Ch 3, Ch 4
라운드 1, 라운드 N
유전자1, 유전자2, 유전자3, 등 세포 1, 세포 2, 세포 3, 등

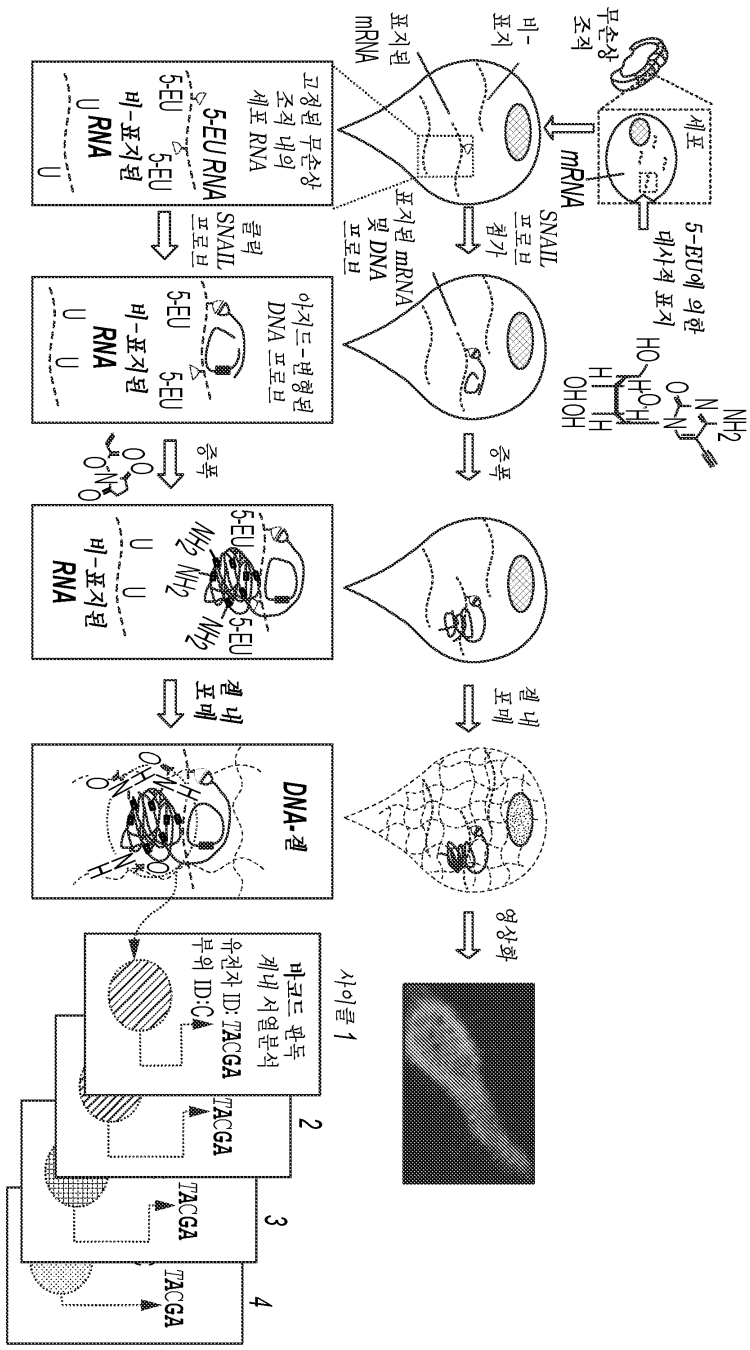
도면6a


DNA 프로브
DNA/RNA
바코드
근접 라이게이션
롤링-서클 증폭
T4 DNA 리가제
CCAAT
GGTTA
다중 라운드의
서열분석 반응
Ch1234
GTACT
ACGTT
TTGCA

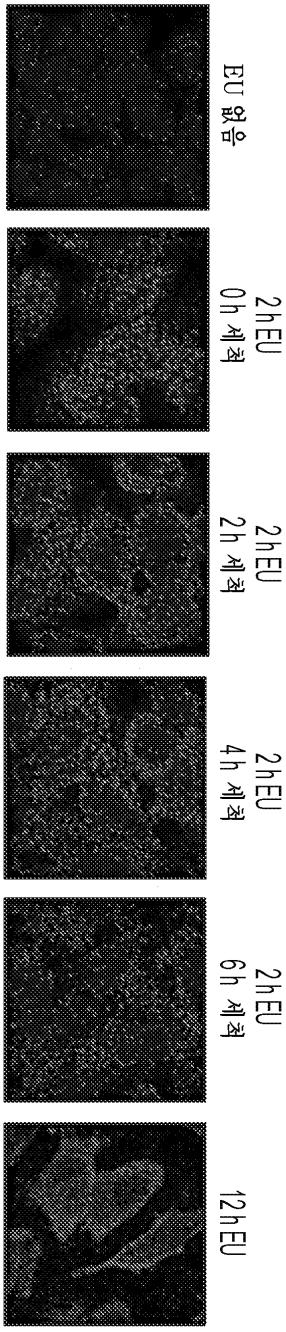
도면6b


기존 RNA
EU 펄스
Δ펄스
EU 표지된 RNA
추적
Δ추적
고정 & 클릭
종합 & 소거
STAR맵 & 세포 재구축
신생 RNA의 대사적 표지
생물직교 RNA-하드로겔 접합
EU
Cu

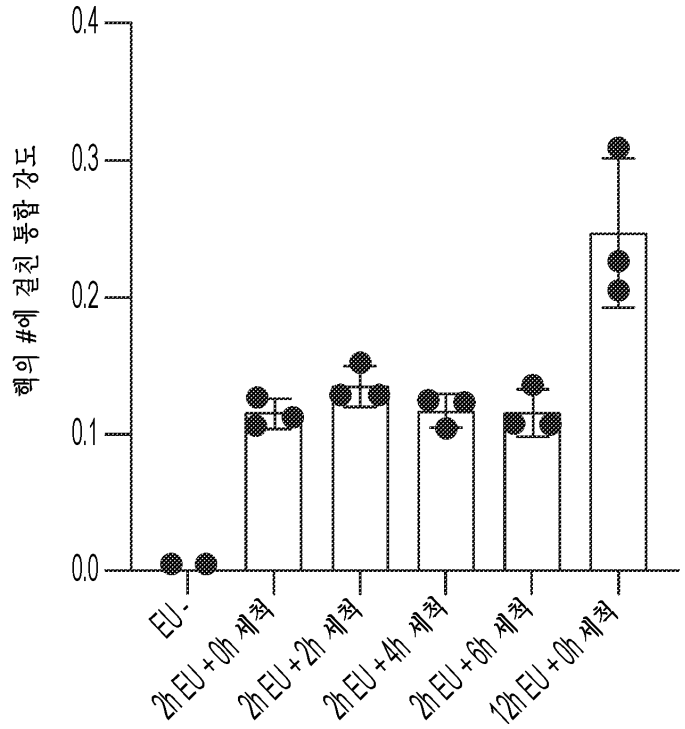
도면7


세포
무손상 조직
5-EU에 의한 대사적 표지
mRNA
SNAIL 프로브 첨가
비-표지
표지된 mRNA
표지된 mRNA 및 DNA 프로브
증폭
겔 내 포매
영상화
고정된 무손상 조직 내의 세포 RNA
5-EU RNA
5-EU
비-표지된 RNA
클릭
SNAIL 프로브
아지드-변형된 DNA 프로브
DNA-겔
바코드 판독 게내 서열분석
유전자 ID: TACGA
유전자 부위 ID:CA
TACGA
사이클 1
2
3
4

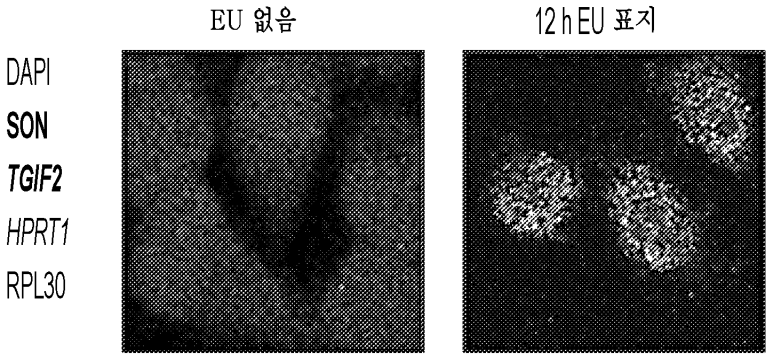
도면8a



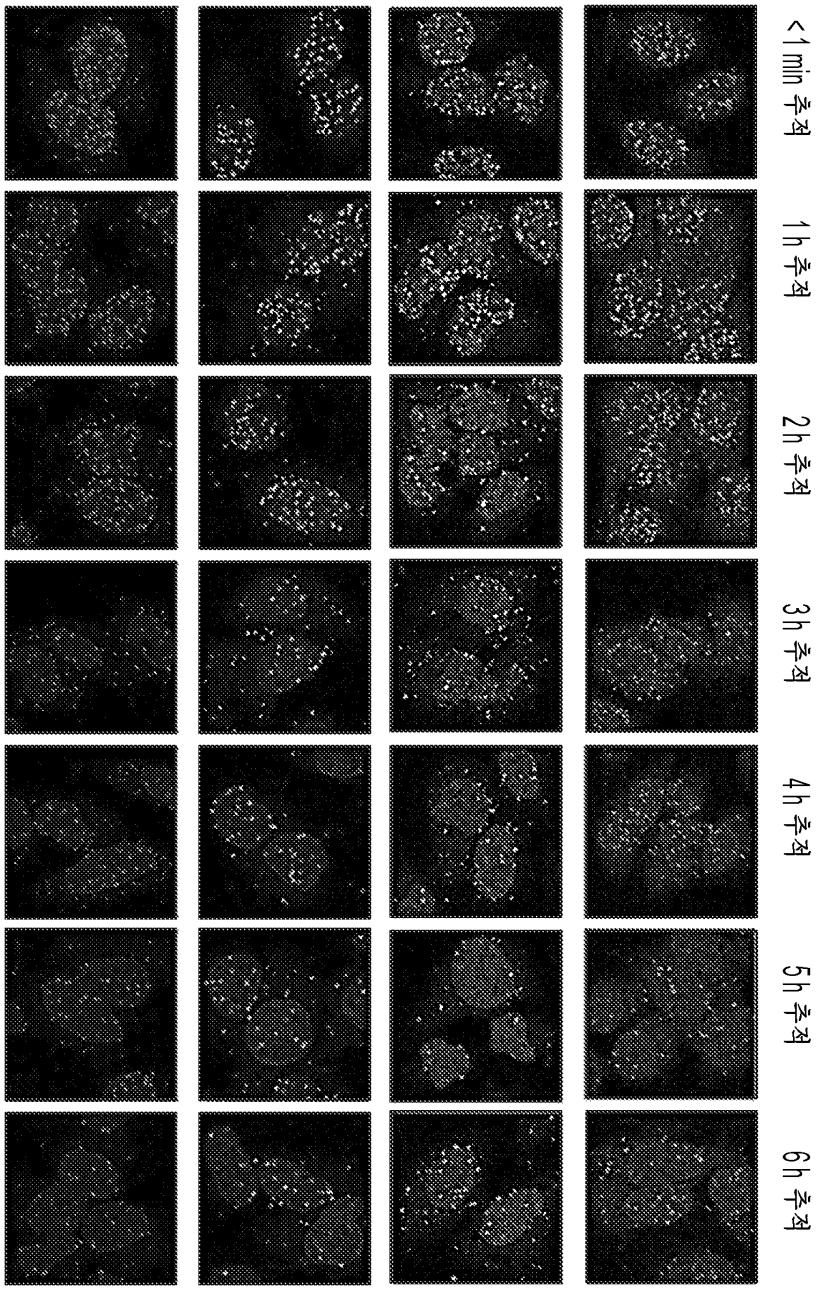
도면8b


0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
핵의 #에 걸친 통합 강도
EU -
2h EU + 0h 체적
2h EU + 2h 체적
2h EU + 4h 체적
2h EU + 6h 체적
12h EU + 0h 체적

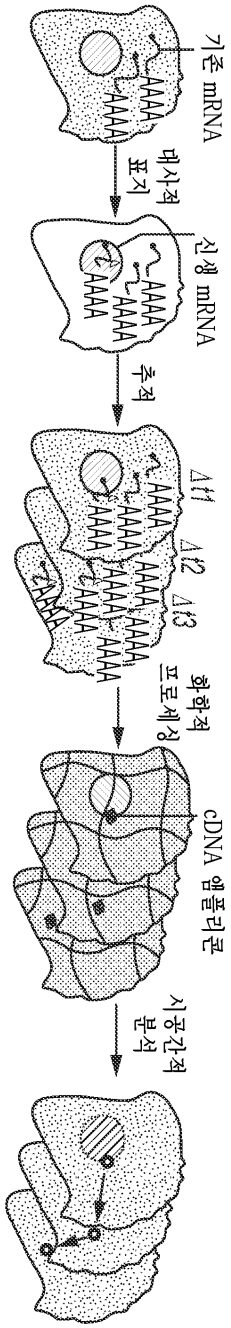
도면9a


EU 없음
12 h EU 표지
DAPI
SON
TGIF2
HPRT1
RPL30

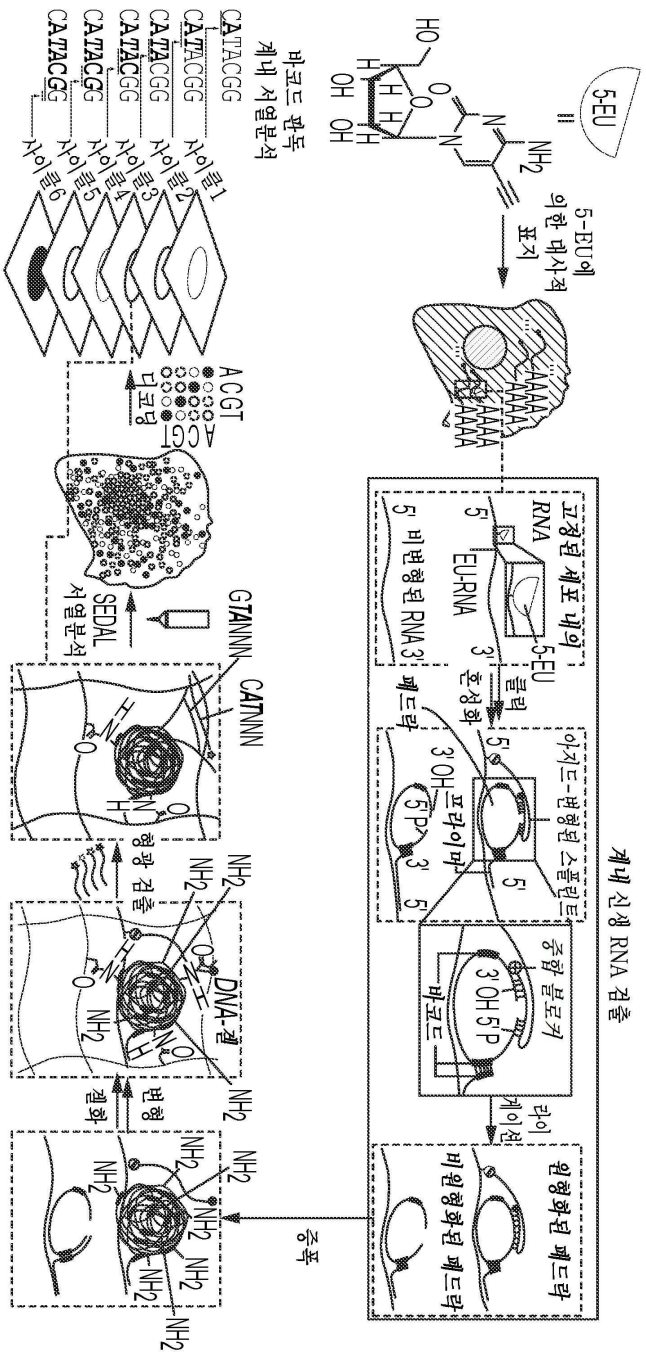
도면9b



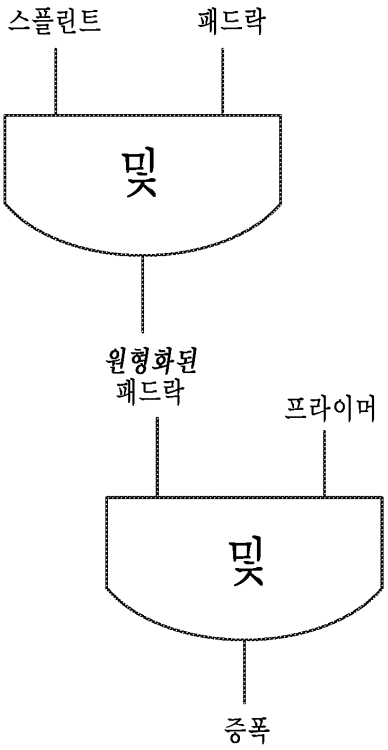
도면10a



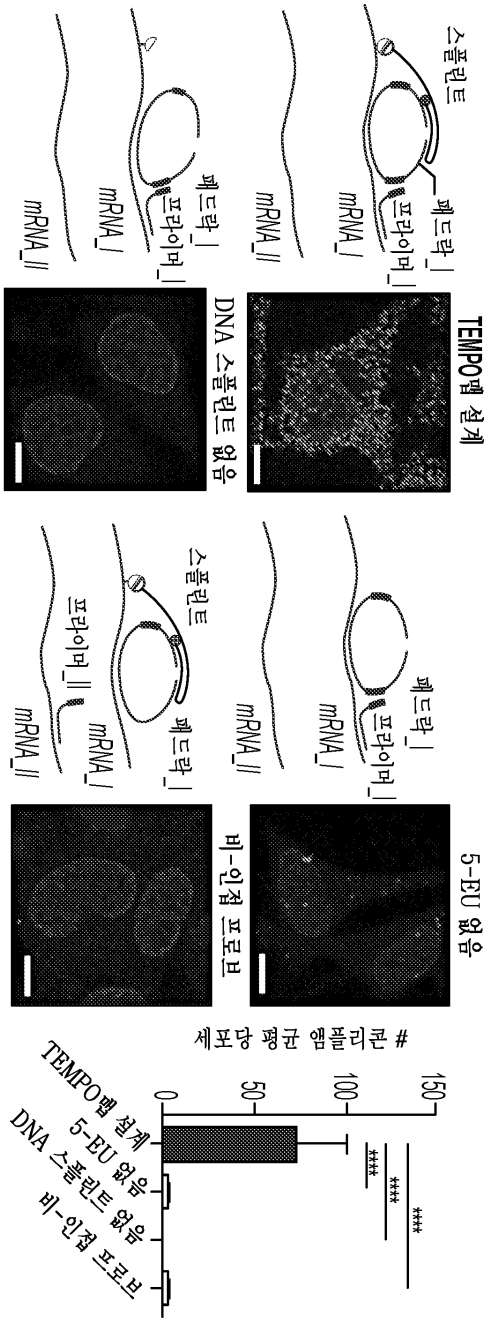
도면10b


5-EU
5-EU에 의한 대사적 표지
세포 신생 RNA 검출
고정된 세포 내의 RNA
5-EU
EU-RNA
5' 비변형된 RNA 3'
혼성화
클릭
아지드-변형된 스플린트
프라이머
3'OH
5'P
중합 블로커
3'OH 5'P
바코드
라이게이션
원형화된 패드락
비원형화된 패드락
증폭
DNA-겔
변형
겔화
형광 검출
GTATNNN
CATNNN
SEDAL
서열분석
ACGT
디코딩
바코드 판독
계내 서열분석
CATTACGG
사이클1
사이클2
사이클3
사이클4
사이클5
사이클6

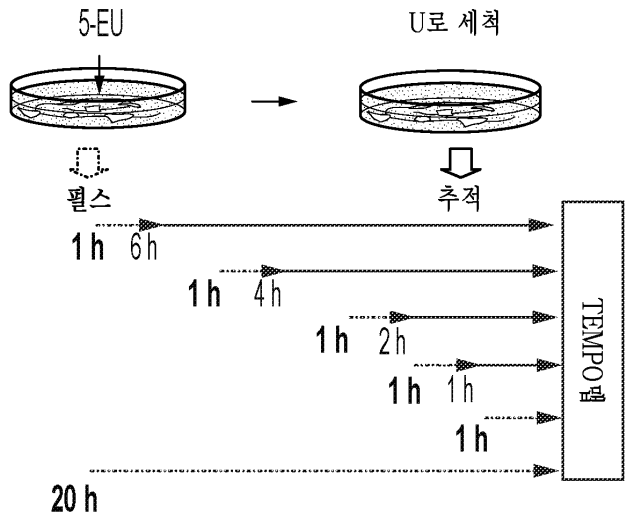
도면10c



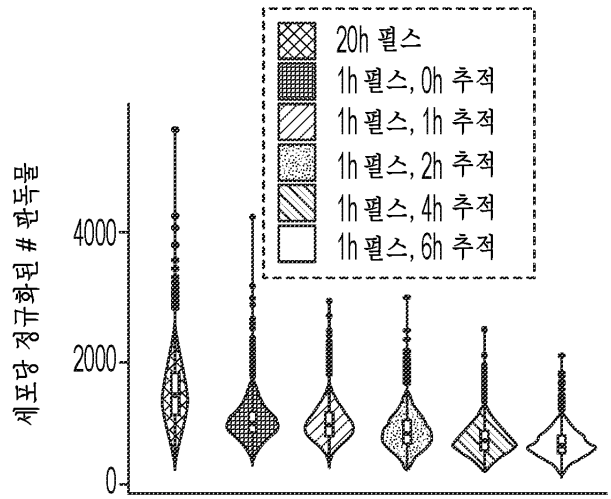
도면10d


TEMPO랩 설계
DNA 스플린트 없음
5-EU 없음
비-인접 프로브
스플린트
패드락_I
프라이머_I
mRNA_I
mRNA_II
프라이머_II
세포당 평균 앰플리콘 #
0
50
100
150
****
****
****
TEMPO랩 설계
5-EU 없음
DNA 스플린트 없음
비-인접 프로브

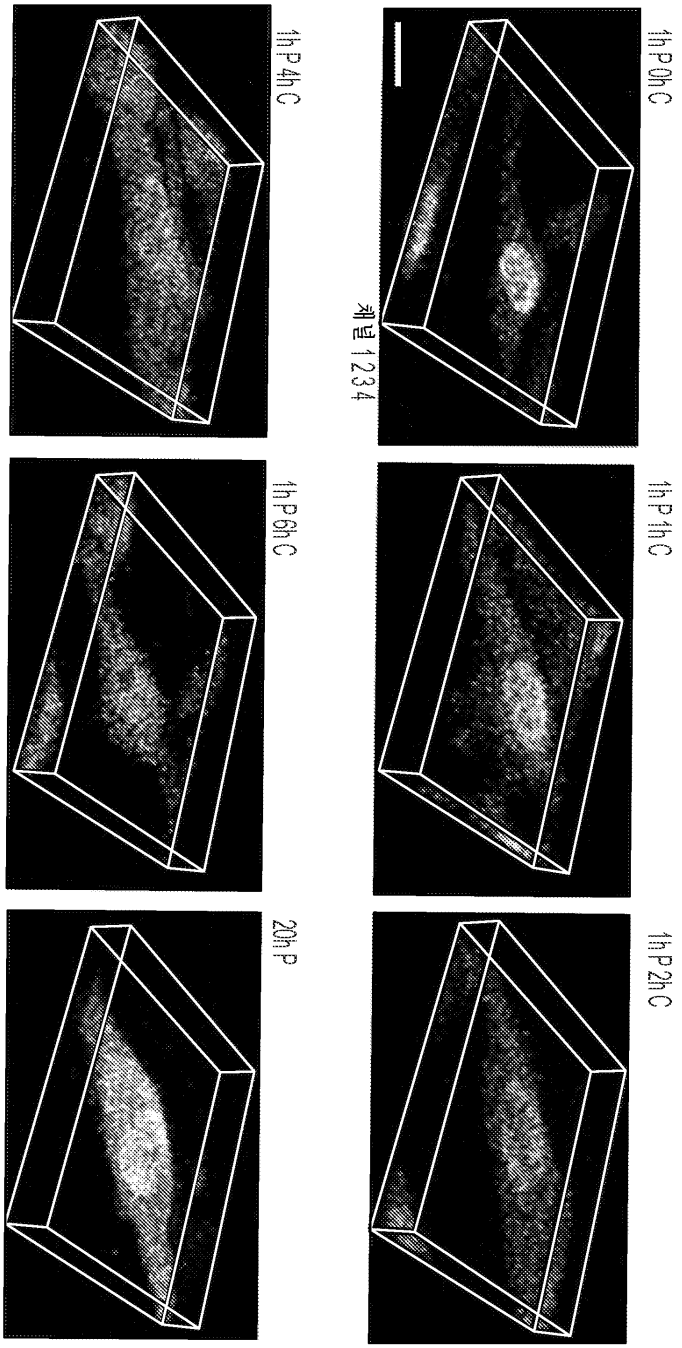
도면11a


5-EU
U로 세척
펄스
추적
1 h 6 h
1 h 4 h
1 h 2 h
1 h 1 h
1 h
20 h
TEMPO랩

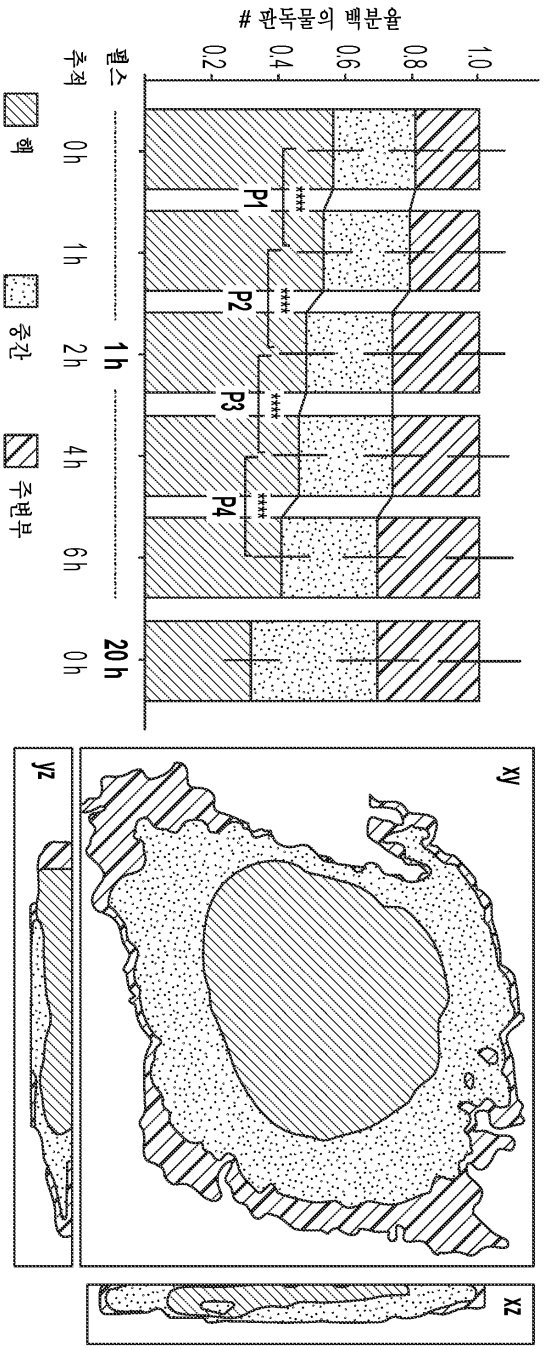
도면11b


20h 펄스
1h 펄스, 0h 추적
1h 펄스, 1h 추적
1h 펄스, 2h 추적
1h 펄스, 4h 추적
1h 펄스, 6h 추적
세포당 정규화된 # 판독물
4000
2000
0

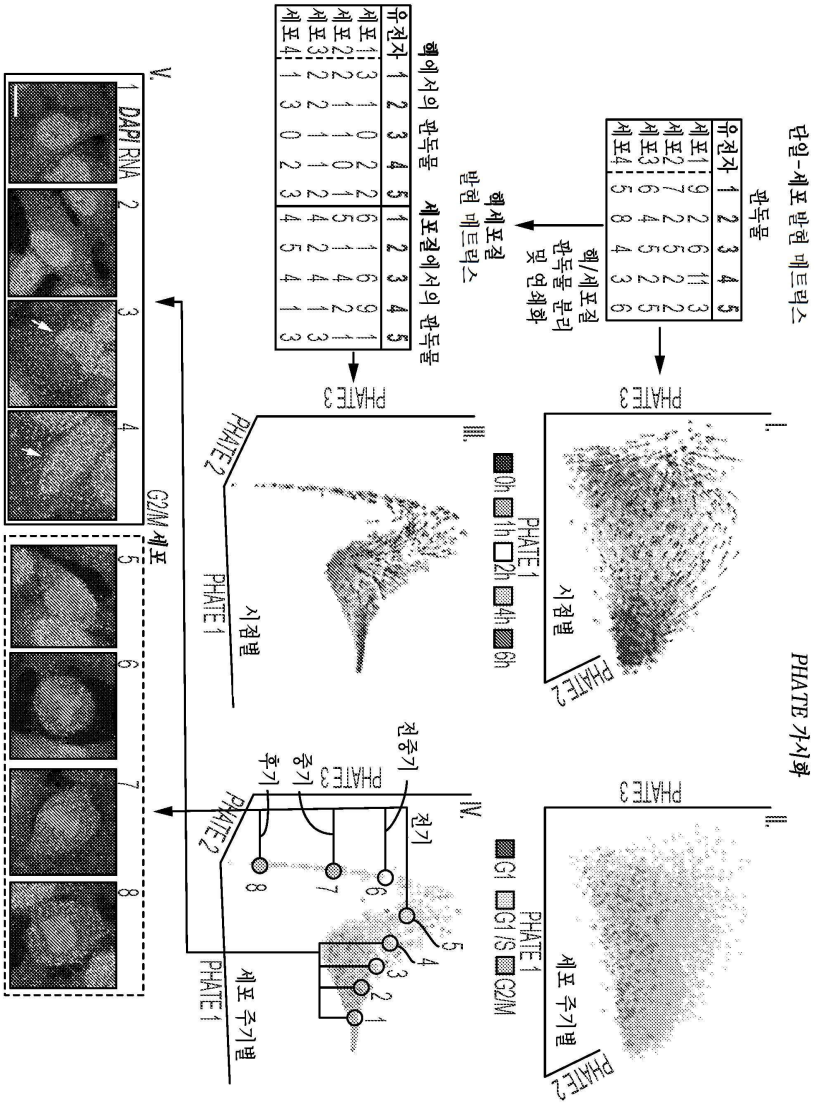
도면11c



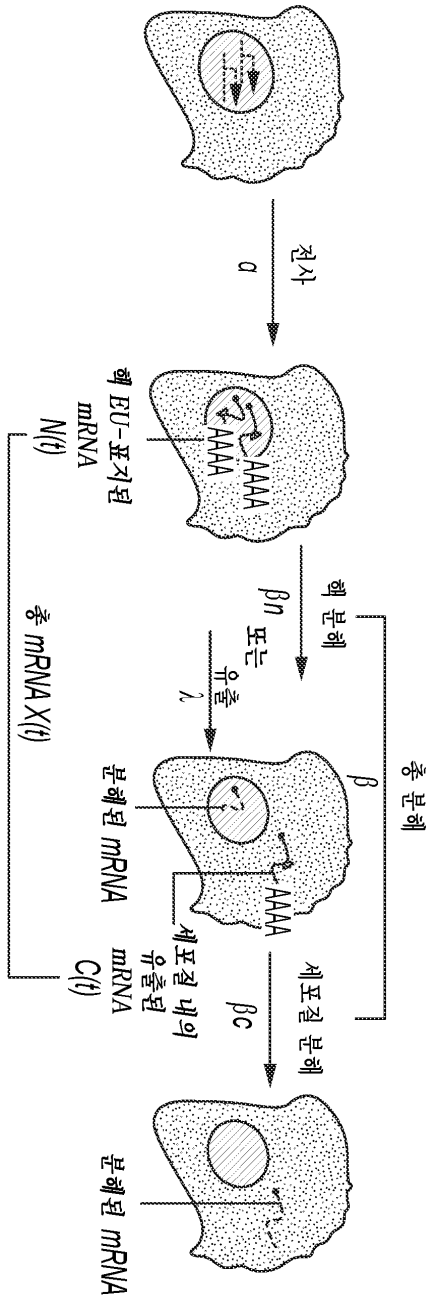
도면11d


판독물의 백분율
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
펄스 추적
0h
1h
2h
4h
6h
0h
1 h
20 h
핵
중간
주변부
P1
P2
P3
P4
****
xy
yz
xz

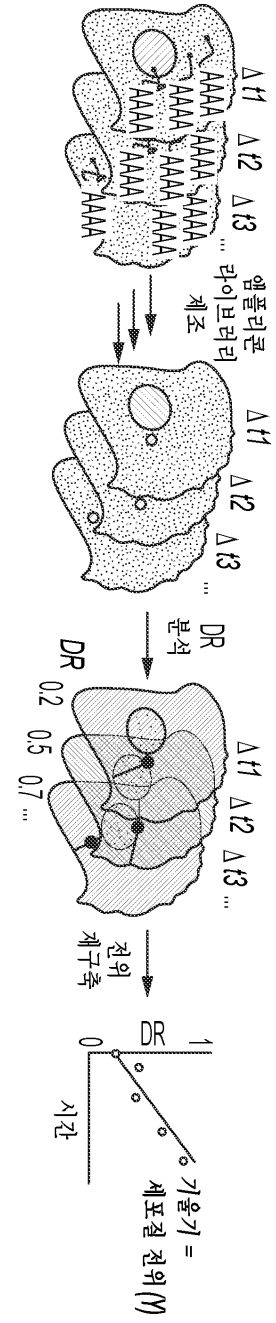
도면11e


단일-세포 발현 메트릭스
판독물
유전자 1 2 3 4 5
세포1 1 9 2 6 11 3
세포2 7 2 5 2 2
세포3 6 4 5 2 5
세포4 5 8 4 4 3 6
헤/세포질 판독물 분리 및 연쇄화
헤세포질 발현 메트릭스
헤에서의 판독물
유전자 1 2 3 4 5
세포1 3 1 0 2 2
세포2 2 1 1 0 1
세포3 2 2 1 1 2
세포4 1 3 0 2 3
세포질에서의 판독물
1 2 3 4 5
6 1 6 9 1
5 1 4 2 1
4 2 4 1 3
4 5 4 1 3
PHATE 가시화
I.
PHATE3
PHATE2
시점별
PHATE1
0h 1h 2h 4h 6h
II.
PHATE3
PHATE2
세포 주기별
PHATE1
G1 G1/S G2/M
III.
PHATE3
PHATE2
시점별
PHATE1
IV.
전증기
PHATE3
중기
후기
전기
PHATE2
세포 주기별
PHATE1
V.
DAPI RNA
G2/M 세포

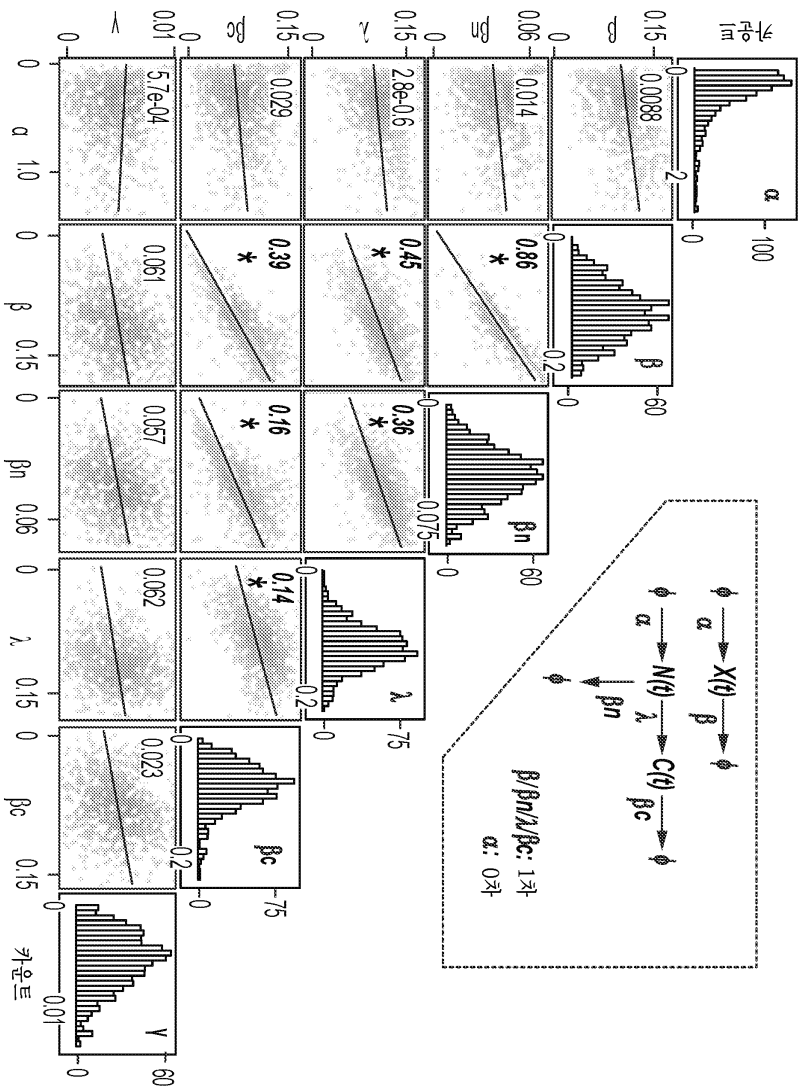
도면12a


전사
α
핵 EU-표지된 mRNA N(t)
AAAA
AAAA
βn
핵 분해
또는
유출
λ
총 mRNA X(t)
분해된 mRNA
β
총 분해
AAAA
세포질 내의 유출된 mRNA C(t)
βc
세포질 분해
분해된 mRNA

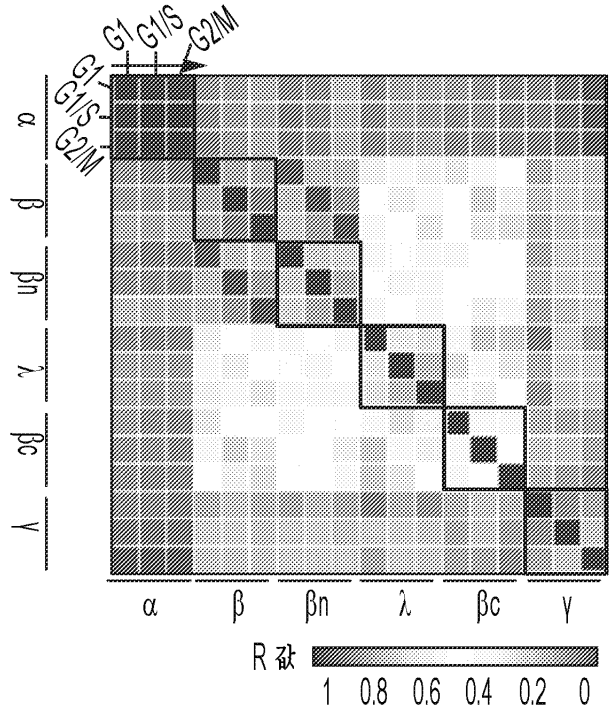
도면12b


Δt1 Δt2 Δt3 ...
AAAA
앰플리콘
라이브러리
제조
Δt1 Δt2 Δt3 ...
DR
분석
DR
0.2
0.5
0.7 ...
Δt1 Δt2 Δt3 ...
전위
제구축
DR
1
0
시간
기울기 =
세포질 전위 (V)

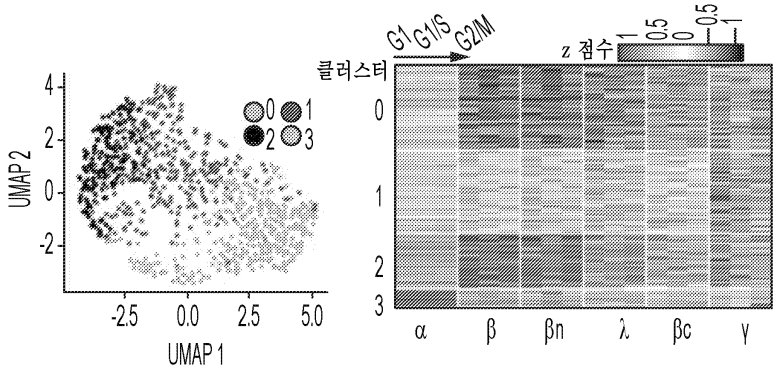
도면12c


카운트
α
β
βn
λ
βc
γ
0.0088
0.014
2.8e-06
0.029
5.7e-04
0.86
0.45
0.36
0.39
0.16
0.14
0.061
0.057
0.062
0.023
X(t)
N(t)
C(t)
βn
β/βn/λ/βc: 1차
α: 0차

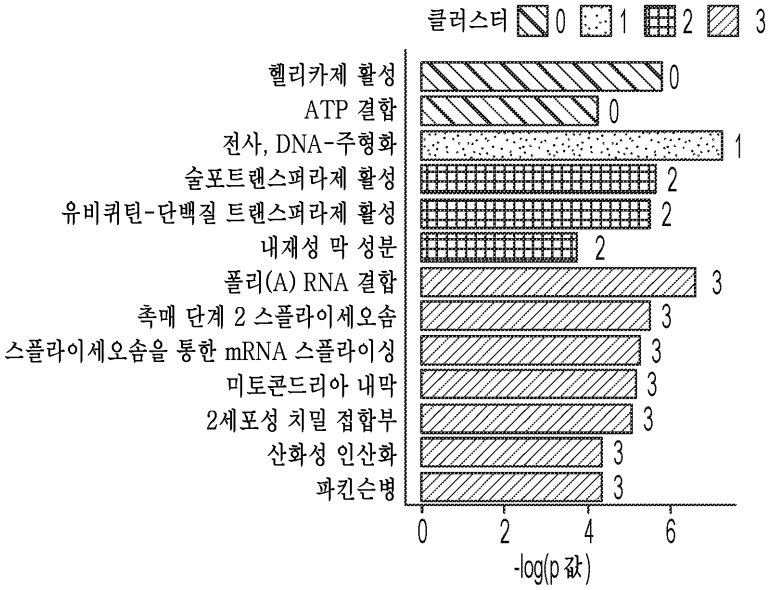
도면12d


G1
G1/S
G2/M
α
β
βn
λ
βc
γ
R 값
1 0.8 0.6 0.4 0.2 0

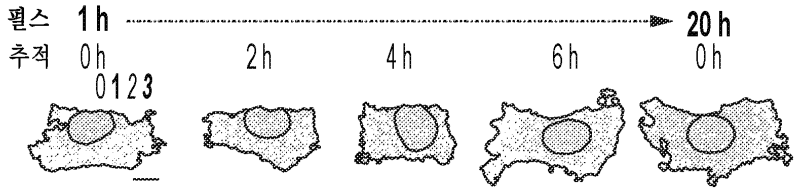
도면12e


UMAP 2
UMAP 1
-2.5 0.0 2.5 5.0
클러스터
z 점수
1 0.5 0 -0.5 -1
α β βn λ βc γ

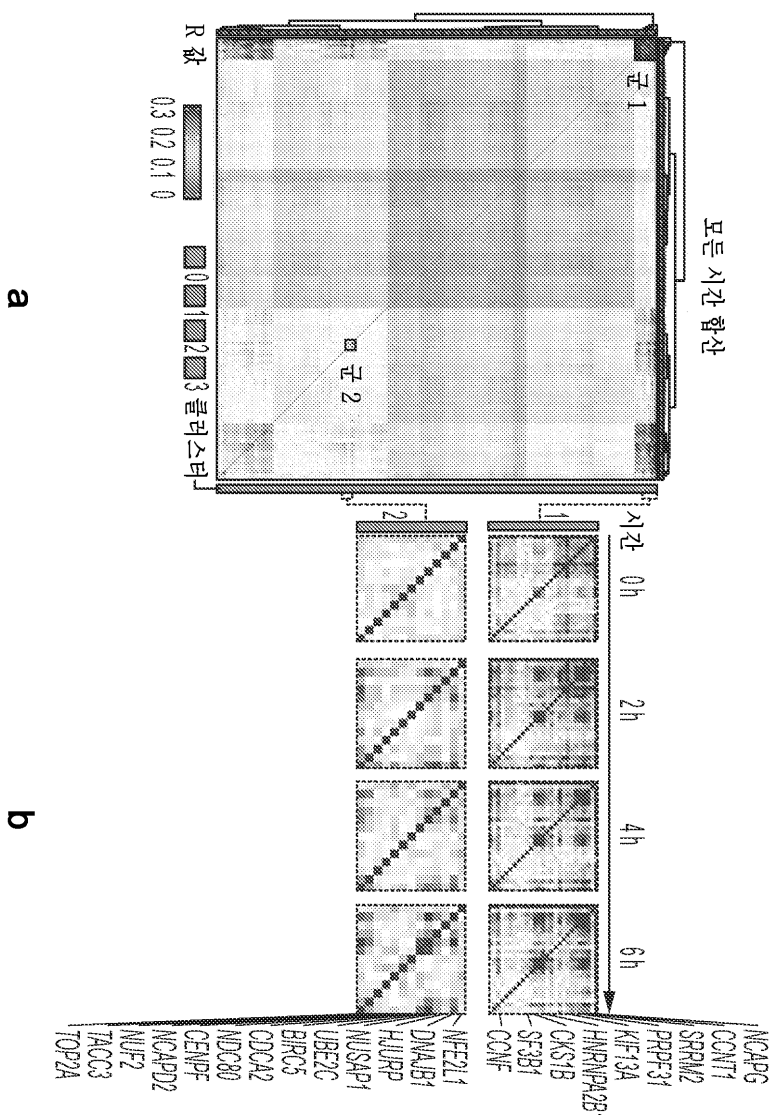
도면12f


클러스터 0 1 2 3
헬리카제 활성
ATP 결합
전사, DNA-주형화
술포트랜스퍼라제 활성
유비퀴틴-단백질 트랜스퍼라제 활성
내재성 막 성분
폴리(A) RNA 결합
촉매 단계 2 스플라이세오솜
스플라이세오솜을 통한 mRNA 스플라이싱
미토콘드리아 내막
2세포성 치밀 접합부
산화성 인산화
파킨슨병
0
0
1
2
2
2
3
3
3
3
3
3
3
0
2
4
6
-log(p 값)

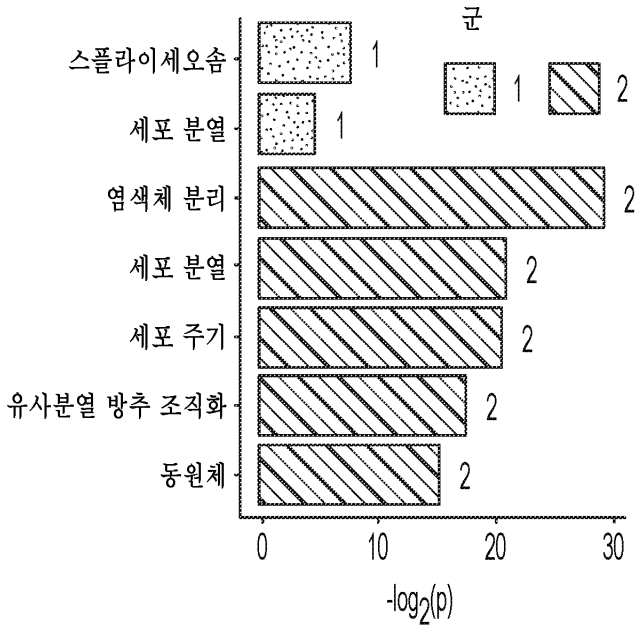
도면12g


펄스 1h
20h
추적 0h
2h
4h
6h
0h
0123

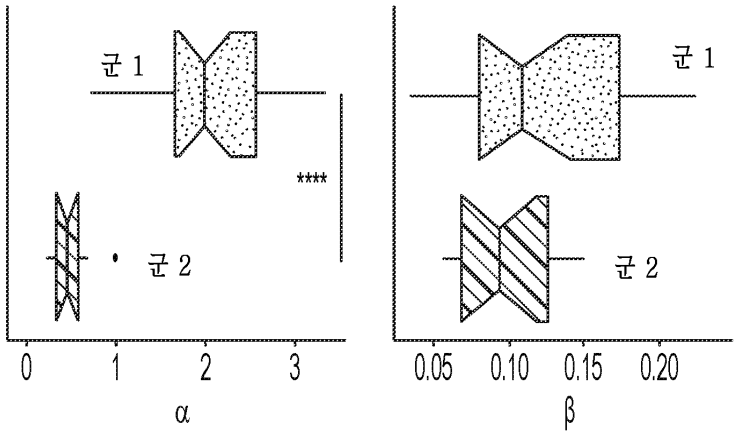
도면13ab


a
b
R 값
0.3 0.2 0.1 0
0 1 2 3 클러스터
군 1
군 2
모든 시간 합산
시간
0h
2h
4h
6h
NCAPG
CCNT1
SRRM2
PRPF31
KIF13A
HNRNPA2B1
CKS1B
SF3B1
CCNF
NFE2L1
DNAJB1
HJURP
NUSAP1
UBE2C
BIRC5
CDCA2
NDC80
CENPF
NCAPD2
NUF2
TACC3
TOP2A

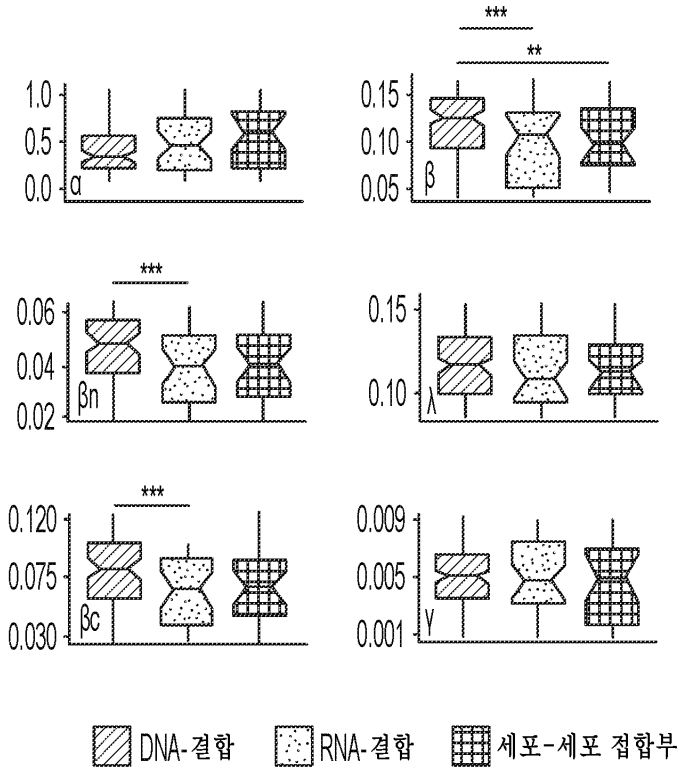
도면13c


군
스플라이세오솜
세포 분열
염색체 분리
세포 분열
세포 주기
유사분열 방추 조직화
동원체
1
1
1
2
2
2
2
2
0
10
20
30
-log2(p)

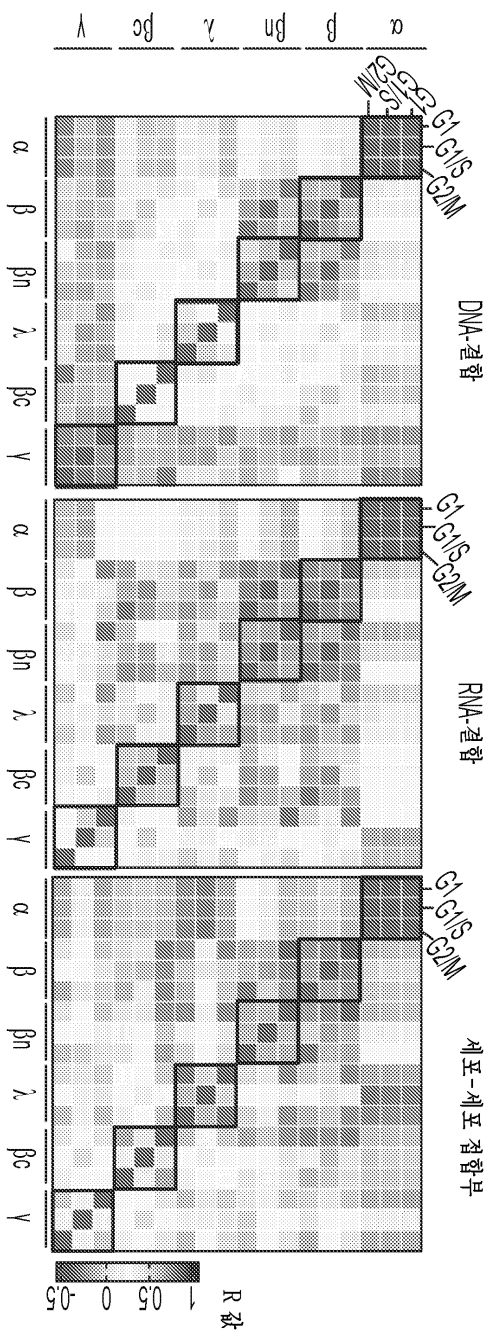
도면13d


군 1
****
군 2
0
1
2
3
α
군 1
군 2
0.05
0.10
0.15
0.20
β

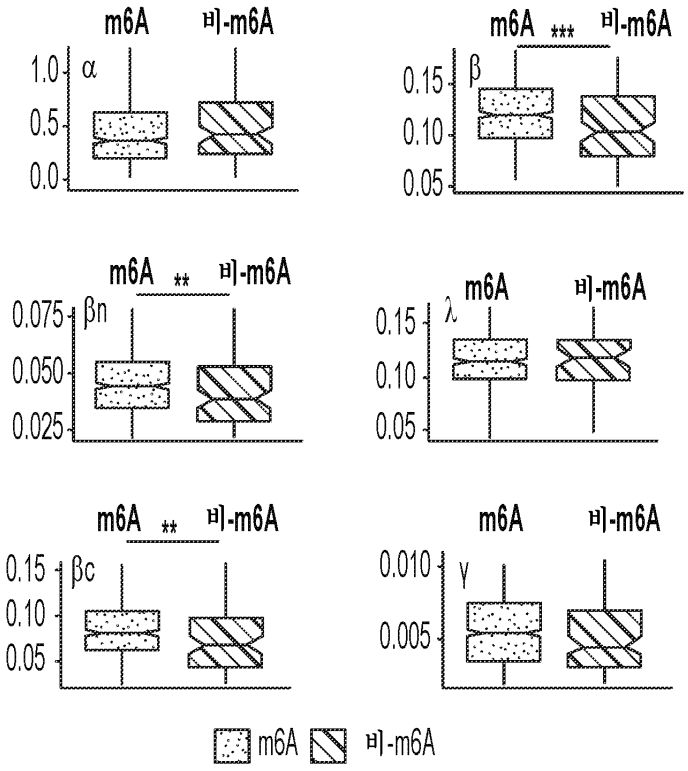
도면13e


***
**
1.0
0.5
0.0
α
0.15
0.10
0.05
β
***
0.06
0.04
0.02
βn
0.15
0.10
λ
***
0.120
0.075
0.030
βc
0.009
0.005
0.001
γ
DNA-결합
RNA-결합
세포-세포 접합부

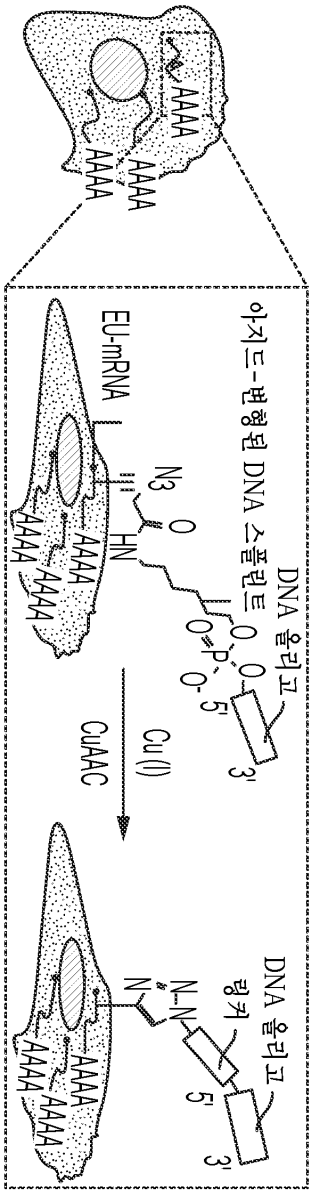
도면13f



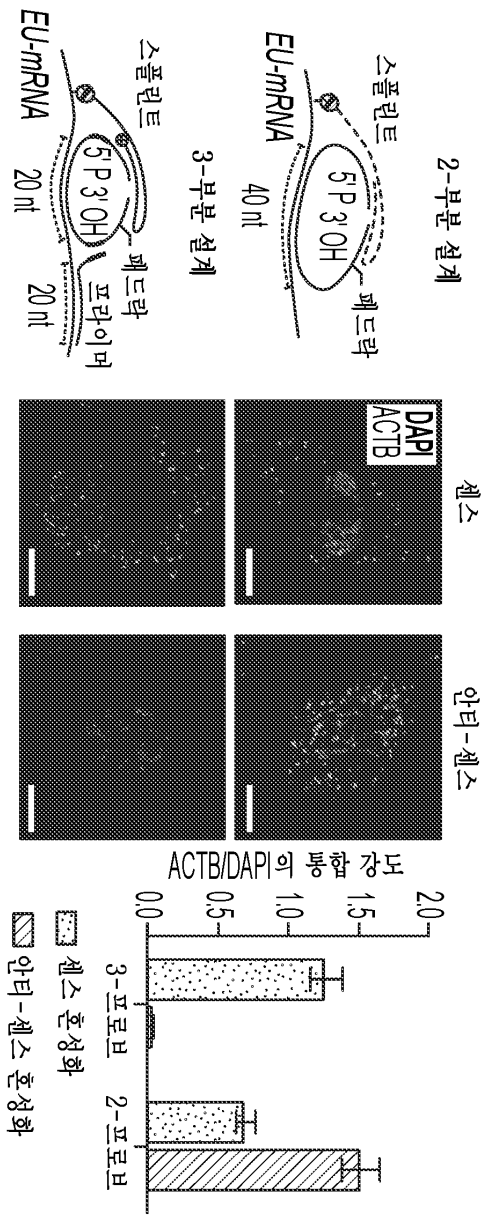
도면13g


m6A
비-m6A
1.0
0.5
0.0
α
m6A
***
비-m6A
0.15
0.10
0.05
β
m6A
**
비-m6A
0.075
0.050
0.025
βn
m6A
비-m6A
0.15
0.10
0.05
λ
m6A
**
비-m6A
0.15
0.10
0.05
βc
m6A
비-m6A
0.010
0.005
γ
m6A
비-m6A

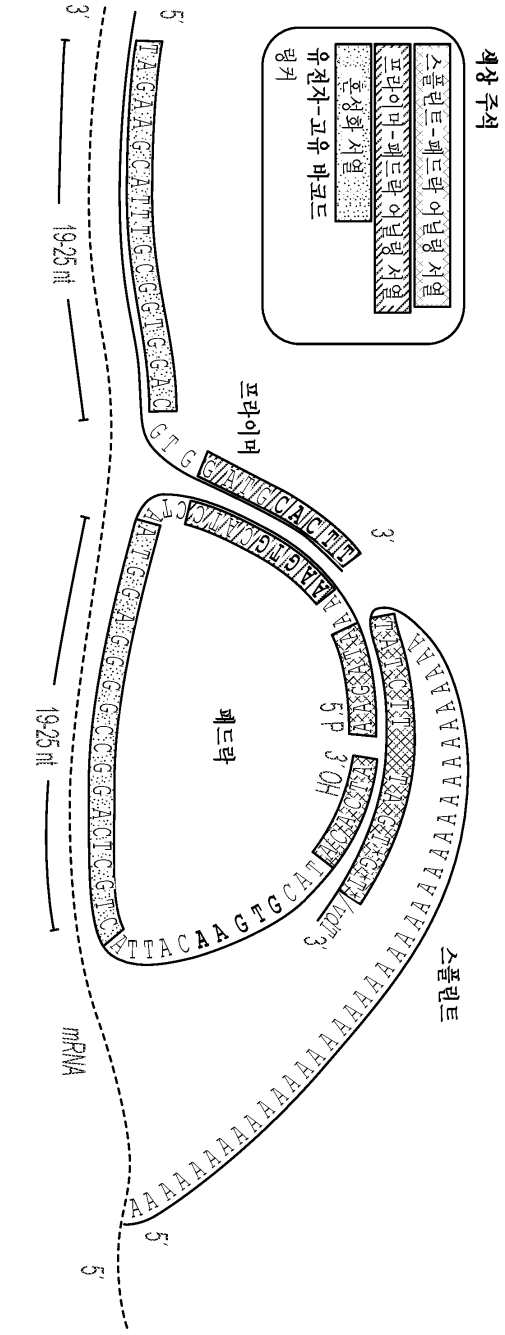
도면14a


AAAA
AAAA
AAAA
EU-mRNA
아지드-변형된 DNA 스플린트
DNA 올리고
N3
O
HN
O
O⁻P
O⁻
5'
3'
Cu (I)
CuAAC
DNA 올리고
링커
N
N
N
5'
3'

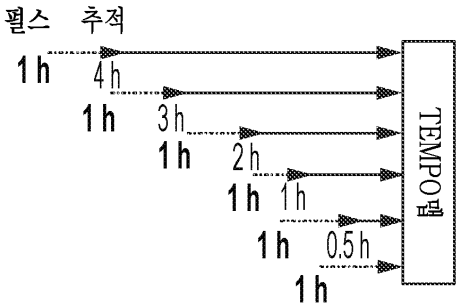
도면14b

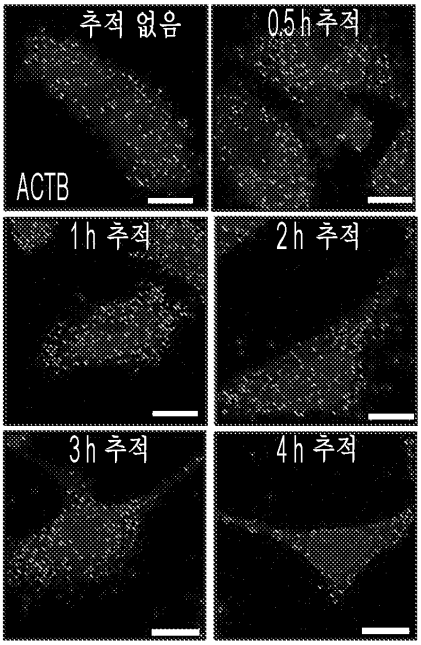

2-부분 설계
스플린트
EU-mRNA
5' P 3' OH
40 nt
페드락
3-부분 설계
스플린트
EU-mRNA
5' P 3' OH
20 nt
페드락
프라이머
20 nt
센스
DAPI
ACTB
안티-센스
ACTB/DAPI의 통합 강도
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
3-프로브
2-프로브
센스 혼성화
안티-센스 혼성화

도면14c

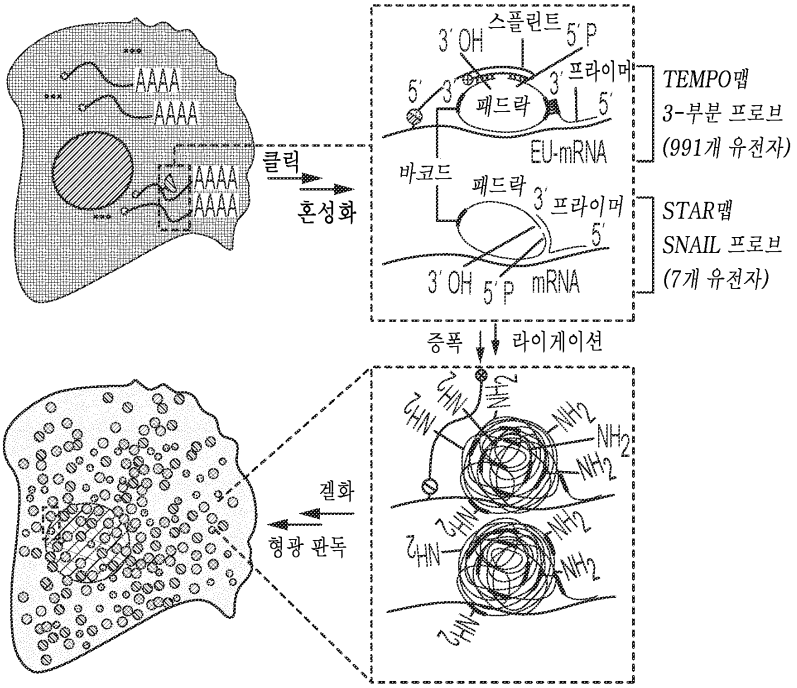

색상 주석
스플린트-페드락 이널링 서열
프라이머-페드락 이널링 서열
혼성화 서열
유전자-고유 바코드
링커
프라이머
페드락
스플린트
mRNA
19-25 nt
19-25 nt
5'
3'
5'
3'
5'
3'
OH
5'
3'

도면14d

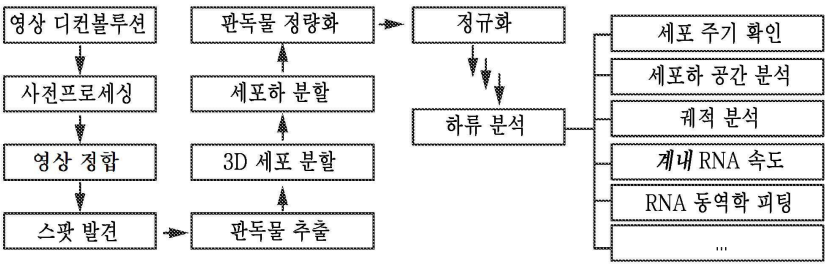

펄스 추적
1 h
4 h
1 h
3 h
1 h
2 h
1 h
1 h
1 h
0.5 h
1 h
TEMPO팹


추적 없음
0.5 h 추적
ACTB
1 h 추적
2 h 추적
3 h 추적
4 h 추적

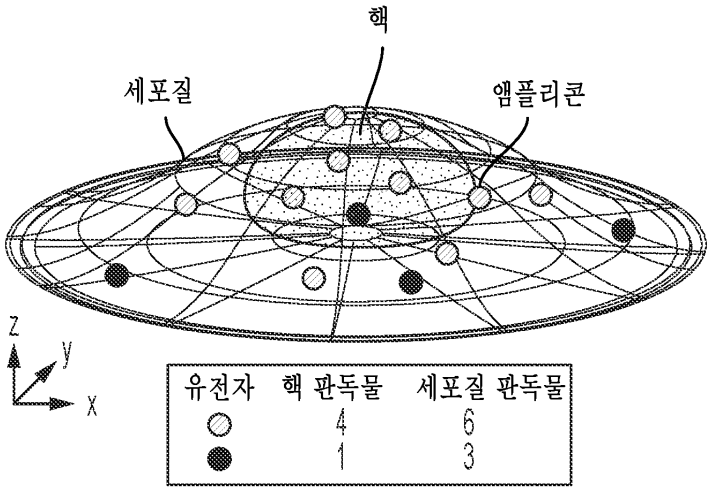
도면14e



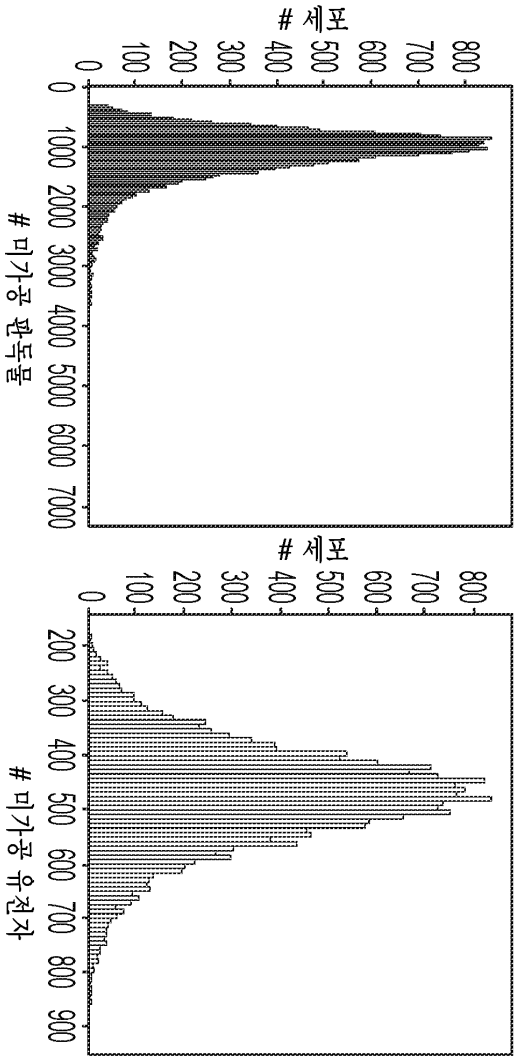
도면15a



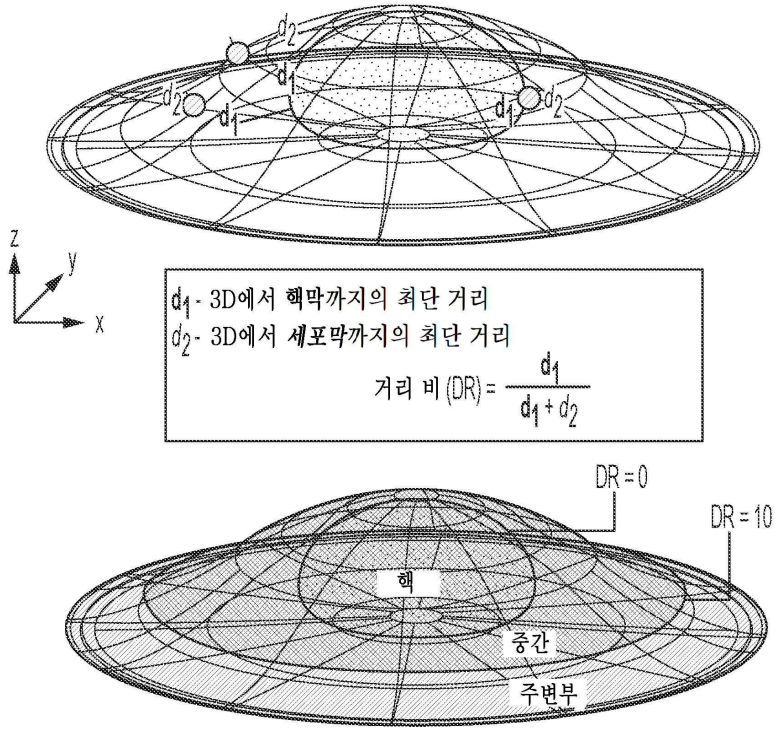
도면15b



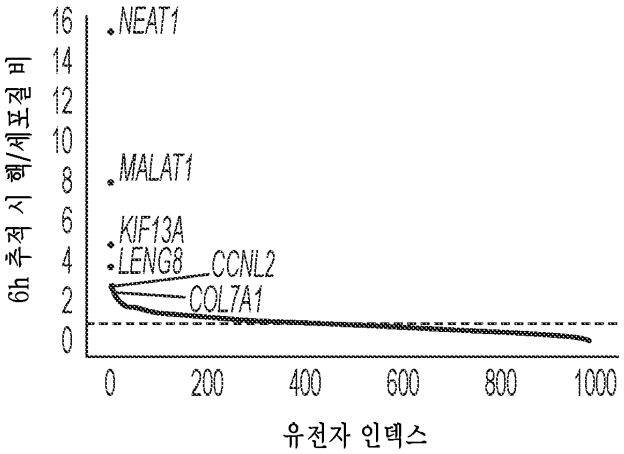
도면15c


세포
0
100
200
300
400
500
600
700
800
미가공 판독물
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
세포
0
100
200
300
400
500
600
700
800
미가공 유전자
200
300
400
500
600
700
800
900

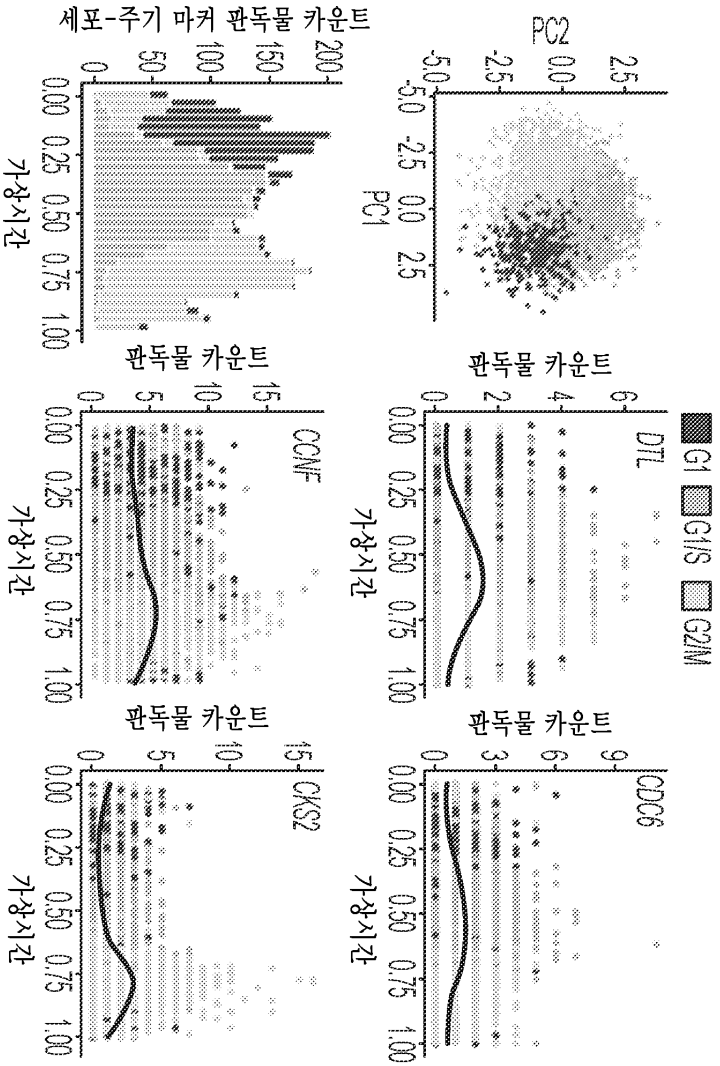
도면15d


d2
d1
d2
d1
d1
d2
z
y
x
d1 - 3D에서 핵막까지의 최단 거리
d2 - 3D에서 세포막까지의 최단 거리
거리 비 (DR) = d1 / (d1 + d2)
DR = 0
DR = 10
핵
중간
주변부

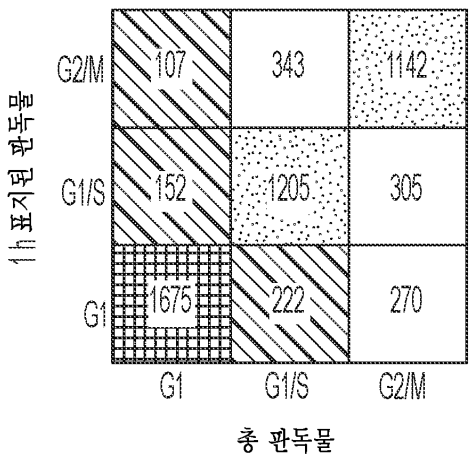
도면16a


6h 추적 시 핵/세포질 비
16
14
12
10
8
6
4
2
0
NEAT1
MALAT1
KIF13A
LENG8
CCNL2
COL7A1
0
200
400
600
800
1000
유전자 인덱스

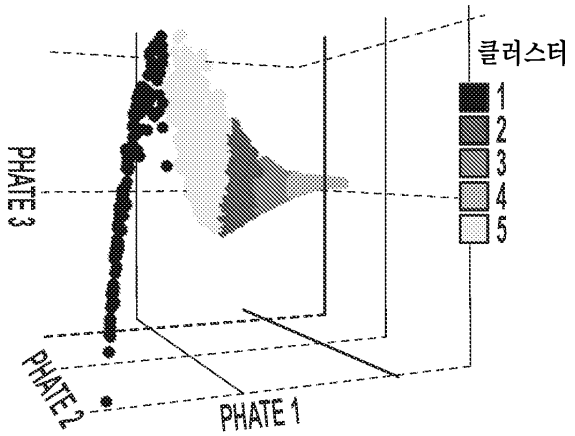
도면16b


세포-주기 마커 판독물 카운트
가상시간
PC2
PC1
판독물 카운트
CCNF
DTL
CKS2
CDC6
G1
G1/S
G2/M

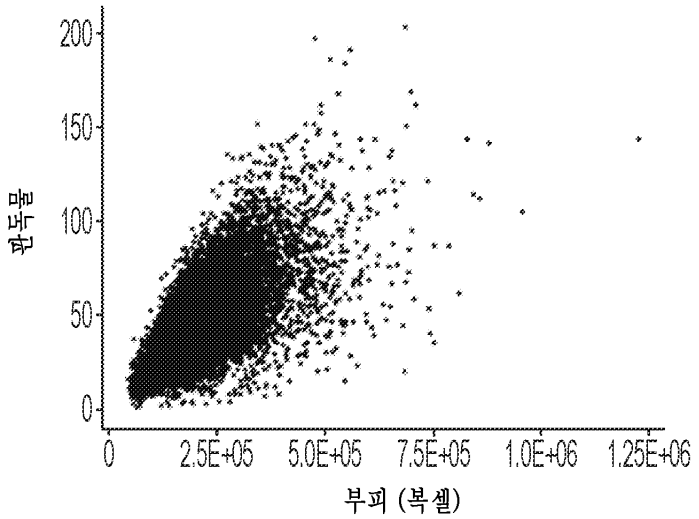
도면16c


107
343
1142
152
1205
305
1675
222
270
G2/M
G1/S
G1
총 판독물

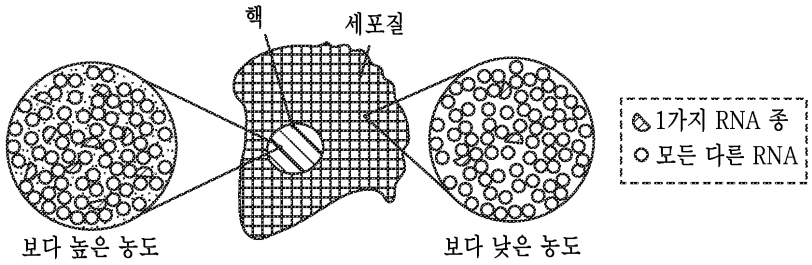
도면16d



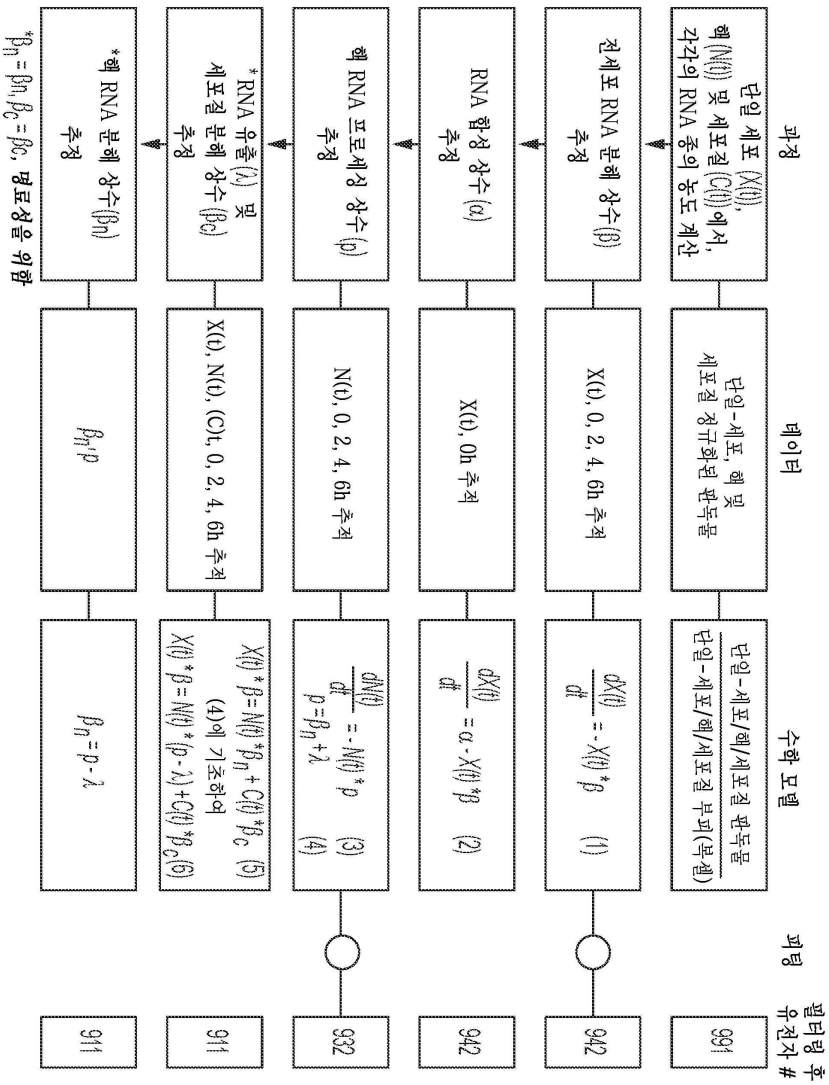
도면17a



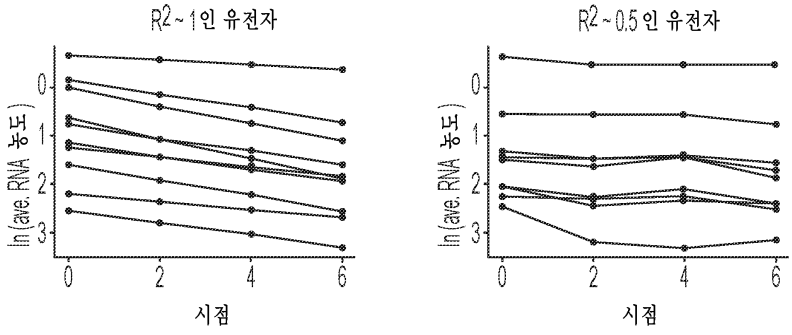
도면17b



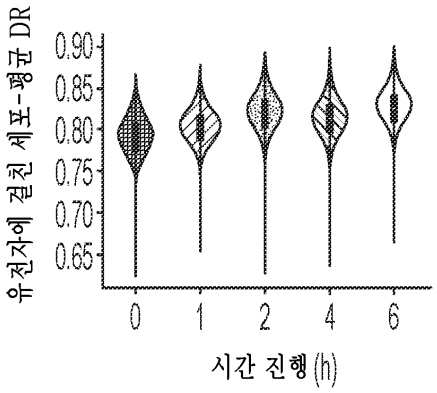
도면17c


과정
데이터
수학 모델
피팅
필터링 후 유전자 #
단일 세포 (X(t)), 핵 (N(t)) 및 세포질 (C(t)) 에서, 각각의 RNA 종의 농도 계산
단일-세포, 핵 및 세포질 정규화된 판독물
단일-세포/핵/세포질 판독물
단일-세포/핵/세포질 부피(복셀)
991
전세포 RNA 분해 상수 (β)
X(t), 0, 2, 4, 6h 추적
$\frac{dX(t)}{dt} = -X(t) * \beta$ (1)
942
RNA 합성 상수 (α)
X(t), 0h 추적
$\frac{dX(t)}{dt} = \alpha - X(t) * \beta$ (2)
942
핵 RNA 프로세싱 상수 (ρ)
N(t), 0, 2, 4, 6h 추적
$\frac{dN(t)}{dt} = -N(t) * \rho$ (3)
$\rho = \beta_n + \lambda$ (4)
932
*RNA 유출 (λ) 및 세포질 분해 상수 (βc)
X(t), N(t), (C)t, 0, 2, 4, 6h 추적
$X(t) * \beta = N(t) * \beta_n + C(t) * \beta_c$ (5)
(4)에 기초하여
$X(t) * \beta = N(t) * (\rho - \lambda) + C(t) * \beta_c$ (6)
911
*핵 RNA 분해 상수 (βn)
β_n, ρ
$\beta_n = \rho - \lambda$
911
*$\beta_n = \beta_n, \beta_c = \beta_c$, 명료성을 위함

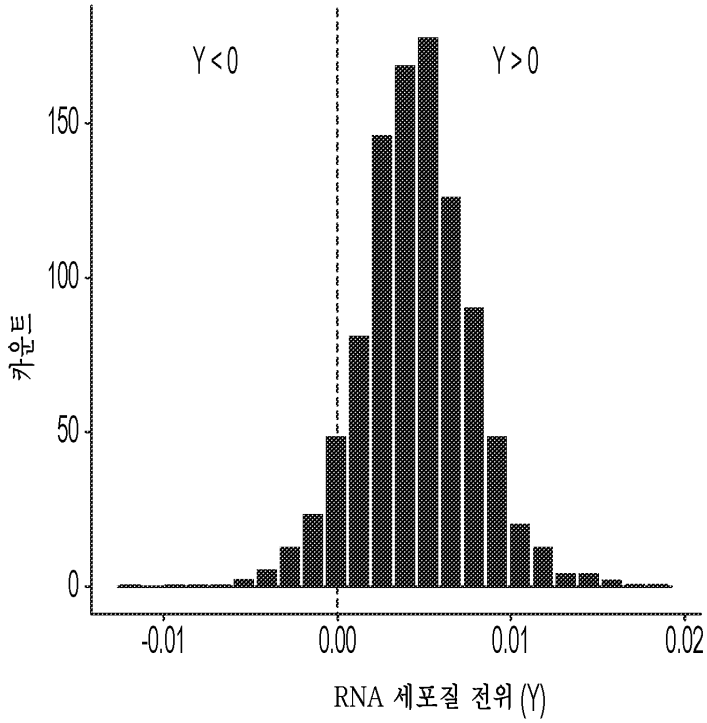
도면17d


R2~1인 유전자
R2~0.5인 유전자
ln(exp. RNA 포획)
0
1
2
3
0
2
4
6
시점

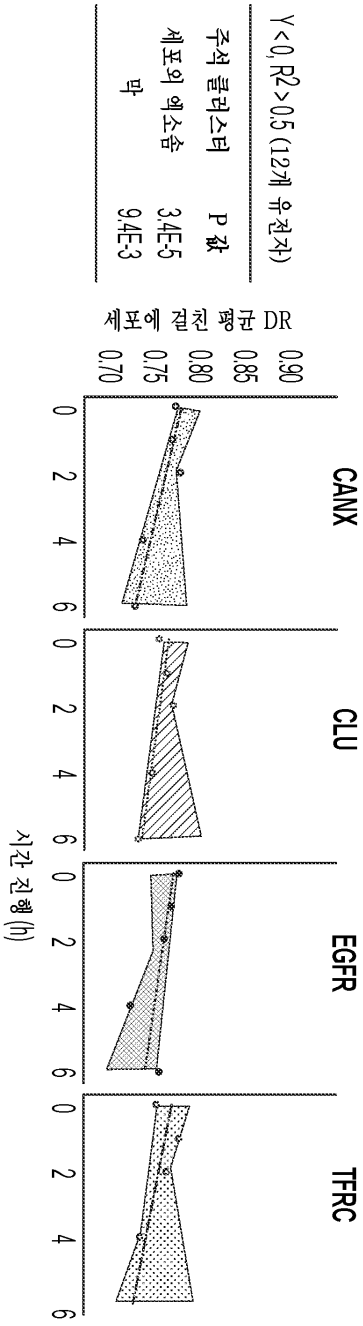
도면17e


유전자에 걸친 세포-평균 DR
0.90
0.85
0.80
0.75
0.70
0.65
0
1
2
4
6
시간 진행 (h)

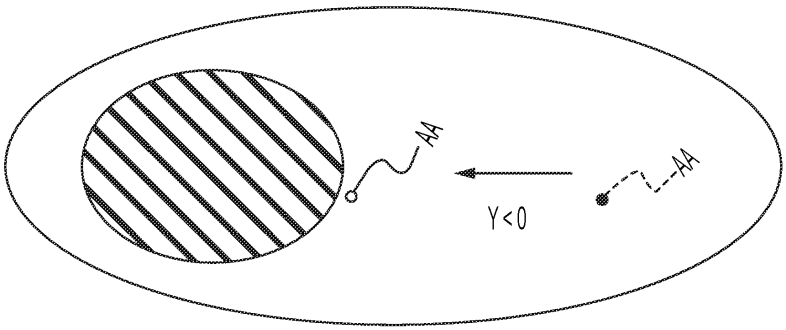
도면17f


Y<0
Y>0
150
100
50
0
카운트
-0.01
0.00
0.01
0.02
RNA 세포질 전위 (Y)

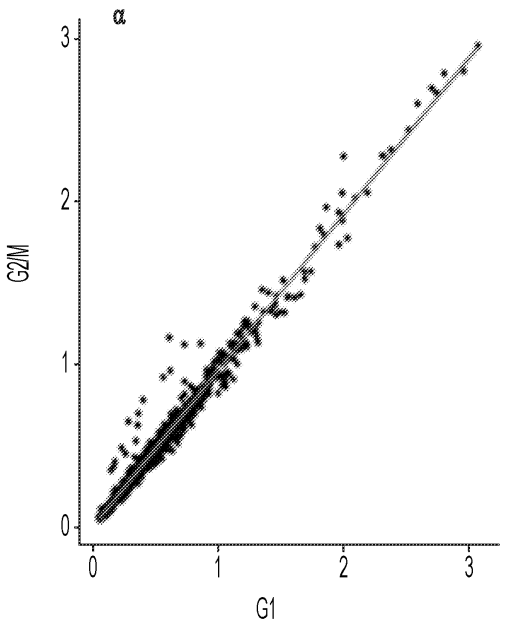
도면17g


Y<0, R2>0.5 (12개 유전자)
주석 클러스터
세포외 엑소솜
막
P 값
3.4E-5
9.4E-3
세포에 걸친 평균 DR
0.90
0.85
0.80
0.75
0.70
CANX
CLU
EGFR
TFRC
0
2
4
6
시간 진행 (h)

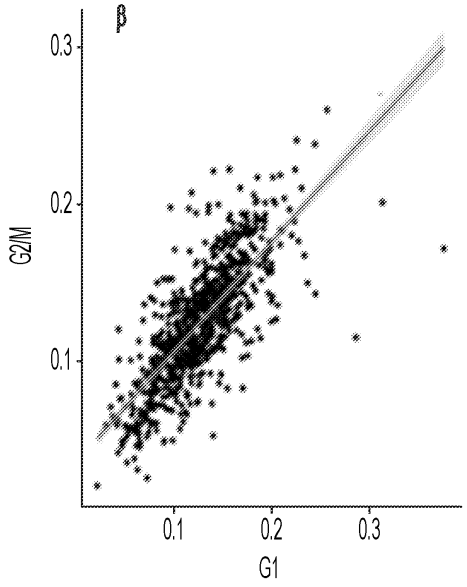
도면17h


AA
AA
Y<0

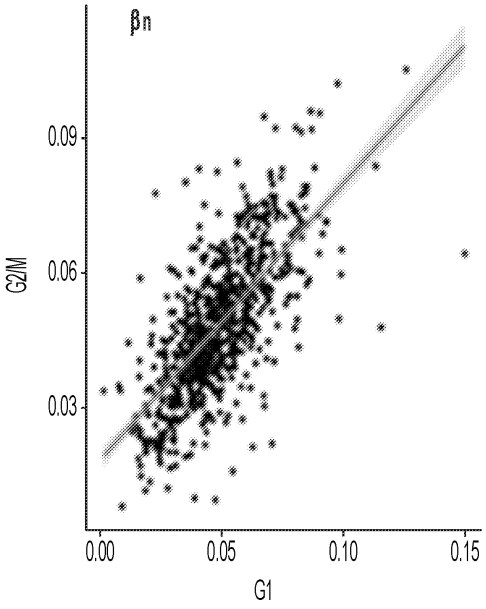
도면18a



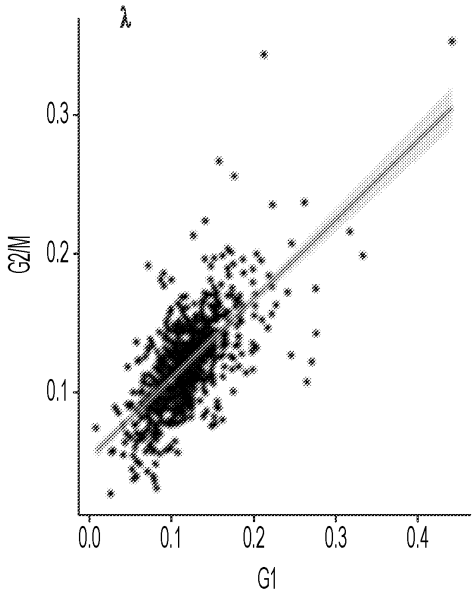
도면18b



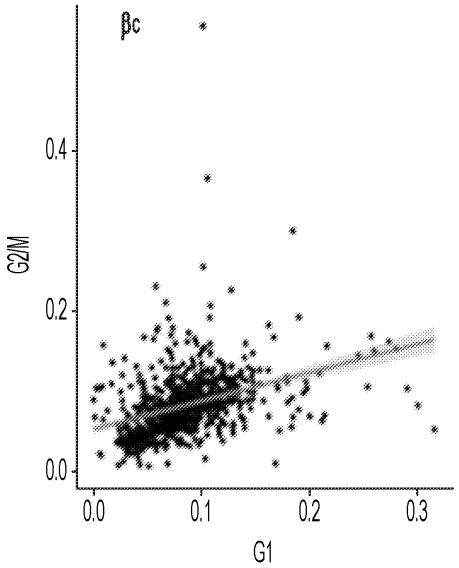
도면18c


βn
0.09
0.06
0.03
G2/M
0.00
0.05
0.10
0.15
G1

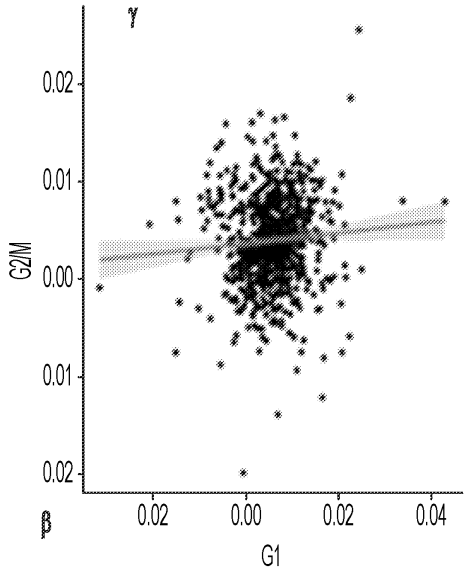
도면18d


λ
0.3
0.2
0.1
G2/M
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
G1

도면18e

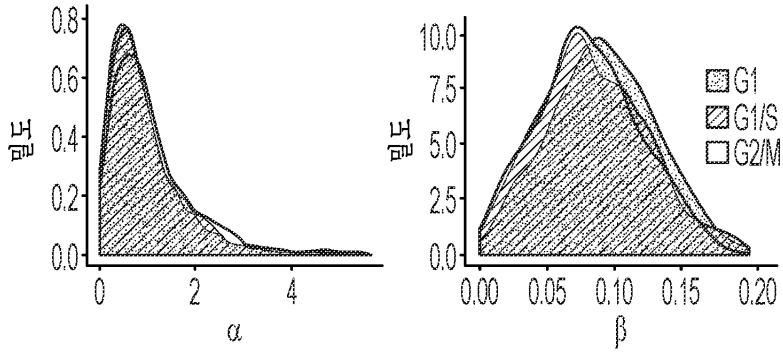

βc
0.4
0.2
0.0
G2/M
0.0
0.1
0.2
0.3
G1

도면18f


γ
0.02
0.01
0.00
0.01
0.02
G2/M
0.02
0.00
0.02
0.04
β
G1

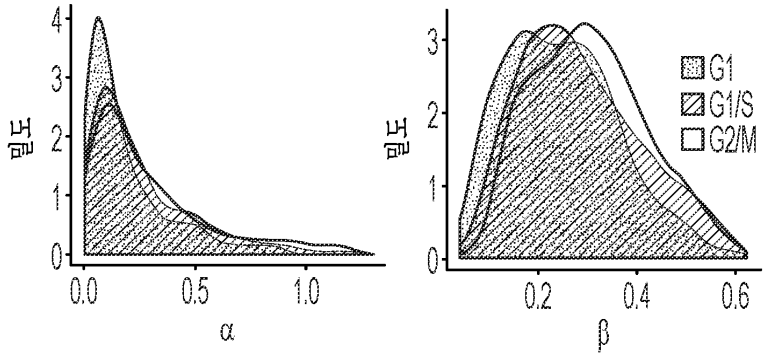
도면18g

TEMPO맵으로부터 단일-세포 RNA 카피수에 의한 추정

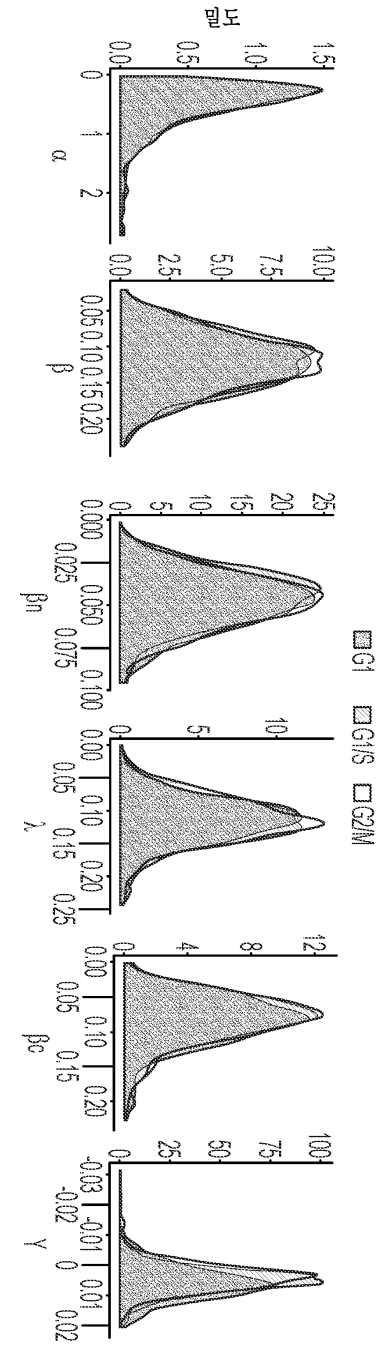


도면18h

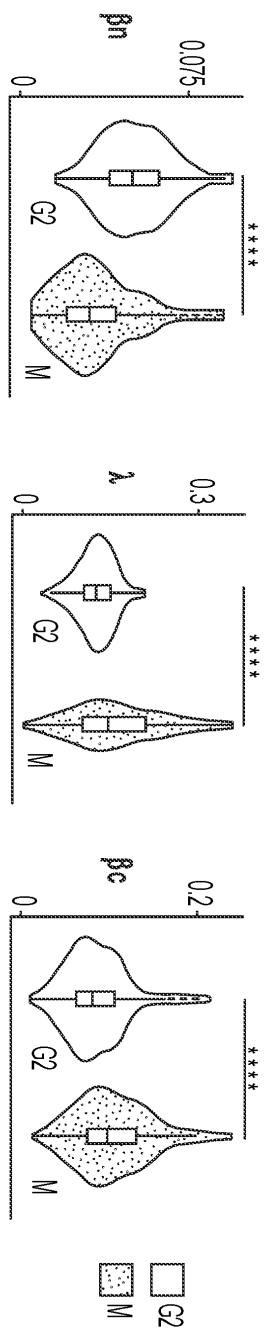
scEU-seq로부터 단일-세포 RNA 카피수에 의한 추정



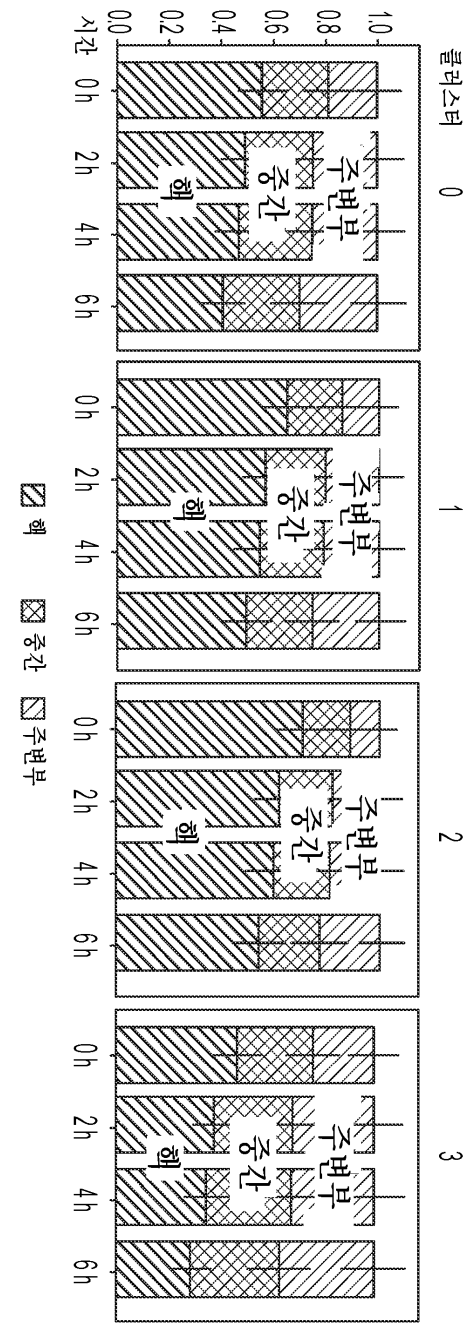
도면18i



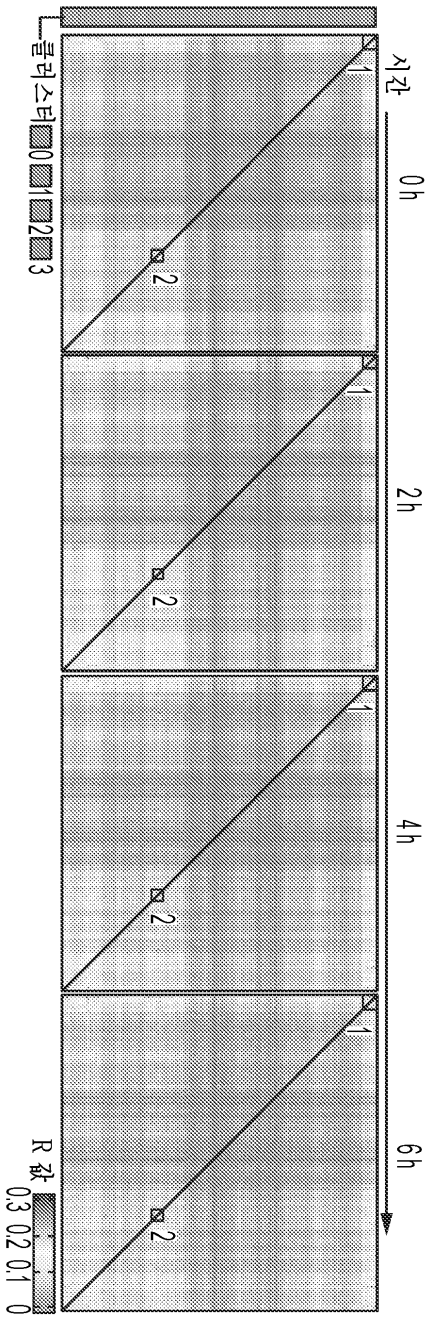
도면18j



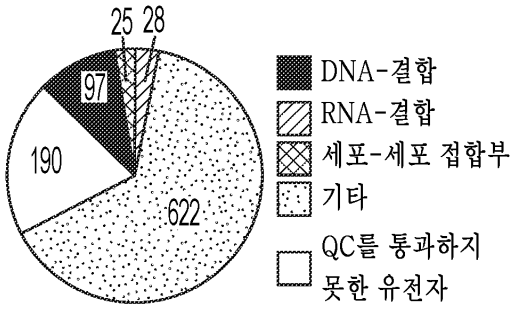
도면18k



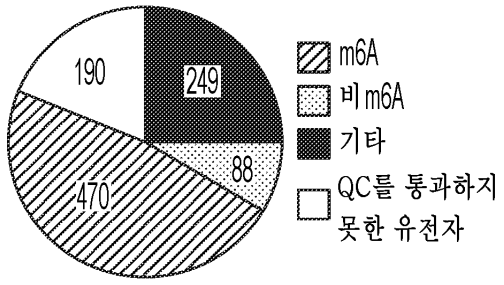
도면19a


클러스터 0 1 2 3
시간
0h
2h
4h
6h
1
2
R 값
0.3 0.2 0.1 0

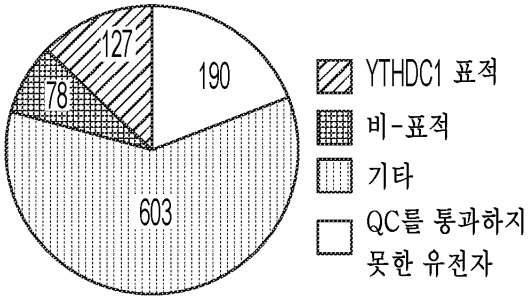
도면19b


25
28
97
190
622
DNA-결합
RNA-결합
세포-세포 접합부
기타
QC를 통과하지 못한 유전자

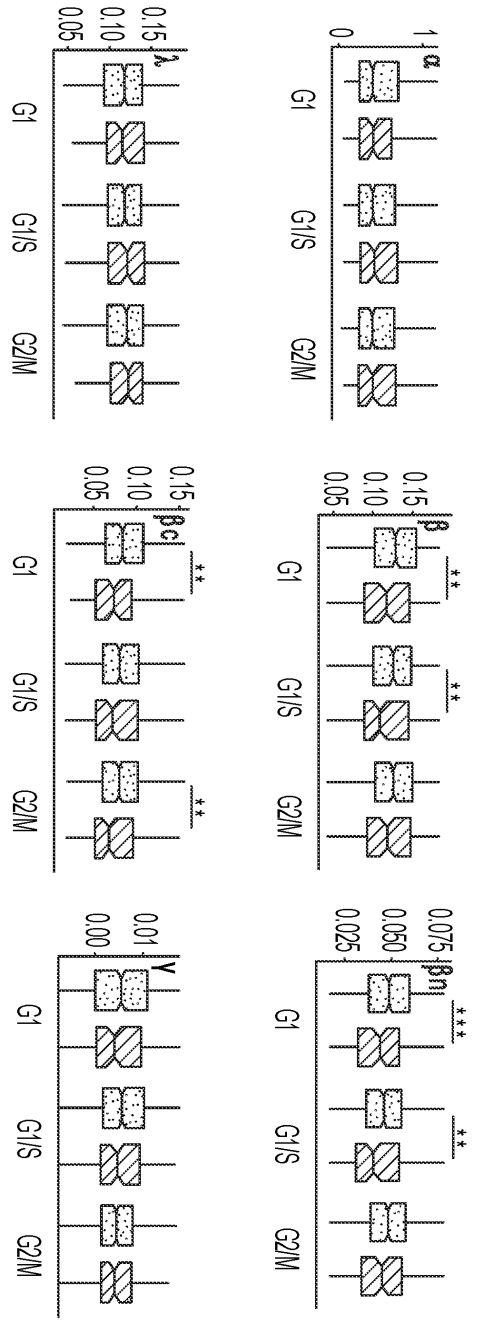
도면19c


190
249
88
470
m6A
비 m6A
기타
QC를 통과하지 못한 유전자

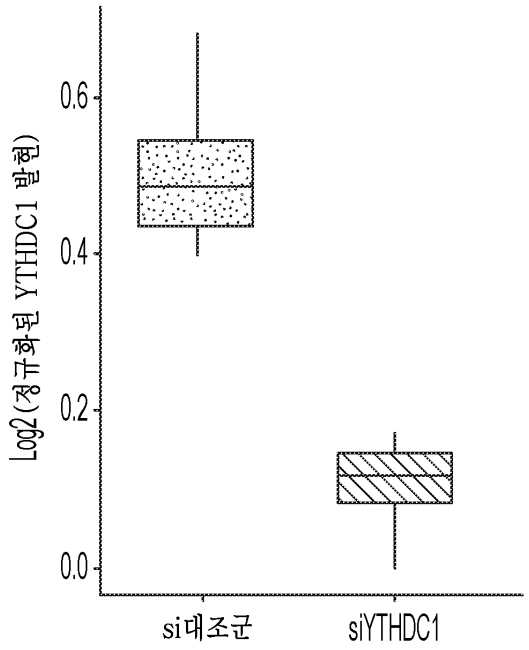
도면19d


127
190
78
603
YTHDC1 표적
비-표적
기타
QC를 통과하지 못한 유전자

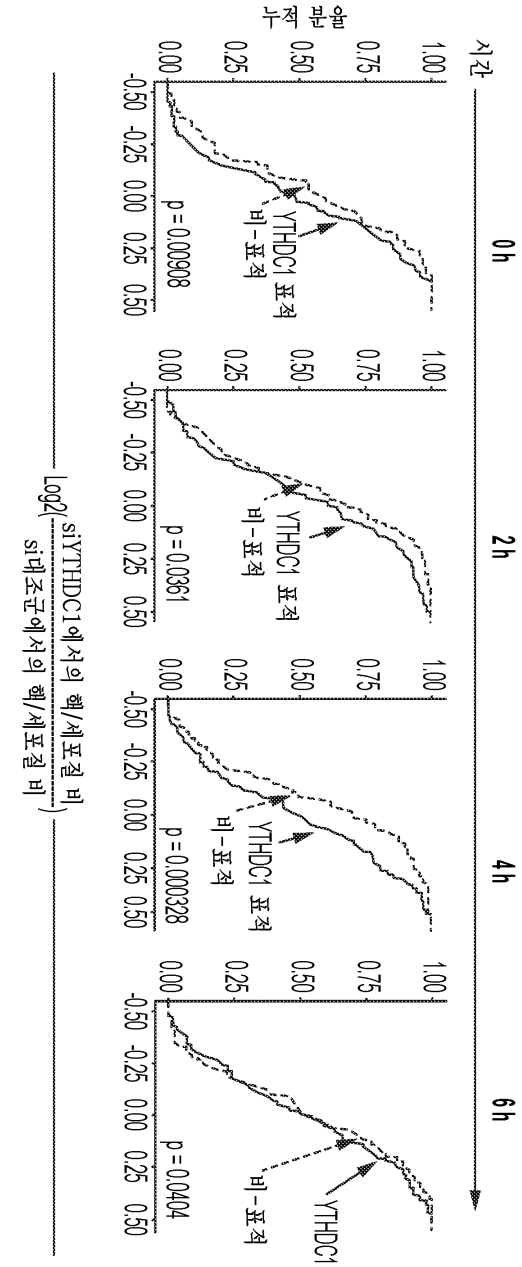
도면19e



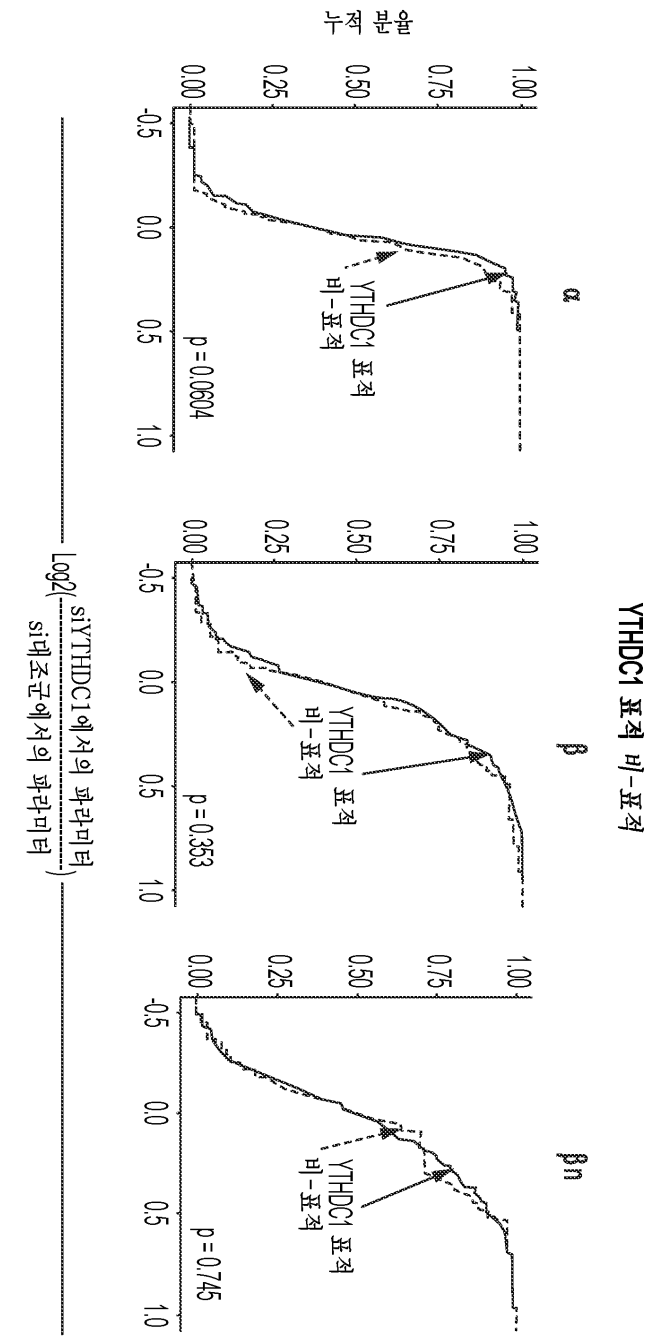
도면19f



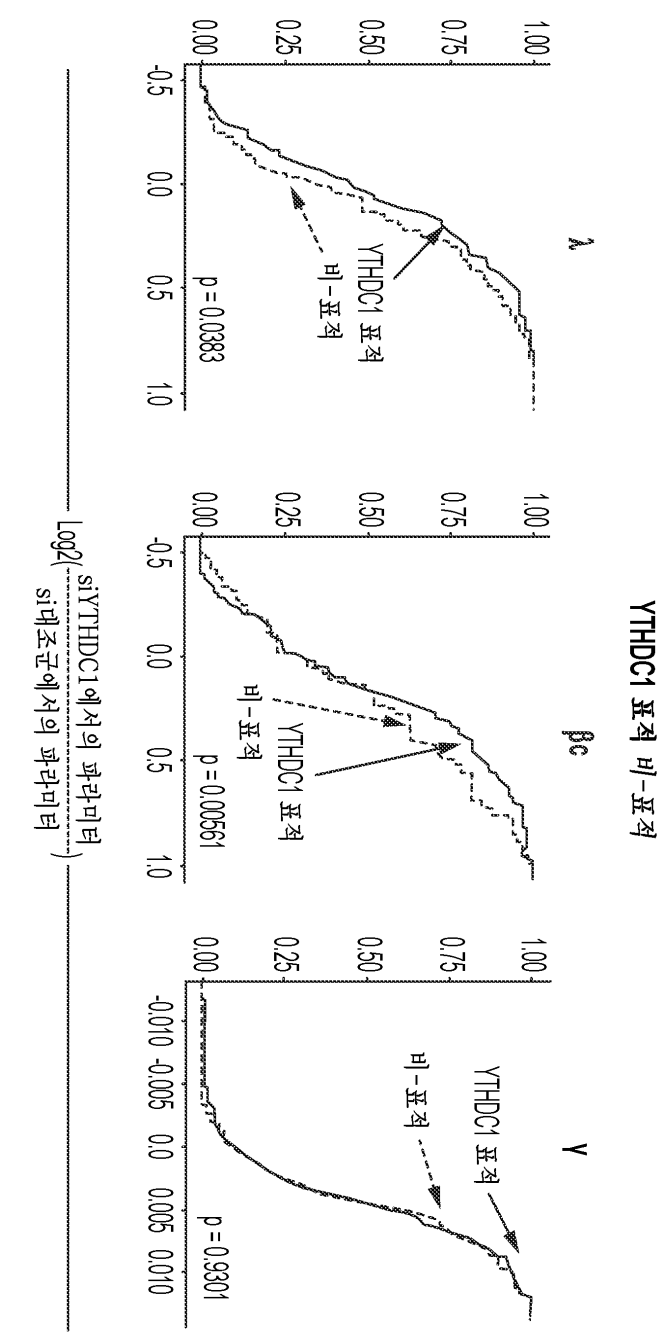
도면19g


시간
0 h
2 h
4 h
6 h
누적 분율
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
-0.50 -0.25 0.00 0.25 0.50
비-표적
YTHDC1 표적
p = 0.00908
p = 0.0361
p = 0.000328
p = 0.0404
Log2(siYTHDC1에서의 핵/세포질 비 / si대조군에서의 핵/세포질 비)

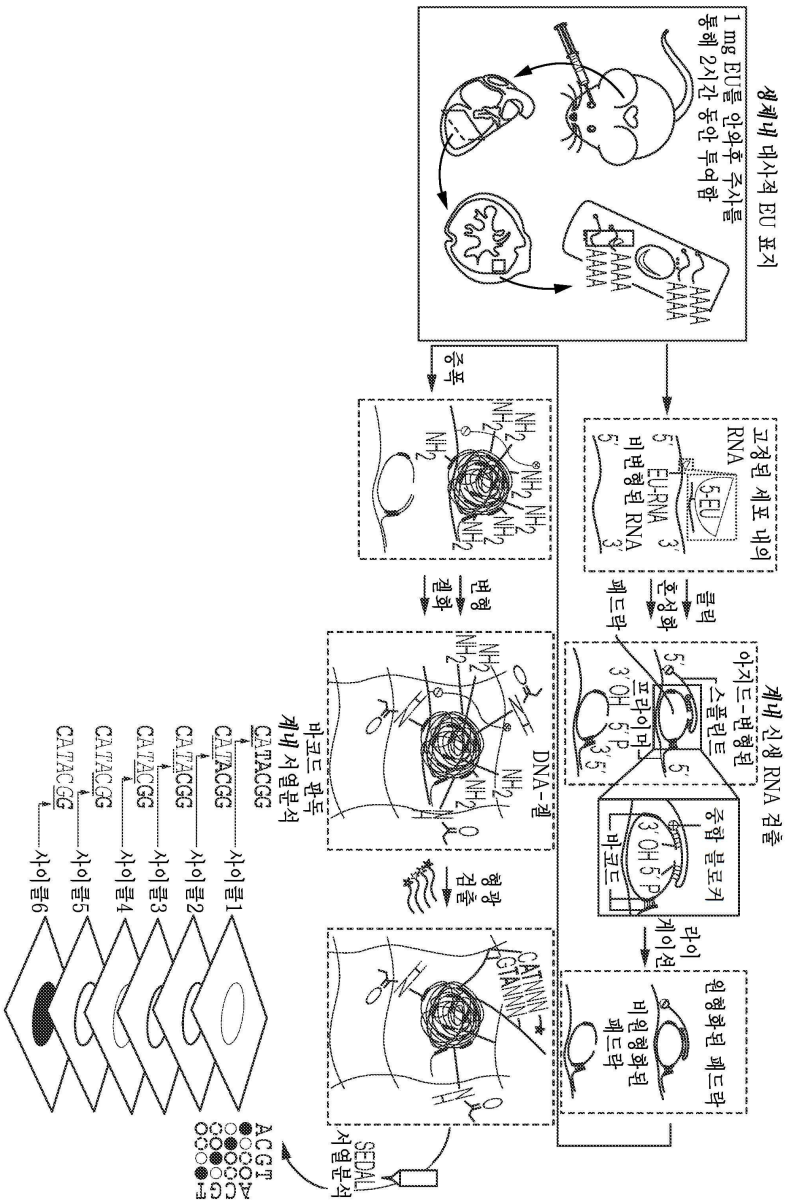
도면19ha


YTHDC1 표적 비-표적
α
β
βn
누적 분율
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
-0.5
0.0
0.5
1.0
YTHDC1 표적
비-표적
p = 0.0604
p = 0.353
p = 0.745
Log2(siYTHDC1에서의 파라미터 / si대조군에서의 파라미터)

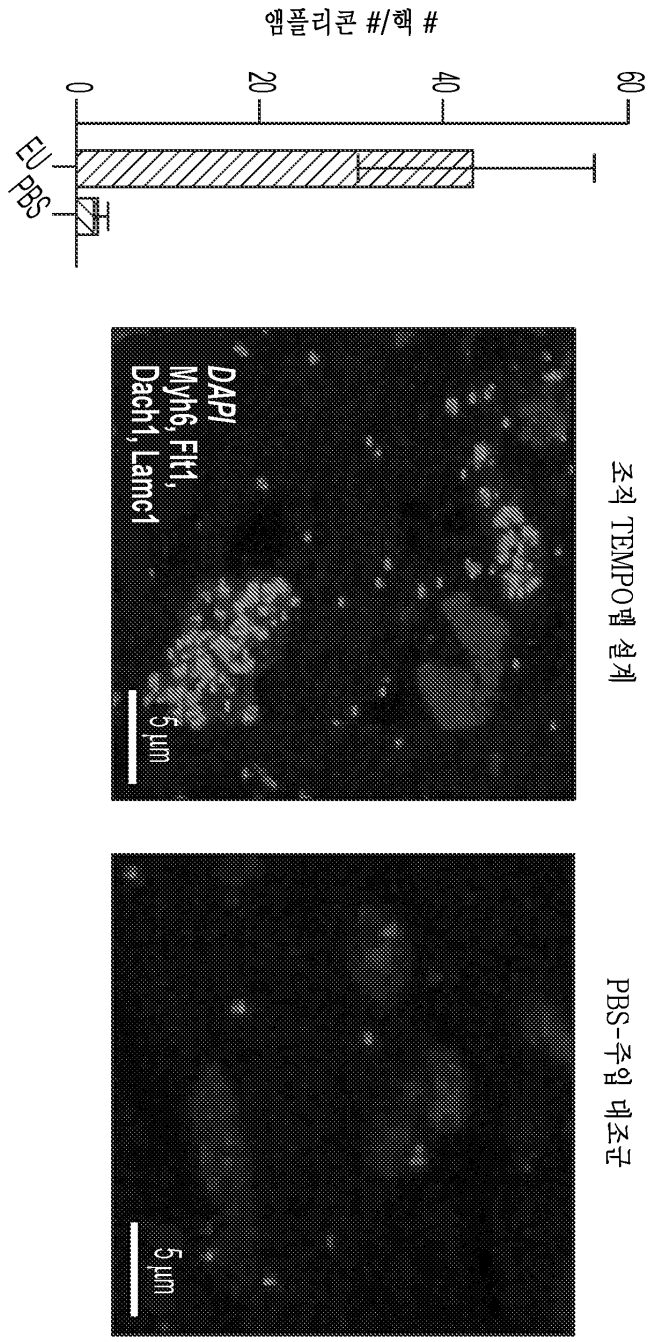
도면19hb


YTHDC1 표적 비-표적
λ
βc
γ
YTHDC1 표적
비-표적
p = 0.0383
p = 0.00561
p = 0.9301
Log2(siYTHDC1에서의 파라미터 / si대조군에서의 파라미터)

도면20a


생체내 대사적 EU 표지
1 mg EU를 안와후 주사를 통해 2시간 동안 투여함
AAAA
AAAA
고정된 세포 내의 RNA
5-EU
EU-RNA
비변형된 RNA
5'
3'
증폭
클릭 혼성화 페드락
변형 결찰
게내 신생 RNA 검출
아지드-변형된 스플린트
프라이머
3' OH
5' P
중합 블로커
바코드
라이게이션
원형화된 페드락
비원형화된 페드락
DNA-겔
형광 검출
SEDAL 서열분석
게내 서열분석
바코드 판독
CATACGG
사이클1
사이클2
사이클3
사이클4
사이클5
사이클6
A
C
G
T

도면20b


앰플리콘 #/핵 #
0
20
40
60
EU
PBS
조직 TEMPO맵 설계
DAPI
Myh6, Flt1,
Dach1, Lamc1
5 μm
PBS-주입 대조군
5 μm