

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0032021
(43) 공개일자 2024년03월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/4705 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7000754
- (22) 출원일자(국제) 2022년06월09일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년01월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2022/050923
- (87) 국제공개번호 WO 2022/256933
국제공개일자 2022년12월15일
- (30) 우선권주장
63/208,627 2021년06월09일 미국(US)

- (71) 출원인
서니브룩 리서치 인스티튜트
캐나다 온타리오주 엠4엘 3엠5 토론토 베이뷰 애비뉴 2075
더 가버닝 카운슬 오브 더 유니버시티 오브 토론토
캐나다 온타리오 엠5취 0썸6 토론토 스위트 더블 유540 5썸 플로어 108 칼리지 스트리트 씨/오 이노베이션즈 앤드 파트너십스 오피스 슈와츠 라이스만 이노베이션 캠퍼스 유니버시티 오브 토론토
- (72) 발명자
슈어만스 캐롤
캐나다 온타리오주 엠1취 3피8 스카버러 17 미노스 크레센트
맥로린 조앤
캐나다 온타리오주 엠4엘 3엑스4 토론토 156 보드워크 드라이브
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인아주

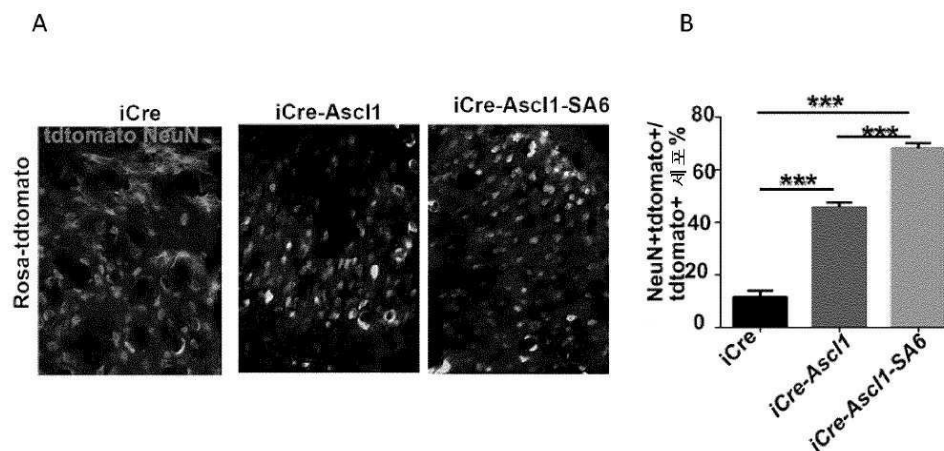
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 신경 재프로그래밍을 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본 출원은 단독으로 또는 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자에서 발견되는, HLH 도메인 내의 보존된 PKA 부위에서의 돌연변이와 함께 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대한 하나 이상의 포스포억제 부위의 돌연변이를 포함하고, 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 및 PKA에 의한 감소된 인산화를 나타내는 돌연변이체 베이직-헬릭스-루프-헬릭스(bHLH) 전사 인자를 제공한다. 또한 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산 및 암호화 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다. 치료 목적을 위한 돌연변이체 bHLH 전사 인자 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산의 사용은 저해성 환경에서도 신경아교 세포의 뉴런 계통 전환을 효율적으로 유도할 수 있고, 신경 퇴행성 질환 및 장애의 예방 또는 치료 및 CNS 손상의 치료에 유용하다. 또한 신경아교 세포의 뉴런 계통 전환을 위한, ZBTB18 전사 인자 또는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산의 용도가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

(72) 발명자

모시드 신디

캐나다 온타리오주 엠6에스 3터9 토론토 274 사우스 킹스웨이

박 은지

캐나다 온타리오주 엠2엔 7쥬7 노스 요크 1109-26 올리브 애비뉴

케타리 탈란

캐나다 온타리오주 엠2케이 1에스9 토론토 97 시테이션 드라이브

바산 락슈미

캐나다 온타리오주 엠4와이 2피3 토론토 77 헌틀리 스트리트 아파트먼트 512

파이즈 마얌

캐나다 온타리오주 엠6에이치 3비8 토론토 231 헤이브룩 스트리트

엔바 톰

캐나다 온타리오주 엠4제이 9제이1 쏘넬 27 시슬리 크레센트

명세서

청구범위

청구항 1

돌연변이체 베이직-헬릭스-루프-헬릭스(basic-helix-loop-helix: bHLH) 전사 인자로서,

상기 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자에서 발견되는 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대한 하나 이상의 포스포억셉터 부위의 돌연변이를 포함하고, 상기 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자보다 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 의한 인산화로부터 감소된 기능 저해를 나타내는, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자에서 발견되는 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대해서 2개 이상 또는 3개 이상 또는 4개 이상의 포스포억셉터의 돌연변이를 포함하는, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자에서 발견되는 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대해서 포스포억셉터 부위 모두의 돌연변이를 포함하는, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대한 포스포억셉터 부위의 각각의 돌연변이는 상기 포스포억셉터 부위 내의 세린 또는 트레오닌의 알라닌, 글리신, 발린, 류신, 아이소류신, D-세린, D-트레오닌, D-알라닌, D-글리신, D-발린, D-류신 및 D-아이소류신으로 이루어진 군으로부터 선택된 또 다른 아미노산으로의 치환을 포함하는, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 *Neurog2*, *Asc11* 및 *Neurod4*로 이루어진 군으로부터 선택된 전신경(proneural) bHLH 전사 인자의 돌연변이체인, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 6

제5항에 있어서,

- a) 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하거나;
- b) 서열번호 13 또는 서열번호 14와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하거나; 또는
- c) 서열번호 19 또는 서열번호 20과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 인간 *Asc11*-SA5, 마우스 *Asc11*-SA6, 인간 *Asc11*-SA6, 마우스 *Asc11*-SA7, 인간 *Neurod4*-SA4TA6, *Neurod4*-SA3TA4, 인간 *Neurod4*-SA5TA6, 마우스 *Neurod4*-SA4TA4, 인간 *Neurog2*-SA8TA1, 마우스 *Neurog2*-SA9TA1, 인간 *Neurog2*-SA8TA2, 마우스 *Neurog2*-SA9TA2 또는 마우스 *Neurog2*-SA9인, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 *Neurod1* 신경 분화 전사 인자의 돌연변이체인, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 9

제8항에 있어서, 서열번호 7 또는 서열번호 8과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 인간 *Neurod1*-SA6, 마우스 *Neurod1*-SA6, *Neurod1*-SA7, 또는 마우스 *Neurod1*-SA7인, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자의 헬릭스-루프-헬릭스 도메인 내의 보존된 단백질 키나제 A(PKA) 부위에 돌연변이를 추가로 포함하는, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 보존된 PKA 부위의 상기 돌연변이는 포스포억제제 부위 내의 세린 또는 트레오닌의 알라닌, 글리신, 발린, 류신, 아이소류신, D-세린, D-트레오닌, D-알라닌, D-글리신, D-발린, D-류신 및 D-아이소류신으로 이루어진 군으로부터 선택된 또 다른 아미노산으로의 치환을 포함하는, 돌연변이체 bHLH 전사 인자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 돌연변이체 bHLH를 암호화하는 핵산.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 돌연변이체 bHLH 전사 인자 암호 서열은 신경아교 세포-선택적 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 핵산.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 신경아교 세포-선택적 프로모터는 신경아교 섬유 산성 단백질(glial fibrillary acidic protein: GFAP) 프로모터인, 핵산.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는 벡터로서, 상기 벡터는 비-바이러스 벡터 또는 바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 17

제16항에 있어서, 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터, 레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV2/5 벡터, AAV2/8 벡터 또는 AAV 9 벡터인, 벡터.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산은 신경아교 세포-선택적 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 벡터.

청구항 20

제16항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 제2 전사 인자를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는, 벡터.

청구항 21

제16항 내지 제20항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는, 바이러스 입자.

청구항 22

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 핵산 또는 제16항 내지 제20항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제21항의 바이러스 입자를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 23

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 돌연변이체 bHLH 전사 인자, 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 핵산 또는 제16항 내지 제20항 중 어느 한 항의 벡터 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 조성물은 직접 두개내 투여, 두개내 주사, 뇌실내 주사, 수조내 주사, 척수강내 주사, 정맥내 주사, 복강내 주사, 동맥내, 나노입자를 통한 전달 및/또는 집속 초음파를 사용한 투여를 위하여 제형화되는, 약제학적 조성물.

청구항 25

신경아교 세포의 뉴런 형질전환(neuronal transformation)을 필요로 하는 대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환을 위한, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 돌연변이체 bHLH 전사 인자, 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 핵산, 제16항 내지 제20항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제23항 또는 제24항의 약제학적 조성물의 용도.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 대상체에서 신경퇴행성 질환 또는 장애의 예방 또는 치료, 또는 CNS 또는 뇌 손상, 예컨대, 뇌졸중의 치료를 위한, 용도.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기신경퇴행성 질환 또는 장애는 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis: ALS), 알츠하이머병(Alzheimer's disease: AD), 파킨슨병(Parkinson's disease: PD), 다운 증후군(down's syndrome), 권투 선수 치매(dementia pugilistica), 다계통 위축증(multiple system atrophy), 전두엽 측두엽 치매(frontal temporal dementia), 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy), 프리온 질환(prion disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 운동 뉴런 질환(motor neuron disease) 및 루이소체병(Lewy body disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도.

청구항 28

대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환 방법으로서,

상기 대상체에게 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 돌연변이체 bHLH 전사 인자, 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 핵산, 제16항 내지 제20항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제23항 또는 제24항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 29

대상체에서 신경퇴행성 질환 또는 장애를 예방 또는 치료하는 방법 또는 CNS 또는 뇌 손상을 치료하는 방법으로서,

상기 대상체에게 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 돌연변이체 bHLH 전사 인자, 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 핵산, 제16항 내지 제20항 중 어느 한 항의 벡터 또는 제23항 또는 제24항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 30

신경아교 세포의 뉴런 형질전환을 필요로 하는 대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환을 위한, ZBTB18 전사 인자 또는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산의 용도.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 ZBTB18 전사 인자는 서열번호 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하는, 용도.

청구항 32

대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환 방법으로서,

상기 대상체에게 ZBTB18 전사 인자 또는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

백터로서,

서열번호 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54 중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산을 포함하되, 상기 백터는 비-바이러스 백터 또는 바이러스 백터인, 백터.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 미국 출원 제63/208,627호(출원일: 2021년 6월 9일)에 대한 우선권을 주장하며, 이의 내용은 이의 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 출원은 신경 재프로그래밍(neuronal reprogramming) 분야에 관한 것이다. 보다 특별하게는, 본 출원은 중추 신경계 질환, 장애 또는 부상의 치료를 위한 신경 재프로그래밍에 사용하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

도입부

[0006]

척추동물 중추신경계(CNS)는 기능적 뇌 영역을 구성하고 이를 복잡한 방식으로 연결하여 고차 인지 기능 및 운동 및 감각 처리를 가능하게 하는 다양한 배열의 뉴런 및 큰신경아교(성상교세포 및 희소돌기신경아교세포) 세포 유형으로 구성된다. 베이직-헬릭스-루프-헬릭스(basic-helix-loop-helix: bHLH) 패밀리의 전사 인자는 배아 발달 동안 신경 세포 운명 지정 및 분화의 필수 조절자이다. 특히, 전신경 및 신경 분화 bHLH 유전자는 배아 뇌의 신경 분화를 촉진하고 일부 세포 상황에서는 희소돌기신경아교세포의 운명 지정을 유도할 수도 있다.

[0007]

전신경 활성을 갖는 뉴런-특이적 bHLH 유전자는 *Neurog1*, *Neurog2*, *Ascl1*, *Neurod4*, *Atoh1* 및 *Atoh7*를 포함한다. 이들 bHLH 유전자는 전사 캐스케이드에서 작용하여 다른 bHLH 유전자를 작용하게 하는데, 이는 후기 발달 단계에서 신경 분화를 제어하는 기능을 한다. 특히, 몇몇 bHLH 유전자는 발현되고 수입된(committed) 뉴런/신경아교 전구체 또는 유사분열 후 뉴런 및 신경아교 세포에서 뉴런 계통의 발달에서 추후에 기능한다. 이들 중에는 *NeuroD*(*Neurod1*, *Neurod2/Ndrf*, *Neurod6/Math2*), *Nsc1*(*Nhlh1/Nsc11*, *Nhlh2/Nsc12*) 및 *Olig*(*Olig1*, *Olig2*, *Olig3*, *Bhlhe22*) 패밀리의 구성원을 비롯한, 뉴런 및 신경아교 분화 및 성숙에서 중요한 역할을 하는 bHLH가 있다. 그러나, bHLH 유전자는 모든 세포 상황에서 활성화되지 않으며 환경 신호에 의해 저해될 수 있다.

[0008]

최근에 bHLH 신경 분화(*Neurod1*) 및 전신경(*Neurog2*, *Ascl1*) 유전자는 시험관내 및 생체내에서 성상교세포의 뉴런으로의 전환을 촉진하는 데 사용되었다. 뇌 손상 및 헌팅턴병과 같은 신경학적 병태의 치료를 위해 이러한 bHLH 신경 분화 및 전신경 유전자를 발현하는 발현 백터를 사용한 뉴런 전환의 유전자 요법 방법이 제안되었다(예를 들어 미국 특허 공개 제2019/0117797, 제2020/0405801호 및 제2021/0032300호 참조). 연구자들은 또한 *Neurod1* 재프로그래밍이 뇌졸중 모델에서 기능적 회복을 제공할 수 있음을 밝혀내었다(예를 들어, 문헌 [Livingston et al., 2020, *BioRx*, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.02.929091>] 참조). 이러한 방법은

부상 또는 질환 부위에서 건강한 뉴런의 생성을 목표로 하여 병태를 치료하기 위한 것이다.

[0009] 신경 프로그래밍/재프로그래밍은 치료를 위한 유망한 접근법이지만, 현재까지 재프로그래밍의 효율성은 종종 낮고 보고된 전환율은 상이한 군에 따라서 매우 다양하다. 신경발생(neurogenesis)을 촉진하는 이들 bHLH 유전자 각각의 능력은 환경에 따라 크게 좌우되고; 뉴런 전환 효율은 존재하는 저해 기전에 따라 상이한 발달 시기, 상이한 뇌 영역, 병이 걸리거나 손상된 뇌에서 다양하다.

[0010] 부상을 포함한 신경학적 질환 및 장애에 대한 효과적인 치료에 대한 필요성이 여전히 남아 있다.

[0011] 상기 정보는 출원인이 본 발명과 관련될 수 있다고 믿는 알려진 정보를 만들기 위한 목적으로 제공된다. 전술한 정보 중 어느 것도 본 발명에 대한 선행 기술을 구성한다는 것을 반드시 인정하려는 의도는 없으며 그렇게 해석되어서도 안 된다.

발명의 내용

[0012] 본 출원의 목적은 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료 또는 예방, 또는 신경학적(예를 들어, 뇌) 손상의 치료를 위한 조성물 및 신경 재프로그래밍에서의 이의 사용 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 출원의 일 양상에 따르면, 돌연변이체 베이직-헬릭스-루프-헬릭스(bHLH) 전사 인자가 제공되며, 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자에서 발견되는 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대한 하나 이상의 포스포억셉터 부위의 돌연변이를 포함하고, 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자보다 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 의한 인산화로부터 감소된 기능 저해를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체는 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자에서 발견되는 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대해서 2개 이상 또는 3개 이상 또는 4개 이상의 포스포억셉터의 돌연변이를 포함한다. 대안적으로, 상응하는 야생형 bHLH 전사 인자에서 발견되는 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대한 포스포억셉터 부위 모두가 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, 진화적으로 보존되고 저해성 온-오프 스위치인 단백질 키나제 A(PKA) 인산화의 표적인 보존된 HLH 도메인 내의 추가적인 보존된 세린 또는 트레오닌 잔기가 또한 돌연변이된다.

[0014] 일부 실시형태에 따르면, 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 예를 들어, 대상체에게 투여하기에 적합한 단리된 및/또는 정제된 형태이다.

[0015] 일부 실시형태에 따르면, 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 및/또는 PKA에 대한 포스포억셉터 부위의 각각의 돌연변이는 포스포억셉터 부위 내의 세린 또는 트레오닌의 알라닌, 글리신, 발린, 류신, 아이소류신, D-세린, D-트레오닌, D-알라닌, D-글리신, D-발린, D-류신 및 D-아이소류신으로 이루어진 군으로부터 선택된 또 다른 아미노산으로 치환을 포함한다.

[0016] 일 실시형태에 따르면, 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 *Neurog2*, *Asc11* 및 *Neurod4*로 이루어진 군으로부터 선택된 전신경 bHLH 전사 인자의 돌연변이체인데, 이것은 선택적으로 (a) 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하거나; (b) 서열번호 13 또는 서열번호 14와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하거나; 또는 (c) 서열번호 19 또는 서열번호 20과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하다. 이러한 돌연변이체 bHLH 전사 인자의 예는 인간 *ASCL1*-SA5, 마우스 *Asc11*-SA6, 인간 *ASCL1*-SA6(선택적으로 추가적인 PKA 부위 돌연변이를 가짐), 마우스 *Asc11*-SA7(선택적으로 추가적인 PKA 부위 돌연변이를 가짐), 인간 *NEUROD4*-SA4TA6, 마우스 *Neurod4*-SA3TA4, 인간 *NEUROD4*-SA5TA6(선택적으로 추가적인 PKA 부위 돌연변이를 가짐), 마우스 *Neurod4*-SA4TA4(선택적으로 추가적인 PKA 부위 돌연변이를 가짐), 인간 *NEUROG2*-SA8TA1, 마우스 *Neurog2*-SA9, 인간 *NEUROG2*-SA8TA2(선택적으로 추가적인 PKA 부위 돌연변이를 가짐) 및 마우스 *Neurog2*-SA9TA1(선택적으로 추가적인 PKA 부위 돌연변이를 가짐)이다.

[0017] 또 다른 실시형태에 따르면, 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 *Neurod1* 신경 분화 전사 인자의 돌연변이체이고, 이것은 선택적으로, 서열번호 7 또는 서열번호 8과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하다. 이러한 돌연변이체 bHLH 전사 인자의 예는 인간 *NEUROD1*-SA6, 마우스 *Neurod1*-SA6, 인간 *NEUROD1*-SA7(선택적으로 추가적인 PKA 부위 돌연변이를 가짐) 및 마우스 *Neurod1*-SA7(선택적으로 추가적인 PKA 부위 돌연변이를 가짐)이다.

[0018] 본 출원의 또 다른 양상에 따르면, 하나 이상의 조절 요소와 작동 가능하게 연관될 수 있는, 본 명세서에 기재된 바와 같은 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산이 제공된다. 핵산은 바이러스(예를 들어, AAV, 렌티바이러스 또는 레트로바이러스 벡터) 또는 비바이러스 벡터에 존재할 수 있다.

[0019] 또 다른 양태에 따르면, 본 명세서에 기재된 바와 같은 돌연변이체 bHLH 전사 인자 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인

자를 암호화하는 핵산 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 조성물은 선택적으로 직접 두개내 투여, 두개내 주사, 뇌실내 주사, 수조내 주사, 척수강내 주사, 정맥내 주사, 복강내 주사, 나노입자를 통한 전달, 세포외 소포를 통한 전달 및/또는 집속 초음파를 사용한 투여를 위하여 제형화된다.

[0020] 또 다른 양상에 따르면, 신경아교 세포의 뉴런 형질전환(neuronal transformation)을 필요로 하는 대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환을 위한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 돌연변이체 bHLH 전사 인자 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산의 용도가 제공된다. 이러한 용도는 대상체에서 신경퇴행성 질환 또는 장애의 예방 또는 치료 또는 뇌 손상, 예컨대, 뇌졸중의 치료를 위한 것일 수 있다.

[0021] 또 다른 양상에 따르면, 대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환 방법이 제공되며, 상기 방법은 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 돌연변이체 bHLH 전사 인자 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인자 또는 암호화 핵산을 함유하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 이 방법은 대상체에서 신경퇴행성 질환 또는 장애의 예방 또는 치료 또는 CNS 손상, 예컨대, 뇌 손상의 치료에 유용하다.

[0022] 일부 실시형태에 따르면, 신경퇴행성 질환 또는 장애는 근위축성 측색 경화증(ALS), 알츠하이머병(AD), 파킨슨 병(PD), 다운 증후군, 권투 선수 치매, 다계통 위축증, 전두엽 측두엽 치매, 진행성 핵상 마비, 프리온 질환, 헌팅턴병, 운동 뉴런 질환 및 루이소체병(Lewy body disease)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0023] 또 다른 양상에 따르면, 신경아교 세포의 뉴런 형질전환을 필요로 하는 대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환을 위한, ZBTB18 전사 인자 또는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산의 용도가 제공된다. 일부 실시형태에서, ZBTB18 전사 인자는 서열번호 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54 중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0024] 또 다른 양상에 따르면, 대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환 방법이 제공되며, 상기 방법은 대상체에게 ZBTB18 전사 인자 또는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산을 투여하는 단계를 포함한다.

[0025] 또 다른 양상에 따르면, 서열번호 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54 중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터가 제공되며, 벡터는 비-바이러스 벡터 또는 바이러스 벡터이다.

[0026] 또 다른 양태에 따르면, 본 명세서에 기재된 바와 같은 ZBTB18 전사 인자 또는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 조성물은 선택적으로 직접 두개내 투여, 두개내 주사, 뇌실내 주사, 수조내 주사, 척수강내 주사, 정맥내 주사, 복강내 주사, 나노입자를 통한 전달, 세포외 소포를 통한 전달 및/또는 집속 초음파를 사용한 투여를 위하여 제형화된다.

도면의 간단한 설명

[0027] 본 명세서에 기재된 바와 같은 출원뿐만 아니라 이의 다른 양상 및 추가 특징을 더 잘 이해하기 위해 첨부 도면과 함께 사용되는 다음 설명을 참조한다.

도 1: *Asc11-SA6*의 발현이 피질 성상교세포의 뉴런으로의 전환을 촉진하는 데 *Asc11*보다 더 효율적임을 나타낸, tdtomato 및 NeuN 항체로 면역염색된 *Asc11-t2a-iCre* 및 *Asc11-SA6-t2a-iCre* 벡터로 처리되고 정량화된 (B) 마우스로부터의 뇌 절편의 영상 (A)(막대는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. p-값: ns - 유의하지 않음, <0.05 *, <0.01 **, <0.001 ***).

도 2: *Asc11-SA6* 발현에 의한 뉴런 계통 전환의 효율적인 유도를 입증한, 16주령 hSOD^{G93A} 트랜스제닉 ALS 마우스에게 AAV5-GFAP-iCre(대조군) 및 AAV5-GFAP-*Asc11-SA6-t2a-iCre*를 정위 주사한 후 면역염색 및 정량화된 발현 결과(막대는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. p-값: ns - 유의하지 않음, <0.05 *, <0.01 **, <0.001 ***).

도 3: 대조군 주입된 동물에 비해 *Asc11-SA6*에서 더 양호한 체중 유지를 나타낸 AAV5-GFAP-iCre(대조군) 및 AAV5-GFAP-*Asc11-SA6-t2a-iCre*로 처리한 후 마우스로부터 취한 체중 측정의 그래프 표현(Mann-Whitney 검정, $P=0.0238$), 22주에 유의함(막대는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. p-값: ns - 유의하지 않음, <0.05 *, <0.01 **, <0.001 ***).

도 4: 대조군 주입된 동물에 비해 *Asc11-SA6*에서 증가된 뉴런 밀도에 대한 경향을 나타낸 AAV5-GFAP-iCre(대조군) 및 AAV5-GFAP-*Asc11-SA6-t2a-iCre*로 처리한 후 마우스로부터 취한 뉴런 밀도 측정의 그래프 표현(막대는 평

균 +/- SEM을 나타낸다. p-값: ns - 유의하지 않음, <0.05 *, <0.01 **, <0.001 ***).

도 5: 대조군 주입에 비해 Asc11-SA6로의 처리 후 더 긴 생존 동물에서의 개선된 건강(점수는 질환 진행에 따라 더 커짐)을 입증한 ALSTDI-Neuroscore에 의해 캡처된 신경학적 점수(NS) 측정의 그래프 표현(막대는 평균 +/- SEM을 나타낸다. p-값: ns - 유의하지 않음, <0.05 *, <0.01 **, <0.001 ***).

도 6: 20주에 유의성을 나타낸 대조군 주입에 비해 Asc11-SA6로 처리된 동물에서 개선된 운동 행동을 입증한 로타로드 결과의 그래프 표현(Mann-Whitney 검정, P=0.0952; 막대는 평균 +/- SEM을 나타낸다. p-값: ns - 유의하지 않음, <0.05 *, <0.01 **, <0.001 ***).

도 7: Aβ 플라크 및 타우 과인산화의 특징규명. (a) 6F3D로 표지된 뇌혈관 및 실질 플라크의 대표적인 현미경 사진. (b) 타우의 다양한 인산화 부위가 비-트랜스제닉(nTg) 대조군에 비해서 TgF344-AD 래트에서 수준이 증가했음을 나타낸 대표적인 면역 블롯 (c) TgF344 AD와 nTg 래트 사이에서 굴파기(burrowing) 및 반스 미로 작업의 상당한 결함이 검출되었다. 막대는 평균 + SEM을 나타낸다. *p < 0.05.

도 8: 12개월령 TgF344 AD 래트 및 이들의 nTg 한배새끼의 해마에서 NeuN 면역조직화학 염색의 정성 분석, nTg 한배새끼와 비교하여 TgF344 AD 래트에서 NeuN+ 뉴런 또는 시냅스 마커의 수에서 차이가 검출되지 않음.

도 9: TgF344 AD 래트에서의 GABA성 뉴런 결손. 웨스턴 블롯(Ai)의 분석은 GAD65/GAD2(Aii)가 증가하고 GAD67/GAD1(Aiii) 단백질 수준은 변화가 없음을 나타내었다. 대조적으로, 세포 수(Bi)는 SST 또는 NPY를 발현하는 GAD67+ 세포의 손실을 입증하였다. *p<0.05 및 막대는 평균±SEM이다.

도 10: 웨스턴 블롯(Ai)의 분석은 TgF344 AD를 nTg 래트를 비교할 때 α-1(Aii) GABA_A 수용체 소단위가 아닌 α-5(Aiii) 및 δ(Aiv)의 증가를 입증하였다. 막대는 평균 ± SEM이다. * p<0.05.

도 11: nTg 래트에서 HPC로부터의 원시(검은색) 및 필터링된(변조 지수의 하단의 세타, 변조 지수의 상단의 높은-감마) 기록의 대표적인 트레이스(A). HPC에서 nTg(좌측) 및 TgAD(우측) 래트의 평균 공동 변조 맵. 고-감마 변조 지수에 대한 세타는 nTg 코호트에서의 것에 비해 TgAD의 HPC에서 78.9 +/- 0.8%, p = 0.05 감소하였다(B). 2개월령에서 nTg와 TgAD 래트 사이의 변조 지수 또는 공동 변조 맵에서는 차이가 없다.

도 12: 12개월령 TgF344 AD 래트 해마의 AAV2/8-Asc11-mCherry 형질도입은 GFAP 면역반응성(밝은 회색)과 mCherry 발현(진한 회색)의 공동국재화에 의해 예시된다. 모든 감염된 세포는 반응성 정상세포 형태를 상실하였다.

도 13: 반응성 정상교세포의 뉴런으로의 전환분화(transdifferentiation)는 해마문 내에서 GFAP+mCherry+ 세포의 존재 없이 NeuN+mCherry+ 세포의 존재에 의해 확인되었다. 패널 A는 대조군 벡터인 AAV-mCherry 주입 반구이고, 패널 B는 AAV-Asc11-mCherry 주입 반구이고, 패널 C는 AAV-Asc11-mCherry 반구의 배율이다. 스케일 바 = 250μm(A 및 B), 100μm(C).

도 14: 새로운 뉴런의 GABA성 개재뉴런으로의 분화는 해마문에서의 GAD67+ mCherry+ 뉴런의 존재에 의해 확인되었다. Tg 및 nTg 대상체의 해마에서 두개내 자극 후(검은색 화살표) nTg 래트는 형질주입된 mCherry와 Asc11-mCherry 형질주입된 해마 사이에 대등한 반응을 나타내었다(A). 반면, TgF344 AD 래트는 mCherry 형질주입된 것보다 Asc11-mCherry 해마에서 더 큰 반응을 나타내었다(B). 이러한 결과는 새로운 뉴런의 형질도입 후 개선된 뉴런 네트워크 기능을 시사한다. 스케일 바= 100μm

도 15: Asc11, Asc11-SA6 및 Neurod1은 동측 반구와 비교하여 해마문에서 NeuN+ 뉴런의 수를 효과적으로 증가시킨다.

도 16: Asc11-SA6을 사용한 직접 계통 재프로그래밍은 GFAP+ 세포의 감소를 초래한다. (A) 해마문의 GFAP+ 세포의 각각의 면역형광 영상(i: 10×, ii 내지 vi: 20×). (B) mm²당 GFAP+ 세포의 정량화(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 시험). (C) 주입된 반구와 미경험 래트 사이의 해마문에서의 GFAP+ 세포의 배수 변화(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정).

도 17: 반응성 정상교세포는 감염되지 않은 반구(좌측 패널)와 비교하여 Asc11-SA6 감염된 문(우측 패널)에서 감소된다. 반응성 정상교세포는 비반응성 세포와의 차이를 설명하기 위해 원으로 표시된다. 스케일 바 = 100μm

도 18: Asc11-SA6은 생체내 해마문에서 플라크 커버리지의 상당한 감소를 유도한다. (A) 미경험 및 처리된 TgF344 AD 래트에서 항-MOAB2 항체를 사용한 면역형광 영상(20x). (B) 전체 면적의 백분율로서의, 플라크 커버

리지의 정량 분석(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정). (C) 치료된 래트와 미경험 래트의 주입된 반구 사이의 플라크 커버리지의 배수 변화(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정).

도 19: *Ascl1* 및 *Ascl1-SA6*의 바이러스 전달은 생체내에서 플라크-연관 미세아교세포 및 평균 플라크 크기에 상당한 변화를 초래하였다. (A) 해마문(20x)에서 IBA-1+4G8+ 세포의 면역형광. (B) IBA-1+4G8+ 세포의 정량 분석(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정). (C) 항-4G8 항체를 사용한 평균 플라크 크기의 정량 분석(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정).

도 20: *Ascl1-SA6*의 바이러스 전달은 생체내에서 분기된(ramified) IBA-1+ 세포의 활성화 감소 및 증가를 초래한다. (A) 해마문(20x)에서 IBA+ 세포의 면역형광. (B) (i) 활성화된 및 (ii) 분기된 IBA-1+ 세포의 고배율. (C) 해마문에서 총 IBA-1+ 세포에 대한 정량 분석(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정). (D) 전체 IBA-1+ 세포의 백분율로서의 활성화 및 분기된 세포의 정량 분석(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정).

도 21: *Ascl1-SA6*의 일시적인 발현은 생체내에서 비대성 성상교세포의 감소 및 생리학성 성상교세포의 증가를 초래한다. (A) 해마문(20x)에서 GFAP+ 세포의 면역형광. (B) (i) 비대성 성상교세포 및 (ii) 생리학성 성상교세포의 고배율. (C) 전체 GFAP+ 세포의 백분율로서 비대성 성상교세포 및 생리학성 성상교세포의 정량 분석(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정).

도 22: *Ascl1-SA6*의 바이러스 전달은 반응성 성상교세포를 나타내는 마커의 존재비 감소를 초래한다. (A) 해마문(20x)에서 S100 β + 세포의 면역형광. (B) S100 β + 세포의 정량 분석(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정). (C) AD에서 C3에 대한 동계 혼성화 및 S100 β 에 대한 면역형광 염색. 문헌[Liddel et al, *Nature* 541, 481-487 (2017)]로부터 변형. (D) 해마문에서 C- 및 S100 β -양성 세포의 면역형광에 대한 정량 분석(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정).

도 23: 직접 계통 재프로그래밍은 생체내에서 과사성 뉴런의 감소를 초래한다. (A) 미경험 및 치료된 TgF344 AD 래트에서 β III-튜불린+ 및 RIPK1+ 세포의 면역형광(20 $\times$). (B) 전체 β III-튜불린+ 세포의 백분율로서의 과사성 뉴런(β III-튜불린+RIPK1+)의 정량 분석(n=5, 일원 분산분석, Bonferroni 검정).

도 24: 직접 계통 재프로그래밍은 생체내에서 개재뉴런의 증가를 초래한다. (A) 미경험 및 *Ascl1* 또는 *Ascl1-SA6* 처리된 TgF344 AD 래트에서 GAD67+ 세포의 정량화. (B) 처리된 TgF344 AD 래트와 미처리 TgF344 AD 래트 사이에서의 비교에서 *Ascl1-SA6*로 처리된 TgF344 AD 래트의 2개의 반구 사이의 개재뉴런에서의 배수 변화의 정량적 분석(n=5, 일원 분산분석, 여러 군에 대한 보정 포함).

도 25: 직접 계통 재프로그래밍은 개선된 인지 기능을 초래한다. (A) 미경험, *Ascl1*- 및 *Ascl1-SA6* 처리된 NTg 래트 사이의 공간 기억 비교는 유의한 차이를 나타내지 않은 반면 *Ascl1* 및 *Ascl1-SA6*으로 처리된 TgF344 AD 래트는 미처리 래트에 비해 개선된 기억을 나타내었다. (B) 미처리 TgF344 AD 래트는 *Ascl1-SA6*으로 처리된 TgF344 AD 래트 및 처리 및 미처리 NTg 래트 둘 다보다 Barnes 미로 작업을 상당히 더 느리게 학습하였다. *Ascl1-SA6*으로 처리된 TgF344 AD 래트는 처리 및 미처리 NTg 래트 둘 다와 유의하게 상이하지 않았다. (C) 실행 기능 또는 문제 해결 능력에 대한 검사는 미처리 TgF344 래트에 비해서 *Ascl1-SA6*으로 처리된 TgF344 AD 래트에서 훨씬 더 양호하였고, 처리 및 미처리 NTg 래트와 유의하게 상이하지 않았다(n=5, 일원 분산분석, 여러 군에 대한 보정 포함).

도 26: *Ascl1-SA6*은 뇌졸중 후 성상교세포의 뉴런으로의 재프로그래밍에서 더 효율적이다. (A) 실험 패러다임의 도식. 마우스에게 제0일에 ET-1 뇌졸중(단일) 및 재프로그래밍(AAV-Cre; AAV-*Ascl1*; AAV-*Ascl1-SA6*)을 제공하였고, 조직 분석을 위해 PSD28에서 희생시켰다. (B) 재프로그래밍 백분율(TdTom+NeuN+/TdTom+ 세포)은 대조군(AAV-Cre)에 비해 AAV-*Ascl1* 및 AAV-*Ascl1-SA6* 처리 마우스에서 신경 재프로그래밍에 대해서 상당히 더 큰 성상교세포를 나타낸다. *Ascl1-SA6* 처리 마우스는 AAV-*Ascl1* 처리 마우스에 비해 재프로그래밍된 뉴런의 백분율이 더 높았다. (C) PSD28에 대한 (i) AAV-Cre (ii) AAV-*Ascl1* 및 (iii) AAV-*Ascl1-SA6* 뇌의 뇌졸중 손상 피질의 대표적인 영상. 흰색 화살표는 TdTom+(형질도입된 AAV), NeuN+의 예를 나타낸다. 스케일 바 = 100 μ m. 데이터는 +/- SEM을 의미한다. N=6 내지 12마리 마우스/군; 일원 분산분석; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

도 27: *Ascl1-SA6* 과발현은 AAV 형질도입 후 제3주에 뇌졸중의 아급성 모델에서 운동 기능 개선을 초래한다. (A) 실험 타임라인의 개략도. 마우스에게 제0일에 ET-1 뇌졸중(단일 주입)을 제공하였고 아급성 단계에서 제7일에 재프로그래밍하였다(AAV-Cre(대조군, 밝은 회색 막대, n=4,7); AAV-*Ascl1*(검은색 막대, n=7,8) 또는 AAV-*Ascl1-SA6*(진한 회색 막대, n=9,10)). 뒷발(B) 및 앞발(C)의 미끄러짐 백분율을 기준선(뇌졸중 전, PSD4(재프로그래밍 전) 및 PSD29에서 평가하였다. *Ascl1-SA6*을 제공받은 마우스는 재프로그래밍 후 제21일에 미끄러짐 %가

상당히 감소하였다. 데이터는 $\pm$ SEM을 의미한다. N=4 내지 10마리 마우스/군; 이원 분산분석 Tukey 다중 비교, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$

도 28: *Asc11-SA6*의 이소성 발현은 재프로그래밍 후 제3주에 개선된 보행 결과를 초래한다: 뇌졸중 및 치료 후 제28일에, 손상된(좌측) 뒷발 지문 영역 및 최대 강도는 대조군 처리된 마우스에서 상당히 손상되었다(AAV-Cre, 밝은 회색 막대). 뇌졸중 및 AAV-*Asc11-SA6*을 제공받은 마우스는 이러한 보행 매개변수에서 훨씬 더 양호한 성능을 나타내었다. 데이터는 $\pm$ SEM을 나타낸다. N=5 내지 7마리의 마우스/군; 일원 분산분석, Tukey의 다중 비교, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

도 29: *Asc11-SA6*의 이소성 발현은 수평 사다리 시험에서 숙련된 운동 행동을 개선시킨다: (A) 삼중 ET-1 뇌졸중을 제공받은 마우스의 수평 사다리 시험에서 숙련된 운동 기능을 평가하기 위한 실험 설계의 도식. (B) 손상된 앞발의 평균 미끄러짐 백분율(좌측 미끄러짐/좌측 스텝*100)은 AAV-*Asc11-SA6* 처리된 마우스가 PSD4 성능에 비해 PSD29에 의해 상당히 개선된 반면 AAV-Cre 및 AAV-*Asc11* 처리된 마우스는 PSD29에서 손상된 채로 유지됨을 나타낸다. N=6 내지 11마리 마우스/군; 이원 분산분석 Tukey 다중 비교, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.0001$, ns=유의하지 않음.

도 30: *Asc11* 및 *Asc11-SA6*은 ET-1 뇌졸중 후 PSD28의 악력 시험에서 기능 회복을 촉진할 수 있다: (A) 단일 ET-1 뇌졸중 후 앞발 강도(g)를 평가하기 위한 실험 설계의 도식. (B) 뇌졸중 AAV-Cre 마우스는 검사한 임의의 시간에 악력 개선을 나타내지 않았다. *Asc11* 또는 *Asc11-SA6*을 제공받은 마우스는 PSD28에 의해 상당한 개선을 나타낸다(뇌졸중 전 기준 성능(100%)과 크게 다르지 않음). 데이터는 $\pm$ SEM을 나타낸다. N=12 내지 26마리 마우스/군; 이원 분산분석 Tukey 다중 비교, **** $p<0.0001$, ns=유의하지 않음.

도 31: *Asc11-SA6*의 이소성 발현은 보다 심각한 뇌졸중 모델에서 *Asc11*보다 더 빠른 속도로 악력 시험에서 기능적 회복을 촉진한다. (A) 삼중 ET-1 뇌졸중 후 앞발 강도(g)를 평가하기 위한 실험 설계의 도식. (B) 뇌졸중 AAV-Cre 마우스는 검사된 모든 시간에 기준선(뇌졸중 전) 성능에서 크게 손상을 입었다. *Asc11* 또는 *Asc11-SA6*을 제공받은 마우스는 PSD120에 의해 상당한 개선을 나타낸다(과 크게 다르지 않음). AAV-*Asc11-SA6*을 제공받은 마우스는 PSD59에 의해 악력을 회복하였으며 회복은 PSD120(검사된 가장 긴 시간)까지 유지되었다. 데이터는 $\pm$ SEM을 나타낸다. N=12 내지 26마리 마우스/군; 이원 분산분석 Tukey 다중 비교, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$, ns=유의하지 않음.

도 32: 대뇌 오가노이드(CO) 배양을 위한 실험 작업흐름의 도식.

도 33: AAV2/8-GFAP-mCherry가 주입된 CO(좌측 패널)에서, GFAP 발현(성상교세포 마커)은 GFAP 프로모터 하에 발현된 mCherry와 함께 국제화되었다. 반대로, AAV2/8-GFAP-*Asc11*-mCherry가 주입된 CO에서는 GFAP의 발현이 감소되었고(우측 패널), mCherry를 발현하는 세포의 형태는 성상교세포-유사 구조에서 신경-유사 구조로 변화되었다.

도 34: AAV2/8-GFAP-mCherry가 주입된 CO(좌측 패널)에서, Doublecortin(DCX; 초기 뉴런 마커) 발현은 GFAP 프로모터 하에서 발현된 mCherry와 공동 국제화되지 않았다. 그러나, DCX의 발현은 AAV2/8-GFAP-*Asc11*-mCherry(우측 패널)가 주입된 CO에서 mCherry(밝은 화살표)와 공동 국제화되었다.

도 35: (A) AAV2/8-GFAP-*Asc11*-mCherry 또는 AAV2/8-mCherry가 주입된 인간 CO(90일)에서 형질도입 후 21일에 성상교세포(GFAP)의 비율이 감소하였고 동시에 뉴런 마커(NeuN, 성숙한 뉴런; DCX, 미성숙 뉴런)가 증가하였고; (B) 제21일에 NeuN(화살표)으로 공동 표지된 형질도입된 성상교세포를 나타낸 현미경 사진 (i); (II) mCherry 형질도입 세포(화살표)는 NeuN을 발현하고 (iii), GFAP (iv); DAPI (v)를 발현하지 않는다.

도 36: 생체 내에서 형질도입된 피질 성상교세포의 운명을 추적 관찰하기 위한 계통 추적 시스템 확립. (A) AAV8-GFAPlong-mCherry 벡터의 개략도 및 생체내 문맥 대뇌 피질로의 주입 전략. (B) 형질도입 1개월 후 GFAP 또는 Dcx 및 형질도입 2개월 후 GFAP 또는 NeuN와의 mCherry 공동 발현. 청색은 DAPI 대비염색이다. (C) AAV8-GFAPlong-*Asc11*-mCherry의 형질도입한 후 NeuN을 발현하는 mCherry⁺ 형질도입된 세포의 백분율의 정량화. (D) AAV5-GFAPshort-iCre 벡터의 개략도 및 생체내 피질로의 주입 전략. (E) 형질도입 2개월 후 AAV5-GFAPshort-*Asc11*-iCre가 주입된 Rosa-zsGreen 마우스의 피질에서의 zsGreen 발현. 청색은 DAPI 대비염색이다. (F,G) 형질도입 2개월 후에 AAV5-GFAPshort-iCre (G) 또는 AAV5-GFAPshort-*Asc11*-iCre (F,G)가 형질도입된 피질의 *Asc11* 전사체 분포의 비색 RNA 동계 혼성화 (F) 및 형광 RNAscope 분석. G의 상자 영역은 우측 패널에서 확대된다. (H) SP 부위가 지정된 야생형(wt) *Asc11* 및 제시된 SA 돌연변이를 갖는 *Asc11-SA6*의 서열의 개략도. B = 25 μ m,

E= 200 μ m 및 G= 75 μ m의 스케일 바.

도 37: Ascl1-SA6은 Ascl1보다 성숙한 뉴런 마커인 NeuN을 발현하는 더 많은 형질도입된 피질 세포를 유도한다. (A) AAV5-GFAPshort 벡터 및 Rosa-tdtomato 또는 Rosa-zsGreen 트랜스제닉 동물을 사용하여 Cre-기반 계통 추적 전략의 개략도. (B) zsGreen 표면형광 및 NeuN 발현을 나타낸, 형질도입 후 21일에 AAV5-GFAPshort-iCre가 형질도입된 Rosa-zsGreen 피질의 저배율 이미지. (C) tdtomato 표면형광 및 NeuN 발현을 나타낸, 형질도입 후 21일에 AAV5-GFAPshort-iCre, AAV5-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre 및 AAV5-GFAPshort-Ascl1-SA6-t2a-iCre가 형질도입된 Rosa-tdtomato 피질. (D) NeuN을 공동 발현하는 tdtomato⁺ 세포의 핵분율의 정량화. (E) zsGreen 표면형광 및 NeuN 발현을 나타낸, 형질도입 후 21일에 AAV5-GFAPlong-iCre, AAV5-GFAPlong-Ascl1-t2a-iCre, 및 AAV5-GFAPlong-Ascl1-SA6-t2a-iCre가 형질도입된 Rosa-zsGreen 피질. (F) NeuN을 공동 발현하는 zsGreen⁺ 세포의 핵분율의 정량화. (G) zsGreen 표면형광 및 NeuN 발현을 나타낸, 형질도입 후 21일에 AAV8-GFAPshort-iCre, AAV8-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre 및 AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA6-t2a-iCre가 형질도입된 Rosa-zsGreen 피질. (H) NeuN을 공동 발현하는 zsGreen⁺ 세포의 핵분율의 정량화. B = 200 μ m 및 C,E,G = 100 μ m의 스케일 바.

도 38. Ascl1-SA6은 Ascl1보다 형질도입된 피질 세포에서 교모세포 마커인 Sox9 발현을 더 효율적으로 억제한다. (A) zsGreen 표면형광, Sox9(적색) 및 GFAP(백색) 발현을 나타낸, 형질도입 후 21일에 AAV5-GFAPlong-iCre, AAV5-GFAPlong-Ascl1-t2a-iCre 및 AAV5-GFAPlong-Ascl1-SA6-t2a-iCre가 형질도입된 Rosa-zsGreen 피질. 청색은 DAPI 대비염색이다. 병합된 영상 및 분리된 Sox9(적색) 및 GFAP(백색) 채널이 표시된다. (B) zsGreen 표면형광, Sox9(적색) 및 GFAP(백색) 발현을 나타낸, 형질도입 후 21일에 AAV8-GFAPshort-iCre, AAV8-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre 및 AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA6-t2a-iCre가 형질도입된 Rosa-zsGreen 피질. 청색은 DAPI 대비염색이다. 병합된 영상 및 분리된 Sox9(적색) 및 GFAP(백색) 채널이 표시된다. (C,D) Sox9 또는 GFAP를 공동 발현하는 zsGreen⁺ 세포의 핵분율 및 AAV5-GFAPlong 시리즈(C) 및 AAV8-GFAPshort 시리즈(D) 둘 다에 대해 GFAP를 공동 발현하는 zsGreen⁺Sox9⁺ 세포의 핵분율의 정량화. 스케일 바 = 100 μ m.

도 39. Ascl1 및 Ascl1-SA6 둘 다는 GFAP⁺ 형질도입된 성상교세포에서 Dcx 발현을 유도한다. (A 내지 C) zsGreen 표면형광, Dcx(적색) 및 GFAP(백색) 발현을 나타낸, 형질도입 21일 후 AAV5-GFAPlong-iCre(A), AAV5-GFAPlong-Ascl1-t2a-iCre(B) 및 AAV5-GFAPlong-Ascl1-SA6-t2a-iCre(C)가 형질도입된 Rosa-zsGreen 피질. 청색은 DAPI 대비염색이다. (D) Dcx 단독 또는 Dcx와 GFAP를 공동 발현하는 zsGreen⁺ 세포의 핵분율의 정량화. 스케일 바 = 100 μ m.

도 40. Chr2 작동자의 광유전학적 자극은 Ascl1-SA6 형질도입된 세포가 더 짧은 붕괴 상수를 가짐을 나타낸다. (A) 광유전학적 작동자인 Chr2-(H134R)-YFP를 운반하는 AAV와 Cre-기반 AAV를 Rosa-zsGreen 마우스의 피질에 주입한 광유전학적 실험의 개략도. 4주 후, 광자극 실험을 수행하였다. (B) 동시 광자극 및 전기생리학 기록에 사용되는 개두술 및 피질 창. 또한 Zs-녹색 양성 세포(녹색 채널) 및 텅스텐 전극 팁(적색 채널)을 나타낸 피질 조직의 2-광자 z-스택 투영이 도시되며; 원형 황색 영역은 전극 근처의 자극 부위를 나타낸다. 스케일바 = 100 μ m. (C) ASCL1-SA6(보라색 추적) 및 iCre(검은색 추적) 처리 둘 다에 대해 4Hz에서 3초 광자극 후 LFP 밴드의 변화를 나타낸 대표적인 원시 전압 추적. 음영 처리 영역은 동일한 광자극 영역 내에서 다양한 반복에 걸쳐 측정된 전압 표준 편차를 나타낸다. (D) iCre 및 Ascl1-SA6 형질도입된 뇌에서 광자극된 세포의 붕괴 상수 측정. 상자플롯의 점은 개별 측정값을 나타내고 "N"은 각각의 군에 사용된 마우스 수를 나타낸다.

도 41: 3개월령 및 5개월령의 hSod1^{G93A} 뇌에서 반응성 미세아교세포증이 없는 Ctip2⁺ 상부 운동 뉴런의 감소. (A) 분석의 앞뒤(rostrocaudal) 위치에 대한 도식적 표현. (B) 브레그마 2.15, 1.85 및 1.34에서 피질 절편의 DAPI 염색. (C 내지 F) 3개월령(C,D) 및 5개월령(E,F)에서 Ctip2(녹색) 및 Iba1(적색)로 면역염색된 C57Bl/6 대조군(C,E) 및 hSod1^{G93A} (D,F) 운동 피질을 통한 관찰 절편. 청색은 DAPI 대비염색이다. (G 내지 I) 브레그마 2.15(G), 1.85(H) 및 1.34(J)의 계수치를 나타낸, 3개월령 및 5개월령의 Ctip2⁺ 세포/DAPI⁺ 핵%의 정량화. (J 내지 O) 3개월령 및 5개월령의 C57Bl/6 대조군 및 hSod1^{G93A} 운동 피질에서 Iba1⁺ 세포/DAPI⁺ 핵%를 나타낸, 미세아교세포증의 분석(J). 3개월령 및 5개월령 C57Bl/6 대조군 및 hSOD1^{G93A} 운동 피질에서 Iba1⁺ 세포 밀도(K), 평균 세포체 크기(L) 및 세포당 가지(M)의 특징규명. (N,O) 활성화된 세포를 최적으로 식별하는 데 사용되는 조정 과정을 나타낸, MORPHIOUS를 사용한 활성화된 미세아교세포의 식별. 히트맵의 적색은 더 큰 값을 나타내고 검은

색은 3개월령(N) 및 5개월령(O)에 표시된 0을 나타낸다. B 내지 F에서 스케일 바= 200 μ m.

도 42: 3개월령 및 5개월령의 hSod1^{G93A} 뇌에서 성상교세포증은 분명하지 않다. (A) 분석의 앞뒤 위치에 대한 조직적 표현. (B 내지 E) 3개월령(B,C) 및 5개월령(D,E)에서 GFAP(녹색) 및 Sox9(적색)로 면역염색된 C57Bl/6 대조군(B,D) 및 hSod1^{G93A}(C,E) 운동 피질을 통한 관찰 절편. 청색은 DAPI 대비염색이다. (F 내지 I) 브레그마 2.15(F), 1.85(G) 및 1.34(H)에서의 계수치를 나타낸, 3개월령 및 5개월령의 Sox9⁺ 세포/DAPI⁺ 핵%의 정량화. (I 내지 K) MORPHIOUS를 사용하여 3개월 및 5개월령에서 C57Bl/6 대조군 및 hSod1^{G93A} 운동 피질에서 GFAP 발현을 특징규명하는 성상교세포증 분석(I). (N,O) 활성화된 세포를 최적으로 식별하는 데 사용되는 조정 과정을 표시하며, 히트맵의 적색은 더 큰 값을 나타내고 검은색은 0을 나타내는데, 이는 3개월령(J) 및 5개월령(K)에 표시된다. B 내지 E에서 스케일 바= 200 μ m.

도 43: 주입되지 않음, iCre, Asc11 및 Asc11^{SA6} 주입된 hSod1^{G93A} 운동 피질에서의 클러스터 분석 및 배정. (A, B) 스테레오타크(stereotax)를 사용하여 16주령 hSod1^{G93A};Rosa-zsGreen 마우스의 운동 피질에 3개의 AAV를 주입하는 나타난 실험 프로토콜(A). 28dpi 후, 뇌를 Visium 캡처 스팟 상에서 절편화하고, 조직을 투과화하여 바코드 프라이머에 mRNA를 캡처하였다(A). 프라이머 서열은 공간 바코드, UMI 및 poly dT 테일을 포함한다(B). 각각의 '스팟'의 기준 프레임 및 캡처 영역을 표시한다(B). (C,D) 기준 프레임, 공간 맵 및 UMAP에서 H&E 염색 절편을 도시한 주입되지 않은 hSod1^{G93A} 운동 피질의 ST 분석(C). 조직 전반에 걸쳐 다양하게 발현되는 상위 50개 유전자의 히트맵(D). (E,F) 기준 프레임, 공간 맵 및 UMAP에서 H&E 염색 절편을 나타낸, iCre가 주입된 hSod1^{G93A} 운동 피질의 ST 분석(E). 조직 전반에 걸쳐 다양하게 발현되는 상위 50개 유전자의 히트맵(F). (G,H) 기준 프레임, 공간 맵 및 UMAP에서 H&E 염색 절편을 나타낸, Asc11이 주입된 hSod1^{G93A} 운동 피질의 ST 분석(G). 조직 전반에 걸쳐 다양하게 발현되는 상위 50개 유전자의 히트맵(H). (I,J) 기준 프레임, 공간 맵 및 UMAP에서 H&E 염색 절편을 나타낸, Asc11^{SA6}이 주입된 hSod1^{G93A} 운동 피질의 ST 분석(I). 조직 전반에 걸쳐 다양하게 발현되는 상위 50개 유전자의 히트맵(J). D, F, H, J의 클러스터 배정은 Allen Brain Atlas를 사용하여 분자 뇌 지도의 266개 유전자의 뇌 팔레트와 비교하여 이루어졌다³⁹.

도 44: iCre 형질도입된 세포는 염증성 전사 시그니처와 연관된다. (A 내지 E) 주입되지 않음, iCre, Asc11 및 Asc11^{SA6} 형질도입된 뇌에 대한 공간 맵 상의 매핑 iCre 전사체 분포(A). iCre에 의해 재조합된 Rosa-zsGreen 유전자좌의 개략도(B). iCre, Asc11 및 Asc11^{SA6} 형질도입된 뇌에서 zsGreen 발현 확인(C). 둘 다는 리보솜 스키핑에 의해 별도의 단백질로 번역되는 Asc11 및 iCre에 대한 암호 서열을 운반하는 이시스트론성 mRNA를 생성하는, v2a-유발 리보솜 스키핑 모델(D). DEG 분석을 허용하기 위해 iCre, Asc11 및 Asc11^{SA6} 형질도입된 뇌에서 iCre 발현의 정규화 및 스케일링(E). (F 내지 J) Asc11을 iCre와 또는 Asc11^{SA6}을 iCre와 비교할 때 상향조절 및 하향조절되는 DEG의 분포를 나타낸 벤 다이어그램(F). 각각의 조직 내에서 iCre 양성 세포와 iCre 음성 세포 사이의 DEG 히트맵(G). 상향조절된 DEG와 관련된 GO 용어를 포함하여 iCre 형질도입된 세포에서 DEG와 관련된 의미 공간에서 분리된 GO 용어의 비교(H). 주입되지 않음, iCre, Asc11 및 Asc11^{SA6} 뇌에서 Gfap, Vim, Tyrobp, Mpeg1, Cd52 및 C4b에 대한 전사체 분포의 공간 매핑(I). iCre(검은색 원), Asc11(파란색 원) 및 Asc11^{SA6}(녹색 원)에 대한 값을 나타낸, DEG 세트에 대한 전사체 관독치의 Log2FC(J).

도 45: 공간 전사체학(ST) 데이터의 품질 대조군. (A 내지 A") 기준 프레임의 H&E 염색 절편(A), 각각의 클러스터의 UMI 계수치가 있는 tSNE 플롯(A), 공간 맵(A') 및 상응하는 색상-코딩된 tSNE 플롯(A')을 나타낸, 주입되지 않은 hSod1^{G93A} 운동 피질의 ST 분석. 시퀀싱 포화를 또한 나타낸다(A"). (B 내지 B") 기준 프레임의 H&E 염색 절편(B), 각각의 클러스터의 UMI 계수치가 있는 tSNE 플롯(B), 공간 맵(B') 및 상응하는 색상-코딩된 tSNE 플롯(B')을 나타낸, iCre가 주입된 hSod1^{G93A} 운동 피질의 ST 분석. 시퀀싱 포화를 또한 나타낸다(B"). (C 내지 C") 기준 프레임의 H&E 염색 절편(C), 각각의 클러스터의 UMI 계수치가 있는 tSNE 플롯(C), 공간 맵(C') 및 상응하는 색상-코딩된 tSNE 플롯(C')을 나타낸, Asc11이 주입된 hSod1^{G93A} 운동 피질의 ST 분석. 시퀀싱 포화를 또한 나타낸다(C"). (D 내지 D") 기준 프레임의 H&E 염색 절편(D), 각각의 클러스터의 UMI 계수치가 있는 tSNE 플

롯(D), 공간 맵(D') 및 상응하는 색상-코딩된 tSNE 플롯(D')을 나타낸, $Ascl1^{SA6}$ 이 주입된 $hSod1^{G93A}$ 운동 피질의 ST 분석. 시퀀싱 포화를 또한 나타낸다(D").

도 46: 뉴런-연관 유전자 발현은 $Ascl1$ 및 $Ascl1^{SA6}$ 형질도입된 세포에서 풍부해진다. (A 내지 C) $Ptgds$, $Pvalb$, $Gad1$ 및 Sst 를 포함하여 주입되지 않음, $iCre$, $Ascl1$ 및 $Ascl1^{SA6}$ 형질도입된 세포의 $iCre$ 양성 세포에서 DEG의 전사체 분포(A). $Id3$, $Clqb$ 및 $Clqa$ 를 포함하여 주입되지 않음, $iCre$, $Ascl1$ 및 $Ascl1^{SA6}$ 형질도입된 세포에서 시험관내에서 출생 후 성상교세포의 $Ascl1^{ERT2}$ 과발현 실험¹⁰에서 확인된 DEG의 전사체 분포(B). $iCre$ (검은색 원), $Ascl1$ (파란색 원) 및 $Ascl1^{SA6}$ (녹색 원)에 대한 값을 나타낸, DEG 세트에 대한 전사체 관독치의 $Log2FC$ (C). (D 내지 G) $Ascl1$ 및 $Ascl1^{SA6}$ -형질도입 세포에서 각각 상향조절된(D,F) 및 하향조절된(E,G) DEG와 관련된 의미 공간에서 분리된 GO 용어의 비교.

도 47: 생체내에서 $Ascl1$ 및 $Ascl1^{SA6}$ 에 의해 활성화된 $Zbtb18$ 및 Id TF를 포함하는 GRN의 식별. (A 내지 C) TF로 구성된 GRN은 $iCre$ (A), $Ascl1$ (B) 및 $Ascl1^{SA6}$ (C) 형질도입된 뇌에 대한 ST 데이터로부터 구축되었다. 가장 어두운 회색 상자(원래 적색)는 $iCre$ 단독 또는 $Ascl1$ 및/또는 $Ascl1^{SA6}$ 형질도입된 뇌에서 특별하게 상향조절된 DEG를 둘러싸고 있다. 진한 회색 상자(원래 주황색)는 $iCre$ 및 $Ascl1$ 및/또는 $Ascl1^{SA6}$ 형질도입된 뇌에서 상향조절된 DEG를 둘러싸고 있다. 가장 밝은 회색 상자(원래 청색)는 $iCre$ 단독 또는 $Ascl1$ 및/또는 $Ascl1^{SA6}$ 형질도입된 뇌에서 특별하게 하향조절된 DEG를 둘러싸고 있다. 중간 회색 상자(원래 보라색)는 $iCre$ 및 $Ascl1$ 및/또는 $Ascl1^{SA6}$ 형질도입된 뇌에서 특별하게 하향조절된 DEG를 둘러싸고 있다. (D 내지 I) 본 연구에서 생체내 ST 데이터로부터의 상향조절된 DEG와 천연 $ASCL1$ (WT 51)(D 내지 F) 또는 $ASCL1^{SA5}$ 의 돌연변이된 버전(G 내지 I)을 사용하여 교모세포종 세포의 시험관내 재프로그래밍으로부터의 상향조절된 DEG의 비교 분석(GSE153823; ²⁵). 상향조절된 DEG에 초점을 맞춘, $iCre$ (D,G), $Ascl1$ (E,H) 및 $Ascl1^{SA6}$ ST 데이터와의 비교를 나타낸다(F, I). (J, K) $iCre$ (검은색 원), $Ascl1$ (청색 원) 및 $Ascl1^{SA6}$ (녹색 원)에 대한 값을 나타낸, 상향조절된(J) 및 하향조절된(K) DEG에 대한 전사체 관독치의 $Log2FC$. (L,M) 교란되지 않은 상태(L) 또는 $Zbtb18$ (M)의 인 실리코 핵-아웃('KO') 이후에 교모세포종 세포(GSE153823; ²⁵)에서 $Ascl1^{SA6}$ 과발현에 반응하여 상향조절된(어두운 회색 사각형) 또는 하향조절된(밝은 회색 사각형) TF를 나타낸, 공개된 scRNAseq 데이터 세트⁹⁶에서 추론된 배아 피질 GRN의 생성. (N 내지 Q) 3개의 유전자 모두가 $Neurog2+Ascl1+$ NPC의 RNAseq 데이터로부터 구축된 동일한 GRN의 일부임을 처음으로 입증한, E12.5 피질 NPC에서의 $Neurog2$ ('N'으로 지정), $Ascl1$ ('A'로 지정) 및 $Zbtb18$ ('Z'로 지정)의 비교 분석⁹⁷. 글루타메이트성 및 GABA성 뉴런 계통의 분기를 나타낸, E12.5 피질 scRNAseq 데이터⁹⁸의 SPRING 플롯에 표시된 $Ascl1$, $Neurog2$ 및 $Zbtb18$ 의 계통 계층 분석(O). $Ascl1$, $Neurog2$ 및 $Zbtb18$ 발현(P)의 국지적 편향 및 3개 유전자의 의사시간 분석을 나타낸, pseudoDV 점수를 또한 표시한다(Q).

도 48: 공개된 시험관내 신경 재프로그래밍 데이터세트에 대한 생체내(ST 데이터)의 비교. (A 내지 C) 본 연구에서 생체내 ST 데이터로부터의 상향조절된 DEG와 $ASCL1$ 을 사용하여 출생 후 성상교세포의 시험관내 재프로그래밍으로부터의 상향조절된 DEG의 비교 분석(GSE06389; ¹⁰). 상향조절된 DEG에 초점을 맞춘, $iCre$ (A), $Ascl1$ (B) 및 $Ascl1^{SA6}$ (C) ST 데이터와의 비교를 나타낸다. (D 내지 F) 본 연구에서 생체내 ST 데이터로부터의 하향조절된 DEG와 $ASCL1$ 을 사용하여 출생 후 성상교세포의 시험관내 재프로그래밍으로부터의 하향조절된 DEG의 비교 분석(GSE06389; ¹⁰). 하향조절된 DEG에 초점을 맞춘, $iCre$ (D), $Ascl1$ (E) 및 $Ascl1^{SA6}$ (F) ST 데이터와의 비교를 나타낸다. (G 내지 J) 본 연구에서 생체내 ST 데이터로부터의 하향조절된 DEG와 천연 $ASCL1$ (WT 51)(G 내지 I) 또는 $ASCL1^{SA5}$ 의 돌연변이된 버전(J 내지 L)을 사용하여 교모세포종 세포의 시험관내 재프로그래밍으로부터의 하향조절된 DEG의 비교 분석(GSE153823; ²⁵). 하향조절된 DEG에 초점을 맞춘, $iCre$ (G,J), $Ascl1$ (H,K) 및 $Ascl1^{SA6}$ (I,L) ST 데이터와의 비교를 나타낸다.

도 49: $hSOD1^{G93A}$ 및 대조군 마우스에서 16주령의 $iCre$ 및 $Ascl1^{SA6}$ 주입에 대한 실험 개요 및 체중 측정치. (A)

AAV 주입 및 행동 시험 타임라인. iCre 및 $Asc11^{SA6}$ 을 16주령 Rosa-zsGreen(대조군) 및 16주령(증상이 있는) $hSOD1^{G93A};Rosa-zsGreen$ 마우스, 수컷 및 암컷에 양측에 주사하였다. 체중 및 운동 행동 시험을 매주 수행하였고 15주 기준선 측정치와 비교하였다. (B,C) 수컷(B) 및 암컷(C) 마우스에 대한 실험 일정에 따른 체중 변화.이원 분산분석은 $hSOD1^{G93A}$ 마우스에서 19주와 22주에 유의한 차이를 나타내었다(각각 $p = 0.0470$ 및 $p = 0.0370$).

도 50: 수컷 및 암컷 $hSOD1^{G93A}$ 마우스에서 제16주 iCre 및 $Asc11^{SA6}$ 주입에 대한 신경학적 점수 및 생존 곡선. 행동 시험을 매주 수행하였고, 인도적인 종점까지 계속하였다. (A, B) 수컷(A) 및 암컷(B) $hSOD1^{G93A}$ 마우스에 대한 NS 배경. (C) iCre 및 $Asc11^{SA6}$ -주입된 수컷(C) 및 암컷(D) 마우스에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선.

도 51: $SOD1^{G93A}$ 및 대조군 마우스에서 제16주에 iCre 및 $Asc11^{SA6}$ 주사에 대한 로타로드 및 악력. (A, B) 로타로드 검정은 수컷(A) 및 암컷(B) $hSOD1^{G93A}$ 및 대조군 마우스에서 15주(기준선) 및 16주령에 AAV 주입 후 제17주부터 매주 수행되었다. $Asc11^{SA6}$ 으로 치료된 $hSOD1^{G93A}$ 수컷은 로타로드에 머무르는 능력이 증가하였고 iCre 주입된 코호트와 비교하여 제19주, 제20주 및 제21주령에 유의한 차이를 나타내었다(A). 24주 이후에는 대조군 동물이 생존하지 못하여 통계적 시험을 수행할 수 없었다. ($\checkmark$ Šidák의 다중 비교 시험, 제19주, 제20주, 제21주에 각각 $p = 0.0471$, $p = 0.0379$, $p = 0.0329$). $Asc11^{SA6}$ 이 주입한 $hSOD1^{G93A}$ 암컷 래트는 로타로드에 머무르는 능력이 증가하였고 23주령과 25주령에 유의한 차이를 나타내었다. ($\checkmark$ Šidák의 다중 비교 시험, 각각 $p = 0.0359$ 및 $p < 0.0001$) (C,D) 신경근 기능의 악력 측정은 수컷(C) 및 암컷(D) $hSOD1^{G93A}$ 및 대조군 마우스에서 제15주(기준선) 및 16주령에 AAV 주입 후 제17주차부터 매주 수행되었다. $Asc11^{SA6}$ 이 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 수컷 래트는 악력이 증가하는 경향을 나타내었다.

도 52: 16주령의 iCre 및 $Asc11^{SA6}$ 처리 대조군 및 $hSOD1^{G93A}$ 마우스에 대한 보행 분석. 수컷(A) 및 암컷(B) 대조군 및 $hSOD1^{G93A}$ 마우스의 앞다리 및 뒷다리 발자국 측정을 기반으로 한 보폭 거리의 보행 분석. (A) $Asc11^{SA6}$ 이 주입한 $hSOD1^{G93A}$ 수컷 마우스는 보폭이 증가하는 경향을 나타내었지만 유의한 차이를 나타내지 않았다. (B) iCre가 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 암컷 마우스는 $Asc11^{SA6}$ 처리 동물에 비해 15주령 및 21주령에 보폭이 상당히 길었다 ($\checkmark$ Šidák의 다중 비교 시험, 각각 $p = 0.0319$ 및 $p = 0.0057$).

도 53: 제16주에 iCre 및 $Asc11^{SA6}$ 주입 후 우측(RH) 및 좌측(LH) 뒷다리 걸음 거리의 CatWalk XT® 보행 분석. (A, B) 대조군 및 $hSOD1^{G93A}$ 수컷 마우스의 RH(A) 및 LH(B) 보폭. (C,D) 대조군 및 $hSOD1^{G93A}$ 암컷 마우스의 RH(C) 및 LH(D) 보폭.

도 54: $hSOD1^{G93A}$ 및 대조군 마우스에서 19주령에 iCre 및 $Asc11^{SA6}$ 주입 후 체중 측정치. 체중을 매주 측정하고 수컷(A) 및 암컷(B) 마우스의 18주 기준 측정치와 비교하였다.

도 55: 19주령의 iCre 및 $Asc11^{SA6}$ 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 마우스에 대한 신경점수 및 Kaplan-Meier 생존 곡선. 행동 시험을 매주 수행하였고, 인도적인 종점까지 계속하였다. (A, B) 수컷(A) 및 암컷(B) $hSOD1^{G93A}$ 마우스에 대한 NS 배경. (C) iCre 및 $Asc11^{SA6}$ -주입된 수컷 및 암컷 마우스에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선. iCre 주입된 수컷 마우스의 경우 0%와 비교하여, $Asc11^{SA6}$ 주입 수컷 마우스는 28주까지 60% 생존 확률을 나타내었다. iCre 주입된 암컷 마우스의 경우 0%와 비교하여, $Asc11^{SA6}$ 암컷 수컷 마우스는 26주까지 35% 생존 확률을 나타내었다.

도 56: $hSOD1^{G93A}$ 및 대조군 마우스에서 19주차 iCre 및 $Asc11^{SA6}$ 주사에 대한 로타로드 및 악력. (A, B) 로타로드 검정은 수컷(A) 및 암컷(B) $hSOD1^{G93A}$ 및 대조군 마우스에서 18주(기준선) 및 19주령에 AAV 주입 후 제20주부터 매주 수행되었다. $Asc11^{SA6}$ 으로 치료된 $hSOD1^{G93A}$ 수컷은 로타로드에 머무르는 능력이 증가하는 경향이 있었다 (A). $Asc11^{SA6}$ 또는 iCre가 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 암컷 마우스는 로타로드에 떨어지는 지연의 차이를 나타내지 않았다

(B) (C,D) 신경근 기능의 악력 측정은 수컷(C) 및 암컷(D) hSOD1^{G93A} 및 대조군 마우스에서 제18주(기준선) 및 19주령에 AAV 주입 후 제20주부터 매주 수행되었다. Asc11^{SA6}이 주입된 hSOD1^{G93A} 수컷 래트는 악력이 증가하는 경향을 나타내었다.

도 57: 제19주에 iCre 및 Asc11^{SA6} 주입 후 우측(RH) 및 좌측(LH) 뒷다리 걸음 거리의 CatWalk XT® 보행 분석. (A, B) 대조군 및 hSOD1^{G93A} 수컷 마우스의 RH(A) 및 LH(B) 보폭. (C,D) 대조군 및 hSOD1^{G93A} 암컷 마우스의 RH(C) 및 LH(D) 보폭.

도 58: Asc11-SA7은 Asc11보다 더 효율적으로 그리고 Asc11-SA6과 동일한 정도로 형질도입된 피질 세포에서 교모세포 마커인 Sox9 발현을 억제한다. (A) zsGreen 표면형광, Sox9 및 GFAP(백색) 발현을 나타낸, 형질도입 후 제21일에 AAV8-GFAPshort-iCre, AAV8-GFAPshort-Asc11-t2a-iCre, AAV8-GFAPshort-Asc11-SA6-t2a-iCre 및 AAV8-GFAPshort-Asc11-SA7-t2a-iCre가 형질도입된 Rosa-zsGreen 피질. DAPI를 대비염색으로서 사용하였다. 병합된 영상(상단 패널) 및 분리된 Sox9(제2 패널) 및 GFAP(하단 패널) 채널이 표시된다. (B) 그래프는 Sox9 또는 GFAP를 공동 발현하는 zsGreen⁺ 세포의 백분율 및 GFAP를 공동 발현하는 zsGreen⁺Sox9⁺ 세포의 백분율의 정량화를 나타낸다. 스케일바 = 100μm.

도 59: Asc11-SA7 및 Asc11-SA6은 Asc11보다 성숙한 뉴런 마커인 NeuN을 발현하는 더 많은 형질도입된 피질 세포를 유도한다. (A) zsGreen 표면형광 및 NeuN 발현을 나타낸, 형질도입 후 제21일에 AAV8-GFAPshort-iCre, AAV8-GFAPshort-Asc11-t2a-iCre, AAV8-GFAPshort-Asc11-SA6-t2a-iCre 및 AAV8-GFAPshort-Asc11-SA7-t2a-iCre가 형질도입된 Rosa-zsGreen 피질. (B) NeuN을 공동 발현하는 zsGreen⁺ 세포의 백분율의 정량화. 100μm 단위의 스케일바.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 정의
- [0029] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속한 기술분야의 통상의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다.
- [0030] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 복수형을 포함한다.
- [0031] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "포함하는"은 다음 목록이 비제한적이며 임의의 다른 추가적인 적합한 항목, 예를 들어, 적절한 경우 하나 이상의 추가 특징(들), 성분(들) 및/또는 구성성분(들)을 포함하거나 포함하지 않을 수 있음을 의미하는 것으로 이해될 것이다.
- [0032] 본 명세서에 전반에 걸쳐서 "일 실시형태", "실시형태", "또 다른 실시형태", "특별한 실시형태", "관련 실시형태", "특정 실시형태", "추가적인 실시형태" 또는 "추가 실시형태" 또는 이의 조합에 대한 언급은 실시형태와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 적어도 하나의 실시형태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전반에 걸쳐 다양한 곳에 등장하는 상기 어구가 반드시 모두 동일한 실시형태를 지칭하는 것은 아니다. 또한, 특정 특징, 구조 또는 특성은 하나 이상의 실시형태에서 임의의 적절한 방식으로 조합될 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "유효량"은 목적하는 효과를 생성하기에 충분한 양이다. 일부 실시형태에서, 전사 인자 또는 전사 인자를 암호화하는 핵산의 유효량은 대상체의 표적 조직의 충분한 수의 표적 세포를 전환분화시키는 데 충분한 양이다. 일부 실시형태에서, 표적 조직은 뉴런 조직(예를 들어, 뇌 조직, 예컨대, 비제한적으로 대뇌 피질(CCTX), 해마(HIPPO), 내후각 피질(entorhinal cortex: EC), 전전두엽 피질(pre-frontal cortex: PFC), 후방 내측 피질(posterior medial cortex: PMC), 청반(locus coeruleus: LC), 시상(TH), 하구(IC), 후구(OB), 전후각핵(AON), 시상하부(HT), 소뇌(CBL), 선조체, 기저핵, 변연계(LC), 디폴트 모드 네트워크(default mode network: DMN), 내측 측두엽(MTL), 뇌줄기, 소뇌 및 척수)이다. 일부 실시형태에서, 조성물 또는 벡터의 유효량은 대상체에서 치료적 유익을 갖기에, 예를 들어, 정상교세포의 뉴런으로의 신경재프로그래밍을 제공하거나, 대상체의 수명을 연장하거나, 지연, 예방 또는 치료하기 위해 대상체에서 신경퇴행성 질환 또는 장애 또는 손상을 지연, 예방 또는 치료하거나, 대상체에서 중추신경계 질환, 장애 또는 손상을 치료하기에 충분한 양일 수 있다. 유효량은 예를 들어, 대상체의, 종, 성별, 연령, 체중, 건강, 투여 방식 또는 투여 부위 등과 같은 다양한 요인에 따라 달라질 수 있고, 따라서 대상체 및 투여에 따라 달라질 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 본 발명의 방법에 의해 치료될 "대상체", "환자" 또는 "개체"는 인간 또는

인간이 아닌 동물을 지칭하는 것을 의미한다. "비인간 동물"은 임의의 척추동물 또는 무척추동물 유기체를 포함하지만, 바람직하게는 포유동물이다. 인간 대상체는 임의의 연령, 성별, 인종 또는 민족 군, 예를 들어, 백인(백인종), 아시아인, 아프리카인, 흑인, 아프리카계 미국인, 아프리카계 유럽인, 히스패닉계, 중동인 등일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 임상 환경에서 환자 또는 다른 대상체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 대상체는 이미 치료를 받고 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 신생아, 유아, 아동, 청소년, 성인 또는 노인이다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 상호 교환적으로 사용되며, 따라서 용어 폴리펩타이드는 전장 단백질을 지칭하는 데 사용될 수 있고 전장 단백질의 단편 및/또는 이의 기능적 변이체를 지칭하는 데에도 사용될 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "핵산 서열"은 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, RNA, DNA, mRNA, cDNA 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 유전 물질을 포함할 수 있으며, 이는 전장 서열, 기능적 변이체 및/또는 이의 단편을 포함할 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "백터"는 외래 유전 물질을 숙주 세포 내로 인공적으로 운반하기 위한 비히클, 예를 들어, 시험관내 또는 생체내에서 숙주 세포 내로 전달될 핵산을 포함하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스를 지칭하는 것을 의미한다.

[0038] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "발현 백터"는 백터 상의 전사 조절 서열에 연결된 서열로부터 RNA 또는 폴리펩타이드의 발현을 지시하는 백터를 지칭한다. 발현된 서열은 반드시 그런 것은 아니지만 종종 숙주 세포에 대해 이중성일 것이다. 발현 백터는 추가 요소를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 발현 백터는 2개의 복제 시스템을 가질 수 있어서 2개의 유기체, 예를 들어, 발현을 위한 인간 세포 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵 숙주에서 유지될 수 있다. 용어 "발현"은 적용 가능한 경우, 예를 들어, 비제한적으로 전사, 전사체 처리, 번역 및 단백질 접힘, 변형 및 처리를 포함하는 RNA 및 단백질 생산, 그리고 적절한 경우 단백질 분비에 관여하는 세포 과정을 지칭한다. 발현 산물은 유전자로부터 전사된 RNA 및 유전자로부터 전사된 mRNA의 번역에 의해 얻은 폴리펩타이드를 포함한다. "유전자"라는 용어는 적절한 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 때 시험관내 또는 생체내에서 RNA로 전사(DNA)되는 핵산 서열을 의미한다. 유전자는 돌연변이체 유전자일 수 있으며 암호 영역 앞과 뒤의 영역, 예를 들어, 5' 미번역(5'UTR) 및 Kozak 서열 또는 "리더" 서열 및 3' UTR 또는 "트레일러" 서열뿐만 아니라 개별 암호 분절(엑손) 사이의 개재 서열(인트론)을 포함할 수도 있고 포함하지 않을 수도 있다.

[0039] 본 발명은 예를 들어, 중추신경계(예를 들어, 신경퇴행성) 질환 또는 장애 또는 중추신경계 손상(예를 들어, 뇌졸중)의 치료를 위한 직접 신경 재프로그래밍에 사용되는 생성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 생성물은 저해 환경 제어에 대한 전사 인자를 탈감각화하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 전신경 또는 신경 분화 배이직-헬릭스-루프-헬릭스(bHLH) 전사 인자(예를 들어, *Neurog2*, *Ascl1*, *Neurod1*, *Neurod4*) 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0040] 본 발명자들은 놀랍게도 포스포억제부위 돌연변이를 혼입하면 bHLH 전사 인자 *Ascl1*이 정상적으로 활성이 아닌 세포 환경에서도 이의 활성을 유지할 수 있다는 사실을 발견하였다. 이는 다른 bHLH 전사 인자 내의 포스포억제부위 부위의 유사한 돌연변이가 이러한 전사 인자가 정상적으로 활성이 아닌 세포 환경에서도 활성을 유지하는 능력을 개선시킬 것임을 나타낸다. 이러한 bHLH 전사 인자의 돌연변이 형태의 예는 예를 들어, *Neurog2*-SA9, *Ascl1*-SA6, *Neurod1*-SA6, *Neurod4*-SA3/TA4를 포함한다. 이러한 bHLH 전사 인자의 돌연변이된 형태의 발현은 신경퇴행성 질환에 또는 손상 후 존재하는 것과 같은 저해 환경에서도 치료된 대상체에서 신경아교 세포(예를 들어, 성상교세포, 희소돌기신경아교세포 및 미세아교세포)의 뉴런 계통 전환을 유도할 수 있다.

[0041] bHLH 전사 인자 돌연변이체

[0042] 상기에서 언급된 바와 같이, bHLH 전사 인자는 기능적 특성에 기초하여 전신경 및 신경 분화 유전자로 분류될 수 있다(D.J. Dennis et al./Brain Research 1705 (2019) 48-6549). 전신경 활성을 갖는 전신경 bHLH 유전자는 *Neurog1*, *Neurog2*, *Ascl1*, *Neurod4*, *Atoh1* 및 *Atoh7*를 포함한다. 뉴런 계통의 발달에서 나중에 기능하는 신경 분화 bHLH 전사 인자는 *NeuroD*(*Neurod1*, *Neurod2*/*Ndrf*, *Neurod6*/*Math2*), *Nsc1*(*Nhlh1*/*Nsc11*, *Nhlh2*/*Nsc12*) 및 일부 상황에서 *Olig*(*Olig1*, *Olig2*, *Olig3*, *Bhlhe22*) 패밀리를 포함한다.

[0043] 신경발달 동안, bHLH 전사 인자는 인산화 시 활성을 상실하도록 다양한 키나제에 의한 인산화에 의해 적어도 부분적으로 조절된다. bHLH 전사 인자는 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대한 포스포억제부위인 프롤린(P) 잔기(SP 또는 TP로 지정)에 인접한 세린(S) 또는 트레오닌(T)을 암호화하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 프롤린-지향 세린 트레오닌 키나제(예를 들어, GSK3, ERK, CDK1)에 의한 이러한 bHLH 단백질의 인산화는 이러한

전사 인자가 DNA에 결합하고 신경 분화를 유도하는 능력을 저해한다. 이러한 저해는 환경적 저해성 제어이다.

[0044]

본 발명자들은 본 발명에 이르러서 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대한 포스포엑셉터 부위를 포함하지 않거나, 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제에 대한 감소된 수의 포스포엑셉터 부위를 갖는 bHLH 전사 인자의 돌연변이체가 CNS, 예를 들어, 뇌 내에서 성상교세포를, 환경적 저해성 제어에 영향을 받지 않는 방식으로, 기능성 뉴런으로 효율적으로 재프로그래밍하는 놀라운 능력을 갖는다는 것을 발견하였다.

[0045]

신경발생을 촉진하는 bHLH 유전자의 능력은 환경에 따라 크게 좌우된다는 것을 발견하였고; 뉴런 전환 효율은 존재하는 저해 기전에 따라 상이한 발달 시기, 상이한 뇌 영역, 병이 걸리거나 손상된 뇌에서 다양하다. 이는 하기 표에 제공된 요약에 의해서 설명된다. 또한, bHLH 전사 인자의 인산화를 감소시키는 것이 어떻게 뉴런 전환 효율을 상당히 개선시키고 안정화시킬 수 있는지를 나타낸다.

공급원 세포	인자	아형	효율	기능성 결과	참고문헌
해마 성상교세포 (AD 래트)	<i>Neurod1</i> , <i>Ascl1</i> 또는 <i>Ascl1-SA6</i>	시험되지 않음	NeuN+ 뉴런 밀도: <i>Ascl1-SA6</i> : 4.5x↑ <i>Ascl1</i> : 4.0 x ↑ <i>Neurod1</i> : 2.5 x ↑	<i>Neurod1</i> - 신경 네트워크 활성을 향상시킴	본 출원
운동 피질 성상교세포(야생형 마우스)	<i>Ascl1-SA6</i> , <i>Ascl1</i>	시험되지 않음	<i>Ascl1-SA6</i> : 68% <i>Ascl1</i> : 45%	시험되지 않음	본 출원
운동 피질 성상교세포(ALS)	<i>Ascl1-SA6</i>	시험되지 않음	<i>Ascl1-SA6</i> : 80%	시험되지 않음	본 출원
피질 성상교세포(뇌졸중)	<i>Ascl1-SA6</i> , <i>Ascl1</i>	시험되지 않음	<i>Ascl1-SA6</i> : 60% <i>Ascl1</i> - 47%		본 출원
중식성 신경아교 세포	<i>Neurog2</i> , FGF, EGF	글루타메이트성	72+/-5%	시험되지 않음	(Grande, Sumiyoshi et al. 2013)
성상교세포	<i>Neurog2</i> , DAPT	글루타메이트성 및 GABA 성	50% (피질), 30% (소뇌), 20% (SC)	시험되지 않음	(Hu, Qin et al. 2019)
성상교세포	<i>Neurog2</i> , <i>Nurr1</i>	글루타메이트성 및 GABA 성	80%	전기생리학적 활성, 활동 전위 생성, 시냅스 형성, 장거리 축삭 돌기	(Mattugini, Bocchi et al. 2019)
선조체 성상교세포	<i>Ascl1</i> , <i>Neurod1</i> , <i>Nurr1</i>	DA	16%	전기생리학적 활성, 활동 전위 생성, 운동 행동 회복	(Rivetti di Val Cervo, Romanov et al. 2017)
선조체 뉴런	<i>Sox2</i> , <i>Nurr1</i> , <i>Lmx1a</i> 및 <i>Foxa1</i> TF 및 발프로산,	DA	79%	전기생리학적 활성, 활동 전위 생성, 도파민 회복	(Niu, Zang et al. 2018)
피질 성상교세포	<i>Neurod1</i>	글루타메이트성 뉴런	92.8%	전기생리학적 활성, 활동 전위 생성	(Guo, Zhang et al. 2014)
NG2 교세포	<i>Neurod1</i>	글루타메이트성 및 GABA 성	42.5%	전기생리학적 활성, 활동 전위 생성	(Guo, Zhang et al. 2014)
선조체 미세아교세포	<i>Neurod1</i>	글루타메이트성 및 GABA 성	25-35%	전기생리학적 활성, 활동 전위 생성 및 자발적인 시냅스 전류	(Matsuda, Irie et al. 2019)
반응성 성상교세포	<i>Neurod1</i>	글루타메이트성 및 GABA 성	70%	전기생리학적 활성, 활동 전위	(Chen, Ma et al. 2020)

[0046]

공급원 세포	인자	아형	효율	기능성 결과	참고문헌
선조체 비-반응성 성상교세포	<i>Neurod1</i>	글루타메이트성 뉴런	80%	생성, 운동 행동 개선	(Brulet, Matsuda et al. 2017)
피질 성상교세포 (뇌졸중)	<i>Neurod1</i>	글루타메이트성	20-27%	운동 활동 개선 및 기능 회복	(Livingston, Lee et al. 2020)
선조체 성상교세포	<i>Neurod1</i> , <i>Dlx2</i>	GABA 성 중간 가시 뉴런	80%	전기생리학적인 활성, 활동 전위 생성, 수명 연장 및 운동 기능 개선	(Wu, Parry et al. 2020)

[0047]

[0048]

본 명세서에 제공되는 전사 인자 돌연변이체는 하나 이상의 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위에 치환 돌연변이, 예컨대, 세린 대 알라닌 또는 트레오닌 대 알라닌을 포함한다. 각각의 경우에 치환 돌연변이는 전사 인자 활성화에 영향을 주지 않고 돌연변이된 부위에서 인산화를 중단시키는 기능을 한다. 본 명세서에 제공된 예는 세린 또는 트레오닌의 알라닌으로의 치환을 포함하지만, 다른 치환도 가능하다. 예를 들어, 표적화된 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 인산화 부위(들)의 세린 또는 트레오닌은 알라닌과 유사한 생화학적 특성(예를 들어, 크기, 전하 및 소수성)을 갖는 아미노산; 예컨대, 글리신, 발린, 류신 또는 아이소류신으로 대체될 수 있다. 대안적으로, 돌연변이체는 세린 또는 트레오닌의 D-아미노산, 예컨대, D-세린, D-트레오닌, D-알라닌, D-글리신, D-발린, D-류신 또는 D-아이소류신으로의 치환을 함유할 수 있다.

[0049]

bHLH 전사 인자에서 모든 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위의 돌연변이는 신경 분화를 유도하는 전사 인자 능력의 저해를 감소시키거나 제거한다는 점에서 최대 효과를 제공할 것이다. 그러나, 이러한 bHLH 전사 인자는 가변저항기(rheostat)와 유사한 방식으로 조절되며, 이에 따라 인산화 정도는 활성의 다양한 제어를 제공한다. 결과적으로, 자연 발생 서열에 존재하는 모든 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위를 돌연변이시키는 것이 항상 필요한 것은 아니다. 특히, 일부 실시양태에서, 최대 효과는 필요하지 않거나 유익하지 않으며, 저해 제어의 부분적인 감소만이 요구된다. 이러한 경우에, 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위 중 전체보다 적은 수가 돌연변이된다. 이들 실시양태에서, bHLH 전사 인자는 가변저항기처럼 제어되기 때문에, 저해 제어의 변화를 허용하는 것은 돌연변이의 위치보다는 돌연변이의 수이다.

[0050]

일부 실시양태에 따르면, 본 명세서에 제공된 bHLH 전사 인자 돌연변이체는 하나 이상의 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위에서 세린 또는 트레오닌의 치환을 포함한다. 대안적으로, 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 2개 이상의 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위에서, 또는 3개 이상의 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위에서, 또는 4개 이상의 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위에서, 또는 5개 이상의 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위에서 세린 또는 트레오닌 잔기의 치환을 포함한다. 다른 실시양태에서, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 자연 발생 서열에 존재하는 모든 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위에서 세린 또는 트레오닌의 치환을 포함한다.

[0051]

포유동물 bHLH 전사 인자를 암호화하는 유전자는 고도로 보존되어 있다. 이러한 보존은 마우스 대 인간 암호 서열(NCBI 참조 서열 사용)의 BLAST 정렬로부터 설명되며, 이는 다음 백분율 동일성을 제공한다: *Asc11* 89.73%; *Neurod1* 90.78%; *Neurod4* 87.41%; *Neurog2* 82.54%. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 인간 또는 마우스 서열을 기반으로 한다. 그러나, 서열 유사성을 고려할 때, 마우스 서열과 같은 비인간 포유동물 서열에 기반한 돌연변이가 인간에게 유용하다.

[0052]

돌연변이체 bHLH 전사 인자 단백질은 자연 발생 단백질의 상응하는 서열과 적어도 90% 또는 보다 바람직하게는 적어도 93%, 적어도 95% 또는 적어도 97% 동일한 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있으며, 이는 상기에 기재된 바와 같이 적어도 하나의 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 인산화 부위의 돌연변이를 포함한다.

[0053]

서열 동일성 백분율은 정렬된 아미노산 서열에서 일치하는 위치의 수를 결정하고, 일치하는 위치의 수를 정렬된 아미노산의 총 수로 나누고, 100을 곱하여 계산된다. 일치하는 위치는, 동일한 아미노산이 정렬된 아미노산 서열의 동일한 위치에서 발생하는 위치를 지칭한다. 또한, 서열 동일성(%)은 임의의 핵산 서열에 대해 결정될 수 있다.

[0054]

일부 실시양태에 따르면, 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 돌연변이체 전신경 bHLH 전사 인자이다. 특정 실시양태에서, 돌연변이체 전사 인자는 인간 또는 마우스 전신경 bHLH 전사 인자에 기반한다. 다른 실시양태에 따르면, 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 돌연변이체 신경 분화 bHLH 전사 인자이다. 특정 실시양태에서, 돌연변이체 전사 인자는 인간 또는 마우스 뉴런 bHLH 전사 인자에 기반한다. 다른 유기체로부터 유래된 bHLH 전사 인자 서열이

상응하는 돌연변이체의 설계를 위해 사용되는 정도로, 상응하는 아미노산 위치는 예를 들어, 쌍별 또는 다중 서열 정렬에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0055] 일부 실시형태에서, 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 포스포억셉터 부위 돌연변이는 루프/헬릭스 2(L-H2) 접합부에서 단일 보존 S/T 잔기의 돌연변이와 조합되어 혼입되며, 이는 PKA에 의해서 인산화되어 척추동물 및 무척추동물의 전신경 TF 둘 다에 대해 이진 '오프' 스위치 역할을 한다(Quan et al. Cell 2016 Jan 28;164(3):460-75. Doi: 10.1016/j.cell.2015.12.048).

[0056] 일부 실시형태에 따르면, Neurog2, Ascl1, Neurod4 및 Neurod1 전사 인자 돌연변이체가 제공된다. 표 1은 이러한 전사 인자에 존재하는 프롤린-지향 세린-트레오닌 키나제 인산화 부위의 수를 열거하며, 이들 중 세린을 포함하는 것은 "SP"로 식별되고 트레오닌을 포함하는 것은 "TP"로 식별된다.

표 1

유전자	인간		마우스	
	SP	TP	SP	TP
ASCL1	5		6	
NEUROD1	6		6	
NEUROD4	4	6	3	4
NEUROG2	8	1	9	1

[0057]

[0058] 인간 및 마우스 야생형 ASCL1의 예시적인 아미노산 서열이 하기에 제시되며, 여기서 인산화 부위는 음영 처리되어 있고 상자로 표시된 잔기는 PKA에 의해서 인산화된 L-H2 접합부에서 보존된 세린 잔기인 세린 155/150이다:

인간(서열번호 1):

MESSAKMESGGAGQQPQPQPFPFLPPAACFFATAAAAAAAAAAAAAQSAQQQQQQQ
 QQQQAPQLRPAADGQPSGGGHKSAPKQVKRQRSSPELMRCKRRLNFSGFGYSLPQ
 QQPAAVARRNERERNRVKLVNLGFATLREHVPNGAANKKMSKSVETLRSVEYIRAL
 QQLLDEHDAVSAAFQAGVLSPTISPNYSNDLNSMAGSPVSSYSSDEGSYDPLSPEEQ
 ELLDFTNWF

[0059]

마우스(서열번호 2):

MESSGKMESGAGQQPQPQPFPFLPPAACFFATAAAAAAAAAAAAAQSAQQQQPQAPPQQ
 APQLSPVADSQPSGGGHKSAKQVKRQRSSPELMRCKRRLNFSGFGYSLPQQQPAA
 VARRNERERNRVKLVNLGFATLREHVPNGAANKKMSKSVETLRSVEYIRALQQLLDE
 HDAVSAAFQAGVLSPTISPNYSNDLNSMAGSPVSSYSSDEGSYDPLSPEEQELLDFT
 NWF

[0060]

[0061] 일부 실시형태에 따르면, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 80% 동일하고 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 포스포억셉터 부위의 돌연변이를 포함하는 ASCL1 전사 인자 돌연변이체가 제공되며, 각각의 돌연변이는 상응하는 돌연변이된 포스포억셉터 부위에서 인산화를 제거한다. 보다 바람직하게는 ASCL1 전사 인자 돌연변이체는 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 85%, 90%, 95%, 97% 동일하다. 또한 본 명세서에는 서열번호 1 또는 서열번호 2와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하고 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 포스포억셉터 부위의 돌연변이를 포함하는 ASCL1 전사 인자 돌연변이체를 암호화하는 핵산이 제공되며, 각각의 돌연변이는 상응하는 돌연변이된 포스포억셉터 부위에서 인산화를 제거한다. 이들 돌연변이체는 전사 인자 활성을 보유한다.

[0062]

일례에 따르면, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 인간 *Ascl1*-SA5 또는 마우스 *Ascl1*-SA6(S62/88/185/189/202/218A; 서열번호 3)이다. 대안적으로, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 인간 *Ascl1*-SA6 또

는 마우스 *Asc11*-SA7(S62/88/150/185/189/202/218A; 서열번호 5)이며, 여기서 L-H2 접합부에서의 세린이 또한 치환된다.

[0063] 마우스 *Asc11*-SA6 돌연변이체에 대한 핵산 암호 서열(서열번호 4)이 하기에 제공되며, 돌연변이체 코돈은 음영 처리되어 있다:

ATGGAGAGCTCTGGCAAGATGGAGAGTGGAGCCGGCCAGCAGCCGCAGCCCCCGCAG
CCCTTCCTGCCTCCCGCAGCCTGCTTCTTTGCGACCGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCG
GCGGCCGCGGCAGCTCAGAGCGCGCAGCAGCAACAGCCGAGGCGCCGCCGCGCAGCAG
GCGCCGCGAGCTGGCCCCGGTGGCCGACAGCCAGCCCTCAGGGGGCGGTCAACAAGTCA
GCGGCCAAGCAGGTCAAGCGCCAGCGCTCGTCCGCTCCGGAAGTATGCGCTGCAAA
CGCCGGCTCAACTTCAGCGGCTTCGGCTACAGCCTGCCACAGCAGCAGCCGGCCGCC

[0064] GTGGCGCGCCGCAACGAGCGCGAGCGCAACCGGGTCAAGTTGGTCAACCTGGGCTTT
GCCACCTCCGGGAGCATGTCCCAACGGCGCGGCCAACAAAGATGGCCAAGGTG
GAGACGCTGCGCTCGGCGGTGAGTACATCCGCGCGCTGCAGCAGCTGCTGGACGAG
CACGACGCGGTGAGCGCTGCCTTTTCAAGCGGGCGTCTGGCGCCACCATCGCCCC
AACTACTCCAACGACTTGAAGTCTATGGCGGGTGTCTCCGGTCTCGTCTACTCCTCC
GACGAGGGATCCTACGACCTCTTGCCCCAGAGGAACAAGAGCTGCTGGACTTTACC
AACTGGTTC (TGA)

[0065]

[0066] 마우스 *Asc11*-SA7 돌연변이체에 대한 핵산 암호 서열(서열번호 6)이 하기에 제공되며, 돌연변이체 코돈은 음영 처리되어 있다:

ATGGAGAGCTCTGGCAAGATGGAGAGTGGAGCCGGCCAGCAGCCGCAGCCCCCGCAG
CCCTTCCTGCCTCCCGCAGCCTGCTTCTTTGCGACCGCGGCGGCGGCGGCAGCGGCG
GCGGCCGCGGCAGCTCAGAGCGCGCAGCAGCAACAGCCGAGGCGCCGCCGCGCAGCAG
GCGCCGCGAGCTGGCCCCGGTGGCCGACAGCCAGCCCTCAGGGGGCGGTCAACAAGTCA
GCGGCCAAGCAGGTCAAGCGCCAGCGCTCGTCCGCTCCGGAAGTATGCGCTGCAAA
CGCCGGCTCAACTTCAGCGGCTTCGGCTACAGCCTGCCACAGCAGCAGCCGGCCGCC
GTGGCGCGCCGCAACGAGCGCGAGCGCAACCGGGTCAAGTTGGTCAACCTGGGCTTT
GCCACCTCCGGGAGCATGTCCCAACGGCGCGGCCAACAAAGATGGCCAAGGTG
GAGACGCTGCGCTCGGCGGTGAGTACATCCGCGCGCTGCAGCAGCTGCTGGACGAG
CACGACGCGGTGAGCGCTGCCTTTTCAAGCGGGCGTCTGGCGCCACCATCGCCCC
AACTACTCCAACGACTTGAAGTCTATGGCGGGTGTCTCCGGTCTCGTCTACTCCTCC
GACGAGGGATCCTACGACCTCTTGCCCCAGAGGAACAAGAGCTGCTGGACTTTACC
AACTGGTTC (TGA)

[0067]

[0068] 인간 및 마우스 야생형 *Neurod1*의 예시적인 아미노산 서열이 하기에 제시되며, 포스포엑셀터 부위는 음영 처리되어 있다(상자 안의 잔기는 PKA에 의해서 인산화된 L-H2 접합부에서 보존된 세린 잔기인 세린 138/138이다):

인간(서열번호 7)

MTKSYSESGLMGEPQPGPPSWTDECLSSQDEEHEADKKEDDLETMNAEDSLRNGG
EEDEDEDELEEEEEEDDDQPKRRGPKKKMTKARLERFKLRMRKANAREERNRM
HGLNAALDNLKVVPCYSKTQKL^SKIETLRLAKNYIWALSEILRSGKSPDLVSFVQT
LCKGLSQPTTNLVAGCLQLNPRTFLPEQNQDMPPHLPTASAFVHPYYSQSPGLPS
PPYGTMDSSSHVHVKPPPHAYSAALEPFFESPLTDCTSPSFDGPLSPPLSINGNFSF
KHEPSAEFEKNYAFTMHYPAATLAGAQSHGSIFSGTAAPRCEIPIDNIMSFDSHHH
ERVMSAQLNAIFHD

[0069]

마우스(서열번호 8)

MTKSYSESGLMGEPQPQGPFSWTDECLSSQDEEHEADKKEDELEAMNAEEDSLRNGG
EEEEDEDELEEEEEEEEEEDQKPKRRGPKKKMTKARLERFKLRMRKANARERNRM
HGLNAALDNLRKVVPCYSKTQKL[**S**]KIETLRLAKNYIWALSEILRSGKSPDLVSFVQT
LCKGLSQPTTNLVAGCLQLNPRTFLPEQNPDMPPHLPTASASFPVHPYSYQSPGLPS
PPYGTMDSSHVFHVKPPPHAYSAALEPPFESPLTDCTSPSFDGPLSPPLSINGNFSF
KHEPSAEFEKNYAFTMHYPAATLAGPQSHGSIFFSSGAAAPRCEIPIIDNIMSFDSHSH
HERVMSAQLNAIFHD

[0070]

[0071]

일부 실시형태에 따르면, 서열번호 7 또는 서열번호 8과 적어도 80% 동일하고 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 포스포엑셉터 부위의 돌연변이를 포함하는 *Neurod1* 전사 인자 돌연변이체가 제공되며, 각각의 돌연변이는 상응하는 돌연변이된 포스포엑셉터 부위에서 인산화를 제거한다. 보다 바람직하게는 *Neurod1* 전사 인자 돌연변이체는 서열번호 7 또는 서열번호 8과 적어도 85%, 90%, 95%, 97% 동일하다. 또한 본 명세서에는 서열번호 7 또는 서열번호 8과 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하고 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 포스포엑셉터 부위의 돌연변이를 포함하는 *Neurod1* 전사 인자 돌연변이체를 암호화하는 핵산이 제공되며, 각각의 돌연변이는 상응하는 돌연변이된 포스포엑셉터 부위에서 인산화를 제거한다.

[0072]

일례에 따르면, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 인간 *Neurod1*-SA6 또는 마우스 *Neurod1*-SA6(S162/ 223/ 228/ 259/ 266/ 274A; 서열번호 9)이다. 대안적으로, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 인간 *Neurod1*-SA7 또는 마우스 *Neurod1*-SA7 (S138/162/ 223/ 228/ 259/ 266/ 274A; 서열번호 11)이며, 여기서 L-H2 접합부에서의 세린이 또한 치환된다.

[0073]

마우스 *Neurod1*-SA6 돌연변이체에 대한 핵산 암호 서열(서열번호 10)이 하기에 제공되며, 돌연변이체 코돈은 음영 처리되어 있다:

ATGACCAATCATACAGCGAGAGCGGGCTGATGGGCGAGCCTCAGCCCCAAGGTCCC
CCAAGCTGGACAGATGAGTGTCTCAGTTCTCAGGACGAGGAACACGAGGCAGACAAG
AAAGAGGACGAGCTTGAAGCCATGAATGCAGAGGAGGACTCTCTGAGAAACGGGGGA
GAGGAGGAGGAGGAAGATGAGGATCTAGAGGAAGAGGAGGAAGAAGAAGAGGAGGAG
GAGGATCAAAAGCCCAAGAGACGGGGTCCCAAAAAGAAAAAGATGACCAAGGCGCGC
CTAGAACGTTTTTAATTAAGGCGCATGAAGGCCAACGCCCGGAGCGGAACCGCATG
CACGGGCTGAACGCGGCGCTGGACAACCTGCGCAAGGTGGTACCTTGCTACTCCAAG
ACCCAGAAACTGTCTAAATAGAGACACTGCGCTTGGCCAAGAACTACATCTGGGCT
CTGTCAGAGATCCTGCGCTCAGGCAAAGCCCCTGATCTGGTCTCCTTCGTACAGACG
CTCTGCAAAGGTTTTGTCCAGCCCACTACCAATTTGGTCGCCGGCTGCCTGCAGCTC
AACCCTCGGACTTTCTTGCTGAGCAGAACC CGGACATGCCCCCGCATCTGCCAACCC
GCCAGCGCTTCCTTCCCGGTGCATCCCTACTCCTACCAGGCCCTGGACTGCCCGCC
CCGCCCTACGGCACCATGGACAGCTCCACGCTCTCCACGTCAAGCCGCCGCCACAC
GCCTACAGCGCAGCTCTGGAGCCCTTCTTTGAAGCCCCCTAACTGACTGCACCGCC
CCTTCCTTTGACGGACCCCTCGCCCCGCGCTCAGCATCAATGGCAACTTCTCTTTT
AAACACGAACCATCCGCCGAGTTTGAAAAAATTATGCCTTTACCATGCACTACCCT
GCAGCGACGCTGGCAGGGCCCCAAAGCCACGGATCAATCTTCTCTTCCGGTGCCGCT
GCCCTCGCTGCGAGATCCCCATAGACAACATTATGTCTTTCGATAGCCATTTCGCAT
CATGAGCGAGTCATGAGTGCCAGCTTAATGCCATCTTTCACGAT (TAG)

[0074]

[0075]

마우스 *Neurod1*-SA7 돌연변이체에 대한 핵산 암호 서열(서열번호 12)이 하기에 제공되며, 돌연변이체 코돈은 음영 처리되어 있다:

ATGACCAAATCATAACGAGAGCGGGCTGATGGGCGAGCCTCAGCCCCAAGGTCCC
 CCAAGCTGGACAGATGAGTGTCTCAGTTCTCAGGACGAGGAACACGAGGCAGACAAG
 AAAGAGGACGAGCTTGAAGCCATGAATGCAGAGGAGGACTCTCTGAGAAACGGGGGA
 GAGGAGGAGGAGGAAGATGAGGATCTAGAGGAAGAGGAGGAAGAAGAAGAGGAGGAG
 GAGGATCAAAAGCCCAAGAGACGGGGTCCCAAAAAGAAAAGATGACCAAGGCGCGC
 CTAGAACGTTTTAAATTAAGGCGCATGAAGGCCAACGCCCGGAGCGGAACCGCATG
 CACGGGCTGAACGCGGCGCTGGACAACCTGCGCAAGGTGGTACCTTGCTACTCCAAG
 ACCCAGAACTGGCTAAAATAGAGACACTGCGCTTGGCCAAGAACTACATCTGGGCT
 CTGTCAGAGATCCTGCGCTCAGGCAAAGCCCCTGATCTGGTCTCCTTCGTACAGACG
 CTCTGCAAAGGTTTGTCCCAGCCCACTACCAATTTGGTTCGCCGGCTGCCTGCAGCTC
 AACCTCGGACTTTCTTGCTGAGCAGAACC CGGACATGCCCCCGCATCTGCCAACC
 GCCAGCGCTTCTTCCCGGTGCATCCCTACTCCTACCAGGCCCTGGACTGCCCGCC
 CCGCCCTACGGCACCATGGACAGCTCCACGTCTTCCACGTCAAGCCGCCGCCACAC
 GCCTACAGCGCAGCTCTGGAGCCCTTCTTTGAAGCCCCCTAACTGACTGCACCGCC
 CCTTCTTTTGACGGACCCCTCGCCCCGCGCTCAGCATCAATGGCAACTTCTCTTTC
 AAACACGAACCATCCGCCGAGTTTGAATAAATTATGCCTTTACCATGCACTACCCT
 GCAGCGACGCTGGCAGGGCCCCAAAGCCACGGATCAATCTTCTCTTCCGGTGCCGCT
 GCCCCTCGCTGCGAGATCCCCATAGACAACATTATGTCTTTCGATAGCCATTTCGCAT
 CATGAGCGAGTCATGAGTGCCAGCTTAATGCCATCTTTCACGAT (TAG)

[0076]

[0077]

[0078]

인간 및 마우스 야생형 *Neurod4*의 예시적인 아미노산 서열이 하기에 제시되며, 인산화 부위는 음영 처리되어 있다(상자 안의 잔기는 PKA에 의해서 인산화된 L-H2 접합부에서 보존된 세린 잔기인 세린 124/124이다):

인간(서열번호 13)

MSKTFVKSKEMGELVNTPSWMDKGLGSQNEVKEEESRPGTYGMLSSLTEEHDSIEEE
 EEEEEEDGEKPKRRGPKKKKMTKARLERFRARRVKANARERTRMHGLNDALDNLRRVM
 PCYSKTQKLSKIETLRLARNYIWALSEVLETGQTPEGKGFVEMLCGLSQPTSNLVA
 GCLQLGPPQSVLLEKHEDKSPICDSAISVHNFNYQSPGLPSPPYGHMETHLLHLKPQV
 FKSLGESSFGSHLPDCSTPPYEGPLTPPLSISGNFSLKQDGSPDLEKSYSFMPHYPS
 SSLSSGHVHSTPFQAGTPRYDVPIDMSYDSYPHHGIGTQLNTVFTE

[0079]

마우스(서열번호 14)

MAKMYMKSMDVELVNTQSWMDKGLSSQNEKQERRPGSYGMLGTLTEEHDSIEED
 EEEEEEDGDKPKRRGPKKKKMTKARLERFRARRVKANARERTRMHGLNDALDNLRRVM
 PCYSKTQKLSKIETLRLARNYIWALSEVLETGQTLEGKGFVEMLCGLSQPTSNLVA
 GCLQLGPPQSTLLEKHEEKSSICDSTISVHSFNYQSPGLPSPPYGHMETHSLHLKPQP
 FKSLGDSFGSHPPDCSTPPYEGPLTPPLSISGNFSLKQDGSPDLEKSYNFMPHYTSA
 SLSSGHVHSTPFQGTGTPRYDVPVDLSYDSYSHSIGTQLNTIFSD

[0080]

[0081]

일부 실시형태에 따르면, 서열번호 13 또는 서열번호 14와 적어도 75% 동일하고 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 포스포엑셀터 부위의 돌연변이를 포함하는 *Neurod4* 전사 인자 돌연변이체가 제공되며, 각각의 돌연변이는 상응하는 돌연변이된 포스포엑셀터 부위에서 인산화를 제거한다. 보다 바람직하게는 *Neurod4* 전사 인자 돌연변이체는 서열번호 13 또는 서열번호 14와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하다. 또한 본 명세서에는 서열번호 13 또는 서열번호 14와 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하고 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 포스포엑셀터 부위의 돌연변이를 포함하는 *Neurod4* 전사 인자 돌연변이체를 암호화하는 핵산이 제공되며, 각각의 돌연변이는 상응하는 돌연변이된 포스포엑셀터 부위에서 인산화를 제거한다.

[0082] 일례에 따르면, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 인간 *Neurod4*-SA4TA6 또는 마우스 *Neurod4*-SA3TA4(S206/ 211/ 269A; T245/ 253/ 295/ 301A; 서열번호 15)이다. 대안적으로, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 인간 *Neurod4*-SA5TA6 또는 마우스 *Neurod4*-SA4TA4(S124/206/ 211/ 269A; T245/ 253/ 295/ 301A; 서열번호 17)이며, 여기서 L-H2 접합부에서의 세린이 또한 치환된다.

[0083] 마우스 *Neurod4*-SA3TA4 돌연변이체에 대한 핵산 암호 서열(서열번호 16)이 하기에 제공되며, 돌연변이체 코돈은 음영 처리되어 있다:

```
ATGGCAAAAATGTATATGAAATCCAAGGACATGGTGGAGCTGGTCAACACACAATCC
TGGATGGACAAAGGTCTGAGCTCTCAAATGAGATGAAGGAGCAAGAGAGAAGACCG
GGCTCTTATGGAATGCTCGGAACCTTAACTGAAGAGCATGACAGTATTGAGGAGGAT
GAAGAAGAGGAAGAAGATGGAGATAAACCTAAAAGAAGAGGTCCCAAGAAAAAGAAG
ATGACTAAAGCTCGCCTTGAAAGATTTCAGGGCTCGAAGAGTCAAGGCCAATGCTAGA
GAACGGACCCGGATGCATGGCCTGAATGATGCCTTGGATAATCTTAGGAGAGTCATG
CCATGTTACTCTAAAACCTCAAAGCTTTCCAAGATAGAGACTCTTCGACTGGCAAGG
AACTACATCTGGGCCTTGTCTGAAGTCCTGGAGACTGGTCAGACACTTGAAGGGAAG
GGATTTGTAGAGATGCTATGTAAAGGTCTCTCTCAACCCACAAGCAACCTGGTTGCT
GGATGCCTCCAACCTGGGGCCTCAATCTACCCTCCTGGAGAAGCATGAGGAAAAATCT
TCAATTTGTGACTCTACTATCTCTGTCCACAGCTTCAACTATCAGGCTCCAGGGCTC
CCCGCCCCCTCCTTATGGCCATATGGAAACACATTCTCTCCATCTCAAGCCTCAACCA
TTTAAGAGTTTGGGTGACTCTTTTGGGAGCCATCCACCTGACTGCAGTGCCCCCCT
TATGAGGGTCCACTCGCACCACCCCTGAGCATTAGTGGCAACTTCTCCTTAAAGCAA
GACGGCGCCCCTGATTTGGAAAAATCCTACAATTTTCATGCCACATTATACCTCTGCA
AGTCTAAGTTCAGGGCATGTGCATTTCAGCTCCCTTTCAGACTGGCGCTCCCGCTAT
GATGTTTCCTGTAGACCTGAGCTATGATTCCTACTCCCACCATAGCATTGGAACTCAG
CTCAATACGATCTTCTCTGAT (TAG)
```

[0084]

[0085] 마우스 *Neurod4*-SA4TA4 돌연변이체에 대한 핵산 암호 서열(서열번호 18)이 하기에 제공되며, 돌연변이체 코돈은 음영 처리되어 있다:

```
ATGGCAAAAATGTATATGAAATCCAAGGACATGGTGGAGCTGGTCAACACACAATCC
TGGATGGACAAAGGTCTGAGCTCTCAAATGAGATGAAGGAGCAAGAGAGAAGACCG
GGCTCTTATGGAATGCTCGGAACCTTAACTGAAGAGCATGACAGTATTGAGGAGGAT
GAAGAAGAGGAAGAAGATGGAGATAAACCTAAAAGAAGAGGTCCCAAGAAAAAGAAG
ATGACTAAAGCTCGCCTTGAAAGATTTCAGGGCTCGAAGAGTCAAGGCCAATGCTAGA
GAACGGACCCGGATGCATGGCCTGAATGATGCCTTGGATAATCTTAGGAGAGTCATG
CCATGTTACTCTAAAACCTCAAAGCTTGCCAAGATAGAGACTCTTCGACTGGCAAGG
AACTACATCTGGGCCTTGTCTGAAGTCCTGGAGACTGGTCAGACACTTGAAGGGAAG
GGATTTGTAGAGATGCTATGTAAAGGTCTCTCTCAACCCACAAGCAACCTGGTTGCT
GGATGCCTCCAACCTGGGGCCTCAATCTACCCTCCTGGAGAAGCATGAGGAAAAATCT
TCAATTTGTGACTCTACTATCTCTGTCCACAGCTTCAACTATCAGGCTCCAGGGCTC
CCCGCCCCCTCCTTATGGCCATATGGAAACACATTCTCTCCATCTCAAGCCTCAACCA
TTTAAGAGTTTGGGTGACTCTTTTGGGAGCCATCCACCTGACTGCAGTGCCCCCCT
TATGAGGGTCCACTCGCACCACCCCTGAGCATTAGTGGCAACTTCTCCTTAAAGCAA
GACGGCGCCCCTGATTTGGAAAAATCCTACAATTTTCATGCCACATTATACCTCTGCA
AGTCTAAGTTCAGGGCATGTGCATTTCAGCTCCCTTTCAGACTGGCGCTCCCGCTAT
GATGTTTCCTGTAGACCTGAGCTATGATTCCTACTCCCACCATAGCATTGGAACTCAG
CTCAATACGATCTTCTCTGAT (TAG)
```

[0086]

[0087] 인간 및 마우스 야생형 *Neurog2*의 예시적인 아미노산 서열이 하기에 제시되며, 포스포엑셉터 부위는 음영 처리되어 있다(상자 안의 잔기는 PKA에 의해서 인산화된 L-H2 접합부에서 보존된 트레오닌 잔기인 트레오닌 149/149이다):

인간 (서열번호 19)

MFVKSETLELKEEEDVLVLGASAPALAAALPLSSSADEEEEEEPGASGGARRQGA
EAGQGARGGVAAGAEGCRPARLLGLVHDCRRPSRARAVSRGAKTAETVQRIKKTRR
LKANNRERNRMHNLNAALDALREVLPTFPEDAKLTKIETLRFHANYIWALTETLRLA
DHCGGGGGLPGALFSEAVLLSPGGASALSSSGDSPSPASTWSCTNSPAPSSSVSS
NSTSPYSCTLSPASPAGSDMDYWQPPPPDKHRYAPHLPIARDCI

[0088]

마우스 (서열번호 20)

MFVKSETLELKEEEVLMLLGSASPASATLTPMSSSADEEEDDEELRRPGSARGQGA
EAGQGVQGS PASGAGGCRPGRLLGLMHECKRRPSRSRAVSRGAKTAETVQRIKKTRR
LKANNRERNRMHNLNAALDALREVLPTFPEDAKLTKIETLRFHANYIWALTETLRLA
DHCAGAGGLQGALFTEAVLLSPGAALGASGDSPPSPSSWSCTNSPASSSNSTSPYSC
TLSPASPGSDVDYWQPPPPPEKHRYAPHLPLARDCI

[0089]

[0090] 일부 실시형태에 따르면, 서열번호 19 또는 서열번호 20과 적어도 70% 동일하고 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 포스포엑셉터 부위의 돌연변이를 포함하는 *Neurog2* 전사 인자 돌연변이체가 제공되며, 각각의 돌연변이는 상응하는 돌연변이된 포스포엑셉터 부위에서 인산화를 제거한다. 보다 바람직하게는 *Neurog2* 전사 인자 돌연변이체는 서열번호 19 또는 서열번호 20과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하다. 또한 본 명세서에는 서열번호 19 또는 서열번호 20과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일하고 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 포스포엑셉터 부위의 돌연변이를 포함하는 *Neurog4* 전사 인자 돌연변이체를 암호화하는 핵산이 제공되며, 각각의 돌연변이는 상응하는 돌연변이된 포스포엑셉터 부위에서 인산화를 제거한다.

[0091] 일례에 따르면, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 인간 *Neurog2*-SA8TA1 또는 마우스 *Neurog2*-SA9TA1(S24 /66 /192 /203 /205 /215/224/231/234A;T31A; 서열번호 21)이다. 대안적으로, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 인간 *Neurog2*-SA8TA2 또는 마우스 *Neurog2*-SA9TA2(S24/66/192/203/205/215/224/231/234A;T31/149A; 서열번호 23)이며, 여기서 L-H2 접합부에서의 세린이 또한 치환된다. 다른 실시형태에서, bHLH 전사 인자 돌연변이체는 마우스 *Neurog2*-SA9 (S24/66/192/203/205/215/224/231/234A; 서열번호 25)이다.

[0092] 마우스 *Neurog2*-SA9TA1 돌연변이체에 대한 핵산 암호 서열(서열번호 22)이 하기에 제공되며, 돌연변이체 코돈은 음영 처리되어 있다:

ATGTTTCGTCAAATCTGAGACTCTGGAGTTGAAGGAGGAAGAGGAGGTACTGATGCTG
CTGGGCTCGGCTGCCCCGGCCTCGGCGACCCCTGGCCCCGATGTCCTCCAGCGCGGAC
GAGGAGGAGGACGAGGAGCTGCGCCGGCCGGGCTCCGCGCGTGGGCAGCGTGGAGCG

[0093]

GAAGCCGGGCAGGGGGTGCAGGGCGCTCCGGCGTCGGGTGCCGGGGTTGCCGGCCA
GGGCGGCTGCTGGGCCTGATGCACGAGTGCAAGCGTCGCCCCGTCGCGCTCACGGGCC
GTCTCCCGAGGTGCCAAGACGGCGGAGACGGTGACGCGCATCAAGAAGACCCGCAGG
CTCAAGGCCAACACCGCGAGCGCAACCGCATGCACAACCTAAACGCCGCGCTGGAC
GCGCTGCGCGAGGTGCTGCCCACCTTCCCCGAGGATGCCAAGCTCACGAAGATCGAG
ACGCTGCGCTTCGCCCCACAATTACATCTGGGCGCTCACCGAGACTCTGCGCCTGGCG
GACCACTGCGCCGGCGCCGGTGGCTCCAGGGGGCGCTCTTACGGAGGCGGTGCTC
CTGGCCCCGGGAGCTGCGCTCGGCGCCAGCGGGGACGCCCCCTGCTCCACCTTCCTCC
TGGAGCTGCACCAACGCCCCGGCGTCATCCTCCAACCTCCACGGCCCCATACAGCTGC
ACTTTAGCGCCCGCTGCCCCCGGGTCAGACGTGGACTACTGGCAGCCCCACCTCCG
GAGAAGCATCGTTATGCGCCTCACCTGCCCCCTGCCAGGGACTGTATC (TAG)

[0094]

[0095]

마우스 *Neurog2*-SA9TA2 돌연변이체에 대한 핵산 암호 서열(서열번호 24)이 하기에 제공되며, 돌연변이체 코돈은 음영 처리되어 있다:

ATGTTTCGTCAAATCTGAGACTCTGGAGTTGAAGGAGGAAGAGAGGTACTGATGCTG
CTGGGCTCGGCTGCCCCGGCCTCGGCGACCCTGGCCCCGATGTCTCCAGCGCGGAC
GAGGAGGAGGACGAGGAGCTGCGCCGGCCGGGCTCCGCGCGTGGGCAGCGTGGAGCG
GAAGCCGGGCAGGGGGTGCAGGGCGCTCCGGCGTCGGGTGCCGGGGTTGCCGGCCA
GGGCGGCTGCTGGGCCTGATGCACGAGTGCAAGCGTCGCCCCGTCGCGCTCACGGGCC
GTCTCCCGAGGTGCCAAGACGGCGGAGACGGTGACGCGCATCAAGAAGACCCGCAGG
CTCAAGGCCAACACCGCGAGCGCAACCGCATGCACAACCTAAACGCCGCGCTGGAC
GCGCTGCGCGAGGTGCTGCCCACCTTCCCCGAGGATGCCAAGCTCGCGAAGATCGAG
ACGCTGCGCTTCGCCCCACAATTACATCTGGGCGCTCACCGAGACTCTGCGCCTGGCG
GACCACTGCGCCGGCGCCGGTGGCTCCAGGGGGCGCTCTTACGGAGGCGGTGCTC
CTGGCCCCGGGAGCTGCGCTCGGCGCCAGCGGGGACGCCCCCTGCTCCACCTTCCTCC
TGGAGCTGCACCAACGCCCCGGCGTCATCCTCCAACCTCCACGGCCCCATACAGCTGC
ACTTTAGCGCCCGCTGCCCCCGGGTCAGACGTGGACTACTGGCAGCCCCACCTCCG
GAGAAGCATCGTTATGCGCCTCACCTGCCCCCTGCCAGGGACTGTATC (TAG)

[0096]

[0097]

일부 예에서, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 단백질은 인산화를 제한하거나 방지하기 위해 도입된 것 외에 추가적인 치환을 포함할 수 있다. 이러한 추가적인 치환은 아미노산을 유사한 화학적 구조, 유사한 화학적 특성 또는 유사한 측쇄 부피의 다른 아미노산으로 대체하는 하나 이상의 보존적 변화를 도입할 것이다. 도입된 아미노산은 대체되는 아미노산과 유사한 극성, 친수성, 소수성, 염기성도, 산성도, 중성도 또는 전하를 가질 것이다. 대안적으로, 보존적 변화는 기존의 방향족 또는 지방족 아미노산 대신 방향족 또는 지방족인 또 다른 아미노산을 도입할 수 있다. 보존적 아미노산 변화는 당업계에 잘 알려져 있으며 20개 주요 아미노산의 특성에 따라 선택될 수 있다. 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩타이드의 기능에 영향을 미치지 않는다. 이러한 보존적 치환을 포함하는 단백질은 본 명세서에서 "보존적 변이체"로 지칭된다.

[0098]

치료 용도 및 조성물

[0099]

본 명세서에 기재된 바와 같이, 포유동물(예를 들어, 신경퇴행성 질환 또는 장애, CNS 또는 뇌 손상을 갖는 포유동물)은 상기에 기재된 바와 같은 단리된 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 신경아교 세포가 뉴런을 형성하도록 촉발하는 방식으로 포유동물 뇌(예를 들어, 대뇌 피질) 내에서 신경아교 세포, 바람직하게는 성상교세포에 전달함으로써 치료될 수 있다. 형성된 뉴런은 전기생리학적으로 기능할 수 있거나 기능하지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서 형성된 뉴런은 신경가소성을 향상시키고/키거나, 다른 세포 유형의 성장 및 발달을 지원하고/하거나, 미세환경을 변형(예를 들어, 미세환경의 독성을 감소)시키는 기능을 한다. 돌연변이체 bHLH 전사 인자는 단리되거나 정제된 단백질로서 직접 전달되거나, 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산의 발현을 통해 전달될 수 있다.

[0100]

일부 실시형태에 따르면, 2개 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자가 대상체의 치료에 사용된다. 2개 이상의 돌연

변이체는 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있다.

[0101] 신경퇴행성 질환 또는 장애는 예를 들어, 알츠하이머병(AD), 초로성 및 노인성 형태; 경도 인지 장애; 알츠하이머병 관련 치매; 타우병증; α -시누클레인병증; 파킨슨병; 근위축성 측색 경화증(ALS); 운동 뉴런 질환; 경직성 하반신 마비; 헌팅턴병, 척수소뇌실조증, 프리드리히 운동실조증; 상응하는 유전자 내의 트라이- 또는 테트라-뉴클레오타이드 요소의 병리학적 확장으로 인해 발생하는 폴리글루타민, 폴리알라닌 또는 다른 반복부를 갖는 단백질의 세포내 및/또는 뉴런내 응집체와 연관된 신경퇴행성 질환; 다운 증후군; 프리온 관련 질환; 가족성 영국 치매; 가족성 덴마크 치매; 경직성 운동실조를 동반한 초로기 치매; 뇌 아밀로이드 혈관병증, 영국형; 경직성 운동실조를 동반한 초로기 치매, 뇌 아밀로이드 혈관병증, 덴마크형; 과립성 치매, 피질기저핵 변성, 권투 선수 치매, 석회화를 동반한 미만성 신경섬유 엉킴, 파킨슨증을 동반한 전두측두엽 치매, 프리온 관련 질환, 할러보든-스파츠병, 근긴장성 이영양증, 니만-픽병 C형, 신경섬유엉킴을 동반한 비-구아마니아 운동 뉴런 질환, 픽병, 뇌염후 파킨슨증, 프리온 단백질 뇌 아밀로이드 혈관병증, 진행성 피질하 신경아교증, 진행성 핵상 마비, 아급성 경화성 범뇌염 및 엉킴 치매; 루이소체를 동반한 치매, 신경아교 세포질 봉입체를 포함한 다계통 위축증, 샤이-드래거 증후군, 선조체 흑질 변성, 올리브교 소뇌 위축, 뇌 철 축적을 동반한 신경변성 I형 후각 기능 장애 및 근위축성 측색 경화증; 경직성 하반신마비 및 척수소뇌 운동실조증은 DRPLA 또는 마차도-조셉병; 프리온 관련 질환 크로이츠펠트-야콥병, 게르스트만-슈트로이스러-샤잉커병 및 변종 크로이츠펠트-야콥병일 수 있다. 바람직하게는, 신경퇴행성 질환 또는 장애는 ALS, AD, 알츠하이머병-관련 치매, 파킨슨병, 다운 증후군, 권투 선수 치매, 다계통 위축증, 전두엽 측두엽 치매, 진행성 핵상 마비, 프리온 질환, 헌팅턴병, 운동 뉴런 질환 또는 루이소체병이다. 뇌 또는 CNS 손상은 예를 들어, 외상, 뇌진탕, 뇌졸중, 종양, 감염, 약물 남용, 저산소증, 무산소증, 동맥류, 신경학적 질병 질환으로부터 유발되는 손상, 독소, 색전증, 혈중, 뇌출혈, 유전 질환으로부터 유발되는 인한 손상 또는 혼수상태일 수 있다.

[0102] 본 출원은 돌연변이체 bHLH 전사 인자 및 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 부형제 또는 담체를 포함하는 조성물을 추가로 제공한다. 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자의 전달을 위한 조성물은 나노담체 또는 나노입자, 예를 들어, 리포솜 또는 생체재료의 형태일 수 있다(이러한 전달 제형에 대한 검토는 문헌 [Khait NL, Ho E, and Shoichet MS, *Advanced Functional Materials*, special issue on Advanced Materials for Drug Delivery and Theranostics. (2021) 2010674: 1-32]을 참조하기 바란다). 이러한 전달 제형은 돌연변이체 bHLH 전사 인자(들)를 CNS에서 표적 신경아교 세포로 특이적으로 지향시키기 위한 표적화 요소를 추가로 혼입할 수 있다.

[0103] 일부 실시형태에서, 뉴런 계통 전환의 효율성을 개선시키거나 아형 아이덴티티를 부여하기 위해서, 돌연변이된 bHLH 전사 인자는 하나 이상의 다른 전사 인자(TF)와 함께 사용된다. 본 명세서에 기재된 돌연변이체 bHLH 전사 인자와 함께 발현될 수 있는 운명 결정인자로서 작용하는 다른 TF는 지역적 아이덴티티를 지정하는 호메오도메인 TF(Dlx1, Dlx2, Pax6, Emx1, Lhx2), 층 V 결정인자(Fezf2, Ctip2), Nurr1(공식 유전자 명칭 Nr4a2, 신경 재프로그래밍 효율을 증가시킴), Brn2(공식 유전자 명칭 Pou3f2, Ascl1과 협력하여 신경발생을 촉진시킴), Sox 패밀리의 TF(신경 아이덴티티를 지정함) 및 Myt1l(대체 비-신경 세포 운명의 다중-계통 억제 인자임)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 분화된 세포의 전환분화 방법에서 이들 TF 중 몇몇의 사용은 본 명세서에 참조에 의해 포함된 유럽 특허 출원 제EP 3 099 786호에 기재되어 있다.

[0104] 대안적으로, 또한 본 명세서에 기재된 바와 같이, 포유동물(예를 들어, 신경퇴행성 질환 또는 장애, CNS 또는 뇌 손상을 갖는 포유동물)은 상기에 기재된 바와 같은 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 발현하도록 설계된 핵산을 신경아교 세포가 뉴런을 형성하도록 촉발하는 방식으로 포유동물 뇌(예를 들어, 대뇌 피질) 내에서 신경아교 세포, 바람직하게는 성상교세포에 투여함으로써 치료될 수 있다. 상기에 기재된 바와 같이, 형성된 뉴런은 전기생리학적으로 기능할 수 있거나 기능하지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서 형성된 뉴런은 신경가소성을 향상시키고/키거나, 다른 세포 유형의 성장 및 발달을 지원하고/하거나, 미세환경을 변형(예를 들어, 미세환경의 독성을 감소)시키는 기능을 한다.

[0105] 따라서, 본 출원은 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 발현하도록 설계된 핵산 또는 핵산 작제물을 추가로 제공한다. 핵산은 제어 서열과 양립 가능한 조건 하에서 적합한 숙주 세포에서 암호 서열의 발현을 지시하는 하나 이상의 제어 서열에 작동 가능하게 연결된, 본 명세서에 기재된 바와 같은 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0106] 일부 실시형태에서, 핵산은 표적 신경아교 세포를 발현하기 위해서 설계된다. 대안적으로, 핵산은 돌연변이체 bHLH 전사 인자의 제조를 위해서, 박테리아 시스템과 같은 시험관내 시스템에서 발현되도록 설계된다. 또한 본

명세서에는 이러한 핵산 및 하나 이상의 회색제, 부형제 또는 담체를 포함하는 조성물이 제공되며, 이는 조성물이 대상체를 치료하기 위한 투여용인 경우 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 회색제, 부형제 또는 담체이다.

[0107] 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 더하여, 핵산은 암호 서열에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 조절 요소를 함유할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "작동 가능하게 연결된"은 암호화된 폴리펩타이드의 발현을 허용하거나 용이하게 방식으로의 핵산에 상대적인 벡터 내의 조절 요소의 배치를 지칭한다. 조절 요소의 예는 비제한적으로 번역 개시 서열(예를 들어, 비-표적 조직에서의 발현을 회피하기 위한 Kozak 공통 서열 또는 조직-특이적 Kozak 서열(예를 들어, McClements et al. *Mol. Vis.* 2021, 27:233-242)), 프로모터 서열, 인핸서 서열, 반응 요소, 신호 펩타이드, 내부 리보솜 유입 서열, 5'UTR, 3'UTR, 폴리아데닐화 신호, 종결인자 또는 핵산의 발현(예를 들어, 전사 또는 번역)을 조절하는 유도성 요소를 포함할 수 있지만 이들로 제한되지 않는다.

[0108] 예를 들어, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 전사를 용이하게 하기 위해 프로모터가 핵산에 포함될 수 있다. 프로모터는 구성적이거나 유도성이 있을 수 있으며, 일반적 또는 조직-특이적 방식으로 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 신경아교 세포(예를 들어, 성상교세포)에서 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드의 발현을 유도하는 데 사용될 수 있는 세포-특이적 및/또는 조직-특이적 프로모터의 예는 Nestin, Vimentin, NG2, GFAP, gfaABC₃D(최소 GFAP 프로모터), Olig2, CAG, EF1a, Aldh1L1, CMV 및 CBA(키메라 CMV-닭 β-액틴) 프로모터를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 성상교세포에서 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 전사를 촉진하기 위해 GFAP 프로모터가 바이러스 벡터에 포함될 수 있다.

[0109] 돌연변이체 bHLH 전사 인자의 발현을 위해 핵산에 포함될 수 있는 추가적인 조절 요소 중에는 3'UTR 및/또는 5'UTR 서열이 있다. 특정 예에서 핵산은 야생형 *Asc11*의 3'UTR을 혼입한다. 야생형 *Asc11*에서 3'UTR은 넌센스-매개 붕괴(NMD)에 대한 메시지를 표적으로 하는 인트론을 포함한다. 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산에 *Asc11* 3'UTR을 첨가하면 전사체가 덜 안정해져서 세포가 뉴런으로 전환된 후 분해되어 신경 재프로그래밍이 달성된 후 지속적인 발현을 회피할 수 있다. 일부 예에서, bHLH 단백질이 P1 뇌 NSC를 뉴런으로 전환할 수 있지만, bHLH 단백질 발현이 유지된다면 이러한 뉴런은 시간 경과에 따라서 사멸한다(L. Cai, E.M. Morrow, and C.L. Cepko, Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. *Development* 127 (2000) 3021-30). 따라서, 일부 실시형태에서, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 유전자의 발현을 중단시키기에 유용한 조절 서열을 혼입하는 것이 유익할 수 있다.

[0110] *Asc11* 3'UTR 서열(서열번호 38)의 서열은 하기에 제시되어 있다(NM_008553.5). 음영 처리된 서열은 첫 번째 엑손이고 서열의 나머지 부분은 두 번째 엑손을 구성한다.

ggacctgccaggctctcctgggaatggactttggaagcaggatggcagcagatcctg
catctttagtggtttctcgccaacgacgtcaaatggggaggcagaaaaacaaggggaa
aaaagaagaagaatgaacaaacaaaccagacagccaacctacaggggcaccttca
ctaagatgcaatgtttctcagcaaacaggggtgggctccaacagtgtctctgcattcc
aacatcatttccagacacgagaagagtgactgggtgtctgaacctaaagcccgaatcac
agatgggttcccttctcctggagcaagagcgtcacacacacacacacacacagacag
acactatattaactcccaaccactaacaggcagggctggaagcgcgcagtgtgcaagt
gccttcacctcccactctctgtcagagctgtcttagccccctgaaactgggttgatg
tctttcctcagtcacccccattccagcgtctatggacatttgccctccattgaagca
acgtcagttctcggacagcctttccctctcctgggtggcctcctcccaaacccaca
tcgccccccacgggtctttgcttctgttttcttcatagaatgcttccaatctttgtg
aattttttattataagaaaaaatctatttgatatctatcctaaccagtttggggat
atattaagatatattttgtacataagaaaaagagagagaaaaatttatagaagtttt
gtacaaatgggttaaaaatgtgtatatcttgatactttaacatgtaatgagattacc
tctgctacttttagatatgtagttcatcttacaactgccatccccacccccatcccc
agtgtggttttgaaagaactctcctcataggtgagatctaaatgccaccagaatga
cttcagcaccaatgtgtcttacttcacagaaacgtgggttaatgtattaatgatgtta
ttaaaaaaaactgttcaagaagaacaaaagtttatgcagctactgtccaaacgcaa
gtggcagcccggttggttcccataggttgcccttttggaagtttctaccattgccttcc
ccctcacacccaccccttactgttttattacaaacttacaaaaaaaagtgtataacc

[0111]

ctgtttttatacaaaactagttttgtaataaaaactttttccttttttatataaaaagaa
gagagagagagaatgaaaaaaaaa

[0112]

[0113]

발현을 중단시키기에 유용한 *Asc11* 인트론 서열(마우스;(서열번호 39))이 하기에 제공된다.

gtacgcttcatgtggggatgggcagagcctttcttgactaggtccctttttcttttt
cgggtgtggaggggggagttcacggaaggtaggggctgtctccaggaacccaggggtg
agaggaggttactatgttgttagtttgtccatctcaagtgtctagtgtgtaacttca
gtcttggccccctgagagtggttcttgcccaagtttccaagagcagaaggtcgaggtga
ggcatagagacctgcgtattgagtcctgggactttgtccaaagagatgttttacct
gacagattctccaagcctgaatagcttctaccacaccccttcaagttcacactaacc
tctcttgtttctgttacag

[0114]

[0115]

일부 실시형태에서, 뉴런 계통 전환의 효율성을 개선시키거나 아형 아이덴티티를 부여하기 위해서, 돌연변이된 bHLH 유전자는 하나 이상의 다른 전사 인자(TF)와 함께 발현된다. 암호 서열은 리보솜 스킵핑 서열(예를 들어, v2A, t2A, p2A)에 의해 분리되어 다িস트론성 전사체로부터 여러 유전자의 화학량론적 발현을 허용한다. 본 명세서에 기재된 돌연변이체 bHLH 전사 인자와 함께 발현될 수 있는 운명 결정인자로서 작용하는 다른 TF는 지역적 아이덴티티를 지정하는 호메오도메인 TF(Dlx1, Dlx2, Pax6, Emx1, Lhx2), 층 V 결정인자(Fezf2, Ctip2), Nurr1(공식 유전자 명칭 Nr4a2, 신경 재프로그래밍 효율을 증가시킴), Brn2(공식 유전자 명칭 Pou3f2, Asc11과 협력하여 신경발생을 촉진시킴), Sox 패밀리의 TF(신경 아이덴티티를 지정함) 및 Myt11(대체 비-신경 세포 운명의 다중-계통 억제 인자임)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 상기에 언급된 바와 같이, 분화된 세포의 전환 분화 방법에서 이들 TF 중 몇몇의 사용은 유럽 특허 출원 제EP 3 099 786호에 기재되어 있다.

[0116]

상기에 언급된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 2개 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자가 대상체의 치료에 사용된다. 이러한 실시형태의 일례에서, 핵산은 2개 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자에 대한 암호 서열을 포함할 수 있고, 이것은 리보솜 스킵핑 서열(예를 들어, v2A, t2A, p2A)에 의해 분리되어 다িস트론성 전사체로부터 여러 유전자의 화학량론적 발현을 허용한다. 예를 들어, 핵산은 제1 돌연변이체 bHLH 전사 인자 및 제2의 상이한 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 서열, 및 개재 t2a 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 이러한 핵산은 신경 재프로그래밍 효율을 증가시키기 위해 2개의 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 동시에 발현하는 데 유

용하다.

- [0117] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 바이러스 벡터와 같은 하나 이상의 벡터를 사용하여 포유동물에 투여될 수 있다. 핵산(예를 들어, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산)을 투여하기 위한 벡터는 적절한 물질(예를 들어, 패키징 세포주, 헬퍼 바이러스 및 벡터 작제물)를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine), edited by Jeffrey R. Morgan, Humana Press, Totowa, N.J. (2002) 및 Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, edited by Curtis A. Machida, Humana Press, Totowa, N.J. (2003)]을 참조한다. 일부 경우에, 바이러스-기반 벡터를 사용하여 분열하는 세포에서 핵산을 발현할 수 있다. 일부 경우에, 바이러스-기반 벡터를 사용하여 분열하지 않는 세포에서 핵산을 발현할 수 있다. 일부 경우에, 바이러스-기반 벡터를 사용하여 분열하는 세포 및 분열하지 않는 세포 둘에서 핵산을 발현할 수 있다. 살아있는 포유동물의 CNS 내에서 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 발현하도록 설계된 핵산을 전달하기 위한 바이러스-기반 핵산 전달 벡터는 동물 바이러스, 예컨대, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 백시니아 바이러스, 헤르페스 바이러스, 유두종 바이러스로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터(예를 들어, AAV 혈청형 2, AAV 혈청형 2/5, AAV 혈청형 2/8, AAV 혈청형 5, 또는 AAV 혈청형 9 바이러스 벡터), 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터 또는 폭스바이러스 벡터를 사용하여 성상교세포에 전달될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 분열하는 및 분열하지 않는 세포 둘 다에서 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 발현하기 위해 아데노-연관 바이러스 벡터를 사용하여 포유동물에 투여될 수 있다.
- [0118] 돌연변이체 bHLH 전사를 암호화하는 핵산에 혼입될 수 있는 부위-특이적 재조합 요소의 예는 비제한적으로 재조합 표적 부위(예를 들어, LoxP 부위) 또는 핵산의 부위-특이적 재조합을 조절하는 플립-절제(FLEX) 스위치이다. 바이러스 벡터에 포함될 수 있는 요소(들)의 선택은 비제한적으로 유도성, 표적화, 원하는 발현 수준 및 원하는 재조합 부위를 포함하는 여러 인자에 좌우된다.
- [0119] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 핵산은 비-바이러스성 벡터로 제형화될 수 있다. 비-바이러스 벡터의 예는 리포플렉스, 무기 나노입자 및 네이키드 또는 플라스미드 DNA를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 비-바이러스 벡터는 전형적으로 어떠한 바이러스 성분에도 의존하지 않는다. 일부 실시형태에서, 비-바이러스성 벡터는 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자를 암호화하는 서열을 표적 세포 염색체에 통합할 수 있는 트랜스포존 또는 이동성 DNA 요소이다.
- [0120] 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드의 발현을 위한 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터 핵산은 나노담체 또는 나노입자, 예를 들어, DNA Trojan Horse, 리포솜 또는 생체재료로 제형화될 수 있다(이러한 전달 제형에 대한 검토는 문헌[Khait NL, Ho E, and Shoichet MS, *Advanced Functional Materials*, special issue on Advanced Materials for Drug Delivery and Theranostics. (2021) 2010674: 1-32]을 참조하기 바란다). 이러한 제형은 핵산을 CNS에서 표적 신경아교 세포로 특이적으로 지향시키기 위한 표적화 요소를 추가로 혼입할 수 있다.
- [0121] 바이러스 및 비-바이러스 벡터를 포함하는 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 분자 클로닝, 중합효소 연쇄 반응(PCR), 화학적 핵산 합성 기술 및 이러한 기술의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 기술에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, PCR 또는 RT-PCR은 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산(예를 들어, 게놈 DNA 또는 RNA)을 증폭하도록 설계된 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 함께 사용될 수 있다. 그런 다음 후속 분자 클로닝 기술을 사용하여 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 바이러스 벡터(예를 들어, AAV, 예를 들어 AAV2/5, AAV2/8, AAV9) 또는 비-바이러스 벡터 내의 적절한 위치에 삽입할 수 있다.
- [0122] 대상체에서 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드의 발현을 위한 핵산을 신경아교 세포에 전달하는 것은 환경적 저해성 제어로부터의 어떠한 효과도 없이 또는 이로부터의 최소한의 효과로 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드의 효율적인 발현 및 신경아교 세포의 후속 재프로그래밍을 초래한다. 유사하게, 대상체에서 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 신경아교 세포에 전달하는 것은 환경적 저해성 제어로부터의 어떠한 효과도 없이 또는 이로부터의 최소한의 효과로 신경아교 세포의 재프로그래밍을 초래한다.
- [0123] 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드, 또는 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 발현하도록 설계된 핵산을 CNS 내의 신경아교 세포(예를 들어, 성상교세포)에 전달하기 위해서 임의의

적절한 방법이 사용될 수 있다.

- [0124] 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드, 또는 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 발현하도록 설계된 핵산을 함유하는 본 명세서에 기재된 조성물은 예를 들어, 직접 두개내 투여, 선조체내 주사, 뇌실내 주사, 수조내 주사, 실질내 주사, 척수강내 주사, 복강내 투여, 정맥내 투여, 동맥내, 비강내 투여, 근육내 투여 또는 나노입자 및/또는 약물 정제, 캡슐 또는 알약의 경구 투여를 통해서 CNS, 예컨대, 대뇌 피질 내의 신경아교 세포(예를 들어, 성상교세포)에 투여될 수 있다.
- [0125] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드, 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 발현하도록 설계된 핵산, 또는 이들의 임의의 조합은 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하거나 손상을 치료하기 위해서 신경퇴행성 질환 또는 장애, 또는 CNS 손상(예를 들어, 뇌졸중)을 갖는 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 투여된 돌연변이체 bHLH 전사 인자(들) 또는 발현된 돌연변이체 bHLH 전사 인자(들)는 신경아교 세포(예를 들어, CNS의 성상교세포)를 뉴런으로 전환하고/하거나 뉴런:교세포 비율의 균형을 다시 맞추고/거나, 흥분:억제의 균형을 다시 맞추고/거나, 손상된 뇌 조직을 복구하고/하거나, 신경아교 흥터를 감소시키고/시키거나, 신경염증을 감소시키고/시키거나, 혈액-뇌-장벽을 복원하고/하거나 독성 미세아교세포의 양을 감소시킴으로써, 신경퇴행성 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하거나, 손상을 치료하는 기능을 한다. 선택적으로, 신경퇴행성 질환 또는 장애의 치료 또는 예방, 또는 손상의 치료 방법은 2개 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 동시에 또는 순차적으로 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0126] 특정 실시형태에 따르면, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 발현하도록 설계된 핵산, 또는 이들의 임의의 조합은 ALS를 갖거나 이의 발병 위험이 있는 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 투여되거나 발현된 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드(들)는 신경아교 세포(예를 들어, 성상교세포)를 기능성 뉴런으로 전환시키고, 뉴런:신경아교 비율의 균형을 맞추고, 흥분:억제의 균형을 다시 맞추고/거나, 손상된 뇌 조직을 복구하고/하거나(예를 들어, 운동 피질 및/또는 척수의 뉴런 변성을 복구하고/하거나), 병원성 TDP-43 단백질 응집을 감소시키고/시키거나 신경염증을 감소시킴으로써 포유동물에서 ALS를 치료 또는 예방하는 기능을 한다. 선택적으로, ALS의 치료 또는 예방 방법은 2개 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 동시에 또는 순차적으로 투여하거나 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0127] 또 다른 특정 실시형태에 따르면, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 발현하도록 설계된 핵산, 또는 이들의 임의의 조합은 알츠하이머병 (AD)을 갖거나 이의 발병 위험이 있는 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 투여되거나 발현된 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드(들)는 신경아교 세포(예를 들어, 성상교세포)를 뉴런, 특히 글루타메이트성 및 GABA성 뉴런으로 전환시키고/시키거나, 흥분:억제의 균형을 다시 맞추고/거나, 뉴런:교세포 비율의 균형을 다시 맞추고/거나, 신경염증을 감소시키고/시키거나, 해마 뉴런 연결성을 증가시키고/시키거나, 플라크와의 미세아교 세포 회합을 증가시키고/시키거나 아밀로이드 플라크 제거를 자극함으로써 포유동물에서 AD를 치료 또는 예방하는 기능을 한다. 선택적으로, AD의 치료 또는 예방 방법은 2개 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 동시에 또는 순차적으로 투여하거나 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0128] 또 다른 특정 실시형태에 따르면, 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드 또는 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 발현하도록 설계된 핵산, 또는 이들의 임의의 조합은 뇌 손상, 예컨대, 뇌졸중 이후에 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 투여되거나 발현된 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드(들)는 신경아교 세포(예를 들어, 성상교세포)를 뉴런, 예를 들어, 글루타메이트성 및 GABA성 뉴런으로 전환시키고/시키거나, 흥분:억제의 균형을 다시 맞추고/거나, 뉴런:교세포 비율의 균형을 다시 맞추고/거나, 흥터 형성을 감소시키고/시키거나, 신경염증을 감소시키고/시키거나, 뉴런 연결성을 증가시키고/시키거나, 신경가소성을 증가시킴으로써 포유동물에서 손상을 치료하는 기능을 한다. 선택적으로, 뇌졸중의 치료 방법은 2개 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 동시에 또는 순차적으로 투여하거나 발현시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0129] 따라서, 본 명세서에 개시된 핵산(들), 벡터(들) 및/또는 단백질(들)을 포함하는 조성물(들)이 추가로 제공되고 사용된다. 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 희석제, 부형제, 담체 등을 포함하는 약제학적 조성물일 수 있다.
- [0130] 일부 실시형태에 따르면, 포유동물(예를 들어, 살아있는 포유동물) 내의 뇌(예를 들어, 대뇌 피질)를 모니터링하여 본 명세서에 기술된 치료의 효과를 평가할 수 있다. 포유동물에 존재하는 질환, 장애 또는 뇌 손상이 효과

적으로 치료되고 있는지 여부를 결정하기 위해 임의의 적절한 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 영상 기술 및/또는 실험실 검정을 사용하여 포유동물의 뇌 내에 존재하는 성상교세포 수 및/또는 뉴런 수를 평가할 수 있다. 일부 경우에, 영상 기술 및/또는 실험실 검정을 사용하여 임의의 돌연변이체 bHLH 전사 인자-매개 효과(예를 들어, converting 신경아교 세포(예를 들어, 성상교세포)의 기능성 뉴런으로의 전환, 뉴런:교세포 비율의 재균형화, 손상된 뇌 조직의 복구(예를 들어, 신경아교 흉터 형성의 감소), 신경염증의 감소, 혈액-뇌-장벽의 복원, 신경혈관 단위의 복원, 독성 미세아교세포 양의 감소, 해마 뉴런 연결성의 증가, 플라크와의 미세아교세포의 증가 및/또는 아밀로이드 플라크 제거의 자극)가 관찰되는지 여부를 평가할 수 있다. 일부 경우에, 영상 기술 및/또는 실험실 검정을 사용하여 실시예에 기재된 바와 같을 수 있는 돌연변이체 bHLH 전사 인자-매개 효과를 평가할 수 있다. 치료된 대상체에서, 예를 들어, PET, MRI 또는 CT 스캔을 사용하여 치료 효과를 모니터링할 수 있다.

[0131] 또한, 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드(예를 들어, *Neurog2*-SA9, *Ascl1*-SA6, *Neurod4*-SA3/TA4, *Neurod1*-SA6 또는 이들의 임의의 조합) 또는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 돌연변이체 bHLH 전사 인자 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 키트가 제공된다. 키트는 또한 본 명세서에 기재된 임의의 방법을 수행하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 키트는 본 명세서에 기재된 임의의 조성물의 적어도 1회 용량을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 임의의 조성물을 투여하기 위한 수단(예를 들어, 주사기)을 제공할 수 있다.

[0132] 본 명세서에 기재된 본 발명의 더 양호한 이해를 얻기 위해, 다음 실시예가 제시된다. 이러한 예는 단지 설명을 위한 것임을 이해해야 한다. 따라서 이들은 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한해서는 안 된다.

[0133] 실시예

[0134] 실시예 1: ALS 요법을 위한 뉴런 계통 전환

[0135] 근위축성 측색 경화증(ALS)은 뇌 및 척수의 운동 뉴런의 손실을 초래하여 운동 기능의 악화를 초래하고 궁극적으로 사망에 이르게 하는 말기 신경퇴행성 질환이다. 성상교세포는 뉴런 독성에 기여하며, 다잉 포워드(dying forward) 모델은 뉴런 변성이 운동 피질에서 먼저 발생하여 척수의 운동 신경 세포 사멸을 유발한다는 것을 시사한다. 본 실시예에서, 운동 피질 성상교세포의 뉴런 계통 전환을 ALS 환자에서 발견되는 G93A 돌연변이를 보유하는 인간 *SOD1* 트랜스젠을 발현하는 hSOD1^{G93A} 트랜스제닉 마우스를 사용하여 질환 진행을 지연시키는 수단으로서 연구하였다. 성상교세포의 뉴런으로의 전환을 촉진하기 위해서, 6개의 세린이 알라닌으로 전환된 전신경 유전자 *Ascl1*의 변형된 형태(Ascl1-SA6)의 잘못된 발현은 배아 뇌의 뉴런 전환율을 향상시킨다. 유전자 전달은 신경아교 섬유 산성 단백질(GFAP) 프로모터의 제어 하에 아데노-연관 바이러스(AAV) 2/5를 벡터로 사용하여 달성되었다. Ascl1-SA6이 Ascl1보다 더 효율적으로 피질 성상교세포를 뉴런으로 전환할 수 있다는 것을 처음 확인하였다. 그런 다음, 질환 진행에 대한 피질 성상교세포에서의 Ascl1-SA6의 잘못된 발현의 효과를 모니터링하였는데, 이는 hSOD1^{G93A} 트랜스제닉 마우스가 체중을 더 잘 유지할 수 있고 더 양호한(즉, 더 낮은) 신경점수를 유지하며, 개선된 운동 기능의 징후를 가짐을 나타내었다. 종합하면, 이들 데이터는 운동 피질 성상교세포를 표적으로 하는 뉴런 계통 전환이 ALS 치료를 위한 치료 전략으로 사용될 수 있음을 입증한다.

[0136] 도입부

[0137] ALS는 운동 피질의 상부 운동 뉴런 및 이들의 신경분포 표적, 골격근, 내장 및 심장 근육에 신경을 분포시키는 뇌줄기 및 척수의 하부 운동 뉴런의 사멸과 연관된다^{1,2}. 하부 운동 뉴런의 손실은 근육 신경 제거, 근육 위축 및 궁극적으로 사망을 유발한다². 이러한 질환에 대한 대부분의 연구는 척수 운동 뉴런에서 나타나는 병리학에 초점을 두었지만, 최근 증거는 뉴런 변성이 운동 피질에서 시작된 후 척수로 진행되는 다잉 포워드 모델을 뒷받침한다. 이 모델을 뒷받침하기 위해, 경두개 자기 자극(TMS)은 ALS 환자의 임상 운동 증상 이전에 피질의 과흥분성의 증가를 나타내었다³. 마찬가지로, ALS의 동물 모델인 hSOD1^{G93A} 트랜스제닉 마우스에서 수지상 퇴행, 척추 손실 및 과흥분성은 출생 후 제30일(P)에 증상 발병 전에 운동 피질에서 관찰되었다⁴.

[0138] 또한, 다잉 포워드 모델은 운동 피질의 병리학이 척수 질환에 선행할 뿐만 아니라 질환을 진전시킬 수도 있다고 제안하였다. 이 모델의 결과로서, 상부 운동 뉴런의 사멸을 방지함으로써 질환 진행이 지연될 수 있다고 제안되었다. 이 발견과 일치하게, 증상 발병 전 hSOD1^{G93A} 래트의 운동 피질에서 돌연변이체 *SOD1*의 억제는 질환 진행을 지연시키고, 생존율을 높이며, 하부 운동 뉴런 및 신경근 접합부 변성을 지연시킨다⁵. 또한, 신경아교 세포

-유래 신경영양 인자(GDNF)를 분비하는 성상교세포로 분화되는 $hSOD1^{G93A}$ 트랜스제닉은 상부 및 하부 운동 뉴런 사멸을 모두 지연시킨다.⁶

- [0139] 성상교세포는 건강한 숙주 뇌에 이식되는 경우 병리학을 유발할 수 있기 때문에 ALS 동물 모델에서 신경 세포 사멸의 주요 원인이다.⁷ ALS 성상교세포와 연관된 독성을 예방하고 손실된 상부 운동 뉴런을 잠재적으로 대체하기 위해, 본 발명에 이르러서 뉴런 계통 전환 접근법이 개발되었다. *Neurog1*, *Neurog2*, *Ascl1* 및 *Neurod4*를 포함한 전신경 유전자는 배아 뇌의 신경발생 및 성인의 신경 재프로그래밍의 중요한 설계자로 등장한 bHLH 전사 인자(TF)를 암호화한다.⁹ 이들 bHLH 유전자는 전사 캐스케이드에서 작용하여 다른 bHLH 유전자, 예컨대, *Neurod1*를 작용하게 하는데, 이는 후기 발달 단계에서 신경 분화를 제어하는 기능을 한다. 그러나, 이러한 bHLH 유전자는 모든 세포 상황에서 활성화되지 않으며 환경 신호에 의해 저해될 수 있다. 예를 들어, 배아 피질에서, *Neurog2*는 배아일(E) E17에 끝나는 신경원성 기간 동안 후기 단계에서의 계속된 발현에도 불구하고 E11.5에서 E14.5 사이에 글루타메이트성 뉴런 운명을 지정하는 데 단지 충분하고(기능 획득에 의해서¹⁰) 필수적이다(기능 상실에 의해서)¹¹⁻¹³.
- [0140] 전신경 bHLH TF 기능이 저해되는 한 가지 방법은 "가변저항기-유사 방식"으로 작용하는 프롤린-지향 세린 트레오닌 키나제(예를 들어, GSK3, ERK1/2, Cdk5)에 의한 인산화에 의한 것이고; 세린-프롤린(SP) 또는 트레오닌-프롤린(TP) 부위가 더 많이 인산화될수록 이들 TF가 DNA에 결합하고 표적 유전자를 트랜스활성화하여 뉴런 운명 지정 및 분화를 촉진하는 능력이 적어진다^{10,14-16}. 마우스 *Neurog2*는 9개의 SP 부위가 있고 마우스 *Ascl1*에는 6개의 SP 부위가 있다. 야생형 *Ascl1*은 ERK에 의해 인산화된다¹⁶. 또한, *Ascl1*-SA6을 생성하기 위해 6개의 세린(SP)을 알라닌(SA)으로 돌연변이시키면 *Ascl1*의 프로-증식(pro-proliferative)/신경교세포 발생(gliogenic) 활성이 감소하여 거의 전적으로 신경발생을 촉진한다¹⁶. 또한 *Neurog2*는 SP 부위의 GSK3에 의해 인산화되어 *Neurog2* 전신경 활성을 감소시키는 것을 발견하였다. *Neurog2* 인산화가 저해되는 경우 *Neurog2*는 발달의 E14.5에서도 더욱 강력한 전신경 활성을 갖는다.
- [0141] 전신경 유전자의 세포 상황-의존적 활성화는 성인 뇌 및 신경 재프로그래밍까지 확장된다. *Ascl1*은 섬유아세포¹⁷⁻²², 간세포²³, 심근세포²⁴, 성상교세포²⁵의 뉴런 계통 전환 및 다능성 세포의 분화²⁶를 효율적으로 유도할 수 있지만, *Ascl1*은 성인 신피질²⁷, 해마 및 척수^{28,29}에서는 덜 효율적이다. 유사하게, *Neurog2*는 강력한 계통 전환인자가 되기 위해 다른 신호와 조합되어야 하기 때문에 신경 재프로그래밍에 덜 자주 사용된다³⁰. 따라서, 전신경 유전자가 어떻게 조절되는지 더 잘 이해함으로써 재생 의학에서 더 효율적으로 사용될 수 있다.
- [0142] 본 연구는 성상교세포 프로모터(즉, GFAP)의 제어 하에서 환경 저해성 제어의 대상이 되지 않도록 설계된 *Ascl1*-SA6으로 명명된 *Ascl1*의 변형된 버전을 사용하여 수행되었다.
- [0143] 방법
- [0144] 동물 및 유전자형분석. 동물 절차는 캐나다 동물 관리 협회회의 지침에 따라 Sunnybrook Research Institute(21-757)의 승인을 받았다. $hSOD1^{G93A}$ (B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J, JAX #008230) 및 Rosa-ZsGreen(JAX #007906) 마우스를 Jackson Laboratory에서 구입하여 C57BL/6 배경에서 유지시켰다. 마우스를 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있는 12:12시간 명/암 주기 하의 케이지에 넣었다. 유전자형분석을 위한 PCR 프라이머 및 조건은 Jackson Laboratory 프로토콜을 사용하여 수행되었다: $hSOD1^{G93A}$ 정방향: CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA(서열번호 26); 역방향: CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA(서열번호 27). Rosa-ZsGreen: 야생형 정방향: CTG GCT TCT GAG GAC CG(서열번호 28); 야생형 역방향: AAT CTG TGG GAA GTC TTG TCC (서열번호 29); 돌연변이체 정방향: ACC AGA AGT GGC ACC TGA C(서열번호 30); 돌연변이체 역방향: CAA ATT TTG TAA TCC AGA GGT TGA(서열번호 31).
- [0145] $hSOD1^{G93A}$ 마우스를 주간 체중 측정 및 일일 행동 평가를 포함하여 증상에 대해 면밀히 모니터링하여 질환 진행을 결정하였다. ALSTDI-Neuroscore를 사용하여 질환 발병 및 진행 척도를 모니터링하였다. 문헌[Hatzipetros, T., Kidd, J. D., Moreno, A. J., Thompson, K., Gill, A., & Vieira, F. G. (2015). A Quick Phenotypic 신경학적 Scoring System for Evaluating Disease Progression in the SOD1-G93A 마우스 Model of ALS. *Journal of*

visualized experiments : JoVE, (104), 53257]에 상세히 기재된 바와 같이, 점수 평가를 하기와 같이 수행하였다:

- [0146] 1. 다음이 관찰되는 경우 NS 0(증상 전)을 배정한다: 마우스가 꼬리로 매달려질 때 뒷다리가 정상적인 벌어짐을 나타내고, 즉, 측면 중앙선에서 완전히 확장되어 2초 이상 동안 이러한 자세로 유지한다. 마우스가 걸을 수 있게 되면 정상적인 보행이 관찰된다.
- [0147] 2. 다음이 관찰되는 경우 NS 1(제1 증상)을 배정한다: 마우스가 꼬리로 매달려질 때 뒷다리가 비정상적인 벌어짐을 나타내고, 즉, 측면 중앙선을 향해 늘어지거나 부분적으로 늘어지거나 꼬리 매달기 동안 떨어지거나 또는 움츠리거나/움켜쥔다. 마우스가 걸을 수 있게 되면 정상적이거나 약간 느린 보행이 관찰된다.
- [0148] 3. 다음이 관찰되는 경우 NS 2(부전 발병)을 배정한다: 마우스가 꼬리로 매달려질 때 뒷다리가 많이 확장되지는 않지만 부분적으로 또는 완전히 늘어진다. (아직 관절 움직임이 있을 수 있다.) 마우스가 걸을 수 있게 되면 뒷다리는 전진 동작에 사용되지만 발가락은 90cm 걷기 동안 적어도 2회 아래쪽으로 말리거나 발의 임의의 일부가 케이지 바닥/테이블을 따라 끌린다. 마우스를 왼쪽과 오른쪽에 놓으면 양쪽에서 10초 이내에 오른쪽으로 이동할 수 있다.
- [0149] 4. 다음이 관찰되는 경우 NS 3(마비)을 배정한다: 마우스가 꼬리로 매달려질 때 뒷다리에 경직된 마비가 있거나 최소한의 관절 움직임이 있다. 마우스가 걸을 수 있게 되면 전진 동작이 있지만 뒷다리는 전진 동작에 사용되지 않는다. 마우스를 왼쪽과 오른쪽에 놓으면 양쪽에서 10초 이내에 오른쪽으로 이동할 수 있다. 참고: 드물게, 마비가 시작된 후 소변 습기가 뒷다리에 나타날 수 있다. 소변 습기를 처리하지 않고 방치하면 소변이 "화상"을 일으키고 피부 병변이 발생할 수 있다. 털을 밀어서 소변 습기를 처리하고, 따뜻한 물에 담가서 소변을 제거한 후 가볍게 닦아낸다. 피부 병변이 있는 경우 항생제 연고를 바른다.
- [0150] 5. 다음이 관찰되는 경우 NS 4(인도적 종점)을 배정한다: 마우스가 꼬리로 매달려질 때 뒷다리에 경직된 마비가 발생한다. 마우스가 걸을 수 있게 되면 전진 동작이 없다. 마우스를 왼쪽과 오른쪽에 놓으면 어느 쪽에서도 10초 이내에 오른쪽으로 이동할 수 없고, 즉, 직립 반사가 없다.
- [0151] 마비가 축적되어 동물이 15초 이내에 더 이상 스스로 직립하지 않고/거나 연령이 일치하는 대조군과 비교하여 체중이 20% 감소하고/하거나, 그루밍을 할 수 없고/없거나 방광 기능장애의 징후를 나타내면 질환 말기에 도달한다. 이 동물을 즉시 희생시켰다.
- [0152] AAV 클로닝. AAV2/5-GFAP-iCre 및 AAV2/5-GFAP-Ascl1-SA6-t2a-iCre를 GenScript™에 의해서 클로닝하고, VectorBuilder™ Inc에 의해서 패키징한다.
- [0153] AAV의 두개내 주사. 두개내 주사를 위해, 16주령 C57BL/6(한배 새끼 대조군) 또는 hSOD1^{G93A} 마우스를 아아이스 플루란(2%, 1L/분)을 사용하여 마취하고 부프레노르핀(0.1mg/kg), 베이트릴(2.5 mg/kg) 및 식염수(0.5ml)를 피하 주사하였다. 운동 피질 위의 두개골을 통해 천공 구멍을 뚫고, 스테레오택스를 사용하여 주입용 브레그마 및 람다 수준을 식별하였다(AP: +2.15mm, L/M: ±1.7mm, DV: -1.7mm). AAV2/5-GFAP-iCre 또는 AAV2/5-GFAP-Ascl1-SA6-2a-iCre를 30게이지 바늘을 갖는 5 μ l의 Hamilton 주사기를 사용하여 10분에 걸쳐 0.1 μ l/분으로 1 μ l의 총 부피에 1.0 $\times 10^{12}$ /ml로 주입하였다. 21일 후, 기재된 바와 같이 동물을 희생시키고 조직을 수거하였다. 실험 종점까지 체중, NS, 운동 행동 검사(로타로드, 악력 및 보행 분석)를 확인함으로써 질환 진행을 측정하였다. 마우스를 양쪽으로 눕힌 후 30초 이내에 스스로 똑바로 설 수 없을 때 이들을 희생시켰다.
- [0154] 조직 처리 및 절편화. 관류 전에 마우스를 케타민(75mg/kg)과 자일라진(10mg/kg)으로 마취시켰다. 얼음 냉각된 식염수(0.9% NaCl), 그 다음 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 4% 파라폼알데하이드(PFA)를 10ml/분의 유량으로 연동 펌프를 대략 5분 동안 사용하여 대략 20배의 혈액 부피로 심장내 관류를 수행하였다. 뇌 및 척수를 수집하고, PBS 중의 4% PFA에 밤새 후고정하고, 20% 수크로스/1X PBS에 4℃에서 밤새 동결보호하고, O.C.T 화합물(Tissue-Tek® O.C.T.Compound, Sakura® Finetek, 미국 펜실베이니아주 소재)에 포매하고, -80℃에서 저장하였다. 관상 뇌 절편을 Leica CM3050™ 크리오스타트(Leica Microsystems Canada Inc., 캐나다 온타리오주 리치몬드 힐 소재)에서 30 μ m로 절단하고, Fisherbrand™ Superfrost™ Plus Microscope Slides(Thermo Fisher Scientific, 캐나다 온타리오주 오타와 소재)에서 수집하였다.
- [0155] 면역염색. 슬라이드를 PBS로 세척한 다음 실온에서 10% 말 혈청(HS), 0.075% 소 혈청 알부민(BSA) 및 PBS 중의 0.3% Triton-X-100에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 차단 후 항체 용액(PBS 중의 10% HS, 0.75% BSA 및 0.1% Triton-X-100) 중의 토끼 항-GFAP(1:500, #G9260, Sigma Aldrich Canada, 캐나다 온타리오주 미시소거 소재)와

함께 4℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 1차 항체는 토끼 항-zsGreen(1:500, Takara #632474), 토끼 항-NeuN(1:500, Abcam #ab177487), 토끼 항-GFAP(1:500, DakoCytomation #Z0334), 래트 항-GFAP 항체(1:500, Thermo Fisher Scientific #13-0300), 토끼 항-Sox9(1:500, Millipore #AB5535), 토끼 항-Tbr1(1:500, Abcam #Ab31940), 마우스 항-Satb2(1:500, Abcam #ab51502), 래트 항-Ctip2(1:100, Abcam, ab18465) 및 토끼 항-S100b(1:100, Dako/Agilent #Z031129-2)를 포함하였다. 슬라이드를 PBS 중의 0.1% Triton-X-100에서 각각 10분 동안 3회 세척하고, Alexa568(1:500; Invitrogen Molecular Probes™, ThermoFisher Scientific, 캐나다 온타리오주 마감 소재), Alexa488(1:500; Molecular Probes)에 접합된 중-특이적 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 슬라이드를 PBS에서 3회 세척하고, 4,6-다이아미딘오-2-페닐인돌(DAPI)(Sigma Aldrich Canada, 캐나다 온타리오주 미시소거 소재)로 대비염색하였다. 마지막으로, 슬라이드를 3회 세척한 후 Aqua-polymount™(Polysciences Inc., 미국 펜실베이니아주 소재)에 장착하였다.

[0156] RNA 동계 혼성화 비색 RNA-동계 혼성화(ISH)를 이전에 기재된 바와 같이 다이곡시게닌으로 표지된 *Asc11* 리보프로브를 사용하여 수행하였다³¹. 형광 RNA-ISH를 제조사의 지침에 따라 RNAscope® Multiplex Fluorescent Protection Kit v2(ACD #323110)를 사용하여 수행하였다. 간략하면, 뇌 절편을 4℃에서 15분 동안 후고정(4% PFA/1XPBS)시킨 후, 실온에서 50%, 70% 및 100% 에탄올에서 각각 5분 동안 탈수시키고, 10분 동안 H₂O₂ 용액에서 인큐베이션시켰다. 그 다음 절편을 95℃에서 5분 동안 1× 표적 검색 용액에서 인큐베이션시키고, dH₂O로 세척한 다음 Protease Plus™에서 40℃에서 15분 동안 인큐베이션시킨 후 세척 완충액으로 세척하였다. RNA 프로브(Mm-*Asc11* #313291 및 제공된 음성 및 양성 대조군 프로브)를 절편에서 40℃에서 2시간 동안 인큐베이션시켰다. 증폭 및 염색 단계를 Opal™ 570(Akoya #FP1488001KT; 1:1500) 형광단을 사용하여 제조사의 지침에 따라 완료하였다.

[0157] 영상화. 유전자 요법으로 표적화된 뇌 부피를 계산하기 위해서 Zeiss Axioscan™ 슬라이드 스캐너를 사용하였다. 더 높은 배율 이미지를 위해, Leica DMI8™ 형광 현미경, Zeiss Axiovert™ 200M 공초점 현미경 또는 Zeiss 관찰자 Z1™ 회전 디스크 공초점 현미경을 사용하였다. ImageJ™ 소프트웨어를 사용하여 면역표지된 세포를 계수하였다.

[0158] 행동 검정. 한배 새끼를 군별로 나누고, 성별 균형을 맞추었다. 본 연구는 검정력 0.95, 신뢰도 95% 및 효과 크기 20%를 사용하여, Cox 비례 위험 모델을 사용하여 샘플 크기 계산을 기반으로 생존 및 행동 측정을 위해 군당 12마리의 수컷 및 12마리의 암컷 hSOD1^{G93A} 동물에 대해 수행하였다.

[0159] 로타로드: 로타로드 장치에서 운동 조정력, 근력 및 균형을 평가하였다. 데이터를 기록하기 일주일 전에 마우스를 로타로드에서 훈련시켰다. 마우스를 실린더 위에 놓고 2rpm으로 회전을 시작하였다. 180초 이내에 회전 속도를 1분에 걸쳐 최대 18rpm까지 증가시켰고, 운동 뉴런 증상이 발생하면 동물은 약해지고 감지 플랫폼으로 떨어진다. 낙하 시간은 자기 스위치에 의해 감지되고 실험이 끝나면 디스플레이에 표시된다.

[0160] 악력: 악력 측정기(Bioseb™)를 사용하여 신경근 기능을 연구하였다. 100×80mm 초과와 20° 각도의 격자 홀더에서 마우스의 꼬리를 잡았다. 마우스가 격자를 단단히 잡으면 이들이 격자를 놓칠 때까지 힘 센서의 축을 따라 이들을 잡아당겼다. 악력 시험은 라운드 사이에 홈 케이지에서 5분 동안 한 번의 시험에서 3라운드로 수행하였다. 모든 악력 시험을 체중에 대해 정규화하였다.

[0161] 보행 이상: 길이 50cm, 폭 10cm의 길을 따라 걸을 때 마우스의 발자국 패턴을 모니터링하였다. 앞다리를 적색 염료로 칠했고 뒷다리를 청색 염료로 칠하였다. 발자국 패턴을 3단계 매개변수에 대해 분석하였다: 1) 보폭, 각각의 걸음 사이의 전진 이동의 평균 거리를 측정하기 위해; 2) 흔들림(sway) 거리, 좌우 뒷발자국 사이의 평균 거리를 측정하기 위해; 3) 자세 길이, 왼쪽 또는 오른쪽 앞발자국에서 오른쪽 또는 왼쪽 뒷발자국까지의 평균 거리를 측정하기 위해.

[0162] 정량화 및 통계. GraphPad Prism™ 소프트웨어를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 평균의 표준 오차(SEM)를 나타내는 평균값 및 오차 막대를 플로팅한다. 각각의 실험에 사용된 통계 시험을 도면 범례에 표시한다. 면역염색된 세포의 정량화를 조건당 적어도 3개의 뇌 및 뇌당 최소 3개의 절편에서 수행하였다.

[0163] 결과

[0164] *Asc11*의 세린 포스포억셉터 부위의 돌연변이화는 저해성 제어를 제거하여 성인 운동 피질에서 뉴런 계통 전환을 증가시킨다.

- [0165] 배아 뇌에서 *Neurog2* 및 *Asc11*의 신경발생-유도 활성을 차단하는 저해성 신호가 확인되었다^{10, 16}. 본 연구는 이러한 동일한 신호가 성인 뇌에서 뉴런 계통 전환을 유도하는 *Asc11*의 능력을 차단한다는 것을 입증하기 위해 수행되었다. 전신경 유전자 *Asc11*을 환경(특히, 부상 또는 신경퇴행성 질환)의 저해 신호에 둔감하도록 만들기 위해서, *Asc11*의 프로모인에 인접한 세린(S)을 암호화하는 6개의 뉴클레오타이드가 알라닌(A)으로 대체된 *Asc11* 돌연변이체의 돌연변이체 형태를 조작하였고 이들을 본 명세서에서 *Asc11-SA6*으로 지칭한다. *Asc11*(야생형, 변형되지 않은 유전자), *Asc11-SA6* 또는 대조군으로서의 *Neurod1*을 또한 t2a-iCre 카세트를 운반하는 성상교세포 프로모터(GFAP)의 제어 하에 AAV2/5 벡터에 클로닝하였다.
- [0166] AAV 벡터를 cre-리포터 주인 Rosa-tdtomato 마우스의 운동 피질에 두개내 주사하여 형질도입된 뉴런의 운명을 추적할 수 있게 하였다. 3주 후, 뇌를 해부하고 절편화하고 tdtomato 및 NeuN 항체로 면역염색하였다. 놀랍게도, *Asc11* 및 *Neurod1*은 약 50%의 유사한 전환 효율을 갖는 반면, *Asc11-SA6*의 잘못된 발현은 거의 75%의 뉴런 전환 효율(즉, $\text{NeuN}^+ \text{tdtomato}^+ / \text{tdtomato}^+$ 세포%) (도 1). 이러한 전환율 모두는 형질도입율에 대한 대조군인 iCre 단독 발현 후 관찰된 약 15%의 $\text{NeuN}^+ \text{zsGreen}^+ / \text{zsGreen}^+$ 세포보다 훨씬 높았다.
- [0167] AAV5-GFAP-iCre(대조군) 및 AAV5-GFAP-*Asc11-SA6*-t2a-iCre의 정위 주사를 16주령의 $\text{hSOD}^{\text{G93A}}$ 트랜스제닉 ALS 마우스에 실시하였는데, 이것은 이번에는 Rosa-zsGreen 트랜스젠을 보유하였다. 성상교세포의 뉴런으로의 전환을 NeuN 면역염색을 사용하여 모니터링하였다. 이들 동물은 질환 중점에서 희생되었으므로 효율성 전환 평가는 형질도입 후 5 내지 12주(및 17주에 한 마리)에 수집된 동물을 포함하였다. *Asc11-SA6* 발현 후 $\text{NeuN}^+ \text{zsGreen}^+ / \text{zsGreen}^+$ 세포 수(뉴런 전환 효율)의 상당한 증가가 관찰되었다. iCre 형질도입된 뇌에서는 배경 수준의 신경염색도 증가하였다. 이러한 증가에는 여러 가지 이유가 있을 수 있다는 것을 주목하기 바람; 이는 1차 형질도입 성상교세포 및 이웃하는 뉴런 사이를 이동하는 zsGreen의 인공물질 가능성이 높다. 그럼에도 불구하고, 도 2에 도시된 바와 같이, 대조군과 비교하여 *Asc11-SA6* 발현 후 뉴런 전환이 유의하게 증가하였다.
- [0168] 신경퇴행성 질환 진행을 모델링하기 위해서, ALS가 소모성 질환이기 때문에 체중 및 운동 행동을 측정하였다. 기준선 측정은 15주령의 $\text{hSOD}^{\text{G93A}}$ 및 C57B16(야생형) 수컷 마우스로 설정하였다. 15주는 $\text{hSOD}^{\text{G93A}}$ 마우스에서 증상 단계의 시작 시기이다. 결과를 도 3에 나타낸다. *Asc11-SA6* 벡터가 주사된 수컷 마우스는 시간 경과에 따라 체중을 더 잘 유지할 수 있는 것으로 관찰되었는데, 이는 향상된 뉴런 생존의 간접적인 척도 및 질환 치료의 지표이다.
- [0169] 뉴런 밀도(NeuN^+ 세포의 총 수)를 또한 연구하였다. 도 4에서 나타난 바와 같이, *Asc11-SA6* 대 iCre 대조군 형질도입된 뇌에서 더 많은 뉴런을 향한 약간의 경향이 있었다.
- [0170] ALSTDI-Neuroscore(Score Sheet Appendix 1)에 의해 캡처된 신경학적 점수(NS)를 치료된 마우스에서 모니터링하였다. 낮은 점수는 대조군 주사에 비해 *Asc11-SA6*을 주사한 더 오래 생존한 동물에서 더 양호한 건강을 나타낸다(질환 진행에 따라 점수가 증가함). 결과를 도 5에 요약한다.
- [0171] 또한, 처리된 마우스의 운동 조정력, 근력 및 균형을 평가하기 위한 로타로드 성능 시험을 사용하여, 대조군 마우스와 비교하여 *Asc11-SA6* 처리 후 개선된 운동 행동에 대한 명확한 경향이 관찰되었다. 결과를 도 6에 요약한다.
- [0172] 전반적으로, 본 연구로부터의 결과는, *Asc11*의 변형된 버전인 *Asc11-SA6*의 사용이 운동 피질 성상교세포의 뉴런으로의 전환을 유도하는 데 있어서 *Asc11*보다 더 효율적이었고, $\text{hSOD}^{\text{G93A}}$ 트랜스제닉 마우스에서 *Asc11-SA6*을 사용하여 운동 피질 성상교세포의 뉴런 계통 전환을 유도함으로써 동물은 대조군 동물보다 더 긴 시간 동안 더 높은 체중 및 더 양호한 신경점수를 유지하였다는 것을 확인해 준다. 이 동물은 또한 운동 행동이 개선되는 경향을 가졌다. 종합하면, 이 데이터는 운동 피질 성상교세포의 뉴런 계통 전환이 ALS에 대한 요법으로 유용하다는 것을 입증한다.

[0173]

참고문헌

1 de Carvalho, M. & Swash, M. Lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin Neurophysiol* **127**, 2670-2681, doi:10.1016/j.clinph.2016.03.024 (2016).

2 Turner, M. R. *et al.* Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* **12**, 310-322, doi:10.1016/S1474-4422(13)70036-X (2013).

[0174]

3 Vucic, S., Nicholson, G. A. & Kiernan, M. C. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* **131**, 1540-1550, doi:10.1093/brain/awn071 (2008).

4 Ozdinler, P. H. *et al.* Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci* **31**, 4166-4177, doi:10.1523/JNEUROSCI.4184-10.2011 (2011).

5 Thomsen, G. M. *et al.* Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* **34**, 15587-15600, doi:10.1523/JNEUROSCI.2037-14.2014 (2014).

6 Thomsen, G. M. *et al.* Transplantation of Neural Progenitor Cells Expressing Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor into the Motor Cortex as a Strategy to Treat Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cells*, doi:10.1002/stem.2825 (2018).

7 Qian, K. *et al.* Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports* **8**, 843-855, doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.003 (2017).

8 Masserdotti, G., Gascon, S. & Gotz, M. Direct neuronal reprogramming: learning from and for development. *Development* **143**, 2494-2510, doi:10.1242/dev.092163 (2016).

9 Oproescu, A. M., Han, S. & Schuurmans, C. New Insights Into the Intricacies of Proneural Gene Regulation in the Embryonic and Adult Cerebral Cortex. *Front Mol Neurosci* **14**, 642016, doi:10.3389/fnmol.2021.642016 (2021).

10 Li, S. *et al.* GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. *J Neurosci* **32**, 7791-7805, doi:10.1523/JNEUROSCI.1309-12.2012 (2012).

11 Britz, O. *et al.* A role for proneural genes in the maturation of cortical progenitor cells. *Cerebral cortex* **16 Suppl 1**, i138-151, doi:10.1093/cercor/bhj168 (2006).

[0175]

- 12 Schuurmans, C. *et al.* Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *The EMBO journal* **23**, 2892-2902 (2004).
- 13 Fode, C. *et al.* A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes & development* **14**, 67-80 (2000).
- 14 Ali, F. *et al.* Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* **138**, 4267-4277, doi:10.1242/dev.067900 (2011).
- 15 Hindley, C. *et al.* Post-translational modification of Ngn2 differentially affects transcription of distinct targets to regulate the balance between progenitor maintenance and differentiation. *Development* **139**, 1718-1723, doi:10.1242/dev.077552 (2012).
- 16 Li, S. *et al.* RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci* **34**, 2169-2190, doi:10.1523/jneurosci.4077-13.2014 (2014).
- 17 Vierbuchen, T. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**, 1035-1041, doi:10.1038/nature08797 (2010).
- 18 Pang, Z. P. *et al.* Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* **476**, 220-223, doi:10.1038/nature10202 (2011).
- 19 Caiazzo, M. *et al.* Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* **476**, 224-227, doi:10.1038/nature10284 (2011).
- 20 Son, E. Y. *et al.* Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* **9**, 205-218, doi:10.1016/j.stem.2011.07.014 (2011).

[0176]

- 21 Kim, J. *et al.* Functional integration of dopaminergic neurons directly converted from mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* **9**, 413-419, doi:10.1016/j.stem.2011.09.011 (2011).
- 22 Pfisterer, U. *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10343-10348, doi:10.1073/pnas.1105135108 (2011).
- 23 Marro, S. *et al.* Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell* **9**, 374-382, doi:10.1016/j.stem.2011.09.002 (2011).
- 24 Chuang, W. *et al.* Partial Reprogramming of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes into Neurons. *Sci Rep* **7**, 44840, doi:10.1038/srep44840 (2017).
- 25 Rivetti di Val Cervo, P. *et al.* Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol* **35**, 444-452, doi:10.1038/nbt.3835 (2017).
- 26 Yang, N. *et al.* Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. *Nat Methods* **14**, 621-628, doi:10.1038/nmeth.4291 (2017).
- 27 Grande, A. *et al.* Environmental impact on direct neuronal reprogramming in vivo in the adult brain. *Nat Commun* **4**, 2373, doi:10.1038/ncomms3373 (2013).
- 28 Jessberger, S., Toni, N., Clemenson, G. D., Jr., Ray, J. & Gage, F. H. Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* **11**, 888-893, doi:10.1038/nn.2148 (2008).
- 29 Ohori, Y. *et al.* Growth factor treatment and genetic manipulation stimulate neurogenesis and oligodendrogenesis by endogenous neural progenitors in the injured adult spinal cord. *J Neurosci* **26**, 11948-11960, doi:10.1523/JNEUROSCI.3127-06.2006 (2006).

[0177]

- 30 Gascon, S. *et al.* Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell Stem Cell* **18**, 396-409, doi:10.1016/j.stem.2015.12.003 (2016).
- 31 Touahri, Y. *et al.* Non-isotopic RNA In Situ Hybridization on Embryonic Sections. *Curr Protoc Neurosci* **70**, 1 22 21-21 22 25, doi:10.1002/0471142301.ns0122s70 (2015).

[0178]

[0179]

실시예 2: 알츠하이머병 요법을 위한 신경 계통 전환

[0180]

알츠하이머병(AD)은 개체의 인지 능력을 서서히 앓아가는 파괴적인 신경퇴행성 장애이다. AD의 점진적인 인지 저하는 아밀로이드 베타 펩타이드(A β)의 침착, 신경섬유 매듭 형성 및 뉴런 손실 등 여러 특징적인 병리학적 특징과 연관된다¹. 시냅스 손실은 AD 증상을 개시하는 것으로 가정되며, 현재까지 인지 저하와 가장 높은 신경생리학적 상관관계를 제공하였는데^{2,3}, 이는 뉴런 기능 장애가 질환 진행에 중요하다는 것을 시사한다. 그러나, 인

지 감소는 고립된 몇몇 시냅스의 장애로 인해 유도되는 것이 아니라 흥분성 세포, 저해성 세포, 신경조절 세포 사이의 상호작용을 통해 조절되는 전체 뉴런 네트워크 기능의 이상으로 인해 유도된다. 질환이 진행됨에 따라서, 특정 세포 집단의 손실은 인지 기능을 악화시키고 현재 치료 개입에 대한 복귀가 불가능한 지점을 만든다. A β 및 타우 병리학 둘 다를 나타내는 TgAD 마우스에 대한 신경병리학적 연구는 뉴런 손상 및 A β -독립적인 뉴런 손실의 가속화된 속도를 나타내었는데, 이는 AD 진행에서 타우병증의 중요한 역할을 나타내고^{4,5}, A β 축적 및 신경섬유 엉킴 형성 둘 다를 나타내는 AD 모델에서 신경 손상을 평가하는 중요성을 강조하는데, 그 이유는 이들 둘 다가 독성을 유발하고⁶ 이들의 복잡한 상호 작용은 퇴행을 악화시키기 때문이다.^{6,7}

[0181] 뇌 회로는 뉴런 네트워크를 형성하는 뉴런의 특정 하위세트를 신속하고 선택적으로 연결함으로써 정보를 처리한다. 네트워크의 역동적인 형성은 지각, 인지 및 운동 성능과 밀접하게 연관되어 있는 리드미컬하게 동기화된 뉴런 활동에서 종종 분명하게 나타난다². 전기생리학적 기록의 스펙트럼 내용은 고전적으로 주파수 대역으로 구분되며 진동 활동은 전체 상태 또는 특정 동작과 관련된다. 신경 진동은 다양한 주파수에서 발생하고; AD에 중요한 것은 운동 행동 및 기억 형성과 연관된 세타파(4 내지 8Hz) 및 의식적 사고에 역할을 하는 감마파(30 내지 200Hz)이다. 중요한 것은, 세타 및 감마 진동이 일반적인 네트워크 통신 동안 교차 주파수 커플링을 통해 상호 작용한다는 것이다. 인간 및 설치류 둘 다에서 AD와 연관된 손상된 인지 기능은 흥분성 뉴런 활동과 저해성 신경 활동 사이의 균형에 좌우되는 세타 진동 및 세타-감마 커플링^{9,10}의 일시적인 조절과 관련이 있다.

[0182] 여기서 특히 흥미로운 것은, 세타 진동의 위상이 신경 가소성의 조절(즉, 경험에 대한 반응의 신경 변화) 및 해마 및 피질 영역의 장기간 강화 유도(즉, 뉴런 시냅스의 강화 또는 활성 패턴에 기초한 다른 뉴런과의 연결)를 통해 기억 처리에 영향을 미친다는 것이다. 작업 기억을 포함한 다양한 인지 과정은 감마 진동을 조절하고^{11,12}, 이는 다시 세타 진동에 의해 조절되며¹³: 세타에 의한 감마의 이러한 조절은 감마-아미노부티르산(GABA성) 개재 뉴런의 손상되지 않은 저해 네트워크에 좌우되는 것으로 알려져 있다.

[0183] 신경펩타이드 및 칼슘 결합 단백질의 발현을 특징으로 하는 여러 유형의 GABA성 개재뉴런이 존재한다. 기억 획득은 해마(GABA성) 개재뉴런을 발현하는 과발부민(PV) 및 소마토스타틴(SST)의 발화 패턴 변화가 필요하다^{14,15}. 이러한 저해성 개재뉴런 하위 집단은 해마 흥분성 과립 세포의 활성을 제어하며, PV-발현 개재뉴런은 과립 세포 세포체 및 축삭 분절을 표적으로 하여 과립 세포의 활동 전위 출력을 제어하는 반면, SST-발현 세포는 수상돌기를 표적으로 하여 과립 세포에 대한 입력을 제한한다¹⁶. 최근 해마 과립 세포가 SST-개재뉴런을 활성화하여 기억 엔그램의 크기, 기억 저장 단위뿐만 아니라 결과적인 기억의 안정성을 조절한다는 것이 밝혀졌다¹⁷.

[0184] AD 환자 및 마우스 모델에서, PV 및 SST-발현 개재뉴런의 선택적 및 초기 손실은 A β 또는 타우 축적 및 ApoE4 발현에 의해 매개된다¹⁸⁻²⁴. PV-GABA성 개재뉴런의 손실은 간질 활성화와 상관관계가 있는 반면, SST-개재뉴런 손실은 인지 저하와 관련이 있고; GABA 신호전달의 조절은 마우스 모델에서 간질 활성화 및 기억 결핍 둘 다를 방지하였다^{23,25-27}.

[0185] 역사적으로, 외인성 줄기 세포 대체뿐만 아니라 GABA성 표적화 약물의 사용은 AD의 설치류 모델에서 기억력 개선에 대한 가능성을 나타내었지만, 이것은 환자에게 심각한 부작용을 초래하였다. GABA성 조절 약물은 보통 진정제 또는 항불안제 부작용을 유발하며, 이의 만성 투여는 노화에 따른 인지 기능 악화와 관련이 있다²¹. 더욱이, GABA성 약물 개입은 개재뉴런이 계속해서 악화됨에 따라 일시적인 작용 창이 제한될 수 있다.

[0186] 최근 많은 연구 관심이 세포 요법 전략에 집중되었지만, 특정 개재뉴런 집단의 재생 가능한 공급원을 생성하는 효율적이고 안전한 방법이 부족하다²⁸⁻³⁰. 배아 복부 종뇌의 내측 신경절 용기부로부터 전구 세포를 이식하면 다양한 질환 상태에서 적절한 아형 특이적 개재뉴런을 유도할 수 있는 가능성이 입증되는데, 이는 세포 대체 요법의 가능성을 뒷받침한다^{28,29}. 이러한 접근법을 보다 임상적으로 관련성이 높은 응용 분야로 전환하기 위해서, 보다 접근 가능하고 안전한 GABA성 뉴런 공급원이 필요하다. 잠재적으로 더 안전한 대안은 계통-특이적 전사 인자의 초생리학적 발현을 사용하여 직접적인 신경 재프로그래밍에 의해서 내인성 세포를 뉴런으로 전환시키는 것이다³¹⁻³³. 섬유아세포, 간세포, 다능성 줄기 세포 및 다른 세포를 최대 4개의 전사 인자의 조합을 사용하여 뉴런으로 전환하기 위해 이 접근법을 활용한 많은 연구가 있었다³⁴⁻³⁷. 이러한 연구는 여전히 침습적인 세포 이식이 필

요하였지만, 이것은 전사 인자 Asc11을 단독으로 또는 Dlx2와 조합하여 사용하여 아형 특이적 GABA성 개재뉴런을 생성할 수 있는 가능성을 입증하였다^{38,39}. 따라서, 현재의 치료 전략은, 내인성의 활성화된 성상교세포의 환경 신호에 적절하게 반응하는 완전히 통합된 GABA성 뉴런으로의 전환 분화의 AAV-전달 전사 인자 유도에 의해서 뉴런 네트워크의 균형을 재조정하는 것이다.

[0187] 인간 및 설치류 둘 다에서, 뉴런 네트워크의 공간 기억 표현은 세타 진동 및 세타-감마 커플링의 시간적 조정와 관련되어 있다. AD 환자는 휴식 상태 EEG 리듬의 감소된 커플링을 나타내고; 특정 주파수 대역에서 피질 리듬의 커플링은 AD의 특정 지표일 수 있다. 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, GABA성 개재뉴런 기능의 손실 및 궁극적으로 세포 손실은 뉴런 네트워크 기능장애를 초래하고 인지 기능장애에 기여한다고 제안된다. 따라서, GABA성 개재뉴런 기능의 회복은 흥분성-억제성 신경전달의 균형을 재조정하여 인지 기능을 향상시킬 것이다.

[0188] 본 연구에서 이 접근법의 효능을 입증하기 위해, 전신경 전사 인자인 Asc11, Asc11-SA6, Neurod1을 반응성 GFAP+ 성상교세포에서 일시적으로 발현시켜 해마 영역 내에서 완전히 기능하고 통합된 GABA성 뉴런으로의 전환 분화를 유도하였다.

[0189] 이러한 접근법을 뒷받침하기 위해서, 현재까지의 연구는 출생 후 초기 동물 또는 기껏해야 최소한의 신경 손실을 나타내는 AD 마우스 모델에서 성상교세포에서 뉴런으로의 전환분화를 유도하였고; 그 결과 새로 형성된 뉴런은 AD 뇌에 존재하는 조건과 근본적으로 다른 완전한 기능의 뉴런 네트워크에 통합될 필요가 있다^{29,38,40,41}. 본 연구는 글루타메이트성 뉴런 계통 결정인자(Neurod1)의 과발현과 달리 GABA성 아이덴티티를 지정하는 유전자의 과발현을 활용한다는 점에서 이전 연구와 구별된다.

[0190] 이전 연구는 늙은 설치류에서 전환분화가 가능하다는 증거를 제시하였다⁴⁰. 현재 접근법에 대한 또 다른 고려 사항은 성상교세포가 반응성일 뿐만 아니라 증식성도 있는 정도이고; 다양한 병리학적 조건 하에서 활성화된 반응성 성상교세포는 다양한 증식률을 보이는 것으로 나타났다. 특히, 자상(stab injury) 반응성 성상교세포는 증식성이 높은 반면, APPS1 또는 CK/p25 마우스의 반응성 성상교세포는 증식률이 낮다⁴². 이러한 낮은 증식은 실제로 AD에 이점이 될 수 있는데, 그 이유는 목표가 네트워크의 균형을 재조정하여 주로 흥분성에서 저해성으로 균형을 변화시키는 저해성 세포의 과밀화를 생성하지 않는 것이기 때문이며 이는 또한 해로울 수도 있다.

[0191] 방법

[0192] AD는 남성 및 여성 둘 다에게 영향을 미치므로, Tg344 AD 및 nTg(비-트랜스제닉) 래트의 4개의 성-균형 군을 사용하였다: 1) AAV2/8-mCherry 대조군 바이러스 감염 및 2) AAV2/8-Asc11-mCherry 감염 또는 Asc11-SA6 또는 Neurod1. AAV2/8은 출생 전 및 출생 후 설치류에서 뉴런을 선호하지만 성체 동물에서 성상교세포를 표적으로 하며⁴⁰, 이는 GFAP 프로모터와 함께 백터 특이성을 증가시킨다. GABA성 뉴런 손실은 해마, 특히 질환 초기 단계의 문에서 발생하므로 활성화된 성상교세포는 질환 상태에 따라 정위 주사를 사용하여 감염되었다. 침습적이지만, 이 전략은 정의된 위치 내에서 유한한 바이러스 부하의 제어된 전달을 허용하므로 각각의 해마 영역에서 GABA성 손실의 역할을 개별적으로 그리고 동시에 결정할 수 있다. 일부 연구는 바이러스 감염 후 3주에 글루타메이트성 뉴런으로의 성상교세포 전환분화를 조사하였고⁴⁰; 다른 연구는 GABA성 뉴런의 성숙이 감염 후 28 내지 42일에 발생하였다고 제안하였으며⁵⁴; 따라서 본 검정은 감염 후 4주 및 7주에 수행되었다. 새로운 성숙한 뉴런의 생성을 병리학적 분석, 생체내 전기생리학적 관독을 활용하여 해마 내 기존 네트워크에 새로운 뉴런의 구조적 및 기능적 통합을 통해 평가하였다. 바이러스 감염을 유의한 명백한 GABA성 신경세포 손실 이후 단계인 9개월 및 14개월에 시작하였다.

[0193] 바이러스 투여: 트랜스제닉 AD 래트 모델에서 계통 전환을 유도하기 위해서, AAV2/8-Asc11-mCherry 및 AAV2/8-mCherry(대조군) 백터를 초기에 사용하였다. 이러한 백터는 이전에 후부 중뇌에서 성상교세포의 뉴런으로의 전환분화를 촉진하는 것으로 밝혀져 있다⁴¹. 그 다음 AAV2/5 백터는 CNS 내에서 더 효율적인 것으로 나타났기 때문에 전신경 전사 인자의 비교를 위해 사용되었다. 또한 iCre가 포함되어 있으므로 백터에 mCherry 태그가 필요하지 않았다.

[0194] AAV-GFAP-전신경 전사 인자 백터의 정위 주사는 두개골을 통해 천공된 천공 구멍을 통해 마취된 TgF344-AD 래트 및 이들의 nTg 한배 새끼의 해마의 각각의 반구의 문 내에서 수행하였다. AAV의 확산은 정위 주사의 기능으로 간질액 유동 변화에 의해 제한되며 AAV는 글림프 배수(glymphatic drainage)에 의해 제거되므로 세포의 공간에

서 짧은 반감기를 갖는다^{65,66}. 이러한 프로젝트의 목표는 해마 네트워크 내에서 흥분/억제 활동의 균형을 재조정 하는 것이었고 GABA성 뉴런은 뉴런 집단의 10%만을 차지하므로 목표는 충분하지만 제한된 수의 mCherry+NeuN+GAD67+ 뉴런을 얻는 것이었다. 4.0×10^8 및 1.2×10^9 의 바이러스 역가가 사용되었으며, 더 낮은 바이러스 역가가 제한된 전환율 및 뉴런 네트워크에 대한 이점에 더 도움이 되는 것을 발견하였다.

[0195] 동소 전기생리학: 본 실험은 가장 민감한 검정, 즉 각각의 동물 내 동측 반구 및 대측 반구의 생체내 전기생리학 기록 간의 대조를 가능하게 하기 위해 독립적인 세트의 래트에서 수행하였다. 따라서, AAV2/8-mCherry 및 AAV2/8-Ascl1-mCherry 벡터 주사를 코호트 내의 각각의 래트에 걸쳐 오른쪽 대 왼쪽 반구로 무작위화하였다. 본 연구는 해마 뉴런 네트워크 기능을 평가하기 위해 이전에 확립된 프로토콜을 따랐다⁵³. 2개의 두개골 창을 반구 당 하나씩 열어 개두술의 중심이 후부 해마 위에 위치하도록 하였다. 2개의 생크 선형 다중 전극 어레이(LMA)를 각각의 창으로 내렸다. 각각의 생크에는 2개의 백금/이리듐 기록 사이트(직경 200 μ m, LifeScience용 Microprobes™)가 장착되어 있었다. 휴면 상태의 국지적 장 전위를 0.3Hz와 5kHz 사이에서 증폭시켰고, 20kHz에서 샘플링하여 분석을 위해 저장하였다.

[0196] 관심 주파수 대역(세타(3 내지 9Hz), 알파(10 내지 14Hz), 베타(15 내지 30Hz), 낮은 감마(30 내지 58) 및 높은 감마(62 내지 120Hz))은 구조 회로를 기반으로 하는 동적 모드프에서 발생하고 입출력 변환 후 행동 기능을 지시하는 것으로 가정되었다⁶⁷. 높은 감마 활동은 감각, 운동 및 인지 사건에 의해 조절되며 기능적으로 낮은 감마와 구별되며, 뚜렷한 생리학적 기원을 가지고 있다⁶⁸. 하나의 주파수 대역이 상이한 주파수 대역의 활동을 변조할 수 있는 현상은 동물과 인간 데이터 모두에서 관찰되었으며 교차 주파수 커플링이라고 불린다⁶⁹. 구체적으로, 세타파의 위상은 감마 대역의 진폭을 변조할 수 있으며 위상 진폭 커플링이라고 하는 이 현상은 피질내 국소 장 전위로 해결될 수 있다^{52,70,71}. 위상 진폭 커플링을 정량화하기 위해서, 고주파 대역 시계열의 진폭 포락선 및 저주파 대역의 위상 시계열을 하나의 복합 복소 값 신호로 결합하는 변조 지수(MI)를 사용하였다.

[0197] 병리학적 특징규명: GABA성 개재뉴런 손실/구제를 평가하기 위해, 전체 GAD65/67, SST, NPY, CCK 및 VIP를 포함하는 신경펩타이드 발현뿐만 아니라 GABA_A(빠른 저해) 및 GABA_B(느린 저해) 수용체 소단위 발현을 웨스턴 블롯을 사용하여 정량화하였다²⁰. GABA성 뉴런 집단인 GAD67+가 NeuN과의 동시발현을 사용하여 완전히 성숙되었는지 여부를 결정하였다. mCherry + 세포에 대한 GABA의 발현 및 공동국재화를 면역조직화화학적으로 조사하였다. AD-관련 결과의 평가 및 아밀로이드 플라크의 효과 크기 면역조직화학적 분석의 확인을 이전에 설명한 프로토콜에 따라 수행하였다^{53,63,86}. 전환분화 후 신경아교 반응의 변화를 성상교세포에 대한 GFAP 항체와 미세신경아교 세포에 대한 Iba-1 항체를 사용하여 평가하였다. 신경독소 및 신경변성을 각각 S100 β 및 보체 성분 3(C3)의 공동 위치 지정 및 β III 튜빌린과 RIPK1의 공동국재화를 사용하여 평가하였다. 모든 면역조직화학은 Zeiss Observer™ Z1 현미경 또는 Nikon A1(Melville, 미국 뉴욕주 뉴욕 소재) 레이저 스캐닝 공초점 현미경: A β , NeuN, GFAP, Iba-1(10 $\times$ 분석, 20 $\times$ 대표)에서 영상화하였다. A β 플라크 분석은 ImageJ™에서 배경을 빼고 영상을 이진화하고 염색 밀도(% 덮힌 영역)를 분석하여 수행하였다.

[0198] 반스 미로: 모든 래트는 행동 평가를 경험하지 않았다. 반스 미로(Maze Engineers) 시험을 훈련을 제외한 모든 시도에서 공간 단서 및 혐오 조명이 있는 행동 제품군에서 수행하였다. EthoVision™ XT(Noldus, 버전 11.5)를 사용하여 비디오 데이터를 수집하고 분석하였다. 탈출 위치까지 훈련한 후, 래트는 하루에 2번의 시도를 통해 3일에 걸쳐 작업을 배웠다. 공간 기억을 3일 후 1회 시험에서 평가하였다. 다음날부터 실행 기능을 위한 역전 학습(5일, 1일 2회 시도)을 시작하였고, 여기서 재훈련 없이 탈출 구멍의 위치를 바꾸었다.

[0199] 결과

[0200] 이전에 발표된 연구에 비추어, 본 연구에서는 F344 마우스 계통을 사용하였다. 마우스 계통은 지난 40년 동안 정상적인 노화 모델로 사용되어⁴³ 인지 결핍의 시간적 진화가 알려져 있다^{44,45}. 6 내지 8개월령의 F344 래트는 미묘한 실행 기능 결함을 보이지만 기억력 결함은 없다⁴⁶. 더욱이, 이들 래트는 노화된 인간 집단에서 보고된 것과 유사하게, 래트 A β 축적의 연령-의존적 증가, A β 뇌-혈액 유출 감소, 인지 기능장애와 상관관계가 있는 콜린성 시냅스 기능 감소를 나타낸다⁴³⁻⁴⁶.

[0201] 본 명세서에 사용된 TgR344AD 래트는 진행성 아밀로이드 및 타우 병리학뿐만 아니라 인지 결핍, 염증 및 명백한

뉴런 손실을 나타내며, 따라서 인간 AD의 전구증상 단계 및 증상 단계 모두의 특징을 요약한다. 본 연구에 사용된 콜로니의 인지 및 아밀로이드 표현형이 입증되었으며, 이 모델에 대한 본래 공개와 잘 일치한다⁸. 구체적으로, 동물은 3개월령에 아밀로이드 플라크; 6개월령에 일부 실질 플라크; 및 9개월령까지 뇌혈관 아밀로이드 혈관병증, 타우 과인산화 및 아밀로이드 조직 플라크가 없다(도 7). 그럼에도 불구하고, 본 연구에 사용된 콜로니에서 TgF344 AD 래트는 최대 6개월까지 정상적인 일상 생활 활동 및 인지 활동을 나타내었다. 12개월령까지 TgAD 동물은 개방장 시험(open field test), 굴파기 활동(burrowing activity) 및 반스 미로 작업에서 결함을 나타내었다(도 7c).

[0202] 해마에서의 신경 생존을 평가하기 위해, 신경 마커 NeuN을 사용하여 유사분열 후 뉴런의 핵을 표지하였다⁴⁷. NeuN 면역조직화학적 염색의 정량적 분석은 이전에 나타난 바와 같이 12개월령 TgF344 AD 래트 및 이들의 비-트랜스제닉(nTg) 한배 새끼의 해마에서 대등한 수의 NeuN+ 세포를 나타내었다(도 8). 따라서, 시냅스전 단백질, 시냅토파이신, 신택신 및 시냅토타그민뿐만 아니라 시냅스후 단백질 PSD95의 수준은 두 코호트 간에 구별할 수 없었다(도 8). 해마 뉴런의 대부분은 흥분성이고, 약 10%는 저해성 GABA성 개재뉴런이다. 개재뉴런은 해마 내의 뉴런의 작은 부분만을 차지하기 때문에 NeuN 수만으로 개재뉴런 집단의 차이를 가릴 수 있으며 시냅스 마커는 저해성 뉴런 기능보다 흥분성을 더 나타낼 수 있다.

[0203] 글루탐산 데카르복실레이트(GAD)는 글루탐산을 GABA로 전환하고; 2개의 이소형인 GAD67과 GAD65는 각각 GABA성 세포체 및 축삭 말단에 주로 국재화된다. AD 환자의 해마 조직에 대한 사후 조직학적 분석에서 GAD65 단백질 수준은 감소하는 반면 GAD67은 상대적으로 보존된다. 대조적으로, 현재 조사된 질환 진행의 초기 단계에서, nTg 동물과 비교하여 TgF344 AD 래트에서 GAD65의 단백질 발현 증가가 발견되었지만(도 9a), GAD67에서는 변화가 검출되지 않았다. 이러한 결과는, GAD65 단백질의 증가로 설명되는 바와 같은 시냅스 GABA 생산이 기능을 유지하려는 시도로 증가되었음을 나타낸다.

[0204] GABA성 개재뉴런에 의해 발현되는 신경펩타이드는 콜레시스토키닌(CCK), 소마토스타틴(SST), 혈관활성 장내 폴리펩타이드(VIP) 및 신경펩타이드 Y(NPY)를 포함한다. 칼슘 결합 단백질은 파발부민(PV), 칼빈딘 및 칼레티닌(CR)이다. GAD67의 전체 해마 단백질 수준과 대조적으로, 주로 SST 및 NPY 발현 세포를 포함하는 GAD67을 발현하는 해마의 모든 영역 내에서 개재뉴런 수 감소가 관찰되었다(도 9B). 이러한 조합된 결과는, GAD67-발현 세포의 수가 감소했지만 나머지 세포는 뉴런 손실을 보상하기 위해 GAD67 발현을 증가시켰음을 시사한다. 노화, AD 및 AD 마우스 모델에서 SST-발현 GABA성 뉴런의 손실은 널리 특징규명되어 있고 인지 결핍과 상관관계가 있는 것으로 나타났다¹⁸⁻²³. 중요한 것은 해마문의 SST-발현 GABA성 뉴런의 감소 정도가 기억력 결핍의 심각성을 강력하게 예측한다는 것이다^{28,48}. AD의 마우스 모델과 대조적으로, 해마 전반에 걸쳐 PV-발현 GABA성 뉴런의 손실은 본 연구에서 조사된 연령에서는 관찰되지 않았다(데이터는 표시되지 않음).

[0205] 연구의 다음 부분에서는, GABA 수용체의 두 가지 주요 부류인 GABA_A 및 GABA_B의 수준을 조사하였다. GABA_A 수용체는 AD를 포함한 질환 상태와 관련이 있다⁴⁹. GABA_A 수용체는 여러 소단위로 구성되며, 뇌에서 가장 일반적인 유형은 2 α x, 2 β x 및 1 γ x 소단위가 조합된 오량체이다. GABA_A 수용체는 시냅스내 또는 시냅스외에 국재화되어, 위상성 및 긴장성 해를 각각 매개한다. 소단위 α -1은 시냅스 내 수용체의 일부이고; α -5는 시냅스내 또는 시냅스외일 수 있는 반면; δ 소단위는 독점적으로 시냅스외이다^{49,50}. TgF344 AD를 nTg 래트 비교할 때 α -1 GABA_A 수용체 소단위가 아닌 α -5 및 δ 의 발현 증가가 관찰되었는데, 이는 긴장성 해의 증가를 시사한다(도 10). GABA성 개재뉴런 결손이 이전에 상이한 AD 설치류 모델에서 보고되었지만, 뉴런 신경펩타이드 및 칼슘 결합 단백질 발현으로 분류되는 하위 유형 수준 변화는 트랜스진(들) 발현에 따라 달라진다. 전체적으로, 이 데이터는 TgF344 AD 래트에서 9개월령까지 GABA성 시스템의 기능 장애를 입증한다.

[0206] 뇌 영역을 가로지르거나 뇌 영역 내에서 뉴런 네트워크를 특징규명하기 위해서 전기생리학에서 사용되는 상이한 주파수 대역의 진동 사이의 상호작용을 교차 주파수 커플링(CFC)이라고 한다. 빠르게-작용하는 GABA성 개재뉴런은 감마 및 세타 리듬 모두에 기여하기 때문에 CFC에서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다^{51,52}. 이로 인해 CFC 추정은 개재뉴런 활성을 조사하는 데 유용한 검정이 된다. 생체내에서, 9개월령의 TgF344 AD 래트는 해마 뉴런 기능에 상당한 장애를 나타내었는데⁵³, 이는 연령이 일치하는 nTg 한배 새끼의 것과 비교했을 때 해마에서 CFC의 감쇠에 반영되었다(도 11A 내지 도 11C). 특히, 본 발명자들은 해마의 높은 감마 진폭에 대한 세타 위상의 변조 지수(MI)를 추정하였고 nTg 동물(도 11B, 도 11C)과 비교하여 TgAD 코호트에서 감소된 MI가 관찰되었다(도 11B,

도 11C). 또한, TgF344 AD 코호트(도 11D)와 달리 nTg 코호트에서는 변조의 전달 주파수가 6Hz에 집중된 것으로 나타났다. 어린(2개월 미만) 동물의 해마에서의 파워를 측정하였는데, 이는 유전자형 간 차이를 나타내지 않았다($p>0.05$). 마찬가지로, 높은 감마 변조에 대한 세타는 어떠한 차이도 나타내지 않았다($p>0.05$, 데이터는 표시되지 않음). 이러한 데이터는 2개월령에서 TgF344 AD 래트가 해마 네트워크 기능 장애의 증거를 제시하지 않음을 나타내는데(도 11D), 이는 많은 AD 마우스 모델²⁶과 달리 이러한 래트의 뉴런 네트워크가 정상적으로 발달하고 노화에 따라 네트워크 결함이 나타난다는 것을 시사한다.

[0207] 반응성 성상교세포의 GFAP 프로모터⁴¹ 하에서 AAV2/8 유도 Asc11 전사 인자 발현이 TgF344 AD 래트 및 이들의 nTg 한배 새끼에서 GABA성 뉴런으로의 전환분화를 유도한다는 것을 확립하기 위해, 해마문을 바이러스의 정위 주사에 의해서 6개월 및 12개월령 TgF344 AD 래트 및 nTg 한배 새끼에 감염시켰다. AAV2/8-mCherry 및 AAV2/8-Asc11-mCherry 벡터를 동일한 래트 내의 오른쪽 반구 또는 왼쪽 반구에 개별적으로 주입하였다. 6개월령(데이터는 표시되지 않음) 및 12개월령 TgF344 AD 래트(도 6)에서 반응성 성상교세포의 효과적인 감염이 달성되었는데, 이는 성상교세포 형태를 갖는 세포에서 GFAP와 mCherry 형광 마커 발현의 공동 국제화에 의해서 입증되었다(도 12).

[0208] 28일 후, AAV2/8-mCherry 감염 반구는 mCherry의 발현이 거의 없었고 발현은 NeuN 발현과 연관되지 않았다(도 13). AAV2/8-mCherry 벡터가 증식성 성상교세포를 감염시키더라도 바이러스의 발현 및 이에 따른 mCherry 발현은 시간이 지남에 따라 세포가 증식 주기를 종료하고 GFAP 발현이 안정화됨에 따라 감소하므로 이는 놀라운 일이 아니다. GFAP는 느린 턴오버율을 갖는 안정적인 구조 단백질이며 mCherry 발현은 GFAP 프로모터에 의해 제어되므로 번역 부족으로 인해 시간이 지남에 따라 감소할 것이다. 대조적으로, AAV2/8-Asc11-mCherry 감염 반구는 반응성 성상교세포가 거주하는 영역에 위치한 광범위한 mCherry+NeuN+ 이중 표지 세포가 있었다. mCherry+NeuN+ 세포의 형태학적 특성 및 위치에 기초하여, 이들 세포는 미성숙하고 이동하지 않았으며 뉴런 네트워크에 완전히 통합되지 않은 것으로 제안되었다. 또한 문에는 다수의 mCherry+NeuN- 세포가 존재하였고; 모든 성상교세포가 동시에 전환분화되는 것은 아니기 때문에 이러한 세포는 분화의 초기 단계에 있을 가능성이 높다(도 13).

[0209] 젊은 및 늙은 TgF344 AD 및 nTg 래트 둘 다에서, GAD67+mCherry+ 뉴런이 문에 존재하였다(도 14). GAD67+mCherry+ 세포의 수는 28 내지 42일이 걸리는 전환분화를 사용한 운명 지정으로 인해 낮았으며⁵⁴, 따라서 본 발명자들의 결과는 GABA성 뉴런 성숙의 초기 단계를 나타낼 수 있다. 따라서 더 많은 GABA성 뉴런이 나중에 이러한 개입으로 인해 발생할 것으로 예상된다. 본 연구의 목적에서 가장 중요한 것은 해마 네트워크 활성화에 대한 뉴런 사양의 잠재적인 이점을 조사하는 것이었다. nTg 래트에서, AAV2/8-mCherry 감염 반구는 mCherry-Asc11 감염 반구와 크게 상이하지 않았다(도 14). 이러한 결과는 새로운 뉴런의 사양이 완전히 기능하는 네트워크를 활성화하거나 저해하지 않는다는 것을 시사한다. 반면, TgF344 AD 래트에서, AAV2/8-mCherry-대조군 바이러스 감염 반구와 대조적으로 AAV2/8-mCherry-Asc11 감염 반구에서 해마 활성화가 향상되었다(도 14B). 이러한 조합된 결과는, 반응성 성상교세포의 뉴런으로의 전환분화가 손상된 뉴런 네트워크의 기능에 유익한 효과를 발휘하고 GABA성 뉴런의 손실이 AD의 인지 결핍에 기여하는 기전을 다루는 새로운 기술을 나타냄을 시사한다.

[0210] GABA성 뉴런 및 글루타메이트성 뉴런 둘 다 TgF344AD 래트 및 알츠하이머병 환자에서 손실된다는 것이 이미 밝혀져 있다. GABA성 뉴런 대 글루타메이트성 뉴런의 우선적인 생산이 AD 병리학 및 해마 기능에 유익하다는 것을 설명하기 위해서, 상이한 전사 인자인 Asc11 및 Neurod1의 효능을 조사하였다. 이전에 언급된 바와 같이, Asc11은 환경 신호에 따라 GABA성 및 회돌기신경아교 세포의 분화를 우선적으로 촉진하는 반면 Neurod1은 글루타메이트성 신경 세포의 운명을 우선적으로 촉진한다. 발달 시에, 이러한 전사 인자는 서열 전반에 걸쳐 세린/트레오닌 잔기의 인산화에 의해 제어되며, 이는 정확한 발달 단계에서 전사 인자의 불활성화를 초래한다. Asc11의 초기 불활성화를 방지하기 위해서, Asc11 활성을 정지시키는 데 일반적으로 사용되는 세린 인산화 부위 6개 모두에 알라닌 잔기를 혼입하였다(S 대 A 점 돌연변이). 3개의 전사 인자 모두 감염되지 않은 반구와 비교하여 바이러스에 감염된 반구에서 해마문 내의 NeuN+ 세포 수를 계산하여 측정한 바와 같이 성상교세포의 뉴런으로의 전환분화를 효과적으로 촉진하였다(도 15). 그러나, Asc11-SA6 돌연변이체는 모체 Asc11보다 20% 더 효과적이며 NeuN+ 뉴런은 4.5배 및 4.0배 증가한 반면 Neurod1은 전환분화에 2.5배 효과적이었다. 뉴런의 증가는 감염된 반구의 반응성 성상교세포의 감소를 동반하였다(도 16, 17). NeuN+ 뉴런에 대한 전사 인자의 차등 효과와 일치하여, Asc11-SA6 발현은 성상교세포를 약 50% 감소시키는 반면 Asc11은 성상교세포를 15% 감소시켰고 Neurod1은 성상교세포를 5%만 감소시켰다. 반응성 성상교세포의 손실은 Asc11 및 Neurod1에 의해 유도된 전환분화에 대한 뉴런의 증가보다 낮은 배수 변화로 나타났지만, 반응성 성상교세포는 감소하였다. 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 반응성 성상교세포 중 일부는 뉴런으로 전환분화되었을 수 있는 반면 다른 것은 AD 병리학에 기여하지 않

는 정지 표현형을 나타낼 수 있다.

[0211] 반응성 성상교세포가 감소하였기 때문에 문의 독성 환경이 변경되었을 수 있는 것으로 나타났으며, 이는 궁극적으로 AD 관련 병리학에 대한 긍정적인 하류 효과를 가져올 것으로 예상되었다. 이를 조사하기 위해 감염된 반구에 존재하는 아밀로이드 플라크와 반응성 미세아교세포의 수를 계수하고 감염되지 않은 반구와 비교하였다. MOAB2(아밀로이드-베타 펩타이드의 N-말단을 인식하는 항체)가 형질주입된 반구의 절편을 염색한 후, 감염되지 않은 동측 문과 비교하여 감염된 문의 아밀로이드 플라크가 감소한 것이 즉시 명백해졌다(도 18A 및 도 18B). 정량화는, 성상교세포를 뉴런으로 전환분화한 후 *Asc11*(SA6)에 의해 플라크가 약 70% 감소한 반면 *Asc11*은 약 20% 감소시켰고 *Neurod1*은 감소시키지 않았음을 입증하였다(도 18C). 아밀로이드 플라크의 감소는 생산 감소 또는 분해 증가의 결과일 수 있다. 그러나, 실험 패러다임은 단지 약 45일이었기 때문에, 생산 감소로 인해 반구 사이에 플라크가 50% 손실될 가능성은 이전에 플라크가 9개월령 이후에 한 달에 10%씩 증가하는 것으로 나타났기 때문에 가능성이 낮다. 이에 비추어, 아밀로이드 플라크의 감소는 아밀로이드 분해의 증가로 인한 것일 것이다.

[0212] 아밀로이드는 플라크를 둘러싸는 활성화된 미세아교세포에 의해 분해되는 반면, 가용성 아밀로이드-베타 펩타이드는 플라크와 관련되지 않은 미세신경아교세포에 의해 분해된다. A β 펩타이드의 아미노산 잔기 17 내지 24에 특이적인 항-4G8 항체 및 항-IBA-1 항체를 사용하여, 병리학적 조직을 사용하여 IBA-1+4G8+ 세포를 정량화하였다(도 19). *Neurod1*을 사용한 계통 재프로그래밍 후 IBA-1+4G8+ 세포에서 대략 60%의 증가가 있었지만, 이는 미경험 트랜스제닉 래트에서는 유의하지 않았다. *Asc11*을 제공받은 래트는 약 1.7배의 배수 변화로 플라크 관련 미세아교세포의 상당한 증가를 나타내었다. 그러나 다른 분석과 마찬가지로 *Asc11*-SA6을 사용한 전환분화는 미경험 트랜스제닉 래트에 비해 IBA-1+4G8+ 세포가 대략 2.7배 증가하는 가장 큰 변화를 초래하였다. *Asc11* 및 *Neurod1*은 통계적으로 구별되지 않았지만($p > 1.00$), 플라크 관련 미세아교세포의 증가는 *Asc11* 및 *Neurod1* 둘 다보다 훨씬 컸다($p < 0.01$). 또한, bHLH 전사 인자의 일시적인 발현에 따라 평균 플라크 크기를 평가하였다. *Neurod1*의 발현으로 인해 평균 플라크 크기가 대략 25% 감소하였지만, 이러한 변화는 미경험 트랜스제닉 래트에서는 유의하지 않았다. 그러나 *Asc11*을 제공받은 래트는 플라크 크기가 약 50%로 크게 감소한 반면, *Asc11*-SA6은 약 60%의 감소를 나타내었다($p < 0.01$). *Asc11*-SA6 전달 후 플라크 크기의 감소는 *Neurod1*과 유의하게 상이하였다($p = 0.01$). 또한 *Neurod1*과 비교하여 *Asc11* 발현으로 평균 플라크 크기가 감소하는 경향이 있었다($p = 0.09$).

[0213] 미세아교세포는 아밀로이드 플라크의 증가된 식세포작용을 나타내었기 때문에, 이는 미세아교세포 표현형이 전환 표현형에서 보다 항상성적 표현형으로 복귀하고 있었음을 시사하였다. 따라서, IBA-1+ 세포에 대한 면역형광 염색을 사용하여 미세아교세포 형태를 조사하였다(도 20A). 전신경 bHLH 전사 인자를 사용한 직접적인 계통 재프로그래밍은 문에서 IBA-1+ 세포의 총 밀도에 유의한 변화를 나타내지 않았다(도 20B). *Neurod1*의 일시적인 발현은 *Asc11*-SA6($p = 0.04$; 도 20C)에 비해 약간의 차이가 있었지만 미경험 래트($p > 1.00$)와는 유의한 차이가 없었다. 미경험 트랜스제닉 래트는 IBA-1+ 세포의 약 72%에서 활성화된 형태를 나타낸 반면, 단지 9%만 분기되었다(도 20C). *Asc11*을 사용한 전환분화 이후 IBA-1 형태는 61% 활성화 및 19% 분기(각각 $p = 0.07$ 및 $p = 0.09$)되는 경향이 있었다. 그러나 *Asc11*-SA6을 제공받은 래트는 IBA-1 형태에서 상당한 변화를 나타내었고; 대략 42%의 세포가 활성화된 형태를 나타내고 31%는 분기되었다(도 20D). *Neurod1*은 미경험 래트와 비교하여 미세아교세포 형태에 큰 변화를 초래하지 않았다($p > 1.00$). 이러한 데이터는 *Asc11*-SA6가 항상성을 향한 환경으로 이동한다는 것을 시사한다.

[0214] 성상교세포 표현형이 항상성을 향해 이동했는지 여부를 시험하기 위해서, GFAP+ve 성상교세포 형태를 사용하고 성상교세포를 비대성 또는 생리학적으로 분류하였다(도 21). *Asc11*-SA6 발현 후 관찰된 총 GFAP+ 세포의 감소에 더하여, 생리적 상태의 증가와 동시에 비대성 성상교세포의 감소가 있었다(도 21C). 미경험 상태에서, 트랜스제닉 래트의 성상교세포의 대략 80%는 비대성이며 단지 10%만이 생리적이다. 그러나 *Asc11*-SA6을 사용한 전환분화 후에, 성상교세포 형태에는 비대성 54%, 생리적 39%로 상당한 변화가 있다. *Asc11* 및 *Neurod1*과 비교하여 비대성 및 생리적 성상교세포의 존재비는 *Asc11*-SA6의 바이러스 전달에 따라 상당히 상이하다($p < 0.01$). *Asc11*의 발현은 비대성의 약 10% 감소 및 생리적 GFAP+ 세포의 5% 증가를 초래하였지만, 이 값은 미경험 트랜스제닉 래트와 크게 상이하지 않았다(각각 $p = 0.27$ 및 $p > 1.00$). 반면, *Neurod1*의 일시적인 발현은 대등한 수준의 비대성 및 생리적 GFAP+ 세포와 1.00보다 큰 p 값을 갖는 성상교세포 형태의 변화를 초래하지 않았다(도 21C).

[0215] 성상교세포증을 추가로 특징규명하기 위해, 주사 부위에서 S100 β + 세포의 면역형광 분석을 수행하였다. GFAP+ 세포의 정량 분석뿐만 아니라 성상교세포 형태와 일치하게, *Asc11*-SA6의 바이러스 전달은 주사 부위에서 S100 β + 세포의 상당한 감소를 초래한다(도 22A, 도 22B). 미경험 트랜스제닉 래트와 비교하여, *Asc11*-SA6을 제공받은

래트는 S100 β + 세포가 대략 45% 감소한 것으로 나타났다. *Asc11* 및 *Neurod1*은 미경험 Tg 래트에서는 유의하지 않았지만($p > 1.00$), *Asc11-SA6*($p < 0.01$)과는 구별되는 최소한의 차이를 초래하였다. 성상교세포증의 특징규명을 위한 C3의 정량화를 제안하는 연구에 비추어, 주사 부위에서 S100 β +C3+ 세포를 정량화하기 위한 면역형광 분석을 수행하였다(도 22C, 도 22D). *Asc11* 및 *Neurod1*이 해마문에서 S100 β +C3+ 세포의 대략 10% 감소를 초래하였지만, 이러한 차이는 유의하지 않았다($p \geq 0.73$; 도 22D). *Asc11-SA6*의 발현은 치료되지 않은 Tg 래트($p < 0.01$)와 비교하여 S100 β +C3+ 세포가 약 50% 감소하였는데, 이는 *Asc11* 및 *Neurod1*($p < 0.01$)과도 상당히 상이하였다. 따라서 *Asc11-SA6*은 GFAP+ 세포, S100 β + 세포, C3+ 성상교세포의 성상교세포증 감소 및 성상교세포 형태의 변화를 나타내는 4가지 요인의 감소를 초래하였다.

[0216] AD 환자 및 질환의 동물 모델에서 인지 저하의 가장 우수한 상관관계는 시냅스 기능장애이지만, 뉴런 손실 및 신경퇴행은 시냅스 손실에서 역할을 한다. 이전 연구는 CNS 질환에서 성상교세포 및 미세아교세포 활성화로 인해 염증성 유전자 시그니처가 상향조절되는 것으로 나타났다. 이로 인해 뉴런에서 RIPK1이 활성화되고 최종적으로 세포 사멸이 발생한다. 실제로, RIPK1 저해는 AD 병리를 완화시키고 마우스 모델에서 신경 세포 사멸을 방지한다. 따라서 직접적인 계통 재프로그래밍이 피사성 뉴런의 수를 변경했는지 여부를 결정하였다(도 23). 피사성 뉴런을 정량화하기 위해, 항- β III-튜불린 및 항-RIPK1 항체와 함께 면역형광 염색을 사용하였다(도 23A). 결과는 *Asc11*, *Asc11-SA6* 및 *Neurod1*을 사용한 전환분화가 문에서 β III-튜불린+RIPK1+ 세포의 상당한 감소를 유도한다는 것을 나타내었다(도 23B). *Asc11-SA6*을 제공받은 래트는 미경험 래트에 비해 β III-튜불린+RIPK1+ 세포가 50%를 초과하게 감소하여 피사성 뉴런이 가장 크게 감소한 것으로 나타났다($p < 0.01$).

[0217] 그 다음, 피사성 뉴런의 감소 및 신경아교 항상성의 재균형이 치료된 반구뿐만 아니라 반대쪽 반구 내에서 GABA성 뉴런의 전반적인 증가로 이어질 것이라는 가설을 세웠다. *Neurod1*은 이러한 효과를 나타내지 않았기 때문에, 분석은 *Asc11* 및 *Asc11-SA6*에 초점을 맞추었다. *Asc11* 및 *Asc11-SA6* 둘 다는 전사 인자 주입된 반구에서 GAD67+ 세포의 수를 유의하게 증가시켰지만(도 24A), 치료되지 않은 Tg 래트와 비교하여 *Asc11-SA6*만 반대측에서 GABA성 뉴런의 수를 유의하게 증가시켰다. 동측 대 반대측 대 주입 대 미처리 반구 사이의 배수 변화의 비교는 *Asc11-SA6* 처리된 래트에서 전체 GABA성 뉴런의 유의한 증가를 입증한다(도 24B).

[0218] 마지막으로, 반응성 성상교세포의 뉴런으로의 직접적인 계통 전환분화 및 이에 따른 하류 항상성 이점이 TgF344 AD 래트의 인지 기능 개선으로 이어지는지 여부를 결정하기 위해서, 반스 미로 과제를 *Asc11-SA6* 대 *Asc11* 전환분화된 래트에 대해 미처리 래트와 비교하여 수행하였다(도 25). 미경험, *Asc11*- 및 *Asc11-SA6*-처리된 NTg 래트 사이의 공간 기억의 비교는 유의한 차이를 나타내지 않은 반면, *Asc11*로 처리된, 유의하게는 *Asc11-SA6*으로 처리된 TgF344 AD 래트는 미처리 TgF344 AD 래트와 비교하여 개선된 기억을 나타내었다(도 25A). *Asc11-SA6* TgF344 AD 래트는 *Asc11* 처리된 래트에 비해 기억력이 증가하는 경향을 나타내었다. *Asc11-SA6*으로 처리된 TgF344 AD 래트의 개선된 성능을 추가로 조사하기 위해 반스 미로 작업의 학습 및 반전 단계를 검사하였다. 미처리 TgF344 AD 래트는 *Asc11-SA6*으로 처리된 TgF344 AD 래트 및 처리 및 미처리 NTg 래트 둘 다보다 Barnes 미로 작업을 상당히 더 느리게 학습하였다(도 25B). 중요한 것은, *Asc11-SA6*으로 처리된 TgF344 AD 래트는 처리 및 미처리 NTg 래트 둘 다와 유의하게 상이하지 않았다는 것이었다. 실행 기능 또는 문제 해결 능력에 대한 검사는 미처리 TgF344 래트에 비해서 *Asc11-SA6*으로 처리된 TgF344 AD 래트에서 훨씬 더 양호하였고, 처리 및 미처리 NTg 래트와 유의하게 상이하지 않았다(도 25C).

[0219] 결론

[0220] 본 연구는 전신경 전사 인자인 *Asc11*, *Asc11-SA6* 및 *Neurod1*이 TgF344 AD 래트 모델에서 반응성 성상교세포를 뉴런으로 효과적으로 전환분화한다는 것을 입증한다. 해마에서 *Asc11* 발현은 GABA성 뉴런의 수를 증가시켰고 *Asc11* 발현은 해마 뉴런 연결성을 증가시켰는데, 이는 생성된 새로운 뉴런이 회로에 통합되어 유익하다는 것을 나타낸다. 또한 새로 생성된 뉴런의 결과로 생성되는 성장 인자도 이점에 기여한다.

[0221] 돌연변이체 *Asc11-SA6* 전사 인자는 성상교세포를 뉴런으로 전환분화시키는 데 가장 효과적인 인자였다. 예기치 않게, 전환분화 후 반응성 성상교세포의 *Asc11-SA6* 감소는 아밀로이드 플라크 로드 제거가 내인적으로 자극되도록 해마 환경을 변경하였다. 아밀로이드 플라크의 감소는 플라크와 미세아교세포의 회합 증가를 동반하였는데, 이는 뇌 내 플라크 부하를 감소시키는 하나의 기전이다. *Asc11-SA6*으로의 전환분화 후, 해마의 실질 환경은 성상교세포 및 미세신경아교 세포의 형태학적 변화, 염증 매개인자인 S100 β 및 C3의 감소, 피사성 뉴런의 감소로 설명되는 바와 같이 항상성 표현형으로 이동하였다. *Asc11-SA6*을 사용한 전환분화 후 전반적인 유익한 결과는 미처리 TgF344 래트와 비교하여 치료된 TgF344 AD 래트에서 향상된 공간 학습, 기억력 및 실행 기능을 초래하였다.

[0222] 참고문헌

1. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2010 Jan 28;362(4):329-344.
2. Terry RD, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol*. 1991, 30, 572-580.
3. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol*. 1990, 27, 457-464.
4. Oddo, S. et al. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron* 2003, 39, 409-421.
5. Bittner, T. et al. Multiple Events Lead to Dendritic Spine Loss in Triple Transgenic Alzheimer's Disease Mice. *PLoS One* 2010, 5, e15477.
6. Ittner, L. M. & Götz, J. Amyloid- β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2011, 12, 65-72.
7. Rhein, V. et al. Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc Natl Acad Sci* 2009, 106, 20057-20062.
8. Cohen, RM et al., A transgenic Alzheimer's rat with plaques, tau pathology, behavioural impairment, oligomeric A β and frank neuronal loss. *J. Neurosci*. 2013, 33, 6245-6256.

[0223] .

9. Bott J-B, et al., Spatial Reference Memory is Associated with Modulation of Theta-Gamma Coupling in the Dentate Gyrus. *Cereb Cortex*. 2016, 26, 3744–3753.
10. Huxter J, Burgess N, O’Keefe J. Independent rate and temporal coding in hippocampal pyramidal cells. *Nature*. 2003, 425, 828–832.
11. Cardin JA, et al., Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*. 2009, 459, 663–667.
12. Onslow ACE, Bogacz R, Jones MW. Quantifying phase-amplitude coupling in neuronal network oscillations. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011 105, 49–57.
13. Canolty RT, et al., High gamma power is phase-locked to theta oscillations in human neocortex. *Science*. 2006, 313, 1626–1628.
14. Lee H, et al., Phase locking of single neuron activity to theta oscillations during working memory in monkey extrastriate visual cortex. *Neuron*. 2005, 45, 147–156.
15. Sohal VS, et al., Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*. 2009, 459, 698–702.
16. Liguz-Leczinar M, Urban-Clecko J, Kossut M. Somatostatin and somatostatin containing neurons in shaping neuronal activity and plasticity. *Frontiers in Neural Circuits* 2016, 10, article 48, 1-15.
17. Stefanelli T., et al., Hippocampal somatostatin interneurons control the size of the neuronal memory ensembles. *Neuron* 2016, 89, 1074-1085.
18. Ramos B, et al., Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer’s disease. *Neurobiol Aging* 2006, 27, 1658-1672.
19. Krantic S, Isorce N, Mechawar N, Davoli MA, Vignault, E., Albuquerque, M., Chabot J-G, Chauvin J-P, Aubert I. McLaurin J, Quirion R, Hippocampal GABAergic neurons are susceptible to amyloid beta toxicity *in vitro* and are decreased in number in the Alzheimer’s disease TgCRND8 mouse model. *J. Alz. Disease* 2012, 29, 293-308.
20. Ma K, McLaurin J. α-Melanocyte stimulating hormone prevents GABAergic cell loss to improve cognition in Alzheimer’s disease. *J. Neuroscience* 2014, 34, 6736-6745.
21. Li Y, et al., Implications of GABAergic neurotransmission in Alzheimer’s disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2016, 8, article 31, 1-12.

[0224]

22. Tong LM, et al., . Enhancing GABA signaling during middle adulthood prevents age-dependent GABAergic interneuron decline and learning and memory deficits in ApoE4 mice. *J. Neuroscience* 2016, 36, 2316-2322.
23. Schmid LC, et al., . Dysfunction of somatostatin-positive interneurons associated with memory deficits in an Alzheimer's disease model. *Neuron* 2016, 92, 114-125.
24. Soler H, et al., The GABAergic septohipocampal connection is impaired in a mouse model of tauopathy. *Neurobiol Aging* 2017, 49, 40-51.
25. Verret L, et al., Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 2012, 149, 708-721.
26. Palop JJ, Mucke L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 2016, 17, 777-792.
27. Sanchez PE, et al., Levetiracetam suppresses neuronal network dysfunction and reverses synaptic and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *PNAS* 2012, 109, E2895-2903.
28. Shetty AK, Bates A. Potential of GABAergic cell therapy for schizophrenia, neuropathic pain and Alzheimer's and Parkinson's disease. *Brain Res.* 2016, 1638, 74-87.
29. Colasante G, et al., Rapid conversion of fibroblasts into functional forebrain GABAergic interneurons by direct genetic reprogramming. *Cell Stem Cell* 2015, 17, 719-734.
30. Hunt RF, et al., GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behaviour. *Nat Neurosci* 2013, 16, 692-697.
31. Vierbuchen, T. et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010, 463, 1035-1041.
32. Pang, Z. P. et al. Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 2011, 476, 220-223.
33. Son, E. Y. et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell stem cell* 2011, 9, 205-218.
34. Pfisterer, U. et al. Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2011, 108, 10343-10348.
35. Marro, S. et al. Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell stem cell* 2011, 9, 374-382.

[0225]

36. Chuang, W. et al. Partial Reprogramming of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes into Neurons. *Scientific reports* 2017, 7, 44840.
37. Rivetti di Val Cervo, P. et al. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nature biotechnology* 2017, 35, 444-452.
38. Yang, N. et al. Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. *Nature methods* 2017, 14, 621-628.
39. Dennis DJ, Wilkinson G, Li S, Dixit R, Adnani L, Balakrishman A, Han S, Kovach C, Gruenig N, Kurrasch DM, Dyck RH, Schuurmans C. Neurog2 and Ascl1 together regulate a postmitotic derepression circuit to govern laminar fate specification in the murine neocortex. *PNAS* 2017, 114, E4934–E4943.
40. Guo Z, et al., In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell*. 2014, 14,188–202.
41. Liu Y, Miao Q, Yuan J, Han S'e, Zhang P, Li S, Rao Z, Zhao W, Ye Q, Geng J, Zhang X, Cheng L. Ascl1 Converts Dorsal Midbrain Astrocytes into Functional Neurons In Vivo. *J Neurosci*. 2015, 35, 9336–9355.
42. Sirko S, et al., Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. *Cell Stem Cell*. 2013, 12, 426–439.
43. Sprott, RL & Ramirez, L. Current inbred and hybrid rat and mouse models for gerontological research. *ILAR J*. 1997, 38:104-109.
44. Beas, BS et al., Distinct manifestations of executive dysfunction in aged rats. *Neurobiol Aging* 2013, 34: 2164-2174.
45. Pancani, T et al., Effect of high-fat diet on metabolic indices, cognition and neuronal physiology in aging F344 rats. *Neurobiol. Aging* 2013, 34: 1977-1987.
46. Guidi, M et al., Assessing the emergence and reliability of cognitive decline over the life span in Fisher 344 rats using the spatial water maze. *Frontiers in Aging Neurosci* 2014, 6:1-11.
47. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae* 2015, 7, 42-47.
48. McGill JA, Frazier CJ, Bizon JL. Molecular aspects of age-related decline: the role of GABA signaling. *Mol Med* 2015, 21, 450-460.

[0226]

49. Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic inhibition of GABA_A receptors. *Nat Rev Neurosci* 2005, 6, 215-229.
50. Tong X, et al., Ectopic expression of $\alpha 6$ and α GABA_A receptor subunits in hilar somatostatin neurons increases tonic inhibition and alters network activity in the dentate gyrus. *J. Neurosci* 2015, 35, 16142-16158.
51. Buzsáki G, Leung LW, Vanderwolf CH. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res.* 1983, 287, 139-171.
52. Bragin A, et al., Gamma (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *J Neurosci.* 1995, 15, 47-60.
53. Bazzigaluppi P, Beckett TL, Koletar MM, Lai AY, Joo IL, Brown ME, Carlen PL, McLaurin J, Stefanovic B. Early stage attenuation of phase amplitude coupling in the hippocampus and medial prefrontal cortex in a transgenic rat model of AD. *J Neurochem.* 2017 doi: 10.1111/jnc.14136.
54. Christian KM, Song H, Ming G-I. Functions and dysfunctions of adult hippocampal neurogenesis. *Ann Rev Neurosci* 2014, 37, 243-262.
55. Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S. Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J. Psychiatry Neurosci* 2013, 38, 6-23.
56. Berninger B, Guillemot F, Götz M. Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. *Eur J Neurosci.* 2007, 25, 2581–2590.
57. Britz O, Mattar P, Nguyen L, Langevin L-M, Zimmer C, Alam S, Guillemot F, Schuurmans C. A role for proneural genes in the maturation of cortical progenitor cells. *Cereb Cortex.* 2006, 16 Suppl 1:i138-151.
58. Casarosa S, Fode C, Guillemot F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development.* 1999,126, 525–534.
59. Li S, Mattar P, Dixit R, Lawn SO, Wilkinson G, Kinch C, Eisenstat D, Kurrasch DM, Chan JA, Schuurmans C. RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci.* 2014, 34, 2169–2190.
60. Masserdotti G, et al., Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell.* 2015, 17, 74–88.
61. Pang ZP, et al., Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature.* 2011, 476, 220–223.

[0227]

62. Treutlein B, et al., Dissecting direct reprogramming from fibroblast to neuron using single-cell RNA-seq. *Nature*. 2016, 534, 391–395.
63. McLaurin J, Kierstead ME, Brown ME, Hawkes CA, Lambermon MHL, Phinney AL, Darabie AA, Cousins JE, French JE, Lan MF, Chen F, Wong SSN, Mount HTJ, Fraser PE, Westaway D, St George-Hyslop P. Cyclohexanehexol inhibitors of Abeta aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med*. 2006, 12, 801–808.
64. Fenili D, Brown M, Rappaport R, McLaurin J. Properties of scyllo-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology. *J Mol Med*. 2007, 85, 603–611.
65. Murlidharan G, Samlusi RJ, Asokan A. Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system. *Frontiers in Mol Neurosci* 2014, 7, article 76, 1-9.
66. Murlidharan G, et al., Glymphatic fluid transport controls paravascular clearance of AAV vectors from the brain. *J. Clin. Invest. Insight* 2016, 1, e88034.
67. Womelsdorf T, et al., Dynamic circuit motifs underlying rhythmic gain control, gating and integration. *Nature Neurosci* 2014, 17, 1031-1039
68. Edwards E, et al., High gamma activity in response to deviant auditory stimuli recorded directly from human cortex. *Journal of neurophysiology* 2015, 94, 4269-4280.
69. Canolty RT, Knight RT. The functional role of cross-frequency coupling. *Trends in cognitive sciences*, 2010, 14, 506-515.
70. Lee H, et al., Phase locking of single neuron activity to theta oscillations during working memory in monkey extrastriate visual cortex. *Neuron*, 2005, 45, 147-156.
71. Chrobak JJ, Buzsaki G. Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *Journal of Neurosci* 1998, 18, 388-398.
72. Turner KM, Burne THJ. Comprehensive behavioural analysis of Long Evans and Sprague-Dawley rats reveals differential effects of housing conditions on tests relevant to neuropsychiatric disorders. *PLoS ONE*. 2014, 9, e93411.
73. Deacon RMJ. Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behav Brain Res*. 2009 200, 128–133.
74. Birrell JM, Brown VJ. Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *J Neurosci*. 2000, 20, 4320–4324.

[0228]

75. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979, 93, 74–104.
76. Hof PR, Bouras C, Object recognition deficit in Alzheimer's disease: possible disconnection of the occipito-temporal component of the visual system. *Neurosci. Lett.* 1991, 122, 53-56.
77. Viggiano, M., et al., Visual recognition memory in Alzheimer's disease: Repetition-lag effects. *Experimental Aging Research* 2008, 34, 267-281.
78. Francis, B.M., Kim J., Barakat, M.E., Fraenkl, S., Yücel, Y.H., Peng, S., Michalski, B., Fahnestock, M., McLaurin, J., Mount, H.T.J. Object recognition memory and BDNF expression are reduced in young TgCRND8 mice. *Neurobiol. Aging* 2012, 33, 555-563.
79. Barker GRI, et al., Recognition memory for object, place, and temporal order: A disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J. Neurosci* 2007, 27, 2948-2957.
80. Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res.* 2009 247–251.
81. Cordova CA, et al., Impaired executive function following ischemic stroke in the rat medial prefrontal cortex. *Behav Brain Res.* 2014, 258,106–111.
82. Caroni P. Inhibitory microcircuit modules in hippocampal learning. *Current Opinion in Neurobiol* 2015, 35, 66-73.
83. Yuan M, et al., Somatostatin-positive interneurons in the dentate gyrus of mice provide local- and long-range septal synaptic inhibition. *eLife* 2017, 6, e21105.
84. Ko J, Choi G, Lim JW. The balancing act of GABAergic synapse organizers. *Trends in Molecular Medicine* 2015, 21, 256-268.
85. Krueger-Burg D, Papadopoulos T, Brose N. Organizers of inhibitory synapses come of age. *Current Opinion in Neurobiology* 2017, 45, 66-77.
86. Joo, IL, Lai, AY, Bazzigaluppi P, Koletar, MM, Dorra A, Brown ME, Thomason LAM, Sled JG, McLaurin J, Stefanovic B. Early neurovascular dysfunction in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Scientific Report*, 2017, **7**, Article number: 46427.
87. Busche MA, et al., Rescue of long-range circuit dysfunction in Alzheimer's disease models. *Nat Neurosci* 2016, 18, 1623-1630.

[0229]

[0230]

[0231]

실시예 3: 뇌졸중 치료를 위한 뉴런 계통 전환

뇌졸중은 전 세계적으로 사망 및 장애의 주요 원인이다. 뇌졸중 생존자의 2/3 초과가 일상 생활을 방해하는 인지 및/또는 운동 결핍을 가지고 있다. 신경학적 기능 장애는 전 세계적인 질환 부담의 주요 원인을 나타낸다¹⁻⁴. 뇌졸중 생존자를 위한 치료법 및 치료 옵션은 제한적이다. 뇌졸중은 손상 부위와 병변 주위 실질의 신경교증과 함께, 뉴런 및 신경아교 세포의 손실을 초래하는 허혈성 손상이다. 뇌졸중은 또한 신경 세포의 손실, 손상 및 이소성 증식으로 인해 뉴런 네트워크 수준에서 흥분성-저해성 균형의 전체적인 변화뿐만 아니라 기계적 및 세포적 변화를 초래한다.

[0232]

도입부

[0233]

뇌졸중은 모든 연령층에서 발생할 수 있지만 성인 및 노년층에서 더욱 두드러진다. 뇌졸중은 전 세계적인 질환 부담의 주요 원인 중 하나이다⁴. 현재 가장 흔한 형태의 뇌졸중인 허혈성 손상 후 뇌를 보호하거나 복구할 수 있는 치료법 및 치료 옵션은 제한적이다. 장애의 주요 원인으로서, 전 세계적으로 연간 1,500만 명을 초과하는 뇌졸중 환자에서 추정되는 글로벌 비용(직접 및 간접)은 2020년 7,500억 달러이며⁴, 이 비용은 2030년에 두 배로 증가할 것으로 예상된다.

- [0234] 뇌졸중은 뇌로의 혈류가 중단될 때 발생한다. 이는 뇌 내의 뇌 혈관이 파열될 때 발생하는 출혈성 뇌졸중(뇌졸중 사례의 약 15%) 또는 뇌로 가는 혈류가 막힐 때 발생하는 허혈성 뇌졸중을 통해 발생할 수 있다. 출혈성 뇌졸중은 혈액 누출로 인해 뇌에 압력이 증가하고, 사망 위험 증가와 관련이 있다.⁵ 허혈성 뇌졸중은 가장 널리 퍼진 뇌졸중 유형으로 전체 사례의 약 85%를 차지한다.⁶ 허혈성 뇌졸중은 글로코스 및 뇌에 전달되는 산소 감소를 초래하여 급속한 세포 신경 세포 사멸을 일으키고 신경 기능 손상을 초래한다.
- [0235] 허혈성 뇌졸중은 흥분 독성, 칼슘 조절 장애, 산화 및 질산화 스트레스, 피질 확산 탈분극, 혈액-뇌 장벽(BBB) 붕괴, 부종 및 염증의 기전을 통해 뇌졸중 후 수 분 이내에 세포 손실을 초래한다.^{7,8} 이러한 기전은 허혈성 손상의 중심 코어 내의 모든 세포의 급속한 사멸을 전파하며, 주변 반음영(penumbra) 영역에서 더 느리고 더 진행적인 세포 사멸이 발생하는데, 이는 초기 손상 후 몇 시간 동안 생존할 수 있다. 뇌졸중 손상의 진행은 중첩되는 단계에서 발생한다. 급성기(최대 4일 지속)에서 허혈성 중심부의 괴사성 세포 사멸은 무산소성 탈분극 및 아데노신 트라이포스페이트(ATP) 부족으로 인해, 뇌졸중 발병 후 수 분 이내에 돌이킬 수 없는 손상을 초래한다. 주위-경색 주변은 뇌졸중 후 수 일 및 수 주 동안 세포사멸 세포 사멸을 겪기 시작한다. 또한, 주위-경색 환경 및 세포의 환경은 정상교세포("반응성" 정상교세포), 활성화된 미세아교세포 및 신경아교 흥터 형성에 기여하는 침투 면역 세포의 활성화로 이어지는 프로 및 항-염증 신호에 노출된다.⁹⁻¹¹ 반응성 정상교세포는 중간 필라멘트 단백질인 GFAP(신경아교 섬유 산성 단백질)을 상향조절하고 프로테오글리칸 및 염증 세포(예를 들어, 대식세포, 미세아교포)와 함께 손상된 조직을 둘러싸는 조밀한 장벽을 형성한다.^{11,12}
- [0236] 뇌졸중을 치료하기 위한 치료적 중재는 초기 손상 후 세포가 죽는 것을 방지하기 위한 혈류 회복 및 신경보호에 크게 초점을 맞춰 왔다. 이러한 중재는 성공이 제한적이며 성공한 중재는 시간에 민감하므로 뇌졸중 발병 후 짧은 시간 내에 투여해야 한다. 이와 관련하여, 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA)는 혈전을 파괴하여 혈류를 회복하고 결과적으로 초기 손상 후 추가 세포 손실을 방지하는 뇌졸중에 대한 FDA 승인 치료법이다. 그러나 이러한 접근법은 짧은 치료 효능 창(뇌졸중 후 4.5시간 이내)뿐만 아니라 환자의 치료에 대한 후보 여부로 인해 제한되어 대부분의 뇌졸중 환자에게 가용성 및 유용성을 배제한다.¹³ 뇌졸중 환자를 위한 치료 표준은 재화에 중점을 두었지만, 유익이 제한적이고 구현 및 평가에 대한 표준화된 접근 방식이 없다.¹⁴
- [0237] 뇌졸중은 손실된 세포를 대체하고 치료 창을 확장하며 궁극적으로 기능 회복을 촉진하기 위한 치료적 개입의 필요성으로 인해 세포 기반 요법의 이상적인 표적이다. 손상으로 손실된 뇌 세포를 대체하기 위해 상주 뇌 세포를 새로운 뉴런으로 전환하는 것은 뇌 복구를 위한 매력적인 접근법이다. 또한, 뇌졸중 손상의 비진행성 특성으로 인해 단일 용량 유전자 요법에 대한 세포 재프로그래밍이 가장 큰 잠재력을 제공할 가능성이 높다. 손상된 뇌가 해결되면 치료가 계속되고 뉴런이 대체되어 기능이 회복되고 "퇴행"의 가능성이 줄어든다. 또한, 최근 연구는 뇌졸중 후 정상교세포의 이질성을 강조하였으며¹⁵, 신경 세포 사멸에 기여할 수 있는 신경아교 흥터 내의 "독성" 정상교세포의 하위 집단을 확인하였다. 신경 세포 사멸에 기여하는 독성 정상교세포를 제거하기 위한 직접적인 세포 재프로그래밍은 정상교세포의 뉴런으로의 재프로그래밍 전략에 추가적인 이점을 제공한다.
- [0238] 치료적 개입을 연구하려면 인간 병태를 모방하는 동물 모델이 필요하다. 뇌졸중이 이질적인 결과를 가져온다는 지식을 바탕으로, 각각의 모델의 장단점을 연구 유형(예를 들어, 재생 대 신경보호) 및 사용될 결과 측정에 대한 각각의 적절성과 함께 고려해야 한다.¹⁶⁻²² 전임상 치료 회복 연구를 위해서, 예측 가능하고 재현 가능한 조직 손상 및 기능적 결함을 초래하는 모델이 필수적이다.²³
- [0239] 현재까지의 다수의 연구는 *Ascl1* 및 *Neurod1*을 포함하는 단일 신경-특이적 bHLH TF를 사용하여 신경 질환 및 손상의 마우스 및 비인간 영장류 모델에서 정상세포에서 뉴런으로의 전환을 유도하였고, 다양한 재프로그래밍 효율성 및 기능 개선 정도를 갖는 TF의 각태일이 보고되었다³⁰⁻³⁴. 허혈의 설치류 모델에서 발달 동안 신경 분화에 중요한 전사 인자인 *Neurod1*을 사용하여 개선된 기능적 결과가 최근 보고되었다.^{31,32} 이러한 연구는 뇌졸중 후 신경 복구 및 기능 회복을 위한 유전자 치료의 유망한 잠재력을 강조하지만, 재프로그래밍의 효능 및 기능적 결과에 대한 영향 측면에서 많은 질문이 여전히 중요하다.
- [0240] 본 연구는, *Ascl1-S46*으로 명명된 전신경 유전자 *Ascl1*의 변형된 버전을 사용하는데, 이는 뇌졸중으로 손상된 뇌에서 발견되는 환경적 저해성 제어에 적용되지 않도록 설계되었다. 허혈성 뇌졸중의 아급성 모델에서 뇌졸중으로 손상된 뇌에서 천연 *Ascl1* 유전자(야생형) 및 *Ascl1-S46*(돌연변이체)를 사용하여 정상교세포에서 신경 세

포로의 전환 효능을 검사하고 비교하였다. 정상세포 프로모터(즉, GFAP)의 제어 하에 *Asc11* 및 *Asc11-SA6*을 사용하여 국소 허혈성 뇌졸중의 두 가지 모델에서 세포 재프로그래밍에 따른 기능적 결과를 비교하였다.

[0241] 방법

[0242] 뇌졸중 모델. 뇌졸중은 손상 부위와 병변 주위 실질의 정상교세포증과 함께, 뉴런 및 신경아교 세포의 손실을 초래하는 허혈성 손상이다. 본 발명자들은 양호하게 확립되고 재현 가능한 엔도텔린-1(ET-1) 모델을 사용하여 운동 피질 뇌졸중을 유도할 것이다. ET-1은 국소 허혈성 손상, 정상교세포 반응성 및 지속적인 운동 결핍을 유발하는 혈관수축 펩타이드이며, 이것은 회복 연구에 이상적이다. 마우스에게 감각 운동 피질(브레그마에 비해 전방 +0.6mm, 측면 -2.25mm 및 복부 1.0mm)에 단일 ET-1 주사(400pmol, 1 μ l; Calbiochem) 또는 감각 운동 피질에 3X ET-1 주사(400pmol, 1 μ l/주사, 브레그마로부터 +0.6AP, -2.25ML, -1.0DV; +1.6AP, -2.25ML, -1.0DV; 및 -0.4AP, -2.25ML, -1.0DV)(삼중-ET-1)를 제공하였다. 실험은 리포터 마우스(R26R-YFP(Jackson Labs: B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J) 및 R26R-tdTomato(Jackson Labs: Gt(ROSA)26Sortm9(CAG-tdTomato)Hze) 포함) Cre-조건부 트랜스제닉 마우스 및 C57/B16 마우스의 성체(8 내지 12주령) 수컷 및 암컷 코호트에서 수행하였다. 간략하면, 마우스를 이소플로란을 사용하여 마취하고 정위 장치에 올려놓았다. 두피를 절개하고 주입 위치(위)의 두개골에 작은 구멍을 뚫었다. 멸균 PBS에 용해된 ET-1을 베벨 팁 26-게이지 해밀턴 주사기를 사용하여 0.1 μ l/분의 속도로 주입하였다. ET-1 주입이 완료된 후 바늘을 10분간 그대로 둔 후 천천히 뺐다. 가열 패드를 사용하여 체온을 37°C로 유지하고 동물을 가열 램프 아래에서 회복시켰다. 수술 후 진통을 위해 케토프로펜(5.0mg/kg; sc)을 투여하였다.

[0243] AAV 주입. C57/B16 마우스에서 AAV2/5-GFAP-Cre 또는 AAV2/5-GFAP-Asc11-t2a-Cre 또는 AAV2/5-GFAP-Asc11-SA6-t2a-Cre(Cre-조건부 트랜스제닉 마우스에서) 또는 AAV2/5-Flex::GFP + AAV2/5-GFAP-Asc11-Cre 또는 AAV2/5-Flex::GFP + AAV2/5-GFAP-Asc11-SA6-Cre 또는 빈 벡터(AAV2/5-Flex::GFP + AAV2/5-GFAP-Cre)를 뇌졸중 또는 모의 손상 후 제7일에 동측손상 피질에 주입하였다. 다음 좌표에서 각각 26게이지 바늘이 있는 5 μ l 해밀턴 주사기를 사용하여 0.1 μ l/분에서 1 μ l 총 부피로 1.0 $\times 10^{12}$ /ml: 브레그마로부터 [+0.6 AP, +2.25 ML, -1.0 DV]; [+1.6 AP, +2.25 ML -1.0 DV]; 및 [-0.4 AP, +2.25 ML, -1.0 DV]mm, 뇌졸중 병변의 전후 범위를 포괄하는 영역을 나타냄. 역류를 방지하기 위해 각각의 AAV 주사 후 바늘을 10분 동안 그대로 두었다가 천천히 뺐다. 가열 패드를 사용하여 체온을 37°C로 유지하고 마우스를 가열 램프 아래에서 회복시켰다. 수술 후 진통을 위해 케토프로펜(5.0mg/kg; sc)을 투여한다. 실험에 따라 군은 뇌졸중+AAV(Cre만, Asc11, Asc11-SA6) 및 모의(손상되지 않은 마우스)+AAV(Cre)를 포함하였다. 모든 마우스를 뇌졸중 전(기준선) 및 뇌졸중 후 3일 또는 4일(PSD3/4)에 일련의 행동 작업에 대해 시험하였다(뇌졸중 후 운동 장애가 관찰되었는지 확인하기 위해). 치료적 개입이 행동 회복을 평가하고 있음을 확인하기 위해서 기능적 손상을 나타낸 뇌졸중으로 손상된 마우스를 행동 평가에 사용하였다. 마우스를 하기에 설명된 작업에 따라 뇌졸중 후 최대 4개월 동안 행동 시험하였다.

[0244] AAV 작제물. 모든 AAV 작제물은 VectorBuilder™ Inc에 의해서 생성되고 패키징되었다.

[0245] 조직 가공 및 분석. 마우스를 과량의 아버틴(Avertin)(250mg/kg; i.p.)으로 마취시키고 식염수 및 4% 파라폼알데하이드(PFA)를 경심으로 관류시켰다. 뇌를 제거하고 4% PFA로 4시간 동안 후-고정시킨 다음 30% 수크로스에 넣어 냉동보존한 후 냉동 절편화(20 μ m)하고, 슈퍼프rost 슬라이드에 장착하였다. 절편을 PBS 중의 10% 정상 염소 혈청(NGS) 및 0.3% 트리톤으로 차단하고, PBS 중의 1차 항체(하기 표 참조)로 4°C에서 밤새 표지한 후 PBS 중의 2차 항체 및 DAPI와 함께 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 절편을 브레그마로부터 +1.6 및 -1.0 AP 영역 내에 위치한 20 $\times$ 배율로 본 마우스당 3개 이상의 관상 절편의 5 내지 9개 영상에서 마커의 중첩 발현에 대해 분석하였다.

[0246] 행동 평가. 본 연구에 사용된 마우스 모델에서 양호하게 확립된 일련의 행동/기능 시험을 활용하였다. 이는 다음을 포함한다: (1) 발 악력의 최대 피크 힘에 대한 관독값을 제공하는 BIOSEP 악력 시험; (2) 수평 사다리 시험 및 (3) 숙련된 조정을 평가하는 데 사용되는 발 오류 시험; (4) 자발적인 보행 중 다양한 매개변수의 차이를 측정하기 위한 CatWalk™을 사용한 디지털 보행 분석.

[0247] 발 걸음 분석. 마우스를 테이블 표면 위 12인치에 매달린 금속 격자(1cm 간격) 위에 배치하였다. 동물이 3분 동안 격자 주위를 걷도록 허용하고 아래에서 기록하였다. 반대쪽 앞발과 뒷발로 만든 걸음 수와 발 미끄러짐을 분석하고(별도로 고려함) 미끄러짐 비율을 #슬립/#걸음으로 계산하였다. 시험은 뇌졸중 전(기준선), 뇌졸중 후 4일(PSD4; 뇌졸중 후 및 재프로그래밍 전) 및 PSD28(AAV 후 21일)에 수행되었다. 다음 포함 기준이 적용되었다: (i) 뇌졸중 후 장애를 입증함(기준선 성능에 비해 30% 더 많은 미끄러짐으로 정의됨) 및 (ii) 시험 중에 얻은

50걸음 초과.

[0248] **보행 분석:** 보행 분석은 자동화된 Noldus CatWalk XT 시스템(Noldus, 네덜란드 소재)을 사용하여 수행되었다. 마우스에게 빛으로 조명된 유리 통로를 횡단하도록 허용하였고, 다수의 보행 매개변수를 측정하였다. 마우스가 직행 경로를 취하고 통과하는 동안 속도가 60%를 초과하게 변하지 않는 최소 3회의 성공적인 시도가 필요하였다. 발자국을 고속 비디오 카메라를 사용하여 기록하였고, 걷는 동안 발 위치 및 사지 조정을 둘러싼 다양한 변수에 걸쳐 CatWalk XT 8.1 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 기준선에서 군 간에 유의한 차이가 있거나 뇌졸중 후 유의하게 손상되지 않은 매개변수는 분석에서 제외되었다. PSD28에 대한 보행 분석을 수행하고 치료군 간 매개변수를 비교하였다.

[0249] **사다리 시험:** 수평 사다리 시험은 장치 끝에 골 박스가 있고 간격이 일정하지 않은 가로대가 있는 높은 사다리로 구성되었다. 마우스를 골 박스에 2분 동안 적응시킨 후 시험일당 3번 연속으로 사다리를 건너도록 유도하였다. 시험 중에 마우스를 기록하고 반대쪽 앞발 걸음 수와 미끄러짐 수에 대해 비디오를 검사하여 손상된 앞발의 미끄러짐 비율을 계산하였다. 마우스를 뇌졸중(기준선) 이전, PSD3/4(AAV 이전) 및 PSD 28에 시험하였다. PSD3/4에서 미끄러짐%의 증가를 나타내지 않은 마우스를 추가 분석에서 제외하였다.

[0250] **악력:** 악력 측정기(Bioseb™)를 사용하여 앞다리 신경근 기능을 평가하였다. 마우스의 꼬리를 잡고 앞발로 금속 당김 막대를 잡도록 허용하였다. 막대가 풀리고 센서 값이 기록될 때까지 힘 센서의 축을 따라 수평면에서 마우스를 부드럽게 잡아당겼다. 마우스는 한 번의 시험에서 3회의 악력 시험을 수행하고 시험 기간 동안 평균값을 기록한다(기준선, PSD3/4, PSD14 및 PSD28/29). 삼중 ET-1 뇌졸중을 제공받은 마우스를 PSD28, PSD59, PSD89 및 PSD120의 작업에서 평가하여 장기간 손상 및 회복을 조사하였다. PSD3/4의 기준선에 비해 악력(그램 단위로 가해지는 힘)이 30%를 초과하게 변화한 마우스를 분석에 포함시켰다.

[0251] **데이터 획득 및 통계 분석:** 모든 실험은 손상/치료 상태가 블라인딩된 실험으로 수행되었다. Prism™(v.9, GraphPad™)을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 3개 이상의 군을 비교하기 위해 일원 분산분석(ANOVA)을 사용하였다. 행동 데이터 분석에는 이원 반복 측정 분산분석을 사용하였다. 차이는 $p < 0.05$ 에서 유의미한 것으로 간주되었다. 값을 평균 $\pm$ SEM으로 표시한다.

표 2

면역조직화학에 대해서 사용된 시약 요약

1차 항체	희석	회사	카탈로그 번호
Ch 항 GFP	1:200	평균	GFP-1020
Rb 항 NeuN	1:200	Millipore	ABN78
2차 항체	희석	회사	카탈로그 번호
항 rb Alexa 568™	1:400	Life Tech	A11036
Anti ch Alexa 488™	1:400	Life Tech	A11039
핵 염색	희석	회사	카탈로그 번호
DAPI	50ng/ μ l	Life Tech	IG571

[0252]

[0253] 결과

[0254] *Asc11* 세린 포스포억제제 부위를 돌연변이시키면 손상된 피질에서 성상세포에서 뉴런으로의 전환이 향상된다.

[0255] 이전 연구에서는 전신경 유전자 *Asc11*(야생형)이 감각-운동 피질에 두개내 주사 후 대조군(손상되지 않은) 성체 마우스의 대뇌 피질에서 성상교세포를 뉴런으로 전환시킬 수 있음을 나타내었다. 또한, 미세환경의 저해성 신호에 민감하지 않도록 설계된 *Asc11*의 돌연변이체 형태(프롤린에 인접한 6개의 세린(S) 뉴클레오타이드가 알라닌(A)으로 대체되도록 설계됨, *Asc11-SA6*이라고 함)가 손상되지 않은 피질의 전환에서 더 효율적이다. *Asc11* 및 *Asc11-SA6*은 AAV2/5 벡터에 클로닝되었으며 GFAP 프로모터의 제어 하에 성상교세포를 표적으로 하였고 또한 *Asc11* 또는 *Asc11-SA6*의 부재 하에서 제어 벡터 역할을 하는 t2A-Cre 카세트를 운반하였다. 첫 번째 질문은 *Asc11-SA6*이 뇌졸중으로 손상된 대뇌 피질 환경에서 성상 세포의 뉴런으로의 재프로그래밍에 더 효과적인지의 여부였다.

- [0256] 이 질문에 답하기 위해서, AAV 벡터(AAV-Asc11, AAV-Asc11SA6 또는 AAV-Cre)를 감각 운동 피질 뇌졸중을 제공 받은 성체 cre-리포터 마우스(Rosa-YFP 또는 Rosa-TdTom)에게 두개내 주사하여 AAV-형질도입된 성상교세포의 운명 추적을 허용하였다. 마우스에게 제0일에 국소성 허혈성 뇌졸중을 유도하기 위해 ET-1 주입을 제공하였고, 제7일에 병변이 있는 피질에 AAV를 주입하였는데, 이는 뇌졸중 후 아급성 단계를 나타낸다. Et-1 뇌졸중은 병변 부위 주변에 신경 세포 사멸과 신경아교 흥터 형성을 초래한다(Shen X-Y et al., 2021; Livingston et al., 2020). AAV 전달 3주 후인 뇌졸중 후 28일(PSD28)에 뇌를 제거하고 절개하고 성숙한 뉴런(NeuN+)에 대해 염색하였다. tdTomato+(AAV 형질도입된 GFAP 발현 세포) 및 tdTomato+/NeuN+(재프로그래밍된 뉴런)의 총 수를 도 26에 나타낸다. 예상된 바와 같이, Asc11은 Cre 대조군에 비해서 재프로그래밍된 뉴런 백분율이 유의하게 증가하였고(각각 48.32 ± 3.21 대 28.01 ± 1.71 %TdTomato+/NeuN+/TdTomato+ 세포, Asc11 대 Cre), 뉴런 전환은 Asc11-SA6 마우스에서 유의하게 증가하였다(61.52 ± 4.03 %TdTomato+/NeuN+/TdTomato+ 세포). 따라서 돌연변이된 Asc11-SA6 유전자는 천연 Asc11에 비해 향상된 신경 재프로그래밍을 유도한다.
- [0257] *Asc11* 및 *Asc11SA6*의 과발현은 뇌졸중 손상 후 개선된 기능적 결과를 초래한다.
- [0258] ET-1 감각-운동 피질 뇌졸중을 제공받은 마우스는 다수의 행동 작업을 사용하여 측정할 수 있는 기능 장애를 갖는다. (1) 숙련된 걷기(발 걸함 및 수평 사다리 시험); (2) 보행 분석(걸을 때 미세 운동 조정) 및 (3) 신경근 강도를 평가하기 위한 악력을 포함한 운동 기능을 평가한 행동 작업을 사용하였다.
- [0259] 발 걸함 작업은 뇌졸중 후 제7일에 단일 ET-1 뇌졸중 및 AAV 주입(AAV-Asc11, AAV-Asc11-SA6 또는 AAV-Cre 대조군)을 제공받은 마우스에서 수행되었다. 반대쪽 걸음 및 미끄러짐(즉, 뇌졸중 측면과 반대되는 신체의 손상된 측면)을 앞발과 뒷발에 대해 기록하였다. 도 27에 도시된 바와 같이, 뇌졸중을 제공받은 모든 마우스는 뒷발(A) 및 앞발(B)의 미끄러짐%가 증가하여 PSD3/4에 상당히 손상되었다. PSD29에 의해서, AAV-Asc11-SA6을 제공받은 마우스는 크게 개선되었으며 기준선과 유사하게 수행하였다. 이러한 데이터는 재프로그래밍 후 제21일이 손상 후 운동 결과를 개선하기 위해서 Asc11-SA6 과발현에는 충분하지만 Asc11 과발현에는 충분하지 않다는 것을 나타낸다.
- [0260] 미묘한 운동 결손을 검출하는 민감한 분석인 보행 분석을 또한 수행하였다. PSD28에서 손상된 운동 기능을 입증하는 발 걸함 데이터를 뒷받침하기 위해, AAV-Cre를 제공받은 뇌졸중 손상 마우스는 PSD28에 모의 마우스(AAV-Cre를 제공받은 손상되지 않은 마우스)와 비교하여 병변 반대쪽(왼쪽) 뒷발 인체 영역과 체중 분포(최대 강도)가 크게 손상되었다(도 28). 특히, 발 걸함 작업에서 관찰된 것과 유사하게, AAV-Asc11 및 AAV-Asc11-SA6을 제공받은 뇌졸중 손상 마우스는 보행 성능이 향상되었지만 AAV-Asc11-SA6 처리 마우스만 PSD28에 뇌졸중 부상 대조군에 비해 훨씬 더 양호한 성능을 나타내었다.
- [0261] *Asc11-SA6* 치료 후 ET-1 뇌졸중의 더욱 심각한 모델에서 개선된 기능적 결과가 관찰된다.
- [0262] 운동 피질에 ET-1을 단일 주입하여 뇌졸중을 유도하는 것은 운동 장애를 초래하는 고도로 재현 가능한 뇌졸중 모델이다. 보다 심각한 운동 피질 뇌졸중 모델에서도 행동 개선이 관찰되는지 확인하기 위해 엔도텔린-1(ET-1)의 삼중 주입을 수행한 후^{32,35} AAV 치료 및 행동 평가를 수행하였다.
- [0263] C57BL/6 마우스의 코호트는 운동 피질에 ET-1을 삼중 주사하여 유발된 뇌졸중을 제공받았다. 뇌졸중 후 제7일에, *Asc11*(AAV5-Flex::GFP + AAV5-GFAP-Asc11-Cre) 또는 *Asc11-SA6*(AAV5-Flex::GFP + AAV5-GFAP-Asc11-SA6-Cre) 또는 빈 벡터(AAV5-Flex::GFP + AAV5-GFAP-Cre)를 ET-1 뇌졸중 주입 부위에 전달하였다. 본 발명자들은 다양한 치료군의 기능적 결과를 조사하기 위해 수평 사다리 시험을 수행하였다. 도 29에 도시된 바와 같이, 뇌졸중 및 Asc11-SA6 치료를 제공받은 마우스는 PSD29에서 상당히 개선되었으며(앞발 미끄러짐이 적음) 자신의 기준선 성능에 비해 손상되지 않았다. 따라서 보다 심각한 피질 뇌졸중 모델에서 Asc11-SA6 치료는 기능적 결과를 향상시킨다.
- [0264] *Asc11* 및 *Asc11-SA6*의 이소성 발현 후 악력이 향상된다.
- [0265] 단일 ET-1 뇌졸중 또는 삼중 ET-1 뇌졸중을 제공받은 마우스의 코호트에서 악력 분석을 수행하였다. 단일 ET-1 뇌졸중을 제공받은 마우스는 PSD3에 크게 손상되었으며 AAV-Cre(대조군) 처리된 마우스는 PSD28에 여전히 손상되었다. 그러나 AAV-Asc11 및 AAV-Asc11-SA6 처리된 마우스는 PSD28까지 기준선 수준으로 다시 개선되었는데, 이는 천연 또는 돌연변이 Asc11 유전자의 이소성 발현이 덜 심각한 뇌졸중 모델에서 기능 회복을 촉진하는 데 충분했음을 나타낸다(도 30).
- [0266] 야생형 및 돌연변이된 Asc11 유전자가 더 심각한 뇌졸중 모델(3중 ET-1)에서 회복을 촉진하는 데 동일하게 효율

적인지 여부를 결정하기 위해, 악력을 연장된 기간(최대 4개월) 동안 조사하여 회복 속도의 임의의 가능한 차이를 포착하였다. 도 31에 도시된 바와 같이, AAV-Cre(대조군) 처리된 마우스는 삼중 ET-1 뇌졸중 후 PSD120까지의 기준선 성능에 비해 유의하게 손상된 상태를 유지하였다. 단일 ET-1 뇌졸중 손상 마우스와 유사하게, AAV-Asc11 및 AAV-Asc11-SA6의 이소성 발현은 AAV-Asc11 처리된 마우스에서 PSD120까지 발생한 악력 시험의 성능을 기준선으로 회복하는 데 충분하였다. 흥미롭게도, AAV-Asc11-SA6 처리된 마우스는 PSD59까지 기준선 성능으로 회복되었는데, 이는 돌연변이된 Asc11 유전자가 야생형 Asc11보다 기능적 결과를 개선하는 데 더 효율적이라는 것을 나타낸다.

[0267] 결론:

[0268] 종합하면, 본 실시예의 발견은 *Asc11*의 변형된 버전인 *Asc11-SA6*의 사용이 뇌졸중 후 정상교세포에서 뉴런으로의 전환을 유도하는 데 있어서 *Asc11*보다 더 효율적이라는 것을 확인해 준다. 이러한 효율성 증가는 숙련된 운동 시험(발 걸함 및 사다리 시험); 보행 및 악력의 향상된 기능적 결과와 상관관계가 있었다. *Asc11-SA6*의 이소성 발현은 단일 ET-1 또는 삼중 ET-1 병변을 제공받은 마우스의 기능적 결과를 개선하는 데 *Asc11*보다 더 효율적이었다. 따라서, *Asc11-SA6* 매개 피질 정상교세포의 뉴런 계통 전환은 손상된 뇌를 치료하는 데 유용한 전략이다.

[0269] 참고문헌

1. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18: 459-480, PM:30879893.
2. Anderson CS, Carter KN, Brownlee WJ, Hackett ML, Broad JB, Bonita R (2004) Very long-term outcome after stroke in Auckland, New Zealand. *Stroke* 35: 1920-1924, PM:15178818.
3. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, Bennett DA, Moran AE, Sacco RL, Anderson L, Truelsen T, O'Donnell M, Venketasubramanian N, Barker-Collo S, Lawes CM, Wang W, Shinohara Y, Witt E, Ezzati M, Naghavi M, Murray C (2014) Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 383: 245-254, PM:24449944.
4. Feigin VL et al., (2020) The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *Lancet Neurol.*, 19:255-265.
5. Andersen, K.K., Olsen, T.S., Dehlendorff, C., and Kammergaard, L.P. (2009). Hemorrhagic and Ischemic Strokes Compared: Stroke Severity, Mortality, and Risk Factors. *Stroke* 40, 2068-2072.
6. Mozaffarian, D., Benjamin, E.J., Go, A.S., Arnett, D.K., Blaha, M.J., Cushman, M., de Ferranti, S., Després, J.-P., Fullerton, H.J., Howard, V.J., et al. (2015). Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 131, e29-e322.
7. Iadecola, C., and Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* 17, 796-808.

[0270]

8. Rayasam, A., Hsu, M., Hernández, G., Kijak, J., Lindstedt, A., Gerhart, C., Sandor, M., and Fabry, Z. (2017). Contrasting roles of immune cells in tissue injury and repair in stroke: The dark and bright side of immunity in the brain. *Neurochem. Int.* **107**, 104–116.
9. Huang, L., Wu, Z.-B., ZhuGe, Q., Zheng, W., Shao, B., Wang, B., Sun, F., and Jin, K. (2014). Glial Scar Formation Occurs in the Human Brain after Ischemic Stroke. *Int. J. Med. Sci.* **11**, 344–348.
10. Burda, J., and Sofroniew, M. (2014). Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron* **81**, 229–248.
11. Silver, J. (2016). The glial scar is more than just astrocytes. *Exp. Neurol.* **286**, 147–149.
12. Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* **32**, 638–647.
13. Diamandis, T. and Borlongan, C.V. (2015) One, Two, Three Steps Toward Cell Therapy for Stroke, *Stroke* **46**(2), 588-591
14. Saver, J.L., Fonarow, G.C., Smith, E.E., Reeves, M.J., Navalkele, D., Grotta, J.C., Grau-Sepulveda, M.V., Hernandez, A.F., Peterson, E.D., and Schwamm, L. (2015). Abstract 50: Shape of the TPA Time - Benefit Curve: Insights From The National US Get With The Guidelines - Stroke Population. *Stroke* **46**, A50–A50.
15. Shen X-Y et al., (2021) Activation and Role of Astrocytes in Ischemic Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience.*, **15**: DOI=10.3389/fncel.2021.755955
16. Carmichael, S.T. (2005). Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* **2**, 396–409.
17. Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D.W., Hurn, P.D., Kent, T.A., Savitz, S.I., Lo, E.H., and for the STAIR Group (2009). Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. *Stroke* **40**, 2244–2250.

[0271]

18. Fluri, F., Schuhmann, M., and Kleinschnitz, C. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des. Devel. Ther.* 3445.
19. Jolkkonen, J., and Kwakkel, G. (2016). Translational Hurdles in Stroke Recovery Studies. *Transl. Stroke Res.* 7, 331–342.
20. Savitz, S.I., Chopp, M., Deans, R., Carmichael, S.T., Phinney, D., Wechsler, L., The STEPS Participants, and The STEPS Writing Committee: Sean I. Savitz, Larry Wechsler, Robert Deans, Michael Chopp, Tom Carmichael, and Donald Phinney. Contributors: Jaraslow Aronowski, Martin Bednar, Johannes Boltze, Cesar Borlongan, Tom Carmichael, Thomas Chase, Michael Chopp, D (2011a). Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke (STEPS) II. *Stroke* 42, 825–829.
21. Savitz, S.I., Chopp, M., Deans, R., Carmichael, S.T., Phinney, D., and Wechsler, L. (2011b). Stem cell therapy as an emerging paradigm for stroke (STEPS) II. *Stroke* 42, 825–829.
22. Sommer, C.J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 245–261.
23. Winstein, C.J., Stein, J., Arena, R., Bates, B., Cherney, L.R., Cramer, S.C., Deruyter, F., Eng, J.J., Fisher, B., Harvey, R.L., et al. (2016). Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 47, e98–e169.
24. Napoli, E., and Borlongan, C.V. (2016). Recent Advances in Stem Cell-Based Therapeutics for Stroke. *Transl. Stroke Res.* 7, 452–457.
25. Vonderwalde I, Azimi A, Rolvink G, et al., 2019 Transplantation of directly reprogrammed human neural precursor cells following stroke promotes synaptogenesis
26. Chen, L., Zhang, G., Gu, Y., and Guo, X. (2016). Meta-Analysis and Systematic Review of Neural Stem Cells therapy for experimental ischemia stroke in preclinical studies. *Sci. Rep.* 6.

[0272]

27. Wang, Y., Ji, X., Leak, R.K., Chen, F., and Cao, G. (2017). Stem cell therapies in age-related neurodegenerative diseases and stroke. *Ageing Res. Rev.* 34, 39–50.
28. Janowski, M., Wagner, D.-C., and Boltze, J. (2015). Stem Cell–Based Tissue Replacement After Stroke: Factual Necessity or Notorious Fiction? *Stroke* 46, 2354–2363.
29. Guo, Z., Zhang, L., Wu, Z., Chen, Y., Wang, F., and Chen, G. (2014). In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell* 14, 188–202.
30. Faiz, M., Sachewsky, N., Gascon, S., Bang, K.W., Morshead, C.M., and Nagy, A. (2015). Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell* 17, 624–634.
31. Livingston J, Lee T, Enbar T, Daniele E, Phillips C, Krassikova A, Enbar T, Kortebi I, Bang KWA, Donville B, Ibragimov O, Sachewsky N, Morshead CM, Faiz M. Direct reprogramming of astrocytes to neurons leads to functional recovery after stroke. *BioRx*, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.02.929091>
32. Chen, Y.C., Ma, N.X., Pei, Z.F., Wu, Z., Do-Monte, F.H., Keefe, S., Yellin, E., Chen, M.S., Yin, J.C., Lee, G., Minier-Toribio, A., Hu, Y., Bai, Y.T., Lee, K., Quirk, G.J., and Chen, G. (2020). A NeuroD1 AAV-Based Gene Therapy for Functional Brain Repair after Ischemic Injury through In Vivo Astrocyte-to-Neuron Conversion. *Mol Ther.* 28(1):217–234.
33. Ge, L.J., Yang, F.H., Li, W., Wang, T., Lin, Y., Feng, J., Chen, N.H., Jiang, M., Wang, J.H., Hu, X.T., and Chen, G. (2020). In vivo Neuroregeneration to Treat Ischemic Stroke Through NeuroD1 AAV-Based Gene Therapy in Adult Non-human Primates. *Front Cell Dev Biol* 8, 590008.
34. Rivetti di Val Cervo, P. et al. (2017) Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nature biotechnology*, 35, 444–452.

35. Roome RB, et al., (2014) A reproducible Endothelin-1 model of forelimb motor cortex stroke in the mouse. *J Neurosci Methods*. 2014 Aug 15;233:34–44. doi: 10.1016/j.jneumeth.2014.05.014.

실시예 4: 대뇌 오가노이드(CO) 배양

방법

본 연구에 대한 전체 작업흐름은 도 32에 도시한다.

피더가 없는 H1 인간 배아 줄기 세포(hESC, WiCell)를 hESC/hiPSC 유지를 위한 TeSR™-E8™ 키트(StemCell Tech; #05990)의 Matrigel에서 배양하였다. hESC를 사용하여 일부 변형시켜 STEMdiff Cerebral Organoid Kit(StemCell Tech; #08570) 및 STEMdiff Cerebral Organoid Maturation Kit(StemCellTech; #08571)에 포함된 배지를 사용하여 CO를 생성하였다. 간략하면, hESC를 50 μM Y-27632(ROCK 저해제; StemCell Tech; #72302)가 존재하는 배아체(EB) 형성 배지에서 12,000개 세포/웰로 96웰 V자형 바닥 초저 부착 플레이트에 제2일까지 플레이트팅하였다. 이중 SMAD 저해제(2 μM Dorsomorphin; StemCellTech; #72102 및 2 μM A83-01; StemCell Tech; #72022)를 플레이트팅일부터 제5일까지 첨가하였다. 새로 형성된 EB를 유도 배지를 함유하는 저결합 24웰 플레이트로

옮겼다. 제9일에, 광학적으로 반투명한 가장자리가 있는 EB를 매트릭셀(Corning; #354277)에 포메시킴, StemCell Tech 확장 배지를 갖는 6웰 초저 접착 플레이트에 넣었다. 제5일부터 제13일까지, 배지에 1 μ M CHIR-99021(StemCell Tech; #72052) 및 1 μ M SB-431542(StemCellTech; #72232)를 보충하여 양호하게 정의된 극성화된 신경 표피 유사 구조의 형성을 지원하였다. 제13일에, 발아 표면으로서 확장된 신경 표피를 나타내는 포매된 EB를 37°C 인큐베이터에서 성숙 배지를 함유하는 12-웰 회전 생물반응기(Spin Omega)로 옮겼다. CO에는 주 2회 성숙 배지를 공급하였다. 2014년 Lancaster 방법론(Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. Nat Protoc. 2014;9:2329-2340. doi: 10.1038/nprot.2014.158)에 의해 생성된 CO를 이 연구에서도 유사하게 사용하였다.

[0279] 아테노-연관 바이러스(AAV)를 사용한 CO의 주입

[0280] 제90일 또는 제119일에, 개별 CO에 성숙 배지 중의 AAV2/8-GFAP-mCherry 또는 AAV2/8-GFAP-ASCL1-mCherry를 1×10^{12} GC/ml로 주입하고 오비탈 진탕기로 옮겼다. 주입 후 48시간 후에 배지를 교환하고 CO를 수집 전 3주 동안 배양하였다.

[0281] CO 수집 및 분석

[0282] CO를 PBS로 1회 세척하고, 4% 파라폼알데하이드(PFA)에 밤새 로커에서 4°C로 고정시켰다. 다음날 CO를 밤새 30% 수크로스로 옮기고 냉동절편화를 위해 OCT에서 급속 냉동하였다. 면역조직화학을 위해, 샘플(두께 10 μ m)을 0.1% TritonX™-100을 함유한 PBS로 세척하여 과량의 OCT를 제거하고 시트레이트 완충액에서 항원 검색을 수행하였다. 0.1% TritonX-100 및 10% 말 혈청을 함유한 PBS를 사용하여 1시간 동안 차단을 수행하였다. 차단 용액에 희석된 1차 항체(GFAP; Novus bios; NB100-53809, mCherry; Millipore; M11217, Doublecortin; Abcam; ab77450)를 밤새 인큐베이션시킨 후, 핵 염색 및 장착 전에 1시간 동안 2차 항체를 인큐베이션시켰다.

[0283] 결과

[0284] 도 33에 예시된 바와 같이, AAV2/8-GFAP-mcherry가 주입된 CO(좌측 패널)에서, GFAP 발현(성상교세포 마커)은 GFAP 프로모터 하에 발현된 mCherry와 함께 국재화되었다. 반면에, AAV2/8-GFAP-ASCL1-mCherry가 주입된 CO에서는 GFAP의 발현이 없어졌고(우측 패널), mCherry를 발현하는 세포의 형태는 성상교세포-유사 구조에서 신경-유사 구조로 변화되었다.

[0285] 도 34에 예시된 바와 같이, AAV2/8-GFAP-mcherry가 주입된 CO(좌측 패널)에서, Doublecortin(DCX; 초기 뉴런 마커) 발현은 GFAP 프로모터 하에서 발현된 mCherry와 공동 국재화되지 않았다. 그러나, DCX의 발현은 AAV2/8-GFAP-ASCL1-mCherry(우측 패널)가 주입된 CO에서 mCherry(밝은 화살표)와 공동 국재화되었다.

[0286] 도 35에 도시된 바와 같이, AAV2/8-GFAP-Ascl1-mCherry 또는 AAV2/8-mCherry가 주입된 인간 CO(90일)에서 형질 도입 후 21일에 성상교세포(GFAP)의 비율이 감소하였고 동시에 뉴런 마커(NeuN, 성숙한 뉴런; DCX, 미성숙 뉴런)가 증가하였다.

[0287] 이러한 결과는 인간 CO에서 마우스 bHLH 전사 인자의 발현 후 성상교세포가 뉴런으로 성공적으로 재프로그래밍 되었음을 입증한다. 이것은 돌연변이 bHLH 전사 인자의 본 명세서에서 입증된 효과에 기초하여 이해되어야 하며, 인간 CO에서 성상교세포의 뉴런으로의 재프로그래밍은 돌연변이 bHLH 전사 인자의 사용으로 개선될 수 있을 것으로 예상된다.

[0288] 실시예 5: Ascl1 포스포-부위 돌연변이는 생체내에서 성체 피질 성상교세포에서 뉴런 전환을 향상시킨다.

[0289] 신경 질환은 특정 뉴런 집단의 손실 또는 기능 장애와 가장 흔히 연관된다. 한번 손실되면, 뉴런은 드문 상황 및 제한된 뇌 틈새를 제외하고는 대체되지 않는다[1; 2]. 신경치료제의 부족과 조합하여 재생 반응의 부족은 외인성 세포 이식 및 내인성 신경 줄기 세포의 자극을 포함한 다양한 뉴런 대체 전략에 대한 탐구를 촉발하였다. 그러나, 이러한 접근법은 아직 장기적인 기능 회복을 위한 충분한 신경 통합을 초래하지 못했다[3; 4]. 더욱이, 외인성 인간 세포, 특히 태아 줄기 또는 전구 세포를 도입하는 것은 윤리적 우려를 불러일으키고 면역 거부, 종양 발생성 및 공급 제약으로 인해 혼란을 겪을 수 있다. 새로운 뉴런이 기존 뉴런 회로에 기능적으로 통합되는 내인성 뉴런 복구 전략을 식별하는 것은 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 새로운 치료 전략을 제공할 수 있기 때문에 획기적인 것이다.

[0290] 본 발명자들은 내인성 뉴런 대체를 위한 직접적인 신경 재프로그래밍의 가능성을 활용하기 시작하였다[5; 6]. 이러한 업적은 배아 뇌에서 하위 유형-특이적 신경 발생을 유도하는 데 있어 계통-지정 베이직-헬릭스-루프-헬

릭스(bHLH) 전사 인자(TF)의 역할에 대한 수십 년 간의 연구를 활용한다[1; 6]. Neurog2, Ascl1 및 Neurod4를 포함한 전신경 bHLH TF 및 Neurod1과 같은 하류 bHLH 유전자는 배아 뇌에서 신경발생의 중요한 설계자로 등장했으며[7] 현재 이중 세포 유형의 뉴런 전환을 유도하는 데 활용되고 있다[5; 6]. 발달 동안, 전신경 bHLH TF는 전사 캐스케이드의 최상위에서 작용하여 후기 발달 단계에서 신경 분화를 제어하는 기능을 하는 Neurod1과 같은 다른 TF를 활성화한다. 그러나, bHLH TF는 모든 세포 상황에서 활성화되지 않으며 환경 신호에 의해 저해될 수 있다. 예를 들어, 배아 피질에서, Neurog2는 배아일(E) E17에 끝나는 신경원성 기간 동안 후기 단계에서의 계속된 발현에도 불구하고 (E) 11.5에서 E14.5 사이에 글루타메이트성 뉴런 운명을 지정하는 데 단지 충분하고(기능 획득에 의해서; [8]) 필수적이다(기능 상실에 의해서; [9; 10; 11]). 유사하게, 배아 복부 중뇌에서 GABA성 개재뉴런의 운명을 지정하는 Ascl1은 [12] 초기(E12.5) 및 후기가 아닌(E14.5) 배아 단계에서 후부 중뇌 전구에서 이소성 GABA성 유전자만을 유도할 수 있다[9; 10; 11].

[0291] 전신경 유전자의 세포 상황-의존적 활성화는 시작 세포가 동일성(즉, 신경 계통)에서 더 유사할 때 체세포를 유도된 뉴런(iNeuron) 운명으로 전환하는 것이 더 효율적이라는 공감대가 커지고 있는 신경 재프로그래밍까지 확장된다. 따라서, 먼 관련된 섬유아세포를 iNeuron으로 효율적으로 전환하기 위해서, Ascl1은 초기 "BAM" 조합(Brn2/Pou3f2, Ascl1, Myt1l)에서와 같이 다른 TF와 조합된다[13; 14]. 이러한 맥락에서 Ascl1은 특정 3가 시그니처(H3K4me1, H3K27ac, H3K9me3)와 회합된 염색질을 여는 선구자 TF로서 중요한 역할을 하며, 이는 Brn2 및 기타 신경성 TF에 의해 접근된다[14]. 다른 연구는 Ascl1이 섬유아세포를 iNeuron으로 직접 전환할 수 있다고 보고했지만 이러한 iNeuron의 성숙에는 제한이 있다[15]. 유사하게, Ascl1은 인간 주피세포가 iNeuron으로 전환 분화되도록 촉발할 수 있지만 Sox2와 공동 발현될 때만 가능하며, 이는 신경 줄기/전구 세포-유사 단계를 통해 세포의 이동을 촉진한다(즉, 전환은 직접적이지 않다)[16; 17]. 신경 전구 세포가 뉴런으로 분화되도록 유도하는 Ascl1의 능력은 발달 역할과 일치하며[7], 선구자 TF 역할을 하는 Ascl1과 함께 전구 세포주[18] 또는 시험관 내 다능성 줄기 세포를 사용하여 요약되었다[15; 19; 20].

[0292] 성상교세포는 신경퇴행성 질환 및 뇌졸중과 같은 손상에서 활성화된 상태가 질환 병리학에 기여하므로 뉴런 전환을 위한 일반적인 표적 세포이다[5; 6]. Ascl1은 단독으로 잘못 발현될 때 시험관내에서 피질 성상교세포를 iNeuron으로 전환할 수 있거나[21; 22; 23; 24] 또는 다른 TF와 함께 예를 들어, 도파민성 iNeuron을 만든다[25]. 척수 성상교세포도 iNeuron로 재프로그래밍될 수 있지만 흥미롭게도 피질 표현형보다는 구별되는 V2 개재 뉴런 유사-동일성이 달성된다[24]. Ascl1이 생체내에서 성인 중뇌 성상교세포를 iNeuron으로 전환할 수 있다는 보고가 있지만[26], 대부분의 연구는 Ascl1이 생체내에서 성인 피질과 해마에서 낮은 전환 효율을 가지고 있음을 시사한다[27; 28]. 따라서 Ascl1과 같은 전신경 유전자가 특히 생체내에서 어떻게 조절(즉, 저해)되는지 이해하는 것은 재생 의학에서 효율적으로 사용하는 데 중요하다. Ascl1 및 Neurog2의 뉴런 전환 효율을 향상시키기 위해 여러 가지 접근법이 취해졌다. 예를 들어, 최근 CRISPR-기반 접근법으로 나타난 바와 같이 Ascl1을 다른 TF와 함께 발현하면 뉴런 전환을 향상시킬 수 있으며 결과적으로 iNeuron은 파킨슨병 모델에서 치료 이점을 얻을 수 있다[29]. 마찬가지로 Neurog2는 Bcl2와 같은 다른 신호와 조합되어 생체 내에서 강력한 계통 전환인자가 될 수 있다[30]. 신경원성 유전자의 전사 억제자인 REST의 녹다운은 또한 신경 계통 전환을 향상시킨다[31; 32]. 마지막으로, 또 다른 획기적인 연구에서는, 뉴런이 풍부한 미토콘드리아 유전자의 CRISPR-활성화가 Neurog2 및 Ascl1 재프로그래밍 효율을 향상시켰다[33]. 따라서 bHLH TF 활성을 차단하는 조절 사건을 식별하고 표적화하는 것은 신경 재프로그래밍을 개선하기 위한 유익한 전략임을 입증한다.

[0293] 시험관내와 비교하여 생체내에서 더 낮은 뉴런 전환 효율 문제를 해결하기 위해서[6], Ascl1의 중요한 번역후 변형으로서 인산화의 중요성을 조사하였다. 신경원성 bHLH TF가 정상적인 세포 상황 외부에서 발현될 때[8; 34], 이들은 신경원성 활성을 제한하는 인산화-의존적 저해에 적용된다. 실제로, bHLH TF 기능은 "가변저항기-유사 방식"으로 작용하는 프롤린-지향 세린 트레오닌 키나제(예를 들어, GSK3, ERK1/2, Cdk)에 의한 인산화에 의를 통해서 저해되고; 세린-프롤린(SP) 또는 트레오닌-프롤린(TP) 부위가 더 많이 인산화될수록, TF가 DNA에 결합하고 표적 유전자를 트랜스활성화하여 뉴런 운명 지정 및 분화를 촉진하는 능력이 적어진다[8; 34; 35; 36]. bHLH TF 활성을 유지하기 위해서, 본 발명자들[8; 34] 및 다른 연구자들[35; 36; 37; 38; 39]은 프롤린(P)-지향 포스포-부위에서 알라닌(A)으로의 돌연변이된 세린(S) 및 트레오닌(T)(즉, SP/TP 대 SA/TA 돌연변이)을 갖는다. 이러한 돌연변이는 저해성 프롤린-지향 키나제에 의한 인산화를 방지하고 배아 마우스 및 개구리 신경계에서 bHLH TF의 신경원성 가능성을 증가시킨다[8; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40].

[0294] 본 실시예의 목표는 Ascl1-SA6으로 지칭되는 Ascl1의 돌연변이 버전이 생체 내에서 성인 뇌의 피질 성상교세포의 뉴런 전환을 유도하는 데 더 효율적인지 여부를 결정하는 것이었다. 본 발명자들은 AAV 및 GFAP 프로모터[41]를 사용하여 본 연구를 시작하였는데, 그 이유는 이 조합은 처음에 보고된 것보다 덜 성상교세포-특이적인

것으로 나타났기 때문이다[42]. 그럼에도 불구하고, 모든 연구에서 Asc11을 Asc11-SA6과 직접 비교함으로써, 본 발명자들은 Asc11-SA6이 뉴런 마커 발현을 유도하고 성인 대뇌 피질에서 성상교세포 유전자를 억제하는 탁월한 능력을 가지고 있음을 입증한다. 뉴런 유전자 발현을 유도하는 Asc11-SA6의 향상된 능력은 이전에 수행된 배아 연구와 일치한다.

[0295] 물질 및 방법

[0296] 동물 및 유전자형분석. 동물 절차는 캐나다 동물 관리 협회의 지침에 따라 Sunnybrook Research Institute(21-757)의 승인을 받았다. 모든 실험에서 본 발명자들은 C57BL/6 배경에서 유지되고 Jackson으로부터 얻은 수컷 C57BL/6 야생형 마우스인 Rosa-ZsGreen(JAX #007906) 및 Rosa-tdtomato(JAX #007914) 트랜스제닉 마우스[43]를 사용하였다. 마우스를 12시간 명/12시간 암 주기 하에서 음식과 물에 자유롭게 접근하도록 가두었다. 유전자형분석을 위한 PCR 프라이머 및 조건은 Jackson Laboratory 프로토콜을 사용하여 수행하였다: Rosa-ZsGreen: 야생형 정방향: 5'-CTG GCT TCT GAG GAC CG-3'(서열번호 28); 야생형 역방향: 5'-AAT CTG TGG GAA GTC TTG TCC-3'(서열번호 29); 돌연변이체 정방향: 5'-ACC AGA AGT GGC ACC TGA C-3'(서열번호 30); 돌연변이체 역방향: 5'-CAA ATT TTG TAA TCC AGA GGT TGA-3'(서열번호 31). Rosa-tdtomato: 돌연변이체 역방향: 5'-GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC-3'(서열번호 32); 돌연변이체 정방향: 5'-CTG TTC CTG TAC GGC ATG G-3'(서열번호 33). PCR 주기는 다음과 같았다: 94℃ 2분, 10×(94℃ 20초, 65℃ 15초 주기당 *0.5c 감소, 68℃ 10초), 28×(94℃ 15초 분, 60℃ 15초, 72℃ 10초), 72℃ 2분.

[0297] AAV 클로닝 및 패키징. AAV2/8-GFAPlong-mCherry 및 AAV2/8-GFAPlong-Asc11-mCherry는 Leping Cheng의 선물이었으며 2.2kb GFAP 프로모터를 포함한다[26]. Asc11을 AAV2/8-GFAPlong-Asc11-mCherry에서 Asc11-SA6으로 대체하였다. Asc11-SA6에서, 6개 SP 부위 모두에서 세린이 알라닌으로 돌연변이되었다([34]에서와 같음). AAV5-GFAPshort-iCre는 이전에 설명되었으며[44], 681bp(gfaABC(1)D 변형 GFAP 프로모터를 포함한다[41]. Asc11-t2a-iCre 및 Asc11-SA6-t2a-iCre의 AAV5-GFAPshort 내로의 클로닝 및 Leping Cheng[26]으로부터의 AAV에서 GFAPshort 프로모터의 GFAPlong 프로모터로의 대체는 Genscript에 아웃소싱하였다. 클로닝 후 모든 AAV를 VectorBuilder Inc.에서 AAV 캡시드 8 또는 캡시드 5로 패키징하였다. 광유전학 실험의 경우 AAV5-EF1a-double floxed-hChr2(H134R)-EYFP-WPRE-HGFpA(카탈로그 번호 51502-AAV5)는 Addgene(20298)에서 구입하였다.

[0298] AAV의 두개내 주사. 베이트릴(2.5 mg/kg; Bayer, 02249243) 및 식염수(0.5 ml, Braun, L8001)와 함께 진통제로서 부프레노르핀(0.1mg/kg; Vetergesic, 02342510) 또는 트라마돌-HCL(20mg/kg; Chiron, RxN704598)을 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 16주령 수컷 C57BL/6 마우스의 두개내 주사를 수행하였다.

[0299] 도 36B의 mCherry AAV 주입의 경우, 좌표(AP: +1.1, L/M: ±1.2 DV: -2)에서 1μl 총 부피로 총 1.0×10⁸ GC를 주입하였다. Rosa-tdtomato 마우스에서 iCre AAV 주입을 위해(도 37C), 1μl 총 부피의 1×10¹² GC/ml(또는 총 1×10⁹ GC)를 좌표(AP: 2.2 LM: 0.6 DV:1.0)에 주입하였다. iCre AAV(도 37E, 도 37G, 도 38, 도 39 및 도 40)를 사용하여 Rosa-zsGreen 동물에서 수행된 다른 모든 실험에서 1μl 총 부피로 4.8×10¹² GC/ml(또는 총 4.8×10⁹ GC)를 좌표(AP: +2.15, L/M: ±1.7, DV: -1.7)에 주입하였다.

[0300] 광유전학 및 전기생리학. AAV-주입된 마우스를 2% 아이소플루란을 사용하여 마취시키고 4mm 개두술을 수행하였다(브레그마에서: AP 1.7mm, ML +2.15). 경막을 제거한 후, 실리콘-기반 폴리디메틸실록산(PDMS) 창을 피질 조직을 덮고 있는 1% 아가로스(PBS 내)의 얇은 층 위에 배치하였다. 마우스를 FVMPE-RS 다광자 현미경(Olympus)으로 옮기고 25x/1.05NA 대물렌즈(Olympus) 아래에 놓고 텅스텐 전극(0.255mm Ø, A-M 시스템)을 PDMS 창을 통해 30° 각도로 삽입하여, 피질에 깊이 100μm에 도달하였다. 900nm로 조정된 Insight Ti:Sapphire 레이저(SpectraPhysics)를 사용하여 Zs-녹색 형광을 여기시켰으며, 이의 방출은 대역 통과 필터(485 내지 540nm)로 정렬된 PMT에 의해 수집되었다. 제2 채널(575 내지 630nm)을 또한 동시에 기록하여 텅스텐 전극 팁의 조직 내 위치를 더 잘 시각화하였다. Chr2의 동시 집중 광자극(PS)을 위해서, 별도의 검류계가 장치된 라스터 스캔 가시파장 레이저(458nm)를 사용하였다. PS는 Zs-녹색-양성 세포가 존재하는 직경 250μm의 원형 영역 위에 제시되었다. PS를 10초 간격(PS 오프)으로 동일한 영역에 걸쳐 10회 반복하였다. PS를 4mW/mm2의 파워로 4Hz에서 원형 영역에 전달하였고 총 3초 동안 지속하였다. 저임피던스 텅스텐 전극을 사용하여 Axon 멀티클램프 700B 증폭기(Molecular devices)에 의해 전류 클램프 모드에서 기록된 LFP 대역(1 내지 300Hz)의 전압 변화를 획득하였다. 아날로그 신호를 40배(40mV/mV) 증폭하였고, 데이터 획득 시스템 Digidata 1440A™(Molecular devices)를 통해 디지털화하였다. LFP 신호의 재분극 단계를 설명하기 위해 2단계 감쇠 모델을 사용하였고 느린 성분을 감쇠 상

수로 보고하였다.

[0301] 조직 처리 및 절편화. 관류 전에 마우스를 케타민(75mg/kg, Narketan, 0237499)과 자일라진(10mg/kg, Rompun, 02169592)으로 마취시켰다. 얼음 냉각된 식염수(0.9% NaCl, Braun, L8001), 그 다음 인산염 완충 식염수(PBS, Wisent, 311-011-CL) 중의 4% 파라폼알데하이드(PFA, Electron Microscopy Sciences, 19208)를 10ml/분의 유량으로 연동 펌프를 5분 동안 사용하여 대략 20배의 혈액 부피로 심장내 관류를 수행하였다. 뇌를 수집하고 PBS에 용해된 4% PFA에 밤새 후-고정시킨 후 4℃에서 20% 수크로스(Sigma, 84097)/1X PBS에 밤새 동결 보호하였다. 관상 뇌 절편을 Leica CM3050™ 크리오스타트(Leica Microsystems Canada Inc., 캐나다 온타리오주 리치몬드 힐 소재)에서 10 내지 30μm로 절단하고, Fisherbrand™ Superfrost™ Plus Microscope Slides(Thermo Fisher Scientific, 12-550-15)에서 수집하였다.

[0302] 면역염색. 슬라이드를 PBS 중 0.3% Triton X-100에서 세척하고, 그 다음 1시간 동안 실온에서 PBS(PBST) 중 10% 말 혈청(HS, Wisent, 065-150) 및 0.1% Triton X-100(Sigma, T8787)에서 차단시켰다. 1차 항체를 다음과 같은 차단 용액에서 희석시켰다: 토끼 항-NeuN(1:500, Abcam #ab177487), 염소 항-GFAP(1:500, Novus #100-53809), 토끼 항-Sox9(1:500, Millipore #AB5535) 및 토끼 항-Dcx(1:500, Abcam #ab77450). 슬라이드를 PBS 중의 0.1% Triton-X-100에서 각각 10분 동안 3회 세척하고, Alexa568(1:500; Invitrogen Molecular Probes™, ThermoFisher Scientific, 캐나다 온타리오주 마캄 소재), Alexa488(1:500; Molecular Probes)에 접합된 중-특이적 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 슬라이드를 PBS에서 3회 세척하고, 4',6-다이아미디노-2-페닐인돌(DAPI, Invitrogen, D1306)로 대비염색하였다. 마지막으로, 슬라이드를 PBS에서 3회 세척하고, Aqua-polymount(Polysciences Inc., 18606-20)에 장착시켰다.

[0303] RNA 동계 혼성화 비색 RNA-동계 혼성화(ISH)를 이전에 기재된 바와 같이 다이콕시게닌으로 표지된 Ascl1 리보프로브를 사용하여 수행하였다[45]. 형광 RNA-ISH를 제조사의 지침에 따라 RNAscope® Multiplex Fluorescent Protection Kit v2(ACD #323110)를 사용하여 수행하였다. 간략하면, 뇌 절편을 4℃에서 15분 동안 후고정(4% PFA/1XPBS)시킨 후, 실온에서 50%, 70% 및 100% 에탄올(Commercial Alcohols, P016EAA)에서 각각 5분 동안 탈수시키고, 10분 동안 H₂O₂ 용액에서 인큐베이션시켰다. 그 다음 절편을 95℃에서 5분 동안 1× 표적 검색 용액에서 인큐베이션시키고, dH₂O로 세척한 다음 Protease Plus™(ACD, 322331)에서 40℃에서 15분 동안 인큐베이션시킨 후 세척 완충액으로 세척하였다. 표지된 RNA 프로브를 Ascl1(Mm-Ascl1 #313291)을 위해서 사용하였고, 제공된 음성 및 양성 대조군 프로브를 또한 사용하였다. 절편을 40℃에서 2시간 동안 프로브와 함께 인큐베이션시켰다. 증폭 및 염색 단계를 Opal™ 570(1:1500, Akoya #FP1488001KT) 형광단을 사용하여 제조사의 지침에 따라 완료하였다.

[0304] 영상화, 정량화 및 통계. 모든 영상은 다음을 제외하고 Leica DMI8 Inverted Microscope(Leica Microsystems CMS, 11889113)을 사용하여 촬영하였다. 도 36E의 영상은 Zeiss Z1 Observer/Yokogawa 회전 디스크(Carl Zeiss) 현미경을 사용하여 획득하였다. 전체 운동 피질을 포괄하는 타일 이미지는 20× 대물렌즈에서 1μm 스텝 크기의 30μm z-스택을 사용하여 획득하였다. 도 36F에서, 전체 단면 영상을 Plan-Apochromat 10× 대물렌즈를 사용하여 Zeiss AxioScan Z1 장치(Carl Zeiss Canada)로 스캔하고 Hamamatsu CCD 카메라로 획득하였다. 면역염색된 세포의 정량화를 조건당 3개의 뇌 및 뇌당 최소 3개의 절편에서 수행하였다. 비교는 일원 분산분석 및 Tukey 다중 비교를 사용하여 이루어졌다. 유의성은 0.05 미만의 p-값으로 정의되었으며 다음과 같이 표시되었다: ns - 유의하지 않음, <0.05 *, <0.01 **, <0.001 ***.

[0305] 결과

[0306] 피질 성장교세포에서 AAV-GFAP-mCherry 발현은 생체내에서 장기간 유지되지 않는다.

[0307] 본 실시예의 목표는 Ascl1-SA6이 생체내에서 성인 피질 성장교세포에서 잘못 발현될 때 신경 마커 발현을 유도하는 데 있어서 Ascl1보다 더 효율적인지 여부를 결정하는 것이었다. 이 문제를 해결하기 위해서, 먼저 GFAPlong 프로모터([41]에서와 같이 2.2kb)를 운반하는 AAV8을 사용하여 피질 성장교세포에서 mCherry(대조군) 또는 Ascl1-mCherry를 발현시켰다(도 36A). 특히, 이러한 바이러스 전달 시스템은 생체내에서 성인 중뇌 성장교세포를 iNeuron으로 성공적으로 전환시키는 것으로 보고되어 있다[26]. AAV8-GFAPlong-mCherry 또는 AAV8-GFAPlong-Ascl1-mCherry의 총 1×10^9 게놈 카피(GC)를 정위 수술을 사용하여 대뇌 피질의 각각의 반구에 주입하였다(도 36A, [46]에서와 같음). 1개월 및 2개월 후에, 각각의 AAV 주사군에서 동물을 수거하였다. 형질도입 1개월 후, 성장교세포에서 mCherry 및 GFAP의 예상되는 동시 발생 발현이 AAV8-GFAPlong-mCherry-형질도입 뇌에

서 관찰되었다(도 36B). 그러나, 분석 타임라인이 2개월로 연장되었을 때, mCherry 발현은 대조군 AAV8-GFAPlong-mCherry-형질도입 뇌 중 어느 것에서도 더 이상 검출되지 않았다(도 36B). 대조적으로, 형질도입 후 1개월까지 AAV8-GFAPlong-Ascl1-mCherry가 형질도입된 많은 mCherry+ 세포는 초기 신경아세포 마커인 Dcx를 발현하였고, 2개월 후에 대부분의 mCherry+ 세포가 후기 신경 세포 마커인 NeuN을 공동 발현하였다(도 36B, 도 36C). 그럼에도 불구하고, 대조군 리포터 발현이 손실되었다는 점을 고려할 때, mCherry 대조군 및 Ascl1-mCherry 실험군에서 뉴런 마커 발현의 유도 효율을 비교할 수 없었는데, 이는 사용된 추적 시스템의 변화를 촉발시켰다.

[0308] AAV-GFAP-iCre는 생체내에서 형질도입된 피질 성상교세포의 운명의 장기간 추적을 위해서 사용될 수 있다.

[0309] 장기간 mCherry 리포터 발현에서 관찰된 문제를 회피하기 위해서, Cre-기반 영구 계통 추적 시스템, 구체적으로 Neurod1을 Ascl1로 대체하여 AAV5-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre를 생성한, Neurod1을 잘못 발현하기 위한 신경 재프로그래밍 연구에서 이전에 사용되었던 AAV5-GFAPshort-iCre 벡터를 사용하였다[44](도 36D). 특히, GFAPshort 프로모터는 GFAPlong과 유사한 성상교세포-특이성을 나타내지만 2배 더 높은 수준의 유전자 발현을 유도하는 681bp(gfaABC(1)D 변형된 프로모터이다[41].

[0310] 패키징된 AAV($1\mu\text{l}$ 총 부피 중 총 4.8×10^9 GC)를 도 36B에서와 동일한 좌표를 사용하여 Rosa-zsGreen 마우스의 피질에 정위적으로 주입하였다. 강력한 zsGreen 발현은 AAV5-GFAPshort-iCre 대조군 바이러스(나타내지 않음) 또는 AAV5-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre의 형질도입 후 2개월에 관찰되었다(도 36E). 다이크시게닌-표지된 Ascl1 리보프로브를 사용한 RNA 동계 혼성화를 사용하여 2개월 후에도 Ascl1 전사체가 Ascl1-t2a-iCre 형질도입된 뇌에서 검출되었다는 것이 추가로 확인되었다(도 36F). RNAscope™를 사용하여 최종 확인을 수행하였는데 이는 iCre 대조군 벡터가 형질도입된 성인 피질에서는 Ascl1 전사체가 검출되지 않았지만 형질도입 2개월 후 Ascl1-t2a-iCre가 형질도입된 뇌에서는 강력한 Ascl1 발현이 검출되었음을 확실하게 나타내었다(도 36G). 따라서 iCre 시스템은 Ascl1을 발현하고 Cre-의존성 리포터 발현을 유발하는 데 사용될 수 있으며, 이는 결국 성인 대뇌 피질에서 형질도입된 세포의 운명을 추적하는 데 사용될 수 있다.

[0311] Ascl1에서의 돌연변이화 세린 포스포-억제부위는 성인 피질에서 뉴런 계통 전환을 증가시킨다.

[0312] 본 연구의 주요 목표는 Ascl1(도 36H)의 6개 SP 부위의 세린-대-알라닌 돌연변이가 뉴런 전환 효율을 향상시킬 수 있는지 여부를 결정하는 것이었다. 특히, Ascl1-SA6이 E12.5 피질 전구체에 도입되었을 때 뉴런 전환에 더 효율적이라는 것이 이전에 입증되었지만[34], 이러한 변형된 bHLH 전사 인자가 성인 피질 성상교세포를 iNeuron으로 더 효과적으로 전환시킬 수 있는지에 대한 의문이 남아 있다. 이 문제를 해결하기 위해서, 피질 성상교세포[47], GFAPlong 및 GFAPshort 프로모터[41] 및 가장 밝은 형광 리포터[43] 중 두 가지인 Rosa-zsGreen 및 Rosa-tdtomato 리포터 마우스를 형질도입하였다고 보고된 AAV5 및 AAV8 캡시드를 비교하였다(도 37). 각각의 비교 군은 iCre 단독(대조군), Ascl1-t2a-iCre 또는 Ascl1-SA6-t2a-iCre의 3개의 유전 카고 세트를 가졌다. 2개의 주요 비교는 짧은 GFAP 프로모터가 있는 AAV8 대 AAV5, 그리고 AAV5의 GFAPshort 대 GFAPlong이었다. 상기와 같이, 모든 패키징된 AAV를 정위 수술을 사용하여 Rosa-zsGreen 또는 Rosa-tdtomato 마우스의 대뇌 피질에 주입하였다.

[0313] 먼저 Rosa-tdtomato 마우스의 피질에 주입되었을 때 NeuN 발현을 유도하는 AAV5-GFAPshort 작제물의 능력을 비교하였다(도 37C). 형질도입 후 21일에, 유사한 수의 iCre 및 Ascl1 형질도입된 세포가 NeuN 발현을 발현하였고, 단지 Ascl1-SA6만 iCre "기준선" 수준을 초과하게 NeuN 발현 세포의 수를 증가시킬 수 있었다(도 37D). 다음으로 Rosa-zsGreen 마우스의 피질에 도입되었을 때 AAV5-GFAPlong 작제물이 어떻게 작용하는지 조사하였다(도 37E). 형질도입 후 21일에, iCre 형질도입된 대조군 세포의 약 70%가 NeuN을 발현하였는데(도 37F), 이는 이 긴 프로모터가 GFAPshort 프로모터만큼 성상교세포에 제한되지 않음을 시사한다. 그럼에도 불구하고, Ascl1-SA6이 GFAPlong 프로모터로부터 발현되었을 때, Ascl1 또는 iCre에 비해 더 많은 형질도입된 세포가 NeuN을 발현하였다(도 37F). 마지막으로, GFAPshort 프로모터를 AAV8 캡시드에 대해 시험하였다(도 37G). 이 시스템을 사용하면, iCre 대조군 세포의 약 50%가 NeuN을 발현하였지만 Ascl1 및 더욱 놀랍게도 Ascl1-SA6 둘 다는 형질도입 후 제21일에 NeuN 발현 세포 수 증가를 유도할 수 있다는 것을 또한 발견하였다(도 37H).

[0314] 이들 연구로부터, Ascl1-SA6 형질도입 세포는 GFAP 프로모터 요소를 사용하여 성인 대뇌 피질에 전달될 때 Ascl1 형질도입 세포에 비해 NeuN을 더 빈번하게 발현한다는 결론을 내렸다. 또한, 본 연구는 GFAPshort 프로모터가 GFAPlong 프로모터보다 피질 성상교세포에 더 특이적임을 제한한 트랜스제닉 마우스를 사용한 이전 연구를 뒷받침한다[41]. 마지막으로, AAV5 캡시드는 GFAP 프로모터 요소와 조합되는 경우 AAV8보다 적은 대뇌 피질 뉴

론을 표지하며, 생체내에서 신경 재프로그래밍에 더 적합할 수 있다.

[0315] *Ascl1-SA6* 및 *Ascl1*은 성상교세포 마커 발현을 저해한다.

[0316] 진정한 계통 전환은 표적 세포, 이 경우 성상교세포가 뉴런 마커를 활성화할 뿐만 아니라 신경아교 마커의 발현을 소멸시켜야 함을 요구한다. 실제로, 배아 피질에서, *Ascl1-SA6*은 *Ascl1*에 비해 뉴런 유전자 발현을 활성화하는 데 더 효율적이고 Sox9 신경아교 프로모터를 트랜스활성화하는 데는 덜 효율적인 것으로 나타났다[34]. 따라서, 성인 피질에서 *Ascl1-SA6*이 Sox9 발현을 보다 효율적으로 하향조절할 수 있는지 여부가 의문이었다. 이 실험 세트에서는 GFAPlong 프로모터가 있는 AAV5 벡터와 GFAPshort 프로모터가 있는 AAV8 벡터의 두 시스템을 비교하였다. 예상된 바와 같이, AAV5-GFAP-long-iCre(도 38A, 도 38C) 또는 AAV8-GFAPshort-iCre(도 38B, 도 38D)가 형질도입된 세포의 약 60%가 21일 후에 Sox9를 발현하여 성상교세포 아이덴티티를 확인해주었다. 흥미롭게도, GFAP를 공동 발현한 iCre 대조군 세포의 비율은 AAV5-GFAP-long-iCre(도 38A, 도 38C) 또는 AAV8-GFAPshort-iCre(도 38B, 도 38D) 둘 다에 대해 더 낮았으며 약 30%였다. 하나의 가능성은 형질도입 당시 처음에 GFAP를 발현했던 성상교세포가 분석 전 21일 이내에 GFAP 발현을 중단했다는 것이다. 그럼에도 불구하고, 불일치에도 불구하고 iCre 대조군 세포의 절반 초과가 사실 성상교세포이다.

[0317] 다음 비교는 AAV5-GFAP-long-*Ascl1-SA6*-iCre(도 38A, 도 38C) 또는 AAV8-GFAPshort-*Ascl1-SA6*-iCre(도 38B, 도 38D)의 형질도입 후 신경아교 마커 발현이었다. 예상된 바와 같이, *Ascl1* 및 *Ascl1-SA6* 형질도입 세포는 형질도입 후 21일 후에 iCre 대조군 세포에 비해 Sox9 및 GFAP를 덜 빈번하게 발현하였다(도 38C, 도 38D). 특히, 마커 발현의 이러한 저하는 Sox9 및 GFAP를 공동 발현하는 세포의 비율을 변경하지 않았으므로, 두 세포 집단 모두 동일하게 영향을 받았다(도 38C, 도 38D). 종합하면, 이 데이터는 *Ascl1* 및 *Ascl1-SA6* 둘 다가 성인 피질에서 성상교세포의 운명을 억제한다는 주장을 뒷받침하며, 나아가 배아 피질에서 입증된 바와 같이 *Ascl1-SA6*이 신경아교 억제에 더 효율적이라는 것을 시사한다[34].

[0318] *Ascl1* 및 *Ascl1-SA6* 형질도입된 세포는 *Dcx+* 신경아세포 단계를 거친다.

[0319] 계통 전환을 나타주기 위한 또 다른 요구 사항은 형질도입된 성상교세포가 미성숙 *Dcx+* 신경아세포 단계를 통과한다는 것을 입증하는 것이다. 따라서 AAV5-GFAP-긴 작제물을 사용한 전환 효율은 성인 대뇌 피질의 형질도입 후 21일에 *Dcx* 발현을 조사함으로써 평가되었다(도 39). 21일 후, iCre 및 *Ascl1* 수준보다 높은 *Dcx*를 발현하는 *Ascl1-SA6* 형질도입된 세포의 수가 작지만 유의하게 증가하였다(도 39A 내지 도 39D). 그러나, 리포터 발현이 본 발명의 주입 전략을 사용하여 뇌실질막 하 구역의 실질 성상교세포 및 줄기 세포 둘 다에서 관찰되었으므로(도 39C), GFAP 및 *Dcx* 공동-발현을 사용하여 "일시적" 신경아세포 단계에서 성상교세포를 확인하였다. *Dcx*+GFAP+zsGreen+ 세포의 정량화는 *Ascl1* 및 *Ascl1-SA6* 형질도입된 세포 둘 다 iCre 형질도입된 피질 성상교세포보다 일시적인 신경아세포 유사 상태를 획득할 가능성이 더 높다는 것을 나타내었다(도 39D). 따라서 *Ascl1* 및 *Ascl1-SA6* 형질도입된 세포는 *Dcx* 발현을 개시하는 동등한 능력을 갖지만, *Ascl1-SA6*만 높은 *Dcx* 수준을 유지할 수 있고(도 39D), 궁극적으로 성숙한 뉴런 마커인 NeuN을 활성화할 수 있다(도 37).

[0320] *Ascl1-SA6*은 표적 성상교세포에서 iNeuron의 전기생리학적 특성을 유도한다.

[0321] 병리학적 상태에서 기능적 회복을 촉진하기 위해서, iNeuron은 내인성 뉴런과의 시냅스 연결을 만들고 축삭을 적절한 뉴런 표적으로 보냄으로써 기존 신경 회로에 통합되어야 한다. 생체내에서 iNeuron의 뉴런 네트워크 통합을 시험하기 위해서, GFAP-iCre 또는 GFAP-*Ascl1-SA6*을 운반하는 AAV를 뉴런의 광활성화에 민감한 방법을 제공하고 큰 유발 전위를 유도하는 Cre-의존적 광유전자 작동자인 FLEX-ChR2-(H134R)-YFP와 공동 형질도입하였다(도 40A). 36일 후, 두개골 창을 만들고 피질내 전기생리학적 기록을 수행하여 ChR2 광활성화(20Hz, 10ms 펄스 길이, 총 5초)에 대한 반응으로 총 신경 활동의 척도인 국소장 전위를 평가하였다(도 40B). 대표적인 추적에서 여러 부위에 대해 정량화한 *Ascl1-SA6* iNeuron 형질도입된 피질은 iCre 형질도입된 피질(도 40C, 도 40D), 뉴런 기능보다 기준선에 대한 유발 전위의 더 빠른 붕괴를 나타내었다. 따라서 이 데이터는 *Ascl1-SA6*이 형질도입된 성상교세포를 기능성 iNeuron으로 성공적으로 전환한다는 주장을 뒷받침한다.

[0322] 논의

[0323] 본 실시예는 생체내에서 성인 피질 성상교세포에서 발현될 때 뉴런 마커를 유도하고 신경아교 마커를 억제하는 *Ascl1* 및 *Ascl1-SA6*의 능력에 대한 상세한 비교를 제공한다. AAV 캡시드, GFAP 프로모터 및 Rosa-리포터 주기의 각각의 조합을 시험한 결과, *Ascl1* 또는 iCre 대조군이 형질도입된 세포에 비해 더 높은 비율의 *Ascl1-SA6* 형질도입된 세포가 성숙한 뉴런 마커인 NeuN을 일관되게 발현하는 것을 발견하였다. 대조적으로, 동일한 수의 *Ascl1* 및 *Ascl1-SA6* 형질도입된 세포는 일시적인 GFAP+*Dcx+* 신경아세포 단계의 시그니처를 가졌는데, 이는 *Ascl1*이 미

성숙 뉴런의 일부 특징을 유도할 수 있지만 이것은 완전한 분화 캐스케이드의 유도에서 Ascl1-SA6보다 덜 효율적이라는 것을 시사한다. 또한 Ascl1 및 Ascl1-SA6 둘 다는 성상교세포 마커(Sox9 및 GFAP)의 발현을 억제할 수 있었지만 Ascl1-SA6은 이와 관련하여 다시 우수하였다. 또한, 최근 ASCL1-SA5(인간 ASCL1 유전자에는 5개의 SP 부위가 있음)가 교모세포종 줄기 세포주가 최종 분화를 거치고 천연 ASCL1보다 더 효과적으로 세포 주기를 종료하도록 유도하여 이러한 종양 세포주의 성장을 억제할 수 있다는 것이 입증되었다[39]. 본 실시예의 작업과 함께, 현재 Ascl1에 비해 Ascl1-SA6과 같은 bHLH 돌연변이체의 향상된 프로-신경원성 및 항-성상교세포 능력에 대한 누적 지원이 존재한다.

[0324]

참고문헌

1. S. Grade, and M. Gotz, Neuronal replacement therapy: previous achievements and challenges ahead. *NPJ Regen Med* 2 (2017) 29.
2. R.A. Barker, M. Gotz, and M. Parmar, New approaches for brain repair-from rescue to reprogramming. *Nature* 557 (2018) 329-334.
3. K.V. Adams, and C.M. Morshead, Neural stem cell heterogeneity in the mammalian forebrain. *Prog Neurobiol* 170 (2018) 2-36.
4. R.M. Ruddy, and C.M. Morshead, Home sweet home: the neural stem cell niche throughout development and after injury. *Cell Tissue Res* 371 (2018) 125-141.
5. R. Bocchi, G. Masserdotti, and M. Götz, Direct neuronal reprogramming: Fast forward from new concepts toward therapeutic approaches. *Neuron* (2021).
6. L. Vasan, E. Park, L.A. David, T. Fleming, and C. Schuurmans, Direct Neuronal Reprogramming: Bridging the Gap Between Basic Science and Clinical Application. *Front Cell Dev Biol* 9 (2021) 681087.
7. A.M. Oproescu, S. Han, and C. Schuurmans, New Insights Into the Intricacies of Proneural Gene Regulation in the Embryonic and Adult Cerebral Cortex. *Front Mol Neurosci* 14 (2021) 642016.
8. S. Li, P. Mattar, D. Zinyk, K. Singh, C.P. Chaturvedi, C. Kovach, R. Dixit, D.M. Kurrasch, Y.C. Ma, J.A. Chan, V. Wallace, F.J. Dilworth, M. Brand, and C. Schuurmans, GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. *J Neurosci* 32 (2012) 7791-805.
9. O. Britz, P. Mattar, L. Nguyen, L.M. Langevin, C. Zimmer, S. Alam, F. Guillemot, and C. Schuurmans, A role for proneural genes in the maturation of cortical progenitor cells. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1 (2006) i138-51.
10. C. Schuurmans, O. Armant, M. Nieto, J.M. Stenman, O. Britz, N. Klenin, C. Brown, L.M. Langevin, J. Seibt, H. Tang, J.M. Cunningham, R. Dyck, C. Walsh, K. Campbell, F.

[0325]

Polleux, and F. Guillemot, Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *Embo J* 23 (2004) 2892-902.

11. C. Fode, Q. Ma, S. Casarosa, S.L. Ang, D.J. Anderson, and F. Guillemot, A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14 (2000) 67-80.
12. S. Casarosa, C. Fode, and F. Guillemot, Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126 (1999) 525-34.
13. T. Vierbuchen, A. Ostermeier, Z.P. Pang, Y. Kokubu, T.C. Sudhof, and M. Wernig, Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463 (2010) 1035-41.
14. O.L. Wapinski, T. Vierbuchen, K. Qu, Q.Y. Lee, S. Chanda, D.R. Fuentes, P.G. Giresi, Y.H. Ng, S. Marro, N.F. Neff, D. Drechsel, B. Martynoga, D.S. Castro, A.E. Webb, T.C. Sudhof, A. Brunet, F. Guillemot, H.Y. Chang, and M. Wernig, Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell* 155 (2013) 621-35.
15. S. Chanda, C.E. Ang, J. Davila, C. Pak, M. Mall, Q.Y. Lee, H. Ahlenius, S.W. Jung, T.C. Sudhof, and M. Wernig, Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1. *Stem Cell Reports* 3 (2014) 282-96.
16. M. Karow, R. Sanchez, C. Schichor, G. Masserdotti, F. Ortega, C. Heinrich, S. Gascon, M.A. Khan, D.C. Lie, A. Dellavalle, G. Cossu, R. Goldbrunner, M. Gotz, and B. Berninger, Reprogramming of pericyte-derived cells of the adult human brain into induced neuronal cells. *Cell Stem Cell* 11 (2012) 471-6.
17. M. Karow, J.G. Camp, S. Falk, T. Gerber, A. Pataskar, M. Gac-Santel, J. Kageyama, A. Brazovskaja, A. Garding, W. Fan, T. Riedemann, A. Casamassa, A. Smiyakin, C. Schichor, M. Gotz, V.K. Tiwari, B. Treutlein, and B. Berninger, Direct pericyte-to-neuron reprogramming via unfolding of a neural stem cell-like program. *Nat Neurosci* 21 (2018) 932-940.

[0326]

18. A. Raposo, F.F. Vasconcelos, D. Drechsel, C. Marie, C. Johnston, D. Dolle, A. Bithell, S. Gillotin, D.L.C. van den Berg, L. Ettwiller, P. Flicek, G.E. Crawford, C.M. Parras, B. Berninger, N.J. Buckley, F. Guillemot, and D.S. Castro, *Ascl1 Coordinately Regulates Gene Expression and the Chromatin Landscape during Neurogenesis. Cell Rep* 10 (2015) 1544-1556.
19. B. Aydin, A. Kakumanu, M. Rossillo, M. Moreno-Estelles, G. Garipler, N. Ringstad, N. Flames, S. Mahony, and E.O. Mazzoni, *Proneural factors Ascl1 and Neurog2 contribute to neuronal subtype identities by establishing distinct chromatin landscapes. Nat Neurosci* 22 (2019) 897-908.
20. N. Yang, S. Chanda, S. Marro, Y.H. Ng, J.A. Janas, D. Haag, C.E. Ang, Y. Tang, Q. Flores, M. Mall, O. Wapinski, M. Li, H. Ahlenius, J.L. Rubenstein, H.Y. Chang, A.A. Buylia, T.C. Sudhof, and M. Wernig, *Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. Nat Methods* 14 (2017) 621-628.
21. B. Berninger, F. Guillemot, and M. Gotz, *Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. Eur J Neurosci* 25 (2007) 2581-90.
22. C. Heinrich, R. Blum, S. Gascon, G. Masserdotti, P. Tripathi, R. Sanchez, S. Tiedt, T. Schroeder, M. Gotz, and B. Berninger, *Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. PLoS Biol* 8 (2010) e1000373.
23. C. Heinrich, M. Gotz, and B. Berninger, *Reprogramming of postnatal astroglia of the mouse neocortex into functional, synapse-forming neurons. Methods Mol Biol* 814 (2012) 485-98.
24. J. Kempf, K. Knelles, B.A. Hersbach, D. Petrik, T. Riedemann, V. Bednarova, A. Janjic, T. Simon-Ebert, W. Enard, P. Smialowski, M. Gotz, and G. Masserdotti, *Heterogeneity of neurons reprogrammed from spinal cord astrocytes by the proneural factors Ascl1 and Neurogenin2. Cell Rep* 36 (2021) 109409.
25. P. Rivetti di Val Cervo, R.A. Romanov, G. Spigolon, D. Masini, E. Martin-Montanez, E.M. Toledo, G. La Manno, M. Feyder, C. Pifl, Y.H. Ng, S.P. Sanchez, S. Linnarsson, M.

[0327]

- Wernig, T. Harkany, G. Fisone, and E. Arenas, Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol* 35 (2017) 444-452.
26. Y. Liu, Q. Miao, J. Yuan, S. Han, P. Zhang, S. Li, Z. Rao, W. Zhao, Q. Ye, J. Geng, X. Zhang, and L. Cheng, Ascl1 Converts Dorsal Midbrain Astrocytes into Functional Neurons In Vivo. *J Neurosci* 35 (2015) 9336-55.
27. S. Jessberger, N. Toni, G.D. Clemenson, Jr., J. Ray, and F.H. Gage, Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11 (2008) 888-93.
28. A. Grande, K. Sumiyoshi, A. Lopez-Juarez, J. Howard, B. Sakthivel, B. Aronow, K. Campbell, and M. Nakafuku, Environmental impact on direct neuronal reprogramming in vivo in the adult brain. *Nat Commun* 4 (2013) 2373.
29. J. Giehl-Schwab, F. Giesert, B. Rauser, C.L. Lao, S. Hembach, S. Lefort, I.L. Ibarra, C. Koupourtidou, M.D. Lueken, D.J. Truong, J. Fischer-Sternjak, G. Masserdotti, N. Prakash, J. Ninkovic, S.M. Holter, D.M. Vogt Weisenhorn, F.J. Theis, M. Gotz, and W. Wurst, Parkinson's disease motor symptoms rescue by CRISPRa-reprogramming astrocytes into GABAergic neurons. *EMBO Mol Med* (2022) e14797.
30. S. Gascon, E. Murenu, G. Masserdotti, F. Ortega, G.L. Russo, D. Petrik, A. Deshpande, C. Heinrich, M. Karow, S.P. Robertson, T. Schroeder, J. Beckers, M. Irmeler, C. Berndt, J.P. Angeli, M. Conrad, B. Berninger, and M. Gotz, Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell Stem Cell* 18 (2016) 396-409.
31. G. Masserdotti, S. Gillotin, B. Sutor, D. Drechsel, M. Irmeler, H.F. Jorgensen, S. Sass, F.J. Theis, J. Beckers, B. Berninger, F. Guillemot, and M. Gotz, Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell* 17 (2015) 74-88.
32. J. Drouin-Ouellet, S. Lau, P.L. Brattas, D. Rylander Ottosson, K. Piracs, D.A. Grassi, L.M. Collins, R. Vuono, A. Andersson Sjolund, G. Westergren-Thorsson, C. Graff, L.

[0328]

- Minthon, H. Toresson, R.A. Barker, J. Jakobsson, and M. Parmar, REST suppression mediates neural conversion of adult human fibroblasts via microRNA-dependent and -independent pathways. *EMBO Mol Med* 9 (2017) 1117-1131.
33. G.L. Russo, G. Sonsalla, P. Natarajan, C.T. Breunig, G. Bulli, J. Merl-Pham, S. Schmitt, J. Giehl-Schwab, F. Giesert, M. Jastroch, H. Zischka, W. Wurst, S.H. Stricker, S.M. Hauck, G. Masserdotti, and M. Gotz, CRISPR-Mediated Induction of Neuron-Enriched Mitochondrial Proteins Boosts Direct Glia-to-Neuron Conversion. *Cell Stem Cell* 28 (2021) 524-534 e7.
34. S. Li, P. Mattar, R. Dixit, S.O. Lawn, G. Wilkinson, C. Kinch, D. Eisenstat, D.M. Kurrasch, J.A. Chan, and C. Schuurmans, RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci* 34 (2014) 2169-90.
35. F. Ali, C. Hindley, G. McDowell, R. Deibler, A. Jones, M. Kirschner, F. Guillemot, and A. Philpott, Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* 138 (2011) 4267-77.
36. C. Hindley, F. Ali, G. McDowell, K. Cheng, A. Jones, F. Guillemot, and A. Philpott, Post-translational modification of Ngn2 differentially affects transcription of distinct targets to regulate the balance between progenitor maintenance and differentiation. *Development* 139 (2012) 1718-23.
37. F.R. Ali, D. Marcos, I. Chernukhin, L.M. Woods, L.M. Parkinson, L.A. Wylie, T.D. Papkovskaia, J.D. Davies, J.S. Carroll, and A. Philpott, Dephosphorylation of the Proneural Transcription Factor ASCL1 Re-Engages a Latent Post-Mitotic Differentiation Program in Neuroblastoma. *Mol Cancer Res* 18 (2020) 1759-1766.
38. R. Azzarelli, L.J. Hardwick, and A. Philpott, Emergence of neuronal diversity from patterning of telencephalic progenitors. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4 (2015) 197-214.

[0329]

39. R. Azzarelli, A. McNally, C. Dell'Amico, M. Onorati, B. Simons, and A. Philpott, ASCL1 phosphorylation and ID2 upregulation are roadblocks to glioblastoma stem cell differentiation. *Sci Rep* 12 (2022) 2341.
40. E.A. Marcus, C. Kintner, and W. Harris, The role of GSK3beta in regulating neuronal differentiation in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Neurosci* 12 (1998) 269-80.
41. Y. Lee, A. Messing, M. Su, and M. Brenner, GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56 (2008) 481-93.
42. L.L. Wang, C. Serrano, X. Zhong, S. Ma, Y. Zou, and C.L. Zhang, Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing in vivo. *Cell* 184 (2021) 5465-5481 e16.
43. L. Madisen, T.A. Zwingman, S.M. Sunkin, S.W. Oh, H.A. Zariwala, H. Gu, L.L. Ng, R.D. Palmiter, M.J. Hawrylycz, A.R. Jones, E.S. Lein, and H. Zeng, A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci* 13 (2010) 133-40.
44. J. Livingston, T. Lee, E. Daniele, C. Phillips, A. Krassikova, T. Enbar, I. Kortebi, K.W.A. Bang, B. Donville, O. Ibragimov, N. Sachewsky, C.M. Morshead, and M. Faiz, Direct reprogramming of astrocytes to neurons leads to functional recovery after stroke. *bioRxiv* (2020) 2020.02.02.929091.
45. Y. Touahri, L. Adnani, P. Mattar, K. Markham, N. Klenin, and C. Schuurmans, Non-isotopic RNA In Situ Hybridization on Embryonic Sections. *Curr Protoc Neurosci* 70 (2015) 1 22 1-1 22 25.
46. C.S. Khademullah, A.J. Aqrabawi, K.M. Place, Z. Dargaei, X. Liang, J.C. Pressey, S. Bedard, J.W. Yang, D. Garand, I. Keramidis, A. Gasecka, D. Cote, Y. De Koninck, J. Keith, L. Zinman, J. Robertson, J.C. Kim, and M.A. Woodin, Cortical interneuron-mediated inhibition delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 143 (2020) 800-810.

[0330]

47. D.F. Aschauer, S. Kreuz, and S. Rumpel, Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. *PLoS One* 8 (2013) e76310.
48. Y. Rao, S. Du, B. Yang, Y. Wang, Y. Li, R. Li, T. Zhou, X. Du, Y. He, Y. Wang, X. Zhou, T.F. Yuan, Y. Mao, and B. Peng, NeuroD1 induces microglial apoptosis and cannot induce microglia-to-neuron cross-lineage reprogramming. *Neuron* 109 (2021) 4094-4108.e5.
49. Y. Sun, M. Nadal-Vicens, S. Misono, M.Z. Lin, A. Zubiaga, X. Hua, G. Fan, and M.E. Greenberg, Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104 (2001) 365-76.
50. C. Kovach, R. Dixit, S. Li, P. Mattar, G. Wilkinson, G.E. Elsen, D.M. Kurrasch, R.F. Hevner, and C. Schuurmans, Neurog2 simultaneously activates and represses alternative gene expression programs in the developing neocortex. *Cereb Cortex* 23 (2013) 1884-900.
51. S. Han, S. Okawa, G.A. Wilkinson, H. Ghazale, L. Adnani, R. Dixit, L. Tavares, I. Faisal, M.J. Brooks, V. Cortay, D. Zinyk, A. Sivitilli, S. Li, F. Malik, Y. Ilnytsky, V.E. Angarica, J. Gao, V. Chinchalongporn, A.M. Oproescu, L. Vasan, Y. Touahri, L.A. David, E. Raharjo, J.W. Kim, W. Wu, W. Rahmani, J.A. Chan, I. Kovalchuk, L. Attisano, D. Kurrasch, C. Dehay, A. Swaroop, D.S. Castro, J. Biernaskie, A. Del Sol, and C. Schuurmans, Proneural genes define ground-state rules to regulate neurogenic patterning and cortical folding. *Neuron* 109 (2021) 2847-2863 e11.
52. T. Matsuda, T. Irie, S. Katsurabayashi, Y. Hayashi, T. Nagai, N. Hamazaki, A.M.D. Adefuin, F. Miura, T. Ito, H. Kimura, K. Shirahige, T. Takeda, K. Iwasaki, T. Imamura, and K. Nakashima, Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion. *Neuron* 101 (2019) 472-485 e7.
53. T. Matsuda, and K. Nakashima, Clarifying the ability of NeuroD1 to convert mouse microglia into neurons. *Neuron* 109 (2021) 3912-3913.

[0331]

54. D. Leib, Y.H. Chen, A.M. Monteys, and B.L. Davidson, Limited astrocyte-to-neuron conversion in the mouse brain using NeuroD1 overexpression. *Mol Ther* 30 (2022) 982-986.
55. C.M. Parras, C. Schuurmans, R. Scardigli, J. Kim, D.J. Anderson, and F. Guillemot, Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16 (2002) 324-38.
56. N. Sharif, F. Calzolari, and B. Berninger, Direct In Vitro Reprogramming of Astrocytes into Induced Neurons. *Methods Mol Biol* 2352 (2021) 13-29.
57. H. Qian, X. Kang, J. Hu, D. Zhang, Z. Liang, F. Meng, X. Zhang, Y. Xue, R. Maimon, S.F. Dowdy, N.K. Devaraj, Z. Zhou, W.C. Mobley, D.W. Cleveland, and X.D. Fu, Reversing a model of Parkinson's disease with in situ converted nigral neurons. *Nature* 582 (2020) 550-556.
58. T. Irie, T. Matsuda, Y. Hayashi, A. Kamiya, J.-i. Kira, and K. Nakashima, Direct neuronal conversion of microglia/macrophages reinstates neurological function after stroke. *bioRxiv* (2021) 2021.09.26.461831.

[0332]

[0333]

실시예 6: 근위축성 측색 경화증의 마우스 모델에서 생체내 성상세포에서 뉴런으로의 계통 전환에 대한 공간적 전사체 분석

[0334]

직접 신경 재프로그래밍은 다능성^{1,2}을 거치지 않고 성숙한 체세포를 유도된 (i) 뉴런으로 전환시키는 것을 의미하며, 이는 다능성 상태³로 재프로그래밍하는 초기 입증 이전에도 처음으로 문서화되었다. 이러한 최초의 발견 이후, 전신경 유전자 Neurog2 및 Ascl1과 신경 분화 유전자 Neurod1에 의해 암호화된 베이직-헬릭스-루프-헬릭스 (bHLH) 전사 인자(TF)가 뇌 교세포(예를 들어, 성상교세포, 미세아교세포)를 포함한 체세포를 iNeuron로 전환하는 데 선택되는 TF가 되었다². 이러한 bHLH TF는 배아 신경발생 및 뉴런 하위 유형 사양⁴을 유도하는 역할을 기반으로 선택되었다. 예를 들어, 배아 전뇌에서 Ascl1은 GABA성, 저해성 뉴런 아이덴티티를 지정하는 데 필요하고 충분하지만 Neurog2는 Neurod1를 포함하는 전사 캐스케이드에서 글루타메이트성 흥분성 뉴런 운명을 지정한다⁵⁻⁹. 몇몇 군이 시험관내에서 신경 재프로그래밍 연구에서 이러한 bHLH TF를 사용했지만¹⁰⁻¹⁷, 생체내에서 뇌의 내인성 세포에 적용될 때 iNeuron 전환 효율은 여전히 낮게 유지된다². 저해성 제어의 한 가지 모드는 Cdk5, Erk 및 Gsk3을 포함한 프롤린-지향 세린-트레오닌(S/T) 키나제에 의한 인산화이며, 이는 배아 마우스 뇌에서, 1차 Xenopus 신경발생 동안 그리고 암 세포주에서 bHLH TF를 인산화하고 저해한다¹⁸⁻²⁵.

[0335]

이러한 지식을 사용하여, 세린-대-알라닌(SA) 포스포부위 돌연변이가 Ascl1(Ascl1SA6)에서 사용되었으며, Ascl1SA6이 생체내에서 성인 뇌 성상교세포의 성상교세포에서 발현될 때 뉴런 마커 발현을 유도하는 데 Ascl1보다 더 효율적이라는 것을 나타내었는데(실시예 5), 이는 뉴런 계통 전환을 촉발하는 향상된 능력과 일치한다. 본 실시예에서, 공간 전사체학은 조직 전체 규모에서 유전자 발현에 대한 신경 재프로그래밍 TF의 영향을 포괄적으로 매핑하기 위한 리포터 불가지론적 방법으로 사용되었다.

[0336]

궁극적으로, 신경 재프로그래밍의 목표는 신경퇴행성 질환 모델에서 손실된 신경 세포를 종종 선택된 표적 세포인 성상교세포로 대체하는 것이다. 아직 완전히 특징규명되지는 않았지만, 신경 재프로그래밍 효율은 특히 해부학적 위치^{28,29} 및 질환 상태³⁰에 따라 성상교세포의 이질성이 높다는 점을 고려할 때 상이한 뇌 영역 및 건강한 환경과 신경퇴행성 환경에서 상이할 수 있다¹ 본 실시예에서, 재프로그래밍 TF를 근위축성 측색 경화증(ALS)의 마우스 모델에 도입하였다. ALS는 선조체(피질연골 경로) 및 척수(피질척수 경로)를 포함한 피질하 표적으로 투영되는 신피질의 깊은 층 V 및 VI에 있는 상부 운동 뉴런(MN)의 퇴화와 관련이 있다. 그 후, 골격근 및 다른 근육 유형(심장, 내장)에 신경을 분포시키는 뇌줄기 및 척수의 하부 MN도 퇴화된다^{31,32}. 궁극적으로 낮은 MN의 손

실은 근육 탈신경, 근육 위축을 유발하고 궁극적으로 진단 후 3 내지 5년 이내에 사망한다³². 대부분의 ALS 진단은 산발적이며, 유전되는 경우는 단지 5 내지 10%이다³³. 가족 사례 중에서, Cu-Zn 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 1를 암호화하는 SOD1에서 여러 돌연변이가 확인되었다³⁴. SOD1의 G93A 미스센스 돌연변이는 글리신 대 알라닌 치환을 초래하고; 이러한 돌연변이는 질환 모델링에 사용되는 hSOD1^{G93A} 트랜스제닉 마우스를 생성하기 위해 마우스에 도입되었다³⁵. 인간 (h) SOD1^{G93A} 돌연변이체 트랜스젠을 보유하는 트랜스제닉 마우스 계열은 ALS 운동 결손을 재현하며³⁶, 피질의 상부 운동 뉴런은 척수의 하위 운동 뉴런보다 먼저 퇴행한다³⁷.

[0337]

성상교세포는 건강한 숙주 뇌에 이식되는 경우 병리학을 유발할 수 있기 때문에 ALS 동물 모델에서 뉴런 세포 사멸의 주요 원인이다³⁸. ALS 성상교세포와 연관된 독성을 예방하고 손실된 상부 운동 뉴런을 잠재적으로 대체하기 위해서, 본 실시예는 신경원성 TF(Ascl1, Ascl1^{SA6})의 발현을 유도하기 위해서 신경아교 섬유 산성 단백질 (GFAP) 프로모터를 함유하는 아데노-연관 바이러스(AAV)가 SOD1^{G93A} 운동 피질에서 성상교세포에서 iNeuron으로의 전환을 유도하는 데 사용될 수 있는지를 조사하였다. 상기 실시예 5에서, Ascl1^{SA6}은 생체내에서 야생형 마우스의 운동 피질에서 뉴런 마커 발현을 유도하는 데 Ascl1보다 더 효율적이라는 것이 나타났다²⁶. 여기서 Ascl1 및 Ascl1^{SA6}이 생체내에서 뉴런 계통 전환을 유도하는지 여부를 결정하기 위해서, 10X Genomics Visium 공간 전사체학(ST) 플랫폼을 사용하여 공간적으로 정의된 방식으로 유전자 발현 변화를 조사하였다. 뇌 영역을 조직학적으로 도시하고 전사적으로 클러스터링하고 Molecular Brain Atlas를 사용하여 주석을 달았다³⁹. 예상치 못하게, 대조군 iCre 백터는 동일한 AAV를 사용하여 Ascl1 또는 Ascl1^{SA6}을 발현하는 경우 약화되는 표현형인 염증성 유전자 시그니처를 유도하였다. 대신, Ascl1 및 Ascl1^{SA6}은 성상교세포 유전자의 하위세트(Nr4a1, Thra, Npas4, Clu)를 하향조절하고 시험관내 뉴런 전환 동안 상향조절되는 유전자(예를 들어, Zbtb18, Id2, Id3)를 포함하여 일련의 신경성 유전자를 활성화하였다^{10,23}. 인간 ASCL1 또는 ASCL1^{SA5}가 교모세포종 세포주에서 발현되는 이전의 시험관내 뉴런 전환 데이터 세트를 기반으로 유전자 조절 네트워크(GRN)를 구축함으로써²³, ZBTB18은 GRN을 방해한 인 실리코 녀아웃(KO)인 중요한 허브 TF로 확인되었다. 종합하면, 이러한 데이터는 bHLH TF가 생체내에서 운동 피질 성상교세포의 신경원성 GRN을 적어도 부분적으로 활성화한다는 아이디어를 뒷받침하는데, 이 접근법이 신경퇴행성 질환, 예컨대 비제한적으로 ALS에 대한 치료법으로 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0338]

물질 및 방법

[0339]

동물. 모든 동물 절차는 캐나다 동물 관리 협의회(CCAC)의 지침에 따라 Sunnybrook 연구소 동물 관리 위원회(ACC 프로토콜 #22-757)의 승인을 받았다. 동물은 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있는 12시간 명암 주기 하에 사육되었다. Rosa-zsGreen;hSOD1^{G93A} 이중 이형접합성 마우스는 Rosa-zsGreen 암컷(B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor^{tm6(CAG-ZsGreen1)Hze}/J; JAX® stock #: 007906)과 hSOD1^{G93A} 수컷(B6;Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J; JAX® stock #: 004435)를 교배시켜 생성시켰는데, 이들은 C57B6/J 유전자 배경에서 유지되었다. 이중 트랜스제닉 동물을 Jackson Laboratory 프로토콜을 사용하여 PCR-유전자형분석에 의해서 식별하였다. hSOD1^{G93A} 트랜스젠 및 내부 양성 대조군 프라이머(트랜스젠 정방향, 5'-CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA - 3' (서열번호 26); 역방향, 5' - 5'-CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA - 3' (서열번호 27); 내부 양성 대조군 정방향, 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT - 3' (서열번호 34); 내부 양성 대조군 역방향, 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC C - 3' (서열번호 35)). hSOD1^{G93A} 트랜스젠 밴드는 236bp이고 삽입 야생형 밴드의 유전자좌는 324bp이다. Rosa-ZsGreen: 야생형 정방향: 5'-CTG GCT TCT GAG GAC CG-3' (서열번호 28); 야생형 역방향: 5'-AAT CTG TGG GAA GTC TTG TCC-3' (서열번호 29); 돌연변이체 정방향: 5'-ACC AGA AGT GGC ACC TGA C-3' (서열번호 30); 돌연변이체 역방향: 5'-CAA ATT TTG TAA TCC AGA GGT TGA-3' (서열번호 31).

[0340]

AAV 전달. AAV5-GFAP-iCre 플라스미드는 Dr. Maryam Faiz 박사의 선물이었다¹⁰⁸. AAV5-GFAP-iCre(2.31×10^{13} GC/ml), AAV5-GFAP-Ascl1-t2a-iCre(5.35×10^{13} GC/ml) 및 AAV5-GFAP - Ascl1^{SA6}-t2a-iCre(12.30×10^{13} GC/ml)는

VectorBuilder Inc.(미국 일리노이주 시카고 소재)에서 패키징되었다. 각각의 바이러스를 희석시켜 $1\mu\text{l}$ 용량으로 총 4.8×10^9 GC를 전달하고, $5\mu\text{l}$ 해밀턴 주사기와 30페이지 바늘(Hamilton, 7803-07)을 사용하여 10분에 걸쳐 $0.1\mu\text{l}$ /분의 속도로 전달하였다. 16주령 hSOD1^{G93A}의 1차 운동 피질; Rosa-zsGreen 마우스를 정위 장비(AP: +2.15, L/M: ± 1.7 , DV: -1.7)를 사용하여 표적화하였다. 동물을 아이소플루오란(2%, 1L/분; Fresenius Kabi, CP0406V2)으로 마취시키고, 부프레노르핀(0.1mg/kg; Vetergesic, 02342510), 베이트릴(2.5mg/kg; Bayer, 02249243) 및 식염수(0.5ml, Braun, L8001)를 피하로 투여하였다. 28 dpi 후에 마우스를 희생시켰다.

[0341] 10X Visium 공간 전사체 섹션 및 라이브러리 준비. 해부 전에 마우스를 케타민(75mg/kg)과 자일라진(10mg/kg)으로 마취시켰다. 신선한 뇌를 수집하고, 벤치탑 액체 질소 용기에 있는 이소펜탄(2-메틸부탄, Sigma) 욕조에 5분간 두었다. 냉동된 뇌를 미리 냉각된 50ml 팔콘 튜브에 옮기고 -80°C 에 보관하였다. 신선한 냉동 조직을 Leica CM3050 크라이오스태트(cryostat)(Leica Microsystems Canada Inc., 미국 캐나다 온타리오주 리치몬드 힐 소재)를 사용하여 -20°C 에서 냉동절편화하고, $10\mu\text{m}$ 관상 절편을 10X Visium 공간 슬라이드의 프레임 캡처 영역 내에 즉시 배치하였다. Visium Spatial Tissue Optimization Reagents Kit(10X Genomics)를 사용하여 추가 처리 및 공간 전사체(ST) 라이브러리 생산을 위해 슬라이드를 드라이아이스 위에서 Princess Margaret Genomics Center로 옮겼다. 간략하면, 슬라이드를 -20°C 의 미리 냉각된 MeOH에서 30분 동안 탈수하고, 뚜껑을 열고 37°C 에서 1분 동안 Thermocycler에서 건조시킨 후 헤마톡실린과 에오신으로 염색하였다. 조직 절편을 18분 동안 $70\mu\text{l}$ 의 투과화 효소에 노출시켰는데, 이는 조직 최적화 슬라이드(10X Genomics)를 사용하여 최적의 시간으로 선택되었으며, Visium 슬라이드의 Illumina TruSeq Read™, 공간 바코드 및 UMI를 함유하는 폴리-dT 프라이머로 캡처할 수 있는 폴리아데닐화된 mRNA를 방출한다. 제조사의 프로토콜에 따라 Visium Spatial Gene Expression Reagent Kit(10X Genomics)를 사용하여 Thermal Cycler의 Visium 슬라이드 카세트에서 제1 및 제2 가닥 cDNA 합성 및 증폭을 수행하였다. Dual Index Kit TT Set A(10X Genomics) 및 E3, E4, E5 및 E6 인덱싱 프라이머를 사용하여 제조사의 지침에 따라 샘플 인덱스 PCR에 의해서 듀얼 인덱스 Illumina 호환 라이브러리를 생성하였다. 3' 단부 서열결정은 Illumina NovaSeq 6000™ 시스템을 사용하여 Princess Margaret Genomics Facility에서 수행하였다.

[0342] ST 데이터의 처리. 초기 데이터 분석은 Space Ranger™(버전 1.3.1)을 포함하는 10X Genomics 개방형 소프트웨어를 사용하여 수행하였고, zsGreen 및 iCre 서열이 추가된 Loupe Browser 4.0.™ bcl2fastq 버전 2.20을 사용하여 FASTQ 파일 및 Space Ranger 버전 1.3.1을 생성하여 시열결정 관독치를 맞춤형 마우스 게놈(refdata-gex-mm10-2020-A_zsGreen_iCre)에 정렬하였다. 이 파이프라인은 각각의 특징점에 대한 고유 분자 식별자(UMI) 계수치의 매트릭스를 생성하고 필터링을 수행하여 10개 이상의 UMI를 갖는 유전자만 고려된다. Space Ranger는 Gaussian Mixture Model을 사용하여 UMI당 더 높은 평균 관독치를 갖는 풍부해진 유전자를 식별한다. Loupe Browser를 또한 사용하여 고유한 세포 클러스터에 상응하는 색상-암호화된 서열결정 스왑이 있는 조직 영상을 나타내는 Spatial Map을 생성한다. 또한 이것을 사용하여 2D T-distributed Stochastic Neighbor Embedding(tSNE) 플롯을 생성하였다. tSNE 투영은 조직 절편의 상응하는 색상-암호화된 영역 내에서 고유한 세포 클러스터를 식별한다. 마지막으로, 선택된 개별 관심 유전자의 발현 패턴을 Loupe Browser를 사용하여 시각화하였다.

[0343] 차등적으로 발현되는 유전자(DEG). 추가 특징부 선택 및 클러스터링 분석을 수행하기 위해 단일 세포 유전체학¹⁰⁹을 위한 Seurat v.3.2.3 R 패키지 도구를 사용하였다. Seurat를 사용하여 데이터 세트에서 매우 가변적인 유전자를 선택하였다(기본적으로 2000개의 유전자). 그 다음 이러한 가변성이 높은 유전자를 하류 클러스터링 분석에 사용하여 각각의 뇌 샘플의 모든 클러스터 사이에 상위 2000개의 가변 유전자 목록을 작성하였다. RunUMAP 기능을 사용하여 공간 맵의 위치와 연관되는 클러스터가 매핑된 UMAP 플롯을 생성하였다. 2가지 유형의 차등 유전자 발현을 수행하였다: 첫째, 쌍별 비교를 수행하여 각각의 뇌에서 iCre 양성 세포와 iCre 음성 세포 사이에서 차등적으로 발현된 유전자(DEG)를 조사하여 iCre 클러스터에서 높게 발현되지만 나머지는 그렇지 않은 유전자 목록을 식별할 수 있었다. 각각의 뇌에서 상위 50개 가변 유전자는 도 43D, 도 43F, 도 43H, 도 43J에 제시되어 있다. 이 표는 통합 데이터 세트에 포함된 3000개 유전자 모두로 구성된다. 통합 데이터 세트는 Seurat로부터의 SelectIntegrationFeatures를 사용하여 생성하였다. 이 함수는 N개의 가장 가변적인 특징부, 현재 경우에는 3000개를 기반으로 데이터 세트를 통합한다. 따라서 이러한 데이터 세트는 p-값 컷오프가 없다. 둘째, iCre 양성으로 제한된 DEG를 또한 샘플(Ascl1 대 대조군, Ascl1^{SA6} 대 대조군, Ascl1 대 Ascl1^{SA6}) 사이에서 조사하였다. p-값을 iCre 양성 세포 풀 간의 개별 쌍별 비교를 통해 계산하였다.

- [0344] 차등적인 유전자 발현을 위해서, pathfindR Bioconductor package을 사용하여 경로 클러스터링을 얻었다¹¹⁰. GO 카테고리를 의미론적 유사성을 반영하는 트리맵으로 플로팅하였다. 트리맵은 rrvgo Bioconductor 패키지를 사용하여 준비되었다.
- [0345] *클러스터 주석*. 개별 클러스터에 표시된 조직의 분자 주석은 다양한 뇌 영역에서 발현되는 266개의 고유 유전자로 구성된 Brain Palette™를 사용하여 추론되었다³⁹. 배정된 각각의 클러스터의 모든 지점의 평균 유전자 발현은 github에서 3D ST 뷰어 및 Brain Palette 연구의 아틀라스 시각화를 사용하여 국지적 아이덴티티와 비교하는데 사용되었다³⁹. 각각의 클러스터에서 GO 용어의 강화는 richR R 패키지를 사용하여 GO.BP 및 GO.CC(2021 버전)를 쿼리하여 수행되었으며 조정된 p-값 컷오프가 0.05인 차등적으로 상향조절된 유전자만 조사하였다¹¹¹.
- [0346] *유전자 조절 네트워크(GRN) 추론*. iCRE-CT, Ascl1 및 Ascl1^{SA6}에 대해(Okawa et al., 2015)¹¹²에 기재된 바와 같이 GRN 추론을 수행하였다. PKN을 MetaCore(GeneGo Inc.(15871913)), TRRUST(29087512) 및 RegNetwork(26424082)로부터 조립하였다. TF와 유전자의 각각의 쌍에 대한 피어슨 상관 계수를 각각의 공간 전사체학 샘플에 대해 계산하였다. PKN과 Pearson 상관 계수 사이의 교차점은 90 백분위수 초과로 유지되었다. Cytoscape v.3을 GRN(14597658)의 시각화에 사용하였고, 여기서 차등적으로 상향조절된 유전자 및 하향조절된 유전자는 각각 적색 또는 주황색, 청색 또는 보라색 노드로 표시되는 반면, 비차등적으로 발현된 유전자는 흰색 노드로 표시되었다.
- [0347] *인 실리코 ZBTB18 Nickdown 시뮬레이션*. 신경모세포종 세포주 SH-SY5Y에서 0시간 대조군과 비교하여 ASCL1 과발현 24시간 후 차등적으로 발현된 TF를 (35366798)의 데이터 세트를 사용하여 얻었다. 유전자를 강도별로 두 개의 빈으로 분류하고 limma R 패키지(16646809)를 사용하여 각 빈에 t-검정을 적용하였다. p-값을 조정된 p-값 컷오프가 0.05인 Benjamini-Hochberg 방법을 사용하여 다중 시험에 대해 수정하였다. 평균 절대 배수 변화가 2 미만인 유전자를 또한 폐기하였다. 차등적으로 발현된 TF 중 GRN은 상기에 기재된 바와 같이 재구성되었지만 각각의 TF와 유전자 쌍에 대한 Pearson 상관 계수를 계산하기 위해 인간 피질 발달의 scRNA-seq 데이터(26406371)를 사용하였다. 또한, ZBTB18 결합 표적 유전자를 (30392794)로부터 획득하여 GRN에 추가하였다. ZBTB18의 발현을 지속적으로 억제함으로써 인 실리코 섭동을 수행하였다. GRN 시뮬레이션은 다수결 논리 규칙을 사용하여 Boolean 네트워크 형식으로 수행하였다. Boolean 초기 표현 상태 1과 0을 각각 차등적으로 상향 조절된 TF 및 하향 조절된 TF에 할당하였다. 동기 업데이트를 1000회 반복하였고 최종 GRN 상태를 기록하였다. Cytoscape v.3을 GRN의 시각화에 사용하였다.
- [0348] *면역염색을 위한 조직 처리*. 면역염색을 위해서, 관류 전에 마우스를 케타민(75mg/kg)과 자일라진(10mg/kg)으로 마취시켰다. 얼음 냉각된 식염수(0.9% NaCl), 그 다음 인산염 완충 식염수(PBS) 중의 4% 파라폼알데하이드(PFA)를 10ml/분의 유량으로 연동 펌프를 대략 5분 동안 사용하여 대략 20배의 혈액 부피로 심장내 관류를 수행하였다. 뇌를 수집하고, PBS 중의 4% PFA에 밤새 후-고정시킨 후 동결 보호를 위해 4℃에서 20% 수크로스/1X PBS로 밤새 전달하고, O.C.T. 화합물(Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura® Finetek, 미국 펜실베이니아주)에 포매시키고, -80℃에 저장하였다. 뇌를 Leica CM3050 크리오스타트(Leica Microsystems Canada Inc., 캐나다 온타리오주 리치몬드 힐 소재)의 내부에서 -26℃에서 동결시키고 30μm에서 관상 방향으로 절단하였다. 절편을 Fisherbrand™ Superfrost™ Plus Microscope Slides(Thermo Fisher Scientific, 캐나다 온타리오주 오타와 소재)에서 수집하였다.
- [0349] *면역염색*. 슬라이드를 PBS로 세척한 다음 실온에서 10% 말 혈청(HS), 0.075% 소 혈청 알부민(BSA) 및 PBS 중의 0.3% Triton-X-100에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 차단 후 다음 1차 항체를 사용하여 항체 용액(PBS 중 10% HS, 0.75% BSA 및 0.1% Triton-X-100)에서 4℃에서 72시간 동안 인큐베이션시켰다: 염소 항-GFAP(1:500, #NB100-53809, Novus), 래트 항-Ctip2(1:300, #AB18465, Abcam), 래트 항-Iba1(1:500, #019-19741, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation). 슬라이드를 PBS 중의 0.1% Triton-X-100에서 각각 10분 동안 3회 세척하고, Alexa568™(1:500; Invitrogen Molecular Probes™, ThermoFisher Scientific), Alexa488™(1:500; Molecular Probes) 또는 Alexa647™(1:500; Molecular Probes)에 접합된 종-특이적 2차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션시켰다. 슬라이드를 PBS에서 3회 세척하고, 4,6-다이아미딘오-2-페닐인돌(DAPI)(Sigma Aldrich Canada, 캐나다 온타리오주 미시소가 소재)로 대비염색하였다. 마지막으로, 슬라이드를 3회 세척한 후 Aqua-polymount(Polysciences Inc., 미국 펜실베이니아주 소재)에 장착하였다.
- [0350] *면역양성 세포의 정량화*. GFAP, Ctip2 및 Iba1 발현 세포를 FIJI/ImageJ를 사용하여 정량화되었다⁹³. 간략하

면, 관심 피질 영역을 다각형 도구를 사용하여 도시하였다. Ctip2의 경우, 면역형광 신호를 사용하여 임계값을 설정하고 "입자 분석" 명령을 사용하여 양성 세포를 정량화하였다. GFAP의 경우, 면역형광 신호는 임계값 조정 "삼각형" 알고리즘을 사용하여 임계값을 설정하고 "측정" 명령을 사용하여 측정하였다. 각각의 마우스에 대해 평균 강도 및 면적 백분율을 여러 절편에 걸쳐 수집된 가중 평균으로 평가하였다. 미세아교세포를 MORPHIOUS 분석 도구와 함께 제공되는 매크로를 사용하여 FIJI/ImageJ에서 분석하였다⁴¹. 이 매크로를 사용하여 Iba1 평균 강도 및 백분율 영역을 Autolocal 임계값(방법: Phansalkar, 매개변수 1: 0, 매개변수 2: 0)을 사용하여 평가하였다. MORPHIOUS는 골격 매트릭스(예를 들어, 가지 수, 가지 길이) 및 세포체 매트릭스(예를 들어, 세포체 크기)를 정량화하는 기능을 제공한다. 골격 매트릭스를 미세아교세포 세포체의 수로 정규화하였다. 미세아교세포 세포체에서 가장 가까운 이웃하는 미세아교세포 세포체까지의 유클리드 거리를 나타내는 가장 가까운 이웃하는 거리(NND)를 또한 평가하였다. 각각의 마우스에 대해 매트릭스를 여러 절편에 걸쳐 수집된 가중 평균으로 평가하였다.

[0351] **영상화 및 통계.** 브레그마 1.34, 1.85, 2.15에서 일치하는 관상 운동 피질 절편에 대해 정량 분석을 수행하였는데 이는 마우스 뇌를 사용하여 확인하였다. 다른 모든 영상은 Zeiss Z1 Observer/Yokogawa 회전 디스크(Carl Zeiss) 현미경을 사용하여 획득하였다. 전체 운동 피질을 포괄하는 타일 이미지는 20× 대물렌즈에서 1μm 스텝 크기의 30μm z-스택을 사용하여 획득하였다. 모든 분석은 20× 배율의 영상을 사용하여 수행하였다. 도면을 만드는 데에는 Adobe Photoshop을 사용하였고, 개략도를 준비하는 데에는 BioRender.com에 대한 라이선스를 사용하였다. GraphPad Prism 9.2.0 소프트웨어를 사용하여 그래프를 준비하고 통계 시험을 수행하였다. 평균의 표준 오차(s.e.m.)를 나타내는 평균값 및 오차 막대를 플로팅한다. 면역염색된 세포의 정량화를 조건당 3개의 뇌 및 뇌당 최소 3개의 절편에서 수행하였다. 비교는 일원 분산분석 및 Tukey 다중 비교를 사용하여 이루어졌다. 유의성은 0.05 미만의 p-값으로 정의되었으며 다음과 같이 표시되었다: ns - 유의하지 않음, <0.05 *, <0.01 **, <0.001 ***.

[0352] **결과**

[0353] *hSOD1^{G93A} 운동 피질의 신경 변성 및 신경아교 활성화 평가*

[0354] 뇌 교세포(성상교세포, 미세아교세포)가 생체내에서 뉴런으로 전환될 수 있는지 여부에 대해 의문을 제기한 두 개의 주목받는 2021년 간행물에 의해 생성된 최근 논쟁에 대한 응답으로^{16,27}, 본 실시예는 생체내에서 성인 뇌 성상교세포에 대한 신경 재프로그래밍 TF의 전사 영향을 공간적으로 매핑하기 위해서 설정되었다. 신경 재프로그래밍은 손실된 뉴런을 교체해야 하는 경우 신경퇴행 상태에서 가장 효율적일 수 있다고 추론되었다. 따라서 신경 재프로그래밍 백터를 운동 피질의 심층 피라미드 뉴런이 생후 1개월까지 퇴화되는 것으로 보고된 ALS 모델인 hSOD1^{G93A} 마우스의 운동 피질에 전달하였다³⁷. 신경 손실을 확인하기 위해서, Ctip2를 사용하여 피질 층 V 및 VI⁴⁰의 투영 뉴런을 면역 표지하였다⁴⁰. C57 대조 뇌와 비교하여, 3개월령 및 5개월령 둘 다에서 3개의 전후 위치(Bregma 1.34, 1.85, 2.15)에서 hSOD1^{G93A} 운동 피질에서 더 적은 Ctip2⁺ 뉴런이 검출되었다(도 41A 내지 도 41I).

[0355] 뉴런 변성은 종종 신경아교 활성화와 연관되어 있으므로 맞춤형 기계 학습 소프트웨어 패키지인 MORPHIOUS를 사용하여 활성화된 미세아교세포 및 성상교세포를 식별하고 정량화하였다⁴¹. 이 방법을 사용하여, Iba1⁺ 미세아교세포의 수, 이의 밀도, 세포체 크기 및 가지 수는 3개월 및 5개월령의 C57 및 hSOD1^{G93A} 마우스 사이에서 유사하였다(도 41J). 실제로, 활성화된 세포를 최적으로 식별하기 위해 MORPHIOUS-기반 조정을 사용함으로써 hSOD1^{G93A} 마우스와 비교하여 기준선 대조군 데이터 세트(C57B1/6)에서 더 많은 "활성화"가 나타났는데, 이는 hSOD1^{G93A} 피질에서 활성화된 미세아교세포 클러스터가 증가하지 않았음을 나타낸다(도 41N, 도 41O). 이전 보고서에서도 마찬가지로 hSOD1^{G93A} 마우스에서 미세아교세포 수가 증가하는 것을 발견하지 못했지만⁴², 그들은 MORPHIOUS를 사용하여 검출되지 않은 형태학적 변화를 발견하였다⁴¹. 반응성 신경아교증을 또한 평가하였지만, 유사한 수의 Sox9⁺ 성상교세포가 3개월 및 5개월령 둘 다에서 C57 대조군과 hSOD1^{G93A} 운동 피질에서 검출되었기 때문에 증식 반응의 징후는 분명하지 않았다(도 42A 내지 도 42H). 더욱이, 활성화된 세포를 최적으로 식별하기 위해 MORPHIOUS-기반 조정을 사용한 GFAP 염색의 조사는 hSOD1^{G93A} 마우스에 비해 기준선 대조군 마우스(C57B1/6)에서 유사하게

더 많은 "활성화"가 나타났는데, 이는 $hSOD1^{G93A}$ 피질에서 활성화된 정상교세포의 클러스터링에 실질적인 증가가 없음을 시사한다(도 42I-K). 따라서, 3개월 및 5개월령의 $hSOD1^{G93A}$ 운동 피질의 $Ctip2^+$ 피라미드 뉴런의 퇴화에 도 불구하고 기준선 수준을 초과하는 신경아교 반응성은 검출되지 않았다.

[0356] 신경 재프로그래밍 벡터를 사용한 $hSOD1^{G93A}$ 운동 피질 표적화

[0357] 생체내에서 정상교세포에서 재프로그래밍 TF 발현의 전사 영향을 평가하기 위해서, 짧은 인간 GFAP 프로모터를 운반하는 아데노-연관 바이러스(AAV)를 사용하여 천연 $Ascl1$ 또는 돌연변이된 $Ascl1^{SA6}$ 의 발현을 유도하였는데, 이들 둘 다는 대조군 벡터에도 존재하는 $t2a-iCre$ 에 테더링되어 있다. 특히, 실시예 5에서, 이러한 작제물을 사용하여, $Ascl1^{SA6}$ 및 더 적은 정도의 $Ascl1$ 이 뉴런 변성을 겪지 않은 Rosa-zsGreen 리포터 마우스의 운동 피질 정상교세포에서 발현될 때 뉴런 마커 발현을 증가시킬 수 있음이 입증되었다. 본 실시예에서, 신경변성이 이미 발생하고 행동 증상이 막 시작된 단계의 4개월령 $hSOD1^{G93A}$;Rosa-zsGreen 마우스에게 대신 AAV를 주입하였다⁴²(도 43A). $Ascl1^{SA6}$ 은 배아 피질 신경 신구 세포를 뉴런으로 전환하고¹⁹ 생체내에서 성인 뇌 정상교세포²⁶, 시험관내에서 교모세포종²³ 및 신경모세포종²⁵에서 뉴런 마커 발현을 유도하고 신경아교 마커 발현을 감소시키는 이러한 bHLH TF의 능력을 향상시키는 6개의 세린-대-알라닌 돌연변이를 보유한다. $Ascl1$ 및 $Ascl1^{SA6}$ 은 $t2a-iCre$ 서열에 연결되어 형질도입된 세포가 Rosa-zsGreen 리포터 마우스에서 검출될 수 있었다. 서열을 AAV5에 클로닝하고 패키징하여 다음 세 가지 유전자 전달 벡터를 생성하였다: AAV5 GFAP-iCre(이하, iCre 대조군), AAV5-GFAP- $Ascl1-t2a-iCre$ (이하, $Ascl1$) 및 AAV5-GFAP- $Ascl1^{SA6}-t2a-iCre$ (이하, $Ascl1^{SA6}$).

[0358] 3개의 AAV 각각을 정위 좌표를 사용하여 4주령의 $hSOD1^{G93A}$;Rosa-zsGreen 마우스의 운동 피질(AP: +2.15, L/M: ± 1.7 , DV: -1.7)에 전달하였다. 28일 후인 5개월령에 뇌를 수거하고 새로 냉동된 뇌를 절개하여 zsGreen 발현에 대해 조사하였다(도 43A). 운동 피질에서 최대 zsGreen 발현이 검출되었을 때, 각각의 뇌(주사되지 않음, iCre, $Ascl1$, $Ascl1^{SA6}$)의 단일 절편을 Visium 공간 전사체(ST) 슬라이드의 4개 캡처 창 중 하나에서 수집하였다(도 43A). 슬라이드를 투과화하여 폴리-아데닐화된 mRNA를 방출시켰고, 이를 캡처 창에서 바코드화된 올리고-dT 프라이머에 의해 캡처하였다(도 43B). 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색은 4개의 뇌 각각에서 수집된 절편이 비록 약간 다른 앞뒤 위치에 있지만 운동 피질 내에 있음을 확인해 주었다(도 43C, 도 43E, 도 43G, 도 43I). 이러한 분해능 수준에서, AAV 주입 부위는 H&E-염색 조직에서 쉽게 볼 수 없었지만 zsGreen 발현이 분명했기 때문에(도 44C 참조) 바이러스 형질도입은 성공적이었다.

[0359] 공간 전사체 데이터의 컴퓨터 분석 및 품질 확인

[0360] ST 라이브러리를 생성시켰고, 시퀀싱하였는데, 이는 주입되지 않은 뇌(0.508), 대조군 iCre(0.523), $Ascl1$ (0.606) 및 $Ascl1^{SA6}$ (0.703) 주입된 뇌로부터 유사한 수준의 원시 서열 판독 포화도를 나타내었다(도 45A" 내지 도 45D"). 순차적인 판독치를 필터링하고, 주석을 달고, 표준화하여, 주입되지 않은 뇌, iCre, $Ascl1$ 및 $Ascl1^{SA6}$ 주입된 뇌에서 각각 2,079, 2,348, 2,334 및 2,285개의 개별 캡처 위치(스팟)에 걸쳐 19,925, 20,200, 20,485 및 20,241개의 발현 유전자를 식별하였다(도 45). 조직으로 덮이지 않은 빈 스팟을 분석에서 제외시켰다. 자동화 10X Visium 클러스터링 알고리즘을 사용하여 데이터 품질에 대한 예비 분석을 수행하여, 공간 그래프-기반 맵 및 2D T-distributed Stochastic Neighbor Embedding(tSNE) 투영을 생성시켰다(도 45A 내지 도 45D, 도 45A' 내지 도 45D'). 고유한 분자 식별자(UMI) 개수치는 모든 세포 클러스터에서 높았는데(10,000 내지 30,000 범위/스팟), 이는 높은 서열 분석 깊이를 확인시켜 준다(도 45A 내지 도 45D). 이러한 분해능 수준에서, 7 내지 8개의 전사적으로 고유한 세포 클러스터가 식별되었으며 색상 코드를 사용하여 시퀀싱된 뇌 각각의 해당 공간 위치에 매핑하였다. 주입되지 않은 뇌에서, 전사체의 유사성에 기초하여 7개의 별개의 세포 클러스터를 검출하였다(도 45A'). 대조적으로, iCre가 주입된 뇌에서는 전사적으로 구별되는 8개의 세포 클러스터가 검출되었으며, 추가적인 "새로운" 클러스터는 운동 피질의 AAV 주입 부위와 일치하는 공간 위치를 가졌다(클러스터 7로 주석 표시됨, 도 45B'). 놀랍게도, 주입 부위와 일치하는 추가 클러스터는 $Ascl1$ (6개 클러스터; 도 45C') 및 $Ascl1^{SA6}$ (7개 클러스터; 도 45D') 주입된 뇌에서 유사하게 관찰되지 않았는데, 이는 이러한 시퀀싱된 '스팟'에 있는 세포의 전사체가 iCre 형질도입된 세포보다 내인성 뇌 조직과 더 유사했다는 것을 시사한다.

[0361] 클러스터 아이덴티티 배정 및 AAV 형질도입의 공간 분포 정의

- [0362] ST 데이터에서 세포 클러스터를 더 잘 구별하기 위해서, Seurat를 사용하여 하류 클러스터링 분석을 위한 고도로 가변적인 유전자를 선택하였다. 이를 위해서, iCre 및 zsGreen을 참조 마우스 게놈(refdata-gex-mm10-2020-A_zsGreen_iCre)에 추가하여 AAV 형질도입과 연관된 세포 클러스터를 지정할 수 있었다. 모든 클러스터 사이에 2000개의 상위 가변 유전자를 사용하여 고차원 균일 다양체 근사 및 투영(UMAP) 플롯을 생성시켰고 각각의 뇌에 대해 10 내지 11개의 고유한 세포 클러스터를 식별하였다(도 43C, 도 43E, 도 43G, 도 43I). UMAP 투영에서 세포 집단의 분해능 및 계층화가 증가함에 따라 iCre-형질도입 영역에 상응하는 세포 클러스터가 이제 3개의 형질도입된 뇌에서 분명해졌다(도 43F, 도 43H, 도 43J). 해부학적 위치를 식별하기 위해 Allen 마우스 뇌지도를 사용하여 각각의 클러스터에 국제적 ID를 지정하였다(www.brain-map.org).
- [0363] 예상된 바와 같이, 높은 iCre 발현 클러스터는 iCre(클러스터 3, 도 43F), Ascl1(클러스터 3 및 부분적으로 클러스터 5; 도 43H) 및 Ascl1^{SA6}(클러스터 4; 도 43J) 형질도입된 뇌의 운동 피질 내에 위치하였다. 실제로, iCre는 각각의 형질도입된 뇌에 대한 히트맵에 표시된 바와 같이 조직 전반에 걸쳐 가장 가변적인 유전자 50개 중 최상위에 있었다(도 43F, 도 43H, 도 43J). 놀랍게도, mRNA 서열이 참조 게놈에 추가되었음에도 불구하고 zsGreen 전사체는 검출되지 않았고 zsGreen 표면형광은 3개의 AAV 주입 뇌 각각에서 나타났다(도 44C 참조). 따라서, iCre 발현은 AAV 벡터가 형질도입된 세포 클러스터를 식별하는 데에만 의존하였다.
- [0364] 분자 데이터의 진실성에 대한 독립적인 척도로서, 차등적으로 발현된 유전자(DEG)를 각각의 주어진 클러스터 내에서(다른 모든 클러스터와 비교하여) 분자 뇌 지도에 정의된 266개 유전자의 뇌 팔레트와 비교하였다³⁹. 해부학적 배정으로부터 예상된 바와 같이, 뇌의 4개 절편 모두에서 대부분의 클러스터는 분자적으로 "등피질", "후각 영역" 또는 "섬유관"으로 식별되었다. 몇 가지 잘못 식별된 후뇌 클러스터와 미확인(NA) 배정이 획득되었지만 일반적으로 전사 프로그램은 수집된 조직의 해부학적 뇌 영역에 상응하였다. 특히, iCre 대조군 및 Ascl1-형질도입된 뇌에서 높은 iCre 발현 클러스터의 경우, 분자 배정은 "섬유관"인 반면 Ascl1^{SA6} 형질도입된 뇌의 iCre 클러스터는 잘못된 배정을 반영하거나 이러한 TF에 의해 시작된 전사 프로그램의 고유한 특성을 반영하는 것이 가능하여, "후뇌 아이덴티티"로 배정되었다(도 43D, 도 43F, 도 43H, 도 43I).
- [0365] 종합하면, 이들 데이터는 수집된 ST 데이터가 고품질이고 동일계에서 뇌 세포의 전사체를 잘 나타낸다는 것을 확인해 준다.
- [0366] 생체내에서 iCre, Ascl1 및 Ascl1^{SA6} 형질도입에 대한 구별되는 전사 반응
- [0367] iCre 대조군-형질도입된 뇌에서, 비지도 클러스터링은 총 10개의 클러스터를 식별했으며, 클러스터 3은 운동 피질의 표적 주사 부위에 공간적으로 매핑된 iCre 발현이 풍부한 클러스터이다(도 43E, 도 43F). 놀랍게도, iCre 형질도입된 뇌 전체에서 가변적으로 발현되는 상위 50개 유전자 중 다수가 하기에 자세히 기재된 바와 같이 염증 및/또는 신경퇴행성 반응과 연관되어 있다(예를 들어, Apod, Trf, B2m, Ifi2712a, Cc15, C4b, Serpina3n, Gfap, Vim, C1qb, H2-K1, H2-D1)(도 43F). 비교하면, 주입되지 않은 대조군 뇌는 iCre 주입된 뇌보다 하나 더 많은 11개의 세포 클러스터가 있었는데, 이는 이 뇌 절편의 약간 더 문층 위치를 반영한다(도 43C). 실제로, 주입되지 않은 뇌에서 가장 가변적으로 발현된 유전자는 주로 공간 맵의 후각 영역(클러스터 5 내지 7,9,10; 도 43D)에 존재하였으며, 이는 iCre-형질도입된 뇌에서는 덜 널리 퍼져 있었다(도 43F). 신경변성 상태임에도 불구하고, 주입되지 않은 hSOD1^{G93A} 운동 피질에서는 iCre-형질도입된 뇌에서 관찰된 염증 유전자 중 2개만, 즉, 많은 신경퇴행성 질환의 뇌에서 상향조절되는 지질 담체인 아포지단백질 d(Apod)^{43,44} 및 철 흡수에 관여하고 전염증성 신호에 반응하여 미세아교세포에서 상향조절되는 트랜스페린(Trf)⁴⁵만 상위 50개 가변 유전자에 포함되었다. 따라서, AAV 대조군 벡터는 주입되지 않은 5개월령 hSOD1^{G93A} 운동 피질에서 관찰되는 임의의 퇴행성 신호를 초과하는 염증성 전사 반응을 유도하였다(도 43D).
- [0368] 다음으로 Ascl1- 및 Ascl1^{SA6}-형질도입된 뇌의 공간 전사체를 분석하였고, 이를 각각 11개 및 10개의 세포 클러스터로 계층화하였다(도 43G, 도 43I). Ascl1-형질도입된 뇌에서, iCre 발현이 풍부한 시퀀싱된 스팟은 2개의 클러스터(클러스터 3 및 5) 내에 포함되어, 전사적으로 구별되는 2개의 영역에 걸쳐 있으며, 이들 둘 다 운동 피질의 상이한 도메인에 공간적으로 매핑된다(도 43G). Ascl1^{SA6}-형질도입된 뇌에서, 높은 iCre 발현은 단일 클러스터 4에 속했다(도 43I). 2개의 주입 부위의 공간적 차이에 관계없이, Ascl1 또는 Ascl1^{SA6} 형질도입 후 가변적으로 발현되는 상위 50개 유전자 중에서 염증성 유전자 발현의 눈에 띄는 결여가 관찰되었다(도 43H, 도

43J). 실제로, 주입되지 않은 대조군 hSOD1G^{93A} 뇌뿐만 아니라 Gfap에서도 상승된 Apod 및 Trf만 Asc11 또는 Asc11^{SA6} 형질도입과 연관된 가변 유전자 세트 중 하나였다(도 43H, 도 43J). 대신, Mbp 및 Pvalb와 같은 여러 신경-특이적 유전자는 Asc11 및 Asc11^{SA6} 형질도입된 뇌에서 iCre 발현 세포 클러스터가 풍부한 상위 50개의 가변적으로 발현된 유전자 중 하나였다(도 43H, 도 43J).

[0369] 종합하면, 이들 데이터는 Asc11 또는 Asc11^{SA6}을 발현하는 AAV가 iCre 대조군 벡터와 비교하여 표적 조직에서 뚜렷한 전사 반응을 유도한다는 것을 나타낸다.

[0370] AAV-형질도입된 세포 클러스터 내에서 차등적으로 발현되는 유전자의 확인

[0371] AAV-형질도입된 스핀에서 DEG의 광범위한 비교를 수행하기 위해 연구의 다음 단계는 대조군 iCre, Asc11 및 Asc11^{SA6} 형질도입된 뇌에서 iCre 발현이 풍부한 세포 클러스터에 중점을 두었다. iCre 발현의 공간적 매핑은 iCre가 실제로 3개의 벡터로 형질도입된 뇌의 운동 피질에서 발현되었음을 확인시켜주었다(도 44A). 또한, iCre 전사체는 zsGreen이 주입된 3개의 뇌에서 발현됨에 따라 기능성 단백질로 번역되었는데, 이는 Rosa-zsGreen 유전자좌가 재조합되었음을 나타낸다(도 44B, 도 44C). 특히, 하루 컴퓨터 분석을 위해서, iCre mRNA를 Asc11 전사체의 대리 척도로서 사용하였는데, 그 이유는 두 유전자가 리보솜 스킵핑 및 두 단백질의 효과적인 번역을 촉진하는 t2a 펩타이드 서열에 의해 분리된 단일 이시스트론성 메시지로부터 전사되기 때문이다⁴⁶(도 44D). 본 연구에서는 3' 단부 시퀀싱을 수행함에 따라 시퀀싱 데이터 세트에서 iCre(3' 유전자)만 검출되었다.

[0372] 다음으로, iCre 형질도입 세포와 특이적으로 연관된 DEG를 단리시키기 위해 유전자 발현을 정규화하고 규모를 조정하였다(도 44E). 일련의 벤 다이어그램을 사용하여 3개의 형질도입된 뇌의 iCre+ 세포에서 상향 또는 하향 조절된 DEG를 비교하였다(도 44F). Asc11 또는 Asc11^{SA6}에서 상향 조절된 DEG를 iCre 형질도입된 뇌와 비교할 때, Asc11(69개 유전자) 또는 Asc11^{SA6}(32개 유전자)이 형질도입된 뇌(도 44F) 고유하게 상향 조절된 DEG에 비해 iCre 형질도입된 대조군 뇌(137 내지 152개 유전자)에서 고유하게 상향 조절된 DEG가 2 내지 3배 더 많았다. 44 F 주입된 각각의 조건에서 하향조절된 DEG를 비교할 때 유사한 편향이 관찰되었고; Asc11(39개 유전자) 또는 Asc11^{SA6}(32개 유전자) 형질도입 후 훨씬 더 적은 수의 DEG에 비해 대조군 iCre-형질도입된 뇌에서 90 내지 118 개 유전자가 하향조절되었다(도 44F). DEG 수의 이러한 차이에도 불구하고, 각각의 조건에서 형질도입된 iCre⁺ 세포는 주변 조직에 비해 고유한 유전자 세트를 명확하게 발현하였다.

[0373] iCre 대조군 형질도입된 세포는 상승된 수준의 염증성 마커를 발현한다.

[0374] 생체내 AAV 형질도입의 영향을 더 자세히 특징규명하기 위해, 각각 샘플에 대해 iCre 클러스터에서 고도로 발현되고 조직의 나머지 부분에서는 발현되지 않는 상위 50개의 DEG에 대한 히트맵을 생성하였다(도 44G). iCre 대조군 벡터의 형질도입과 관련된 분자 시그니처를 먼저 DEG의 유전자 존재론(GO) 분석을 수행하여 평가하였다(도 44H). GO 점수에 비례하는 공간 크기로 계층 구조를 시각화할 수 있는 GO 용어를 영상화하는 데 의미론적 유사성 기반 트리맵 플롯을 사용하였다. 놀랍게도 대조군 iCre 형질도입과 관련된 상위 GO 카테고리는 "다른 유기체에 대한 방어 반응", "면역계의 양성 조절", "면역계 과정", "항원 처리 및 펩타이드 항원 제시", "대식세포 활성화" 및 "미세신경아교세포 활성화"를 포함한 여러 면역계 관련 용어를 포함하였다(도 44H). 또한, 상향조절된 GO 용어의 또 다른 분야는 뉴런 발달, 기능 및 성숙, 예컨대, "트랜스-시냅스 신호전달의 조절", "화학적 시냅스 전달의 조절", "신경발생의 조절", "축삭 발달" 및 "시냅스 전정"과 관련이 있었다(도 44H).

[0375] 이러한 염증 반응을 추가로 평가하기 위해서, 시그니처 유전자의 발현을 공간 지도에 매핑하였다(도 44I). Gfap 및 비멘틴⁴⁷을 포함하는 반응성 성상교세포의 마커를 조사하였는데, 이들 둘 다는 주입된 3개의 뇌 모두의 iCre 형질도입 패치 부근에서 명확하게 상향조절되었다(도 44I). 활성화된 미세아교세포의 마커인 Lyz2⁴⁸ 및 Tyrobp⁴⁹, 대식세포 마커인 Mpeg1⁵⁰ 및 Cd52⁵¹ 및 보체 인자⁵²인 C4b에 대해 주입 부위에서 유사한 풍부한 발현이 관찰되었다. 모든 경우에, 풍부한 유전자 발현은 주입되지 않은 대조군 뇌에서는 관찰되지 않았고 iCre의 경우 양측 주입 부위에서 가장 두드러졌고 Asc11 및 Asc11^{SA6}의 경우에는 그 정도가 낮았다(도 44I). Asc11 및 Asc11^{SA6} 주입과 비교하여 iCre 형질도입된 뇌에서 염증 유전자의 상대적인 발현 증가는 iCre 형질도입된 클러스터를 뇌의 다른 시퀀싱된 스핀과 비교하는 유전자 발현의 Log2 배수 변화(FC)를 플로팅함으로써 확인되었다(도

44J).

- [0376] 종합하면, 이들 데이터는 iCre 형질도입된 세포에 신경 기능을 방해할 수 있는 신경 유전자의 조절 완화와 함께, 눈에 띄는 전염증성 면역 반응이 있음을 나타낸다.
- [0377] *Ascl1*⁻ 및 *Ascl1*^{SA6}-형질도입된 세포는 신경-특이적 유전자 온톨로지 카테고리과 연관된 유전자를 발현한다.
- [0378] 조직의 나머지 부분과 비교하여 *Ascl1*⁻ 및 *Ascl1*^{SA6}-형질도입 지점(즉, iCre⁺)에서 상승된 수준으로 발현된 상위 50 DEG의 하위 집합에 대해 유전자 발현의 다음 공간 맵을 생성시켰다(도 44G). 가장 다양하게 발현되는 유전자 중 하나는 프로스타글란딘 D2 신타제(Ptgds)로, 스트레스 반응으로 다초성 질환의 성상교세포 및 희소돌기신경 아교세포에서 상향 조절되는 신경보호 프로스타글란딘인 PGD2를 합성한다⁵³. 또한, 시험관내에서 출생 후 성상교 세포에서 *Ascl1* 발현에 의해 유도되는 *Pvalb*, *Gad1* 및 *Sst*와 같은 GABA성 신경 세포 마커¹³는 상위 50개 DEG에 속했다(도 44G). 그러나 *Ptgds*, *Pvalb1*, *Gad1* 및 *Sst*의 공간 매핑은 각 유전자에 대해 고유하고 풍부한 발현 패턴을 나타내었지만, 나머지 조직과 비교하여 주입 부위의 발현 차이는 주입되지 않음, iCre, *Ascl1* 및 *Ascl1*^{SA6} 주입된 뇌 각각에서 쉽게 식별할 수 없었는데, 이는 일반적으로 피질 조직에서 이들 유전자 각각이 상대적으로 높게 발현되기 때문일 가능성이 높다(도 46A). 실제로, 이러한 공간 맵은 실제 유전자 발현을 반영하는 것이 아니라 조직의 한 부분에서 다른 모든 부위에 비해 유전자 발현이 풍부해지는 것을 반영한다. 유전자 발현의 정량적 측정을 제공하기 위해서, 본 발명자들은 유전자 발현에서 log2FC를 플로팅하였는데, 이는 *Ptgds*, *Sst* 및 *Mbp*가 대조군인 iCre 주입된 뇌와 비교하여 *Ascl1* 또는 *Ascl1*^{SA6}-형질도입된 뇌에서 모두 높은 수준으로 발현되었음을 나타낸다.
- [0379] 다음으로, 초기 출생 후 성상교세포¹⁰를 표적으로 하는 이전의 시험관내 신경 재프로그래밍 실험에서 확인된 소수의 DEG의 발현을 또한 유사하게 공간적으로 매핑하였다. 뉴런에서 발현되는 유전자의 대부분은 AAV-형질도입된 뇌에서 눈에 띄게 변경되지 않았지만(데이터는 표시되지 않음), 기본 도메인이 부족하고 bHLH 인자에 결합하여 이의 활성을 방지하는 HLH TF를 암호화하는 *Id3*을 포함하여 AAV 형질도입 부위에서 풍부한 발현을 나타내는 소수의 유전자가 확인되었다(도 46B). 특히, *Id3*은 조절-T 세포 풀을 유지하지만⁵⁴ 신경발생의 중요한 조절자이기도 하다⁵⁵. 또한, 보체 캐스케이드의 두 가지 성분인 *C1qb* 및 *C1qa*는 시험관내 신경 재프로그래밍 동안 및 3개의 뇌 모두의 주입 부위에서 상향조절되었다(도 46B). 유전자 발현의 정량적 측정을 제공하기 위해서, 본 발명자들은 유전자 발현에서 log2FC를 플로팅하였는데, 이는 *Id3*가 대조군인 iCre 주입된 뇌와 비교하여 *Ascl1*⁻ 또는 *Ascl1*^{SA6}-형질도입된 뇌에서 높은 수준으로 발현되는 반면 *C1qb* 및 *C1qa* 수준은 iCre-형질도입된 뇌에서 비교적 높은 수준으로 발현됨을 나타내었다(도 46C). 이러한 발견은 대조군 iCre 백터와 관련된 염증 반응의 증가와 일치하였다.
- [0380] 마지막으로, 재프로그래밍 TF의 전사 영향을 더 잘 이해하기 위해서, *Ascl1* 및 *Ascl1*^{SA6} 형질도입된 뇌에서 DEG의 GO 분석을 수행하였다. *Ascl1*-형질도입된 뇌에서 상향조절된 GO 용어는 "칼륨 이온 수송", "수상돌기 형태형성의 조절" 및 "화학적 시냅스 전달의 조절"을 포함하는 여러 뉴런 용어를 포함하였다(도 46D). 놀랍게도 *Ascl1*^{SA6} 형질도입된 뇌에는 다양한 GO 용어 세트가 풍부한데, 이는 이러한 두 TF가 서로 구별되는 효과가 있음을 시사한다. "세포 분화의 음성 조절"과 같은 일반적인 GO 용어와 함께 "축삭 및 접합 조립에 대한 단백질 국재화"와 같은 신경 카테고리를 포함하였다(도 46D).
- [0381] 또한 신경아교 아이덴티티의 잠재적 손실과 일치하는 "신경아교 세포 증식"을 포함하는 *Ascl1* 형질도입 시 하향 조절된 GO 용어가 흥미로웠다. 또한, "대사 과정"은 *Ascl1* 발현과 연관된 하향조절된 GO 용어였다(도 46D). 이러한 발견은 신경 전구 세포 분화 중에 대사 유전자 발현이 변경되고⁵⁶ 또한 *ASCL1*^{low} 및 *ASCL1*^{high}로 분류되는 신경내분비 종양에서 여러 대사 유전자가 차등적으로 발현된다⁵⁷는 점을 고려할 때 잠재적인 관심의 대상이다. 마지막으로, *Ascl1*^{SA6} 형질도입된 뇌에서는 다른 세트의 유전자가 하향조절되었으며, 이는 "세포 사멸의 양성 조절"을 포함하는 GO 카테고리에 속하는데, 이는 *Ascl1*^{SA6} 형질도입된 세포가 향상된 생존 표현형 및 "세포 분화"를 가질 수 있음을 시사한다(도 46D).
- [0382] 종합하면, GO 분석은 *Ascl1* 및 *Ascl1*^{SA6}이 분화 경로, 성상교세포 및 뉴런 특이적 유전자 발현의 변화를 유도하

는 것과 일치하며, 이는 유도된 전사체의 보다 상세한 분석을 촉발한다.

[0383] 대조군 AAV 형질도입과 연관된 유전자 조절 네트워크의 엄중 시그니처

[0384] 유전자 조절 네트워크(GRN)는 유전자가 어떻게 상호작용하여 세포 운명 및/또는 상태를 부여하는지에 대한 시스템 수준 견해를 제공하고 중요한 TF 허브를 식별하는 데 사용될 수 있다. 각각의 iCre⁺ 세포 클러스터 내에서 발현된 유전자 목록을 사용하여, 본 발명자들은 대조군, Ascl1 및 Ascl1^{SA6} 형질도입 세포에 대한 GRN을 추론하였다. 3개의 GRN은 구별되는 토폴로지를 가지며, 각각은 서로에 비해 상당히 상향 또는 하향 조절된 유전자를 포함하였다(조정된 p-값 ≤ 0.05). iCre와 Ascl1 또는 Ascl1^{SA6} 중 하나 또는 둘 다에 의해 유도된 유전자는 특정 유전자 카고보다는 AAV 전달과 관련이 있을 가능성이 높다. 일반적으로 상향조절되는 유전자는 염증성 성상교세포 마커인 Gfap, Gfap 발현에 필요한 TF인 Nfic⁵⁸, 층-특이적 뉴런 마커인 Satb2 및 Tbr1⁵⁹, 신경퇴행성 질환에서 감소된 수준으로 발현되는 수초화 마커인 Mbp⁶⁰ 및 신경염증과 관련된 미세아교세포 및 성상교세포에서 발현되는 리소좀 프로테아제 Ctsb⁶¹를 포함한다(도 47A 내지 도 47C). 그러나 도 2J에 제시된 바와 같이, Gfap과 같은 염증성 유전자에 대한 log2FC는 iCre-형질도입된 세포에서 가장 높았다(도 47 내지 도 47C). 유사하게, 일부 DEG는 Hopx⁶², Id4⁶³, Bhlhe22⁶⁴ 및 Meis2⁶⁵를 포함하는 Ascl1 또는 Ascl1^{SA6} 벡터 중 적어도 하나에 의해 특이적으로 하향조절되었다(도 47A 내지 도 47C).

[0385] 종합하면, 이들 데이터는 AAV 형질도입만으로도 카고와 관계없이 유전자 발현을 변경할 수 있다는 생각을 추가로 뒷받침한다. 그러나 목표는 카고-(즉, bHLH TF)-특이적 효과를 확인하는 것이었기 때문에 이 연구는 대신 iCre 또는 Ascl1 및/또는 Ascl1^{SA6}에 의해 고유하게 상향 조절되는 유전자에 중점을 두었다.

[0386] iCre GRN에서, 전염증성 유전자, 예컨대, Stat1, 사이토카인 조절되는 TF⁶⁶, 타입 1 인터페론을 갖는 양성 피드백 루프를 형성하는 TF 조절자⁶⁶인 Irf7, 사이토카인을 유인하는 호중구⁶⁷인 Cxcl1, 전염증성 케모카인⁶⁸인 Ccl15, 허혈성 손상 후 활성화된 미세아교세포에서 상향조절되는 핵 수용체⁶⁹인 Nr4a1, 산화성 스트레스 반응성 TF⁷⁰인 Egr1, 혈액-뇌-장벽 투과성⁷¹을 조절하는 Fabp5, 염증성 반응의 TF 조절자⁷²인 Litaf, 및 성상교세포에서 Sod1 발현 및 산화성 스트레스를 증가시키는 TF⁷³인 Cepbd를 포함하는 다수의 유전자가 고유하게 상향조절되었다(도 47A). 흥미롭게도, Neurod6은 또한 AAV 형질도입에 의해 유도된 전염증 상태에 대한 반응일 수 있는 세포 내성을 부여하여⁷⁴ 산화 스트레스로부터 보호하는 bHLH 유전자인 iCre 형질도입에 의해 상향조절되었다(도 47A). Ascl1 및 Ascl1^{SA6} 형질도입에 대한 유전자 발현의 이러한 차이는 log2FC를 플로팅하여 확인되었다(도 47D). 반대로, DEG 세트는 신경 줄기 및 전구 세포(NSPC) 마커인 Lhx2⁷⁵, Hes5⁷⁶ 및 Cux2⁷⁷과 정신분열증에 대한 감수성 유전자^{25,78}인 Ptprz1을 포함하는 iCre 7에 의해 특이적으로 하향 조절되었고(도 47A), 또한 log2FC 플롯에서 검증되었다(도 47D).

[0387] 종합하면, 이들 데이터는 대조군 iCre 벡터의 형질도입과 연관된 전염증성 GRN과 일치하며, 신경 기능에 대한 다른 가능한 해로운 효과를 제시하며, 생체내에서 AAV 형질도입이 수치상 패턴화⁷⁹ 및 해마 신경발생⁸⁰을 변경한다는 이전 보고와 일치한다.

[0388] Ascl1 및 Ascl1^{SA6} 형질도입과 연관된 유전자 조절 네트워크는 상향조절된 뉴런 및 하향조절된 신경아교 유전자를 포함한다.

[0389] Ascl1 및 Ascl1^{SA6} GRN은 iCre GRN과 실질적으로 달랐지만 Zbtb18 및 Id2와 함께 Ascl1 자체의 풍부한 발현을 포함하여 서로 일부 유사점을 나타내었다(도 47B, 도 47C). Zbtb18은 BTB/POZ 도메인, 아연-핑거 전사 억제인자이며, 이 돌연변이는 소두증 또는 대두증, 지적 장애 및 간질을 포함한 비정상적인 신경질 발달과 관련이 있다⁸¹. 특히, Zbtb18은 Id 패밀리 TF(Id1-4)⁶³의 발현을 조절하고 Id3 발현은 Ascl1^{SA6} GRN에서도 증가하였다(도 47C). iCre 형질도입과 관련된 유전자 발현의 이러한 차이는 log2FC를 플로팅하여 확인되었다(도 47D).

[0390] 그 후, 두 GRN은 달랐으며, 신경돌기 성장에서 역할⁸²을 하는 Egr3을 포함하는 Ascl1 GRN, 신경펩타이드 생합성

⁸³에 필요한 프로호르몬 전환효소인 Pcsk2, 손실이 피질의 과흥분성으로 이어지는⁸⁴ bHLH TF인 Bhlhe40 및 성숙한 유사분열 후 뉴런을 유지하는 데 필요한⁸⁵ Pou4f1을 포함하는 유전자가 Asc11 GRN에서 상승하였다(도 4B, 도 4D). 대조적으로, Asc11^{SA6}은 log2FC 플롯에서 확인된 바와 같이 신경보호 인자⁵³인 Ptgs와 회소돌기신경아교세포 분화⁸⁶를 촉진하는 bHLH TF인 Olig1의 발현을 추가로 증가시켰다(도4C, 도4D). 따라서 Asc11 및 Asc11^{SA6} 둘 다는 일부 공통 TF 노드(Zbtb18, Id3)를 공유하지만 여러 측면에서 다른 GRN을 갖는다.

[0391] Asc11 또는 Asc11^{SA6} GRN이 하향조절된 다음 유전자 발현을 검사하였다(도 4B, 도4C). 두 데이터 세트에는 뉴런 및/또는 교세포에서 발현되는 유전자가 포함되는데, 이것은 손실이 피질 미세아교세포 및 성상교세포를 활성화시키는 신경보호 bHLH-PAS 도메인 TF⁸⁷인 Npas4, 뇌-아웃되는 경우 조속한 신경발생을 촉진하는 갑상선 호르몬 핵 수용체⁸⁸인 Thra, 발현이 단기간 뉴런 활성화와 연관된 극초기 유전자⁸⁹인 Junb 및 과발현이 흥분성 신경전달을 촉진하고 AD 위험을 감소시키는 성상교세포 및 전신냅스 터미널에서 발현되는 유전자⁹⁰인 Clu 또는 ApoJ라고도 알려진 클러스테린을 포함한다. 말단 선택자 유전자⁹¹인 Pbx1도 Asc11 GRN에서 하향조절되었으며(도 47B, 도 47E), 또한 극초기 유전자⁸⁹인 Fos 및 활성화된 미세아교세포와 관련된 Nr4a1도 Asc11^{SA6} GRN에서 추가로 하향 조절되었다(도 47C, 도 47E). 이러한 변화의 중요성은 즉시 명백하지 않을 수 있지만 Asc11과 Asc11^{SA6} 사이의 전사 반응의 중첩은 제어 벡터 단독에 의해 유도된 것과 다른 생체내 전사 변화를 유도하는 이러한 TF에 대한 지원을 제공한다.

[0392] 종합하면, 이 데이터는 hSOD1^{G93A} 마우스의 운동 피질에서 잘못 발현될 때 Asc11 및 Asc11^{SA6}에 의해 활성화된 GRN의 공통적이고 뚜렷한 특징이 모두 있음을 나타낸다.

[0393] 생체내에서 Asc11 및 Asc11^{SA6}이 형질도입된 성상교세포는 시험관내에서 표적 유전자의 하위세트를 활성화시킨다.

[0394] 생체내에서 뇌 성상교세포에서 Asc11 및 Asc11^{SA6}의 발현과 연관된 유전자 발현 변화의 중요성을 더 잘 이해하기 위해서, 본 발명의 ST 분석으로부터의 DEG를 2개의 시험관내 재프로그래밍 연구로부터 이전에 확인된 DEG와 비교하였다. 비교 연구를 수행하였는데, 여기서 4-하이드록시-타목시펜 유도성 Asc11^{ERT2} 레트로바이러스 작제물을 생체내에서 출생 후 (P) 6 내지 7일에 피질로부터 단리된 증식 중인 성상교세포에 형질도입한 후 형질도입 후 4-, 24- 및 48-시간에 RNA-seq 분석을 수행하였다¹⁰. 연구 2에서는, 독시사이클린 유도성 렌티바이러스 시스템을 사용하여 인간 ASCL1 및 돌연변이체 ASCL1^{SA5}(인간 유전자는 단지 5개의 SP 부위를 가짐)를 신경모세포종 세포주(SH-SY5Y)에서 과발현시켰고, 유전자 발현은 형질도입 후 24시간에만 평가하였다²⁵. 본 연구에서는 어느 시스템도 성체 성상교세포 표적을 정확하게 모방하지 못했지만, 두 경우 모두에서 신경 분화가 촉발되었다.

[0395] 놀랍게도, 생체내에서 ALS 마우스의 운동 피질에서 AAV5-GFAP-iCre 형질도입에 의해 유도된 몇몇 전염증성 유전자(본 연구)는 4시간 시점에 Irf7, Hmox1, Cxcl1, Ccl5, Stat1, Litaf, Xaf1 및 Egr1을 포함하는, Asc11의 시험관내 레트로바이러스 형질도입에 의해서 유사하게 일시적으로 상향조절되었다(도 48A). 그러나, 이 반응은 일시적이었고, Hmox1 발현만 형질도입 후 24시간 및 48시간에 지속되었고, Nef1도 이러한 후기 시점에서 발현이 증가하였다(도 48A). NEFL은 뉴런 중간 필라멘트를 형성하는 신경필라멘트 경쇄 단백질을 암호화하며 기능 상실 돌연변이는 샤르코 마리 투스병(charcot-marie-tooth disease)의 신경퇴행과 관련이 있다⁹². 따라서 Nef1의 상향조절은 뇌(본 발명자들의 연구) 및 접시에서 배양된 뇌 성상교세포의 시험관내 바이러스 형질도입에 대한 신경보호 반응일 수 있다¹⁰. 해목옥시게나제 1(Hmox1)은 유사하게 신경보호 기능을 제공하며 일반적으로 ALS에서 하향 조절된다⁹³. 소수의 이들 유전자는 또한 신경모세포종 세포의 형질도입 후 제24시간에 ASCL1(EGR1, NR4A1, LITAF, NEFL) 및 ASCL1^{SA5}(EGR1, NR4A1, LITAF)에 의해 유도되었다²⁵(도 47D, 도 47G).

[0396] 또한 유전자의 하위세트는 본 발명자들의 생체내 ST 분석에서 대조군 AAV에 의해서 그리고 시험관내에서 신경 재프로그래밍 연구에서 사용된 레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터에 의해서 하향조절되었다. 출생 후의 성상교세포에서 Asc11^{ERT2} 발현에 의해 하향조절되는 Ptpz1이 포함되었다¹⁰. Ptpz1은 뉴런 및 교세포에서 발현되고

정신분열증에 대한 감수성 유전자인 다기능 수용체 단백질 티로신 포스파타제를 암호화한다⁷⁸. Ptpz1은 전염증성 사이토카인인 인터류킨-34(IL-34)⁹⁴에 대한 수용체 역할을 하기 때문에 면역 반응에도 참여할 수 있다⁹⁵. 또한, 신경원성 유전자 Cux2뿐만 아니라 구아닐릴 사이클라제 소단위인 Gucy1b3는 아직 뇌에서 연구되지 않았다(도 47G, 도 47J).

[0397] 따라서, 대조군 바이러스 형질도입은 시험관내 또는 생체내에서 형질도입되었는지 여부 및 바이러스 벡터 공급원에 관계없이 전사 프로파일을 공유하였다.

[0398] *Zbtb18*은 *Ascl1* GRN에서 필수적인 노드 TF이다.

[0399] 다음으로, 본 생체내 연구에서 *Ascl1* 및 *Ascl1*^{SA6} GRN에서 확인된 DEG를 시험관내 신경 재프로그래밍 연구와 비교하였다. 놀랍게도, 출생 후 성상교세포에서 *Ascl1*^{ERT2}의 발현 또는 신경모세포종 세포에서 *ASCL1* 및 *ASCL1*^{SA5}의 발현은 모두 *Zbtb18* 및 *Id3*의 발현을 상향조절하였다(도 47G, 도 47J, 도 48B, 도 48C). 또한, *Egr3* 및 *Pcsk2*는 P5 성상교세포에서는 *Ascl1*^{ERT2}에 의해 상향조절되었고(도 48B, 도 48C), 신경모세포종 세포에서는 *ASCL1* 및 *ASCL1*^{SA5}에 의해 상향조절되었다(도 47G, 도 47H, 도 47J, 도 47K). 이에 비해서, *Id3* 발현은 생체내 본 연구에서는 *Ascl1*^{SA6}에 의해서만 유도되었고, 시험관내 신경모세포종 세포에서는 *ASCL1*^{SA5}에 의해서만 유도되었다(도 47H, 도 47K). *Zbtb18* 및 *Id2*는 두 연구 모두에서 *Ascl1*과 *Ascl1*^{SA} 돌연변이체에 의해 일반적으로 상향조절되는 두 유전자이지만, *ZBTB18* 돌연변이 및 피질 기형 사이의 연관성을 고려할 때⁸¹ 본 연구는 이러한 TF에 더욱 초점을 맞췄다.

[0400] *ASCL1*의 하류 뉴런 전환을 유도하는 데 있어서 *ZBTB18*의 잠재적 중요성을 추가로 조사하기 위해서, 피질 GRN을 배아 인간 피질⁹⁶로부터의 scRNA-seq 데이터를 사용하여 추론하였고, 교모세포종 세포²³에서 *ASCL1*^{SA5}-과발현 후 24시간에 상향-(어두운 회색 박스) 또는 하향-조절(밝은 회색 박스)된 유전자를 이러한 GRN에 대해서 매핑하였다(도 47L). 이 네트워크 분석을 통해, *ZBTB18*은 *ASCL1*의 전사 표적으로 확인된 반면, *NEUROG2* 발현은 억제되었는데(도 47L), 이는 이들 두 bHLH TF 사이의 교차-억제 상호작용을 유지한다⁴. *ZBTB18* 발현의 중요성을 평가하기 위해서, 인 실리코 넥-아웃(KO) 분석을 수행하였는데, 이는 82개 TF 노드 중 22개의 TF(또는 모든 TF의 26.8%)가 본 연구에서 *Ascl1* 과발현에 의해 또한 유도된 *EGR3* 및 *ID3*를 비롯하여 변경된 발현을 갖는 것으로 예상되었음을 나타내었다(도 47M).

[0401] 동일한 피질 GRN 내에서 *Ascl1*, *Neurog2* 및 *Zbtb18*의 존재에 대한 추가 뒷받침을 제공하기 위해서, 피질 신경 전구세포(NPC)⁹⁷를 발현하는 *Neurog2* 및 *Ascl1*인 배아일(E) 12.5일로부터 이전에 생산된 GRN을 재분석하였는데, 이는 *Zbtb18*이 실제로 이 전사 네트워크의 일부임을 나타낸다(도 47N). 계통 및 분화 평가를 허용하는 E12.5 중뇌 조직으로부터 생성된 검색 가능한 scRNA-seq 데이터 세트(https://apps.institutimagine.org/mouse_pallium/)를 사용하여 *Ascl1*, *Neurog2* 및 *Zbtb18* 기능 간의 관계에 대한 추가 통찰력을 획득하였다⁹⁸. 시퀀싱된 세포를 후부 글루타메이트 및 복부 GABA성 계통 궤적으로 계층화한 E12.5 중뇌 scRNAseq 데이터로부터 생성된 SPRING 플롯⁹⁸은 예상된 바와 같이 *Ascl1* 및 *Neurog2*가 각각 GABA성 및 글루타메이트 계통에서 반대편에서 발현되었음을 나타낸다(도 47O). 특히, *Zbtb18*은 GABA성 세포에도 일부 양성 세포가 있었지만 글루타메이트 계통에서 더 높은 수준으로 발현되었다⁹⁸. 이러한 데이터 세트에서 전사체 다양성의 주요 원인은 복부(DV) 위치에 해당하며 이는 의사-DV 플롯으로 그래프로 표현될 수 있다(도 47P). 예상된 바와 같이, *Ascl1* 및 *Neurog2*는 각각 복부 및 후부 편향을 갖는 반면, *Zbtb18*은 D/V 축에 걸쳐 균일하게 발현되었다(도 47P). 마지막으로, 이 데이터 세트를 사용하여 후부(진한 회색) 및 복부(밝은 회색) 계통에서 *Ascl1*, *Neurog2* 및 *Zbtb18*에 대한 의사 시간 비교를 수행하였다(도 47Q). 이러한 플롯에서, 전구 세포에서 발현된 유전자는 플롯 중앙에서 최고조에 달하는 반면, 분화 유전자는 플롯의 끝에서 최고조에 달한다. 이 분석으로부터, *Ascl1* 및 *Neurog2* 플롯은 신경 전구 세포 유전자로서 확인된 역할과 더 일치하는 반면, *Zbtb18* 발현은 시간 경과에 따라 세포가 분화됨에 따라 증가하였다(도 47Q). 이러한 연구는 *Zbtb18*이 피질 발달 동안 뉴런 이동 및 형태학적 성숙에 필수적이라는 이전 보고서와 일치한다⁹⁹.

[0402] 종합하면, 이들 연구는 신경 재프로그래밍(본 연구) 동안 *Ascl1*의 하류 및 발달 중인 신피질에서 *Neurog2* 및

Ascl1 둘 다의 하류에 작용하는 중요한 신경 분화 인자로서 Zbtb18의 중요성을 뒷받침한다.

[0403]

논의

[0404]

본 실시예의 목적은 ST 접근법을 사용하여 생체내에서 신경 계통 전환에 대한 증거를 제공하는 것이었다. 구체적으로, 10X Visium 플랫폼을 사용하여 뉴런 변성이 시작된 시점에 $hSOD1^{G93A}$ 운동 피질의 성상교세포에서 Ascl1 및 $Ascl1^{SA6}$ TF를 발현하는 전체 효과를 조사하였다. 전달 패러다임은 Rosa-zsGreen 리포터를 사용하여 바이러스 형질도입을 시각화할 수 있도록 t2a-iCre 서열과 함께 성상교세포-특이적 GFAP 프로모터를 운반하는 AAV5 바이러스 벡터를 기반으로 하였다. 이러한 접근법은 이전에 Ascl1과 비교하여 $Ascl1^{SA6}$ 이 성인 운동 피질의 성상교세포에서 발현될 때 뉴런 마커 발현을 더 효과적으로 유도(및 신경아교 마커를 하향조절)할 수 있음을 보여주기 위해 사용되었다(실시예 5). 그러나, 이러한 연구에서는, GFAP 프로모터에 대한 신경원성 TF 서열의 cis 효과로 인해 신경 계통 전환을 직접적으로 주장하는 것이 어려웠다²⁷. 본 명세서에 사용된 ST 접근법을 사용하면, 생체내에서 Ascl1 및 $Ascl1^{SA6}$ 에 의해 유도된 전사체가 시험관내에서 수행된 재프로그래밍 연구와 공통 전사 표적을 공유한다는 증거가 제공된다^{10,25}. 또한, 새로운 TF인 Zbtb18을 중심으로 한 신경원성 프로그램이 생체내 및 시험관내에서 Ascl1 및 $Ascl1^{SA6}$ 에 의해 활성화된다는 증거가 제공된다.

[0405]

ZBTB18(RP58이라고도 불림)은 이러한 유전자의 돌연변이가 소두증 또는 대두증, 지적 장애 및 간질⁸¹을 포함하는 비정상적인 신피질 발달과 연관되어 있으므로 흥미롭다. 또한, 배아 피질에서 Zbtb18의 넉다운은 뉴런 이동을 방해할 뿐만 아니라 신생 뉴런의 형태학적 성숙을 방해하여, 이러한 TF를 필수 신경 분화 유전자⁹⁹로 지정한다. 본 연구의 의사시간 분석은 신경 분화 유전자로서의 Zbtb18의 역할을 뒷받침하지만, 이는 이러한 TF가 후부 및 복부 계통 둘 다에서 작동할 수 있음을 시사한다. 흥미롭게도, Zbtb18은 모든 Id TF의 발현을 저해하는 것으로 보고되어 있다⁶³. 이에 반해서, Id2 및 Id3은 Zbtb18과 함께 Ascl1 및 $Ascl1^{SA6}$ 에 의해 상향조절되는 것을 발견하였는데, 이는 이러한 저해 관계가 모든 세포 상황에서 동일하지 않음을 시사한다.

[0406]

놀랍게도, GBM에서는 SP 부위의 Ascl1 인산화 및 ID2 발현의 상향조절이 신경 분화에 대한 두 가지 확인된 장애물이었다²³. 이러한 생체내 연구에서, Ascl1 및 $Ascl1^{SA6}$ 은 이전의 시험관내 연구와 유사하게 뇌 성상교세포에서 발현될 때 Id TF의 발현을 유도하였다¹⁰. 처음에는, 이러한 유도는 Id 전사 인자가 비기능성 이중이량체를 형성하거나 I형 E-단백질 보조인자를 흡수함으로써 II형 bHLH TF, 예컨대, Ascl1을 차단하기 때문에 저해성이라고 간주될 수 있다. 그러나, Id2는 뉴런 발아를 유도하는 해마의 카이닉산 손상에 의해 유도되며, 이는 Id2가 성인 뇌에서 잘못 발현될 때 표현형 복사될 수 있고, Id2는 또한 성인 해마에서 이끼 섬유의 발아를 유도할 수 있다¹⁰⁰. 본 연구에서, Id2는 JAK/STAT 및 인터페론 신호전달을 활성화하였다¹⁰⁰. 전사 수준에서, Id2는 Bhlhe40 및 Egr1을 포함하는 하류 TF의 발현을 유도하며¹⁰⁰, 흥미롭게도 본 연구에서 Ascl1이 성인 성상교세포에서 상향조절될 때 두 TF 모두가 유도된다. 보완적인 연구에서, Id2는 배아 병아리 척수에서 Ascl1-유도 신경발생에 필요한 것으로 나타났다¹⁰¹. 흥미롭게도, Id2에 대한 의존도는 Neurog2에 의존하는 후부 척수 전구체보다 Ascl1에 의존하는 복부 척수 전구체에 대해 더 강했다¹⁰¹.

[0407]

예상치 못하게, 전사 프로파일링은 iCre 대조군 벡터가 전체 유전자 발현에 가장 큰 영향을 미쳐서, 반응성 성상교세포, 활성화된 미세아교세포 및 대식세포의 마커 및 보체 시스템을 포함하는 전사 전염증성 반응을 개시함을 나타내었다. 특히, Ascl1 또는 $Ascl1^{SA6}$ 과발현과 연관된 iCre 클러스터에서, 대조군 벡터에 의해 촉발된 면역 반응 유전자의 동일한 발현 증가가 관찰되지 않았다. iCre 형질도입 세포의 염증 시그니처는 특히 11개의 FDA 승인으로 AAV가 임상으로 얼마나 멀리 이동했는지를 고려할 때 예상치 못한 것이었다¹⁰². 본 연구의 유망한 결과 중 하나는, Ascl1 또는 $Ascl1^{SA6}$ 을 운반하는 AAV의 염증 효과가 iCre 대조군 벡터에 비해 훨씬 감소하였다는 것인데, 이는 이러한 TF가 염증 반응을 방해할 수 있음을 시사하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0408]

요약하면, 본 실시예는 bHLH 전사 인자, 특히 본 명세서에 기재된 돌연변이체 bHLH 전사 인자의 사용을 뒷받침하는 공간적으로 분해된 전사체 데이터를 제공하며 생체내에서 뇌 성상교세포에서 발현될 때 신경 계통 전환을 촉진한다. 본 데이터는 Zbtb18이 선택적으로 본 명세서에 기재된 바와 같은 돌연변이체 bHLH 전사 인자와 함께

새로운 뉴런 전환 인자로서 유용한 것으로 추가로 식별한다.

- [0409] 따라서, 본 출원은 대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환에 사용하기 위한 ZBTB18 전사 인자 또는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산을 추가로 제공한다. 일부 실시형태에서, ZBTB18 전사 인자는 서열번호 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54 중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0410] 서열 번호 36, 38, 40, 42, 44, 46 및 48의 아미노산 서열은 각각 마우스 ZBTB18 변이체 전사 인자 1 내지 7의 서열에 상응한다. 이 서열은 국립 의학 도서관, 국립 생명 공학 정보 센터(NCBI) 데이터베이스에서 검색되었으며 해당 mRNA 전사체에 대한 NCBI 참조 서열과 상응한다: 각각 NM_00102330, NM_013915, NM_001355098, NM_001355099, NM_001355100, NM_001355101 및 NM_001355102. mRNA 서열은 각각 서열번호 37, 39, 41, 43, 45, 47 및 49로서 본 출원에 열거되어 있다.
- [0411] 서열번호 50, 52 또는 54의 아미노산 서열은 각각 인간 ZBTB18 전사 인자 변이체 1, 2 및 3의 서열에 상응한다. 이 서열은 국립 의학 도서관, NCBI 데이터베이스에서 검색되었으며 해당 mRNA 전사체에 대한 NCBI 참조 서열과 상응한다: 각각 NM_2055768, NM_006352 및 NM_001278196. mRNA 서열은 각각 서열번호 51, 53 및 55로서 본 출원에 열거되어 있다.
- [0412] 인간, 마우스 및 다른 종(랫트, 개, 닭 및 침팬지 포함)에서 ZBTB18 전사 인자 유전자 사이에는 높은 보존성이 있다.
- [0413] 또한 본 명세서에는 서열번호 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54 중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한 아미노산 서열을 갖는 ZBTB18 전사 인자 또는 서열번호 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54 중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한 아미노산 서열을 갖는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산을 포함하는 약제학적 조성물이 제공되며, 이것은 바이러스 또는 비-바이러스 벡터 내에 존재할 수 있다.
- [0414] 본 출원은 서열번호 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52 또는 54 중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한 아미노산 서열을 갖는 ZBTB18 전사 인자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 적합한 벡터는 돌연변이체 bHLH 전사 인자 발현 벡터와 관련하여 상기에 상세히 기재되어 있다. 핵산 서열은 선택적으로 서열번호 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53 또는 55 중 하나와 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 97% 동일한 서열이다.
- [0415] 또한, 상기에 정의된 바와 같은 ZBTB18 전사 인자, 암호화 핵산, 벡터 또는 약제학적 조성물의 투여에 의해서 대상체에서 신경아교 세포의 뉴런 형질전환을 위해 사용하는 방법이 제공된다.

[0416]

참고문헌

- 1 Bocchi, R., Masserdotti, G. & Götz, M. Direct neuronal reprogramming: Fast forward from new concepts toward therapeutic approaches. *Neuron*, doi:10.1016/j.neuron.2021.11.023 (2021).
- 2 Vasan, L., Park, E., David, L. A., Fleming, T. & Schuurmans, C. Direct Neuronal Reprogramming: Bridging the Gap Between Basic Science and Clinical Application. *Front Cell Dev Biol* **9**, 681087, doi:10.3389/fcell.2021.681087 (2021).
- 3 Heins, N. *et al.* Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* **5**, 308-315, doi:10.1038/nn828 (2002).
- 4 Oproescu, A. M., Han, S. & Schuurmans, C. New Insights Into the Intricacies of Proneural Gene Regulation in the Embryonic and Adult Cerebral Cortex. *Front Mol Neurosci* **14**, 642016, doi:10.3389/fnmol.2021.642016 (2021).
- 5 Casarosa, S., Fode, C. & Guillemot, F. Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* **126**, 525-534 (1999).
- 6 Fode, C. *et al.* A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* **14**, 67-80 (2000).

[0417]

- 7 Schuurmans, C. *et al.* Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *Embo J* **23**, 2892-2902 (2004).
- 8 Parras, C. M. *et al.* Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* **16**, 324-338, doi:10.1101/gad.940902 (2002).
- 9 Kovach, C. *et al.* Neurog2 simultaneously activates and represses alternative gene expression programs in the developing neocortex. *Cereb Cortex* **23**, 1884-1900, doi:10.1093/cercor/bhs176 (2013).
- 10 Masserdotti, G. *et al.* Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell* **17**, 74-88, doi:10.1016/j.stem.2015.05.014 (2015).
- 11 Gascon, S. *et al.* Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell Stem Cell* **18**, 396-409, doi:10.1016/j.stem.2015.12.003 (2016).
- 12 Berninger, B., Guillemot, F. & Gotz, M. Directing neurotransmitter identity of neurones derived from expanded adult neural stem cells. *Eur J Neurosci* **25**, 2581-2590, doi:EJN5509 [pii] 10.1111/j.1460-9568.2007.05509.x (2007).
- 13 Heinrich, C. *et al.* Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS Biol* **8**, e1000373, doi:10.1371/journal.pbio.1000373 (2010).
- 14 Heinrich, C., Gotz, M. & Berninger, B. Reprogramming of postnatal astroglia of the mouse neocortex into functional, synapse-forming neurons. *Methods Mol Biol* **814**, 485-498, doi:10.1007/978-1-61779-452-0_32 (2012).
- 15 Chouchane, M. *et al.* Lineage Reprogramming of Astroglial Cells from Different Origins into Distinct Neuronal Subtypes. *Stem Cell Reports* **9**, 162-176, doi:10.1016/j.stemcr.2017.05.009 (2017).

[0418]

- 16 Rao, Y. *et al.* NeuroD1 induces microglial apoptosis and cannot induce microglia-to-neuron cross-lineage reprogramming. *Neuron* **109**, 4094-4108.e4095, doi:10.1016/j.neuron.2021.11.008 (2021).
- 17 Russo, G. L. *et al.* CRISPR-Mediated Induction of Neuron-Enriched Mitochondrial Proteins Boosts Direct Glia-to-Neuron Conversion. *Cell Stem Cell* **28**, 584, doi:10.1016/j.stem.2020.11.017 (2021).
- 18 Ali, F. R. *et al.* Dephosphorylation of the Proneural Transcription Factor ASCL1 Re-Engages a Latent Post-Mitotic Differentiation Program in Neuroblastoma. *Mol Cancer Res* **18**, 1759-1766, doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-0693 (2020).
- 19 Li, S. *et al.* RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci* **34**, 2169-2190, doi:10.1523/JNEUROSCI.4077-13.2014 (2014).
- 20 Li, S. *et al.* GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. *J Neurosci* **32**, 7791-7805, doi:10.1523/JNEUROSCI.1309-12.2012 (2012).
- 21 Ali, F. *et al.* Cell cycle-regulated multi-site phosphorylation of Neurogenin 2 coordinates cell cycling with differentiation during neurogenesis. *Development* **138**, 4267-4277, doi:10.1242/dev.067900 (2011).
- 22 Azzarelli, R., Hardwick, L. J. & Philpott, A. Emergence of neuronal diversity from patterning of telencephalic progenitors. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **4**, 197-214, doi:10.1002/wdev.174 (2015).
- 23 Azzarelli, R. *et al.* ASCL1 phosphorylation and ID2 upregulation are roadblocks to glioblastoma stem cell differentiation. *Sci Rep* **12**, 2341, doi:10.1038/s41598-022-06248-x (2022).
- 24 Hindley, C. *et al.* Post-translational modification of Ngn2 differentially affects transcription of distinct targets to regulate the balance between progenitor maintenance and differentiation. *Development* **139**, 1718-1723, doi:10.1242/dev.077552 (2012).

[0419]

- 25 Woods, L. M. *et al.* Elevated ASCL1 activity creates de novo regulatory elements associated with neuronal differentiation. *BMC Genomics* **23**, 255, doi:10.1186/s12864-022-08495-8 (2022).
- 26 Example 5, above
- 27 Wang, L. L. *et al.* Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing in vivo. *Cell* **184**, 5465-5481 e5416, doi:10.1016/j.cell.2021.09.005 (2021).
- 28 Bayraktar, O. A. *et al.* Astrocyte layers in the mammalian cerebral cortex revealed by a single-cell in situ transcriptomic map. *Nat Neurosci* **23**, 500-509, doi:10.1038/s41593-020-0602-1 (2020).
- 29 Lanjakornsiripan, D. *et al.* Layer-specific morphological and molecular differences in neocortical astrocytes and their dependence on neuronal layers. *Nat Commun* **9**, 1623, doi:10.1038/s41467-018-03940-3 (2018).
- 30 Matias, I., Morgado, J. & Gomes, F. C. A. Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci* **11**, 59, doi:10.3389/fnagi.2019.00059 (2019).
- 31 de Carvalho, M. & Swash, M. Lower motor neuron dysfunction in ALS. *Clin Neurophysiol* **127**, 2670-2681, doi:10.1016/j.clinph.2016.03.024 (2016).
- 32 Turner, M. R. *et al.* Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* **12**, 310-322, doi:10.1016/S1474-4422(13)70036-X (2013).
- 33 Pasinelli, P. & Brown, R. H. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* **7**, 710-723, doi:10.1038/nrn1971 (2006).
- 34 Rosen, D. R. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **364**, 362, doi:10.1038/364362c0 (1993).

[0420]

- 35 Gurney, M. E. *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-1775, doi:10.1126/science.8209258 (1994).
- 36 Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E. & Robberecht, W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 1068-1082, doi:10.1016/j.bbadis.2006.05.002 (2006).
- 37 Ozdinler, P. H. *et al.* Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci* **31**, 4166-4177, doi:10.1523/JNEUROSCI.4184-10.2011 (2011).
- 38 Qian, K. *et al.* Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports* **8**, 843-855, doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.003 (2017).
- 39 Ortiz, C. *et al.* Molecular atlas of the adult mouse brain. *Sci Adv* **6**, eabb3446, doi:10.1126/sciadv.abb3446 (2020).
- 40 Arlotta, P. *et al.* Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* **45**, 207-221, doi:10.1016/j.neuron.2004.12.036 (2005).
- 41 Silburt, J., Lipsman, N. & Aubert, I. Disrupting the blood-brain barrier with focused ultrasound: Perspectives on inflammation and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E6735-E6736, doi:10.1073/pnas.1710761114 (2017).
- 42 Hatzipetros, T. *et al.* A Quick Phenotypic Neurological Scoring System for Evaluating Disease Progression in the SOD1-G93A Mouse Model of ALS. *J Vis Exp*, doi:10.3791/53257 (2015).
- 43 Terrisse, L. *et al.* Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem* **71**, 1643-1650, doi:10.1046/j.1471-4159.1998.71041643.x (1998).
- 44 Muffat, J., Walker, D. W. & Benzer, S. Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in

[0421]

- Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7088-7093, doi:10.1073/pnas.0800896105 (2008).
- 45 McCarthy, R. C. *et al.* Inflammation-induced iron transport and metabolism by brain microglia. *J Biol Chem* **293**, 7853-7863, doi:10.1074/jbc.RA118.001949 (2018).
 - 46 Trichas, G., Begbie, J. & Srinivas, S. Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC Biol* **6**, 40, doi:10.1186/1741-7007-6-40 (2008).
 - 47 Clarke, L. E. *et al.* Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E1896-E1905, doi:10.1073/pnas.1800165115 (2018).
 - 48 DePaula-Silva, A. B. *et al.* Differential transcriptional profiles identify microglial- and macrophage-specific gene markers expressed during virus-induced neuroinflammation. *J Neuroinflammation* **16**, 152, doi:10.1186/s12974-019-1545-x (2019).
 - 49 Kiiäläinen, A., Hovanes, K., Paloneva, J., Kopra, O. & Peltonen, L. Dap12 and Trem2, molecules involved in innate immunity and neurodegeneration, are co-expressed in the CNS. *Neurobiol Dis* **18**, 314-322, doi:10.1016/j.nbd.2004.09.007 (2005).
 - 50 Bayly-Jones, C., Pang, S. S., Spicer, B. A., Whisstock, J. C. & Dunstone, M. A. Ancient but Not Forgotten: New Insights Into MPEG1, a Macrophage Perforin-Like Immune Effector. *Front Immunol* **11**, 581906, doi:10.3389/fimmu.2020.581906 (2020).
 - 51 Turner, M. J. *et al.* Reduction of inflammation and preservation of neurological function by anti-CD52 therapy in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **285**, 4-12, doi:10.1016/j.jneuroim.2015.05.018 (2015).
 - 52 Scharz, N. D. & Tenner, A. J. The good, the bad, and the opportunities of the complement system in neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* **17**, 354, doi:10.1186/s12974-020-02024-8 (2020).
 - 53 Kagitani-Shimono, K. *et al.* Lipocalin-type prostaglandin D synthase (beta-trace) is upregulated in the alphaB-crystallin-positive oligodendrocytes and astrocytes in the

[0422]

chronic multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* **32**, 64-73, doi:10.1111/j.1365-2990.2005.00690.x (2006).

- 54 Miyazaki, M. *et al.* Id2 and Id3 maintain the regulatory T cell pool to suppress inflammatory disease. *Nat Immunol* **15**, 767-776, doi:10.1038/ni.2928 (2014).
- 55 Tzeng, S. F. Inhibitors of DNA binding in neural cell proliferation and differentiation. *Neurochem Res* **28**, 45-52, doi:10.1023/a:1021691911011 (2003).
- 56 Hanna J, D. L., Fleming T, Sreaton RA, Schuurmans C. . Beyond genetics: the role of metabolism in photoreceptor survival, development and repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. **in press** (2022).
- 57 Cargill, K. R., Hasken, W. L., Gay, C. M. & Byers, L. A. Alternative Energy: Breaking Down the Diverse Metabolic Features of Lung Cancers. *Front Oncol* **11**, 757323, doi:10.3389/fonc.2021.757323 (2021).
- 58 Wilczynska, K. M. *et al.* Nuclear factor I isoforms regulate gene expression during the differentiation of human neural progenitors to astrocytes. *Stem Cells* **27**, 1173-1181, doi:10.1002/stem.35 (2009).
- 59 Dennis, D. J. *et al.* Neurog2 and Ascl1 together regulate a postmitotic derepression circuit to govern laminar fate specification in the murine neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E4934-E4943, doi:10.1073/pnas.1701495114 (2017).
- 60 Hoch-Kraft, P., Trotter, J. & Gonsior, C. Missing in Action: Dysfunctional RNA Metabolism in Oligodendroglial Cells as a Contributor to Neurodegenerative Diseases? *Neurochem Res* **45**, 566-579, doi:10.1007/s11064-019-02763-y (2020).
- 61 Ni, J. *et al.* Increased expression and altered subcellular distribution of cathepsin B in microglia induce cognitive impairment through oxidative stress and inflammatory response in mice. *Aging Cell* **18**, e12856, doi:10.1111/acer.12856 (2019).
- 62 Penisson, M., Ladewig, J., Belvindrah, R. & Francis, F. Genes and Mechanisms Involved in the Generation and Amplification of Basal Radial Glial Cells. *Front Cell Neurosci* **13**, 381, doi:10.3389/fncel.2019.00381 (2019).

[0423]

- 63 Okado, H. Regulation of brain development and brain function by the transcriptional repressor RP58. *Brain Res* **1705**, 15-23, doi:10.1016/j.brainres.2018.02.042 (2019).
- 64 Srinivasan, K. *et al.* A network of genetic repression and derepression specifies projection fates in the developing neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 19071-19078, doi:10.1073/pnas.1216793109 (2012).
- 65 Manuel, M. N., Mi, D., Mason, J. O. & Price, D. J. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci* **9**, 70, doi:10.3389/fncel.2015.00070 (2015).
- 66 Mogensen, T. H. IRF and STAT Transcription Factors - From Basic Biology to Roles in Infection, Protective Immunity, and Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol* **9**, 3047, doi:10.3389/fimmu.2018.03047 (2018).
- 67 Zhang, Z. J., Jiang, B. C. & Gao, Y. J. Chemokines in neuron-glia cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **74**, 3275-3291, doi:10.1007/s00018-017-2513-1 (2017).
- 68 Marques, R. E., Guabiraba, R., Russo, R. C. & Teixeira, M. M. Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opin Ther Targets* **17**, 1439-1460, doi:10.1517/14728222.2013.837886 (2013).
- 69 Zhang, Y. J., Song, J. R. & Zhao, M. J. NR4A1 regulates cerebral ischemia-induced brain injury by regulating neuroinflammation through interaction with NF-kappaB/p65. *Biochemical and biophysical research communications* **518**, 59-65, doi:10.1016/j.bbrc.2019.08.008 (2019).
- 70 Yu, Q. *et al.* Early activation of Egr-1 promotes neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **302**, 145-154, doi:10.1016/j.expneurol.2018.01.009 (2018).
- 71 Paskevicius, T. *et al.* The Fabp5/calnexin complex is a prerequisite for sensitization of mice to experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB journal : official*

[0424]

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **34**, 16662-16675, doi:10.1096/fj.202001539RR (2020).

- 72 Tang, X. *et al.* Novel transcriptional regulation of VEGF in inflammatory processes. *J Cell Mol Med* **17**, 386-397, doi:10.1111/jcmm.12020 (2013).
- 73 Wang, S. M. *et al.* Astrocytic CCAAT/Enhancer-binding protein delta contributes to reactive oxygen species formation in neuroinflammation. *Redox Biol* **16**, 104-112, doi:10.1016/j.redox.2018.02.011 (2018).
- 74 Tutukova, S., Tarabykin, V. & Hernandez-Miranda, L. R. The Role of Neurod Genes in Brain Development, Function, and Disease. *Front Mol Neurosci* **14**, 662774, doi:10.3389/fnmol.2021.662774 (2021).
- 75 Kinare, V. *et al.* An evolutionarily conserved Lhx2-Ldb1 interaction regulates the acquisition of hippocampal cell fate and regional identity. *Development* **147**, doi:10.1242/dev.187856 (2020).
- 76 Ohtsuka, T. & Kageyama, R. Regulation of temporal properties of neural stem cells and transition timing of neurogenesis and gliogenesis during mammalian neocortical development. *Semin Cell Dev Biol* **95**, 4-11, doi:10.1016/j.semcdb.2019.01.007 (2019).
- 77 Weiss, L. A. & Nieto, M. The crux of Cux genes in neuronal function and plasticity. *Brain Res* **1705**, 32-42, doi:10.1016/j.brainres.2018.02.044 (2019).
- 78 Buxbaum, J. D. *et al.* Molecular dissection of NRG1-ERBB4 signaling implicates PTPRZ1 as a potential schizophrenia susceptibility gene. *Mol Psychiatry* **13**, 162-172, doi:10.1038/sj.mp.4001991 (2008).
- 79 Suriano, C. M. *et al.* Adeno-associated virus (AAV) reduces cortical dendritic complexity in a TLR9-dependent manner. *bioRxiv*, 2021.2009.2028.462148, doi:10.1101/2021.09.28.462148 (2021).
- 80 Johnston, S. *et al.* AAV ablates neurogenesis in the adult murine hippocampus. *Elife* **10**, doi:10.7554/eLife.59291 (2021).

[0425]

- 81 Heng, J. I., Viti, L., Pugh, K., Marshall, O. J. & Agostino, M. Understanding the impact of ZBTB18 missense variation on transcription factor function in neurodevelopment and disease. *J Neurochem* **161**, 219-235, doi:10.1111/jnc.15572 (2022).
- 82 Nie, F. *et al.* Schizophrenia risk candidate EGR3 is a novel transcriptional regulator of RELN and regulates neurite outgrowth via the Reelin signal pathway in vitro. *J Neurochem* **157**, 1745-1758, doi:10.1111/jnc.15225 (2021).
- 83 Chang, S. Y. *et al.* Hippocampal changes in mice lacking an active prohormone convertase 2. *Hippocampus* **30**, 715-723, doi:10.1002/hipo.23195 (2020).
- 84 Hamilton, K. A. *et al.* Mice lacking the transcriptional regulator Bhlhe40 have enhanced neuronal excitability and impaired synaptic plasticity in the hippocampus. *PLoS One* **13**, e0196223, doi:10.1371/journal.pone.0196223 (2018).
- 85 Serrano-Saiz, E., Leyva-Diaz, E., De La Cruz, E. & Hobert, O. BRN3-type POU Homeobox Genes Maintain the Identity of Mature Postmitotic Neurons in Nematodes and Mice. *Curr Biol* **28**, 2813-2823 e2812, doi:10.1016/j.cub.2018.06.045 (2018).
- 86 Li, H. & Richardson, W. D. Evolution of the CNS myelin gene regulatory program. *Brain Res* **1641**, 111-121, doi:10.1016/j.brainres.2015.10.013 (2016).
- 87 Choy, F. C., Klaric, T. S., Leong, W. K., Koblar, S. A. & Lewis, M. D. Reduction of the neuroprotective transcription factor Npas4 results in increased neuronal necrosis, inflammation and brain lesion size following ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **36**, 1449-1463, doi:10.1177/0271678X15606146 (2016).
- 88 Krieger, T. G. *et al.* Mutations in thyroid hormone receptor alpha1 cause premature neurogenesis and progenitor cell depletion in human cortical development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 22754-22763, doi:10.1073/pnas.1908762116 (2019).
- 89 Tischmeyer, W. & Grimm, R. Activation of immediate early genes and memory formation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **55**, 564-574, doi:10.1007/s000180050315 (1999).

[0426]

- 90 Chen, F. *et al.* Clusterin secreted from astrocyte promotes excitatory synaptic transmission and ameliorates Alzheimer's disease neuropathology. *Mol Neurodegener* **16**, 5, doi:10.1186/s13024-021-00426-7 (2021).
- 91 Remesal, L. *et al.* PBX1 acts as terminal selector for olfactory bulb dopaminergic neurons. *Development* **147**, doi:10.1242/dev.186841 (2020).
- 92 Sainio, M. T. *et al.* Absence of NEFL in patient-specific neurons in early-onset Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neurol Genet* **4**, e244, doi:10.1212/NXG.0000000000000244 (2018).
- 93 Minj, E., Yadav, R. K. & Mehan, S. Targeting Abnormal Nrf2/HO-1 Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Current Insights on Drug Targets and Influences on Neurological Disorders. *Curr Mol Med* **21**, 630-644, doi:10.2174/1566524021666210111104920 (2021).
- 94 Nandi, S. *et al.* Receptor-type protein-tyrosine phosphatase zeta is a functional receptor for interleukin-34. *J Biol Chem* **288**, 21972-21986, doi:10.1074/jbc.M112.442731 (2013).
- 95 Munoz-Garcia, J. *et al.* The twin cytokines interleukin-34 and CSF-1: masterful conductors of macrophage homeostasis. *Theranostics* **11**, 1568-1593, doi:10.7150/thno.50683 (2021).
- 96 Pollen, A. A. *et al.* Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nat Biotechnol* **32**, 1053-1058, doi:10.1038/nbt.2967 (2014).
- 97 Han, S. *et al.* Proneural genes define ground-state rules to regulate neurogenic patterning and cortical folding. *Neuron* **109**, 2847-2863 e2811, doi:10.1016/j.neuron.2021.07.007 (2021).
- 98 Moreau, M. X., Saillour, Y., Cwetsch, A. W., Pierani, A. & Causeret, F. Single-cell transcriptomics of the early developing mouse cerebral cortex disentangle the

[0427]

- spatial and temporal components of neuronal fate acquisition. *Development* **148**, doi:10.1242/dev.197962 (2021).
- 99 Clement, O. *et al.* Rp58 and p27(kip1) coordinate cell cycle exit and neuronal migration within the embryonic mouse cerebral cortex. *Neural Dev* **12**, 8, doi:10.1186/s13064-017-0084-3 (2017).
- 100 Luo, W. *et al.* Recurrent rewiring of the adult hippocampal mossy fiber system by a single transcriptional regulator, Id2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**, doi:10.1073/pnas.2108239118 (2021).
- 101 Le Dreau, G. *et al.* E proteins sharpen neurogenesis by modulating proneural bHLH transcription factors' activity in an E-box-dependent manner. *Elife* **7**, doi:10.7554/eLife.37267 (2018).
- 102 Gene therapy at the crossroads. *Nat Biotechnol* **40**, 621, doi:10.1038/s41587-022-01346-7 (2022).
- 103 Ferla, R. *et al.* Low incidence of hepatocellular carcinoma in mice and cats treated with systemic adeno-associated viral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* **20**, 247-257, doi:10.1016/j.omtm.2020.11.015 (2021).
- 104 Irie, T. *et al.* Direct neuronal conversion of microglia/macrophages reinstates neurological function after stroke. *bioRxiv*, 2021.2009.2026.461831, doi:10.1101/2021.09.26.461831 (2021).
- 105 Matsuda, T. *et al.* Pioneer Factor NeuroD1 Rearranges Transcriptional and Epigenetic Profiles to Execute Microglia-Neuron Conversion. *Neuron* **101**, 472-485 e477, doi:10.1016/j.neuron.2018.12.010 (2019).
- 106 Matsuda, T. & Nakashima, K. Clarifying the ability of NeuroD1 to convert mouse microglia into neurons. *Neuron* **109**, 3912-3913, doi:10.1016/j.neuron.2021.11.012 (2021).

[0428]

- 107 Sun, Y. *et al.* Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**, 365-376, doi:10.1016/s0092-8674(01)00224-0 (2001).
- 108 Livingston, J. *et al.* Direct reprogramming of astrocytes to neurons leads to functional recovery after stroke. *bioRxiv*, 2020.2002.2002.929091, doi:10.1101/2020.02.02.929091 (2020).
- 109 Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* **36**, 411-420, doi:10.1038/nbt.4096 (2018).
- 110 Ulgen, E., Ozisik, O. & Sezerman, O. U. pathfindR: An R Package for Comprehensive Identification of Enriched Pathways in Omics Data Through Active Subnetworks. *Front Genet* **10**, 858, doi:10.3389/fgene.2019.00858 (2019).
- 111 Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res* **44**, W90-97, doi:10.1093/nar/gkw377 (2016).
- 112 Okawa, S., Angarica, V., Lemischka, I. *et al.* A differential network analysis approach for lineage specifier prediction in stem cell subpopulations. *npj Syst Biol Appl* **1**, 15012 (2015).

[0429]

실시예 7: 신경 계통 전환 표적화 운동 피질 성상교세포는 ALS 마우스 모델에서 운동 증상 진행을 지연시킨다.

[0430]

[0431]

근위축성 측색 경화증(ALS)은 운동 피질의 심층에 있는 상부 운동 뉴런뿐만 아니라 이들의 신경 분포 표적, 뇌 줄기 및 척수의 하부 운동 뉴런의 사멸과 연관된다. 척수 운동 뉴런은 골격근, 내장근, 심장 근육에 신경을 분포시키며, 이들의 손실은 근육 탈신경 및 위축으로 이어지는데, 이는 궁극적으로 호흡근 부전으로 인한 사망을 초래한다¹. 다잉 백(dying back) 가설은 ALS 병리가 척수의 하부 운동 뉴런에서 시작되어 운동 피질의 심층에 있는 상부 운동 뉴런의 점진적인 신경변성을 초래한다는 것을 시사한다^{2,3}. 보다 최근에는 대신에 글루타메이트 흥분 독성이 운동 피질에서 시작하여 척수로 확산되어 하부 운동 신경 세포 사멸을 유발한다는 것을 시사하는 모델이 다잉 포워드 모델이 제안되었다⁴⁻⁶. 실제로, ALS 환자의 경두개 자기 자극(TMS)은 임상 운동 증상 이전에 피질의 과흥분성이 발생한다는 것을 나타낸다⁷. 유사하게, hSOD1^{G93A} 트랜스제닉 동물에서는, 운동 증상이 발병하기 전에 운동 피질에서 수지상 퇴화, 척추 손실 및 과흥분성이 관찰된다⁸. 특히 UMN 사망으로 인해 질환 진행이 시작될 수 있다. 실제로, 증상 발병 전에 SOD1^{G93A} 래트의 운동 피질에서 돌연변이체 SOD1의 Nick은 질환 진행을 지연시키고 생존을 증가시키며 LMN 및 신경근 접합부 변성을 지연시킨다⁹. hSOD1^{G93A} 트랜스제닉체에서 신경피질 뉴런의 AAV-매개 역행 표지는 또한 상부 MN 변성 및 P60에서 층 II/III 정점 수상돌기의 손실을 나타내었다¹⁰. 마지막으로, hSOD1^{G93A} 마우스의 기저 전뇌에서 콜린성 뉴런의 손실에 대한 증거도 존재하지만, 이것이 상위 MN 변성 전후에 발생하는지의 여부는 명확하지 않다¹¹.

[0432]

또한, 다잉 포워드 모델은 운동 피질의 병리학이 척수 질환에 선행할 뿐만 아니라 질환을 진전시킬 수도 있다고 제안하였다. 이 모델의 결과로서, 상부 운동 뉴런의 사멸을 방지함으로써 질환 진행이 지연될 수 있다고 제안되었다. 이 발견과 일치하게, 증상 발병 전에 hSOD1^{G93A} 래트의 운동 피질에서 돌연변이체 SOD1의 Nick은 질환 진행을 지연시키고, 생존율을 높이며, 하부 운동 뉴런 및 신경근 접합부 변성을 지연시킨다⁹. 또한 SOD1^{G93A} 래트의 운동 피질에 이식된 NPC는 신경아교세포-유래 신경영양 인자(GDNF)를 분비하는 성상교세포로 분화하여 UMN

및 LMN 사멸을 지연시킨다¹². 마지막으로, hSOD1^{G93A} 마우스에서 저활성인 피질 Pvalb⁺ GABA성 뉴런의 화학유전적 자극은 운동 뉴런의 흥분독성 사멸을 감소시키고 운동 기능을 보존한다¹³.

[0433] ALS의 신경변성은 성상교세포의 병원성 변화의 비세포 자율적 결과라는 생각에 대한 지지가 커지고 있다^{14,15}. 정상적인 항상성 상태에서 성상교세포는 신경 건강을 유지하기 위해 영양분 및 신경보호 분자를 제공한다¹⁶. 그러나, 병리학적 전염증성 상태에서 성상교세포는 반응성 변형을 겪고 신경변성을 유발하는 신경독성 분자를 생성하기 시작한다¹⁷. 신경염증은 초기에 A1 성상교세포를 활성화시키는 사이토카인을 분비하는 전염증성 미세아교세포에 의해 유발된다^{14,15,18}. 반대로, A2 성상교세포는 항염증성 사이토카인에 의해 활성화되고 이에 반응하여 신경 영양 인자를 분비하여 신경 생존을 지원한다^{17,19}. 흥미롭게도, ALS 환자로부터 유래된 인간 유도 다능성 줄기세포(human induced pluripotent stem cell: hiPSC)는 전염증성 단서가 없는 경우에도 자발적으로 반응하고 보체 성분 3(C3) 유전자 발현을 유도하는 성상교세포로 분화한다²⁰. 마지막으로 성상교세포는 건강한 숙주 뇌에 이식되는 경우 ALS 동물 모델에서 신경 세포 사멸을 유도하는데¹⁶, 이는 치료 개입을 위한 이들 세포의 중요성을 강조한다.

[0434] ALS 성상교세포와 관련된 독성을 예방하고 손실된 상부 운동 뉴런을 잠재적으로 대체하기 위해서, 본 실시예에서는 전신경 전사 인자(TF) Ascl1을 사용하여 운동 피질 성상교세포를 유도된 뉴런(iNeuron)으로 재프로그래밍하는 신경 계통 전환 접근법을 취했다²¹. 구체적으로, 프롤린(SP 부위)에 인접한 6개의 세린이 알라닌으로 전환되어 Ascl1^{SA6}을 생성하는 Ascl1의 돌연변이 버전을 사용하였는데 이는 환경에서 저해성 제어의 영향을 덜 받는다. 성상교세포를 iNeuron으로 전환하면 성상교세포 독성 및 피질 과흥분성을 줄이고/거나 손실된 뉴런을 대체하여 신경 복구를 촉진할 수 있다. 여기에는 hSOD1^{G93A} 마우스의 운동 피질에서 Ascl1^{SA6} 유도된 뉴런 전환이 수명 및 운동 기능에 유익한 영향을 미치는 것으로 나타났다.

[0435] 물질 및 방법

[0436] 동물 모델. 모든 실험에서는 연령 및 성별이 일치하는 마우스를 사용하였다. 동형접합성 zsGreen 마우스는 zsGreen (Jackson laboratory: B6.Cg- *Gt(ROSA)26Sor*^{tm6(CAG-ZsGreen1)Hze}/J) 수컷과 암컷을 번식시켜 생성하였다. hSOD1^{G93A} (Jackson laboratory: B6.Cg-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J) 수컷과 암컷 새끼 마우스를 C57B1/6J 유전적 배경에서 유지시켰다. 모델을 실시예 6에서 기술한 바와 같이 사육하고 검증하였다.

[0437] AAV 두개내 주입. AAV5-GFAP-iCre 플라스미드는 Faiz 박사 연구실에서 선물로 받았다. AAV5-GFAP-iCre 및 AAV5-GFAP-Ascl1/SA6-t2a-iCre는 VectorBuilder Inc에 의해서 패키징하였다. AAV5-CAG-Flex-EGFP(카탈로그 번호 51502-AAV5)는 Addgene에서 구입하였다. 아이소플루란(2%, 1L/분; Fresenius Kabi, CP0406V2)을 사용하여 마우스를 마취시키고, 베이트릴(2.5mg/kg; Bayer, 02249243) 및 식염수(0.5 ml, Braun, L8001)와 함께 진통제인 부프레노르핀(0.1mg/kg; Vetergesic, 02342510) 또는 트라마돌-HCL(20mg/kg; Chiron, RxN704598)을 피하 주사하였다. 피질 위의 두개골을 통해 천공 구멍을 뚫고 V층 영역(AP: +2.15, L/M: ±1.7, DV: -1.7)에 주입하기 위해서 정위 장비를 사용하여 브레그마 및 람다를 식별하였다. 특정 성상교세포 및 전환된 뉴런 집단을 표지하기 위해서 Cre 드라이버 AAV와 Cre 종속 AAV를 조합하였다. 1μL 총 부피로 4.8×10⁹ GC의 AAV5-GFAP-iCre 및 AAV5-CAG-Flex-EGFP 또는 AAV5-GFAP-Ascl1/SA6-t2a-iCre와 AAV5-CAG-Flex-EGFP를 16주령의 hSOD1^{G93A} 트랜스제닉 ALS 마우스에 주입하였다. 21dpi 이후에 마우스를 희생시켰다.

[0438] AAV5-GFAP-iCre 및 AAV5-GFAP-Ascl1/SA6-t2a-iCre 바이러스 벡터를 30게이지 바늘이 있는 5μL 해밀턴 주사기를 사용하여 1μL의 부피로 10분에 걸쳐서 운동 피질층 V 영역(AP: +2.15, L/M: ±1.7, DV: -1.7)에 양측으로 주입하였다. 수술은 16주령 C57B1/6J 마우스에서 수행하였고, 뉴런 전환율을 계산하기 위해서 21dpi 후에 희생시켰다. 대조군을 위해 16주령 zsGreen 마우스 및 16주령 zsGreen/hSOD1^{G93A} 트랜스제닉 ALS 마우스에 동일한 주사 프로토콜을 수행하였다. 또한, 19주령 zsGreen/hSOD1^{G93A} 형질전환 ALS 마우스를 시험하였다. 이들 모든 마우스에서 실험 종점까지 체중, NS, 운동 행동 검사(로타로드, 악력 및 보행 분석 또는 catwalk)를 확인하여 질환 진행을 모니터링하였다. 마우스를 양쪽으로 눕힌 후 30초 이내에 스스로 똑바로 설 수 없을 때 희생시켰다.

- [0439] 조직 수집, 처리 및 절편화. 관류 전에 마우스를 케타민(75mg/kg, Narketan, 0237499) 및 자일라진(10mg/kg, Rompun, 02169592)으로 마취시켰다. 얼음 냉각된 식염수(0.9% NaCl, Braun, L8001), 그 다음 인산염 완충 식염수(PBS, Wisent, 311-011-CL) 중의 4% 파라폼알데하이드(PFA, Electron Microscopy Sciences, 19208)를 10ml/분의 유량으로 연동 펌프를 대략 5분 동안 사용하여 대략 20배의 혈액 부피로 심장내 관류를 수행하였다. 뇌를 수집하고 PBS 중의 4% PFA에 밤새 후-고정시킨 후 동결 보호를 위해 20% 수크로스로 옮겼다. Fisherbrand™ Superfrost™ Plus Microscope Slides(Thermo Fisher Scientific, 12-550-15)에 수집함으로써 뇌를 Leica CM3050 크리오스타트(Leica Microsystems Canada Inc., 캐나다 온타리오주 리치몬드 힐 소재)의 내부에서 -26℃에서 동결시키고 30μm에서 관상 방향으로 절단하였다.
- [0440] 체중 및 신경점수(NS). 두개내 주입 전에 체중을 측정하였고 종점까지 매주 체중을 계속 측정하였다. SOD1에 대한 NS(0 내지 4)는 a) 꼬리로 매달려 있는 것, b) 걷기, c) 마우스를 옆으로 눕혔을 때 마우스가 스스로 똑바로 서는 데 걸리는 시간을 조사하는 4가지 조건에서 마우스를 관찰하여 매주 배정하였다. NS 0은 증상이 나타나기 전 단계였다. NS 1은 ALS 표현형을 시작하였다. 증상 단계는 마우스가 정상적으로 걸을 수 있지만 뒷다리가 중심선을 향해 벌어지거나 부분적으로 벌어지는 경우였다. NS 2는 마비의 시작이었다. 동물은 걸을 수 있지만 걷는 동안 발가락이 아래쪽으로 말려 있다. NS 3에서는 마우스는 걸을 수 있지만 앞으로 움직이기 위해 뒷다리를 사용하지 않았다. NS 4는 동물이 10초 내에 스스로 똑바로 설 수 없는 인도적 종점이었다.
- [0441] 운동 조정력 분석 로타로드 장치에서 운동 조정력, 근력 및 균형을 평가하였다. 데이터를 기록하기 일주일 전에 마우스를 로타로드에서 훈련시켰다. 마우스를 실린더 위에 놓고 2rpm으로 회전을 시작하였다. 180초 이내에 회전 속도를 1분에 걸쳐 최대 18rpm까지 증가시켰고, 운동 뉴런 증상이 발생하면 동물은 약해지고 감지 플랫폼으로 떨어진다. 낙하 시간은 자기 스위치에 의해 감지되고 실험이 끝나면 디스플레이에 표시된다. 로타로드를 매주 평균 3회 실행하여 평가하고 군 성과를 비교하였다.
- [0442] 악력. 신경근 기능을 연구하기 위해 악력 측정기(Bioseb™)를 사용하였다. 100×80mm 초과와 20° 각도의 격자 홀더에서 마우스의 꼬리를 잡았다. 마우스가 격자를 단단히 잡으면 이들이 격자를 놓칠 때까지 힘 센서의 축을 따라 이들을 잡아당겼다. 악력 시험은 라운드 사이에 홈 케이지에서 5분 동안 한 번의 시험에서 3라운드로 수행하였다. 모든 악력 시험을 체중에 대해 정규화하였다.
- [0443] 보행 분석: 길이 50cm, 폭 10cm의 길을 따라 걸을 때 마우스의 발자국 패턴을 분석하여 보행 이상을 평가하였다. 앞다리를 적색 염료로 칠했고 뒷다리를 청색 염료로 칠하였다. 세 가지 걸음 매개변수에 대해 발자국 패턴을 분석하였다: 1) 보폭, 각각의 걸음 사이의 전진 이동의 평균 거리를 측정하기 위해; 2) 흔들림 거리, 좌우 뒷발자국 사이의 평균 거리를 측정하기 위해; 3) 왼쪽 또는 오른쪽 앞발자국에서 오른쪽 또는 왼쪽 뒷발자국까지의 평균 거리를 측정하기 위한, 자세 길이.
- [0444] CatWalk XT®. 현재 연구에서는 보행 평가를 위해 CatWalk® (Noldus Information Technology, 네덜란드 바게닝겐 소재) 버전 11을 사용하였다. 보행 매개변수를 캡처하는 데 사용되는 CatWalk® 보행 분석 시스템은 조명이 비춰지는 발자국을 사용한다. 마우스의 발을 색칠하는 것과 달리, ALS 마우스는 유리 바닥 통로의 시작 부분에 놓이고 자발적으로 홈 케이지를 향해 자유롭게 걸어간다. 대부분의 경우 최대 6번의 실행을 수행하였고 최대 속도 변화가 60%인 3번의 실행을 분석을 위해 선택하였다. 동일한 왼쪽 및 오른쪽 발의 연속 배치 사이의 거리를 분석하여 마우스가 시험을 계속할 수 없을 때까지 매주 보행 매개변수를 캡처한다.
- [0445] 결과
- [0446] AAV 신경 재프로그래밍 벡터의 생체내 전달은 ALS 마우스의 운동 기능을 보존한다.
- [0447] 성상교세포의 뉴런으로의 재프로그래밍은 시험관내에서 Ascl1과 같은 신경 TF에 의해 쉽게 유도되지만 생체내 뉴런 전환은 여전히 비효율적이다. 본 발명자들은 이전에 네이티브 Ascl1에 비해 뉴런 전환을 유도하는 데 더 효율적인 돌연변이체 Ascl1^{SA6}을 사용하여 운동 피질 성상교세포에서 신경 마커 발현을 유도하는 Ascl1의 능력을 증가시킬 수 있음을 나타내었다. 신경아교 섬유산 프로모터(GFAP)를 운반하는 아데노-연관 바이러스(AAV) 5를 사용하여 운동 뉴런 성상교세포에서 Ascl1^{SA6}을 발현시켰다. Rosa-zsGreen 리포터를 사용하여 형질도입Ascl1^{SA6}을 발현된 세포를 검출할 수 있도록 A (v2a)-iCre 카세트를 포함시켰다. 본 연구에서는 iCre만 발현하는 대조군 AAV(AAV5-GFAP-iCre, 이하 iCre) 및 Ascl1^{SA6}을 발현하는 시험 벡터(AAV5-GFAP-Ascl1^{SA6}-t2a-iCre, 이하 Ascl1^{SA6})의 2개의 작제물을 사용하였다. 2개의 AAV를 각각 다음의 4개의 마우스 코호트에서 운동 피질(AP:

+2.15, L/M: ± 1.7 , DV: -1.7)에 주입하였다: 수컷 및 암컷 Rosa-zsGreen(대조군) 및 수컷 및 암컷 hSOD1^{G93A};Rosa-zsGreen(ALS 모델) 마우스.

[0448] ALS는 소모성 질환이므로, 운동 피질 성상교세포에서 신경원성 TF인 Asc11^{SA6} 발현의 영향을 평가하기 위해 체중 및 운동 행동의 주간 측정치를 사용하였다. 기준선 측정은 4개의 동물 코호트에서 각각의 시험에 대해 16주령에 AAV를 주사하기 1주 전인 15주령에 수행하였고, 28주를 실험 종점으로 설정하였다. 대조군 수컷 및 암컷 동물은 실험 기간 내내 점진적으로 체중이 증가하였다(도 49). 대조적으로, 대부분의 hSod1^{G93A} 수컷 및 암컷 마우스는 20주령부터 체중 감량이 시작되었으며, 이러한 경향은 동물이 인도적 종점에 도달하여 희생되는 약 24주 시점까지 계속되었다(도 1). 놀랍게도 Asc11^{SA6} 주사 후 hSod1^{G93A} 마우스는 대조군에 비해 시간이 지남에 따라 체중을 더 잘 유지할 수 있었다. 실제로, iCre와 Asc11^{SA6}이 주입된 수컷의 비교는 더 양호한 체중 유지를 나타낸 제19주 및 제22주에 유의미한 차이를 나타내었다(각각 이원 분산분석, 각각 $p = 0.0470$ 및 $p = 0.0370$). 그러나, 암컷에서는 체중이 개선되지 않았는데, 이는 현장에서 잘 이해되지 않는 치료 반응의 차이이다(도 49). 마지막으로, 야생형 Rosa-zsGreen 마우스 코호트에서 Asc11^{SA6}이 주입된 동물은 또한 각각의 주 측정 시에 대조군 마우스보다 더 큰 체중을 나타내었다(도 49). 그러나 시작점에서 iCre 마우스의 기준선 측정값도 더 낮았으며 체중 변화율은 크게 다르지 않았다.

[0449] 종합하면, 이 데이터는 동물 건강에 긍정적인 영향을 미치는 Asc11^{SA6} 유도된 뉴런 전환의 능력을 뒷받침한다.

[0450] 동물이 더 이상 스스로 똑바로 일어설 수 없어서 인도적으로 희생되었을 때 NS 0(무증상)부터 NS 4까지의 값을 배정하는 신경점수(NS) 척도를 사용하여 전체 운동 기능의 변화에 대해 동물을 모니터링하였다(도 50). 꼬리로 매달려 있는 마우스, 걷기를 관찰하고, 마우스를 옆으로 눌렀을 때 마우스가 스스로 똑바로 서는 데 걸리는 시간을 조사함으로써 NS를 평가하였다. hSOD1^{G93A} 마우스와 대조적으로, 모든 야생형 수컷 및 암컷 마우스는 연구 전반에 걸쳐 NS 0에서 유지되었는데, 이들 대부분은 28주의 실험 종점 이전에 NS 4에 도달하였다. NS 점수에 기초하여, 수컷 hSOD1^{G93A} 마우스는 암컷보다 더 오랫동안 운동 기능을 유지했는데, 그 이유는 전형적으로 NS 1에서 37일 동안 유지된 반면 암컷 hSOD1^{G93A} 마우스는 NS 1에서 28일 동안 머물렀기 때문이었다. 그러나, 일단 증상 발병이 관찰되면 암수 모두 빠르게 악화되었으며, 수컷 및 암컷 마우스는 NS 2에서 단 5일, NS 3에서 5일 미만이 유지된 후 NS 4 및 인도적 희생으로 진행되었다²². 중요한 것은, Asc11^{SA6} 주입된 코호트 내에서 두 마리의 수컷 마우스가 생존하여 28주 실험 종점까지 NS 0에서 유지되었고(도 50A), 한 마리의 암컷 마우스는 26주까지 NS 1에 유지되었다는 것이었다(도 50B). 따라서 Asc11^{SA6}은 16주령에 운동 피질 성상교세포에서 발현될 때 수컷 hSOD1^{G93A} 마우스의 생존 시간을 개선시킨다.

[0451] 다음으로, Asc11^{SA6}-유도된 피질 성상교세포의 신경 재프로그래밍이 생존 시간을 향상시켰는지 여부에 대한 의문이 있었다. 놀랍게도, iCre 처리된 hSOD1^{G93A} 수컷 마우스 중 단지 10%만 실험 종점인 28주까지 생존한 반면, Asc11^{SA6}으로 처리된 40%는 28주까지 생존하였다(도 50C)(중간 생존은 iCre의 경우 24일, Asc11^{SA6}의 경우 26일, 로그 순위 검정, $p = 0.031$). 이에 반해서, Asc11^{SA6} 처리된 hSOD1^{G93A} 암컷 마우스 한 마리는 28주령까지 생존하였으며, 운동 능력이 향상되었지만 중간 생존율은 iCre(26주)와 Asc11^{SA6}(25주) 처리된 hSOD1^{G93A} 암컷 마우스에서 유사하였다(로그 순위 검정, $p = 0.465$)(도 50D).

[0452] 그런 다음 로타로드 시험을 사용하여 운동 조정력, 균형 및 운동 학습을 측정하였다. 기준선(15주) 및 주입 후 17주부터 28주(실험 종점)까지, 마우스를 18rpm에서 180초 동안 회전하는 실린더 위에 놓았다. 대조군 마우스가 180초 동안 실린더에 남아 있는 동안 hSOD1^{G93A} 마우스는 시간이 지남에 따라 운동 능력을 상실했으며 대조군 마우스에 비해 낙상 대기 시간이 시간 경과에 따라 감소하는 것으로 나타났다. Asc11^{SA6}이 주입된 hSOD1^{G93A} 수컷 마우스는 시간이 경과에 따라 대조군 마우스에 비해 로타로드에 머무르는 능력이 증가하였고 iCre 주입 마우스와 비교하여 19, 20, 21에 유의한 차이를 나타내었다(도 51A)(Šídák의 다중 비교 검정, $p =$ 각각 0.0471, $p = 0.0379$, $p = 0.0329$). 유사하게, Asc11^{SA6}으로 처리된 암컷 마우스도 대조군 iCre-처리된 동물보다 23주 및 25주

령에 더 오랫동안 로타로드에 머무를 수 있었다(도 51B)(Šidák의 다중 비교 검정, 각각 $p = 0.0359$ 및 $p < 0.0001$).

[0453] 약력은 체중에 대해 표준화된 와이어 홀더를 잡을 때 발휘되는 최대 피크 힘을 측정함으로써 신경근 기능을 평가한다. $Asc11^{SA6}$ 이 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 수컷 마우스는 대조군 마우스와 비교하여 시간 경과에 따라 약력의 증가를 나타내었지만 이러한 측정은 통계적 유의성에 도달하지 못했다(도 51C). 암컷 마우스는 또한 $iCre$ 와 $Asc11^{SA6}$ 주입 마우스 사이의 약력에 유의미한 차이를 나타내지 않았다(도 51D).

[0454] 운동 결손의 중요한 결과는 보행의 변화이며, 이는 마우스가 길이 50cm, 폭 10cm의 길을 따라 걸을 때 발자국 패턴을 분석하여 평가하였다. $Asc11^{SA6}$ 이 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 수컷 마우스는 $iCre$ 처리된 마우스에 비해 보폭이 더 길어지는 명확한 경향을 나타내었지만 통계적 유의성에는 도달하지 못했는데, 그 이유는 주로 대조군 동물이 더 일찍 사망하여 대조군 동물을 비교에 이용할 수 없었기 때문이다(도 52A). 반대로, $iCre$ 가 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 암컷 마우스는 제15주 및 제21주에 $Asc11^{SA6}$ 으로 처리된 동물에 비해 보폭이 증가하였다(도 52B)(Šidák의 다중 비교 검정, 각각 $p = 0.0319$ 및 $p = 0.0057$). 이러한 결과는 운동 피질에서 $Asc11^{SA6}$ 발현이 16주령의 $hSOD1^{G93A}$ 암컷 마우스에서 유해할 수 있음을 시사한다. 그러나, 야생형 수컷(도 52A) 또는 암컷(도 52B) 야생형 마우스에서는 유해한 효과가 관찰되지 않았으며, 이는 $iCre$ 또는 $Asc11^{SA6}$ 처리를 받았는지 여부에 관계없이 유사한 보폭을 나타내었다.

[0455] Catwalk는 자동화된 방식으로 더 많은 수의 보행 이상을 평가하는 데 사용될 수 있는 보행 분석 시스템이다. 분석이 진행 중이고, N 수는 여전히 낮지만, 첫 번째 분석 세트에서 대조군과 16주차에 $iCre$ 및 $Asc11^{SA6}$ 이 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 수컷 마우스는 오른쪽(도 53A) 및 왼쪽(도 53B) 뒷다리에서 보폭 거리에서 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 유사하게, 제16주에 $iCre$ 및 $Asc11^{SA6}$ 이 주입된 대조군 및 $hSOD1^{G93A}$ 암컷 마우스는 오른쪽(도 53C) 및 왼쪽(도 53D) 뒷다리 보폭 거리에서 유의미한 차이를 나타내지 않았다.

[0456] 제19주에 $iCre$ (대조군) 및 $Asc11^{SA6}$ 치료 후의 행동 검사

[0457] 첫 번째 일련의 운동 행동 평가에서, $iCre$ 및 $Asc11^{SA6}$ 을 증상 발병이 시작되는 16주령에 투여하였다. 치료 목적과 더 관련 있는 질문은 $Asc11^{SA6}$ 이 질환 경과 동안 후기 단계에서 전달될 때 운동 기능을 향상시킬 수 있는지 여부이다. 실제로 ALS 환자는 초기 증상 발병부터 공식적인 진단까지 평균 10 내지 16개월의 지연을 경험하는데²³, 이는 신경학적 증상이 명백하게 나타날 정도로 질환이 진행된 후에만 치료 개입이 가능하다는 것을 의미한다. 따라서 문제는 제19주에 $hSOD1^{G93A}$ 마우스에 $Asc11^{SA6}$ 을 투여하면 운동 증상의 진행을 개선하거나 예방할 수 있는지 여부이다. 기준선 평가는 $hSOD1^{G93A}$ 마우스에서 18주령에 수행되었으며 $iCre$ 및 $Asc11^{SA6}$ 을 운동 피질에 주입한 후 매주 체중 측정 및 행동 시험을 수행하였다.

[0458] 제16주 주사로 나타난 바와 같이, 제19주에 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 수컷(도 54A) 및 암컷(도 54B) 마우스는 질환 진행과 함께 시간 경과에 따라 체중이 지속적으로 감소하였다. $Asc11^{SA6}$ 처리된 수컷 마우스는 $iCre$ 대조군과 비교하여 시간 경과에 따라 체중이 증가하는 경향을 나타냈다(도 54A). 실제로 $Asc11^{SA6}$ 가 주입된 수컷 마우스는 제28주까지 60%의 생존 확률을 나타낸 반면 $iCre$ 를 주사한 수컷 마우스는 0%를 나타내었다. 그러나 $iCre$ 대조군 동물 수가 여전히 너무 낮기 때문에 통계 시험을 수행할 수 없었다($N=2$; 도 6A). 대조적으로, 암컷 $hSOD1^{G93A}$ 마우스에 $iCre$ 또는 $Asc11^{SA6}$ 을 주입하면 체중이 변하지 않았지만, $Asc11^{SA6}$ 주입된 암컷 마우스는 $iCre$ 주입된 암컷 마우스의 경우 0%인 것과 비교하여 제26주까지 35%의 생존 확률을 나타내었다(도 54B).

[0459] 19주 주입이 운동 기능에 미치는 영향을 평가하기 위해 신경점수 분석을 다시 적용하였다. $hSOD1^{G93A}$ 수컷 및 암컷 마우스에서, 운동 증상은 중증도가 점진적으로 증가하였는데, 이는 18주 기준선 측정부터 질환 또는 실험 종점까지 신경점수 증가와 상관관계가 있다(도 55). $Asc11^{SA6}$ 및 $iCre$ 처리 동물 모두에서 $hSOD1^{G93A}$ 수컷 마우스는

23주까지 NS1에서 유지되었고 암컷 마우스는 24주까지 NS1에서 유지되었다. $Asc11^{SA6}$ 처리된 한 마리의 수컷 마우스는 희생될 때까지 NS 0에서 유지되었고, 나머지는 NS 2에서 더 오래 유지되었다(도 55A). 또한, 한 마리의 암컷 $hSOD1^{G93A}$ 마우스는 26주까지 NS 2에서 유지되었다(도 55B). 이러한 결과는 $hSOD1^{G93A}$ 마우스의 신경 점수 진행에 대한 $Asc11^{SA6}$ 전달의 기능적 이점에 대한 일부 증거를 제공한다.

[0460] 제19주차에 전달되었을 때 $hSOD1^{G93A}$ 마우스의 생존에 대한 $iCre$ 및 $Asc11^{SA6}$ 의 영향도 평가하였다. $iCre$ 및 $Asc11^{SA6}$ 처리된 수컷 마우스의 수명에 대한 통계적 분석은 유의미한 차이를 나타내지 않았다(도 55C). 특히, $Asc11^{SA6}$ 처리된 수컷 마우스의 60%는 24주까지 생존했고, 추가적인 수컷 마우스는 28주에 희생될 때까지 증상 없이 생존하였는데, 이는 $hSOD1^{G93A}$ 마우스의 정상적인 생존 기간을 초과하였다(도 55C). 제19주에 $hSOD1^{G93A}$ 가 주입된 마우스의 암컷 코호트에서 $Asc11^{SA6}$ 이 주입한 한 마리의 동물은 27주까지 생존하였지만, 전체적으로 평균 생존 기간은 $iCre$ 의 경우 25주, $Asc11^{SA6}$ 의 경우 24주였으며 생존 시간에 통계적 차이는 나타나지 않았다(로그-순위 검정, $p = 0.3503$)(도 55C).

[0461] 다음으로 검사된 것은 운동 기능의 보다 민감한 척도로서 로타로드에 떨어지기까지의 지연이었다. $hSOD1^{G93A}$ 수컷 마우스에서 제19주에 $Asc11^{SA6}$ 처리는 $iCre$ 군에 비해 로타로드에서 더 긴 시간을 유지하는 경향을 나타내었다(도 56A). 대조적으로, 제19주에 $iCre$ 또는 $Asc11^{SA6}$ 으로 처리된 암컷 $hSOD1^{G93A}$ 마우스는 로타로드에서 매우 유사한 시간을 유지하였는데, 이는 두 군에서 운동 차이가 부족함을 시사한다(도 56B).

[0462] 또한 체중에 대해 표준화된 신경근 기능의 평가로서 악력을 측정하였다. 제19주에 $Asc11^{SA6}$ 가 주입한 $hSOD1^{G93A}$ 수컷 마우스는 시간 경과에 따라 대조군 마우스에 비해 악력이 증가하는 경향이 있었지만, 이러한 측정은 대조군의 작은 샘플 크기로 인해 통계적 유의성에 도달하지 못했다(도 56C). 암컷 마우스는 또한 제19주 $iCre$ 및 $Asc11^{SA6}$ 처리된 $hSOD1^{G93A}$ 마우스 사이에서 악력에 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 56D).

[0463] 마지막으로, *Catwalk* 시스템을 사용하여 보행을 분석하였다. 제19주에 $Asc11^{SA6}$ 이 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 수컷 마우스에서는 $iCre$ 대조군에 비해 오른쪽 및 왼쪽 뒷다리 보폭 길이가 증가하는 경향이 있었지만, 대조군 크기가 작기 때문에 통계적 유의성에 도달하지 못했다(도 57A, 도 57B). 유사하게, 제19주에 $iCre$ 대비 $Asc11^{SA6}$ 이 주입된 $hSOD1^{G93A}$ 암컷 마우스에서 오른쪽 및 왼쪽 뒷다리 보폭 길이가 증가하는 경향이 더 작았지만 통계적 유의성은 달성되지 않았다(도 57C, 도 57D).

[0464] 논의

[0465] 피질의 UMN이 ALS를 퇴화시킨다는 증거가 증가하고 있다는 점을 고려할 때, 손실된 UMN을 대체하여 반응성 성상교세포 및 흥분독성 운동 뉴런 사멸을 최소화하여 질환 진행을 지연시키는 것이 중요하다²⁴. 본 연구에서는 돌연변이된 $Asc11(Asc11^{SA6})$ 의 발현을 유도하기 위해 운동 피질에 짧은 hGFAP 프로모터²⁵를 운반하는 AAV5를 주입하여 신경 계통 전환 접근법을 사용하였다. $Asc11$ 의 SP 부위에서 세린을 알라닌으로 전환하면 저해성 인산화를 방지하고 신경성 잠재력을 증가시켜^{26,27} 충분한 기능적 GABA성 뉴런을 재생성할 수 있다. 또한, 최근 연구는 여성 및 남성 ALS 환자는 질환 진행과 관련이 있는 호중구 수치가 서로 상이한 것으로 나타났다²⁸.

[0466] 본 실시예의 데이터는 운동 피질 성상교세포의 신경 계통 전환이 ALS의 마우스 모델인 $hSOD1^{G93A}$ 트랜스제닉 마우스에서 질환 진행을 지연시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 성상교세포에서 뉴런으로의 전환을 촉진하기 위해서, GFAP를 사용하여 운동 피질 성상교세포에서 전신경 유전자 $Asc11(Asc11^{SA6})$ 의 돌연변이된 버전을 발현시켰다. 유전자 전달은 운동 증상이 시작된 16주령 및 운동 증상이 이미 상당히 심해진 제19령 마우스의 운동 피질에 주입된 아테노-연관 바이러스 5(AAV5)를 사용하여 달성하였다. $Asc11^{SA6}$ 을 제공받은 수컷 마우스는 더 양호한(즉, 더 낮은) 신경 점수 및 로타로드에 떨어지기까지의 지연 증가로 밝혀진 바와 같이 체중을 더 잘 유지하고 운동 기능을 유지할 수 있었다. 종합하면, 이러한 데이터는 운동 피질 성상교세포를 표적으로 하는 신경 계통 전환이 ALS 마우스 모델에서 운동 증상의 발병을 지연시키고 수명을 늘릴 수 있음을 나타낸다.

[0467]

참고문헌

- 1 Turner, M. R. et al. Controversies and priorities in amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 12, 310-322 (2013).
- 2 Dadon-Nachum, M., Melamed, E. & Offen, D. The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* 43, 470-477 (2011).
- 3 Fischer, L. R. et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185, 232-240 (2004).
- 4 Eisen, A. et al. Cortical influences drive amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 88, 917-924 (2017).
- 5 Eisen, A. The Dying Forward Hypothesis of ALS: Tracing Its History. *Brain Sci* 11 (2021).
- 6 Talbot, K. Amyotrophic Lateral Sclerosis: network vulnerability and monosynaptic connections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91, 906 (2020).
- 7 Vucic, S., Nicholson, G. A. & Kiernan, M. C. Cortical hyperexcitability may precede the onset of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 131, 1540-1550 (2008).

[0468]

- 8 Ozdinler, P. H. et al. Corticospinal motor neurons and related subcerebral projection neurons undergo early and specific neurodegeneration in hSOD1G(9)(3)A transgenic ALS mice. *J Neurosci* 31, 4166-4177 (2011).
- 9 Thomsen, G. M. et al. Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex. *J Neurosci* 34, 15587-15600 (2014).
- 10 Jara, J. H., Villa, S. R., Khan, N. A., Bohn, M. C. & Ozdinler, P. H. AAV2 mediated retrograde transduction of corticospinal motor neurons reveals initial and selective apical dendrite degeneration in ALS. *Neurobiol Dis* 47, 174-183 (2012).
- 11 Crochemore, C., Pena-Altamira, E., Virgili, M., Monti, B. & Contestabile, A. Disease-related regressive alterations of forebrain cholinergic system in SOD1 mutant transgenic mice. *Neurochem Int* 46, 357-368 (2005).
- 12 Thomsen, G. M. et al. Transplantation of Neural Progenitor Cells Expressing Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor into the Motor Cortex as a Strategy to Treat Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Stem Cells* (2018).
- 13 Khademullah, C. S. et al. Cortical interneuron-mediated inhibition delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 143, 800-810 (2020).
- 14 Nagai, M. et al. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* 10, 615-622 (2007).
- 15 Di Giorgio, F. P., Carrasco, M. A., Siao, M. C., Maniatis, T. & Eggan, K. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model. *Nat Neurosci* 10, 608-614 (2007).
- 16 Qian, K. et al. Sporadic ALS Astrocytes Induce Neuronal Degeneration In Vivo. *Stem Cell Reports* 8, 843-855 (2017).
- 17 Kwon, H. S. & Koh, S. H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9, 42 (2020).

[0469]

- 18 Liddelow, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481-487 (2017).
- 19 Guttenplan, K. A. et al. Knockout of reactive astrocyte activating factors slows disease progression in an ALS mouse model. *Nat Commun* 11, 3753 (2020).
- 20 Taha, D. M. et al. Astrocytes display cell autonomous and diverse early reactive states in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* (2022).
- 21 Masserdotti, G., Gascon, S. & Gotz, M. Direct neuronal reprogramming: learning from and for development. *Development* 143, 2494-2510 (2016).
- 22 Hatzipetros, T. et al. A Quick Phenotypic Neurological Scoring System for Evaluating Disease Progression in the SOD1-G93A Mouse Model of ALS. *J Vis Exp* (2015).
- 23 Richards, D., Morren, J. A. & Piro, E. P. in *Amyotrophic Lateral Sclerosis* (ed T. Araki) (Exon Publications Copyright: The Authors., 2021).
- 24 Van Den Bosch, L., Van Damme, P., Bogaert, E. & Robberecht, W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762, 1068-1082 (2006).
- 25 Lee, Y., Messing, A., Su, M. & Brenner, M. GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia* 56, 481-493 (2008).
<https://doi.org/10.1002/glia.20622>
- 26 Li, S. et al. RAS/ERK signaling controls proneural genetic programs in cortical development and gliomagenesis. *J Neurosci* 34, 2169-2190 (2014).
- 27 Li, S. et al. GSK3 Temporally Regulates Neurogenin 2 Proneural Activity in the Neocortex. *Journal of Neuroscience* 32, 7791-7805 (2012).
- 28 Murdock, B. J., Goutman, S. A., Boss, J., Kim, S. & Feldman, E. L. Amyotrophic Lateral Sclerosis Survival Associates With Neutrophils in a Sex-specific Manner. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 8 (2021).

[0470]

- 29 Wang, L. L. et al. Revisiting astrocyte to neuron conversion with lineage tracing in vivo. *Cell* 184, 5465-5481.e5416 (2021).
- 30 Fischer, K. B., Collins, H. K. & Callaway, E. M. Sources of off-target expression from recombinase-dependent AAV vectors and mitigation with cross-over insensitive ATG-out vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 27001-27010 (2019).
- 31 Basso, M. et al. Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem* 288, 15699-15711 (2013).
- 32 Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P. & Krämer-Albers, E. M. Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication. *Front Cell Neurosci* 7, 182 (2013).
- 33 Wang, L.-L., Garcia, C. S., Zhong, X., Ma, S. & Zhang, C.-L. (2020).
- 34 Gong Chen, Wen Li, Zongqin Xiang, Liang Xu, Minhui Liu, Qingsong Wang, Wenliang Lei, *bioRxiv* 2020.09.02.279273. DOI: 10.1101/2020.09.02.279273
- 35 Hol, E. M. et al. Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Mol Psychiatry* 8, 786-796 (2003).
- 36 Wang, L. L. et al. The p53 Pathway Controls SOX2-Mediated Reprogramming in the Adult Mouse Spinal Cord. *Cell Rep* 17, 891-903 (2016).
- 37 Gascon, S. et al. Identification and Successful Negotiation of a Metabolic Checkpoint in Direct Neuronal Reprogramming. *Cell Stem Cell* 18, 396-409 (2016).
- 38 Hachem, L. D., Mothe, A. J. & Tator, C. H. Effect of BDNF and Other Potential Survival Factors in Models of In Vitro Oxidative Stress on Adult Spinal Cord-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Biores Open Access* 4, 146-159 (2015).
- 39 Singh, A., Kukreti, R., Saso, L. & Kukreti, S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24 (2019).

[0471]

- 40 Arlotta, P. et al. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron* 45, 207-221 (2005).
- 41 Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R. & Macklis, J. D. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 8, 427-437 (2007).
- 42 Fogarty, M. J., Noakes, P. G. & Bellingham, M. C. Motor cortex layer V pyramidal neurons exhibit dendritic regression, spine loss, and increased synaptic excitation in the presymptomatic hSOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 35, 643-647 (2015).
- 43 Alkaslasi, M. R. et al. Poor Corticospinal Motor Neuron Health Is Associated with Increased Symptom Severity in the Acute Phase Following Repetitive Mild TBI and Predicts Early ALS Onset in Genetically Predisposed Rodents. *Brain Sci* 11 (2021).
- 44 Khademullah, C. S. et al. Cortical interneuron-mediated inhibition delays the onset of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 143, 800-810 (2020).
- 45 Liu, Y. et al. Ascl1 Converts Dorsal Midbrain Astrocytes into Functional Neurons In Vivo. *J Neurosci* 35, 9336-9355 (2015).
- 46 Chouchane, M. et al. Lineage Reprogramming of Astroglial Cells from Different Origins into Distinct Neuronal Subtypes. *Stem Cell Reports* 9, 162-176 (2017).
- 47 Hogg, M. C., Halang, L., Woods, I., Coughlan, K. S. & Prehn, J. H. M. Riluzole does not improve lifespan or motor function in three ALS mouse models. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 19, 438-445 (2018).

[0472]

[0473] 실시예 8: 형질도입된 피질 세포에서 Sox9 발현의 Ascl1-SA7 억제

[0474]

본 실시예를 수행하여 존재하는 경우 Ascl1-SA6 돌연변이체를 사용한 형질도입과 비교하여 Ascl1-SA7 돌연변이체를 사용한 형질도입으로 인한 직접 계통 재프로그래밍 결과에서의 차이가 무엇인지를 결정하는 것이었다. 둘 다 돌연변이 bHLH 전사 인자 Ascl1이 정상적으로는 활성화되지 않을 수 있는 세포 상황에서도 활성을 유지할 수 있도록 하는 포스포억제부위 돌연변이의 혼입으로 인해 Ascl1 전사 인자에 비해 이점을 제공할 것으로 예상되었다.

[0475]

Rosa-zsGreen 마우스의 피질에 AAV8-GFAPshort-iCre, AAV8-GFAPshort-Ascl1-t2a-iCre, AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA6-t2a-iCre 및 AAV8-GFAPshort-Ascl1-SA7-t2a-iCre를 형질도입하였고, 여기서 상기 실시예에 기재된 바와 같이 패키징된 AAV를 정위 수술을 사용하여 Rosa-zsGreen 마우스의 대뇌 피질에 주입하였다. 형질도입 후 제21일에, 상기에 기재된 바와 같이 마우스를 희생시키고 피질 조직을 분석하였다.

[0476]

도 58 및 도 59에 제공된 데이터는 Ascl1-SA7이 반응성 성상교세포의 뉴런으로의 직접적인 계통 재프로그래밍에서 Ascl1-SA6만큼 효율적이라는 것을 확인해 준다.

[0477]

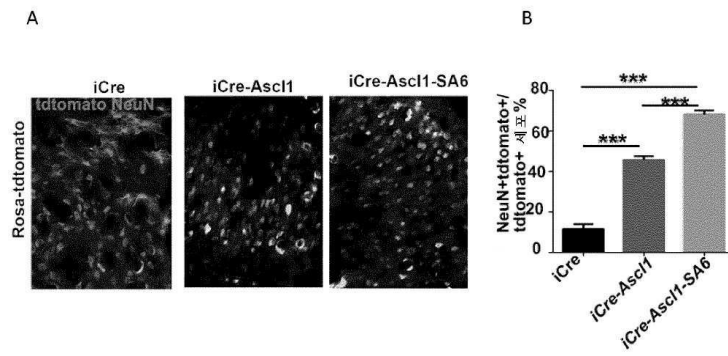
본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자의 기술 수준을 나타내며, 각각의 개별 간행물, 특허 및 특허 출원이 참조에 의해 포함되는 것으로 구체적으로 그리고 개별적으로 제시된 것과 동일한 정도로 본 명세서에 참조에 의해 포함된다.

[0478]

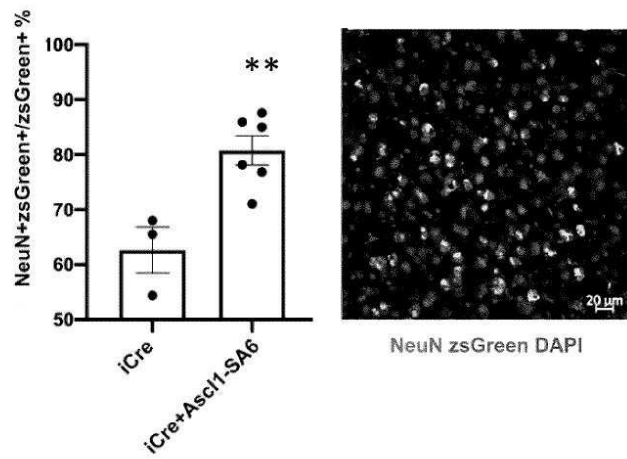
본 발명은 이와 같이 설명되며, 동일한 내용이 다양한 방식으로 변경될 수 있다는 것이 명백할 것이다. 이러한 변형은 본 발명의 사상 및 범주에서 벗어나는 것으로 간주되어서는 안 되며, 당업자에게 명백한 모든 변형은 다음 청구범위의 범위 내에 포함되도록 의도된다.

도면

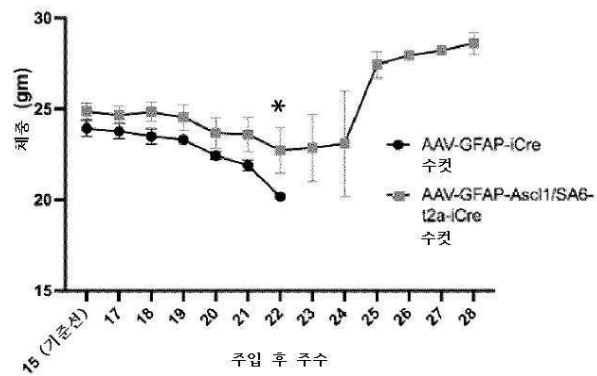
도면1



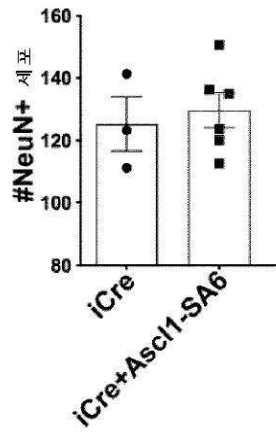
도면2



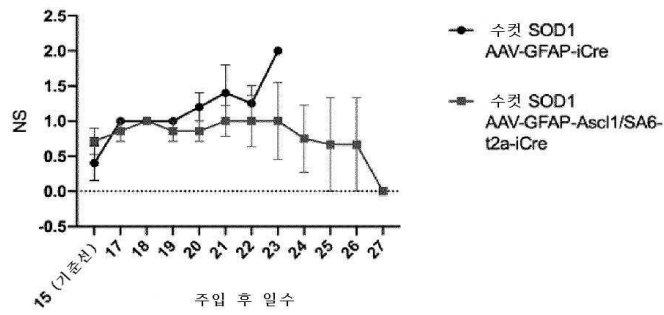
도면3



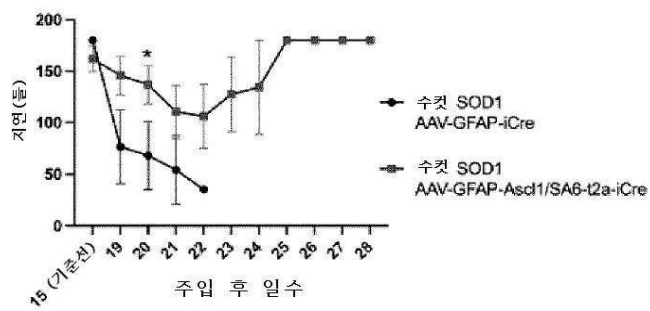
도면4



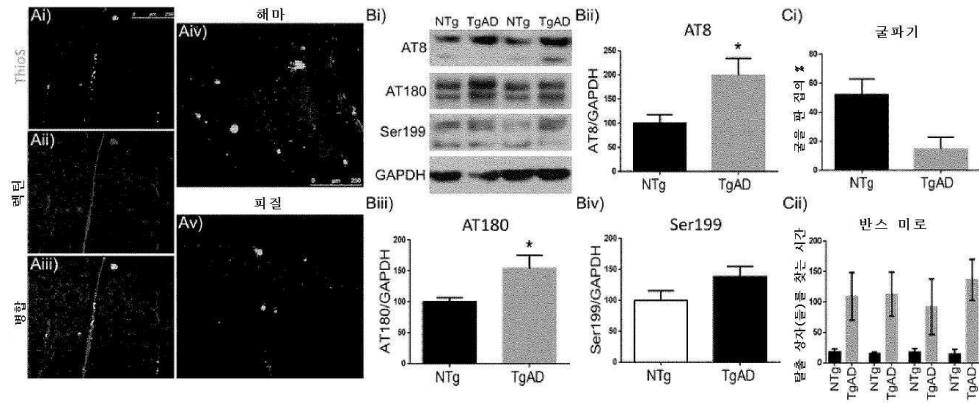
도면5



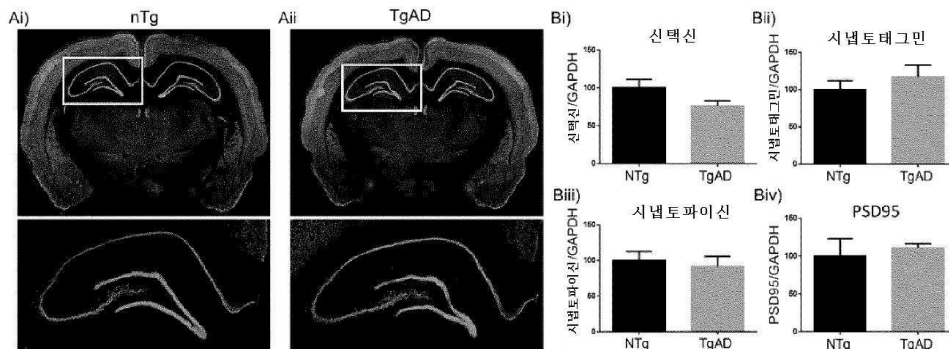
도면6



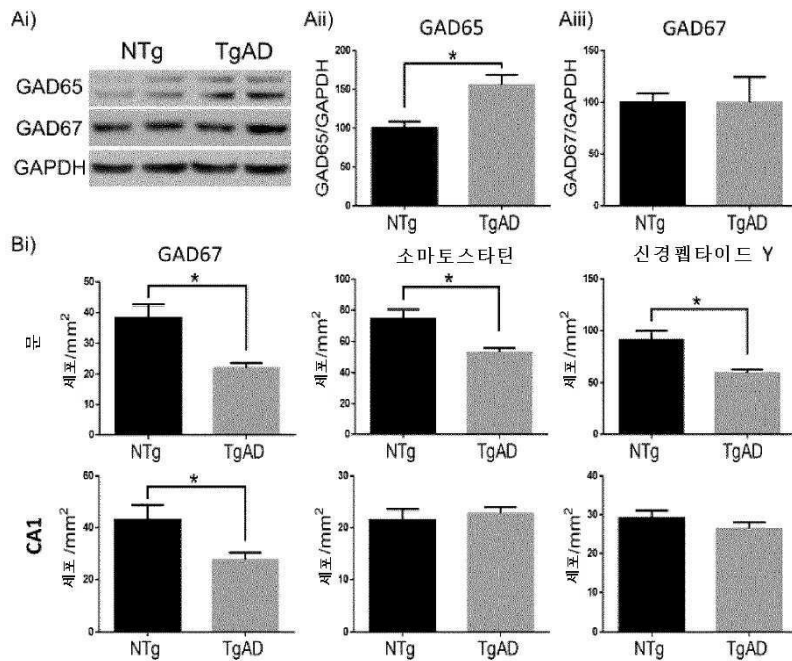
도면7



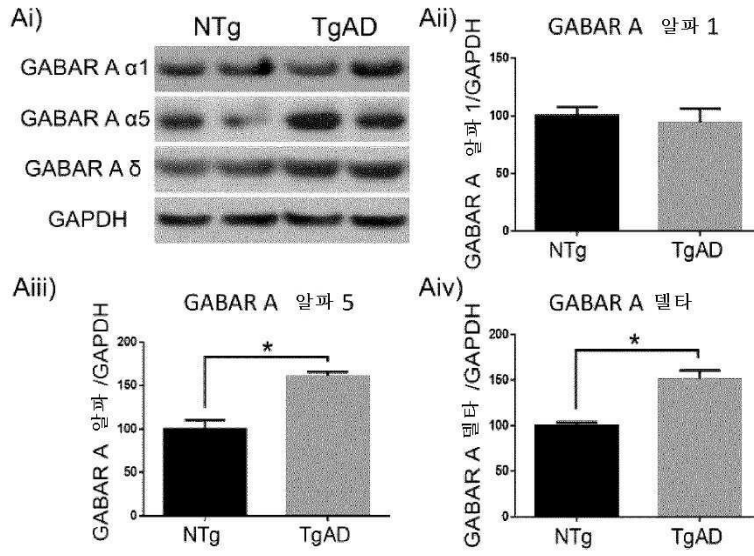
도면8



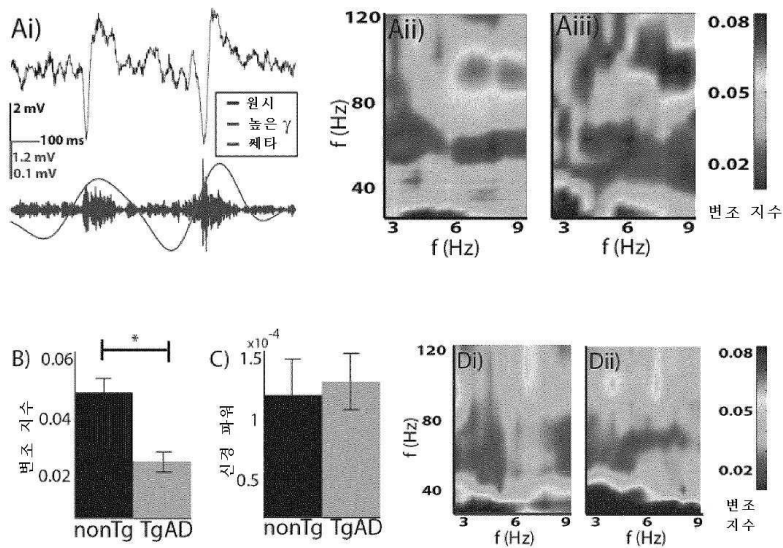
도면9



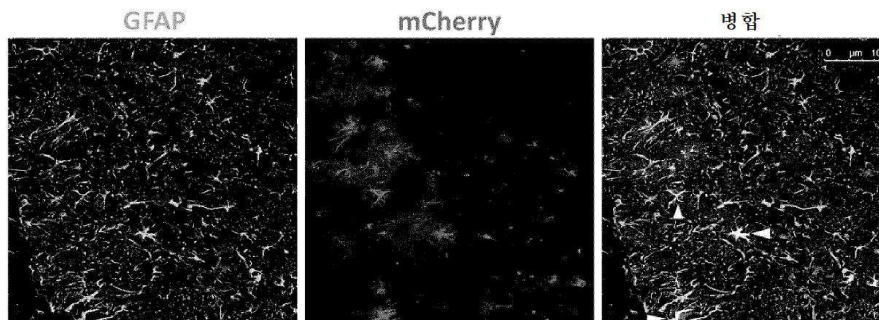
도면10



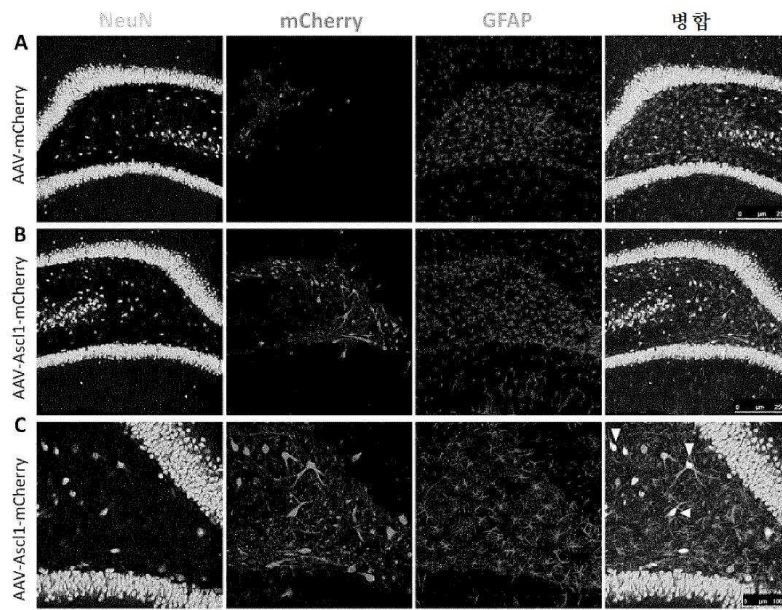
도면11



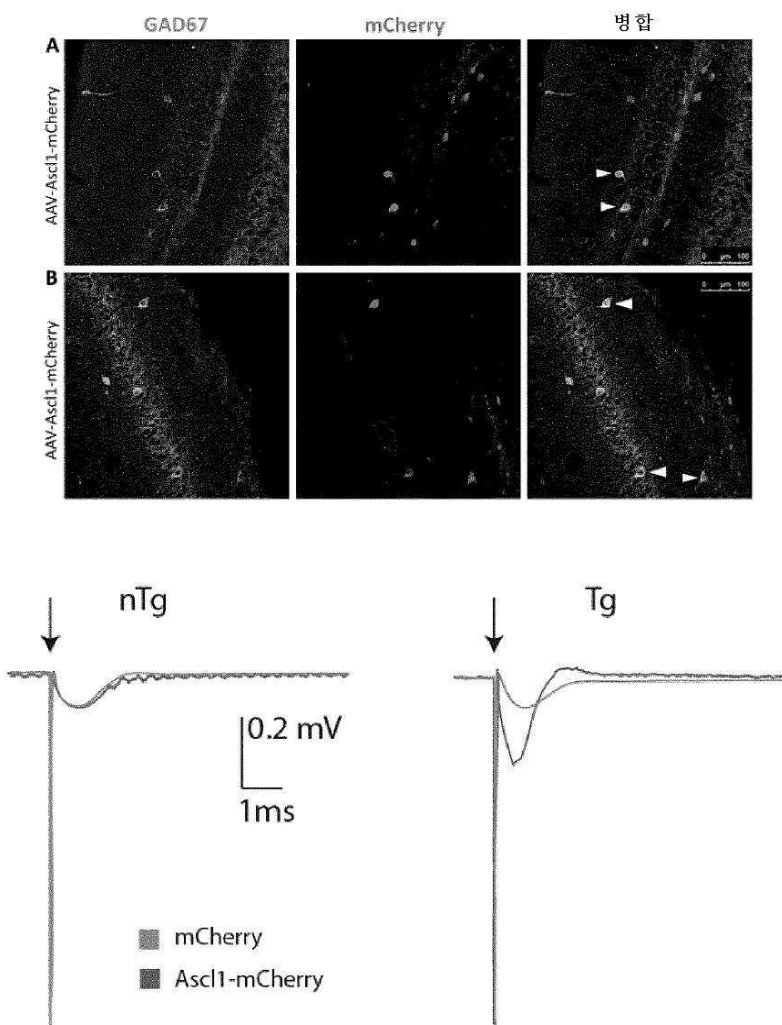
도면12



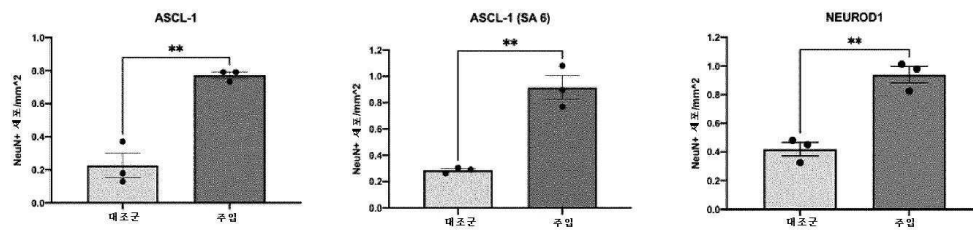
도면13



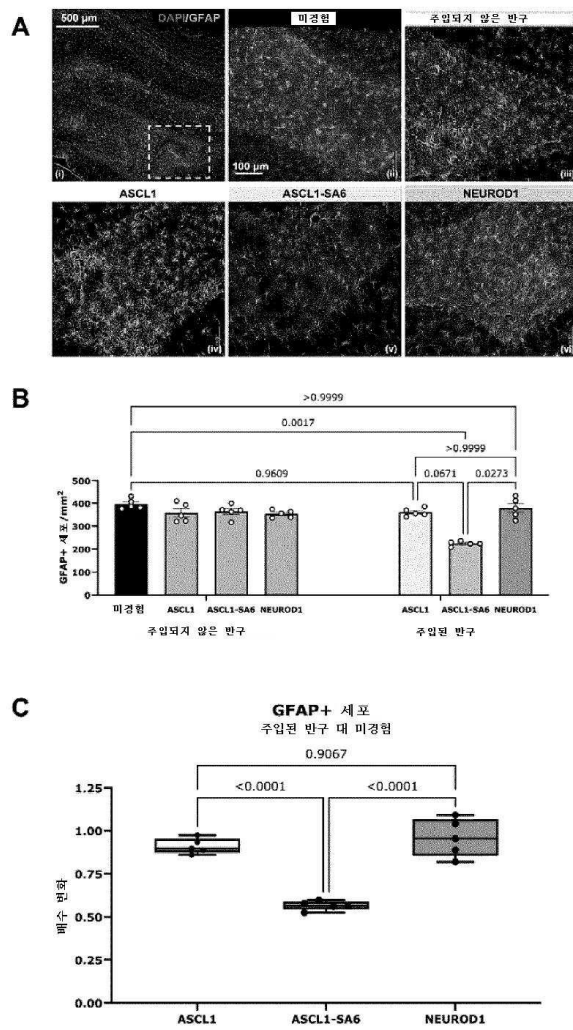
도면14



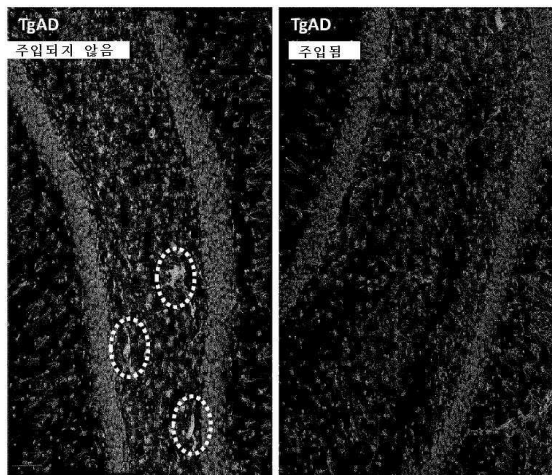
도면15



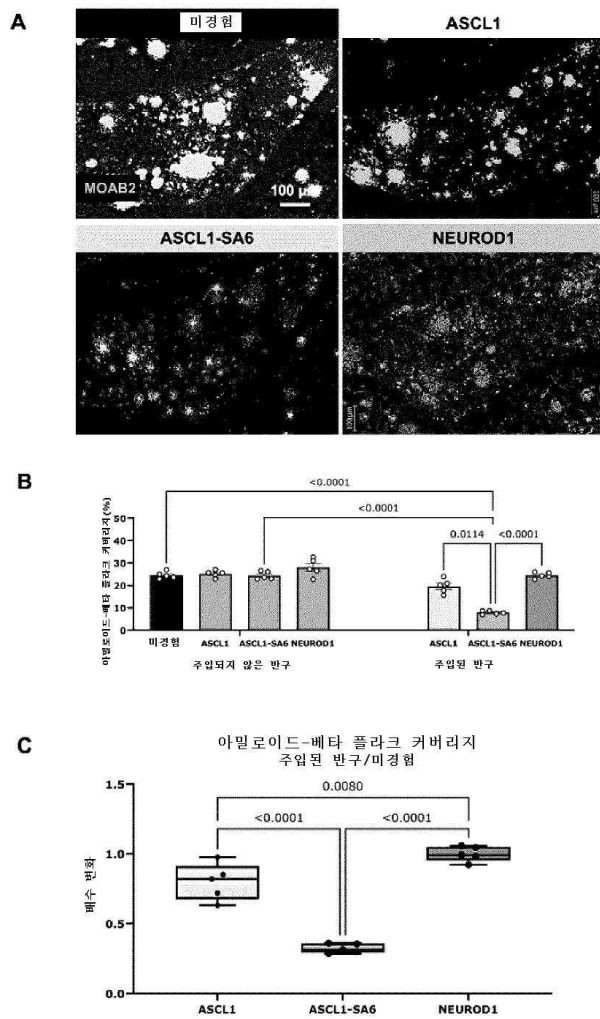
도면16



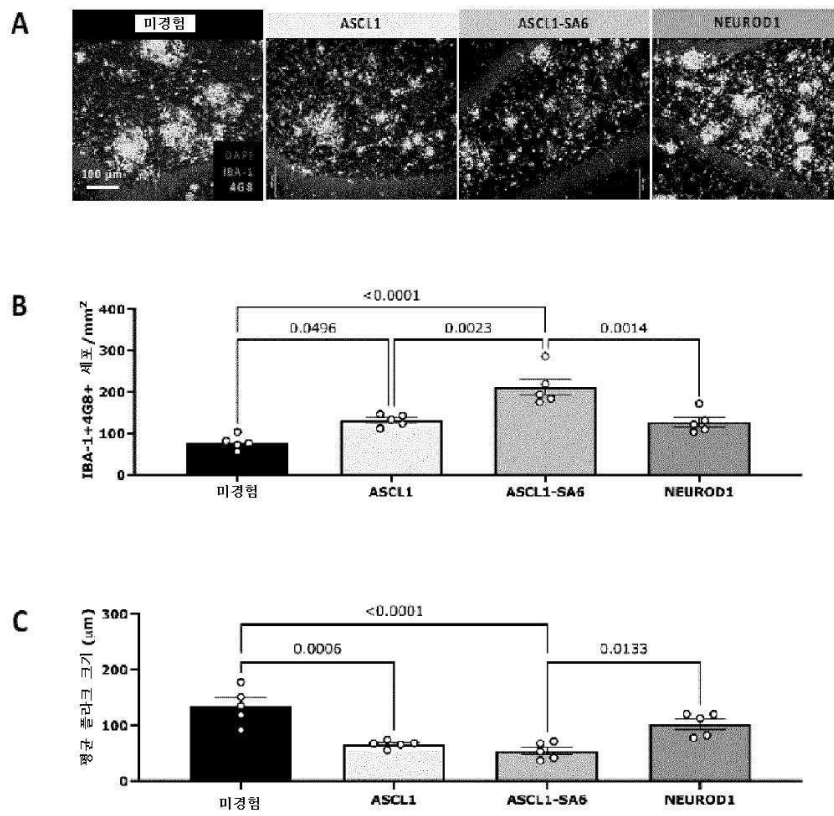
도면17



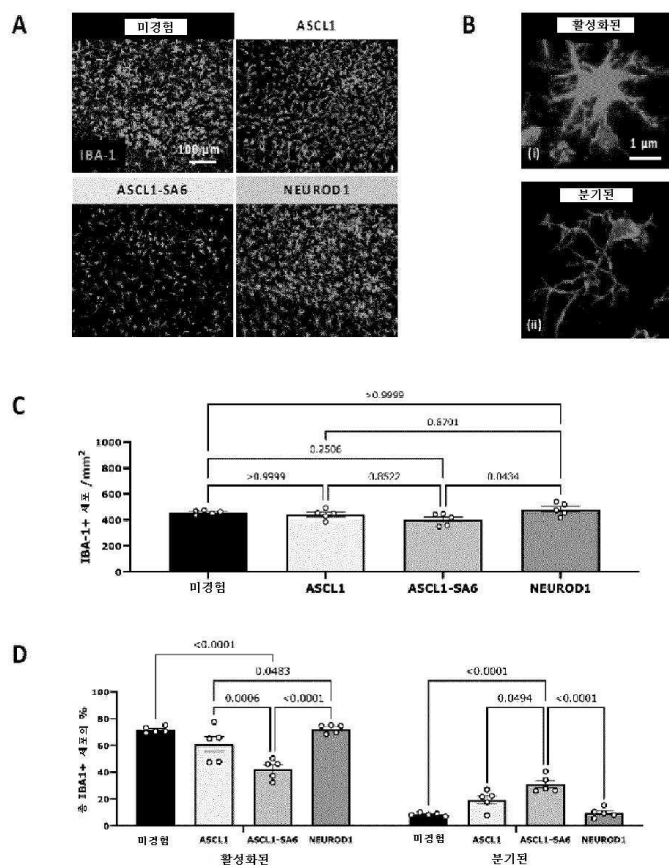
도면18



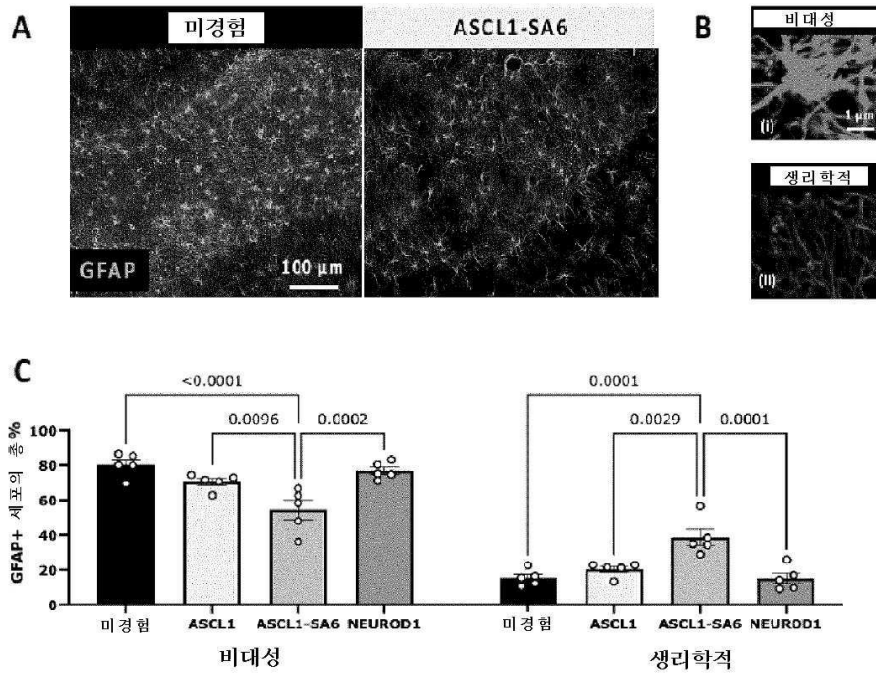
도면19



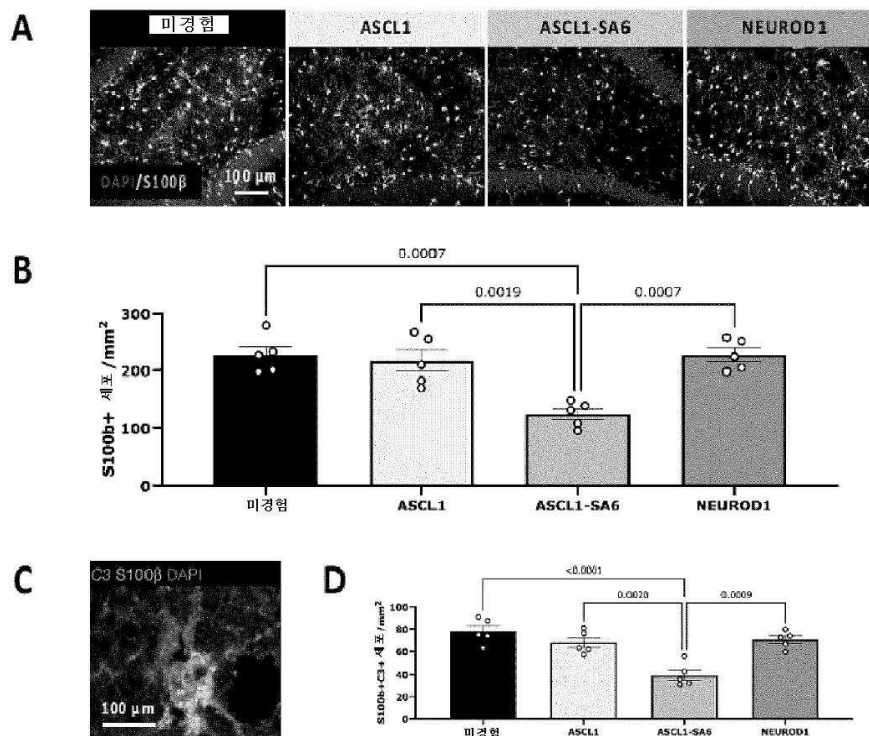
도면20



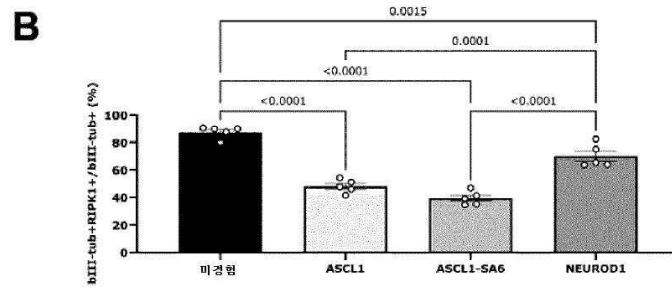
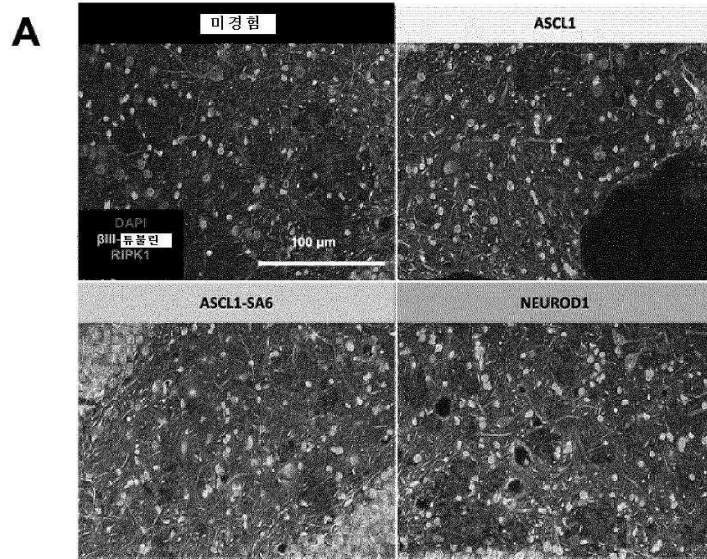
도면21



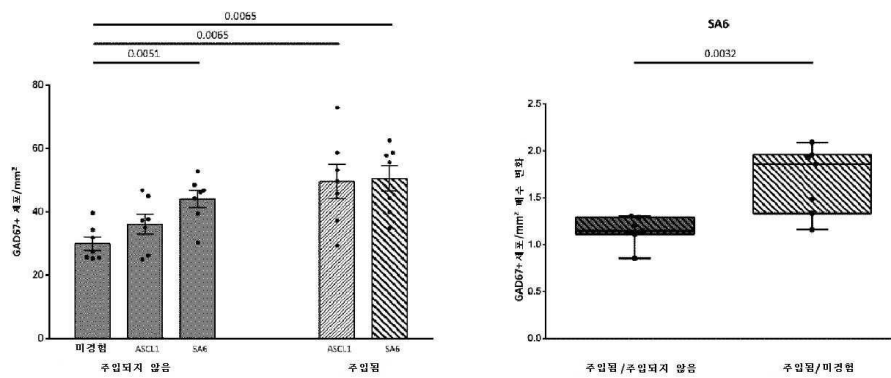
도면22



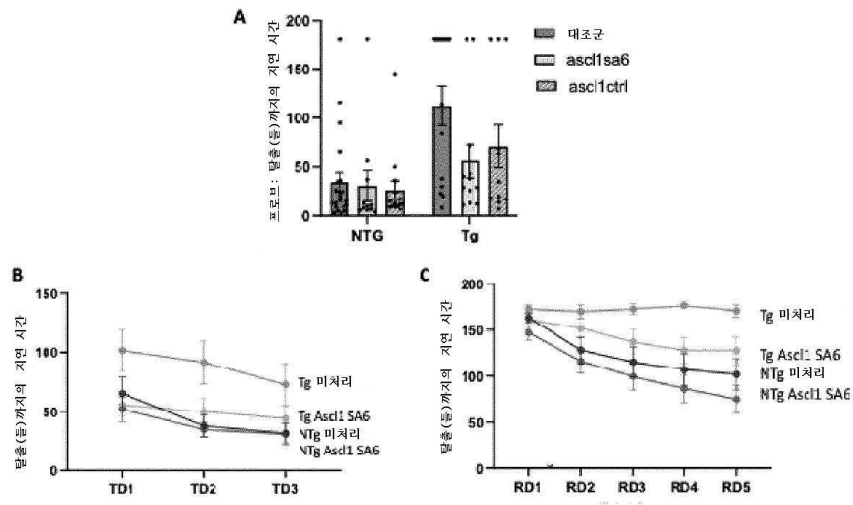
도면23



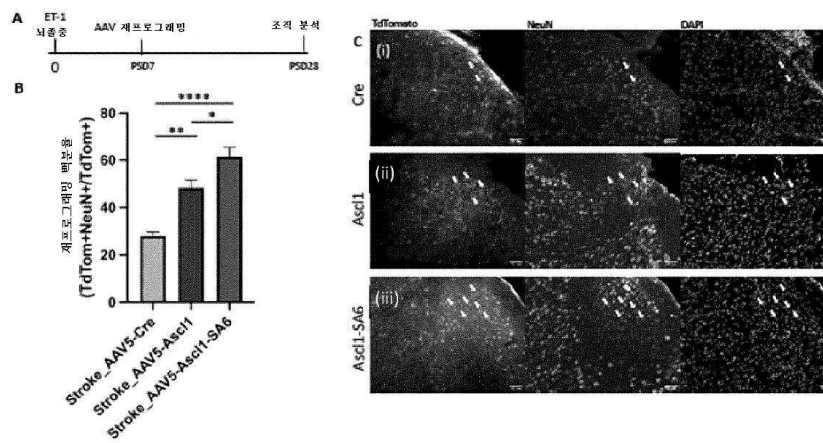
도면24



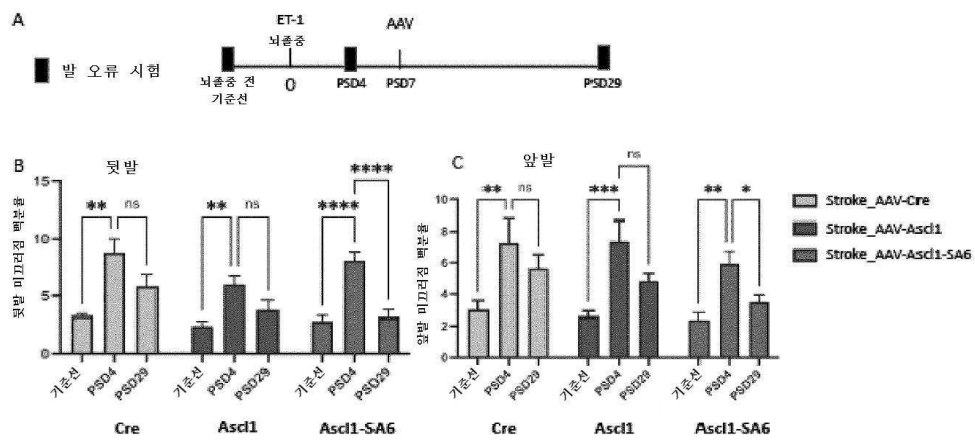
도면25



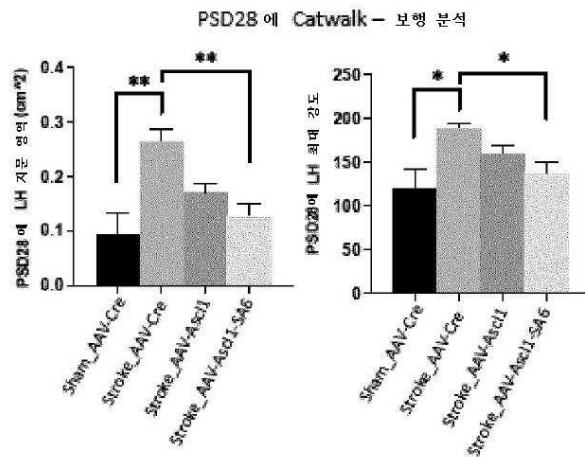
도면26



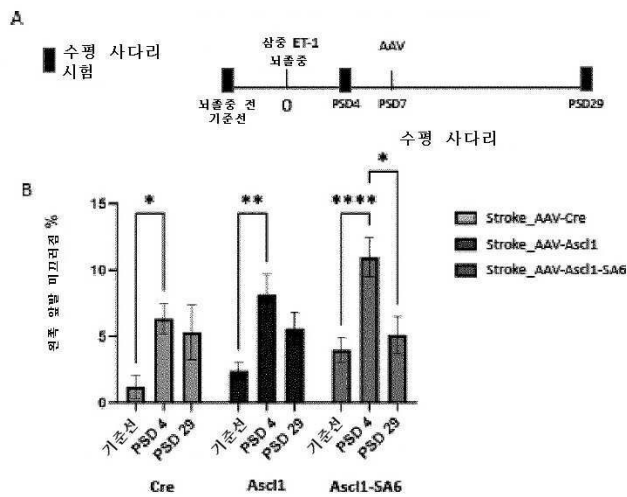
도면27



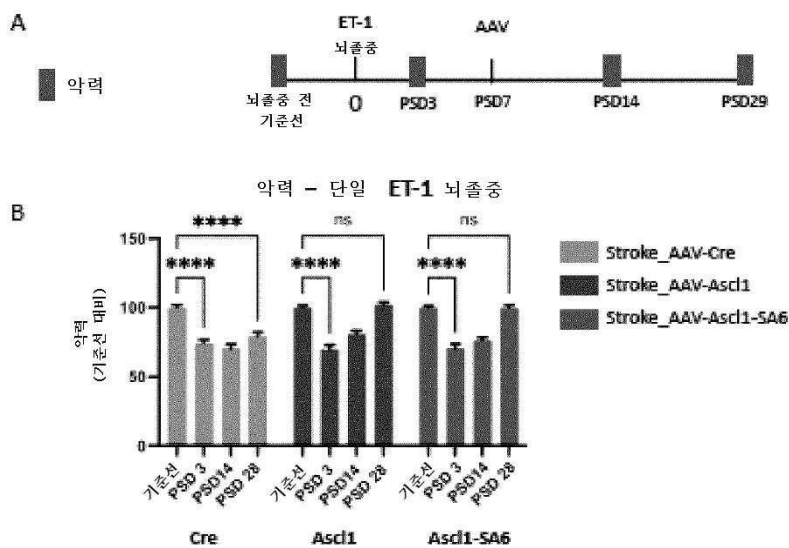
도면28



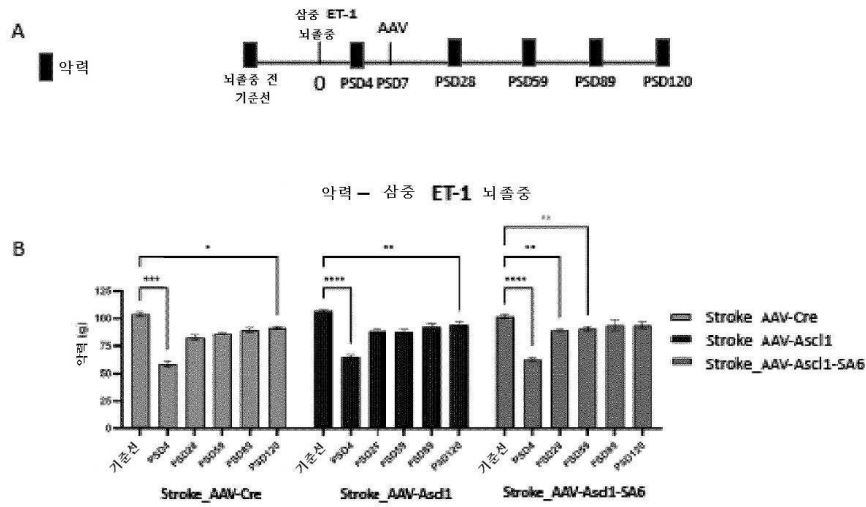
도면29



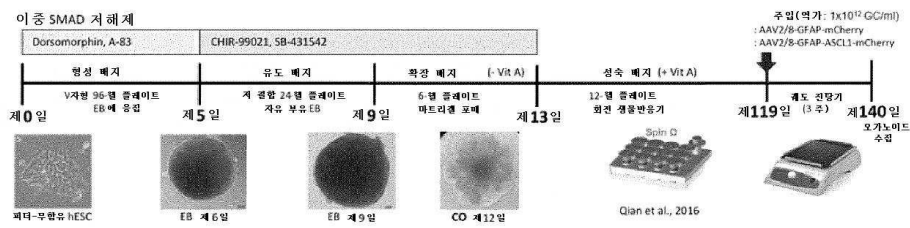
도면30



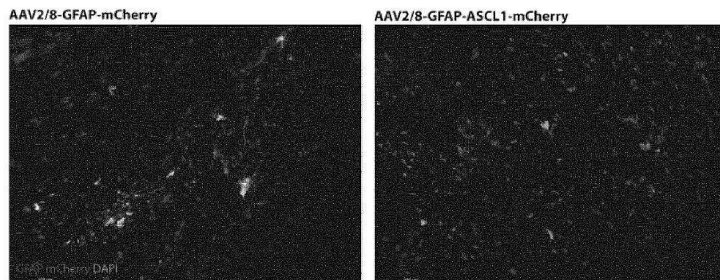
도면31



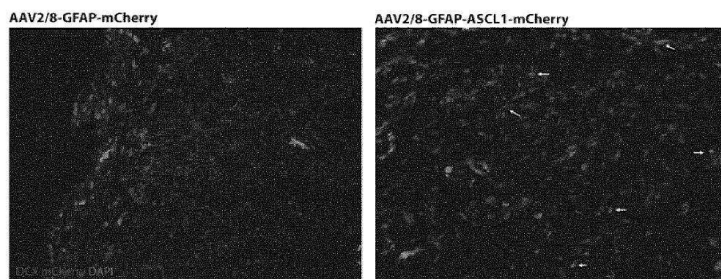
도면32



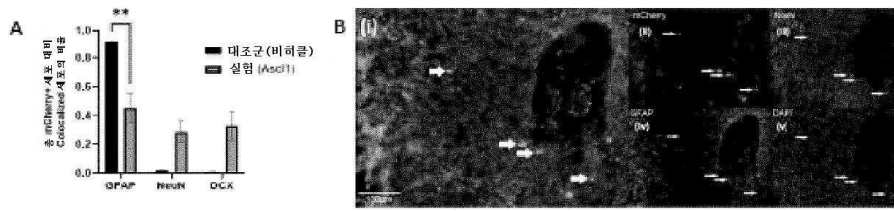
도면33



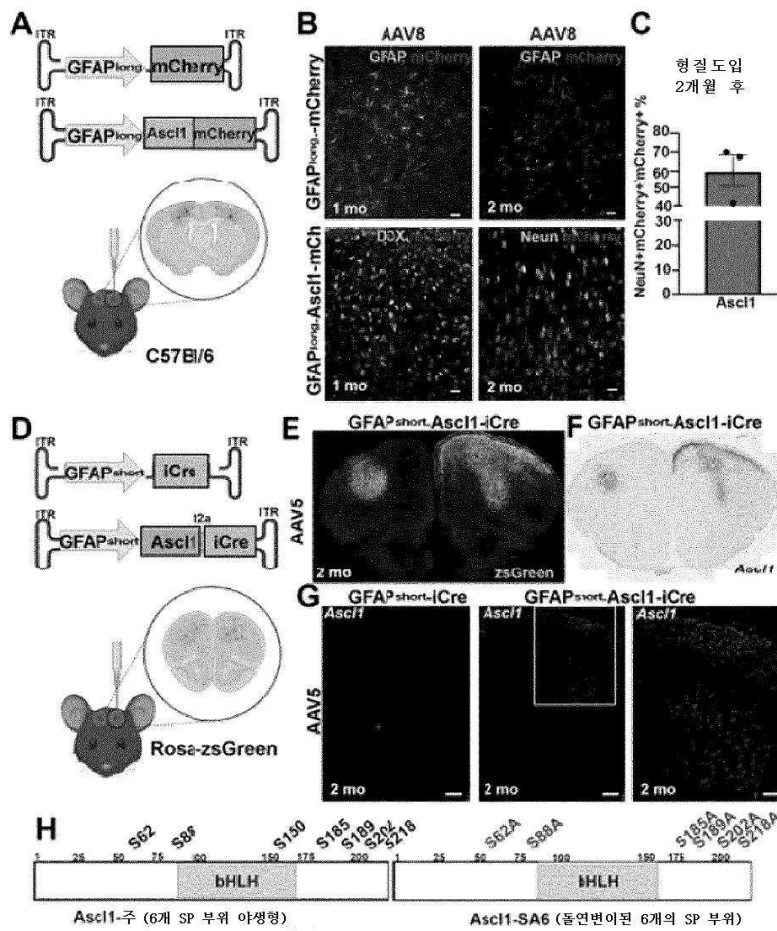
도면34



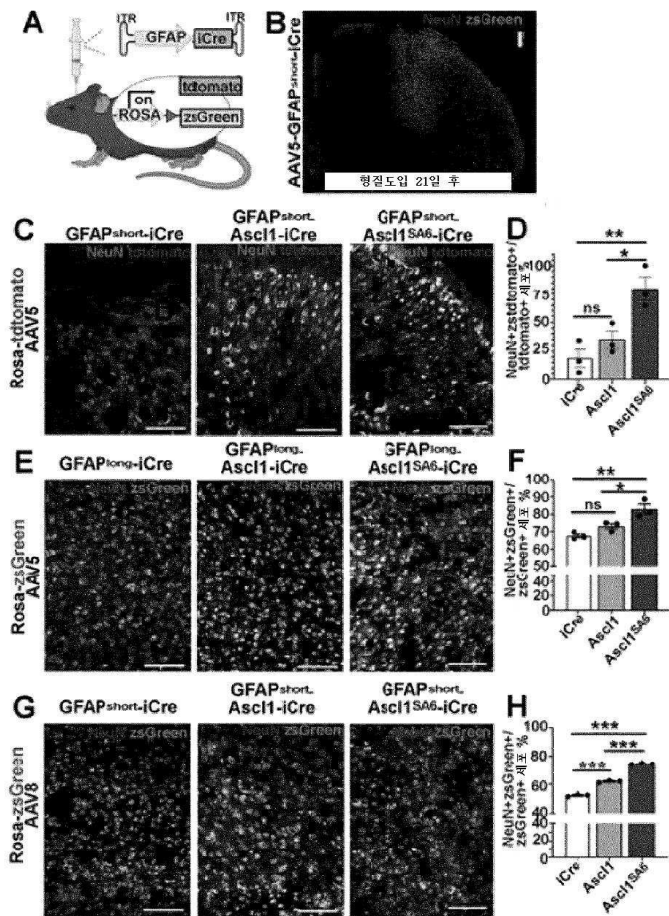
도면35



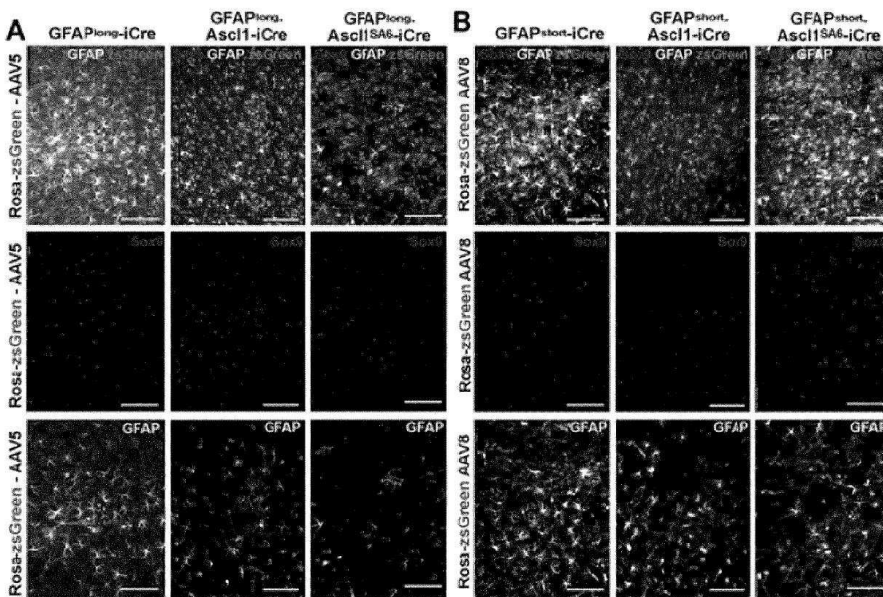
도면36



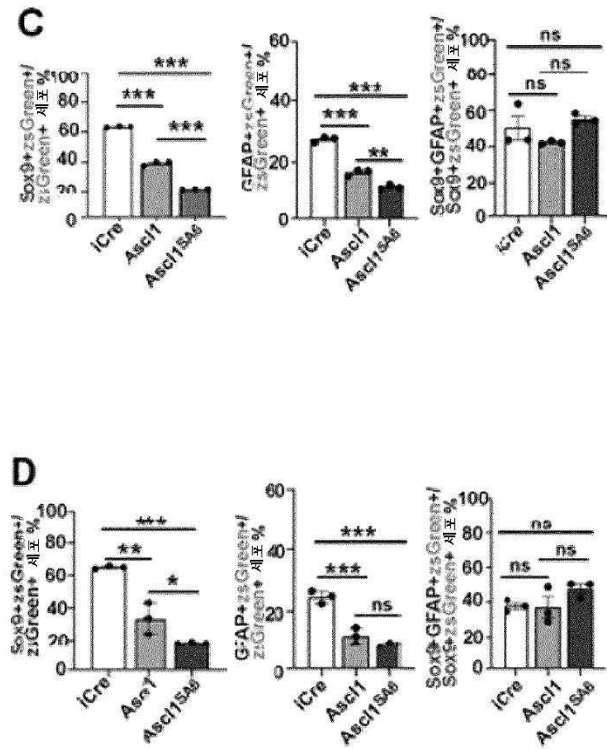
도면37



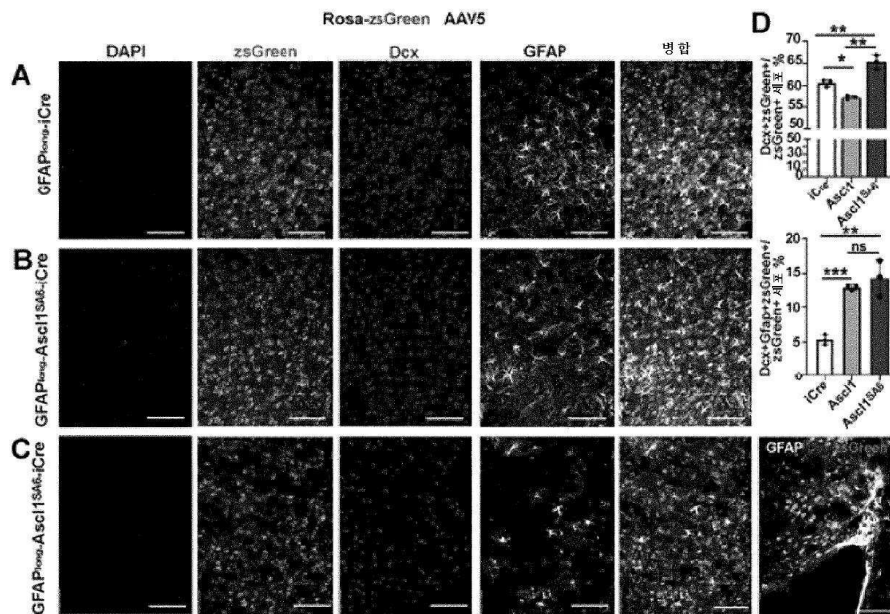
도면38ab



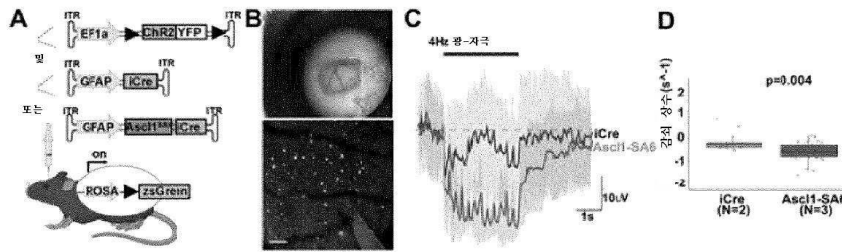
도면38cd



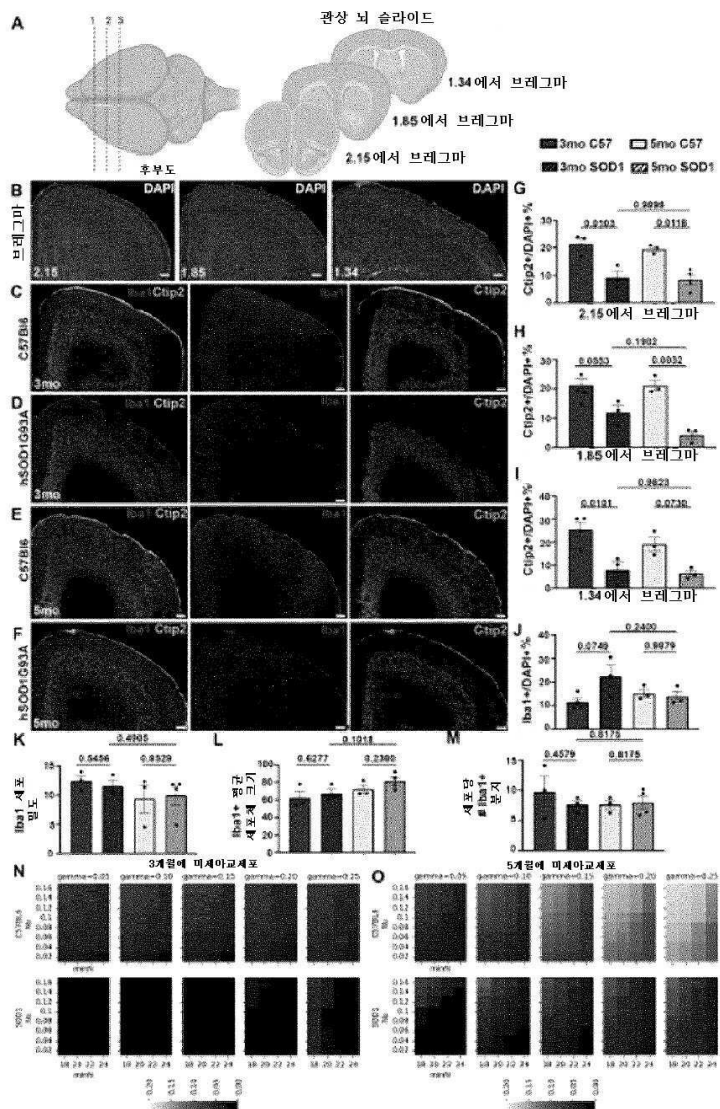
도면39



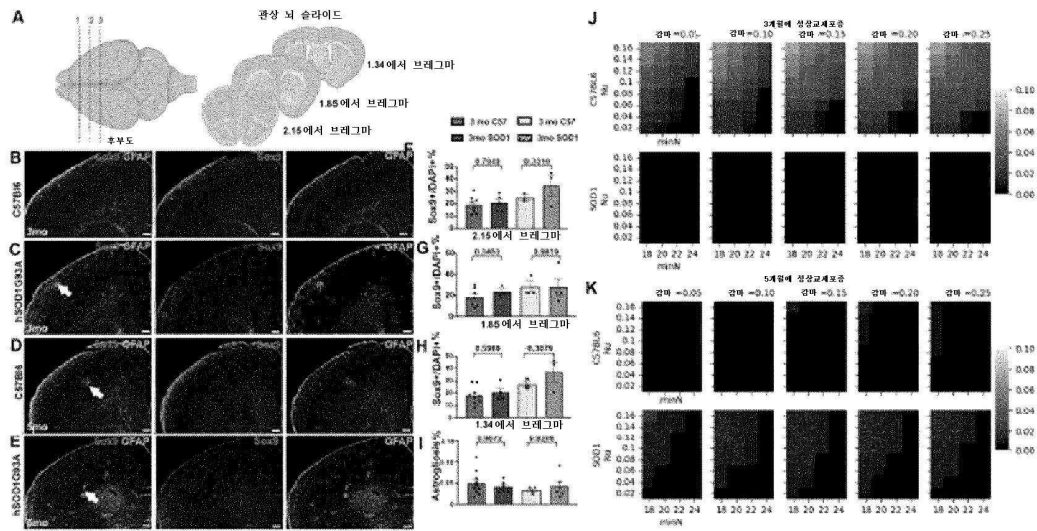
도면40



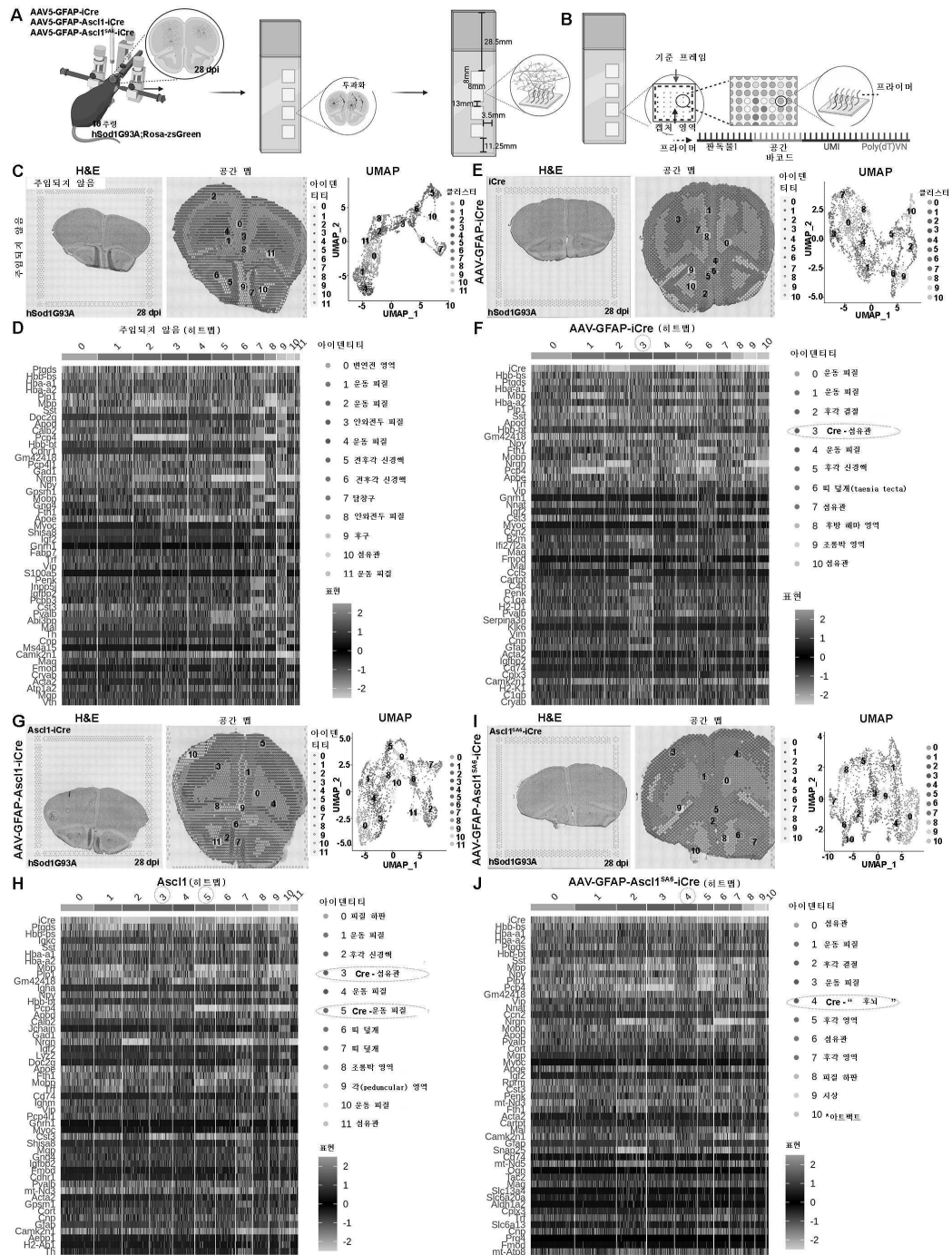
도면41



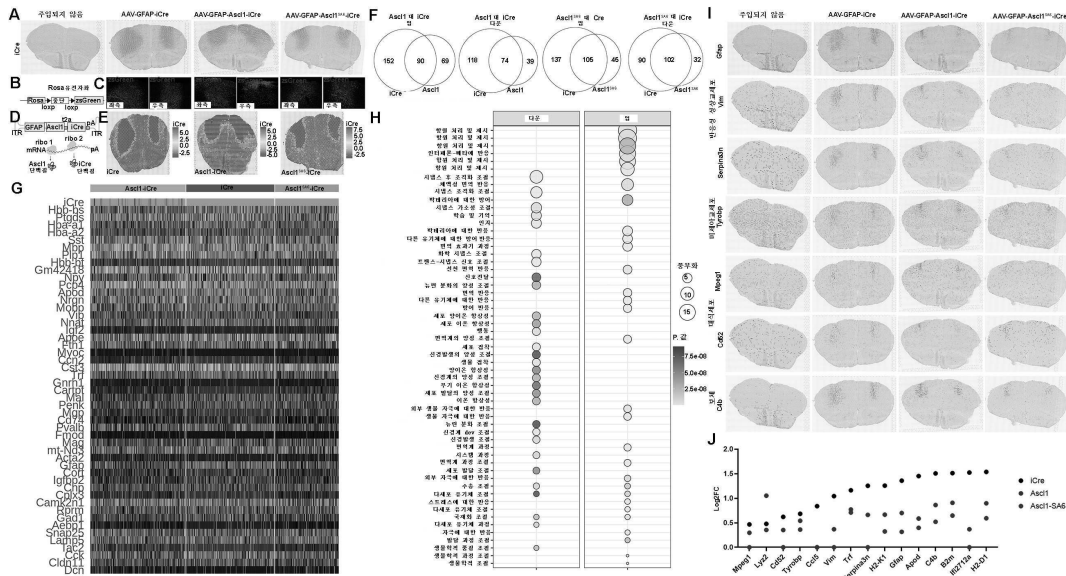
도면42



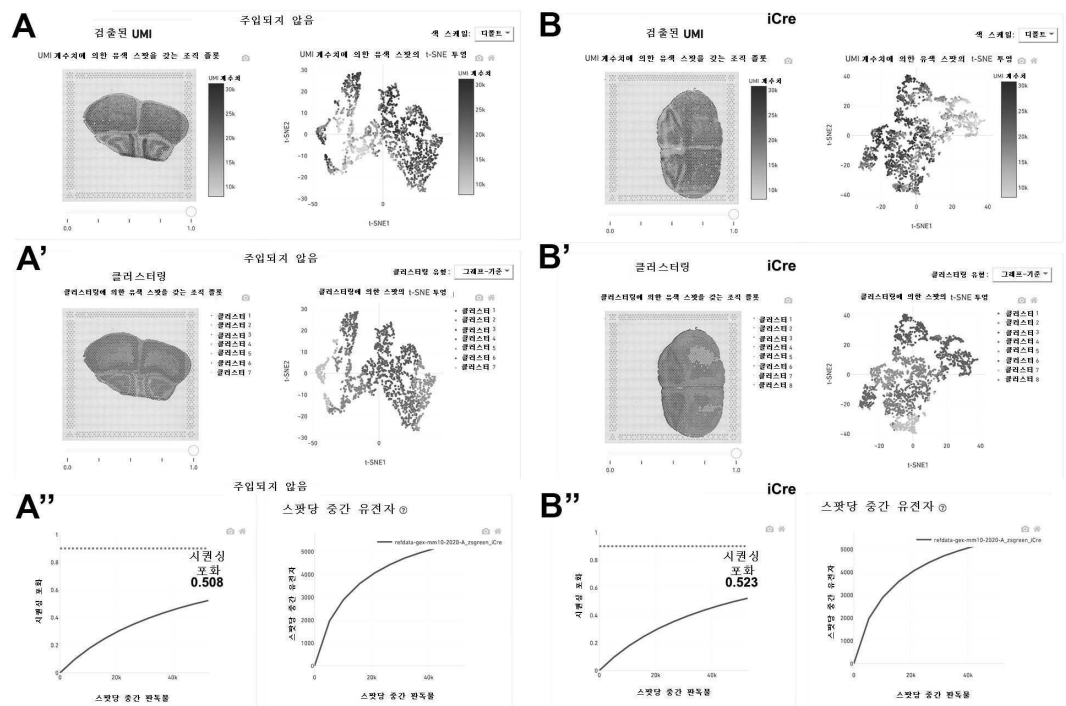
도면43



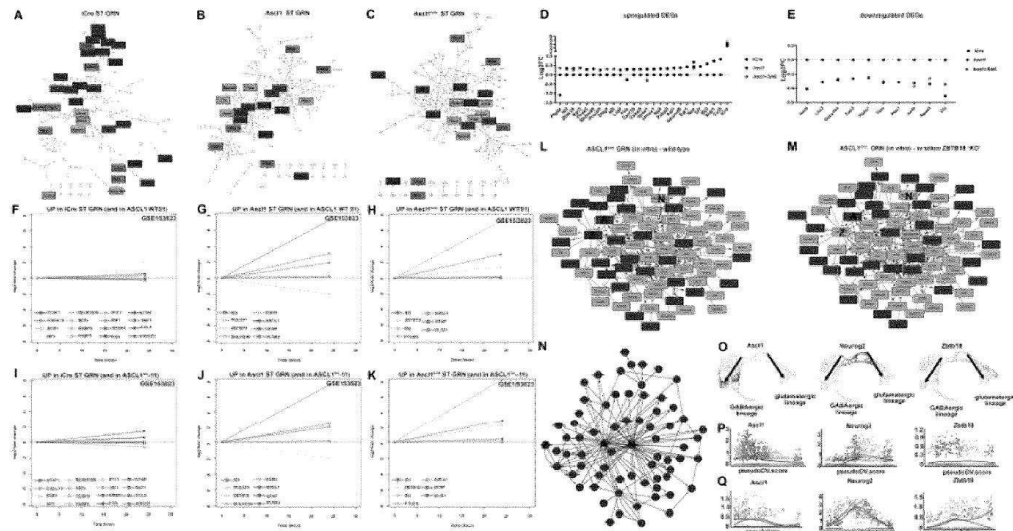
도면44



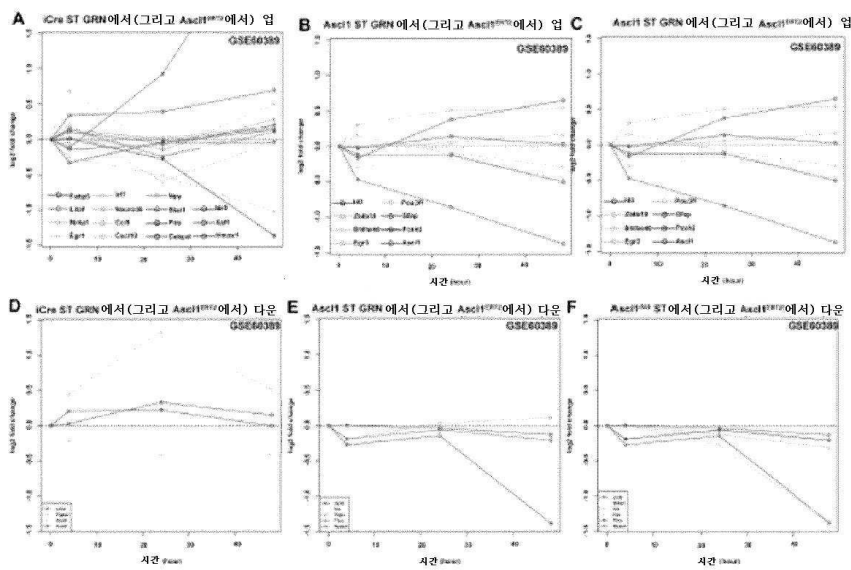
도면45ab



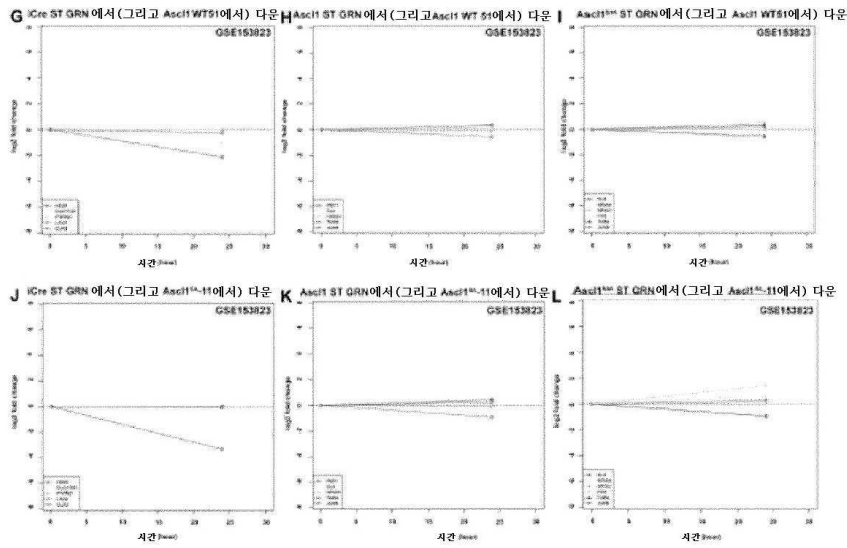
도면47



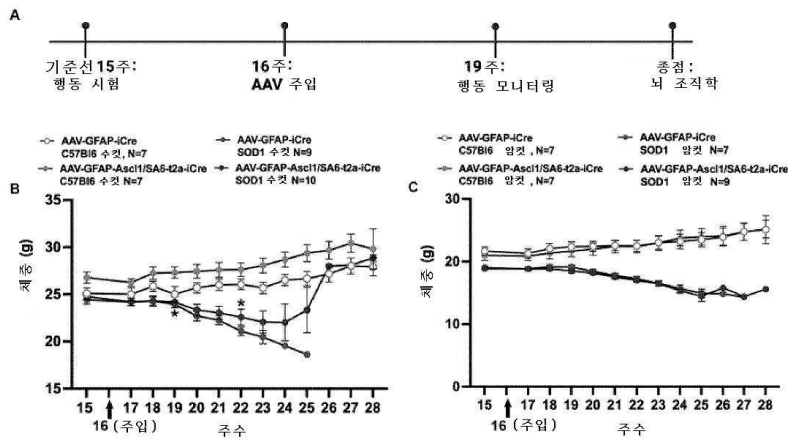
도면48af



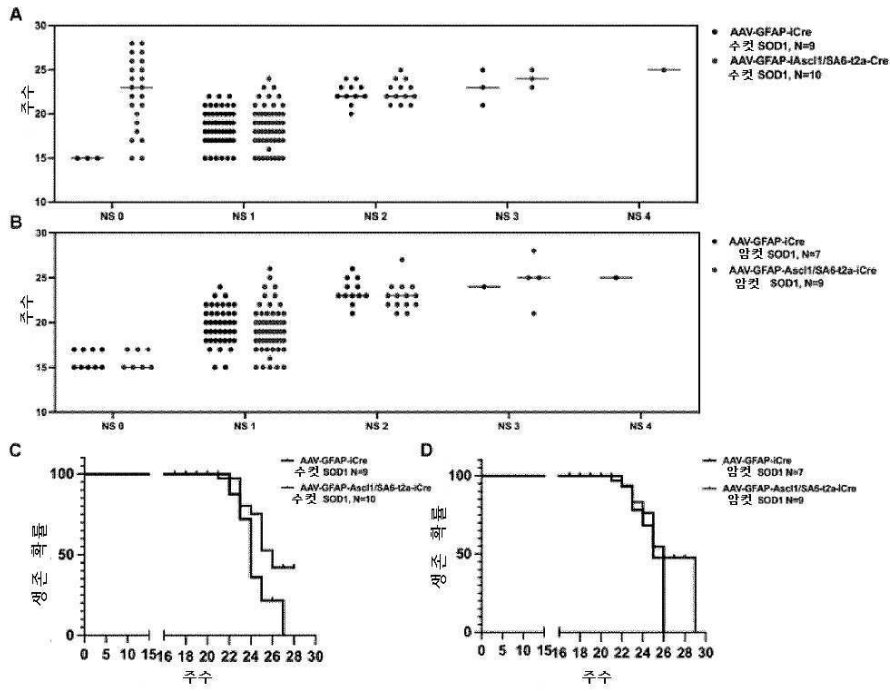
도면48g1



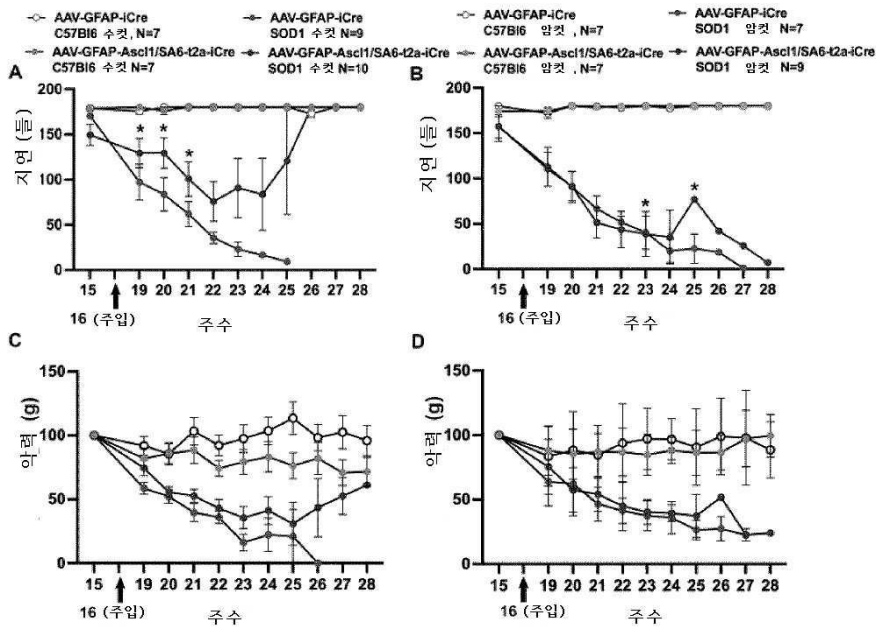
도면49



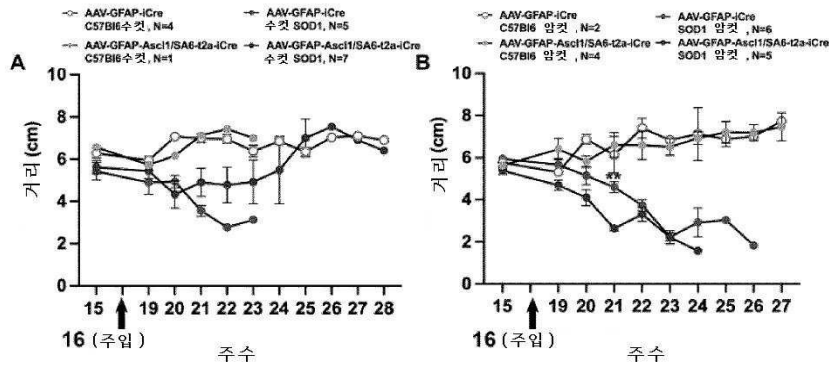
도면50



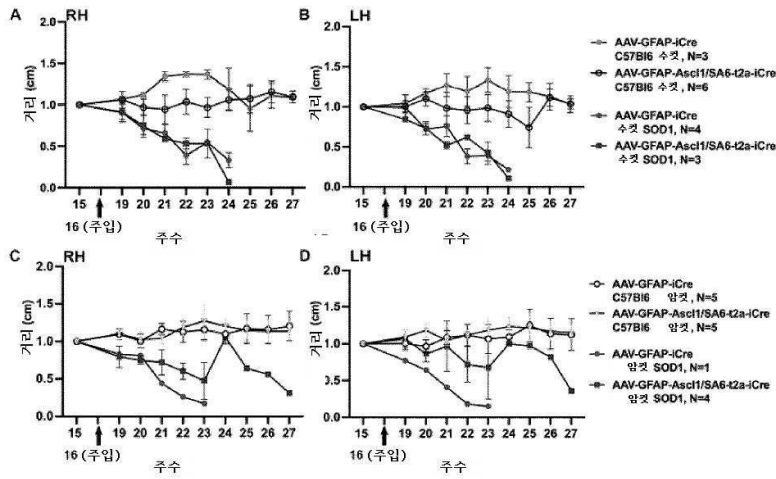
도면51



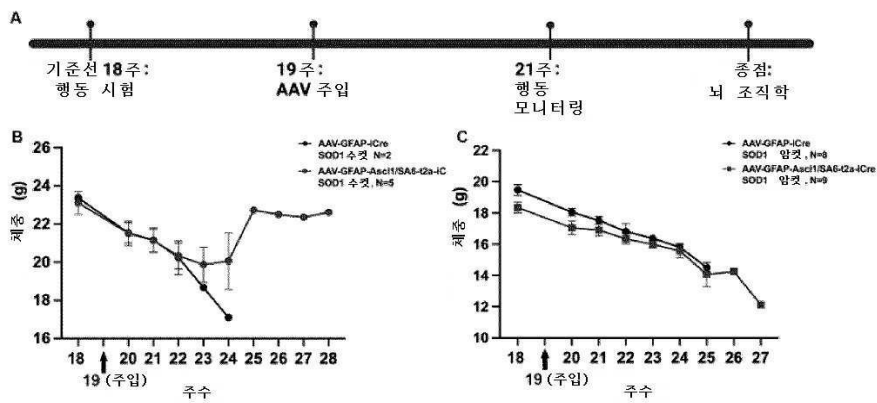
도면52



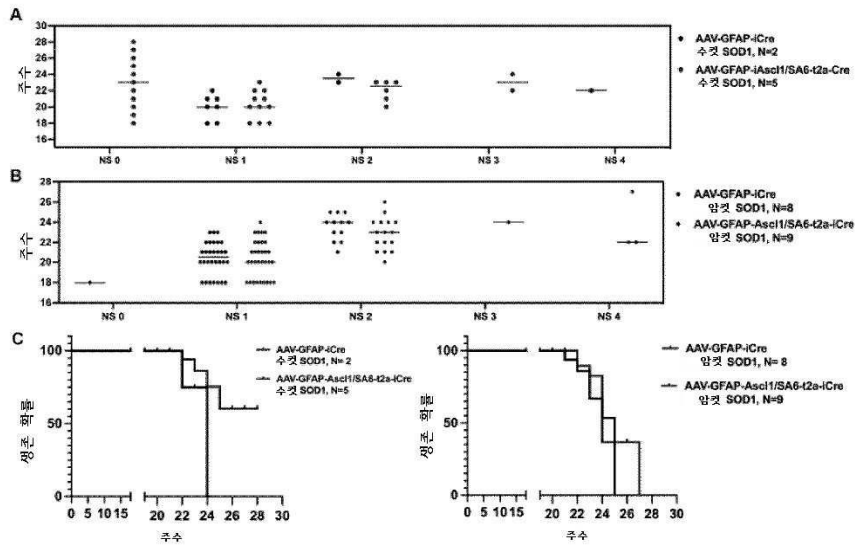
도면53



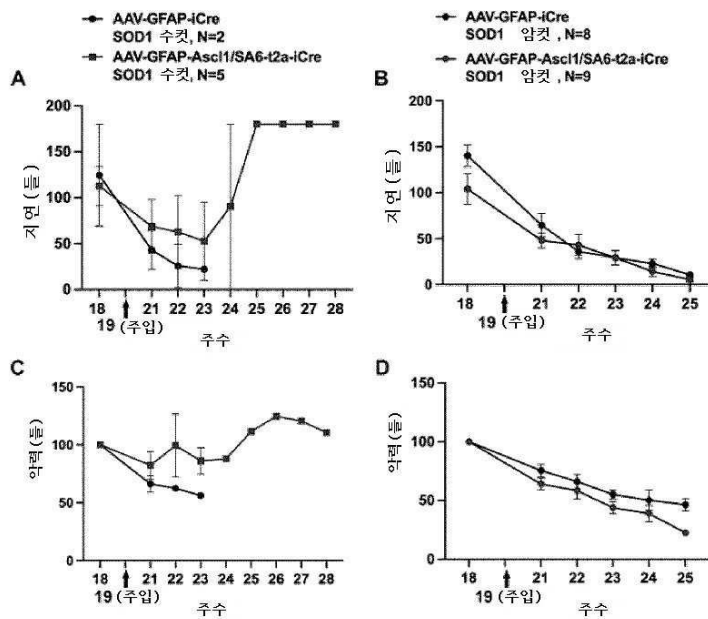
도면54



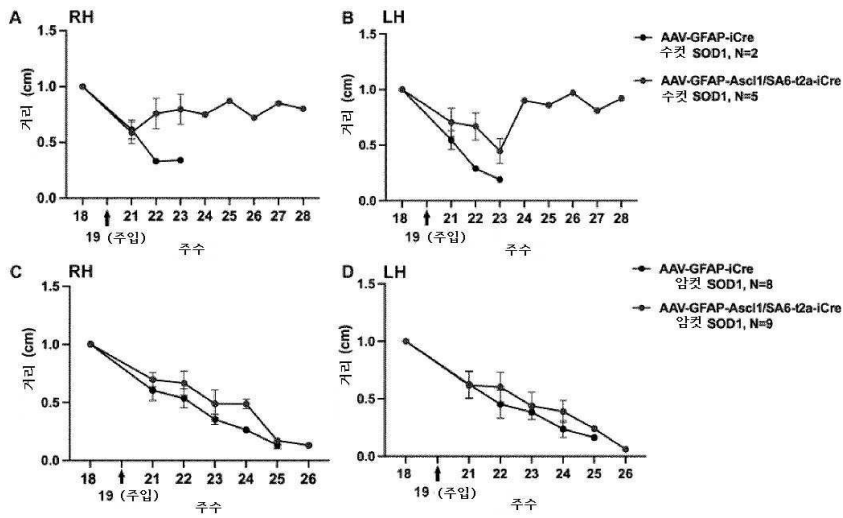
도면55



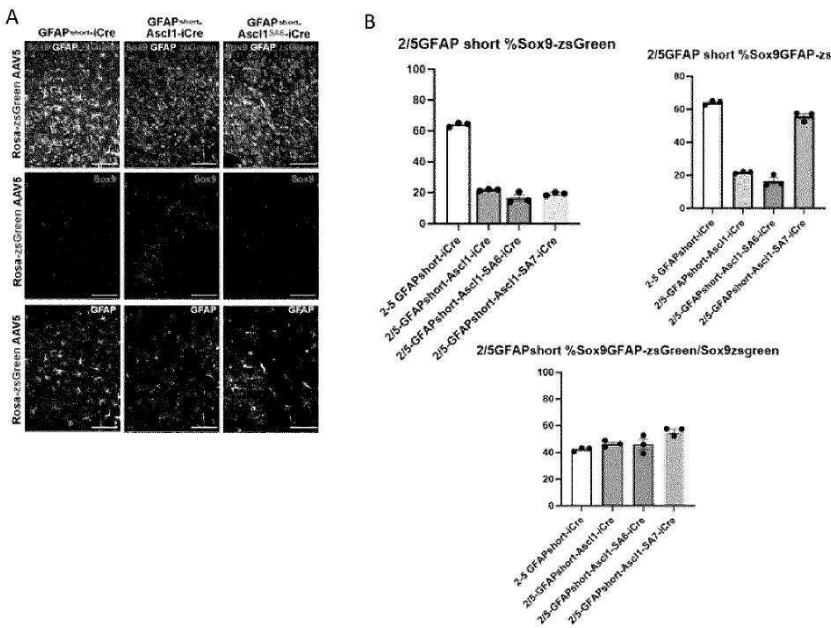
도면56



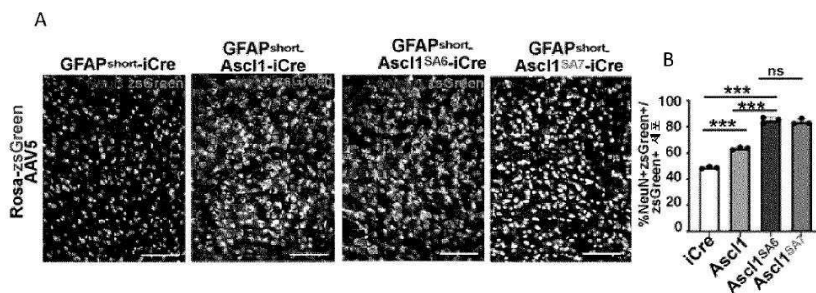
도면57



도면58



도면59



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Sunnybrook Research Institute

The Governing Council of the University of Toronto

<120> Method and Compositions for Neuronal Reprogramming

<130> WO/2022/256933

<140> PCT/CA2022/050923

<141> 2022-06-09

<150> US 63/208627

<151> 2021-06-09

<160> 55

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 237

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Ser Ser Ala Lys Met Glu Ser Gly Gly Ala Gly Gln Gln Pro

1 5 10 15

Gln Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Pro Pro Ala Ala Cys Phe Phe

20 25 30

Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln

35 40 45

Ser Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ala Pro

50 55 60

Gln Leu Arg Pro Ala Ala Asp Gly Gln Pro Ser Gly Gly Gly His Lys

65 70 75 80

Ser Ala Pro Lys Gln Val Lys Arg Gln Arg Ser Ser Ser Pro Glu Leu

85 90 95

Met Arg Cys Lys Arg Arg Leu Asn Phe Ser Gly Phe Gly Tyr Ser Leu

100 105 110

Pro Gln Gln Gln Pro Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg

115 120 125
Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Ala Thr Leu Arg Glu His
130 135 140

Val Pro Asn Gly Ala Ala Asn Lys Lys Met Ser Ser Lys Val Glu Thr
145 150 155 160
Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Gln Leu Leu Asp
165 170 175
Glu His Asp Ala Val Ser Ala Ala Phe Gln Ala Gly Val Leu Ser Pro
180 185 190
Thr Ile Ser Pro Asn Tyr Ser Asn Asp Leu Asn Ser Met Ala Gly Ser
195 200 205

Pro Val Ser Ser Tyr Ser Ser Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Pro Leu Ser
210 215 220

Pro Glu Glu Gln Glu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Trp Phe

225 230 235

<210> 2

<211> 231

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Ser Ser Gly Lys Met Glu Ser Gly Ala Gly Gln Gln Pro Gln

1 5 10 15

Pro Pro Gln Pro Phe Leu Pro Pro Ala Ala Cys Phe Phe Ala Thr Ala

20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ser Ala Gln Gln

35 40 45

Gln Gln Pro Gln Ala Pro Pro Gln Gln Ala Pro Gln Leu Ser Pro Val

50 55 60

Ala Asp Ser Gln Pro Ser Gly Gly Gly His Lys Ser Ala Ala Lys Gln

65 70 75 80

Val Lys Arg Gln Arg Ser Ser Ser Pro Glu Leu Met Arg Cys Lys Arg

85 90 95

Arg Leu Asn Phe Ser Gly Phe Gly Tyr Ser Leu Pro Gln Gln Gln Pro

100 105 110

Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu

115 120 125

Val Asn Leu Gly Phe Ala Thr Leu Arg Glu His Val Pro Asn Gly Ala

130 135 140

Ala Asn Lys Lys Met Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu

145 150 155 160

Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Gln Leu Leu Asp Glu His Asp Ala Val Ser

165 170 175

Ala Ala Phe Gln Ala Gly Val Leu Ser Pro Thr Ile Ser Pro Asn Tyr

180 185 190

Ser Asn Asp Leu Asn Ser Met Ala Gly Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ser

195 200 205

Ser Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Pro Leu Ser Pro Glu Glu Gln Glu Leu

210 215 220

Leu Asp Phe Thr Asn Trp Phe

225 230

<210> 3

<211> 231

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Glu Ser Ser Gly Lys Met Glu Ser Gly Ala Gly Gln Gln Pro Gln

1 5 10 15

Pro Pro Gln Pro Phe Leu Pro Pro Ala Ala Cys Phe Phe Ala Thr Ala

20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ser Ala Gln Gln

35 40 45

Gln Gln Pro Gln Ala Pro Pro Gln Gln Ala Pro Gln Leu Ala Pro Val

50 55 60
Ala Asp Ser Gln Pro Ser Gly Gly Gly His Lys Ser Ala Ala Lys Gln
65 70 75 80
Val Lys Arg Gln Arg Ser Ser Ala Pro Glu Leu Met Arg Cys Lys Arg
85 90 95
Arg Leu Asn Phe Ser Gly Phe Gly Tyr Ser Leu Pro Gln Gln Gln Pro
100 105 110

Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu
115 120 125
Val Asn Leu Gly Phe Ala Thr Leu Arg Glu His Val Pro Asn Gly Ala
130 135 140
Ala Asn Lys Lys Met Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu
145 150 155 160
Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Gln Leu Leu Asp Glu His Asp Ala Val Ser
165 170 175

Ala Ala Phe Gln Ala Gly Val Leu Ala Pro Thr Ile Ala Pro Asn Tyr
180 185 190
Ser Asn Asp Leu Asn Ser Met Ala Gly Ala Pro Val Ser Ser Tyr Ser
195 200 205
Ser Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Pro Leu Ala Pro Glu Glu Gln Glu Leu
210 215 220
Leu Asp Phe Thr Asn Trp Phe
225 230

<210> 4

<211> 696

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 4

atggagagct ctggcaagat ggagagtgga gccggccagc agccgcagcc cccgcagccc 60
ttctgcctc ccgcagcctg cttcttttgcg accgcggcgg cggcggcagc ggcggcggcc 120
gcggcagctc agagcgcgca gcagcaacag ccgcaggcgc cgccgcagca ggccgcgcag 180
ctggccccgg tggccgacag ccagccctca gggggcggtc acaagtcagc ggccaagcag 240

gtcaagcgcc agcgctcgtc cgctccggaa ctgatgcgct gcaaacgccg gctcaacttc 300
agcggcttcg gctacagcct gccacagcag cagccggccg ccgtggcgcg ccgcaacgag 360
cgcgagcgca accgggtcaa gttgggtcaac ctgggctttg ccaccctccg ggagcatgtc 420

cccaacggcg cggccaacaa gaagatggcc aaggtggaga cgctgcgctc ggcggtcag 480
tacatccgcg cgctgcagca gctgctggac gagcacgacg ccgtgagcgc tgcctttcag 540
gcgggcgtcc tggcgccac catcgcccc aactactcca acgacttgaa ctctatggcg 600
ggtgctccgg tctcgtccta ctctccgac gagggatcct acgacctct tgcgccagag 660
gaacaagagc tgctggactt taccaactgg ttctga 696

<210> 5

<211> 231

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Met Glu Ser Ser Gly Lys Met Glu Ser Gly Ala Gly Gln Gln Pro Gln

1 5 10 15
Pro Pro Gln Pro Phe Leu Pro Pro Ala Ala Cys Phe Phe Ala Thr Ala
20 25 30
Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ser Ala Gln Gln
35 40 45
Gln Gln Pro Gln Ala Pro Pro Gln Gln Ala Pro Gln Leu Ala Pro Val
50 55 60
Ala Asp Ser Gln Pro Ser Gly Gly Gly His Lys Ser Ala Ala Lys Gln

65 70 75 80
Val Lys Arg Gln Arg Ser Ser Ala Pro Glu Leu Met Arg Cys Lys Arg
85 90 95
Arg Leu Asn Phe Ser Gly Phe Gly Tyr Ser Leu Pro Gln Gln Gln Pro
100 105 110
Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu
115 120 125
Val Asn Leu Gly Phe Ala Thr Leu Arg Glu His Val Pro Asn Gly Ala

130 135 140

Ala Asn Lys Lys Met Ala Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu
 145 150 155 160
 Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Gln Leu Leu Asp Glu His Asp Ala Val Ser
 165 170 175
 Ala Ala Phe Gln Ala Gly Val Leu Ala Pro Thr Ile Ala Pro Asn Tyr
 180 185 190
 Ser Asn Asp Leu Asn Ser Met Ala Gly Ala Pro Val Ser Ser Tyr Ser

195 200 205
 Ser Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Pro Leu Ala Pro Glu Glu Gln Glu Leu
 210 215 220
 Leu Asp Phe Thr Asn Trp Phe

225 230

<210> 6

<211> 696

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

atggagagct ctggcaagat ggagagtgga gccggccagc agccgcagcc cccgcagccc 60
 ttctgcctc ccgcagcctg cttctttgcg accgcggcgg cggcggcagc ggcggcggcc 120
 gcggcagctc agagcgcgca gcagcaacag ccgcaggcgc cgccgcagca ggcgccgcag 180

ctggccccgg tggccgacag ccagccctca gggggcggtc acaagtcagc ggccaagcag 240
 gtcaagcgcc agcgctcgct cgctccggaa ctgatgcgct gcaaagccg gctcaacttc 300
 agcggcttcg gctacagcct gccacagcag cagccggccg ccgtggcgcg ccgcaacgag 360
 cgcgagcgca accgggtcaa gttggtcaac ctgggctttg ccaccctccg ggagcatgtc 420
 cccaacggcg cggccaacaa gaagatggcc aaggtggaga cgctgcgctc ggcggtcgag 480
 tacatccgcg cgctgcagca gctgctggac gagcacgacg cggtagcgcg tgcctttcag 540
 gcgggcgtcc tggcgccccc catcgcccc aactactcca acgacttgaa ctctatggcg 600

ggtgctccgg tctcgtccta ctctccgac gagggatcct acgacctct tgccccagag 660
 gaacaagagc tgctggactt taccaactgg ttctga 696

<210> 7

<211> 356

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro

1 5 10 15

Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu

20 25 30

Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Asp Leu Glu Thr Met Asn Ala

35 40 45

Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu

50 55 60

Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Gln Lys

65 70 75 80

Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu

85 90 95

Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn

100 105 110

Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val

115 120 125

Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg

130 135 140

Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Leu Arg Ser Gly

145 150 155 160

Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu

165 170 175

Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro

180 185 190

Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Gln Asp Met Pro Pro His Leu Pro

195 200 205

Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro

210 215 220

Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe

225 230 235 240
 His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe
 245 250 255
 Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro
 260 265 270
 Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu
 275 280 285
 Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro

 290 295 300
 Ala Ala Thr Leu Ala Gly Ala Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 Thr Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser Phe
 325 330 335
 Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn Ala
 340 345 350
 Ile Phe His Asp
 355
 <210> 8

 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 8
 Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro
 1 5 10 15
 Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu
 20 25 30
 Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Glu Leu Glu Ala Met Asn Ala
 35 40 45
 Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Glu Asp Glu

 50 55 60
 Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gln Lys
 65 70 75 80

Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu
85 90 95
Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn
100 105 110
Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val
115 120 125
Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg
130 135 140
Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Leu Arg Ser Gly
145 150 155 160
Lys Ser Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu
165 170 175
Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro
180 185 190
Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Pro Asp Met Pro Pro His Leu Pro
195 200 205
Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ser Pro
210 215 220
Gly Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe
225 230 235 240
His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe
245 250 255
Phe Glu Ser Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ser Pro Ser Phe Asp Gly Pro
260 265 270
Leu Ser Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu
275 280 285
Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro
290 295 300
Ala Ala Thr Leu Ala Gly Pro Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Ser
305 310 315 320
Gly Ala Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser

325 330 335
 Phe Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn
 340 345 350
 Ala Ile Phe His Asp
 355
 <210> 9
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 9
 Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro

 1 5 10 15
 Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu
 20 25 30
 Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Glu Leu Glu Ala Met Asn Ala
 35 40 45
 Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu
 50 55 60
 Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gln Lys

 65 70 75 80
 Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu
 85 90 95
 Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn
 100 105 110
 Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val
 115 120 125
 Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr Leu Arg

 130 135 140
 Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Leu Arg Ser Gly
 145 150 155 160
 Lys Ala Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu
 165 170 175

Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro

180 185 190

Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Pro Asp Met Pro Pro His Leu Pro

195 200 205

Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ala Pro

210 215 220

Gly Leu Pro Ala Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe

225 230 235 240

His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe

245 250 255

Phe Glu Ala Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ala Pro Ser Phe Asp Gly Pro

260 265 270

Leu Ala Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu

275 280 285

Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro

290 295 300

Ala Ala Thr Leu Ala Gly Pro Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Ser

305 310 315 320

Gly Ala Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser

325 330 335

Phe Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn

340 345 350

Ala Ile Phe His Asp

355

<210> 10

<211> 1074

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 10

atgaccaa atacacagcga gagcgggctg atgggcgagc ctcagcccca aggtcccca 60

agctggacag atgagtgtct cagttctcag gacgaggaac acgaggcaga caagaaagag 120

gacgagcttg aagccatgaa tgcagaggag gactctctga gaaacggggg agaggaggag 180

gaggaagatg aggatctaga ggaagaggag gaagaagaag aggaggagga ggatcaaaag 240

cccaagagac ggggtcccaa aaagaaaaag atgaccaagg cgccctaga acgttttaa 300

ttaaggcgca tgaaggccaa cgcccgag cggaaccgca tgcacgggct gaacgcggcg 360

ctggacaacc tgcgaaggt ggtaccttgc tactccaaga ccagaaaact gtctaaaata 420

gagacactgc gcttgccaa gaactacatc tgggctctgt cagagatcct gcgctcaggc 480

aaagcccctg atctggtctc ctctgtacag acgctctgca aaggtttgtc ccagcccact 540

accaatttgg tcgccggctg cctgcagctc aacctcgga ctttcttgcc tgagcagaac 600

ccggacatgc ccccgcatct gccaacgcc agcgttctt tcccgggtgca tccctactcc 660

taccaggccc ctggactgcc cgccccgcc tacggcacca tggacagctc ccacgtcttc 720

cagctcaagc cgccgccaca cgcctacagc gcagctctgg agccttctt tgaagccccc 780

ctaactgact gcaccgccc ttcctttgac ggacccctcg ccccgccgct cagcatcaat 840

ggcaacttct ctttcaaaca cgaaccatcc gccgagttg aaaaaatta tgcctttacc 900

atgcactacc ctgcagcgac gctggcaggg ccccaaagcc acggatcaat cttctcttcc 960

ggtgccgctg cccctcgctg cgagatcccc atagacaaca ttatgtcttt cgatagccat 1020

tcgcatcatg agcgagtcag gagtgccag cttaatgcca tctttcacga ttag 1074

<210> 11

<211> 357

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Met Thr Lys Ser Tyr Ser Glu Ser Gly Leu Met Gly Glu Pro Gln Pro

1 5 10 15

Gln Gly Pro Pro Ser Trp Thr Asp Glu Cys Leu Ser Ser Gln Asp Glu

20 25 30

Glu His Glu Ala Asp Lys Lys Glu Asp Glu Leu Glu Ala Met Asn Ala

35 40 45

Glu Glu Asp Ser Leu Arg Asn Gly Gly Glu Glu Glu Glu Asp Glu

50 55 60

Asp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gln Lys

65 70 75 80

Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala Arg Leu
85 90 95

Glu Arg Phe Lys Leu Arg Arg Met Lys Ala Asn Ala Arg Glu Arg Asn
100 105 110

Arg Met His Gly Leu Asn Ala Ala Leu Asp Asn Leu Arg Lys Val Val
115 120 125

Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ala Lys Ile Glu Thr Leu Arg
130 135 140

Leu Ala Lys Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Ile Leu Arg Ser Gly
145 150 155 160

Lys Ala Pro Asp Leu Val Ser Phe Val Gln Thr Leu Cys Lys Gly Leu
165 170 175

Ser Gln Pro Thr Thr Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu Asn Pro
180 185 190

Arg Thr Phe Leu Pro Glu Gln Asn Pro Asp Met Pro Pro His Leu Pro
195 200 205

Thr Ala Ser Ala Ser Phe Pro Val His Pro Tyr Ser Tyr Gln Ala Pro
210 215 220

Gly Leu Pro Ala Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asp Ser Ser His Val Phe
225 230 235 240

His Val Lys Pro Pro Pro His Ala Tyr Ser Ala Ala Leu Glu Pro Phe
245 250 255

Phe Glu Ala Pro Leu Thr Asp Cys Thr Ala Pro Ser Phe Asp Gly Pro
260 265 270

Leu Ala Pro Pro Leu Ser Ile Asn Gly Asn Phe Ser Phe Lys His Glu
275 280 285

Pro Ser Ala Glu Phe Glu Lys Asn Tyr Ala Phe Thr Met His Tyr Pro
290 295 300

Ala Ala Thr Leu Ala Gly Pro Gln Ser His Gly Ser Ile Phe Ser Ser
305 310 315 320

Gly Ala Ala Ala Pro Arg Cys Glu Ile Pro Ile Asp Asn Ile Met Ser

325	330	335	
Phe Asp Ser His Ser His His Glu Arg Val Met Ser Ala Gln Leu Asn			
340	345	350	
Ala Ile Phe His Asp			
355			
<210> 12			
<211> 1074			
<212> DNA			
<213> Mus musculus			
<400> 12			

atgaccaa	at	catacagcga	gagcgggctg	atgggcgagc	ctcagcccca	aggtcccca	60
agctggacag	atgagtgtct	cagttctcag	gacgaggaac	acgaggcaga	caagaaagag		120
gacgagcttg	aagccatgaa	tgcagaggag	gactctctga	gaaacggggg	agaggaggag		180
gaggaagatg	aggatctaga	ggaagaggag	gaagaagaag	aggaggagga	ggatcaaaag		240
ccaagagac	ggggtcccaa	aaagaaaaag	atgaccaagg	cgcgccctaga	acgttttaaa		300
ttaaggcgca	tgaaggccaa	cgcccgcgag	cggaaccgca	tgcacgggct	gaacgcggcg		360
ctggacaacc	tgcgcaaggt	ggtaccttgc	tactccaaga	cccagaaact	ggctaaaata		420
gagacactgc	gcttggccaa	gaactacatc	tgggctctgt	cagagatcct	gcgctcaggc		480
aaagcccctg	atctggtctc	cttcgtacag	acgctctgca	aaggtttgtc	ccagcccact		540
accaatttgg	tcgccggctg	cctgcagctc	aacctcgga	ctttcttgcc	tgagcagaac		600
ccggacatgc	ccccgcatct	gccaaaccgc	agcgcttctt	tcccgggtgca	tcctactcc		660
taccaggccc	ctggactgcc	cgccccgccc	tacggcacca	tggacagctc	ccacgtcttc		720
cacgtcaagc	cgccgccaca	cgcctacagc	gcagctctgg	agcccttctt	tgaagcccc		780
ctaactgact	gcaccgcccc	ttcctttgac	ggaccctctg	ccccgccgct	cagcatcaat		840
ggcaacttct	ctttcaaaca	cgaaccatcc	gccgagtttg	aaaaaaatta	tgcctttacc		900
atgcactacc	ctgcagcgac	gctggcaggg	ccccaaagcc	acggatcaat	cttctcttcc		960
ggtgccgctg	cccctcgctg	cgagatcccc	atagacaaca	ttagtctttt	cgatagccat		1020
tgcgcatcatg	agcgagtcat	gagtggccag	cttaatgcca	tctttcacga	ttag		1074
<210> 13							
<211> 331							
<212> PRT							
<213> Homo sapiens							

<400> 13

Met Ser Lys Thr Phe Val Lys Ser Lys Glu Met Gly Glu Leu Val Asn
1 5 10 15

Thr Pro Ser Trp Met Asp Lys Gly Leu Gly Ser Gln Asn Glu Val Lys
20 25 30

Glu Glu Glu Ser Arg Pro Gly Thr Tyr Gly Met Leu Ser Ser Leu Thr
35 40 45

Glu Glu His Asp Ser Ile Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gly
50 55 60

Glu Lys Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala
65 70 75 80

Arg Leu Glu Arg Phe Arg Ala Arg Arg Val Lys Ala Asn Ala Arg Glu
85 90 95

Arg Thr Arg Met His Gly Leu Asn Asp Ala Leu Asp Asn Leu Arg Arg
100 105 110

Val Met Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr
115 120 125

Leu Arg Leu Ala Arg Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Val Leu Glu
130 135 140

Thr Gly Gln Thr Pro Glu Gly Lys Gly Phe Val Glu Met Leu Cys Lys
145 150 155 160

Gly Leu Ser Gln Pro Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu
165 170 175

Gly Pro Gln Ser Val Leu Leu Glu Lys His Glu Asp Lys Ser Pro Ile
180 185 190

Cys Asp Ser Ala Ile Ser Val His Asn Phe Asn Tyr Gln Ser Pro Gly
195 200 205

Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly His Met Glu Thr His Leu Leu His Leu
210 215 220

Lys Pro Gln Val Phe Lys Ser Leu Gly Glu Ser Ser Phe Gly Ser His
225 230 235 240

Leu Pro Asp Cys Ser Thr Pro Pro Tyr Glu Gly Pro Leu Thr Pro Pro
 245 250 255
 Leu Ser Ile Ser Gly Asn Phe Ser Leu Lys Gln Asp Gly Ser Pro Asp
 260 265 270

 Leu Glu Lys Ser Tyr Ser Phe Met Pro His Tyr Pro Ser Ser Ser Leu
 275 280 285
 Ser Ser Gly His Val His Ser Thr Pro Phe Gln Ala Gly Thr Pro Arg
 290 295 300
 Tyr Asp Val Pro Ile Asp Met Ser Tyr Asp Ser Tyr Pro His His Gly
 305 310 315 320
 Ile Gly Thr Gln Leu Asn Thr Val Phe Thr Glu
 325 330

 <210> 14
 <211> 330

 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 14

 Met Ala Lys Met Tyr Met Lys Ser Lys Asp Met Val Glu Leu Val Asn
 1 5 10 15
 Thr Gln Ser Trp Met Asp Lys Gly Leu Ser Ser Gln Asn Glu Met Lys
 20 25 30
 Glu Gln Glu Arg Arg Pro Gly Ser Tyr Gly Met Leu Gly Thr Leu Thr
 35 40 45
 Glu Glu His Asp Ser Ile Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gly
 50 55 60

 Asp Lys Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala
 65 70 75 80
 Arg Leu Glu Arg Phe Arg Ala Arg Arg Val Lys Ala Asn Ala Arg Glu
 85 90 95
 Arg Thr Arg Met His Gly Leu Asn Asp Ala Leu Asp Asn Leu Arg Arg
 100 105 110
 Val Met Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr

115 120 125
 Leu Arg Leu Ala Arg Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Val Leu Glu
 130 135 140
 Thr Gly Gln Thr Leu Glu Gly Lys Gly Phe Val Glu Met Leu Cys Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Ser Gln Pro Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu
 165 170 175
 Gly Pro Gln Ser Thr Leu Leu Glu Lys His Glu Glu Lys Ser Ser Ile
 180 185 190
 Cys Asp Ser Thr Ile Ser Val His Ser Phe Asn Tyr Gln Ser Pro Gly
 195 200 205
 Leu Pro Ser Pro Pro Tyr Gly His Met Glu Thr His Ser Leu His Leu
 210 215 220
 Lys Pro Gln Pro Phe Lys Ser Leu Gly Asp Ser Phe Gly Ser His Pro
 225 230 235 240
 Pro Asp Cys Ser Thr Pro Pro Tyr Glu Gly Pro Leu Thr Pro Pro Leu
 245 250 255
 Ser Ile Ser Gly Asn Phe Ser Leu Lys Gln Asp Gly Ser Pro Asp Leu
 260 265 270
 Glu Lys Ser Tyr Asn Phe Met Pro His Tyr Thr Ser Ala Ser Leu Ser
 275 280 285
 Ser Gly His Val His Ser Thr Pro Phe Gln Thr Gly Thr Pro Arg Tyr
 290 295 300
 Asp Val Pro Val Asp Leu Ser Tyr Asp Ser Tyr Ser His His Ser Ile
 305 310 315 320
 Gly Thr Gln Leu Asn Thr Ile Phe Ser Asp
 325 330
 <210> 15
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15

Met Ala Lys Met Tyr Met Lys Ser Lys Asp Met Val Glu Leu Val Asn

1 5 10 15

Thr Gln Ser Trp Met Asp Lys Gly Leu Ser Ser Gln Asn Glu Met Lys

20 25 30

Glu Gln Glu Arg Arg Pro Gly Ser Tyr Gly Met Leu Gly Thr Leu Thr

35 40 45

Glu Glu His Asp Ser Ile Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gly

50 55 60

Asp Lys Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala

65 70 75 80

Arg Leu Glu Arg Phe Arg Ala Arg Arg Val Lys Ala Asn Ala Arg Glu

85 90 95

Arg Thr Arg Met His Gly Leu Asn Asp Ala Leu Asp Asn Leu Arg Arg

100 105 110

Val Met Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ser Lys Ile Glu Thr

115 120 125

Leu Arg Leu Ala Arg Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Val Leu Glu

130 135 140

Thr Gly Gln Thr Leu Glu Gly Lys Gly Phe Val Glu Met Leu Cys Lys

145 150 155 160

Gly Leu Ser Gln Pro Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu

165 170 175

Gly Pro Gln Ser Thr Leu Leu Glu Lys His Glu Glu Lys Ser Ser Ile

180 185 190

Cys Asp Ser Thr Ile Ser Val His Ser Phe Asn Tyr Gln Ala Pro Gly

195 200 205

Leu Pro Ala Pro Pro Tyr Gly His Met Glu Thr His Ser Leu His Leu

210 215 220

Lys Pro Gln Pro Phe Lys Ser Leu Gly Asp Ser Phe Gly Ser His Pro

225 230 235 240

Pro Asp Cys Ser Ala Pro Pro Tyr Glu Gly Pro Leu Ala Pro Pro Leu
245 250 255
Ser Ile Ser Gly Asn Phe Ser Leu Lys Gln Asp Gly Ala Pro Asp Leu
260 265 270
Glu Lys Ser Tyr Asn Phe Met Pro His Tyr Thr Ser Ala Ser Leu Ser
275 280 285
Ser Gly His Val His Ser Ala Pro Phe Gln Thr Gly Ala Pro Arg Tyr
290 295 300

Asp Val Pro Val Asp Leu Ser Tyr Asp Ser Tyr Ser His His Ser Ile
305 310 315 320
Gly Thr Gln Leu Asn Thr Ile Phe Ser Asp
325 330

<210> 16

<211> 993

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

atggcaaaaa tgtatatgaa atccaaggac atggtggagc tggccaacac acaatcctgg 60
atggacaaaag gtctgagctc tcaaaatgag atgaaggagc aagagagaag accgggctct 120
tatggaatgc tcggaacctt aactgaagag catgacagta ttgaggagga tgaagaagag 180

gaagaagatg gagataaacc taaaagaaga ggtccaaga aaaagaagat gactaaagct 240
cgccttgaaa gattcagggc tcgaagagtc aaggccaatg ctagagaacg gacccggatg 300
catggcctga atgatgcctt ggataatctt aggagagtca tgccatgtta ctctaaaact 360
caaaagcttt ccaagataga gactcttga ctggcaagga actacatctg ggccttgtct 420
gaagtcttgg agacttgtca gacacttgaa gggaagggat ttgtagagat gctatgtaaa 480
ggtctctctc aaccacaag caacctgggt gctggatgcc tccaactggg gcctcaatct 540
accctcttgg agaagcatga ggaaaaatct tcaatttgtg actctactat ctctgtccac 600

agcttcaact atcaggetcc agggctcccc gccctcctt atggccatat ggaaacacat 660
tctctccatc tcaagcctca accatttaag agtttgggtg actcttttgg gagccatcca 720
cctgactgca gtgcccccc ttatgagggt ccaactgcac caccctgag cattagtggc 780
aacttctcct taaagcaaga cggcgccccct gatttggaat aatcctacaa ttatcatgcca 840
cattatacct ctgcaagtct aagttcaggg catgtgcatt cagctccctt tcagactggc 900

gtctcccgct atgatgttcc ttagacctg agctatgatt cctactccca ccatagcatt 960
ggaactcagc tcaatacgat cttctctgat tag 993

<210> 17

<211> 330

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Met Ala Lys Met Tyr Met Lys Ser Lys Asp Met Val Glu Leu Val Asn

1 5 10 15

Thr Gln Ser Trp Met Asp Lys Gly Leu Ser Ser Gln Asn Glu Met Lys

20 25 30

Glu Gln Glu Arg Arg Pro Gly Ser Tyr Gly Met Leu Gly Thr Leu Thr

35 40 45

Glu Glu His Asp Ser Ile Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Gly

50 55 60

Asp Lys Pro Lys Arg Arg Gly Pro Lys Lys Lys Lys Met Thr Lys Ala

65 70 75 80

Arg Leu Glu Arg Phe Arg Ala Arg Arg Val Lys Ala Asn Ala Arg Glu

85 90 95

Arg Thr Arg Met His Gly Leu Asn Asp Ala Leu Asp Asn Leu Arg Arg

100 105 110

Val Met Pro Cys Tyr Ser Lys Thr Gln Lys Leu Ala Lys Ile Glu Thr

115 120 125

Leu Arg Leu Ala Arg Asn Tyr Ile Trp Ala Leu Ser Glu Val Leu Glu

130 135 140

Thr Gly Gln Thr Leu Glu Gly Lys Gly Phe Val Glu Met Leu Cys Lys

145 150 155 160

Gly Leu Ser Gln Pro Thr Ser Asn Leu Val Ala Gly Cys Leu Gln Leu

165 170 175

Gly Pro Gln Ser Thr Leu Leu Glu Lys His Glu Glu Lys Ser Ser Ile

180 185 190

Cys Asp Ser Thr Ile Ser Val His Ser Phe Asn Tyr Gln Ala Pro Gly
 195 200 205
 Leu Pro Ala Pro Pro Tyr Gly His Met Glu Thr His Ser Leu His Leu
 210 215 220
 Lys Pro Gln Pro Phe Lys Ser Leu Gly Asp Ser Phe Gly Ser His Pro
 225 230 235 240
 Pro Asp Cys Ser Ala Pro Pro Tyr Glu Gly Pro Leu Ala Pro Pro Leu

245 250 255
 Ser Ile Ser Gly Asn Phe Ser Leu Lys Gln Asp Gly Ala Pro Asp Leu
 260 265 270
 Glu Lys Ser Tyr Asn Phe Met Pro His Tyr Thr Ser Ala Ser Leu Ser
 275 280 285
 Ser Gly His Val His Ser Ala Pro Phe Gln Thr Gly Ala Pro Arg Tyr
 290 295 300
 Asp Val Pro Val Asp Leu Ser Tyr Asp Ser Tyr Ser His His Ser Ile

305 310 315 320
 Gly Thr Gln Leu Asn Thr Ile Phe Ser Asp
 325 330

<210> 18

<211> 993

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 18

atggcaaaaa tgtatatgaa atccaaggac atggtggagc tggtaaacac acaatcctgg	60
atggacaaag gtctgagctc tcaaaatgag atgaaggagc aagagagaag accgggctct	120
tatggaatgc tcggaacctt aactgaagag catgacagta ttgaggagga tgaagaagag	180
gaagaagatg gagataaacc taaaagaaga ggtccaaga aaaagaagat gactaaagct	240
cgccctgaaa gattcagggc tcgaagagtc aaggccaatg ctagagaacg gacccggatg	300
catggcctga atgatgcctt ggataatctt aggagagtca tgccatgtta ctctaaaact	360
caaaagcttg ccaagataga gactcttcga ctggcaagga actacatctg ggccttgtct	420
gaagtcctgg agactggta gacacttgaa gggaagggat ttgtagagat gctatgtaaa	480
ggtctctctc aaccacaag caacctggtt gctggatgcc tccaactggg gcctcaatct	540

accctcctgg agaagcatga ggaaaaatct tcaatttgtg actctactat ctctgtccac 600
agcttcaact atcaggtccc agggctcccc gccctcctt atggccatat ggaaacacat 660

ttctctccatc tcaagcctca accattttaag agtttgggtg actcttttgg gagccatcca 720
cctgactgca gtgccccccc ttatgagggg cactcgcac caccctgag cattagtggc 780
aatttctcct taaagcaaga cggcgccccct gatttggaaa aatcctacaa ttatcatgcca 840
cattatacct ctgcaagtct aagttcaggg catgtgcatt cagctccctt tcagactggc 900
gtcccccgct atgatgttcc ttagacctg agctatgatt cctactccca ccatagcatt 960
ggaactcagc tcaatacgat cttctctgat tag 993

<210> 19

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Phe Val Lys Ser Glu Thr Leu Glu Leu Lys Glu Glu Glu Asp Val

1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Gly Ser Ala Ser Pro Ala Leu Ala Ala Leu Thr Pro

20 25 30

Leu Ser Ser Ser Ala Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Pro Gly Ala Ser

35 40 45

Gly Gly Ala Arg Arg Gln Arg Gly Ala Glu Ala Gly Gln Gly Ala Arg

50 55 60

Gly Gly Val Ala Ala Gly Ala Glu Gly Cys Arg Pro Ala Arg Leu Leu

65 70 75 80

Gly Leu Val His Asp Cys Lys Arg Arg Pro Ser Arg Ala Arg Ala Val

85 90 95

Ser Arg Gly Ala Lys Thr Ala Glu Thr Val Gln Arg Ile Lys Lys Thr

100 105 110

Arg Arg Leu Lys Ala Asn Asn Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asn Leu

115 120 125

Asn Ala Ala Leu Asp Ala Leu Arg Glu Val Leu Pro Thr Phe Pro Glu

130 135 140

Asp Ala Lys Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Phe Ala His Asn Tyr
 145 150 155 160
 Ile Trp Ala Leu Thr Glu Thr Leu Arg Leu Ala Asp His Cys Gly Gly
 165 170 175
 Gly Gly Gly Gly Leu Pro Gly Ala Leu Phe Ser Glu Ala Val Leu Leu
 180 185 190

Ser Pro Gly Gly Ala Ser Ala Ala Leu Ser Ser Ser Gly Asp Ser Pro
 195 200 205
 Ser Pro Ala Ser Thr Trp Ser Cys Thr Asn Ser Pro Ala Pro Ser Ser
 210 215 220
 Ser Val Ser Ser Asn Ser Thr Ser Pro Tyr Ser Cys Thr Leu Ser Pro
 225 230 235 240
 Ala Ser Pro Ala Gly Ser Asp Met Asp Tyr Trp Gln Pro Pro Pro Pro
 245 250 255

Asp Lys His Arg Tyr Ala Pro His Leu Pro Ile Ala Arg Asp Cys Ile
 260 265 270

<210> 20

<211> 263

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Met Phe Val Lys Ser Glu Thr Leu Glu Leu Lys Glu Glu Glu Glu Val
 1 5 10 15
 Leu Met Leu Leu Gly Ser Ala Ser Pro Ala Ser Ala Thr Leu Thr Pro
 20 25 30
 Met Ser Ser Ser Ala Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Arg Arg Pro

35 40 45
 Gly Ser Ala Arg Gly Gln Arg Gly Ala Glu Ala Gly Gln Gly Val Gln
 50 55 60
 Gly Ser Pro Ala Ser Gly Ala Gly Gly Cys Arg Pro Gly Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Gly Leu Met His Glu Cys Lys Arg Arg Pro Ser Arg Ser Arg Ala Val

85 90 95
Ser Arg Gly Ala Lys Thr Ala Glu Thr Val Gln Arg Ile Lys Lys Thr

100 105 110
Arg Arg Leu Lys Ala Asn Asn Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asn Leu

115 120 125
Asn Ala Ala Leu Asp Ala Leu Arg Glu Val Leu Pro Thr Phe Pro Glu

130 135 140
Asp Ala Lys Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Phe Ala His Asn Tyr

145 150 155 160
Ile Trp Ala Leu Thr Glu Thr Leu Arg Leu Ala Asp His Cys Ala Gly

165 170 175
Ala Gly Gly Leu Gln Gly Ala Leu Phe Thr Glu Ala Val Leu Leu Ser

180 185 190
Pro Gly Ala Ala Leu Gly Ala Ser Gly Asp Ser Pro Ser Pro Pro Ser

195 200 205
Ser Trp Ser Cys Thr Asn Ser Pro Ala Ser Ser Ser Asn Ser Thr Ser

210 215 220
Pro Tyr Ser Cys Thr Leu Ser Pro Ala Ser Pro Gly Ser Asp Val Asp

225 230 235 240
Tyr Trp Gln Pro Pro Pro Pro Glu Lys His Arg Tyr Ala Pro His Leu

245 250 255
Pro Leu Ala Arg Asp Cys Ile

260

<210> 21

<211> 263

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Met Phe Val Lys Ser Glu Thr Leu Glu Leu Lys Glu Glu Glu Glu Val

1 5 10 15

Leu Met Leu Leu Gly Ser Ala Ala Pro Ala Ser Ala Thr Leu Ala Pro

20 25 30
 Met Ser Ser Ser Ala Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Arg Arg Pro
 35 40 45
 Gly Ser Ala Arg Gly Gln Arg Gly Ala Glu Ala Gly Gln Gly Val Gln
 50 55 60
 Gly Ala Pro Ala Ser Gly Ala Gly Gly Cys Arg Pro Gly Arg Leu Leu
 65 70 75 80
 Gly Leu Met His Glu Cys Lys Arg Arg Pro Ser Arg Ser Arg Ala Val

 85 90 95
 Ser Arg Gly Ala Lys Thr Ala Glu Thr Val Gln Arg Ile Lys Lys Thr
 100 105 110
 Arg Arg Leu Lys Ala Asn Asn Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asn Leu
 115 120 125
 Asn Ala Ala Leu Asp Ala Leu Arg Glu Val Leu Pro Thr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Asp Ala Lys Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Phe Ala His Asn Tyr

 145 150 155 160
 Ile Trp Ala Leu Thr Glu Thr Leu Arg Leu Ala Asp His Cys Ala Gly
 165 170 175
 Ala Gly Gly Leu Gln Gly Ala Leu Phe Thr Glu Ala Val Leu Leu Ala
 180 185 190
 Pro Gly Ala Ala Leu Gly Ala Ser Gly Asp Ala Pro Ala Pro Pro Ser
 195 200 205
 Ser Trp Ser Cys Thr Asn Ala Pro Ala Ser Ser Ser Asn Ser Thr Ala

 210 215 220
 Pro Tyr Ser Cys Thr Leu Ala Pro Ala Ala Pro Gly Ser Asp Val Asp
 225 230 235 240
 Tyr Trp Gln Pro Pro Pro Pro Glu Lys His Arg Tyr Ala Pro His Leu
 245 250 255
 Pro Leu Ala Arg Asp Cys Ile
 260
 <210> 22

<211> 792

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

atgttcgtca aatctgagac tctggagttg aaggaggaag aggaggtact gatgctgctg 60

ggctcggctg ccccgccctc ggcgacctg gccccgatgt cctccagcgc ggacgaggag 120

gaggacgagg agctgcgccg gccgggctcc gcgcgtgggc agcgtggagc ggaagccggg 180

caggggggtgc agggcgctcc ggcgctgggt gccgggggtt gccggccagg gcggctgctg 240

ggcctgatgc acgagtcaa gcgtcgcccg tcgcgtcac gggccgtctc ccgaggtgcc 300

aagacggcgg agacggtgca gcgcatcaag aagaccgca ggctcaaggc caacaaccgc 360

gagcgcaacc gcatgcacaa cctaaacgcc gcgtggagc cgctgcgca ggtgctgccc 420

accttccccg aggatgcaa gctcacgaag atcgagacgc tgcgttcgc ccacaattac 480

atctgggcgc tcaccgagac tctgcgctg gcggaccact gcgccggcgc cgggtggcctc 540

caggggggcgc tcttcacgga ggcggtgctc ctggccccgg gagctgcgt cggcgccagc 600

ggggagcccc ctgtccacc ttctcctgg agctgcacca acgccccggc gtcacctcc 660

aactccagg cccatacag ctgcacttta gcgccgctg cccccgggtc agacgtggac 720

tactggcagc cccacctcc ggagaagcat cgttatgcgc ctacctgcc cctcgccagg 780

gactgtatct ag 792

<210> 23

<211> 263

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Met Phe Val Lys Ser Glu Thr Leu Glu Leu Lys Glu Glu Glu Glu Val

1 5 10 15

Leu Met Leu Leu Gly Ser Ala Ala Pro Ala Ser Ala Thr Leu Ala Pro

20 25 30

Met Ser Ser Ser Ala Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Arg Arg Pro

35 40 45

Gly Ser Ala Arg Gly Gln Arg Gly Ala Glu Ala Gly Gln Gly Val Gln

50 55 60

Gly Ala Pro Ala Ser Gly Ala Gly Gly Cys Arg Pro Gly Arg Leu Leu
65 70 75 80
Gly Leu Met His Glu Cys Lys Arg Arg Pro Ser Arg Ser Arg Ala Val
85 90 95
Ser Arg Gly Ala Lys Thr Ala Glu Thr Val Gln Arg Ile Lys Lys Thr
100 105 110
Arg Arg Leu Lys Ala Asn Asn Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asn Leu
115 120 125

Asn Ala Ala Leu Asp Ala Leu Arg Glu Val Leu Pro Thr Phe Pro Glu
130 135 140
Asp Ala Lys Leu Ala Lys Ile Glu Thr Leu Arg Phe Ala His Asn Tyr
145 150 155 160
Ile Trp Ala Leu Thr Glu Thr Leu Arg Leu Ala Asp His Cys Ala Gly
165 170 175
Ala Gly Gly Leu Gln Gly Ala Leu Phe Thr Glu Ala Val Leu Leu Ala
180 185 190

Pro Gly Ala Ala Leu Gly Ala Ser Gly Asp Ala Pro Ala Pro Pro Ser
195 200 205
Ser Trp Ser Cys Thr Asn Ala Pro Ala Ser Ser Ser Asn Ser Thr Ala
210 215 220
Pro Tyr Ser Cys Thr Leu Ala Pro Ala Ala Pro Gly Ser Asp Val Asp
225 230 235 240
Tyr Trp Gln Pro Pro Pro Pro Glu Lys His Arg Tyr Ala Pro His Leu
245 250 255

Pro Leu Ala Arg Asp Cys Ile
260

<210> 24

<211> 792

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24

atgttcgtca aatctgagac tctggagttg aaggaggaag aggaggtact gatgctgctg

60

ggctcggctg ccccgccctc ggcgacctg gccccgatgt cctccagcgc ggacgaggag 120
gaggacgagg agctgcgccg gccgggctcc gcgctgggc agcgtggagc ggaagccggg 180
cagggggtgc agggcgctcc ggcgtcgggt gccgggggtt gccggccagg gcggctgctg 240
ggcctgatgc acgagtgcaa gcgtcgcccc tcgctcacac gggccgtctc ccgaggtgcc 300

aagacggcgg agacggtgca gcgcatcaag aagacccgca ggctcaaggc caacaaccgc 360
gagcgcaacc gcatgcacaa cctaaacgcc gcgctggacg cgctgcgca ggtgctgccc 420
accttcccc aggatgcaa gctcgcgaag atcgagacgc tgcgttctgc ccacaattac 480
atctgggcgc tcaccgagac tctgcgctg gcggaccact gcgccggcgc cggtgccctc 540
cagggggcgc tcttcacgga ggcggtgctc ctggccccgg gagctgcgct cggcgccagc 600
ggggacgccc ctgctccacc ttctcctgg agctgcacca acgccccggc gtcacctcc 660
aactccagg ccccatagac ctgcacttta gcgccgctg ccccgggtc agacgtggac 720

tactggcagc cccacctcc ggagaagcat cgttatgcgc ctcacctgcc cctcgccagg 780
gactgtatct ag 792

<210> 25

<211> 263

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Met Phe Val Lys Ser Glu Thr Leu Glu Leu Lys Glu Glu Glu Glu Val

1 5 10 15

Leu Met Leu Leu Gly Ser Ala Ala Pro Ala Ser Ala Thr Leu Thr Pro

20 25 30

Met Ser Ser Ser Ala Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Leu Arg Arg Pro

35 40 45

Gly Ser Ala Arg Gly Gln Arg Gly Ala Glu Ala Gly Gln Gly Val Gln

50 55 60

Gly Ala Pro Ala Ser Gly Ala Gly Gly Cys Arg Pro Gly Arg Leu Leu

65 70 75 80

Gly Leu Met His Glu Cys Lys Arg Arg Pro Ser Arg Ser Arg Ala Val

85 90 95

Ser Arg Gly Ala Lys Thr Ala Glu Thr Val Gln Arg Ile Lys Lys Thr

100 105 110
 Arg Arg Leu Lys Ala Asn Asn Arg Glu Arg Asn Arg Met His Asn Leu
 115 120 125
 Asn Ala Ala Leu Asp Ala Leu Arg Glu Val Leu Pro Thr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Asp Ala Lys Leu Thr Lys Ile Glu Thr Leu Arg Phe Ala His Asn Tyr
 145 150 155 160
 Ile Trp Ala Leu Thr Glu Thr Leu Arg Leu Ala Asp His Cys Ala Gly
 165 170 175
 Ala Gly Gly Leu Gln Gly Ala Leu Phe Thr Glu Ala Val Leu Leu Ala
 180 185 190
 Pro Gly Ala Ala Leu Gly Ala Ser Gly Asp Ala Pro Ala Pro Pro Ser
 195 200 205
 Ser Trp Ser Cys Thr Asn Ala Pro Ala Ser Ser Ser Asn Ser Thr Ala
 210 215 220
 Pro Tyr Ser Cys Thr Leu Ala Pro Ala Ala Pro Gly Ser Asp Val Asp
 225 230 235 240
 Tyr Trp Gln Pro Pro Pro Pro Glu Lys His Arg Tyr Ala Pro His Leu
 245 250 255
 Pro Leu Ala Arg Asp Cys Ile
 260

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 26

catcagccct aatccatctg a

21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 27

cgcgactaac aatcaaagtg a 21

<210> 28

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 28

ctggcttctg aggaccg 17

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 29

aatctgtggg aagtcttgtc c 21

<210> 30

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> Primer

<400> 30

accagaagtg gcacctgac 19

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 31

caaattttgt aatccagagg ttga 24

<210> 32

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 32
 ggcattaaag cagcgatatcc 20
 <210> 33
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 33
 ctgttcctgt acggcatgg 19
 <210> 34
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 34
 ctaggccaca gaattgaaag atct 24
 <210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 35
 gtaggtggaa attctagcat cc 22
 <210> 36
 <211> 531
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 36
 Met Cys Pro Lys Gly Tyr Glu Asp Ser Met Glu Phe Pro Asp His Ser
 1 5 10 15

Arg His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu Gln Arg His Gln Gly Phe Leu
20 25 30

Cys Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp Ala Gln Phe Arg Ala His Arg
35 40 45

Ala Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr Phe His Leu Phe Tyr Lys Asp
50 55 60

Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His Leu Asn Ser Asp Ile Val Thr
65 70 75 80

Ala Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu Phe Met Tyr Glu Gly Lys Leu
85 90 95

Gln Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp Val Leu Ala Ala Ala Ser Tyr
100 105 110

Leu His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val Cys Lys Lys Lys Leu Lys Glu
115 120 125

Lys Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr Lys Lys Glu Glu Asp Ala Ser
130 135 140

Ser Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu Ser Asp Gly Ser Ser His Met
145 150 155 160

Ala Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp Glu Gly Glu Asp Asp Lys Leu
165 170 175

Asn Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu Ala Ala Glu Pro Gly Asn Met
180 185 190

Trp Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala Gly Ile Pro Gln Ala Gly Gly
195 200 205

Glu Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala Gly Lys Thr Val Ala Ser Pro
210 215 220

Cys Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln Arg Ser Val Thr Ser Val Arg
225 230 235 240

Asp Ser Ala Asp Val Asp Cys Val Leu Asp Leu Ser Val Lys Ser Ser
245 250 255

Leu Ser Gly Val Glu Asn Leu Asn Ser Ser Tyr Phe Ser Ser Gln Asp

260 265 270
 Val Leu Arg Ser Asn Leu Val Gln Val Lys Val Glu Lys Glu Ala Ser
 275 280 285
 Cys Asp Glu Ser Asp Val Gly Thr Asn Asp Tyr Asp Met Glu His Ser
 290 295 300
 Thr Val Lys Glu Ser Val Ser Thr Asn Asn Arg Val Gln Tyr Glu Pro
 305 310 315 320

 Ala His Leu Ala Pro Leu Arg Glu Asp Ser Val Leu Arg Glu Leu Asp
 325 330 335
 Arg Glu Asp Lys Ala Ser Asp Asp Glu Met Met Thr Pro Glu Ser Glu
 340 345 350
 Arg Val Gln Val Glu Gly Gly Met Glu Asn Ser Leu Leu Pro Tyr Val
 355 360 365
 Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ala Gly Gln Ile Phe Met Cys Pro Leu Cys
 370 375 380

 Asn Lys Val Phe Pro Ser Pro His Ile Leu Gln Ile His Leu Ser Thr
 385 390 395 400
 His Phe Arg Glu Gln Asp Gly Ile Arg Ser Lys Pro Ala Ala Asp Val
 405 410 415
 Asn Val Pro Thr Cys Ser Leu Cys Gly Lys Thr Phe Ser Cys Met Tyr
 420 425 430
 Thr Leu Lys Arg His Glu Arg Thr His Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Thr
 435 440 445

 Cys Thr Gln Cys Gly Lys Ser Phe Gln Tyr Ser His Asn Leu Ser Arg
 450 455 460
 His Ala Val Val His Thr Arg Glu Lys Pro His Ala Cys Lys Trp Cys
 465 470 475 480
 Glu Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp Leu Tyr Arg His Ile Arg Lys
 485 490 495
 Phe His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu Ser Val Lys Ser Glu Ala Leu
 500 505 510

Ser Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gln Glu

515

520

525

Leu Trp Lys

530

<210> 37

<211> 3848

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 37

agtgtgtgcg gatctgtggg ggagaaggta tctcattcct ctccaacatc atctccactt 60

tgcattctgtc tctcttagtc tgcttttttt ccaccgatgt aacagacctg cagccagcaa 120

gactccgagg gaaggactta atcaagttta tgtgtcctaa aggttatgaa gacagtatgg 180

agtttccaga ccacagcaga catttgctgc agtgtctgag cgagcagagg caccagggct 240

ttctttgtga ctgcactgtt ctgggtgggag atgcccagtt ccgggcacac cgagctgttc 300

tggtttcatg cagcatgtat ttccacctct ttacaagga ccagctggac aaaagagaca 360

ttgttcatct gaacagcgac attgtgacag cccccgttt cgctctcttg cttgaattca 420

tgtacgaagg gaaactccag ttcaaagact tgccattga ggacgtgcta gcagctgcca 480

gttatctcca catgtatgac attgtcaaag tctgcaaaaa gaagctgaaa gagaaagcta 540

ccacagaggc ggacagcacc aaaaaagaag aagatgcttc aagtgttctg gataaagtcg 600

agagcctctc agacggcagc agccacatgg caggtgacct gcccagtgat gaagatgaag 660

gcgaagatga caaattgaac attctacca gcaaaaggga cttggcagct gaggctggga 720

acatgtggat gcgattgccc tcagactcag caggcatccc ccaggctggc ggagaggccg 780

agccacacgc cacagcagct ggaaaaacag tagccagccc ctgcagctca acagagtctt 840

tgtcccagag gtctgtcacc tccgtgaggg attcggcaga tgttgactgt gtgctggacc 900

tgtctgtcaa gtccagcctt tcaggagtgt aaaatctgaa cagctcttat ttctcttcac 960

aggacgtgct gagaagcaac ctgggtgcagg tgaagggtga gaaagaggcg tcctgtgatg 1020

agagtgatgt tggcactaat gactatgaca tggaacatag cactgtgaaa gagagtgtga 1080

gcactaacia cagggtacag tatgagccag ccacactggc tcctctgagg gaggactcgg 1140

tcttaaggga actggatcgg gaggacaaag ccagcgatga tgagatgatg accccagaga 1200

gcgagcgggt ccagggtgaa gggggcatgg agaacagtct gcttcctac gtctccaata 1260

tcctgagccc cgcaggccag atcttcatgt gccccctgtg caacaaagtc ttccccagcc 1320

cccacatcct gcagatccac ctgagcacgc acttccgaga gcaggatggc atccgtagca 1380

agcctgccgc cgatgtcaat gtgcccacgt gtcacctgtg tgggaagact ttctcctgca	1440
tgtacaccct caagcgccac gagaggactc actcggggga gaagccctac acgtgcaccc	1500
aatgcggcaa gaggttccag tactcgcaca acctgagccg tcatgcctgt gtgcacaccc	1560
gcgagaagcc ccatgcctgc aagtgggtgc agcgcagggt cacgcagtcc ggagacctgt	1620
acagacacat ccgaagttc cactgtgagt tggatgaactc cttgtcggtc aaaagtgaag	1680
cgctgagctt gccactgtc agagactgga ccttagaaga tagctctcaa gaactttgga	1740
aataatttta tatatatata tatataaata atatatatat atatatatac atatatatac	1800
atagatctct atatatgtt ggtacgggtc aaaagcagtc ttgtttcctg gaactgaaaa	1860
gttgggatct taacttgttt ttgcacttta gaataatagc atgagaatct cactaattta	1920
gcattctgat aaaagaaact agagcaagtc acaagtagag agctgtcttt cttttgaggg	1980
ttaggccaag ttagccaata aaaccttctc aacaaatggt tctgtcacia acgctttcac	2040
atggcttact ttgtacaca ctgcattgtc ttgagcgctt tccctgtgct ccacactgtt	2100
ttgttttgtt ttgttttcag agtagaaatc cctccagtt tattagctc tttatatgtc	2160
tcaaattgca tgaatatatt ctggctgttg gaaacctgaa tgcctttaga cccaaatgga	2220
aaatttctga aatgctggat tatctatttt taaacaagca gttgacttaa aacttttgtt	2280
ggcaacttct ggttttctga tgggtcccag tgagagaaat ctgacagtac actgggtcac	2340
tgggactgtc tctgtgaagg ttgtcttgag atgaaaaagg atattgcagc ttcagcagtg	2400
ttgaactgtg tgtttaaaa gtgaattact gttcttgtat actgtaattg attacacggg	2460
ctgggggggg tgtcaaagaa cttgacaggt tgtgttgatg ctcttagttg agtcttgaaa	2520
agtaaatatt aacgctacag aaatgcatga gtttcaatat atttttgtc ttgttttgca	2580
ttgtataact ttaacgagtg agtttaaaat tatttaattt ccttagaaaa atagcaccat	2640
ttgggaaaaa aactggtgtt acgaagaaca taaatgcact gtctttattt ttatttttat	2700
tttatataat ttaaattgac ttttcccacg tctttaagtt tgaaactgtt aagctgaata	2760
aaaacttaag ctgcaaattg ataacttcgc tacattacaa ggaacatata aatgtttaca	2820
aacggcttaa agaattgcat gtgcagtgtg cattcatacc acacttgtaa ttgcacagaa	2880
cccatgccag ctgagagttt aggtgtacac acgtaccag ccgagtgttt ttagaataac	2940
tactgcacia attgacaata ggtcataggt cattctctct ctccctctt ttgtctccc	3000
ctttcttttt ctcccttatt tctttctt cccctaccc cctaactcat gaaaagattc	3060
tatggactga aaaagcccca ggctgaaagg actgaaccgc cttgattgac atggggaggg	3120

gggttagtag actgtgtatc ggcagcagag gctgcagccc gatgtgtggt tctgatggcc 3180

agcgcggggc agaagcgttt tgcacactgt ttgttttctt gtcttgact taaaaataag 3240

gtctatggga gtagcatggg aaacagtggg tgtttttccc tttttctttt ttaattgctt 3300

ttgtttaaaa ttgatcgcc ttaactactg taaacatagc ctatttttgt gcttaagata 3360

ctgaatggaa aactccattg tgtgttgctg gactgttttg gaaatatttg gtcaaatgta 3420

tgttaatttg gctgtaatgg catttaaagc aaacaaacaa acaacaaac aaagctgtga 3480

aaatggcctt ggagcattat ctttagttac ttgaagagtt tctagttttt ttttttttaa 3540

tacagtttat gttaaaataa tctttattaa tctagaggag acaatcaatg tctgtggaag 3600

aacggacttt ttiggatttt cttttttaat ggtcattgtg agtgattgct ctttctttta 3660

cttagtttca cattcttctt ttgttctaaa tcttagactg acatctagct ttgacaatca 3720

tagtatgttt tatttcttga gggggaataa cttataatgc tgttttagttt tgtactattg 3780

gtgtgttggg gaatttttaa actgtgtgct aactgcaata aattatatga actgagaaaa 3840

aaaaaaaa 3848

<210> 38

<211> 522

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 38

Met Glu Phe Pro Asp His Ser Arg His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu

1 5 10 15

Gln Arg His Gln Gly Phe Leu Cys Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp

20 25 30

Ala Gln Phe Arg Ala His Arg Ala Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr

35 40 45

Phe His Leu Phe Tyr Lys Asp Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His

50 55 60

Leu Asn Ser Asp Ile Val Thr Ala Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu

65 70 75 80

Phe Met Tyr Glu Gly Lys Leu Gln Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp

85 90 95

Val Leu Ala Ala Ala Ser Tyr Leu His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val

100 105 110
 Cys Lys Lys Lys Leu Lys Glu Lys Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr
 115 120 125
 Lys Lys Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu

 130 135 140
 Ser Asp Gly Ser Ser His Met Ala Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Asp Asp Lys Leu Asn Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu
 165 170 175
 Ala Ala Glu Pro Gly Asn Met Trp Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala
 180 185 190
 Gly Ile Pro Gln Ala Gly Gly Glu Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala

 195 200 205
 Gly Lys Thr Val Ala Ser Pro Cys Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln
 210 215 220
 Arg Ser Val Thr Ser Val Arg Asp Ser Ala Asp Val Asp Cys Val Leu
 225 230 235 240
 Asp Leu Ser Val Lys Ser Ser Leu Ser Gly Val Glu Asn Leu Asn Ser
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Ser Ser Gln Asp Val Leu Arg Ser Asn Leu Val Gln Val

 260 265 270
 Lys Val Glu Lys Glu Ala Ser Cys Asp Glu Ser Asp Val Gly Thr Asn
 275 280 285
 Asp Tyr Asp Met Glu His Ser Thr Val Lys Glu Ser Val Ser Thr Asn
 290 295 300
 Asn Arg Val Gln Tyr Glu Pro Ala His Leu Ala Pro Leu Arg Glu Asp
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Arg Glu Leu Asp Arg Glu Asp Lys Ala Ser Asp Asp Glu

 325 330 335
 Met Met Thr Pro Glu Ser Glu Arg Val Gln Val Glu Gly Gly Met Glu
 340 345 350

Asn Ser Leu Leu Pro Tyr Val Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ala Gly Gln
355 360 365

Ile Phe Met Cys Pro Leu Cys Asn Lys Val Phe Pro Ser Pro His Ile
370 375 380

Leu Gln Ile His Leu Ser Thr His Phe Arg Glu Gln Asp Gly Ile Arg

385 390 395 400
Ser Lys Pro Ala Ala Asp Val Asn Val Pro Thr Cys Ser Leu Cys Gly
405 410 415

Lys Thr Phe Ser Cys Met Tyr Thr Leu Lys Arg His Glu Arg Thr His
420 425 430

Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Thr Gln Cys Gly Lys Ser Phe Gln
435 440 445

Tyr Ser His Asn Leu Ser Arg His Ala Val Val His Thr Arg Glu Lys

450 455 460
Pro His Ala Cys Lys Trp Cys Glu Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp
465 470 475 480

Leu Tyr Arg His Ile Arg Lys Phe His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu
485 490 495

Ser Val Lys Ser Glu Ala Leu Ser Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr
500 505 510

Leu Glu Asp Ser Ser Gln Glu Leu Trp Lys
515 520

<210> 39

<211> 4954

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 39

tcagaaggta tcggggtag gatgaaagt tcaactgtgc tcagcatagt gtggaggaga	60
gaagtagttt ctgaatagta gcttcataac catccaagat gcacttgcag aggtagatgt	120
tggcgagctc tgccttttgt cccaggatgg ggaagtgggc tccgctgac ttaagagagt	180
tttagccact acagatgaat ttgactgat ctttgccttc ccttctttca ccctctccct	240
tgccaaaaaa catgggaaag atgcataatt ggaagaatag aaggtactgg gaaaacaaaa	300

tagatcaggt tattattgaa acaaagtatt ttctgttga tacctgaggc agagccagaa 360

aaaaaagttt tattatattt attttttcta ggaaggcttt aaaaaatatt taacttacaa 420

agtttttgca cctcatttta cagtggtaaa agtttgatta attttaatat gaagttcctt 480

ttgcctata gcagatcaaa gttcagatga aaatgttcag agttaacaga ctctctggtt 540

gctaattgtt ttgaggtaga ggatctacaa agaaacagga ccccccccc attcattttt 600

aaaatgtttg gatttgttca tagtaaagat gatctttccc atctgtcgg acagttctgc 660

tcctctgtgt gtgtagtacc tgcagatctt accgcaccaa catctgttct tatacacagg 720

gcttttgttg ttgtaacact ctgactttaa aagtaagttg ttgtctgatt tctgcactaa 780

ttatgcaatt tcattttttt tccccttcat ttcagccaaa tgtgtgtgtt cagtctgtgc 840

tttctaagta gttgggtatc agacgtgtta caaagaatgg ctggacatgt cttcttgact 900

cttcagaat ttgtgtggga ctttgcctga tattatgagt tctttccctt tgaagttaaa 960

gctctctttt aggttttcta ggatgtcatt tgatgagttg ttggttaaat ttctggaaga 1020

ggtctgagtt ctgtttctaa gtcataagct aaaggaagct ttaaacttga ccaggagtta 1080

tgagtggggt gagcaaaagc ttggtgattg catttaggtt gaatgtgtgg ctggggagtc 1140

cttgggggtg gagcctgatt taaaattcag acatgtaact ctccaccact aaggcggata 1200

ttttttaaag tggcgactag agtctaaatt cctgactagg ctctaacgag aaactcctct 1260

ttccccaggt taigaagaca gtatggagtt tccagaccac agcagacatt tgctgcagtg 1320

tctgagcgag cagaggcacc agggctttct ttgtgactgc actgttctgg tgggagatgc 1380

ccagttccgg gcacaccgag ctgttctggc ttcatgcagc atgtatttcc acctctttta 1440

caaggaccag ctggacaaaa gagacattgt tcacttgaac agcgacattg tgacagcccc 1500

cgctttcgct ctctgtctg aattcatgta cgaagggaac ctccagttca aagacttgcc 1560

cattgaggac gtgctagcag ctgccagtta tctccacatg tatgacattg tcaaagtctg 1620

caaaaagaag ctgaaagaga aagctaccac agaggcggac agcaccaaaa aagaagaaga 1680

tgcttcaagt tgttcgata aagtcgagag cctctcagac ggcagcagcc acatggcagg 1740

tgacctgccc agtgatgaag atgaaggcga agatgacaaa ttgaacattc tacccagcaa 1800

aagggacttg gcagctgagc ctgggaacat gtggatgcga ttgccctcag actcagcagg 1860

catccccag gctggcggag aggccgagcc acacgccaca gcagctggaa aaacagtagc 1920

cagccccctgc agctcaacag agtctttgtc ccagaggtct gtcacctccg tgagggtattc 1980

ggcagatgtt gactgtgtgc tggacctgtc tgtcaagtcc agcctttcag gaggttgaaaa 2040

tctgaacagc tcttatttct cttcacagga cgtgctgaga agcaacctgg tgcaggtgaa	2100
ggtggagaaa gaggcgtcct gtgatgagag tgatgttggc actaatgact atgacatgga	2160
acatagcact gtgaaagaga gtgtgagcac taacaacagg gtacagtatg agccagccca	2220
cctggctcct ctgaggaggg actcggctctt aagggaactg gatcgggagg acaaagccag	2280
cgatgatgag atgatgaccc cagagagcga gcgggtccag gtggaagggg gcatggagaa	2340
cagtctgctt ccttacgtct ccaatatcct gagccccgca ggccagatct tcatgtgccc	2400
cctgtgcaac aaagtcttcc ccagcccca catcctgcag atccacctga gcacgcactt	2460
ccgagagcag gatggcatcc gtagcaagcc tgccgccgat gtcaatgtgc ccacgtgctc	2520
cctgtgtggg aagactttct cctgcatgta caccctcaag cgccacgaga ggactcactc	2580
gggggagaag ccctacacgt gcaccaatg cggcaagagt ttccagtact cgcacaacct	2640
gagccgtcat gccgtggtgc acaccgcga gaagcccat gcctgcaagt ggtgagcg	2700
caggttcacg cagtccggag acctgtacag acacatccgc aagtccact gtgagttggt	2760
gaactccttg tcggtcaaaa gtgaagcgt gagcttggcc actgtcagag actggacctt	2820
agaagatagc tctcaagaac ttggaaata atttatata tatatatata taaataatat	2880
atatatatat atatacatat atatacatag atctctatat agttgtggta cggctcaaaa	2940
gcagtcttgt ttcttgaac tgaaaagttg ggatcttaac ttgttttgc actttagaat	3000
aatagcatga gaatctcact aatttagcat tctgataaaa gaaactagag caagtcacaa	3060
gtagagagct gtctttcttt tgagggttag gccaaagtag ccaataaaac cttctcaaca	3120
aatggttctg tcacaaacgc ttccatggt cttacttttg tacacactgc attgtcttga	3180
gcgttttccc tgtgtccac actgtttgt tttgtttgt tttcagagta gaaatccct	3240
ccagtttatt agcctcttta tatgtctcaa attgcatgaa tatittctgg ctgttggaaa	3300
cctgaatgct tttagacca aatggaaaat ttctgaaatg ctggattatc tatttttaa	3360
caagcagttg acttaaaact ttgtgtggca acttctggtt ttctgatggt cccagtgag	3420
agaaatctga cagtacactg ggtcactggg actgtctctg tgaaggtttg cttgagatga	3480
aaaaggatat tgcagcttca gcagtgttga actgtgtgtt taaaatgtga attactgttc	3540
ttgtatactg taattgatta cacgggctgg ggggggtgtc aaagaacttg acaggttgtg	3600
ttgatgctct tagttgagtc ttgaaaagta aatattaacg ctacagaaat gcatgagttt	3660
caatatattt ttgtctttg ttgcatgtg ataactttaa cgagtgagtt taaaattatt	3720
taatttcctt agaaaaatag caccatttgg gaaaaaaact ggtgttacga agaacataaa	3780
tgcactgtct ttatitttat tttatittta tataatttaa attgactttt cccagctctt	3840
taagtttgaa actgttaagc tgaataaaaa cttagctgc aaattgataa cttcgctaca	3900

ttacaaggaa catataaatg tttaacaacg gcttaaagaa ttgcatgtgc agtgtgcatt 3960
cataccacac ttgtaattgc acagaacca tgccagctca gagtttaggt gtacacacgt 4020
accagccga gtgttttttag aataactact gcacaaattg acaataggtc ataggtcatt 4080
ctctctctcc ctcccttttg ctcccccttt cttttctccc cctatttctt ttccttcccc 4140

ctacccccta actcatgaaa agattctatg gactgaaaaa gccccaggct gaaaggactg 4200
aacgccttg attgacatgg ggaggggggt tagtagactg tgtatcgga gcagaggctg 4260
cagcccgatg tttgggtctg atggccagcg cggggcagaa gcgttttgca cactgtttgt 4320
tttctgtct tgcacttaca aataaggtct atgggagtag catgggaaac agtggttgtt 4380
tttccctttt tcttttttaa ttgcttttgt ttaaaatttg atgccttaa ctactgtaaa 4440
catagcctat ttttgtgtt aagatactga atggaaaact ccattgtgtg ttgctggact 4500
gttttggaaa tatttggta aatgtatgtt aatttggctg taatggcatt taaagcaaac 4560

aaacaacaa acaacaag ctgtgaaaat ggccttggag cattatcttt agttacttga 4620
agagtttcta gtttttttt ttttaataca gtttatgtta aaataatctt tattaatcta 4680
gaggagacaa tcaatgtctg tggaagaacg gacttttttg gattttcttt tttaatggtc 4740
attgtgagt attgtctctt cttttactta gtttcacatt cttcctttgt tctaaatctt 4800
agactgacat ctactttga caatcatagt atgttttatt tctgagggg gaataactta 4860
taatgtgtt tagttttgta ctattgggtg gttgggtgaat ttttaactg tgtgctaact 4920
gcaataaatt atatgaactg agaaaaaaaa aaaa 4954

<210> 40

<211> 530

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 40

Cys Pro Lys Gly Tyr Glu Asp Ser Met Glu Phe Pro Asp His Ser Arg

1 5 10 15

His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu Gln Arg His Gln Gly Phe Leu Cys

20 25 30

Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp Ala Gln Phe Arg Ala His Arg Ala

35 40 45

Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr Phe His Leu Phe Tyr Lys Asp Gln

50

55

60

Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His Leu Asn Ser Asp Ile Val Thr Ala
 65 70 75 80
 Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu Phe Met Tyr Glu Gly Lys Leu Gln
 85 90 95
 Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp Val Leu Ala Ala Ala Ser Tyr Leu
 100 105 110
 His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val Cys Lys Lys Lys Leu Lys Glu Lys
 115 120 125
 Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr Lys Lys Glu Glu Asp Ala Ser Ser
 130 135 140
 Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu Ser Asp Gly Ser Ser His Met Ala
 145 150 155 160
 Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp Glu Gly Glu Asp Asp Lys Leu Asn
 165 170 175
 Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu Ala Ala Glu Pro Gly Asn Met Trp
 180 185 190
 Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala Gly Ile Pro Gln Ala Gly Gly Glu
 195 200 205
 Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala Gly Lys Thr Val Ala Ser Pro Cys
 210 215 220
 Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln Arg Ser Val Thr Ser Val Arg Asp
 225 230 235 240
 Ser Ala Asp Val Asp Cys Val Leu Asp Leu Ser Val Lys Ser Ser Leu
 245 250 255
 Ser Gly Val Glu Asn Leu Asn Ser Ser Tyr Phe Ser Ser Gln Asp Val
 260 265 270
 Leu Arg Ser Asn Leu Val Gln Val Lys Val Glu Lys Glu Ala Ser Cys
 275 280 285
 Asp Glu Ser Asp Val Gly Thr Asn Asp Tyr Asp Met Glu His Ser Thr
 290 295 300
 Val Lys Glu Ser Val Ser Thr Asn Asn Arg Val Gln Tyr Glu Pro Ala

305 310 315 320
 His Leu Ala Pro Leu Arg Glu Asp Ser Val Leu Arg Glu Leu Asp Arg
 325 330 335
 Glu Asp Lys Ala Ser Asp Asp Glu Met Met Thr Pro Glu Ser Glu Arg
 340 345 350
 Val Gln Val Glu Gly Gly Met Glu Asn Ser Leu Leu Pro Tyr Val Ser
 355 360 365
 Asn Ile Leu Ser Pro Ala Gly Gln Ile Phe Met Cys Pro Leu Cys Asn

 370 375 380
 Lys Val Phe Pro Ser Pro His Ile Leu Gln Ile His Leu Ser Thr His
 385 390 395 400
 Phe Arg Glu Gln Asp Gly Ile Arg Ser Lys Pro Ala Ala Asp Val Asn
 405 410 415
 Val Pro Thr Cys Ser Leu Cys Gly Lys Thr Phe Ser Cys Met Tyr Thr
 420 425 430
 Leu Lys Arg His Glu Arg Thr His Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys

 435 440 445
 Thr Gln Cys Gly Lys Ser Phe Gln Tyr Ser His Asn Leu Ser Arg His
 450 455 460
 Ala Val Val His Thr Arg Glu Lys Pro His Ala Cys Lys Trp Cys Glu
 465 470 475 480
 Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp Leu Tyr Arg His Ile Arg Lys Phe
 485 490 495
 His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu Ser Val Lys Ser Glu Ala Leu Ser

 500 505 510
 Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gln Glu Leu
 515 520 525
 Trp Lys

530

<210> 41

<211> 4123

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 41

aggctgcggc cgccgctggg ctgctgccat ggggagccgt taaaagagt gggccctgtg	60
gtcggccgc gcgcctcagg ctgccagcgc gggcgggggg cgccgggggc gcgcggggcc	120
cgggcccggg ccggcgggcg ggcggggggc ggcggaggac gccacaagt ccagcggcgg	180
cgccggcggc agaggaggag gaggaggagg acgcggcggg gacgcggcga ctccggccgc	240
tccgtaacct ccgagggtcc gcggtagcgg tggacgggtc gatccgtgga gtggatgtct	300
tcgggccatt gcggtgcttg ggactcatta aactgtcact cacccccacc accaccccac	360
tggtctgctt ttttccacc gatgtaacag acctgcagcc agcaagactc cgagggaagg	420
acttaataca gtttatgtgt cctaaaggtt atgaagacag tatggagttt ccagaccaca	480
gcagacattt gctgcagtgt ctgagcgagc agaggcacca gggctttctt tgtgactgca	540
ctgttctggt gggagatgcc cagttccggg cacaccgagc tgttctggct tcatgcagca	600
tgtatttcca cctcttttac aaggaccagc tggacaaaag agacattgtt catctgaaca	660
gcgacattgt gacagccccc gctttcgtc tctgcttga attcatgtac gaagggaac	720
tccagttcaa agacttgccc attgaggacg tgctagcagc tgccagttat ctccacatgt	780
atgacattgt caaagtctgc aaaaagaagc tgaagagaa agctaccaca gaggcggaca	840
gcacaaaaa agaagaagat gcttcaagtt gttcggataa agtcgagagc ctctcagacg	900
gcagcagcca catggcaggt gacctgccc gtgatgaaga tgaaggcgaa gatgacaaat	960
tgaacattct acccagcaaa agggacttgg cagctgagcc tgggaacatg tggatcgat	1020
tgcctcaga ctcagcagc atccccagg ctggcggaga ggccgagcca cacgccacag	1080
cagctggaaa aacagtacg agccccgca gctcaacaga gtctttgtcc cagaggtctg	1140
tcacctccgt gagggattcg gcagatgttg actgtgtgct ggacctgtct gtcaagtcca	1200
gcctttcagg agttgaaaat ctgaacagct cttatttctc ttacaggac gtgctgagaa	1260
gcaacctggt gcaggtgaag gtggagaaag aggcgtcctg tgatgagagt gatgttggca	1320
ctaatacta tgacatggaa catagcactg tgaagagag tgtgagcact aacaacaggg	1380
tacagtatga gccagccac ctggctctc tgagggagga ctcggtctta agggaaactgg	1440
atcgggagga caaagccagc gatgatgaga tgaatgaccc agagagcgag cgggtccagg	1500
tggaaggggg catggagaac agtctgcttc cctacgtctc caataatcctg agccccgcag	1560
gccagatctt catgtgcccc ctgtgcaaca aagtcttccc cagccccac atcctgcaga	1620
tccacctgag cagcacttc cgagagcagg atggcatccg tagcaagcct gccgccgatg	1680
tcaatgtgcc cagtgctcc ctgtgtggga agactttctc ctgcatgtac accctcaagc	1740

gccacgagag gactcactcg ggggagaagc cctacacgtg cacccaatgc ggcaagagtt 1800
tccagtactc gcacaacctg agccgtcatg ccgtggtgca caccgcgag aagcccatg 1860

cctgcaagtg gtgcgagcgc aggttcacgc agtccggaga cctgtacaga cacatccgca 1920
agttccactg tgagtgggtg aactccttgi cggtcaaaag tgaagcgctg agcttgccca 1980
ctgtcagaga ctggacctta gaagatagct ctcaagaact ttggaaataa ttttatatat 2040
atatatatat aaataatata tatatatata tatacatata tatacataga tctctatata 2100
gttgtgtac ggctctaaaag cagtcttgtt tcctggaact gaaaagtgg gatcttaact 2160
tgtttttgca ctttagaata atagcatgag aatctcacta atttagcatt ctgataaaag 2220
aaactagagc aagtcacaag tagagagctg tctttctttt gagggtagg ccaagttagc 2280

caataaaacc ttctcaacaa atggttctgt cacaacgct ttcacatggc ttacttttgt 2340
acacactgca ttgtcttgag cgctttccct gtgctccaca ctgttttgtt ttgttttgtt 2400
ttcagagtag aaatccctc cagtttatta gcctctttat atgtctcaa ttgcatgaat 2460
atcttctggc tgttggaac ctgaatgctt ttagacccaa atggaaaatt tctgaaatgc 2520
tggattatct atttttaaac aagcagttga cttaaaactt tgtgtggcaa ctcttggttt 2580
tctgatggtc ccagtgaga gaaatctgac agtacactgg gtactggga ctgtctctgt 2640
gaaggtttgc ttgagatgaa aaaggatatt gcagcttcag cagtgttgaa ctgtgtgttt 2700

aaaatgtgaa ttactgttct tgtatactgt aattgattac acgggctggg ggggggtgtca 2760
aagaacttga caggttgtgt tgatgctctt agttgagtct tgaaaagtaa atattaacgc 2820
tacagaaatg catgagtttc aatatatttt ttgtctttgt ttgcattgta taactttaac 2880
gagttagttt aaaattattt aatttcctta gaaaaatagc accatttggg aaaaaactg 2940
gtgttacgaa gaacataaat gcactgtctt tatttttatt tttattttat ataatttaaa 3000
ttgacttttc ccacgtcttt aagtttgaaa ctgttaagct gaataaaaac ttaagctgca 3060
aattgataac ttcgctacat tacaaggaac atataaatgt ttacaaacgg cttaagaat 3120

tgcattgtgca gtgtgcatc ataccacact tgtaattgca cagaacccat gccagctcag 3180
agtttaggtg tacacacgta ccagccgag gtgtttttaga ataactactg cacaaattga 3240
caataggtea taggtcatc tctctctccc tcctttttgc tcccccttc ttttctccc 3300
ctatttctt tccttcccc taccctctaa ctcatgaaaa gattctatgg actgaaaaag 3360
ccccaggctg aaaggactga accgccttga ttgacatggg gaggggggtt agtagactgt 3420
gtatcggcag cagaggctgc agcccgatgt gtggttctga tggccagcgc ggggcagaag 3480

cgttttgcac acgttttggt ttcctgtctt gcacttacaa ataaggtcta tgggagtagc 3540

atgggaaaca gtggttggtt ttcctttttt cttttttaat tgcttttggt taaaatttga 3600

tcgccttaac tactgtaaac atagcctatt tttgtgetta agatactgaa tggaaaactc 3660

cattgtgtgt tgctggactg ttttggaat atttggtcaa atgtatgtta atttggtgt 3720

aatggcattt aaagcaaaca aacaacaaaa caaacaaagc tgtgaaaatg gccttggagc 3780

attatcttta gttacttgaa gagtttctag tttttttttt tttatacag tttatgttaa 3840

aataatcttt attaacttag aggagacaat caatgtctgt ggaagaacgg acttttttgg 3900

attttctttt ttaatggtca ttgtgagtga ttgctctttc ttttacttag tttcacattc 3960

ttcctttggt ctaaacttta gactgacatc tagctttgac aatcatagta tgttttattt 4020

cctgaggggg aataacttat aatgctgttt agttttgtac tattggtgtg ttggtgaatt 4080

tttaaactgt gtgctaactg caataaatta tatgaactga gaa 4123

<210> 42

<211> 521

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

Glu Phe Pro Asp His Ser Arg His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu Gln

1 5 10 15

Arg His Gln Gly Phe Leu Cys Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp Ala

20 25 30

Gln Phe Arg Ala His Arg Ala Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr Phe

35 40 45

His Leu Phe Tyr Lys Asp Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His Leu

50 55 60

Asn Ser Asp Ile Val Thr Ala Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu Phe

65 70 75 80

Met Tyr Glu Gly Lys Leu Gln Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp Val

85 90 95

Leu Ala Ala Ala Ser Tyr Leu His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val Cys

100 105 110

Lys Lys Lys Leu Lys Glu Lys Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr Lys

115	120	125	
Lys Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu Ser			
130	135	140	
Asp Gly Ser Ser His Met Ala Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp Glu			
145	150	155	160
Gly Glu Asp Asp Lys Leu Asn Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu Ala			
165	170	175	
Ala Glu Pro Gly Asn Met Trp Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala Gly			
180	185	190	
Ile Pro Gln Ala Gly Gly Glu Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala Gly			
195	200	205	
Lys Thr Val Ala Ser Pro Cys Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln Arg			
210	215	220	
Ser Val Thr Ser Val Arg Asp Ser Ala Asp Val Asp Cys Val Leu Asp			
225	230	235	240
Leu Ser Val Lys Ser Ser Leu Ser Gly Val Glu Asn Leu Asn Ser Ser			
245	250	255	
Tyr Phe Ser Ser Gln Asp Val Leu Arg Ser Asn Leu Val Gln Val Lys			
260	265	270	
Val Glu Lys Glu Ala Ser Cys Asp Glu Ser Asp Val Gly Thr Asn Asp			
275	280	285	
Tyr Asp Met Glu His Ser Thr Val Lys Glu Ser Val Ser Thr Asn Asn			
290	295	300	
Arg Val Gln Tyr Glu Pro Ala His Leu Ala Pro Leu Arg Glu Asp Ser			
305	310	315	320
Val Leu Arg Glu Leu Asp Arg Glu Asp Lys Ala Ser Asp Asp Glu Met			
325	330	335	
Met Thr Pro Glu Ser Glu Arg Val Gln Val Glu Gly Gly Met Glu Asn			
340	345	350	
Ser Leu Leu Pro Tyr Val Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ala Gly Gln Ile			
355	360	365	

Phe Met Cys Pro Leu Cys Asn Lys Val Phe Pro Ser Pro His Ile Leu
370 375 380

Gln Ile His Leu Ser Thr His Phe Arg Glu Gln Asp Gly Ile Arg Ser
385 390 395 400

Lys Pro Ala Ala Asp Val Asn Val Pro Thr Cys Ser Leu Cys Gly Lys
405 410 415

Thr Phe Ser Cys Met Tyr Thr Leu Lys Arg His Glu Arg Thr His Ser
420 425 430

Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Thr Gln Cys Gly Lys Ser Phe Gln Tyr
435 440 445

Ser His Asn Leu Ser Arg His Ala Val Val His Thr Arg Glu Lys Pro
450 455 460

His Ala Cys Lys Trp Cys Glu Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp Leu
465 470 475 480

Tyr Arg His Ile Arg Lys Phe His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu Ser
485 490 495

Val Lys Ser Glu Ala Leu Ser Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr Leu
500 505 510

Glu Asp Ser Ser Gln Glu Leu Trp Lys
515 520

<210> 43

<211> 3937

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 43

aggctgcggc cgccgctggg ctgctgccat ggggagccgt tgaaagagtg gggccctgtg 60

gctcggccgc gcgcctcagg ctgccagcgc gggcgggggg cggcgggggc gcgcggggcc 120

cgggccgggg ccggcgggcg ggcggggggc ggcggaggac gccacaagt ccagcggcgg 180

cggcggcggc agaggaggag gaggaggagg acgcggcggg gacgcggcga ctcgggccgc 240

tccgtgttat gaagacagta tggagtttcc agaccacagc agacatttgc tgcagtgtct 300

gagcgagcag aggcaccagg gctttctttg tgactgcact gttctggtgg gagatgccca 360

gttccgggca caccgagctg ttctggcttc atgcagcatg tatttccacc tcttttacia 420

ggaccagctg gacaaaagag acattgttca tctgaacagc gacattgtga cagccccgc	480
tttcgtcttc ctgcttgaat tcatgtacga agggaaactc cagttaaag acttgcccat	540
tgaggacgtg ctacgagctg ccagttatct ccacatgtat gacattgtca aagtctgcaa	600
aaagaagctg aaagagaaag ctaccacaga ggcggacagc accaaaaag aagaagatgc	660
ttcaagtgtg tcggataaag tcgagagcct ctacagcggc agcagccaca tggcaggtga	720
cctgcccagt gatgaagatg aaggcgaaga tgacaaattg aacattctac ccagcaaaag	780
ggacttggca gctgagcctg ggaacatgtg gatgcgattg ccctcagact cagcaggcat	840
ccccaggct ggcggagagg ccgagccaca cgccacagca gctggaaaaa cagtagccag	900
ccctgcagc tcaacagagt ctttgtccca gaggtctgtc acctccgtga gggattcggc	960
agatgttgac tgtgtgctgg acctgtctgt caagtccagc ctttcaggag ttgaaaatct	1020
gaacagctct tatttctctt cacaggacgt gctgagaagc aacctggtgc aggtgaaggt	1080
ggagaaagag gcgtcctgtg atgagagtga tgttggcact aatgactatg acatggaaca	1140
tagcactgtg aaagagagtg tgagcactaa caacagggtg cagtatgagc cagcccacct	1200
ggctcctctg agggaggact cggtcttaag ggaactggat cgggaggaca aagccagcga	1260
tgatgagatg atgacccagc agagcgagcg ggtccagggt gaagggggca tggagaacag	1320
tctgttccc tacgtctcca atatcctgag ccccgaggc cagatcttca tgtgccccct	1380
gtgcaacaaa gtcttccca gccccacat cctgcagatc cacctgagca cgcacttccg	1440
agagcaggat ggcacccgta gcaagcctgc cgccgatgtc aatgtgccca cgtgtcctt	1500
gtgtgggaag actttctcct gcatgtacac cctcaagcgc cacgagagga ctactcggg	1560
ggagaagccc tacacgtgca cccaatgcgg caagagtctc cagtactgc acaacctgag	1620
ccgtcatgcc gtggtgcaca cccgcgagaa gccccatgcc tgcaagtgtg gcgagcgag	1680
gttcacgcag tccggagacc tgtacagaca catccgaag ttccactgtg agttggtgaa	1740
ctccttgtcg gtcaaaagtg aagcgtgag cttgccact gtcagagact ggaccttaga	1800
agatagctct caagaacttt ggaaataatt ttatatatat atatataa ataatatata	1860
tatatatata tacatatata tacatagatc tctatatagt tgtgttacgg tctaaaagca	1920
gtcttgtttc ctggaactga aaagtggga tcttaacttg tttttgact ttagaataat	1980
agcatgagaa tctcactaat ttagcattct gataaaagaa actagagcaa gtcacaagta	2040
gagagctgtc ttcttttga gggttiaggcc aagttagcca ataaaacctt ctcaacaaat	2100
ggttctgtca caaacgcttt cacatggctt actttgtac acactgcatt gtcttgagcg	2160

ctttccctgt gctccacact gttttgtttt gttttgtttt cagagtagaa atcccccca	2220
gtttattagc ctctttatat gtctcaaatt gcatgaatat tttctggctg ttggaaacct	2280
gaatgccttt agacccaaat ggaaaatttc tgaatgctg gattatctat ttttaacaa	2340
gcagttgact taaaactttg tgtggcaact tctggttttc tgatggctcc cagttagaga	2400
aatctgacag tacactgggt cactgggact gtctctgtga aggtttgctt gagatgaaaa	2460
aggatattgc agcttcagca gtgttgaact gtgtgtttaa aatgtgaatt actgttcttg	2520
tatactgtaa ttgattacac gggctggggg ggggtgtcaa gaacttgaca ggttgtgttg	2580
atgctcttag ttgagctctg aaaagtaaat attaacgcta cagaaatgca tgagtttcaa	2640
tatatTTTT gtctttgttt gcattgtata actttaacga gtgagtttaa aattatttaa	2700
tttccttaga aaaatagcac catttgggaa aaaaactggt gttacgaaga acataaatgc	2760
actgtcttta tttttatttt tattttatat aatttaaatt gacttttccc acgtctttaa	2820
gtttgaaact gttaaactga ataaaaactt aagctgcaaa ttgataactt cgctacatta	2880
caaggaacat ataatgttt acaaacggct taaagaattg catgtgcagt gtgcattcat	2940
accacacttg taattgcaca gaaccatgc cagctcagag tttaggtgta cacacgtacc	3000
cagccgagtg tttttagaat aactactgca caaattgaca ataggtcata ggtcattctc	3060
tcttccctc ctttttgett cccctttctt ttttccctt atttctttc ctcccccta	3120
ccccctaact catgaaaaga ttctatggac tgaaaaagcc ccaggctgaa aggactgaac	3180
cgcttgatt gacatggga ggggggttag tagactgtgt atcggcagca gaggtgcag	3240
cccgatgtgt ggttctgatg gccagcgcg ggacagaagcg ttttgacac tgtttgttt	3300
cctgtcttgc acttacaat aaggctctat ggagtagcat gggaaacagt ggttgtttt	3360
cccttttct ttttaattg cttttgttta aaatttgat gccttaacta ctgtaaacat	3420
agcctatttt tgtgcttaag atactgaatg gaaaactcca ttgtgtgttg ctggactgtt	3480
ttggaaatat ttggtcaat gtatgttaat ttggctgtaa tggcatttaa agcaaacaaa	3540
caaacaacaa acaaaagctg tgaaaatggc ctggagcat tatctttagt tacttgaaga	3600
gtttctagtt ttttttttt taatacagtt tatgttaaaa taatctttat taatctagag	3660
gagacaatca atgtctgtgg aagaacggac ttttttggat tttctttttt aatggtcatt	3720
gtgagtatt gctctttctt ttacttagtt tcacattctt cctttgttct aaatcttaga	3780
ctgacatcta gccttgacaa tcatagtatg ttttatttcc tgagggggaa taacttataa	3840
tgtgttttag ttttgtacta ttggtgtgtt ggtgaatttt taaactgtgt gctaactgca	3900

ataaattata tgaactgaga aaaaaaaaaa aaaaaaa

3937

<210> 44

<211> 521

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

Glu Phe Pro Asp His Ser Arg His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu Gln

1 5 10 15

Arg His Gln Gly Phe Leu Cys Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp Ala

20 25 30

Gln Phe Arg Ala His Arg Ala Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr Phe

35 40 45

His Leu Phe Tyr Lys Asp Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His Leu

50 55 60

Asn Ser Asp Ile Val Thr Ala Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu Phe

65 70 75 80

Met Tyr Glu Gly Lys Leu Gln Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp Val

85 90 95

Leu Ala Ala Ala Ser Tyr Leu His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val Cys

100 105 110

Lys Lys Lys Leu Lys Glu Lys Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr Lys

115 120 125

Lys Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu Ser

130 135 140

Asp Gly Ser Ser His Met Ala Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp Glu

145 150 155 160

Gly Glu Asp Asp Lys Leu Asn Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu Ala

165 170 175

Ala Glu Pro Gly Asn Met Trp Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala Gly

180 185 190

Ile Pro Gln Ala Gly Gly Glu Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala Gly

195 200 205

Lys Thr Val Ala Ser Pro Cys Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln Arg
 210 215 220
 Ser Val Thr Ser Val Arg Asp Ser Ala Asp Val Asp Cys Val Leu Asp
 225 230 235 240

 Leu Ser Val Lys Ser Ser Leu Ser Gly Val Glu Asn Leu Asn Ser Ser
 245 250 255
 Tyr Phe Ser Ser Gln Asp Val Leu Arg Ser Asn Leu Val Gln Val Lys
 260 265 270
 Val Glu Lys Glu Ala Ser Cys Asp Glu Ser Asp Val Gly Thr Asn Asp
 275 280 285
 Tyr Asp Met Glu His Ser Thr Val Lys Glu Ser Val Ser Thr Asn Asn
 290 295 300

 Arg Val Gln Tyr Glu Pro Ala His Leu Ala Pro Leu Arg Glu Asp Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Arg Glu Leu Asp Arg Glu Asp Lys Ala Ser Asp Asp Glu Met
 325 330 335
 Met Thr Pro Glu Ser Glu Arg Val Gln Val Glu Gly Gly Met Glu Asn
 340 345 350
 Ser Leu Leu Pro Tyr Val Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ala Gly Gln Ile
 355 360 365

 Phe Met Cys Pro Leu Cys Asn Lys Val Phe Pro Ser Pro His Ile Leu
 370 375 380
 Gln Ile His Leu Ser Thr His Phe Arg Glu Gln Asp Gly Ile Arg Ser
 385 390 395 400
 Lys Pro Ala Ala Asp Val Asn Val Pro Thr Cys Ser Leu Cys Gly Lys
 405 410 415
 Thr Phe Ser Cys Met Tyr Thr Leu Lys Arg His Glu Arg Thr His Ser
 420 425 430

 Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Thr Gln Cys Gly Lys Ser Phe Gln Tyr
 435 440 445
 Ser His Asn Leu Ser Arg His Ala Val Val His Thr Arg Glu Lys Pro

450	455	460	
His Ala Cys Lys Trp Cys Glu Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp Leu			
465	470	475	480
Tyr Arg His Ile Arg Lys Phe His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu Ser			
	485	490	495
Val Lys Ser Glu Ala Leu Ser Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr Leu			
	500	505	510
Glu Asp Ser Ser Gln Glu Leu Trp Lys			
	515	520	
<210>	45		
<211>	4039		
<212>	DNA		
<213>	Mus musculus		
<400>	45		
aggctgcggc cgccgctggg ctgctgccat ggggagccgt tgaaagagtg gggccctgtg		60	
gctcgccgc gcgcctcagg ctgccagcgc gggcgggggg cggcgggggc gcgcggggcc		120	
cgggccgggg ccggcgggcg ggccggggcc ggccgaggac gccacaagt ccagcggcgg		180	
cgccggcggc agaggaggag gaggaggagg acgcggcggg gacgcggcga ctcgggccgc		240	
tccgtaacct ccgagggtcc gcggtagcgg tggacgggtc gatccgtgga gtggatgtct		300	
tcgggccatt gcggtgcttg ggactcatta aactgtcact cacccccacc accaccccac		360	
tgggttatga agacagtatg gagtttcag accacagcag acatttgctg cagtgtctga		420	
gcgagcagag gcaccagggc tttctttgtg actgcactgt tctggtggga gatgccagt		480	
tccgggcaca ccgagctgtt ctggcttcat gcagcatgta tttccacctc ttttacaagg		540	
accagctgga caaaagagac attgttcac tgaacagcga cattgtgaca gccccgctt		600	
tcgctctcct gcttgaattc atgtacgaag ggaaactcca gttcaaagac ttgccattg		660	
aggacgtgct agcagctgcc agttatctcc acatgtatga cattgtcaaa gtctgcaaaa		720	
agaagctgaa agagaaagct accacagagg cggacagcac caaaaaagaa gaagatgctt		780	
caagttgttc ggataaagtc gagagcctct cagacggcag cagccacatg gcaggtgacc		840	
tgccagtga tgaagatgaa ggcgaagatg acaaatgaa cattctaccc agcaaaaggg		900	
acttggcagc tgagcctggg aacatgtgga tgcgattgcc ctcagactca gcagcatcc		960	
cccaggctgg cggagaggcc gagccacacg ccacagcagc tggaaaaaca gtagccagcc		1020	

cctgcagctc aacagagtct ttgtcccaga ggctgtcac ctccgtgagg gattcggcag 1080
atgttgactg tgtgtggagc ctgtctgtca agtccagcct ttcaggagtt gaaaatctga 1140
acagctctta tttctcttca caggacgtgc tgagaagcaa cctgggtgcag gtgaagggtg 1200
agaaagaggc gtccgtgat gagagtgat ttggcactaa tgactatgac atggaacata 1260
gcactgtgaa agagagtgtg agcactaaca acaggggtaca gtatgagcca gccacctgg 1320
ctcctctgag ggaggactcg gtcttaaggg aactggatcg ggaggacaaa gccagcgatg 1380
atgagatgat gaccccagag agcgagcggg tccaggtgga agggggcatg gagaacagtc 1440

tgcttccta cgtctccaat atcctgagcc ccgaggcca gatcttcag tgccccctgt 1500
gcaacaaagt ctccccagc ccccatctc tgcagatcca cctgagcacg cacttccgag 1560
agcaggatgg catccgtagc aagcctgccg ccgatgtcaa tgtgccacg tgctccctgt 1620
gtgggaagac tttctctcgt atgtacacc tcaagcgcca cgagaggact cactcggggg 1680
agaagcccta cacgtgcacc caatcgcgca agagtttcca gtactcgac aacctgagcc 1740
gtcatgccgt ggtgcacacc cgcgagaagc cccatgcctg caagtgtgc gagcgaggt 1800
tcacgcagtc cggagacctg tacagacaca tccgaagtt ccactgtgag ttggtgaact 1860

ccttgctcgt caaaagtga ggcgtgagct tgccactgt cagagactgg acctagaag 1920
atagctctca agaactttgg aaataatatt atatatatat atatataaat aatatatata 1980
tatatatata catatatata catagatctc tatatagttg tggtaggtc taaaagcagt 2040
cttgtttctt ggaactgaaa agttgggac ttaacttgtt ttgacctt agaataatag 2100
catgagaatc tctaatttt agcattctga taaaagaaac tagagcaagt cacaagtaga 2160
gagctgtctt tcttttgagg gttaggccaa gttagccaat aaaaccttct caacaaatgg 2220
ttctgtcaca aacgcttca catggcttac tttgtacac actgcattgt ctgagcgct 2280

ttccctgtgc tccacactgt ttgttttgt ttgttttca gagtagaaat cccctccagt 2340
ttattagcct ctttatatgt ctcaattgc atgaatattt tctggctgtt ggaaacctga 2400
atgcttttag acccaaatgg aaattttctg aaatgctgga ttatctattt ttaacaagc 2460
agttgactta aaactttgtg tggcaacttc tggttttctg atggtcccca gtgagagaaa 2520
tctgacagta cactgggtca ctgggactgt ctctgtgaag gtttgcttga gatgaaaaag 2580
gatattgcag cttcagcagt gttgaactgt gtgtttaaaa tgtgaattac tgttcttga 2640
tactgtaatt gattacacgg gctggggggg gtgtcaaaga acttgacagg ttgtgttgat 2700

gctcttagtt gactcttgaa aagtaaata taacgtaca gaaatgcatg agtttcaata 2760
tattttttgt cttgtttgc attgtataac ttaacgagt gactttaaaa ttatttaatt 2820
tccttagaaa aatagcaca tttgggaaaa aaactggtgt tacgaagaac ataaatgcac 2880

tgtcttttatt tttattttta ttttatataa tttaaattga cttttccac gtctttaagt 2940
 ttgaaactgt taagctgaat aaaaacttaa gctgcaaatt gataacttcg ctacattaca 3000
 aggaacatat aaatgtttac aaacggctta aagaattgca tgtgcagtgt gcattcatac 3060
 cacacttgta attgcacaga acctatgcca gctcagagtt taggtgtaca cacgtaccca 3120

gccgagtgtt tttagaataa ctactgcaca aattgacaat aggtcatagg tcattctctc 3180
 tctccctect ttttgettcc cttttctttt tctccctat ttcctttcct tcccectacc 3240
 ccctaactca tgaagagatt ctatggactg aaaaagcccc aggctgaaag gactgaaccg 3300
 ccttgattga catggggagg ggggttagta gactgtgtat cggcagcaga ggctgcagcc 3360
 cgatgtgtgg ttctgatggc cagcgcgggg cagaagcggt ttgcacactg ttgtttttcc 3420
 tgtcttgac ttacaaataa ggtctatggg agtagcatgg gaaacagtgg ttgtttttcc 3480
 ctttttcttt ttttaattgct ttgttttaaa atttgatgc cttactact gtaaacatag 3540

cctatttttg tgcttaagat actgaatgga aaactccatt gtgtgttgct ggactgtttt 3600
 ggaaatattt ggtcaaagt atgttaattt ggctgtaatg gcatttaaag caaacaaca 3660
 aacaacaaa caaagctgtg aaaatggcct tggagcatta tctttagtta cttgaagagt 3720
 ttctagtttt tttttttta atacagttta tgttaaaata atctttatta atctagagga 3780
 gacaatcaat gtctgtggaa gaacggactt ttttgattt tcttttttaa tggtcattgt 3840
 gagtgtatgc tctttctttt acttagtttc acattcttcc ttgtttctaa atcttagact 3900
 gacatctagc ttgacaatc atagtatgtt ttatttcctg agggggaata acttataatg 3960

ctgttttagtt ttgtactatt ggtgtgttgg tgaattttta aactgtgtgc taactgcaat 4020
 aaattatatg aactgagaa 4039

<210> 46

<211> 521

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Glu Phe Pro Asp His Ser Arg His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu Gln

1 5 10 15

Arg His Gln Gly Phe Leu Cys Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp Ala

20 25 30

Gln Phe Arg Ala His Arg Ala Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr Phe

35

40

45

His Leu Phe Tyr Lys Asp Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His Leu
50 55 60
Asn Ser Asp Ile Val Thr Ala Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu Phe
65 70 75 80
Met Tyr Glu Gly Lys Leu Gln Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp Val
85 90 95
Leu Ala Ala Ala Ser Tyr Leu His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val Cys
100 105 110
Lys Lys Lys Leu Lys Glu Lys Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr Lys
115 120 125
Lys Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu Ser
130 135 140
Asp Gly Ser Ser His Met Ala Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp Glu
145 150 155 160
Gly Glu Asp Asp Lys Leu Asn Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu Ala
165 170 175
Ala Glu Pro Gly Asn Met Trp Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala Gly
180 185 190
Ile Pro Gln Ala Gly Gly Glu Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala Gly
195 200 205
Lys Thr Val Ala Ser Pro Cys Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln Arg
210 215 220
Ser Val Thr Ser Val Arg Asp Ser Ala Asp Val Asp Cys Val Leu Asp
225 230 235 240
Leu Ser Val Lys Ser Ser Leu Ser Gly Val Glu Asn Leu Asn Ser Ser
245 250 255
Tyr Phe Ser Ser Gln Asp Val Leu Arg Ser Asn Leu Val Gln Val Lys
260 265 270
Val Glu Lys Glu Ala Ser Cys Asp Glu Ser Asp Val Gly Thr Asn Asp
275 280 285
Tyr Asp Met Glu His Ser Thr Val Lys Glu Ser Val Ser Thr Asn Asn

290 295 300
 Arg Val Gln Tyr Glu Pro Ala His Leu Ala Pro Leu Arg Glu Asp Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Arg Glu Leu Asp Arg Glu Asp Lys Ala Ser Asp Asp Glu Met
 325 330 335
 Met Thr Pro Glu Ser Glu Arg Val Gln Val Glu Gly Gly Met Glu Asn
 340 345 350
 Ser Leu Leu Pro Tyr Val Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ala Gly Gln Ile

 355 360 365
 Phe Met Cys Pro Leu Cys Asn Lys Val Phe Pro Ser Pro His Ile Leu
 370 375 380
 Gln Ile His Leu Ser Thr His Phe Arg Glu Gln Asp Gly Ile Arg Ser
 385 390 395 400
 Lys Pro Ala Ala Asp Val Asn Val Pro Thr Cys Ser Leu Cys Gly Lys
 405 410 415
 Thr Phe Ser Cys Met Tyr Thr Leu Lys Arg His Glu Arg Thr His Ser

 420 425 430
 Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Thr Gln Cys Gly Lys Ser Phe Gln Tyr
 435 440 445
 Ser His Asn Leu Ser Arg His Ala Val Val His Thr Arg Glu Lys Pro
 450 455 460
 His Ala Cys Lys Trp Cys Glu Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp Leu
 465 470 475 480
 Tyr Arg His Ile Arg Lys Phe His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu Ser

 485 490 495
 Val Lys Ser Glu Ala Leu Ser Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr Leu
 500 505 510
 Glu Asp Ser Ser Gln Glu Leu Trp Lys
 515 520
 <210> 47
 <211> 4147
 <212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 47

aggctgcggc cgccgctggg ctgctgccat ggggagccgt tgaagagtg gggccctgtg	60
gtcggccgc gcgcctcagg ctgccagcgc gggcgggggg cgccgggggc gcgcggggcc	120
cgggccgggg ccggcgggcg ggcgggggcc ggcggaggac gcccacaagt ccagcggcgg	180
cgccggcgcc agaggaggag gaggaggagg acgcggcgcc gacgcggcga ctcgggccgc	240
tccgtaacct ccgagggtcc gcggtagcgg tggacgggtc gatccgtgga gtggatgtct	300
tcgggccatt gcggtgcttg ggactcatta aactgtcact cacccccacc accaccccac	360
tggtatttca gaagtgcagt ttgagtttgt tgatgctgaa agtggaaatt tgcactaacg	420
gtggcagtggt gaactatttt cctgagaggt agatccagat aaattgctta ggttatgaag	480
acagtatgga gtttccagac cacagcagac atttgcgtca gtgtctgagc gagcagaggc	540
accagggttt tctttgtgac tgcactgttc tggtagggaga tgcccagttc cgggcacacc	600
gagctgttct ggcttcatgc agcatgtatt tccacctctt ttacaaggac cagctggaca	660
aaagagacat gtgtcatctg aacacgcaga ttgtgacagc ccccgcttcc gctctcctgc	720
ttgaattcat gtacgaaggg aaactccagt tcaaagactt gccattgag gacgtgctag	780
cagctgccag ttatctccac atgtatgaca ttgtcaaagt ctgcaaaaag aagctgaaag	840
agaaagctac cacagaggcg gacagcacca aaaaagaaga agatgcttca agttgttcgg	900
ataaagtcca gagcctctca gacggcagca gccacatggc aggtgacctg cccagtgatg	960
aagatgaagg cgaagatgac aaattgaaca ttctaccag caaaaggac ttggcagctg	1020
agcctgggaa catgtggatg cgattgccct cagactcagc aggcacccc caggctggcg	1080
gagagggcca gccacacgcc acagcagctg gaaaaacagt agccagcccc tgcagctcaa	1140
cagagtcttt gtcccagagg tctgtcacct ccgtgaggga ttccgcagat gttgactgtg	1200
tgctggacct gtctgtcaag tccagccttt caggagtga aaatctgaac agctcttatt	1260
tctcttcaca ggacgtgctg agaagcaacc tggtagcagg gaaggtggag aaagaggcgt	1320
cctgtgatga gagtgatgtt ggcaactaat actatgacat ggaacatagc actgtgaaag	1380
agagtgtgag cactaacaac agggtagagt atgagccagc ccacctggct cctctgaggg	1440
aggactcggg ctttaaggga ctggatcggg aggacaaaag cagcgatgat gagatgatga	1500
ccccagagag cgagcgggtc cagggtggaag ggggcatgga gaacagtctg cttccctacg	1560
tctccaatat cctgagcccc gcaggccaga tcttcatgtg cccctgtgc aacaaagtct	1620
tccccagccc ccacatctg cagatccacc tgagcacgca cttccgagag caggatggca	1680
tccgtagcaa gcctgccgcc gatgtcaatg tgcccacgtg ctccctgtgt gggaagactt	1740

tctcctgcat gtacaccctc aagcgccacg agaggactca ctcgggggag aagccctaca	1800
cgtgcaccca atgcggcaag agtttccagt actcgacaaa cctgagccgt catgccgtgg	1860
tgacaccccg cgagaagccc catgcctgca agtgggtgca ggcaggttc acgcagtccg	1920
gagacctgta cagacacatc cgcaagtcc actgtgagtt ggtgaactcc ttgtcggta	1980
aaagtgaagc gctgagcttg cccactgtca gagactggac cttagaagat agctctcaag	2040
aactttggaa ataattttat atatatatat atataataa tatatatata tatatatata	2100
tatatataca tagatctcta tatagttgtg gtacgggtcta aaagcagtct tgtttcctgg	2160
aactgaaaag ttgggatctt aacttgtttt tgcacttttag aataatagca tgagaatctc	2220
actaattttag cattctgata aaagaaacta gagcaagtca caagtagaga gctgtctttc	2280
ttttgagggt taggccaagt tagccaataa aaccttctca acaaatggtt ctgtcacaaa	2340
cgctttcaca tggttacttt ttgtacacac tgcattgtct tgagcgcttt ccctgtgctc	2400
cacactgttt tgttttgttt tgttttcaga gtagaaatcc cctccagttt attagcctct	2460
ttatatgtct caaattgcat gaatatattc tggtgtgttg aaacctgaat gcttttagac	2520
ccaaatggaa aatttctgaa atgctggatt atctattttt aaacaagcag ttgacttaaa	2580
actttgtgtg gcaacttctg gttttctgat ggtccccagt gagagaaatc tgacagtaca	2640
ctgggtcact gggactgtct ctgtgaaggt ttgcttgaga tgaaaaagga tattgcagct	2700
tcagcagtgt tgaactgtgt gtttaaaatg tgaattactg ttcttgtata ctgtaattga	2760
ttacacgggc tgggggggggt gtcaaaagac ttgacaggtt gtgttgatgc tcttagttga	2820
gtcttgaaaa gtaaatatta acgctacaga aatgcatgag tttcaatata ttttttgtct	2880
ttgtttgcat tgiataactt taacgagtga gtttaaaatt atttaatttc cttagaaaaa	2940
tagcaccatt tgggaaaaaa actggtgtta cgaagaacat aaatgcactg tctttatatt	3000
tatttttatt ttatataatt taaattgact tttccacgt ctttaagttt gaaactgtta	3060
agctgaataa aaacttaagc tgcaaatga taacttcgct acattacaag gaacatataa	3120
atgtttacaa acggcttaaa gaattgcatg tgcagtgtgc attcatacca cacttgtaat	3180
tgacagaaac ccatgccagc tcagagttaa ggtgtacaca cgtaccagc cgagtgtttt	3240
tagaataact actgcacaaa ttgacaatag gtcataggtc attctctctc tccctccttt	3300
ttgttcccc tttttttttc tccctatatt cttttcttc cccctaccc ctaactcatg	3360
aaaagattct atggactgaa aaagccccag gctgaaagga ctgaaccgcc ttgattgaca	3420
tggggagggg ggttagtaga ctgtgtatcg gcagcagagg ctgcagcccg atgtgtggtt	3480

ctgatggcca gcgcggggca gaagcgtttt gcacactgtt tgttttcctg tcttgcaatt 3540

acaaataagg tctatgggag tagcatggga aacagtgggt gtttttcctt ttttcttttt 3600

taattgcttt tgtttaaaat ttgatgcct taactactgt aaacatagcc tatttttgtg 3660

cttaagatac tgaatggaaa actccattgt gtgttgctgg actgttttgg aaatatttgg 3720

tcaaagtat gtaatttgg ctgtaatggc atttaaagca aacaacaaa caaacaaaca 3780

aagctgtgaa aatggccttg gagcattatc tttagttact tgaagagttt ctagtttttt 3840

tttttttaac acagtttatg ttaaataat ctttattaat ctagaggaga caatcaatgt 3900

ctgtggaaga acggactttt ttggattttc ttttttaatg gtcattgtga gtgattgctc 3960

tttcttttac ttagtttcac attcttcctt tgttctaaat cttagactga catctagctt 4020

tgacaatcat agtatgtttt atttctgag ggggaataac ttataatgct gtttagtttt 4080

gtactattgg tgtgttggtg aattttttaa ctgtgtgcta actgcaataa attatatgaa 4140

ctgagaa 4147

<210> 48

<211> 522

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Met Glu Phe Pro Asp His Ser Arg His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu

1 5 10 15

Gln Arg His Gln Gly Phe Leu Cys Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp

20 25 30

Ala Gln Phe Arg Ala His Arg Ala Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr

35 40 45

Phe His Leu Phe Tyr Lys Asp Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His

50 55 60

Leu Asn Ser Asp Ile Val Thr Ala Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu

65 70 75 80

Phe Met Tyr Glu Gly Lys Leu Gln Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp

85 90 95

Val Leu Ala Ala Ala Ser Tyr Leu His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val

100 105 110

Cys Lys Lys Lys Leu Lys Glu Lys Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr
 115 120 125
 Lys Lys Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu
 130 135 140

 Ser Asp Gly Ser Ser His Met Ala Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Asp Asp Lys Leu Asn Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu
 165 170 175
 Ala Ala Glu Pro Gly Asn Met Trp Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala
 180 185 190
 Gly Ile Pro Gln Ala Gly Gly Glu Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala
 195 200 205

 Gly Lys Thr Val Ala Ser Pro Cys Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln
 210 215 220
 Arg Ser Val Thr Ser Val Arg Asp Ser Ala Asp Val Asp Cys Val Leu
 225 230 235 240
 Asp Leu Ser Val Lys Ser Ser Leu Ser Gly Val Glu Asn Leu Asn Ser
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Ser Ser Gln Asp Val Leu Arg Ser Asn Leu Val Gln Val
 260 265 270

 Lys Val Glu Lys Glu Ala Ser Cys Asp Glu Ser Asp Val Gly Thr Asn
 275 280 285
 Asp Tyr Asp Met Glu His Ser Thr Val Lys Glu Ser Val Ser Thr Asn
 290 295 300
 Asn Arg Val Gln Tyr Glu Pro Ala His Leu Ala Pro Leu Arg Glu Asp
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Arg Glu Leu Asp Arg Glu Asp Lys Ala Ser Asp Asp Glu
 325 330 335

 Met Met Thr Pro Glu Ser Glu Arg Val Gln Val Glu Gly Gly Met Glu
 340 345 350
 Asn Ser Leu Leu Pro Tyr Val Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ala Gly Gln

355 360 365
 Ile Phe Met Cys Pro Leu Cys Asn Lys Val Phe Pro Ser Pro His Ile
 370 375 380
 Leu Gln Ile His Leu Ser Thr His Phe Arg Glu Gln Asp Gly Ile Arg
 385 390 395 400

Ser Lys Pro Ala Ala Asp Val Asn Val Pro Thr Cys Ser Leu Cys Gly
 405 410 415
 Lys Thr Phe Ser Cys Met Tyr Thr Leu Lys Arg His Glu Arg Thr His
 420 425 430
 Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Thr Gln Cys Gly Lys Ser Phe Gln
 435 440 445
 Tyr Ser His Asn Leu Ser Arg His Ala Val Val His Thr Arg Glu Lys
 450 455 460

Pro His Ala Cys Lys Trp Cys Glu Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp
 465 470 475 480
 Leu Tyr Arg His Ile Arg Lys Phe His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu
 485 490 495
 Ser Val Lys Ser Glu Ala Leu Ser Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr
 500 505 510
 Leu Glu Asp Ser Ser Gln Glu Leu Trp Lys
 515 520

<210> 49

<211> 3810

<212>

> DNA

<213> Mus musculus

<400> 49

atgaagtgat ggtcttactg gattgaaagt cttgggcttg cttggtttac gattttattt 60
 cttctatttg agcaagtaaa taactttaat acacaaaaat atttcaagtt ttcagatggt 120
 tatgaagaca gtatggagtt tccagaccac agcagacatt tgctgcagtg tctgagcgag 180
 cagaggcacc agggctttct ttgtgactgc actgttctgg tgggagatgc ccagtccgg 240
 gcacaccgag ctgttctggc ttcatgcagc atgtatttcc acctcttta caaggaccag 300
 ctggacaaaa gagacattgt tcattcgaac agcgacattg tgacagcccc cgctttcgct 360

ctcctgcttg aattcatgta cgaaggga aa ctccagttca aagacttgcc cattgaggac 420

gtgctagcag ctgccagtta tctccacatg tatgacattg tcaaagtctg caaaaagaag 480

ctgaaagaga aagctaccac agaggcggac agcaccaaaa aagaagaaga tgcttcaagt 540

tgttcggata aagtcgagag cctctcagac ggacagcagcc acatggcagg tgacctgccc 600

agtgtatgaag atgaaggcga agatgacaaa ttgaacattc taccagcaa aagggacttg 660

gcagctgagc ctgggaacat gtggatgcga ttgccctcag actcagcagg catccccag 720

gctggcggag aggccgagcc acacgccaca gcagctggaa aaacagtagc cagcccctgc 780

agctcaacag agtctttgtc ccagaggtct gtcacctcgg tgagggatc ggcagatgtt 840

gactgtgtgc tggacctgtc tgtcaagtcc agcctttcag gagttgaaaa tctgaacagc 900

tcttatttct cttcacagga cgtgtctgaga agcaacctgg tgcaggtgaa ggtggagaaa 960

gaggcgtcct gtgatgagag tgatgttggc actaatgact atgacatgga acatagcact 1020

gtgaaagaga gtgtgagcac taacaacagg gtacagtatg agccagccca cctggctcct 1080

ctgagggagg actcggctctt aagggaactg gatcgggagg acaaagccag cgatgatgag 1140

atgatgaccc cagagagcga gcgggtccag gtggaagggg gcatggagaa cagtctgctt 1200

ccctacgtct ccaatatcct gagccccgca ggccagatct tcatgtgccc cctgtgcaac 1260

aaagtcttcc ccagccccca catctgcag atccacctga gcacgcactt ccgagagcag 1320

gatggcatcc gtagcaagcc tgccgccgat gtcaatgtgc ccactgtct cctgtgtggg 1380

aagactttct cctgcatgta caccctcaag cgccacgaga ggactcactc gggggagaag 1440

ccctacacgt gcacccaatg cggcaagagt ttccagtact cgcacaacct gagccgtcat 1500

gccgtggtgc acacccgca gaagcccat gcctgcaagt ggtgagagcg cagggtcacg 1560

cagtccggag acctgtacac acacatccgc aagttccact gtgagttggt gaactccttg 1620

tcggtcaaaa gtgaagcgt gagcttgccc actgtcagag actggacctt agaagatagc 1680

tctcaagaac ttggaaata atttatata tatatatata taaataatat atatatatat 1740

atatacatat atatacatag atctctatat agttgtggta cggctctaaa gcagtcttgt 1800

ttcctggaac tgaaaagttg ggatcttaac ttgtttttgc actttagaat aatagcatga 1860

gaatctcact aatttagcat tctgataaaa gaaactagag caagtcacaa gtagagagct 1920

gtctttcttt tgagggttag gccaaagttag ccaataaaac cttctcaaca aatggttctg 1980

tcacaaacgc ttacacatgg cttacttttg tacacactgc attgtcttga gcgctttccc 2040

tgtgtccac actgttttgt ttgttttgt ttccagagta gaaatccct ccagtttatt 2100

agcctcttta taigtctcaa attgcatgaa tattttctgg ctgttggaac cctgaatgct 2160
 tttagacca aatggaaaat ttctgaaatg ctggattatc tatittttaa caagcagttg 2220
 acttaaaact ttgtgtggca acttcttggt ttctgatggc cccagtgag agaaatctga 2280
 cagtacactg ggicactggg actgtctctg tgaaggtttg cttgagatga aaaaggatat 2340
 tgcagcttca gcagtgttga actgtgtgtt taaaatgtga attactgttc ttgtatactg 2400
 taattgatta cacgggctgg ggggggtgtc aaagaacttg acaggttgtg ttgatgctct 2460
 tagttgagtc ttgaaaagta aatattaacg ctacagaaat gcatgagttt caatatattt 2520

 ttgtctttg ttgcatgtg ataactttaa cgagtgagtt taaaattatt taatttcctt 2580
 agaaaaatag caccatttgg gaaaaaaact ggtgttacga agaacataaa tgcactgtct 2640
 ttatttttat ttittattta tataatttaa attgactttt cccagctctt taagtttgaa 2700
 actgttaagc tgaataaaaa cttaagctgc aaattgataa cttcgctaca ttacaaggaa 2760
 catataaatg tttaaaaacg gcttaagaa ttgcatgtgc agtgtgcatt cataccacac 2820
 ttgtaattgc acagaacca tgccagctca gagtttaggt gtacacacgt acccagccga 2880
 gtgtttttag aataactact gcacaaattg acaataggtc ataggtcatt ctctctctcc 2940

 ctctttttg ctccccctt cttttctcc cctatttctt ttcttcccc ctaccccta 3000
 actcatgaaa agattctatg gactgaaaaa gccccaggct gaaaggactg aaccgccttg 3060
 attgacatgg ggaggggggt tagtagactg tgtatcggca gcagaggctg cagcccgatg 3120
 tgtggttctg atggccagcg cggggcagaa gcgttttgca cactgtttgt ttctctgtct 3180
 tgcacttaca aataaggctc atgggagtag catgggaaac agtggttgtt ttccctttt 3240
 tcttttttaa ttgcttttgt ttaaaatttg atcgcttaa ctactgtaaa catagcctat 3300
 ttttgtgctt aagatactga atggaaaact ccattgtgtg ttgctggact gttttggaaa 3360

 tatttggtca aatgtatgtt aatttggtg taatggcatt taaagcaaac aaacaaacaa 3420
 acaaaacaag ctgtgaaaat ggccttgag cattatcttt agttacttga agagtttcta 3480
 gtttttttt tttaataca gtttatgtta aaataatctt tattaatcta gaggagacaa 3540
 tcaatgtctg tggaagaacg gacttttttg gattttcttt tttaatggtc attgtgagtg 3600
 attgctcttt ctttactta gtttcacatt ctctcttgt tctaaatctt agactgacat 3660
 ctactttga caatcatagt atgttttatt tctgagggg gaataactta taatgtgtt 3720
 tagttttgta ctattggtgt gttggtgaat ttttaactg tgtgctaact gcaataaatt 3780

 atatgaactg agaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3810

<210> 50

<211> 531

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Cys Pro Lys Gly Tyr Glu Asp Ser Met Glu Phe Pro Asp His Ser

1 5 10 15

Arg His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu Gln Arg His Gln Gly Phe Leu

20 25 30

Cys Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp Ala Gln Phe Arg Ala His Arg

35 40 45

Ala Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr Phe His Leu Phe Tyr Lys Asp

50 55 60

Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His Leu Asn Ser Asp Ile Val Thr

65 70 75 80

Ala Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu Phe Met Tyr Glu Gly Lys Leu

85 90 95

Gln Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp Val Leu Ala Ala Ala Ser Tyr

100 105 110

Leu His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val Cys Lys Lys Lys Leu Lys Glu

115 120 125

Lys Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr Lys Lys Glu Glu Asp Ala Ser

130 135 140

Ser Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu Ser Asp Gly Ser Ser His Ile

145 150 155 160

Ala Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp Glu Gly Glu Asp Glu Lys Leu

165 170 175

Asn Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu Ala Ala Glu Pro Gly Asn Met

180 185 190

Trp Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala Gly Ile Pro Gln Ala Gly Gly

195 200 205

Glu Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala Gly Lys Thr Val Ala Ser Pro

210 215 220

Cys Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln Arg Ser Val Thr Ser Val Arg

225					230					235					240				
Asp	Ser	Ala	Asp	Val	Asp	Cys	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Val	Lys	Ser	Ser				
				245					250					255					
Leu	Ser	Gly	Val	Glu	Asn	Leu	Asn	Ser	Ser	Tyr	Phe	Ser	Ser	Gln	Asp				
				260					265					270					
Val	Leu	Arg	Ser	Asn	Leu	Val	Gln	Val	Lys	Val	Glu	Lys	Glu	Ala	Ser				
				275					280					285					
Cys	Asp	Glu	Ser	Asp	Val	Gly	Thr	Asn	Asp	Tyr	Asp	Met	Glu	His	Ser				
290				295				300											
Thr	Val	Lys	Glu	Ser	Val	Ser	Thr	Asn	Asn	Arg	Val	Gln	Tyr	Glu	Pro				
305				310				315				320							
Ala	His	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Glu	Asp	Ser	Val	Leu	Arg	Glu	Leu	Asp				
				325					330					335					
Arg	Glu	Asp	Lys	Ala	Ser	Asp	Asp	Glu	Met	Met	Thr	Pro	Glu	Ser	Glu				
				340					345					350					
Arg	Val	Gln	Val	Glu	Gly	Gly	Met	Glu	Ser	Ser	Leu	Leu	Pro	Tyr	Val				
355				360				365											
Ser	Asn	Ile	Leu	Ser	Pro	Ala	Gly	Gln	Ile	Phe	Met	Cys	Pro	Leu	Cys				
370				375				380											
Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Ser	Pro	His	Ile	Leu	Gln	Ile	His	Leu	Ser	Thr				
385				390				395				400							
His	Phe	Arg	Glu	Gln	Asp	Gly	Ile	Arg	Ser	Lys	Pro	Ala	Ala	Asp	Val				
				405					410					415					
Asn	Val	Pro	Thr	Cys	Ser	Leu	Cys	Gly	Lys	Thr	Phe	Ser	Cys	Met	Tyr				
420				425				430											
Thr	Leu	Lys	Arg	His	Glu	Arg	Thr	His	Ser	Gly	Glu	Lys	Pro	Tyr	Thr				
435				440				445											
Cys	Thr	Gln	Cys	Gly	Lys	Ser	Phe	Gln	Tyr	Ser	His	Asn	Leu	Ser	Arg				
450				455				460											
His	Ala	Val	Val	His	Thr	Arg	Glu	Lys	Pro	His	Ala	Cys	Lys	Trp	Cys				
465				470				475				480							

Glu Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp Leu Tyr Arg His Ile Arg Lys
485 490 495

Phe His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu Ser Val Lys Ser Glu Ala Leu
500 505 510

Ser Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr Leu Glu Asp Ser Ser Gln Glu
515 520 525

Leu Trp Lys
530

<210> 51

<211> 3851

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

agtgtgtgcg gatctgtggt ggagaaggta tctcattcct ctctaacatc atctccactt 60
tgcattctgtc tctcttagtc tgcttttttt ccaccgatgt aacagacctg gagccagcag 120

gactcagagg aaaggactta atcaggttta tgtgtcctaa aggttatgaa gacagtatgg 180
agtttccaga ccatagtaga catttgctac agtgtctgag cgagcagaga caccagggtt 240
ttcttttgta ctgcactgtt ctgggtgggag atgcccagtt ccgagcgcac cgagctgtac 300
tggttcatg cagcatgtat ttccacctct ttacaagga ccagctggac aaaagagaca 360
ttgttcatct gaacagcgac attgttacag cccccgcttt cgctctcctg cttgaattca 420
tgtatgaagg gaaactccag ttcaaagact tgccattga agacgtgcta gcagctgcca 480
gttatctcca catgtatgac attgtcaaag tctgcaaaaa gaagctgaaa gagaaagcca 540

ccacggaggc agacagcacc aaaaaggaag aagatgcttc aagttgttcg gacaaagtcg 600
agagtctctc cgatggcagc agccacatag caggcgatct gccagtgat gaagatgaag 660
gagaagatga aaaattgaac atcctgcccc gcaaaaggga cttggcggcc gaggctggga 720
acatgtggat gcgattgccc tcagactcag caggcatccc ccaggctggc ggagaggcag 780
agccacagc cacagcagct ggaaaaacag tagccagccc ctgcagctca acagagtctt 840
tgtcccagag gtctgtcacc tccgtgaggg attcggcaga tgttgactgt gtgctggacc 900
tgtctgtcaa gtccagcctt tcaggagtgtg aaaatctgaa cagctcttat ttctcttcac 960

aggacgtgct gagaagcaac ctgggtgcagg tgaagggtga gaaagaggct tcctgtgatg 1020
agagtgatgt tggcactaat gactatgaca tggaacatag cactgtgaaa gaaagtgtga 1080

gcactaataa cagggtacag tatgagccgg cccatctggc tcccctgagg gaggactcgg	1140
tcttgaggga gctggaccgg gaggacaaag ccagtgatga tgagatgatg accccagaga	1200
gcgagcgtgt ccaggtggag ggaggcatgg agagcagtct gctcccctac gtctccaaca	1260
tcctgagccc cgcgggccag atcttcattgt gccccctgtg caacaaggtc tccccagcc	1320
cccacatcct gcagatccac ctgagcacgc acttccgcga gcaggacggc atccgcagca	1380
agccccccgc cgatgtcaac gtgccacagt gctcgctgtg tgggaagact ttctcttgca	1440
tgtacacctt caagcgccac gagaggactc actcggggga gaagccctac acatgcaccc	1500
agtgcggcaa gagcttccag tactcgaca acctgagccg ccatgccgtg gtgcacaccc	1560
gcgagaagcc gcacgcctgc aagtgggtgc agcgcagggt cacgcagtcc ggggacctgt	1620
acagacacat tcgcaagttc cactgtgagt tggatgaactc cttgtcggtc aaaagcgaag	1680
cactgagctt gcctactgtc agagactgga ccttagaaga tagctctcaa gaactttgga	1740
aataatttta tatatatata aataatata atatatatac atatatataa atagatctct	1800
atatagtgtt ggtacggctt aaaagcagtc ttgtttcctg gaaataaaaa gtgggatata	1860
taacttgttt ttgcacttta gaatagcatg agaattctac taatttagca ttctgataaa	1920
agaaacttta gagcaagtca gaatagagag gtgtttttcc tttgagggga taggggaagt	1980
aagccaataa gaacctttta aacaaatcgt cctgtcaca aatgctttca tatggcttaa	2040
ttttgtcaac actgcattgt cttttgagct cttttttccc cccaacaaa gttttttgt	2100
ttttgttttt ttttttaag tagaaattcc ctccagtttt attagcctct ttatatgtct	2160
caaattgcat gaattttttc tggctgttgg aaacctgaat gcttttagac ccaaattgaa	2220
aatttctgaa atgctggatt atctattttt aaacaagcag ttgacttaaa actttctgtg	2280
gcaacttctg gttttctgac agttcccagt gagagaaatg ctgaaagtac actgggatca	2340
ctgggacact gtcttatgaa ggtttgcttg ggatgaaaaa ggatattgca gcttcagcag	2400
tgttgaactg tgtgtttaaa aatgtgaatt actgttattg tatactgtaa ttgattacat	2460
gggctggggg ggtgtcaaag aacttgacag gtgtgttga tgctcttagt tgagtcttga	2520
aaagtaata ttaacgtac agaaatgcat gagtttcaat atattttttg tctttgtttg	2580
cattgtataa cttaacgag tgagttaaa attatttaat ttccttagaa aaataacacc	2640
atttgaaaa aaaaactggt gttatgaaga acgtaaatgc actgttttta tttttatttt	2700
atataattta aattgacttt cccactgtct ttaagttgaa actgttaagc tgaataaaaa	2760
cttaagctgc aaattgataa cttcgtaca taacaaggaa aataataatg tttaacaaca	2820
gcttaaaagt ttgcatgtgc agtgtgcatt tataacaaac ttctaattgc acaaaaccca	2880
tgccagctca gagtttaggt gtacacattt acccagttga gcgttcttag aataactact	2940

gcacaagttg acaataggtc gttctctctt tttttttgtt tgctcccttt ttctttttct 3000
 ccccttcttc cttaccctcc ctcccttact ctcccccccc accaccaccc tccaccccca 3060

actcatgaaa agattctatg gactgaaaaa gccccaggct gaaaggactg gactgccttg 3120
 attgacatgg ggaagggggg tagtagacta tgtggattgc ggccagcagag gctgcagcct 3180
 aacgtgtggt ttaaatgacc agcacgcaag gcaaaagcat ttgcacagt gttgtttttc 3240
 ctgtcttgca cttacaaata aggtctatgg gagtagcatg gaaaacgttt gctgtttttc 3300
 cctttttttt ttaattgctt ttgtttaaaa ttgatcgcc ttaactactg taaacatagc 3360
 ctatttttgt gcttaagata ctgaatggaa aactccattg tgtgttgctg gactgttttg 3420
 gaaatatttg gttaaatgtg tgtaatttg gctgtaatgg catttaaagc aaacaacaa 3480

acaaaaaag ctgtgaaaat ggccttgag cattatcttt agttacttga agagtttcta 3540
 gtttttttaa aatacagttt atgttaaaat aatttttatt aatttagaga agacaatcaa 3600
 tgtctgtgag aaaacggact ttcttttga tttcttttt gtggtcattg tgagtgattg 3660
 ctttttctt ttcttagttt cacattcttc cttgtttcta aaacttagac tgacatctag 3720
 ctttgacaat catagtatgt tttattttcc tgagggggaa taacttataa tgctgttttag 3780
 ttttgtacta ttggtgtgtt ggtgaatttt taaactgtgt gctaactgca ataaattata 3840
 tgaactgaga a 3851

<210> 52

<211> 522

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Met Glu Phe Pro Asp His Ser Arg His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu

1 5 10 15

Gln Arg His Gln Gly Phe Leu Cys Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp

20 25 30

Ala Gln Phe Arg Ala His Arg Ala Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr

35 40 45

Phe His Leu Phe Tyr Lys Asp Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His

50 55 60

Leu Asn Ser Asp Ile Val Thr Ala Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu

65 70 75 80

Phe Met Tyr Glu Gly Lys Leu Gln Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp
 85 90 95
 Val Leu Ala Ala Ala Ser Tyr Leu His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val
 100 105 110
 Cys Lys Lys Lys Leu Lys Glu Lys Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr
 115 120 125
 Lys Lys Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu
 130 135 140
 Ser Asp Gly Ser Ser His Ile Ala Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Asp Glu Lys Leu Asn Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu
 165 170 175
 Ala Ala Glu Pro Gly Asn Met Trp Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala
 180 185 190
 Gly Ile Pro Gln Ala Gly Gly Glu Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala
 195 200 205
 Gly Lys Thr Val Ala Ser Pro Cys Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln
 210 215 220
 Arg Ser Val Thr Ser Val Arg Asp Ser Ala Asp Val Asp Cys Val Leu
 225 230 235 240
 Asp Leu Ser Val Lys Ser Ser Leu Ser Gly Val Glu Asn Leu Asn Ser
 245 250 255
 Ser Tyr Phe Ser Ser Gln Asp Val Leu Arg Ser Asn Leu Val Gln Val
 260 265 270
 Lys Val Glu Lys Glu Ala Ser Cys Asp Glu Ser Asp Val Gly Thr Asn
 275 280 285
 Asp Tyr Asp Met Glu His Ser Thr Val Lys Glu Ser Val Ser Thr Asn
 290 295 300
 Asn Arg Val Gln Tyr Glu Pro Ala His Leu Ala Pro Leu Arg Glu Asp
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Arg Glu Leu Asp Arg Glu Asp Lys Ala Ser Asp Asp Glu

325 330 335
Met Met Thr Pro Glu Ser Glu Arg Val Gln Val Glu Gly Gly Met Glu
340 345 350
Ser Ser Leu Leu Pro Tyr Val Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ala Gly Gln
355 360 365
Ile Phe Met Cys Pro Leu Cys Asn Lys Val Phe Pro Ser Pro His Ile

370 375 380
Leu Gln Ile His Leu Ser Thr His Phe Arg Glu Gln Asp Gly Ile Arg
385 390 395 400
Ser Lys Pro Ala Ala Asp Val Asn Val Pro Thr Cys Ser Leu Cys Gly
405 410 415
Lys Thr Phe Ser Cys Met Tyr Thr Leu Lys Arg His Glu Arg Thr His
420 425 430
Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Thr Gln Cys Gly Lys Ser Phe Gln

435 440 445
Tyr Ser His Asn Leu Ser Arg His Ala Val Val His Thr Arg Glu Lys
450 455 460
Pro His Ala Cys Lys Trp Cys Glu Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp
465 470 475 480
Leu Tyr Arg His Ile Arg Lys Phe His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu
485 490 495
Ser Val Lys Ser Glu Ala Leu Ser Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr

500 505 510
Leu Glu Asp Ser Ser Gln Glu Leu Trp Lys

515 520

<210> 53

<211> 4319

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

gtgtgttgct aatttctgga ctaattatgc aatttcattt ttttttcttg attcagccaa 60

atgtgtgtgt gtgtgtttta actgtgcttt ctaagcacag tcaggtagca aaagtaataa 120

aaaggatggt tgaacaagtt ttcttgtatg ttccaggata tgtttgggac ttttctttgt	180
ttattatatg agttgttccc tttgaaatta aagctatttt gtaggttttg tgggacataa	240
tttgataagt agagttaatt aaatttcttc tggaagagat ctaaattctt attcttagtg	300
agagactgta gttaaaggaa ggctttttaga acttgggttc aaggaagatg gagatgcgtc	360
ggaagctctt tggcgggggt gaggaagtgc agaaagtgtg cattttcctt ctggcattta	420
ggtcttgctc gtgtgatttg gtggtgcttg ggtcataagc ctgattaaaa ttcagggaca	480
tgtaccacgg cggccaaagc ggaattaatt tttttatatg gggactggag cgctgaaaag	540
ttgttctga ccaggctcta atgagaaatt cctctctccc caggttatga agacagtatg	600
gagtttccag accatagtag acatttgcta cagtgtctga gcgagcagag acaccagggt	660
tttctttgtg actgcactgt tctggtggga gatgccaggt tccgagcgca ccgagctgta	720
ctggcttcat gcagcatgta ttccacctc ttttacaagg accagctgga caaaagagac	780
attgttcac tgaacagcga cattgttaca gccccgctt tcgctctcct gcttgaattc	840
atgtatgaag ggaactcca gttcaaagac ttgccattg aagacgtgct agcagctgcc	900
agttatctcc acatgtatga cattgtcaaa gtctgcaaaa agaagctgaa agagaaagcc	960
accacggagg cagacagcac caaaaaggaa gaagatgctt caagttgttc ggacaaagtc	1020
gagagtctct ccgatggcag cagccacata gcaggcgatt tgcccagtga tgaagatgaa	1080
ggagaagatg aaaaattgaa catcctgccc agcaaaaggg acttggcggc cgagcctggg	1140
aacatgtgga tgcgattgcc ctcagactca gcaggcatcc cccaggctgg cggagaggca	1200
gagccacacg ccacagcagc tggaaaaaca gtagccagcc cctgcagctc aacagagtct	1260
ttgtcccaga ggictgtcac ctccgtgagg gattcggcag atgttgactg tgtgctggac	1320
ctgtctgtca agtccagcct ttccaggagt gaaaatctga acagctctta tttctcttca	1380
caggacgtgc tgagaagcaa cctggtgcag gtgaaggtgg agaaagaggc ttcctgtgat	1440
gagagtgatg ttggcactaa tgactatgac atggaacata gcactgtgaa agaaagtgtg	1500
agcactaata acagggtaca gtatgagccg gcccatctgg ctcccctgag ggaggactcg	1560
gtcttgaggg agctggaccg ggaggacaaa gccagtgatg atgagatgat gaccccagag	1620
agcgagcgtg tccagggtga gggaggcatg gagagcagtc tgctccccta cgtctccaac	1680
atcctgagcc ccgcgggcca gatcttcatg tgeccctgt gcaacaaggt ctccccagc	1740
ccccacatcc tgcagatcca cctgagcacg cacttccgcg agcaggacgg catccgcagc	1800
aagcccgccg ccgatgtcaa cgtgcccacg tgctcgctgt gtgggaagac tttctcttgc	1860

atgtacaccc tcaagcgcca cgagaggact cactcggggg agaagcccta cacatgcacc	1920
cagtgcggca agagcttcca gtactcgac aacctgagcc gccatgccgt ggtgcacacc	1980
cgcgagaagc cgcacgcctg caagtgggtgc gagcgcaggt tcacgcagtc cggggacctg	2040
tacagacaca ttgcaagtt ccactgtgag ttggtgaact ccttgtcggc caaaagcgaa	2100
gcactgagct tgcctactgt cagagactgg accttagaag atagctctca agaactttgg	2160
aaataatfff atatatatat aaataatata tatatatata catatatata aatagatctc	2220
tatatagttg tggtagcgtc taaaagcagc cttgtttcct ggaaataaaa agttgggata	2280
ttaacttggt ttgcacttt agaatagcat gagaatctca ctaatttagc attctgataa	2340
aagaaacttt agagcaagtc agaatagaga ggtgtttttc ctttaggggg ataggggaag	2400
taagccaata agaacttttt aaacaaatcg tctgttcaca aaatgctttc atatgcttta	2460
attttgtcaa cactgcattg tcttttgagc tcttttttcc ccccaacaa agtttttttg	2520
ttttttgttt ttttttttaa gttagaaattc cctccagttt tattagcctc tttatatgtc	2580
tcaaattgca tgaatttttt ctggctgttg gaaacctgaa tgctttttaga cccaaatgga	2640
aaatttctga aatgctggat tatctatfff taaacaagca gttgacttaa aactttctgt	2700
ggcaacttct ggttttctga cagttcccg tgagagaaat gctgaaagta cactgggatc	2760
actgggacac tgtcttatga aggtttgctt gggatgaaaa aggatattgc agcttcagca	2820
gtgttgaact gtgtgtttaa aaatgtgaat tactgttatt gtatactgta attgattaca	2880
tgggtggggg ggtgtgcaaa gaacttgaca ggtgtgttg atgctcttag ttgagcttg	2940
aaaagtaaat attaacgcta cagaaatgca tgagtttcaa tatatfffft gtctttgttt	3000
gcattgtata actttaacga gtgagtttaa aattatttaa tttccttaga aaaatagcac	3060
catttggaag aaaaaactgg tgttatgaag aacgtaaatg cactgttttt atttttatft	3120
tatataatft aaattgactt tcccactgtc ttttaagtga aactgttaag ctgaataaaa	3180
acttaagctg caaattgata acttcgctac ataacaagga aaatataaat gtttacaac	3240
agcttaaaaga ttgcatgtg cagtgtgcat ttataacaaa cttctaattg cacaaaaccc	3300
atgccagctc agagtttagg tgtacacatt taccagttg agcgttctta gaataactac	3360
tgcacaagtt gacaataggt cgttctctct ttttttttgt ttgctccctt tttcttttc	3420
tccccttct ccttaccctc cctcccttac tctccctccc caccaccacc ctccacccc	3480
aactcatgaa aagattctat ggactgaaaa agccccaggc tgaaaggact ggactgcctt	3540
gattgacatg gggaaggggg ttagtagact atgtggattg cggcagcaga ggctgcagcc	3600

taacgtgtgg ttttaatgac cagcacgcaa ggcaaaagca ttttgcacag tgtttgtttt 3660
cctgtcttgc acttacaat aaggtctatg ggagtagcat ggaaaacgtt tgctgttttt 3720
cccttttttt ttttaattgct tttgtttaaa atttgatcgc cttaactact gtaaacaatag 3780
cctatttttg tgcttaagat actgaatgga aaactccatt gtgtgttgct ggactgtttt 3840
ggaaatattt ggtaaatgt gtgttaattt ggctgtaatg gcatttaaag caaacaaca 3900
aacaacaaaa gctgtgaaaa tggccttgga gcattatctt tagttacttg aagagtttct 3960
agttttttta aaatacagtt tatgttaaaa taatttttat taatttagag aagacaatca 4020

atgtctgtga gaaaacggac tttcttttgg attttctttt tgtggtcatt gtgagtgatt 4080
gctttttcct tttcttagtt tcacattctt cctttgttct aaaacttaga ctgacatcta 4140
gctttgacaa tcatagtatg ttttattttc ctgaggggga ataacttata atgtgtttta 4200
gttttgtact attgggtgtg tgggtgaattt ttaaaactgtg tgctaactgc aataaattat 4260
atgaactgag aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4319

<210> 54

<211> 522

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Met Glu Phe Pro Asp His Ser Arg His Leu Leu Gln Cys Leu Ser Glu

1 5 10 15
Gln Arg His Gln Gly Phe Leu Cys Asp Cys Thr Val Leu Val Gly Asp
20 25 30
Ala Gln Phe Arg Ala His Arg Ala Val Leu Ala Ser Cys Ser Met Tyr
35 40 45
Phe His Leu Phe Tyr Lys Asp Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ile Val His
50 55 60
Leu Asn Ser Asp Ile Val Thr Ala Pro Ala Phe Ala Leu Leu Leu Glu

65 70 75 80
Phe Met Tyr Glu Gly Lys Leu Gln Phe Lys Asp Leu Pro Ile Glu Asp
85 90 95
Val Leu Ala Ala Ala Ser Tyr Leu His Met Tyr Asp Ile Val Lys Val
100 105 110
Cys Lys Lys Lys Leu Lys Glu Lys Ala Thr Thr Glu Ala Asp Ser Thr

115 120 125
Lys Lys Glu Glu Asp Ala Ser Ser Cys Ser Asp Lys Val Glu Ser Leu

130 135 140
Ser Asp Gly Ser Ser His Ile Ala Gly Asp Leu Pro Ser Asp Glu Asp
145 150 155 160

Glu Gly Glu Asp Glu Lys Leu Asn Ile Leu Pro Ser Lys Arg Asp Leu
165 170 175

Ala Ala Glu Pro Gly Asn Met Trp Met Arg Leu Pro Ser Asp Ser Ala
180 185 190

Gly Ile Pro Gln Ala Gly Gly Glu Ala Glu Pro His Ala Thr Ala Ala

195 200 205
Gly Lys Thr Val Ala Ser Pro Cys Ser Ser Thr Glu Ser Leu Ser Gln

210 215 220
Arg Ser Val Thr Ser Val Arg Asp Ser Ala Asp Val Asp Cys Val Leu

225 230 235 240
Asp Leu Ser Val Lys Ser Ser Leu Ser Gly Val Glu Asn Leu Asn Ser

245 250 255
Ser Tyr Phe Ser Ser Gln Asp Val Leu Arg Ser Asn Leu Val Gln Val

260 265 270
Lys Val Glu Lys Glu Ala Ser Cys Asp Glu Ser Asp Val Gly Thr Asn

275 280 285
Asp Tyr Asp Met Glu His Ser Thr Val Lys Glu Ser Val Ser Thr Asn

290 295 300
Asn Arg Val Gln Tyr Glu Pro Ala His Leu Ala Pro Leu Arg Glu Asp

305 310 315 320
Ser Val Leu Arg Glu Leu Asp Arg Glu Asp Lys Ala Ser Asp Asp Glu

325 330 335
Met Met Thr Pro Glu Ser Glu Arg Val Gln Val Glu Gly Gly Met Glu

340 345 350
Ser Ser Leu Leu Pro Tyr Val Ser Asn Ile Leu Ser Pro Ala Gly Gln

355 360 365

Ile Phe Met Cys Pro Leu Cys Asn Lys Val Phe Pro Ser Pro His Ile

370

375

380

Leu Gln Ile His Leu Ser Thr His Phe Arg Glu Gln Asp Gly Ile Arg

385

390

395

400

Ser Lys Pro Ala Ala Asp Val Asn Val Pro Thr Cys Ser Leu Cys Gly

405

410

415

Lys Thr Phe Ser Cys Met Tyr Thr Leu Lys Arg His Glu Arg Thr His

420

425

430

Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Thr Cys Thr Gln Cys Gly Lys Ser Phe Gln

435

440

445

Tyr Ser His Asn Leu Ser Arg His Ala Val Val His Thr Arg Glu Lys

450

455

460

Pro His Ala Cys Lys Trp Cys Glu Arg Arg Phe Thr Gln Ser Gly Asp

465

470

475

480

Leu Tyr Arg His Ile Arg Lys Phe His Cys Glu Leu Val Asn Ser Leu

485

490

495

Ser Val Lys Ser Glu Ala Leu Ser Leu Pro Thr Val Arg Asp Trp Thr

500

505

510

Leu Glu Asp Ser Ser Gln Glu Leu Trp Lys

515

520

<210> 55

<211> 4030

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

accggcccg gcggtccgc gctcgtccc tcgctcgtc cctcgtgtg tctggcaggc 60

tgcggccgc gctgggtcgc tgccatgggg agccgttgag agtggggccc tcttcgtcc 120

gccgcgtcc tccggtgcc agcgggggtg ggcgggaggg aggggcgggg gggagcgggc 180

gacggagccg ggattggggg gtgggggggc cgggaggag gggggcaaga gccggaggaa 240

gcccaccaag tccggcggcg gcggcggcgg ccgggaggag gaggaggagg aggcggagga 300

cgcgcggcg gcggggacgc ggtgacttag ggccgctccg tgttatgaag acagtatga 360

gtttccagac catagtagac atttgctaca gtgtctgagc gagcagagac accagggttt 420

tctttgtgac tgcactgttc tgggtgggaga tgcccagttc cgagcgcacc gagctgtact 480

ggcttcatgc agcatgtatt tccacctctt ttacaaggac cagctggaca aaagagacat 540

tgttcatctg aacagcgaca ttgttiacagc ccccgctttc gctctcctgc ttgaattcat 600

glatgaagg aaactccagt tcaaagactt gccattgaa gacgtgctag cagctgccag 660

ttatctccac atgtatgaca ttgtcaaagt ctgcaaaaag aagctgaaag agaaagccac 720

cacggaggca gacagcacca aaaaggaaga agatgcttca agttgttcgg acaaagtcga 780

gagtctctcc gatggcagca gccacatagc aggcgatttg cccagtgatg aagatgaagg 840

agaagatgaa aaattgaaca tcctgcccag caaaaggagc ttggcggccg agcctgggaa 900

catgtggatg cgattgccct cagactcagc aggcattcccc caggctggcg gagaggcaga 960

gccacagccc acagcagctg gaaaaacagt agccagcccc tgcagctcaa cagagtcttt 1020

gtcccagagg tctgtcacct ccgtgaggga ttccgcagat gttgactgtg tgctggacct 1080

gtctgtcaag tccagccttt caggagtga aaatctgaac agctcttatt tctcttcaca 1140

ggacgtgctg agaagcaacc tgggtgcaggt gaagggtggag aaagaggctt cctgtgatga 1200

gagtgatgtt ggactaatg actatgacat ggaacatagc actgtgaaag aaagtgtgag 1260

cactaataac agggtagagt atgagccggc ccatctggct cccctgaggg aggactcgtt 1320

cttgaggggag ctggaccggg aggacaaagc cagtgatgat gagatgatga cccagagag 1380

cgagcgtgtc cagggtggagg gaggcattga gagcagtctg ctcccctacg tctccaacat 1440

cctgagcccc gggggccaga tcttcatgtg cccctgtgc aacaaggctt tccccagccc 1500

ccacatcctg cagatccacc tgagcacgca ctccgcgag caggacggca tccgcagcaa 1560

gcccccgcc gatgtcaacg tgcccacgtg ctgctgtgt gggaagactt tctcttgcac 1620

gtacaccctc aagcgccacg agaggactca ctggggggag aagccctaca catgcaccca 1680

gtgcggcaag agcttccagt actcgacaa cctgagccgc catgccgtgg tgcacaccg 1740

cgagaagccg cagcctgca agtgggtgca gcgaggttc acgcagtccg gggacctgta 1800

cagacacatt cgcaagtcc actgtgagtt ggtgaactcc ttgtcggta aaagcgaagc 1860

actgagcttg cctactgtca gagactggac cttagaagat agctctcaag aactttggaa 1920

ataattttat atatataaa ataatatata tatatatata tatatataa tagatctcta 1980

tatagtgtg gtacggtcta aaagcagtct tgtttcctgg aaataaaaag ttgggatatt 2040

aacttgtttt tgcactttag aatagcatga gaatctcact aatttagcat tctgataaaa 2100

gaaactttag agcaagtcag aatagagagg tgtttttcct ttgaggggat aggggaagta 2160

agccaataag aaccttttaa acaaatctc ctgtcacaaa atgctttcat atggcttaat 2220

tttgtcaaca ctgcattgtc ttttgagctc ttttttcccc cccaacaaag tttttttgtt	2280
ttttgttttt ttttttaagt agaaattccc tccagtttta ttagcctctt tatatgtctc	2340
aaattgcatg aattttttct ggctgttgga aacctgaatg ctttttagacc caaatggaaa	2400
atctctgaaa tgctggatta tctattttta aacaagcagt tgacttaaaa ctttctgtgg	2460
caacttctgg ttttctgaca gttcccagtg agagaaatgc tgaaagtaca ctgggatcac	2520
tgggacactg tcttatgaag gtttgcttgg gatgaaaaag gatattgcag cttcagcagt	2580
gttgaactgt gtgtttaaaa atgtgaatta ctgttattgt atactgtaat tgattacatg	2640
ggctgggggg gtgtcaaaga acttgacagg ttgtgttgat gctcttagtt gagtcttgaa	2700
aagtaaatat taacgttaca gaaatgcatg agtttcaata tttttttgt ctttgtttgc	2760
attgtataac ttaacgagt gagttaaaaa ttatttaatt tccttagaaa aataacacca	2820
tttgaaaaa aaaactggtg ttatgaagaa cgtaaatgca ctgtttttat ttttatttta	2880
tataatttaa attgacttcc ccactgtctt taagttgaaa ctgttaagct gaataaaaac	2940
ttaagctgca aattgataac ttgctacat aacaaggaaa atataaatgt ttacaaacag	3000
cttaaagatt tgcatgtgca gtgtgcattt ataacaaact tctaattgca caaaacccat	3060
gccagctcag agtttaggtg tacacattta ccagttgag cgttcttaga ataactactg	3120
cacaagttga caataggtcg ttctctcttt tttttgttt gctccctttt tctttttctc	3180
cccttctctc ttacctctcc tcccttactc tccccccca ccaccacct ccacctccaa	3240
ctcatgaaaa gattctatgg actgaaaaag ccccaggctg aaaggactgg actgccttga	3300
ttgacatggg gaaggggggt agtagactat gtggattgcg gcagcagagg ctgcagccta	3360
acgtgtgggt ttaatgacca gcacgaagg caaaagcatt ttgcacagtg ttgtttttcc	3420
tgtcttgcac ttacaaataa ggtctatggg agtagcatgg aaacgtttg ctgtttttcc	3480
cttttttttt taattgcttt tgttttaaat ttgatcgctt taactactgt aaacatagcc	3540
tatttttgtg cttaagatac tgaatggaaa actccattgt gtgttgctgg actgttttgg	3600
aaatatattg ttaaatgtgt gttaatttgg ctgtaatggc atttaaagca aacaaacaaa	3660
caaaaaaagc tgtgaaaatg gccttgagc attatcttta gttacttgaa gaggttctag	3720
tttttttaaa atacagttta tgttaaaata atttttatta atttagagaa gacaatcaat	3780
gtctgtgaga aaacggactt tcttttggat tttctttttg tggtcattgt gagtgtttgc	3840
tttttcttt tcttagtttc acattcttcc ttgtttctaa aacttagact gacatctagc	3900
tttgacaatc atagtatgtt ttattttcct gagggggaat aacttataat gctgtttagt	3960
tttgtactat tgggtgtgtg gtgaattttt aaactgtgtg ctaactgcaa taaattatat	4020
gaactgagaa	4030