(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0014486
(43) 공개일자 2024년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6841 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6841 (2018.05)
C12Q 2525/161 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7044565
(22) 출원일자(국제) 2022년05월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/031275
(87) 국제공개번호 WO 2022/251586
국제공개일자 2022년12월01일
(30) 우선권주장
63/194,536 2021년05월28일 미국(US)

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

전체 청구항 수 : 총 175 항

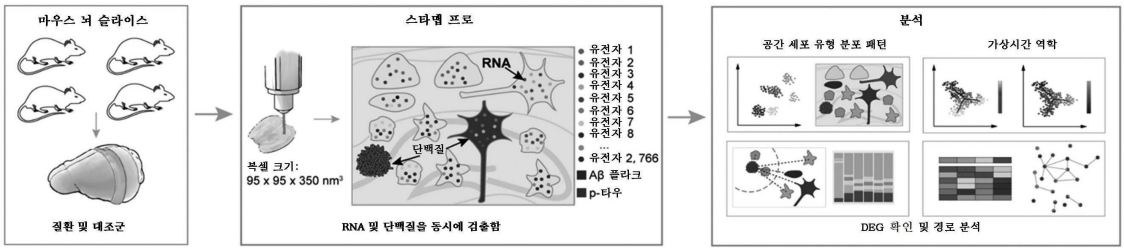
(54) 발명의 명칭 **전사 상태 및 단백질 조직학의 공동-맵핑**

(57) 요 약

본 개시내용은 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 (즉, 동일한 세포 내에서 유전자 및 단백질 발현을 동시에 맵핑하는) 방법 및 시스템을 제공한다. 본 개시내용은 또한 대상체에서 질환 또는 장애 (예를 들어, 신경계 장애, 예컨대 알츠하이머병)를 진단하는 방법을 제공한다. 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는

(뒷면에 계속)

대 표 도



후보 작용제를 스크리닝하는 방법이 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 본 개시내용은 또한 알츠하이머병과 같은 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 유용할 수 있는 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브, 뿐만 아니라 본원에 기재된 임의의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트가 또한 본 개시내용에 의해 기재된다. 추가적으로, 본 개시내용은 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하기 위한 방법, 장치, 및 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체를 제공한다.

(52) CPC특허분류
C12Q 2531/125 (2013.01)
C12Q 2537/162 (2013.01)
C12Q 2563/179 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 방법으로서,

a) 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

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

d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포 내의 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 유전자 및 단백질 발현이 다중 세포에서 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 세포가 복수의 세포 유형을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포 유형이 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 핍지교세포, 근육 세포, 심근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포 및 간 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 투과화된 세포인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 무손상 조직 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 무손상 조직이 고정된 조직 샘플인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 핵산이 DNA인 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 핵산이 RNA인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, RNA가 mRNA인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과의 관심 핵산에 대한 유전자 발현이 맵핑되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 최대 1백만개의 관심 핵산에 대한 유전자 발현이 맵핑되는 것인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12, 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열이 10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브가 관심 핵산의 상이한 부분에 결합하는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

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

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

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

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 관심 핵산의

검출의 특이성을 증가시키는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열이 비-특이적 증폭을 감소시키는 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 검출가능한 표지가 형광단인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 검출제가 각각 검출가능한 표지를 포함하는 항체인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 검출제를 2차 검출제와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 검출제가 소분자를 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 소분자가 X-34인 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 2차 검출제가 2차 항체인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 2차 항체가 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 검출가능한 표지가 형광단인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 검출제가 각각 올리고뉴클레오티드 서열에 접합되고 각각 관심 단백질에 결합하는 항체인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 관심 단백질에 결합하는 1종 이상의 항체 각각을 검출가능한 표지에 접합된 올리고뉴클레오티드와 접촉시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 검출가능한 표지에 접합된 올리고뉴클레오티드는 1종 이상의 항체에 접합된 올리고뉴클레오티드 서열에 상보적인 것인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 검출가능한 표지가 형광단인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 영상화 단계가 형광 영상화를 포함하는 것인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 영상화 단계가 공초점 현미경검사 또는 에피형광 현미경검사를 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제24항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제 각각을 2차 검출제와 접촉시키는 단계가, 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시키는 단계 후에 수행되는 것인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계가 포매 단계 전에 수행되는 것인 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치가 동일한 영상화 라운드에서 결정되는 것인 방법.

청구항 38

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치가 별개의 영상화 라운드에서 결정되는 것인 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스가 히드로겔인 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 히드로겔이 폴리비닐 알콜 히드로겔, 폴리에틸렌 글리콜 히드로겔, 소듐 폴리아크릴레이트 히드로겔, 아크릴레이트 중합체 히드로겔 또는 폴리아크릴아미드 히드로겔인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 롤링 서클 증폭을 수행하는 단계가 아민-변형된 뉴클레오티드를 제공하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 아민-변형된-뉴클레오티드는 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 내로 혼입되는 것인 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스에 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 포매시키는 단계가 1개 이상의 앰플리콘의 아민-변형된 뉴클레오티드를 아크릴산 N-히드록시숙신이미드 에스테르와 반응시키고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스를 공중합시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열이 관심 핵산을 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열인 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 세포하 해상도에서 수행되는 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 20 nm, 또는 10

nm의 세포하 해상도에서 수행되는 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 200 nm의 세포하 해상도에서 수행되는 방법.

청구항 47

세포에서 유전자 발현을 맵핑하는 방법으로서,

a) 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

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

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

e) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 영상화하여 세포 내의 관심 핵산의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 48

세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 방법으로서,

a) 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분 및 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

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

d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를

영상화하여 세포 내의 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 49

대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

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

d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포 내의 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계

를 포함하고;

여기서 1개 이상의 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산 및/또는 관심 단백질의 발현에서의 변경은 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타내는 것인

방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현이 대조군 실험으로서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현이 참조 데이터를 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 53

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 알츠하이머병인 방법.

청구항 54

제49항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 조직에 존재하는 것인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 조직이 대상체로부터의 조직 샘플인 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, 대상체가 비-인간 실험 동물인 방법.

청구항 57

제55항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 58

제54항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 조직이 고정된 조직 샘플인 방법.

청구항 59

제54항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 조직이 뇌 조직인 방법.

청구항 60

제54항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 및 단백질 발현이 다중 세포에서 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 세포가 복수의 세포 유형을 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 세포 유형이 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 핍지교세포, 근육 세포, 심근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포 및 간 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 63

제49항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 단백질이 아밀로이드 베타 (Aβ) 펩티드를 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, Aβ 펩티드가 Aβ 플라크의 형태로 세포에 존재하는 것인 방법.

청구항 65

제49항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 단백질이 타우 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 타우 단백질이 봉입체 (p-타우)의 형태로 세포에 존재하는 것인 방법.

청구항 67

제49항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 핵산이 Vsnl1, Snap25, Dnm1, Slc6a1, Aldoc, Bsg, Ctss, Plp1, Cst7, Ctsb, Apoe, Trem2, C1qa, P2ry12, Gfap, Vim, Aqp4, Clu, Plp1, Mbp, C4b, Ccnb2, Gpm6a, Ddit3, Dapk1, Myo5a, Tspan7, 및 Rhoc로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 68

제63항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, Aβ 펩티드가 소분자를 사용하여 검출되는 것인 방법.

청구항 69

제68항에 있어서, 소분자가 X-34인 방법.

청구항 70

제65항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 타우 단백질이 p-타우 1차 항체를 사용하여 검출되는 것인 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, p-타우 1차 항체를 2차 항체로 검출하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 2차 항체가 검출가능한 표지에 접합되는 것인 방법.

청구항 73

제72항에 있어서, 검출가능한 표지가 형광단인 방법.

청구항 74

제46항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 핵산의 발현에서의 변경이 플라크에 매우 근접한 세포 유형을 확인하는 데 사용되고, 특정 세포 유형이 플라크에 매우 근접하여 확인되는 경우에 대상체가 알츠하이머병을 갖거나 또는 알츠하이머병을 갖는 것으로 의심되는 것인 방법.

청구항 75

제74항에 있어서, 플라크가 Aβ 플라크인 방법.

청구항 76

제74항 또는 제75항에 있어서, 플라크에 매우 근접한 질환-연관 소교세포 세포 유형의 확인이 대상체가 알츠하이머병을 갖거나 또는 가질 위험이 있음을 나타내는 것인 방법.

청구항 77

제74항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 플라크에 매우 근접한 질환-연관 성상세포 세포 유형의 확인이 대상체가 알츠하이머병을 갖거나 또는 가질 위험이 있음을 나타내는 것인 방법.

청구항 78

제74항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 플라크에 매우 근접한 핍지교세포 전구체 세포 유형의 확인이 대상체가 알츠하이머병을 갖거나 또는 가질 위험이 있음을 나타내는 것인 방법.

청구항 79

제49항에 있어서, 질환 또는 장애가 암인 방법.

청구항 80

제49항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 핵산이 DNA인 방법.

청구항 81

제49항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 핵산이 RNA인 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, RNA가 mRNA인 방법.

청구항 83

제49항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과의 관심 핵산에 대한 유전자 발현이 맵핑되는 것인 방법.

청구항 84

제49항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 최대 1백만개의 관심 핵산에 대한 유전자 발현이 맵핑되는 것인 방법.

청구항 85

제49항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12, 또는 9-11개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 86

제49항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 87

제49항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열이 10개의 뉴클레오티드 길이인 방법.

청구항 88

제49항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브가 관심 핵산의 상이한 섹션에 결합하는 것인 방법.

청구항 89

제49항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

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

청구항 90

제49항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 방법:

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

청구항 91

제49항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 바코드 서열이 관심 핵산의 검출의 특이성을 증가시키는 것인 방법.

청구항 92

제49항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 바코드 서열이 비-특이적 증폭을 감소시키는 것인 방법.

청구항 93

제49항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 검출가능한 표지를 포함하는 것인 방법.

청구항 94

제93항에 있어서, 검출가능한 표지가 형광단인 방법.

청구항 95

제49항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 영상화 단계가 형광 영상화를 포함하는 것인 방법.

청구항 96

제49항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 영상화 단계가 공초점 현미경검사 또는 에피형광 현미경검사를 포함하는 것인 방법.

청구항 97

유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법으로서,

a) 후보 작용제로 처리되고 있거나 또는 처리된 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

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

d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포에서 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계

를 포함하고;

여기서 후보 작용제의 부재 하의 발현에 비해 후보 작용제의 존재 하의 관심 핵산 및/또는 관심 단백질의 발현에서의 변경은 후보 작용제가 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정한다는 것을 나타내는 것인

방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 후보 작용제가 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물인 방법.

청구항 99

제98항에 있어서, 소분자가 항암 치료제인 방법.

청구항 100

제98항에 있어서, 단백질이 항체인 방법.

청구항 101

제98항에 있어서, 핵산이 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)인 방법.

청구항 102

제97항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 후보 작용제에 의한 유전자 및/또는 단백질 발현의 조정이 질환 또는 장애의 증상의 감소, 경감 또는 제거와 연관된 것인 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 104

제102항 또는 제103항에 있어서, 질환 또는 장애가 알츠하이머병인 방법.

청구항 105

제102항 또는 제103항에 있어서, 질환 또는 장애가 암인 방법.

청구항 106

대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

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

d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계;

g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포에서 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하는 단계; 및

h) 1개 이상의 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산 및/또는 관심 단백질의 발현에서의 변경이 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현이 대조군 실험으로서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 108

제106항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현이 참조 데이터를 포함하는 것인 방법.

청구항 109

제106항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 치료제를 투여하는 것, 수술 또는 방사선 요법을 포함하는 것인 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 치료제가 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물인 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 소분자가 항암 치료제인 방법.

청구항 112

제110항에 있어서, 단백질이 항체인 방법.

청구항 113

제110항에 있어서, 핵산이 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)인 방법.

청구항 114

제106항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 115

제106항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 알츠하이머병인 방법.

청구항 116

제106항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 암인 방법.

청구항 117

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

i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고,

여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인

복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 118

제117항에 있어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12, 또는

9-11개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 119

제117항 또는 제118항에 있어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 120

제117항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드 서열이 10개의 뉴클레오티드 길이인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 121

제117항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브:

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

청구항 122

제117항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브가 하기 구조를 포함하는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브:

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

청구항 123

제117항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 바코드 서열이 관심 핵산의 검출의 특이성을 증가시키는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 124

제117항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 바코드 서열이 비-특이적 증폭을 감소시키는 것인 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브.

청구항 125

제117항 내지 제124항 중 어느 한 항의 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트.

청구항 126

제125항에 있어서, 1종 이상의 항체를 추가로 포함하며, 여기서 각각의 항체는 관심 단백질에 결합하는 것인 키트.

청구항 127

제125항 또는 제126항에 있어서, 항체가 항-p-타우 항체를 포함하는 것인 키트.

청구항 128

제125항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 소분자 검출제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 129

제128항에 있어서, 소분자 검출제가 X-34인 키트.

청구항 130

제125항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 추가로 포함하는 키트.

청구항 131

제130항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 것인 키트.

청구항 132

제130항 또는 제131항에 있어서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 검출가능한 표지를 포함하는 것인 키트.

청구항 133

제132항에 있어서, 검출가능한 표지가 형광단인 키트.

청구항 134

적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 방법으로서,

적어도 하나의 영상 내의 복수의 세포 각각에 대해, 적어도 하나의 영상 내의 세포의 공간 위치를 수신하는 단계;

적어도 하나의 영상 내의 복수의 단백질 각각에 대해, 영상 내의 단백질의 공간 위치를 수신하는 단계;

복수의 단백질 중 제1 단백질에 대해, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 거리는 복수의 세포의 공간 위치의 적어도 일부 및 복수의 단백질의 공간 위치의 적어도 일부에 기초하여 결정되는 것인 단계;

제1 세포 유형의 세포의 수에 기초하여, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 단계; 및

적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동의 표시를 출력하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 135

제134항에 있어서, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 단계가

복수의 세포 중 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 세포에 대해, 제1 세포 유형과 연관된 세포의 제1 백분율을 결정하고;

적어도 하나의 영상에서 복수의 세포 중 제1 세포 유형과 연관된 세포의 제2 백분율을 결정하고;

제1 백분율을 제2 백분율과 비교하여 비교 결과를 수득하고;

비교 결과를 사용하여 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 것

을 포함하는 것인 방법.

청구항 136

제135항에 있어서,

비교 결과가 제1 백분율이 제2 백분율보다 크다는 것을 나타내고;

비교 결과를 사용하여 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 것이 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 영역 내에 제1 세포 유형의 세포의 풍부화가 존재함을 확인하는 것을 포함하는 것인

방법.

청구항 137

제134항에 있어서, 카메라를 사용하여 적어도 하나의 영상을 캡처하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 138

제137항에 있어서, 적어도 하나의 영상이 복수의 영상을 포함하고, 카메라를 사용하여 적어도 하나의 영상을 캡

처하는 것이

복수의 영상 중 제1 영상을 캡처하고, 제1 영상은 복수의 세포의 공간 위치를 결정하는 데 사용되고;

복수의 영상 중 제2 영상을 캡처하고, 제2 영상은 복수의 단백질의 공간 위치를 결정하는 데 사용되는 것

을 포함하는 것인 방법.

청구항 139

제138항에 있어서,

제1 영상으로부터의 복수의 세포의 공간 위치를 제2 영상으로부터의 복수의 단백질의 공간 위치와 공간적으로 정렬하고;

공간적으로 정렬된 공간 위치에 기초하여, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 것

을 추가로 포함하는 방법.

청구항 140

제134항에 있어서, 적어도 하나의 영상이 하기를 포함하는 복수의 영상을 포함하는 것인 방법:

복수의 세포의 공간 위치를 결정하는 데 사용되는 제1 영상; 및

복수의 단백질의 공간 위치를 결정하는 데 사용되는 제2 영상.

청구항 141

제138항에 있어서,

제1 영상 및 제2 영상이 공간적으로 정렬되고;

역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수가 공간적으로 정렬된 영상에 기초하여 결정되는 것인

방법.

청구항 142

제134항에 있어서, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계가 역치 거리 미만의 세포의 중심으로부터 제1 단백질의 가장자리까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 143

제134항에 있어서, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계가, 제1 세포 유형과 연관된 각각의 세포에 대해:

제1 세포 유형의 세포로부터 복수의 단백질 중 최근접 단백질까지의 최소 거리를 결정하고;

최소 거리를 역치 거리와 비교하는 것

을 포함하는 것인 방법.

청구항 144

제143항에 있어서, 제1 세포 유형과 연관된 각각의 세포에 대한 제1 세포 유형의 세포로부터 최근접 단백질까지의 최소 거리에 기초하여, 제1 세포 유형의 세포로부터 최근접 단백질까지의 평균 최소 거리를 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 145

제134항에 있어서, 복수의 세포 각각에 대해:

세포의 유전자 정보를 수신하고;

세포의 유전자 정보에 기초하여, 세포를 복수의 세포 유형으로부터의 세포 유형과 연관시키고, 여기서 복수의 세포 유형은 제1 세포 유형을 포함하는 것

을 추가로 포함하는 방법.

청구항 146

적어도 하나의 컴퓨터 프로세서; 및

적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때, 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 방법을 수행하는 복수의 명령어로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체

를 포함하는 장치로서,

상기 방법은

적어도 하나의 영상 내의 복수의 세포 각각에 대해, 적어도 하나의 영상 내의 세포의 공간 위치를 수신하는 단계;

적어도 하나의 영상 내의 복수의 단백질 각각에 대해, 영상 내의 단백질의 공간 위치를 수신하는 단계;

복수의 단백질 중 제1 단백질에 대해, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 거리는 복수의 세포의 공간 위치의 적어도 일부 및 복수의 단백질의 공간 위치의 적어도 일부에 기초하여 결정되는 것인 단계;

제1 세포 유형의 세포의 수에 기초하여, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 단계; 및

적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동의 표시를 출력하는 단계

를 포함하는 것인

장치.

청구항 147

제146항에 있어서, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 단계가

복수의 세포 중 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 세포에 대해, 제1 세포 유형과 연관된 세포의 제1 백분율을 결정하고;

적어도 하나의 영상에서 복수의 세포 중 제1 세포 유형과 연관된 세포의 제2 백분율을 결정하고;

제1 백분율을 제2 백분율과 비교하여 비교 결과를 수득하고;

비교 결과를 사용하여 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 것

을 포함하는 것인 장치.

청구항 148

제147항에 있어서,

비교 결과가 제1 백분율이 제2 백분율보다 크다는 것을 나타내고;

비교 결과를 사용하여 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 것이 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 영역 내에 제1 세포 유형의 세포의 풍부화가 존재함을 확인하는 것을 포함하는 것인

장치.

청구항 149

제146항에 있어서, 방법이 카메라를 사용하여 적어도 하나의 영상을 캡처하는 것을 추가로 포함하는 것인 장치.

청구항 150

제149항에 있어서, 적어도 하나의 영상이 복수의 영상을 포함하고, 카메라를 사용하여 적어도 하나의 영상을 캡처하는 것이

복수의 영상 중 제1 영상을 캡처하고, 제1 영상은 복수의 세포의 공간 위치를 결정하는 데 사용되고;

복수의 영상 중 제2 영상을 캡처하고, 제2 영상은 복수의 단백질의 공간 위치를 결정하는 데 사용되는 것

을 포함하는 것인 장치.

청구항 151

제150항에 있어서, 방법이

제1 영상으로부터의 복수의 세포의 공간 위치를 제2 영상으로부터의 복수의 단백질의 공간 위치와 공간적으로 정렬하고;

공간적으로 정렬된 공간 위치에 기초하여, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 것

을 추가로 포함하는 것인 장치.

청구항 152

제146항에 있어서, 적어도 하나의 영상이 하기를 포함하는 복수의 영상을 포함하는 것인 장치:

복수의 세포의 공간 위치를 결정하는 데 사용되는 제1 영상; 및

복수의 단백질의 공간 위치를 결정하는 데 사용되는 제2 영상.

청구항 153

제150항에 있어서,

제1 영상 및 제2 영상이 공간적으로 정렬되고;

역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수가 공간적으로 정렬된 영상에 기초하여 결정되는 것인

장치.

청구항 154

제146항에 있어서, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계가 역치 거리 미만의 세포의 중심으로부터 제1 단백질의 가장자리까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 것을 포함하는 것인 장치.

청구항 155

제146항에 있어서, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계가, 제1 세포 유형과 연관된 각각의 세포에 대해:

제1 세포 유형의 세포로부터 복수의 단백질 중 최근접 단백질까지의 최소 거리를 결정하고;

최소 거리를 역치 거리와 비교하는 것

을 포함하는 것인 장치.

청구항 156

제155항에 있어서, 방법이, 제1 세포 유형과 연관된 각각의 세포에 대한 제1 세포 유형의 세포로부터 최근접 단백질까지의 최소 거리에 기초하여, 제1 세포 유형의 세포로부터 최근접 단백질까지의 평균 최소 거리를 결정하

는 것을 추가로 포함하는 것인 장치.

청구항 157

제146항에 있어서, 방법이, 복수의 세포 각각에 대해:

세포의 유전자 정보를 수신하고;

세포의 유전자 정보에 기초하여, 세포를 복수의 세포 유형으로부터의 세포 유형과 연관시키고, 여기서 복수의 세포 유형은 제1 세포 유형을 포함하는 것

을 추가로 포함하는 것인 장치.

청구항 158

적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때, 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 방법을 수행하는 복수의 명령어로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체로서,

상기 방법은

적어도 하나의 영상 내의 복수의 세포 각각에 대해, 적어도 하나의 영상 내의 세포의 공간 위치를 수신하는 단계;

적어도 하나의 영상 내의 복수의 단백질 각각에 대해, 영상 내의 단백질의 공간 위치를 수신하는 단계;

복수의 단백질 중 제1 단백질에 대해, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 거리는 복수의 세포의 공간 위치의 적어도 일부 및 복수의 단백질의 공간 위치의 적어도 일부에 기초하여 결정되는 것인 단계;

제1 세포 유형의 세포의 수에 기초하여, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 단계; 및

적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동의 표시를 출력하는 단계

를 포함하는 것인

적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 159

제158항에 있어서, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 단계가

복수의 세포 중 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 세포에 대해, 제1 세포 유형과 연관된 세포의 제1 백분율을 결정하고;

적어도 하나의 영상에서 복수의 세포 중 제1 세포 유형과 연관된 세포의 제2 백분율을 결정하고;

제1 백분율을 제2 백분율과 비교하여 비교 결과를 수득하고;

비교 결과를 사용하여 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 것

을 포함하는 것인 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 160

제159항에 있어서,

비교 결과가 제1 백분율이 제2 백분율보다 크다는 것을 나타내고;

비교 결과를 사용하여 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 것이 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 영역 내에 제1 세포 유형의 세포의 풍부화가 존재함을 것을 확인하는 것을 포함하는 것인

적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 161

제158항에 있어서, 방법이 카메라를 사용하여 적어도 하나의 영상을 캡처하는 것을 추가로 포함하는 것인 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 162

제161항에 있어서, 적어도 하나의 영상이 복수의 영상을 포함하고, 카메라를 사용하여 적어도 하나의 영상을 캡처하는 것이

복수의 영상 중 제1 영상을 캡처하고, 제1 영상은 복수의 세포의 공간 위치를 결정하는 데 사용되고;

복수의 영상 중 제2 영상을 캡처하고, 제2 영상은 복수의 단백질의 공간 위치를 결정하는 데 사용되는 것

을 포함하는 것인 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 163

제162항에 있어서, 방법이

제1 영상으로부터의 복수의 세포의 공간 위치를 제2 영상으로부터의 복수의 단백질의 공간 위치와 공간적으로 정렬하고;

공간적으로 정렬된 공간 위치에 기초하여, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 것

을 추가로 포함하는 것인 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 164

제158항에 있어서, 적어도 하나의 영상이 하기를 포함하는 복수의 영상을 포함하는 것인 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체:

복수의 세포의 공간 위치를 결정하는 데 사용되는 제1 영상; 및

복수의 단백질의 공간 위치를 결정하는 데 사용되는 제2 영상.

청구항 165

제162항에 있어서,

제1 영상 및 제2 영상이 공간적으로 정렬되고;

역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수가 공간적으로 정렬된 영상에 기초하여 결정되는 것인

적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 166

제158항에 있어서, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계가 역치 거리 미만의 세포의 중심으로부터 제1 단백질의 가장자리까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 것을 포함하는 것인 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 167

제158항에 있어서, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계가, 제1 세포 유형과 연관된 각각의 세포에 대해:

제1 세포 유형의 세포로부터 복수의 단백질 중 최근접 단백질까지의 최소 거리를 결정하고;

최소 거리를 역치 거리와 비교하는 것

을 포함하는 것인 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 168

제167항에 있어서, 방법이, 제1 세포 유형의 각각의 세포에 대한 제1 세포 유형과 연관된 세포로부터 최근접 단백질까지의 최소 거리에 기초하여, 제1 세포 유형의 세포로부터 최근접 단백질까지의 평균 최소 거리를 결정하는 것을 추가로 포함하는 것인 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 169

제158항에 있어서, 방법이, 복수의 세포 각각에 대해:

세포의 유전자 정보를 수신하고;

세포의 유전자 정보에 기초하여, 세포를 복수의 세포 유형으로부터의 세포 유형과 연관시키고, 여기서 복수의 세포 유형은 제1 세포 유형을 포함하는 것

을 추가로 포함하는 것인 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체.

청구항 170

하기를 포함하는 시스템:

a) 세포; 및

b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍, 여기서

i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적임.

청구항 171

제170항에 있어서, 현미경을 추가로 포함하는 시스템.

청구항 172

제171항에 있어서, 현미경이 공초점 현미경인 시스템.

청구항 173

제170항 내지 제172항 중 어느 한 항에 있어서, 컴퓨터를 추가로 포함하는 시스템.

청구항 174

제170항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 추가의 세포를 추가로 포함하는 시스템.

청구항 175

제174항에 있어서, 세포가 조직 샘플의 일부인 시스템.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] <관련 출원>

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 (e) 하에 2021년 5월 28일에 출원된 미국 가출원, U.S.S.N. 63/194,536을 우선권 주장하며, 이는 본원에 참조로서 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 알츠하이머병 (AD)은 진행성 신경변성 장애이고, 노인에서의 치매의 가장 흔한 형태이다 (문헌 [Masters et al., 2015]). 특히 신피질 및 해마에서 아밀로이드-β (Aβ) 플라크 및 신경원섬유 엉킴 (과인산화 타우 침착물)의 광범위한 침착은 AD의 신경병리학적 특징이다 (문헌 [Braak and Braak, 1991; Hardy and Selkoe, 2002; Masters et al., 2015]). 또한, AD 병리상태는 또한 신경교증 (소교세포 및 성상세포의 반응성 변화) 및 백질 이상을 특색으로 한다 (문헌 [Beach et al., 1989; Henstrindge et al., 2019; Butt et al., 2019]). AD 연구에서의 주요 질문은 형태학적 특징이 신경변성을 유도하는 세포 유전자 경로와 어떻게 상관되는지이다. 게놈전반 연관 연구 (GWAS)는 AD 위험과 연관된 유전자를 밝혀냈으며, 이는 AD 병리상태의 메카니즘을 밝히는 데 기여하고, 대다수의 AD 위험 유전자는 소교세포에서 고도로 발현되는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Pimenova et al., 2018; Cauwenberghe et al., 2016]). AD 마우스 모델 및 다른 신경변성 모델로부터의 다중 벌크 및 scRNA-seq 연구는 DAM (질환-연관 소교세포)으로 지칭되는 독특한 전사 상태를 갖는 소교세포의 집단을 발견하였다 (문헌 [Bohlen et al., 2019; Hansen et al., 2018]). DAM에 추가로, AD 병리상태와 연관된 성상세포 집단이 또한 특징화되었다. 확립된 분석 방법은 AD의 분자 및 세포 복잡성을 밝혀내는 데 불리하다: 벌크-조직 분석은 뇌에서의 세포 집단의 이질성을 차폐하고, 표준 영상화 방법은 소수의 유전자 및 단백질을 가시화하고 제한된 세포 유형만을 확인할 수 있다. AD 뇌 조직에 대한 단일-세포 RNA 서열분석 (scRNA-seq)의 최근 적용은 주요 뇌 세포 유형에서 유전자 발현의 실질적인 이질적 변화를 밝혀냈다 (Grubman et al., 2019; Keren-Shaul et al., 2017; Mathys et al., 2019). 그러나, scRNA-seq 연구는 단일-세포 해상도를 얻지만, 공간 패턴은 보존할 수 없다. 또한, 비편향 방식으로 뇌로부터 모든 세포 유형의 단일-세포 제제를 단리하는 것은 용이하지 않다. 아밀로이드 플라크, 타우 응집, 세포 사멸 및 시냅스 손실에 대한 다양한 세포성 반응의 범주 및 이질성을 진정으로 이해하고, 상기 국재화된 병리상태와 세포성 반응 사이의 공간적 관계를 조사하기 위해, 근본적으로 상이한 기술 플랫폼이 필요하다. 따라서, 공간적으로 분해된 단일-세포 전사체학 및 조직 조직학의 통합된 방법이 AD 연구에서 고도로 요망되고, 다수의 다른 적용에 또한 유용할 것이다.

[0004] 많은 기존의 공간적으로 분해된 트랜스크립톰 기술 (예를 들어, 공간 전사체학, 스타맵(STARmap) 등)은 동일한 조직 섹션에서의 단백질 검출과 비상용성이다 (문헌 [Stahl et al., 2016; Stuart and Satija, 2019; Wang et al., 2018]). 플라크-유도된 유전자 (PIG)는 인접 뇌 섹션의 형광 염색을 사용한 공간 전사체학 (문헌 [Stahl et al., 2016; Stuart and Satija, 2019; Wang et al., 2018])을 사용하여 밝혀져 있다. 그러나, 해상도가 제한되고, 단지 작은 세트의 유전자만이 세포 해상도에서 검증되었다. 게다가, 각각의 섹션의 상대 두께 때문에, 인접-섹션 전략은 덜 정확하고, 동일한 세포에서의 유전자 발현에 대한 타우 엉킴의 영향을 조사하는 데 사용될 수 없다. 따라서, 동일한 조직 샘플에서 유전자 발현 및 단백질 조직학을 맵핑하는 신규 방법이 필요하고, 이러한 방법은 알츠하이머병의 연구 및 치료에 유용할 것이다.

발명의 내용

[0005] 본 개시내용은 동일한 세포 내에서 유전자 및 단백질 발현을 프로파일링하는 방법을 기재한다. 특히, 본원에서 "스타맵 프로"로 지칭되는 방법/시스템의 개발이 본 개시내용에 기재되어 있다. 스타맵 프로는 동일한 조직 섹션 내의 특정 단백질 국재화와 병용하여 고해상도 공간 전사체학을 수행하는 것을 가능하게 한다. 이러한 방법/시스템은, 예를 들어 다중 세포 유형에 걸친 세포하 해상도에서 포괄적인 분자 아틀라스로 AD 병리생리상태 이해하는 데 유용하다 (도 1a). 이 방법/시스템은 또한 유전자 및/또는 단백질 발현에서의 변경을 수반하는 임의의 질환, 예컨대 암을 연구, 진단 또는 치료하고, 조직 발생을 연구하는 데 유용하다. 스타맵 프로는 또한 임의의 질환과 연관된 유전자 및 단백질 발현을 특징화하기 위해, 정상 조직의 발생을 연구하기 위해, 또는 조직에 대한 작용제의 효과를 연구하기 위해 (조직에 대한 특정한 효과를 갖는 작용제에 대한 스크리닝 포함) 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용은 h프레세닐린 2 (PS2), hAPP 및 hTAU의 돌연변이체 형태를 발현하고 연령-관련 뇌 아밀로이드 침착, 타우병증, 신경교증 및 인지 결핍을 나타내는 아밀로이드 플라크 및 타우 병리상태 둘 다를 동반한 AD의 확립된 마우스 모델 (타우PS2APP 삼중 트랜스제닉 마우스)의 사용을 기재한다 (문헌 [Grueninger et al., 2010; Lee et al., 2021]). 이전의 벌크 및 단일-세포 RNA-seq 참조물 및 다양한 AD-관련 데이터베이스로부터 추출된 2,766개의 유전자의 표적화된 목록을 맵핑함으로써, 8- 및 13-개월령 타우PS2APP 마우스의 공간 세포 아틀라스를 세포외 Aβ 플라크 및 세포내 포스포-타우 축적의 맥락에서 세포하 해상도로 생성하였다. 단일-세포 분해된 트랜스크립톰 분석은 대조군 샘플과 비교하여 타우PS2APP 모델의 피질 및 해마 영역에서 다양한 세포 유형에 걸친 질환-연관 유전자 경로를 확인하였다. 상이한 질환 단계에서 다양한 세포 유형 및 상태의 공간 지도를 합성하여, AD 질환 진행의 포괄적인 시공간 모델을 확립하고, 본원에 기재하였다.

[0006] 한 측면에서, 본 개시내용은 동일한 세포에서 (즉, 단일-세포 해상도로; 예를 들어, 도 1a 및 1b 참조) (하나 또는 다수의 유전자 및 단백질의) 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하기 위한 방법 및 시스템을 제공한다. 유전자

및 단백질 발현은 또한 다중 세포에서, 예를 들어 조직 샘플에 존재하는 다중 세포에서 한 번에 맵핑될 수 있다. 본원에 개시된 방법에서, 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시켜 관심 핵산을 증폭시키고 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생성할 수 있다. 이어서, 세포를 1종 이상의 검출제 (예를 들어, 항체, 또는 항체 단편 또는 변이체)와 접촉시킬 수 있고, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합한다. 이어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시킬 수 있고, 1개 이상의 앰플리콘을 서열분석하여 전사체의 정체 및 중합체 매트릭스 내의 그의 위치를 결정할 수 있다. 중합체 매트릭스 내의 1개 이상의 관심 단백질에 결합된 검출제의 위치는 또한 영상화에 의해 (예를 들어, 공초점 현미경검사를 통해) 결정되어, 세포 내의 전사체 및 관심 단백질의 위치가 동일한 샘플 (예를 들어, 동일한 세포) 내에서 동시에 맵핑되도록 할 수 있다. 관심 전사체 및 단백질의 위치를 사용하여, 개별 세포, 세포하 위치, 및 소기관이 특정 유전자 및 단백질의 위치 및 발현 패턴에 기초하여 확인될 수 있다. 방법은, 예를 들어 이환된 및 건강한 조직 샘플로부터의 세포 (또는 다중 세포)를 비교하는 데 유용할 수 있다. 방법은 또한 약물 발견 (예를 들어, 특정 효과를 갖는 후보 작용제에 대한 스크리닝), 약물 부작용의 연구, 및 질환 (예를 들어, 알츠하이머병 및 암)의 진단 및 치료에 유용할 수 있다.

[0007] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 방법을 제공한다:

[0008] a) 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨) 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)를 포함하고, 여기서

[0009] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

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

[0011] b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

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

[0013] d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

[0014] e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0015] f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0016] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포 내의 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계.

[0017] 본원에 기재된 방법 및 시스템은 조직 (예를 들어, 발생 조직)에서 유전자 및 단백질 발현을 연구하는 데, 다양한 질환을 진단 및 치료하는 데, 및 약물 발견에 유용할 수 있다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애 (예를 들어, 알츠하이머병)를 진단하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 유전자 및 단백질 발현을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 것으로 생각되거나 또는 가질 위험이 있는 대상체, 또는 건강하거나 또는 건강한 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서 다양한 관심 핵산 및 단백질의 발현을 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포 (예를 들어, 건강한 개체로부터의 세포, 또는 건강한 개체의 집단으로부터의 다중 세포)에서의 동일한 관심 핵산 및 단백질의 발현과 비교할 수 있다. 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산의 발현에서의 임의의 변경은 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낼 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 발현과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현이 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환

세포에서의 발현이 비-이환 세포에 대한 이러한 기준 데이터와 비교될 수 있다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 관심 핵산 또는 단백질의, 또는 다중 관심 핵산 및/또는 단백질의 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 방법은 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하에 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포 (예를 들어, 정상 세포, 또는 이환 세포)에서의 다양한 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현을 1종 이상의 후보 작용제에 노출되지 않은 세포에서의 동일한 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현과 비교할 수 있다. 후보 작용제(들)에 노출되지 않은 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산(들) 및/또는 단백질(들)의 발현에서의 임의의 변경은 관심 핵산(들) 및/또는 단백질의 발현이 후보 작용제(들)에 의해 조정된다는 것을 나타낼 수 있다.

[0019] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애 (예를 들어, 알츠하이머병)를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 유전자 발현 및 단백질 발현을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 것으로 생각되거나 또는 가질 위험이 있는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포 (또는 예를 들어 조직을 구성하는 다중 세포)에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현을 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 동일한 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현과 비교할 수 있다. 이어서, 질환 또는 장애에 대한 치료는 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현에서의 임의의 변경이 관찰되는 경우에 대상체에게 투여될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 발현과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현이 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포 (또는 이환 세포인 것으로 의심되는 시험 세포)에서의 발현이 비-이환 세포에 대한 이러한 기준 데이터와 비교될 수 있다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨) 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)를 포함하는 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하며, 여기서

[0021] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

[0022] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고,

[0023] 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적이다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 키트 (예를 들어, 본원에 개시된 임의의 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브의 라이브러리를 포함하며, 이들 각각은 특정 관심 핵산을 확인하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 다양한 관심 단백질을 검출하기 위한 검출제 또는 검출제의 라이브러리를 추가로 포함한다. 본원에 기재된 키트는 또한 세포, 리가제, 폴리머라제, 아민-변형된 뉴클레오티드, 1차 항체, 2차 항체, 완충제, 및/또는 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 시약을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 유용한 임의의 다른 시약 또는 성분을 포함할 수 있다.

[0025] 본 개시내용의 또 다른 측면은 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 방법 (즉, 다수의 샘플들 사이의 서로에 대한, 예를 들어 이환 조직과 비교한 건강한 조직에 대한 특정 세포 유형의 공간 분포에서의 변동을 관찰하는 방법)을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 하기를 포함한다:

[0026] 적어도 하나의 영상 내의 복수의 세포 각각에 대해, 적어도 하나의 영상 내의 세포의 공간 위치를 수신하는 단계;

[0027] 적어도 하나의 영상 내의 복수의 단백질 각각에 대해, 영상 내의 단백질의 공간 위치를 수신하는 단계;

[0028] 복수의 단백질 중 제1 단백질에 대해, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 거리는 복수의 세포의 공간 위치의 적어도 일부 및 복수의 단백질의 공간 위치의 적어도 일부에 기초하여 결정되는 것인 단계;

[0029] 제1 세포 유형의 세포의 수에 기초하여, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 단계; 및

[0030] 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동의 표시를 출력하는 단계. 이러한 방법은, 예를 들어 질환과 연관될 수 있는 관심 단백질의 특정 거리 내의 세포 유형을 확인하는 데 유용하다. 예를 들어, 본원에 추가로 기재된 바와 같이, Aβ 및/또는 타우 봉입체로부터 특정 거리를 갖는 특정 세포 유형의 존재는 알츠하이머병과 연관될 수 있다.

[0031] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서; 및 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 방법을 수행하는 복수의 명령어로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체를 포함하는 장치를 제공하고, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0032] 적어도 하나의 영상 내의 복수의 세포 각각에 대해, 적어도 하나의 영상 내의 세포의 공간 위치를 수신하는 단계;

[0033] 적어도 하나의 영상 내의 복수의 단백질 각각에 대해, 영상 내의 단백질의 공간 위치를 수신하는 단계;

[0034] 복수의 단백질 중 제1 단백질에 대해, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 거리는 복수의 세포의 공간 위치의 적어도 일부 및 복수의 단백질의 공간 위치의 적어도 일부에 기초하여 결정되는 것인 단계;

[0035] 제1 세포 유형의 세포의 수에 기초하여, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 단계; 및

[0036] 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동의 표시를 출력하는 단계.

[0037] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때, 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 방법을 수행하는 복수의 명령어로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체를 제공하고, 상기 방법은 하기를 포함한다:

[0038] 적어도 하나의 영상 내의 복수의 세포 각각에 대해, 적어도 하나의 영상 내의 세포의 공간 위치를 수신하는 단계;

[0039] 적어도 하나의 영상 내의 복수의 단백질 각각에 대해, 영상 내의 단백질의 공간 위치를 수신하는 단계;

[0040] 복수의 단백질 중 제1 단백질에 대해, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 단계이며, 여기서 거리는 복수의 세포의 공간 위치의 적어도 일부 및 복수의 단백질의 공간 위치의 적어도 일부에 기초하여 결정되는 것인 단계;

[0041] 제1 세포 유형의 세포의 수에 기초하여, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 단계; 및

[0042] 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동의 표시를 출력하는 단계.

[0043] 본 개시내용이 이러한 측면으로 제한되지 않기 때문에, 상기 개념 및 하기 논의된 추가의 개념은 임의의 적합한 조합으로 배열될 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 추가로, 본 개시내용의 다른 이점 및 신규 특색은 첨부 도면과 함께 고려할 경우에 다양한 비제한적 실시양태의 하기 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0044] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 개시내용의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함되며, 이는 본원에 제시된 구체적 실시양태의 상세한 설명과 조합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참조하는 것에 의해 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1a-1f는 스타맵 프로를 사용한 알츠하이머병에서의 아밀로이드-β 및 타우 병리상태와 함께 단일-세포 전사 상태의 공동-맵핑을 나타낸다. 200-nm 해상도로 세포 유형, 단일-세포 전사 상태 및 조직의 조직병리학의 동시 맵핑을 나타낸다. 도 1a는 세포내 해상도 (200 nm)로 동일한 무손상 3차원 (3D) 조직에서 수천개의 RNA 종 및 단백질 질환 마커를 동시에 맵핑할 수 있는 통합 계내 방법인 스타맵 프로 방법의 개관을 제공한다. 스타맵 프로를 적용하여 아밀로이드-β 및 타우 병리상태를 갖는 타우PS2APP 트랜스제닉 마우스 (알츠하이머병 (AD) 발병 기전의 마우스 질환 모델)를 특징화하였다. 조직의 조직병리학 (공간 세포 유형결정, 가상시간 궤적, 차등 유전자 발현 및 유전자 경로 분석)과 함께 단일-세포 전사 상태의 통합 분석을 사용하여 AD 질환 진행에 따른 주요 세포 유형, 세포 상태, 및 유전자 프로그램을 밝혀냈다. 도 1b는 스타맵 프로 방법의 개략적 흐름도를 제공

한다. 뇌 조직을 절개하고, 고정시키고, 세포내 mRNA를 한 쌍의 SNAIL (분자내 라이게이션을 통한 핵산의 특이적 증폭) 프로브에 의해 인식시키고, 효소적으로 라이게이션하고, 롤링-서클 증폭시켜 계내에서 아민-변형된 cDNA 앰플리콘을 합성하였다. 단백질 표적을 1차 항체로 표지한 후, 아민-변형된 cDNA 앰플리콘, 단백질 및 1차 항체를 갖는 조직을 아크릴산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 (AA-NHS)로 관능화시키고, 아크릴아미드와 공중합시켜, 계내 맵핑을 위해 생체분자 (예를 들어, 앰플리콘, 단백질 및 항체)의 위치를 고정하는 히드로겔-조직 하이브리드를 생성하였다. 각각의 cDNA 앰플리콘은, 계내 SEDAL (동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류 감소를 갖는 서열분석)을 통해 판독되고, 이어서 단백질 신호를 시각화하기 위해 형광 단백질 염색 (2차 항체 및 소분자 염료 X-34를 사용함)되는 유전자-특이적 식별자 서열 (도 1b의 상단에 표지된 바와 같음)을 함유한다. 도 1c는 스타맵 프로의 확장된 코딩 용량을 입증한다. 스타맵 프로에서 SNAIL 프로브는 이론상 1백만 (4^10) 코딩 용량을 갖는 2개의 5-nt 바코드 ("바코드 A" 및 "바코드 B"로 표지됨)를 함유한다. 도 1d는 13개월에 타우PS2APP 마우스 뇌에서의 세포 핵, cDNA 앰플리콘 및 단백질 신호의 영상화 결과를 제공한다. 확대 영상은 해마의 CA1 영역 내의 p-타우 양성 세포를 나타낸다. 세포 핵의 아이오딘화프로피듐 (PI) 염색, 모든 cDNA 앰플리콘의 형광 DNA 프로브 염색, 아밀로이드 β 플라크의 X-34 염색, 및 p-타우의 면역형광 염색 (AT8 1차 항체, 및 이어서 형광 염소 항-마우스 2차 항체)이 제공된 범례에 따라 나타내어진다. 도 1e는 13개월령의 타우PS2APP 마우스 뇌 슬라이스에서의 세포 핵, cDNA 앰플리콘, 및 단백질 신호의 동시 맵핑을 나타내는 대표적인 영상화 결과를 제공한다. 미가공 공초점 형광 영상의 3D 투사는 해마의 CA1 영역 내의 p-타우 양성 세포를 나타낸다 (좌측). 좌측 패널 내 점선 영역의 확대도가 또한 제공되며 (중간), 이는 단백질 및 cDNA 앰플리콘 둘 다를 검출하는 조직의 조직병리학 영상화의 마지막 주기를 나타낸다. 세포 핵의 아이오딘화프로피듐 (PI) 염색, 모든 cDNA 앰플리콘의 형광 DNA 프로브 염색, 아밀로이드 β 플라크의 X-34 염색, 및 p-타우의 면역형광 염색 (AT8 1차 항체, 및 이어서 형광 염소 항-마우스 2차 항체)이 제공된 범례에 따라 나타내어진다. 중간 패널의 도면의 계내 RNA 서열분석의 8회 사이클을 또한 나타낸다 (우측). 각각 1 라운드의 계내 서열분석을 나타내는 형광 채널을 나타낸다. 도 1f는 DNA-태그부착된 항체의 제조를 위한 예시적인 합성 반응식을 나타낸다.

도 2a-2l은 타우PS2AAPP 및 대조군 마우스의 뇌 섹션에서의 상위-수준 세포 유형 분류 및 공간 분석을 나타낸다. 도 2a는 4개의 샘플로부터의 33,106개의 세포의 전사체학 프로파일에 대한 비-선형 차원 감소를 가시화하는 균일 매니폴드 근사 (UMAP) 플롯을 제공한다. 라이덴(Leiden) 알고리즘을 사용하여 잘 연결된 세포를 전사체학 프로파일의 저차원 표현에서 클러스터로서 확인하였다. 13종의 세포 유형을 각각의 클러스터에서 풍부화된 유전자 마커에 의해 규정하였다. 개별 샘플의 UMAP에서 가시화된 바와 같이, 파선 직사각형으로 강조된 클러스터 (성상세포, 소교세포, 핍지교세포, 및 치상회)는 타우PS2APP와 대조군 샘플 사이의 세포 집단의 차등 분포를 나타냈다. 도 2b는 세포 유형의 계층적 분류를 나타낸다. 13종의 상위-수준 클러스터 (피질 흥분성 뉴런 (CTX-Ex, 8,687개의 세포), 억제 뉴런 (In, 2,005개의 세포), CA1 흥분성 뉴런 (CA1-Ex, 2,754개의 세포), CA2 흥분성 뉴런 (CA2-Ex, 436개의 세포), CA3 흥분성 뉴런 (CA3-Ex, 1,878개의 세포), 치상회 (DG, 4,377개의 세포), 성상세포 (Astro, 2,884개의 세포), 내피 세포 (Endo, 1,849개의 세포), 소교세포 (Micro, 1,723개의 세포), 핍지교세포 (Oligo, 4,966개의 세포), 핍지교세포 전구체 세포 (OPC, 549개의 세포), 평활근 세포 (SMC, 877개의 세포), 외측 고삐 뉴런 (LHb, 121개의 세포)) 및 세포 유형 분류 과정 동안 확인된 24종의 하위-수준 클러스터 둘 다를 나타내는 플롯이 제공된다. 각각의 관심있는 상위-수준 클러스터의 유전자 발현 프로파일을 취하고, 동일한 방법으로 하위-수준 클러스터링을 위해 이를 다시 사용하였다. 도 2c는 Aβ 및 타우 병리상태를 갖는 타우PS2APP 13-개월 샘플의 피질 및 해마 영역의 세포 아틀라스를 나타낸다. 상위-수준 세포 유형 및 병리학적 신호는 우측 상단 코너의 범례에 나타낸 바와 같이 음영처리되고, Aβ 플라크 및 p-타우 단백질은 제공된 범례에 나타낸 바와 같이 각각 흑색 및 회색으로 착색된다. 영상화 섹션을 피질 및 피질하로 수동으로 분리하고, 경계를 흑색 파선으로 표시하였다. 축척 막대, 100 μm. 줌-인 섹션: (I)은 중간에 흑색으로 음영처리된 Aβ 플라크를 갖는 피질 영역의 줌-인 섹션이고; (II-III)은 세포의 상부에 회색으로 음영처리된 p-타우 단백질을 갖는 피질하 영역의 줌-인 섹션임; 축척 막대, 10 μm. 도 2d는 Aβ 플라크 주위의 세포 유형 조성을 분석하는 데 사용된 전략을 나타내는 개략적 플롯을 제공한다. 각각의 플라크의 크기를 고려하여, 상이한 반경 (10, 20, 30, 40, 및 50 μm)을 갖는 5개의 동심원이 각각의 플라크의 가장자리로부터 멀리 떨어진 상이한 거리 간격으로 세포-유형 조성을 정량화하기 위해 생성되었다. 세포가 2개의 동심원 사이의 경계 상에 존재하는 경우, 이들을 병합하여 반복 계수를 방지하였다. 축척 막대, 50 μm. 도 2e는 타우PS2APP 13-개월 샘플에 대한 Aβ 플라크 주위의 상이한 거리 간격의 세포 유형 조성을 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 각각의 상위-수준 세포 유형의 백분율을 나타내는 적층 막대 플롯이 제공된다. 각각의 영역에서, 전체 (평균) 세포 유형 조성이 참조로서 포함된다. 도 2f는 8 및 13개월에 타우PS2APP 및 대조군 마우스의 관상 뇌 섹션으로부터 수집된 72,165개의 세포의 전사체학 프로파일에 대한 비-

선형 차원 감소를 가시화하는 균일 매니폴드 근사 (UMAP) 플롯을 제공한다. 라이덴 알고리즘을 사용하여 잘 연결된 세포를 전사체학 프로파일의 저차원 표현에서 클러스터로서 확인하였다. 13종의 주요 세포 유형을 각각의 클러스터에서 풍부화된 유전자 마커에 의해 규정하였다. 개별 샘플의 UMAP에서 가시화된 바와 같이, 파선 직사각형으로 강조된 클러스터 (성상세포, 소교세포, 핍지교세포 및 치상회)는 UMAP에서 타우PS2APP와 대조군 샘플 사이의 세포 유형 집단의 차등 분포를 나타냈다. 도 2g는 세포 유형의 계층적 분류를 나타낸다. 13종의 상위-수준 클러스터 (피질 흥분성 뉴런 (CTX-Ex, 18,483개의 세포), 억제 뉴런 (Inh, 4,163개의 세포), CA1 흥분성 뉴런 (CA1-Ex, 3,225개의 세포), CA2 흥분성 뉴런 (CA2-Ex, 1,439개의 세포), CA3 흥분성 뉴런 (CA3-Ex, 3,225개의 세포), 치상회 (DG, 9,562개의 세포), 성상세포 (Astro, 6,789개의 세포), 내피 세포 (Endo, 4,168개의 세포), 소교세포 (Micro, 3,732개의 세포), 핍지교세포 (Oligo, 11,265개의 세포), 핍지교세포 전구체 세포 (OPC, 1,269개의 세포), 평활근 세포 (SMC, 2,397개의 세포), 외측 고삐 뉴런 (LHb, 204개의 세포)) 및 그의 대표적인 유전자 마커에 따른 세포 유형 분류 과정 동안 확인된 27종의 하위-수준 클러스터 둘 다를 나타내는 플롯이 제공된다. 각각의 관심있는 상위-수준 클러스터의 유전자 발현 프로파일을 라이덴 클러스터링을 사용하여 다시 분석하여 하위-수준 클러스터를 동일한 방법으로 확인하였다. 도 2h는 Aβ 및 타우 병리상태를 갖는 타우PS2APP 13-개월 샘플의 피질 및 해마 영역의 대표적인 공간 세포 유형 아틀라스를 나타낸다. 상위-수준 세포 유형 및 병리학적 신호는 우측 상단 코너의 범례에 나타낸 바와 같이 음영처리되고, Aβ 플라크 및 p-타우 단백질은 제공된 범례에 나타낸 바와 같이 각각 흑색 및 회색으로 착색된다. 영상화 섹션을 피질, 뇌량 (CC) 및 해마로 수동으로 분리하고, 경계를 흑색 파선으로 표시하였다. 축척 막대, 100 μm. 줌-인 섹션: (I)은 상이한 유형의 세포에 의해 둘러싸인, 중간에 흑색으로 음영처리된 Aβ 플라크를 갖는 피질 영역의 줌-인 섹션이고; (II)는 세포 상부에 회색으로 음영처리된 p-타우 단백질을 갖는 해마 영역의 줌-인 섹션임; 축척 막대, 10 μm. 도 2i는 Aβ 플라크 주위의 세포 유형 조성을 분석하는 데 사용된 전략을 나타내는 개략적 플롯을 제공한다. 각각의 플라크의 크기를 고려하여, 5개의 동심 경계 (각각의 플라크로부터 10, 20, 30, 40, 및 50 μm 떨어짐)를 생성하여 각각의 플라크의 가장자리로부터 멀리 떨어진 상이한 거리 간격으로 세포-유형 조성을 정량화하였다. 세포가 2개의 스트라이프 사이의 경계 상에 존재하는 경우, 이들을 병합하여 반복 계수를 방지하였다. 축척 막대, 50 μm. 도 2j는 타우PS2APP 13-개월 샘플에 대한 Aβ 플라크 주위의 상이한 거리 간격의 세포 유형 조성의 대표적인 공간 분포를 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 각각의 상위-수준 세포 유형의 밀도 (mm^2당 세포 계수)를 나타내는 적층 막대 플롯이 제공된다. 각각의 영역에서, 각각의 주요 세포 유형의 세포 밀도가 비교를 위한 참조로서 포함된다. 도 2k는 p-타우 신호 정량화에 사용된 방법을 예시하는 개략도를 제공한다. 조직 섹션을 20 μm x 20 μm의 격자로 나누었다. 음영은 각각의 정사각형에서의 p-타우의 통합 강도를 나타내고, p-타우와 상이한 세포 유형의 공동-국재화의 정도를 분석하기 위한 측정법으로서 사용되었다. 도 2l은 p-타우 밀도에 의해 순위화된 13-개월에서의 타우PS2APP 샘플에서 20 μm x 20 μm 격자에 기초한 세포-유형 조성 분석을 나타낸다. 격자 선으로 나눈 블록을 타우 양성 픽셀의 백분율에 의해 순위화하고, 3개의 빈으로 그룹화하였다: 0% (0 p-타우), 1-50% (저 p-타우), 51-100% (고 p-타우). 고 p-타우 군을 플라크 양성 대 음성 군으로 추가로 나누어 세포-유형 분포에 대한 플라크 및 타우병증의 영향을 해부하였다. 각각의 주요 세포 유형에 대한 블록당 세포의 평균 수를 나타내는 적층 막대 플롯.

도 3a-3s는 타우 + 플라크 병리상태 하에서의 소교세포 집단의 독특한 트랜스크립톰 반응 및 공간 조성을 나타낸다. 타우PS2APP 및 대조군 샘플에서의 소교세포의 시공간 유전자 발현 분석을 나타낸다. 도 3a는 서브클러스터 주석이 있는 소교세포 세포 집단의 UMAP를 제공한다. 도 2a로부터 확인된 1723개의 소교세포의 전사체학 프로파일의 저차원 표현을 나타내는 플롯. 3종의 하위-수준 클러스터 (Micro1 (n = 779), Micro2 (n = 415), 및 Micro3 (n = 529))를 라이덴 알고리즘에 의해 확인하였다. Micro3 클러스터는 이전 보고서에 따른 그의 유전자 마커 및 이환 샘플에서의 유의한 풍부화에 의해 질환-연관 소교세포 (DAM) 집단으로 주석을 달았다. 각각의 샘플 (대조군 8-개월, 타우PS2APP 8-개월, 대조군 13-개월, 타우PS2APP 13-개월)에 대한 하위-수준 세포 클러스터와 함께 UMAP 플롯이 또한 포함되었다. 도 3b는 상이한 서브-클러스터에 걸친 대표적인 마커의 발현 수준을 나타낸다 (행별 z-점수). 도 3c는 소교세포 세포 집단의 UMAP를 가상시간 궤적과 함께 제공한다. 모노클 (Monocle) 3에 의해 생성된 소교세포의 전사체학 프로파일의 저차원 표현을 나타내는 플롯이 제공된다. 컬러맵은 가상시간 값을 나타낸다. 상응하는 궤적을 구축하고, 저차원 임베딩 상에 플롯팅하여 세포 집단의 생물학적 진행을 예시하였다. 각각의 샘플에 대한 플롯이 또한 포함된다. 궤적 출발 앵커를 수동으로 선택하였다 (8개월에서의 대조군 샘플에 기초함). 도 3d는 소교세포 세포 집단의 가상시간 임베딩을 서브클러스터 주석과 함께 나타낸다. 가상시간 계산에 사용된 저차원 임베딩을 소교세포의 서브클러스터 주석과 함께 나타내는 플롯이 제공된다. 도 3e는 가상시간 분포를 나타낸다. 4개의 샘플 중 소교세포의 3종의 하위집단에 대한 가상시간의 분

포 및 소교세포에 대한 가상시간의 분포를 나타낸다. 만-휘트니-윌콕슨 검정, ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. 도 3f는 대조군 13-개월 샘플의 소교세포 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 도 3g는 타우PS2APP 13-개월 샘플의 소교세포 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 우측 상단 코너에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 도 3h는 플라크 주위의 영역별 세포 밀도 및 세포 유형 조성을 나타낸다. 각각의 샘플에 대한 피질 및 피질하 영역 둘 다에서의 각각의 소교세포 서브-클러스터의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다 (상단). 막대 플롯에서의 음영은 도 3f에서의 세포 유형 범례에 상응한다. 플롯은 8 및 13-개월에 두 타우PS2APP 샘플에서 DAM의 유의한 풍부화를 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 μm)에서의 각각의 소교세포 서브-클러스터의 백분율을 나타내는 적층 막대 차트가 또한 제공된다 (하단). 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성을 참조로서 포함시켰다. 도 3i는 차등 발현된 유전자 (DEG)의 유전자 세트 농축 분석 (GSEA) 결과를 나타낸다. 통계적으로 유의한 (공칭 p-값 < 0.01) 농축 점수의 징후에 의해 음영처리됨. 항은 항 크기: 20-1000에 의해 필터링된다. 도 3j는 AD 대 대조군 비교로부터의 소교세포 집단의 DEG의 검증된 하위세트를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다. 2766개의 유전자 데이터세트 및 64개의 유전자 검증 결과에서 상위 유의하게 변경된 (p-값에 의해 순위화됨) DEG의 행별 규모화된 발현 값을 나타내는 플롯이 제공된다. 도 3k는 소교세포 세포 집단의 서브클러스터링을 나타낸다. 도 2a로부터 확인된 3732개의 소교세포의 전사체학 프로파일의 저차원 표현을 나타내는 플롯 (상단). 3종의 하위-수준 클러스터 (Micro1 (n = 1924), Micro2 (n = 784), 및 Micro3 (n = 1024))를 라이덴 알고리즘에 의해 확인하였다. Micro3 클러스터는 이전 보고서에 따른 그의 유전자 마커 및 이환 샘플에서의 유의한 풍부화에 의해 질환-연관 소교세포 (DAM) 집단으로 주석을 달았다. 각각의 샘플 (대조군 8-개월, 타우PS2APP 8-개월, 대조군 13-개월, 타우PS2APP 13-개월, 각 조건 하에 n = 2)에 대한 소교세포 집단의 하위-수준 세포 클러스터의 확산 지도 시각화 역시 포함되었다. 도 3l은 상이한 세포 집단들의 서브클러스터들 사이에서의 대표적인 유전자 마커의 발현 수준을 나타낸다. 각각의 소교세포 하위집단에 대한 대표적인 마커의 평균 유전자 발현 (음영) 및 이들을 발현하는 세포의 백분율 (도트 크기) 둘 다를 나타내는 도트 플롯이 제공된다. 유전자 발현 값을 각각의 칼럼에 대해 정규화하였다. 도 3m은 소교세포 세포 집단의 확산 지도를 가상시간 궤적과 함께 제공한다. 모노클 3에 의해 생성된 소교세포의 전사체학 프로파일의 저차원 표현을 나타내는 플롯이 제공된다 (상단). 컬러맵은 가상시간 값을 나타낸다. 상응하는 궤적을 구축하고, 저차원 임베딩 상에 플롯팅하여 세포 집단의 생물학적 진행을 예시하였다. 각각의 샘플에 대한 플롯이 또한 포함된다. 궤적 출발 앵커를 수동으로 선택하였다 (8개월에서의 대조군 샘플에 기초함). 상이한 샘플로부터의 세포를 확산 지도 임베딩에서 개별적으로 강조하였다 (하단). 도 3n은 소교세포 세포 집단의 가상시간 임베딩을 서브클러스터 주석과 함께 나타낸다. 도 3m에서 확인된 궤적과 함께 가상시간 계산에 사용된 저차원 임베딩을 도 3k에서 확인된 소교세포의 서브클러스터 주석과 함께 나타내는 플롯이 제공된다. 도 3o는 대조군 13-개월 샘플의 소교세포 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 도 3p는 타우PS2APP 13-개월 샘플의 소교세포 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 흑색 박스로 강조하여 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 흑색 파선은 피질, 뇌량 (cc), 및 해마 사이의 경계를 표시한다. 도 3q는 플라크 주위의 영역별 세포 밀도 및 세포 유형 조성을 나타낸다. 2개의 시점에서 대조군 및 타우PS2APP 마우스에서의 피질 및 해마 영역 둘 다에서의 각각의 소교세포 서브-클러스터의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 박스 플롯이 제공된다 (상단). 막대 플롯에서의 음영은 도 3p의 세포 유형 범례에 상응한다. 플롯은 8 및 13-개월에 타우PS2APP 샘플에서의 양쪽 뇌 영역에서 DAM의 유의한 풍부화를 나타낸다. 13개월에 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 μm)에서의 각각의 소교세포 서브-클러스터의 백분율을 나타내는 적층 막대 차트가 또한 제공된다 (하단). 각각의 영역에서, 각각의 영역에서의 각 하위집단의 전체 세포 밀도가 비교를 위한 참조로서 포함된다. 도 3r은 소교세포 아형의 4종의 대표적인 유전자 마커의 발현을 나타내는 확산 지도를 제공한다. 음영은 각각의 세포에서의 유전자의 $\log_{10}$(평균 유전자 발현 값)을 나타낸다. 도 3s는 플라크로부터의 다수의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40+ μm)에 걸친 소교세포의 공간 DEG의 z-점수를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다.

도 4a-4t는 타우 + 플라크 병리상태 하에서의 성상세포의 질환-연관 집단 및 공간 조성을 나타낸다. 타우PS2APP 및 대조군 샘플에서의 성상세포의 시공간적 유전자 발현 분석을 나타낸다. 도 4a는 성상세포 세포 집단의 UMAP를 서브클러스터 주석과 함께 제공한다. 도 2a로부터 확인된 2884개의 성상세포의 전사체학 프로파일의 저차원 표현을 나타내는 플롯이 제공된다. 3종의 하위-수준 클러스터 (Astro1 (n = 1068), Astro2 (n = 1271), 및 Astro3 (n = 545))를 라이덴 알고리즘에 의해 확인하였다. Astro3 클러스터는 이전 보고서에 따른 그의 유전자 마커 및 이환 샘플에서의 유의한 풍부화에 의해 질환-연관 성상세포 (DAA)로 주석을 달았다. 각각

의 샘플 (대조군 8개월, 타우PS2APP 8-개월, 대조군 13개월, 타우PS2APP 13개월)에 대한 하위-수준 세포 클러스터와 함께 UMAP 플롯이 또한 포함되었다. 도 4b는 상이한 서브-클러스터에 걸친 대표적인 마커의 발현 수준을 나타낸다. 행별 z-점수에 의해 음영처리됨. 도 4c는 성상세포 세포 집단의 UMAP를 가상시간 궤적과 함께 제공한다. 모노클 3에 의해 생성된 성상세포의 전사체학 프로파일의 저차원 표현을 나타내는 플롯이 제공된다. 컬러맵은 가상시간 값을 나타낸다. 상응하는 궤적을 구축하고, 저차원 임베딩 상에 플롯팅하여 집단의 생물학적 진행을 예시하였다. 각각의 샘플에 대한 플롯이 또한 포함되었다. 도 4d는 성상세포 세포 집단의 가상시간 임베딩을 서브클러스터 주석과 함께 나타낸다. 가상시간 계산에 사용된 저차원 임베딩을 성상세포의 서브클러스터 주석과 함께 나타내는 플롯이 제공된다. 도 4e는 가상시간 분포를 나타낸다. 4개의 샘플 중 성상세포의 3종의 하위집단에 대한 가상시간의 분포 및 성상세포에 대한 가상시간의 분포를 나타낸다. 만-휘트니-윌콕슨 검정, ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. 도 4f는 대조군 13-개월 샘플의 성상세포 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 도 4g는 타우PS2APP 13-개월 샘플의 성상세포 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 우측 상단 코너에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 도 4h는 플라크 주위의 영역별 세포 밀도 및 세포 유형 조성을 나타낸다. 각각의 샘플에 대한 피질 및 피질하 영역 둘 다에서의 각각의 성상세포 서브-클러스터의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다 (상단). 막대 플롯에서의 음영은 도 4f의 세포 유형 범례에 상응한다. 플롯은 피질에서, 특히 13개월에 DAA의 유의한 풍부화를 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 각각의 성상세포 서브-클러스터의 백분율을 나타내는 적층 막대 차트가 또한 제공된다 (하단). 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성이 참조로서 포함된다. 도 4i는 가상시간 임베딩 상의 DEG를 나타낸다. 가상시간 임베딩 상의 4종의 질환 상향조절된 유전자의 발현을 나타내는 UMAP를 나타내고, 미가공 계수의 음영 척도는 $\log_{10}$ 척도에 의해 조정되었다. 도 4j는 차등 발현된 유전자 (DEG)의 GSEA 결과를 나타낸다. 항은 항 크기 (20-1000) 및 공칭 p-값 (< 0.01)에 의해 필터링된다. 도 4k는 AD 대 대조군 비교로부터의 성상세포 집단의 DEG의 검증된 하위세트를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다. 2766개의 유전자 데이터세트 및 64개의 유전자 검증 결과에서 상위 유의하게 변경된 (p-값에 의해 순위화됨) DEG의 행별 규모화된 발현 값을 나타내는 플롯이 제공된다. 도 4l은 성상세포 세포 집단의 서브클러스터를 나타낸다. 도 2a로부터 확인된 6,789개의 성상세포의 전사체학 프로파일의 줌-인 확산 지도 시각화를 나타내는 플롯이 제공된다 (상단). 성상세포의 3종의 하위-수준 클러스터 (Astro1 (n = 2,547), Astro2 (n = 3,278), 및 Astro3 (n = 964))를 라이덴 알고리즘에 의해 확인하였다. Astro3 클러스터는 이전 보고서에 따른 그의 유전자 마커 및 이환 샘플에서의 유의한 풍부화에 의해 질환-연관 성상세포 (DAA)로 주석을 달았다. 각각의 샘플 (대조군 8개월, 타우PS2APP 8-개월, 대조군 13개월, 타우PS2APP 13개월, 각각의 조건 하에 n = 2)에 대한 성상세포의 하위-수준 세포 클러스터의 확산 지도 임베딩이 또한 포함되었다. 도 4m은 상이한 서브-클러스터에 걸친 대표적인 마커의 발현 수준을 나타낸다. 각각의 성상세포 하위집단에 대한 대표적인 마커의 평균 유전자 발현 (음영) 및 이들을 발현하는 세포의 백분율 (도트 크기) 둘 다를 나타내는 도트 플롯이 제공된다. 유전자 발현 값을 각각의 칼럼에 대해 정규화하였다. 도 4n은 성상세포 세포 집단의 확산 지도를 가상시간 궤적과 함께 제공한다. 모노클 3에 의해 생성된 성상세포의 전사체학 프로파일의 확산 지도 시각화가 제공된다 (상단). 컬러맵은 가상시간 값을 나타낸다. 상응하는 궤적을 구축하고, 저차원 임베딩 상에 플롯팅하여 집단의 생물학적 진행을 예시하였다. 각각의 샘플에 대한 플롯이 또한 포함되었다. 궤적 출발 앵커를 Astro1 집단에 기초하여 수동으로 선택하였다. 흑색 화살표는 질환-연관 유전자 발현 변화와 관련된 궤적 상의 분기점을 강조한다. 상이한 샘플로부터의 세포를 확산 지도 임베딩에서 개별적으로 강조하였다 (하단). 도 4o는 도 4n에서 확인된 궤적과 함께 도 4l에서 확인된 상이한 유형의 성상세포를 나타내는 확산 지도를 제공한다. 성상세포 세포 집단의 가상시간 임베딩을 서브클러스터 주석과 함께 나타낸다. 가상시간 계산에 사용된 저차원 임베딩을 성상세포의 서브클러스터 주석과 함께 나타내는 플롯이 제공된다. 도 4p는 타우PS2APP 13-개월 샘플의 성상세포 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 도 4q는 타우PS2APP 13-개월 샘플의 성상세포 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 흑색 파선은 피질, 뇌량 (cc), 및 해마 사이의 경계를 표시한다. 도 4r은 플라크 주위의 영역별 세포 밀도 및 세포 유형 조성을 나타낸다. 각각의 샘플 (대조군 및 타우PS2APP 마우스)에 대한 피질 및 해마 영역 둘 다에서의 각각의 성상세포 서브-클러스터의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 박스플롯이 2개의 시점에서 제공된다 (상단). 막대 플롯에서의 음영은 도 4q의 세포 유형 범례에 상응한다. 플롯은 피질에서, 특히 13개월에 DAA의 유의한 풍부화를 나타낸다. 13개월에 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 성상세포 서브-클러스터의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 적층 막대 차트가 또한 제공된다 (하단).

각각의 영역에서, 각각의 영역에서의 각 하위집단의 세포 밀도가 비교를 위한 참조로서 포함된다. 도 4s는 가상시간 임베딩 상의 DEG를 나타낸다. 가상시간 임베딩 상의 성상세포 하위집단의 4종의 대표적인 유전자 마커의 발현을 나타내는 확산 지도를 나타내고, 미가공 계수의 음영 척도는 $\log_{10}$ 형질전환에 의해 조정되었다. 도 4t는 플라크로부터의 다중 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40+ μm)에 걸친 성상세포의 공간 DEG의 z-점수를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다.

도 5a-5v는 타우 + 플라크 병리상태 하에서의 핍지교세포 및 전구체 세포의 하위-수준 클러스터링 및 조성을 나타낸다. 타우PS2APP 및 대조군 샘플에서의 핍지교세포 및 전구체 세포의 시공간적 유전자 발현 분석을 나타낸다. 도 5a는 핍지교세포 및 전구체 세포 (OPC) 집단의 UMAP를 서브클러스터 주석과 함께 제공한다. 도 2a로부터 확인된 4966개의 핍지교세포 및 549개의 OPC의 전사체학 프로파일의 저차원 표현을 나타내는 UMAP 플롯이 제공된다. 3종의 하위-수준 클러스터 (Oligo1 (n = 4,295), Oligo2 (n = 181), Oligo3 (n = 490)) 및 OPC (n = 549)를 라이덴 알고리즘에 의해 확인하였다. Oligo3 클러스터는 질환-풍부 핍지교세포로 주석을 달았다. 각각의 샘플 (대조군 8개월, 타우PS2APP 8-개월, 대조군 13개월, 타우PS2APP 13개월)에 대한 하위-수준 세포 클러스터와 함께 UMAP 플롯이 또한 포함되었다. 도 5b는 핍지교세포의 상이한 서브-클러스터에 걸친 대표적인 마커의 발현 수준을 나타낸다 (행별 z-점수). 도 5c는 핍지교세포-관련 세포 집단의 UMAP를 가상시간 궤적과 함께 제공한다. 모노클 3에 의해 생성된 핍지교세포 및 OPC의 전사체학 프로파일의 저차원 표현을 나타내는 플롯이 제공된다. 컬러맵은 가상시간 값을 나타낸다. 상응하는 궤적을 구축하고, 저차원 임베딩 상에 플롯팅하여 집단의 생물학적 진행을 예시하였다. 각각의 샘플에 대한 플롯이 또한 포함되었다. 도 5d는 핍지교세포-관련 세포 집단의 가상시간 임베딩을 서브클러스터 주석과 함께 나타낸다. 가상시간 계산에 사용된 저차원 임베딩을 핍지교세포 및 전구체 세포의 서브클러스터 주석과 함께 나타내는 플롯이 제공된다. 도 5e는 핍지교세포 및 핍지교세포 전구체 세포의 3종의 하위집단에 대한 가상시간의 분포, 뿐만 아니라 4개의 샘플에서 이들 세포에 대한 가상시간의 분포를 나타낸다. 만-휘트니-윌콕슨 검정, ns: $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. 도 5f는 대조군 13-개월 샘플의 핍지교세포-관련 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 도 5g는 타우PS2APP 13-개월 샘플의 핍지교세포-관련 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 우측 상단 코너에 제공한다. 축척 막대, 10 μm. 도 5h는 플라크 주위의 영역별 세포 밀도 및 세포 유형 조성을 나타낸다. 각각의 샘플에 대한 피질 및 피질하 영역 둘 다에서의 각각의 핍지교세포 서브-클러스터 및 OPC의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다. 막대 플롯에서의 음영은 도 5f의 세포 유형 범례에 상응한다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 각각의 핍지교세포 서브-클러스터 및 OPC의 백분율을 나타내는 적층 막대 차트가 또한 제공된다 (하단). 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성을 참조로서 포함시켰다. 도 5i는 차등 발현된 유전자 (DEG)의 유전자 세트 농축 분석 (GSEA) 결과를 나타낸다. 항은 항 크기 20-1000 및 공칭 p-값 < 0.01에 의해 필터링된다. 도 5j는 마커 유전자를 발현하는 세포의 가상시간 임베딩을 나타낸다. 대표적인 마커를 발현하는 세포의 가상시간 분포를 나타내는 UMAP가 제공된다. 도 5k는 AD 대 대조군 비교로부터 핍지교세포 관련 집단의 DEG의 검증된 하위세트를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다. 2766개의 유전자 데이터세트 및 64개의 유전자 검증 결과에서 상위 유의하게 변경된 (p-값에 의해 순위화됨) DEG의 행별 규모화된 발현 값을 나타내는 플롯이 제공된다. 도 5l은 핍지교세포 및 전구체 세포 (OPC) 집단의 서브클러스터를 나타낸다. 도 2a로부터 확인된 11,265개의 핍지교세포 및 1,269개의 OPC의 줌-인 확산 지도 시각화를 제공한다 (상단). 라이덴 클러스터링에 의해 확인된 핍지교세포의 3종의 서브클러스터를 나타낸다: Oligo1 (n = 9,594), Oligo2 (n = 910), Oligo3 (n = 761), 및 OPC (n = 1,269). 각각의 샘플 (대조군 8개월, 타우PS2APP 8-개월, 대조군 13개월, 타우PS2APP 13개월)에 대한 핍지교세포 및 OPC의 서브클러스터의 확산 지도 임베딩이 또한 제공된다 (하단). 도 5m은 핍지교세포 및 OPC의 상이한 서브-클러스터에 걸친 대표적인 마커의 발현 수준을 나타낸다. 각각의 하위집단에 대한 대표적인 마커의 평균 유전자 발현 (음영) 및 이들을 발현하는 세포의 백분율 (도트 크기) 둘 다를 나타내는 도트 플롯이 제공된다. 유전자 발현 값을 각각의 칼럼에 대해 정규화하였다. 도 5n은 핍지교세포-관련 세포 집단의 확산 지도 가상시간 궤적 가시화를 나타낸다. 모노클 3에 의해 생성된 핍지교세포 및 OPC의 가상시간 궤적의 확산 지도 시각화가 제공된다 (상단). 컬러맵은 가상시간 값을 나타낸다. 상응하는 가상시간 궤적을 확산 맵 포매 상에 플롯팅하였다. 궤적 출발 앵커를 OPC 집단에 기초하여 수동으로 선택하였다. 흑색 화살표는 질환-연관 유전자 발현 변화와 관련된 궤적 상의 분기점을 강조한다. 상이한 샘플로부터의 세포를 확산 지도 임베딩에서 개별적으로 강조하였다 (하단). 도 5o는 도 5l에서 확인된 상이한 유형의 핍지교세포 및 OPC를 궤적과 함께 나타내는 확산 지도를 제공한다. 도 5p는 대조군 13-개월 샘플의 핍지교세포-관련 집단에 대한 공간 세포 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 도 5q는 타우PS2APP 13-개월 샘플의 핍지교세포-관련 집단에 대한 공간 세포 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 흑색

박스로 강조된 확대 영역을 나타내는 2개의 배율 섹션 (I, II)이 제공된다. 축척 막대, 10 μm. 흑색 파선은 피질, 뇌량 (cc), 해마, 및 해마백색판(alveus) 사이의 경계를 표시한다. 도 5r은 두 시점에서 대조군 및 타우 PS2APP 마우스 내의 피질, 뇌량, 및 해마 영역에서 각각의 펍지교세포 하위유형 및 OPC의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 박스플롯을 제공한다. 플롯은 뇌량 (cc) 및 해마 영역 내의 Olig02의 유의한 풍부화를 나타낸다. 도 5s는 13개월에 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50 μm)에서의 각각의 펍지교세포 서브-클러스터 및 OPC의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 적층 막대 차트를 제공한다. 각각의 영역에서의 각 하위집단의 전체 세포 밀도가 비교를 위한 참조로서 포함된다 (모두). 도 5t는 p-타우 병리상태와 관련하여 펍지교세포 계통의 세포-유형 조성 분석을 나타낸다. 조직 영역을 p-타우 밀도에 의해 순위화된 13개월에서의 타우PS2APP 샘플에서 20 μm x 20 μm 격자로 나누었다. 격자선으로 나눈 블록을 p-타우 양성 픽셀의 백분율에 의해 등급화하고, 3개의 빈으로 그룹화하였다: 0 (0%), 저 (1%-50%), 고 (50%-100%). 고 p-타우 빈은 Aβ 플라크의 존재 또는 부재에 기초하여 2개의 군으로 추가로 나뉜다. 각각의 펍지교세포 관련 하위유형에 대한 블록당 세포의 평균 수를 나타내는 적층 막대 플롯이 제공된다. 도 5u는 해마백색판(hippocampal alveus) 영역에서의 펍지교세포 및 OPC의 세포 밀도 및 하위유형 조성을 나타낸다. 도 5v는 플라크로부터의 다수의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40+ μm)에 걸친 펍지교세포의 공간 DEG의 z-점수를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다.

도 6a-6u는 타우PS2APP 및 대조군 샘플에서의 뉴런의 차등 유전자 발현 분석 및 공간 정보를 나타낸다. 도 6a는 흥분성 뉴런 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 하단에 CA1 영역의 1개의 배율 섹션과 함께 타우PS2APP 13-개월 샘플의 (총 세포 계수: CTX-Ex1: 2,292, CTX-Ex2: 2,766, CTX-Ex3: 1,184, CTX-Ex4: 2,445, CA1: 2,754, CA2: 436, CA3: 1,878, DG: 4,377). 축척 막대, 10 μm. p-타우 단백질 신호는 세포의 상부에 회색으로 착색되었다. 도 6b는 억제 뉴런 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. TauPS2APP의 Cnr1: 421, Lamp5: 191, Pvalb: 864, Sst: 529. CA1 영역의 1개의 배율 섹션과 함께 13-개월 샘플을 하단에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. p-타우 단백질 신호는 세포의 상부에 회색으로 착색된다. 도 6c는 플라크 주위의 흥분성 뉴런 조성을 나타낸다. AD 13-개월 샘플의 피질 및 피질하 영역으로부터의 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 흥분성 뉴런 집단의 각각의 서브-클러스터의 백분율을 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다. 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성이 참조로서 포함된다. 도 6d는 플라크 주위의 억제 뉴런의 조성을 나타낸다. AD 13-개월 샘플의 피질 및 피질하 영역으로부터의 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 억제 뉴런 집단의 각각의 서브-클러스터의 백분율을 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다. 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성이 참조로서 포함된다. 도 6e는 p-Tau 양성 뉴런의 세포 유형 조성을 나타낸다. 전류 역치 하의 각각의 AD 샘플 내의 타우 양성 흥분성 뉴런 및 억제 뉴런의 조성을 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다. 도 6f는 플라크 주위의 p-타우 신호 정량화를 나타낸다. p-타우+ 픽셀 (강도 > 역치)을 타우PS2APP 13-개월 샘플의 피질 및 피질하 영역으로부터 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서 정량화하였다. 값을 고리 면적에 의해 정규화하였다. 도 6g는 치상회 (DG) 세포 집단의 UMAP를 가상시간 궤적과 함께 제공한다. 모노클 3에 의해 생성된 각각의 샘플의 치상회 영역 내 세포 집단의 전사체학 프로파일의 저차원 표현을 나타내는 플롯이 제공된다. 컬러맵은 가상시간 값을 나타낸다. 상응하는 궤적을 구축하고, 집단의 생물학적 진행을 예시하기 위해 저차원 임베딩 상에 플롯팅하였다. 각각의 샘플에 대한 플롯이 또한 포함되었다. 도 6h는 DG 집단에 대한 가상시간에 의해 음영처리된 공간 세포 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 도 6i는 가상시간 임베딩에서의 DEG를 나타낸다. 가상시간 임베딩 상의 DG 뉴런의 DEG 분석으로부터 4개의 유의하게 변경된 유전자의 발현을 나타내는 UMAP가 제공된다. 미가공 계수의 음영 척도는 $\log_{10}$ 척도에 의해 조정되었다. 도 6j는 AD 대 대조군 비교로부터의 흥분성 및 억제 뉴런 집단의 DEG의 검증된 하위세트를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다. 2766개의 유전자 데이터세트 및 64개의 유전자 검증 결과에서 상위 유의하게 변경된 (p-값에 의해 순위화됨) DEG의 행별 규모화된 발현 값을 나타내는 플롯이 제공된다. 도 6k는 피질 흥분성 뉴런 세포 집단의 서브클러스터링을 나타내는 것이다. 라이덴 클러스터링에 의해 확인된 피질 흥분성 뉴런 세포의 4종의 서브클러스터를 나타내는 UMAP 가시화: CTX-Ex1 (n = 4,972), CTX-Ex2 (n = 6,049), CTX-Ex3 (n = 4,158), 및 CTX-Ex4 (n = 3,304). 도 6l은 피질 흥분성 뉴런 세포의 상이한 서브클러스터들 간의 대표적인 유전자 마커의 발현 수준을 나타낸다. 각각의 하위집단에 대한 대표적인 마커의 평균 유전자 발현 (음영) 및 이들을 발현하는 세포의 백분율 (도트 크기) 둘 다를 나타내는 도트 플롯이 제공된다. 유전자 발현 값을 각각의 칼럼에 대해 정규화하였다. 도 6m은 억제 뉴런 세포 집단의 서브클러스터링을 나타낸다. 라이덴 클러스터링에 의해 확인된 억제 세포의 6종의 서브클러스터를 나타내는 UMAP 가시화: Cnr1 (n = 512), Lamp5 (n = 573),

Pvalb (n = 1,392), Pvalb-Nog (n = 410), Sst (n = 959), 및 Vip (n = 317). 도 6n은 억제 뉴런 세포의 상이한 서브클러스터 중에서 대표적인 유전자 마커의 발현 수준을 나타낸다. 각각의 하위집단에 대한 대표적인 마커의 평균 유전자 발현 (음영) 및 이들을 발현하는 세포의 백분율 (도트 크기) 둘 다를 나타내는 도트 플롯이 제공된다. 유전자 발현 값을 각각의 칼럼에 대해 정규화하였다. 도 6o는 타우PS2APP 13-개월 샘플에서 흥분성 뉴런 집단에 대한 Aβ 플라크 및 p-타우의 공간 지도를 제공한다 (상단). 축척 막대, 100 μm. 흑색 박스로 나타낸 CA1 영역의 섹션의 고배율 확대도와 함께 타우PS2APP 13-개월 샘플의 총 세포 계수: CTX-Ex1: 2,292, CTX-Ex2: 2,766, CTX-Ex3: 1,184, CTX-Ex4: 2,445, CA1: 2,754, CA2: 436, CA3: 1,878, DG: 4,377을 하단에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. p-타우 단백질 신호는 세포의 상부에서 회색으로 착색되었다. 도 6p는 타우PS2APP 13-개월 샘플에서 억제 뉴런 집단에 대한 Aβ 플라크 및 p-타우의 공간 지도를 제공한다 (상단). 축척 막대, 100 μm. 타우PS2APP의 Cnr1: 421, Lamp5: 191, Pvalb: 864, Sst: 529. 흑색 박스로 표시된 CA1 영역의 섹션의 고배율 확대도와 함께 13-개월 샘플을 하단에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. p-타우 단백질 신호는 세포 상부에서 회색으로 착색된다. 도 6q는 플라크 주변의 흥분성 뉴런 조성을 나타낸다. AD 타우PS2APP 13-개월 샘플의 피질 및 피질하 영역으로부터의 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 상이한 뇌 영역으로부터의 흥분성 뉴런 집단의 각각의 서브-클러스터의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다. 각각의 영역에서, 각각의 세포 유형 하위집단의 전체 세포 밀도를 참조 비교 표준으로서 포함시켰다. 도 6r은 플라크 주위의 억제 뉴런 조성을 나타낸다. AD 타우PS2APP 13-개월 샘플의 피질 및 피질하 영역으로부터의 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서 상이한 뇌 영역으로부터의 억제 뉴런 집단의 각각의 서브-클러스터의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다. 각각의 영역에서, 각각의 세포 유형 하위집단의 전체 세포 밀도를 참조 비교 표준으로서 포함시켰다. 도 6s는 대조군 및 타우PS2APP 마우스에서의 각각의 피질 흥분성 뉴런 및 억제 뉴런 하위유형의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 막대플롯을 제공한다. 도 6t는 플라크 주위의 p-타우 신호 정량화를 나타낸다. p-타우+ 픽셀 (강도 > 역치)을 타우PS2APP 13-개월 샘플의 피질 및 피질하 영역으로부터 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서 정량화하였다. 값을 고리 면적에 의해 정규화하였다. Y-축 값을 각각의 뇌 영역의 총 p-타우 신호에 의해 정규화하였다. 도 6u는 p-타우 양성 뉴런의 세포 유형 조성을 나타낸다. 각각의 AD 샘플 (대조군 및 타우PS2APP) 내의 p-타우 양성 흥분성 뉴런 및 억제 뉴런의 조성을 각각의 세포의 면적에 대한 타우 양성 픽셀의 비에 의해 규정되는 2개의 시점에서의 전류 역치 하에 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다.

도 7a-7m은 질환-연관 세포 유형의 통합 경로 및 공간 분석을 제시한다. 도 7a는 AD 13-개월 샘플에서 각각의 관심 세포 유형의 DEG가 풍부화된 유의한 (공칭 p-값 < 0.05) 생물학적 과정 관련 용어를 나타내는 GSEA 열지도를 제공한다. 항은 항 크기 (20-1000)에 의해 필터링된다. 타일의 음영은 정규화된 농축 점수를 나타낸다. 도 7b는 25 μm 고리 외부의 세포 (행별 z-점수에 의해 음영처리됨)와 비교하여 25 μm 고리 내의 세포로부터의 AD 13-개월 샘플의 플라크-근접 영역에서 상향조절된 (LogFC > 0.1) 유전자를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다. 도 7c는 AD 13-개월 샘플에서의 플라크-유도된 유전자 (PIG)와 AD 8-개월 샘플에서의 PIG 및 18-개월 AppNL-G-F 마우스에서의 이전에 보고된 PIG의 중첩을 강조하는 벤 다이어그램을 제공한다. 도 7d는 AD 8-개월 샘플 (좌측) 및 13-개월 샘플 (우측)에서의 Aβ 플라크 주위의 질환-연관 소교세포 (DAM), 질환-연관 성상세포 (DAA), 핍지교세포, OPC, 및 뉴런 세포 집단의 공간 히스토그램을 제공한다. 히스토그램 상에서, 세포를 각각의 플라크의 가장자리로부터 2D 최대-투영으로 10 μm 빈에서 계수하였다. 도 7e는 8-개월 AD 마우스 (좌측) 및 13-개월 마우스 뇌에서 Aβ 플라크 주위의 DAM, DAA, 핍지교세포, OPC, 소교세포 (DAM 제외), 성상세포 (DAA 제외), 및 뉴런 세포 집단의 개략도를 제공한다. 개략적 다이어그램에서의 세포의 수는 각각의 고리 내의 각각의 세포 유형의 계산된 평균 세포 수의 대략적인 값이다. 도 7f-7g는 타우PS2APP 8-개월 샘플 (도 7f) 및 타우PS2APP 13-개월 샘플 (도 7g) 내의 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, >40 μm)에서의 유전자 클러스터링 결과를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다. 행별 z-점수에 의해 음영처리됨. 도 7h-7i는 타우PS2APP 8-개월 샘플 (도 7h) 및 타우PS2APP 13-개월 샘플 (도 7i)에서 Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, >40 μm)에서의 플라크 유도된 유전자 (0-40 간격으로 풍부화됨, 조정된 p-값 < 0.01)를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다. 행별 z-점수에 의해 착색됨. 도 7j는 타우PS2APP 8- 및 13-개월 샘플에서의 SDEG와 타우PS2APP에서의 SDEG 및 18-개월 App_{NL-G-F} 마우스에서의 이전에 보고된 PIG의 중첩을 강조하는 벤 다이어그램을 나타낸다. 도 7k는 타우PS2APP 8- 및 13-개월 샘플에서의 SDEG 및 이전에 보고된 PIG의 유의하게 풍부화된 GO 용어 나타낸다. 도 7l은 AD 타우PS2APP 8-개월 샘플 (왼쪽) 및 13-개월 샘플 (오른쪽)에서의 Micro3 질환-연관 소교세포 (DAM), Astro3 질환-연관질환-연관 성상세포 (DAA), Oligo2/3 핍지

교세포, OPC, 및 Aβ 플라크 주위의 뉴런 세포 집단의 공간 히스토그램을 제공한다. 히스토그램 상에서, 세포를 각각의 플라크의 가장자리로부터 2D 최대-투영으로 10 μm 빈에서 계수하였다. 도 7m은 8-개월 AD 마우스(좌측) 및 13-개월 마우스 뇌에서 Aβ 플라크 주위의 상이한 세포 유형 (예를 들어, DAM, DAA, 핍지교세포, OPC, 소교세포 (DAM 제외), 성상세포 (DAA 제외), 및 뉴런 세포 집단) 및 해마백색판 내의 핍지교세포 하위유형의 개략적 다이어그램을 제공한다. 개략적 다이어그램에서 세포의 수는 각각의 고리 내의 각각의 세포 유형의 세포 수의 대략적인 비이다.

도 8a-8e는 스타맵 프로 방법의 개발을 나타낸다. 도 8a는 p-타우 1차 항체 염색이 mRNA 계내 혼성화 및 증폭 후에 수행된 스타맵 프로 절차를 나타낸다. 영상화 결과는 cDNA 앰플리콘 및 단백질 둘 다로부터의 강한 신호를 나타냈다. 도 8b는 mRNA 계내 혼성화 및 증폭 전에 p-타우 1차 항체 염색을 수행한 대안적 절차를 나타낸다. 영상화 결과는 cDNA 앰플리콘으로부터 훨씬 더 약한 신호를 나타냈고, 이는 항체 인큐베이션 및 세척 단계 동안 RNA 분해가 일어났음을 시사한다. 도 8c는 이전의 스타맵 방법에 비해 스타맵 프로의 증진된 특이성을 설명하는 개략적 다이어그램을 제공한다. 원래의 스타맵 방법 설계에서, 모든 유전자의 DNA 프로브는 라이게이션 접합부에서 동일한 DNA 서열을 공유하여, 근처에 프라이머 프로브가 존재할 때 패드락 프로브는 여전히 원형화되고 비-특이적으로 증폭될 수 있다. 이는 이전의 스타맵 방법을 사용할 때 잠재적으로 거짓 신호로 이어질 수 있다. 스타맵 프로에서, 추가의 5-nt 바코드는 라이게이션 부위에 위치하고, 비-특이적 결합 프로브의 라이게이션을 방지하여 특이성을 개선할 수 있다. 도 8d 및 8e는 라이게이션 부위 근처에 바코드 미스매치를 갖는 (도 8d) 및 갖지 않는 (도 8e) SNAIL 프로브를 사용한 스타맵 프로의 영상화 결과를 나타낸다. 세포 핵의 DAPI 염색 및 모든 cDNA 앰플리콘의 형광 DNA 프로브 염색이 제공된 범례에 따라 나타내어진다.

도 9a-9g는 모든 샘플의 상위-수준 세포 유형 분류 결과를 나타낸다. 도 9a는 2,766개의 유전자 데이터세트의 각각의 상위-수준 세포 유형으로 정렬된 대표적인 유전자 마커에 대한 적층 바이올린 플롯을 제공한다. 도 9b는 2,766- 및 64-유전자 데이터세트의 각각의 상위-수준 세포 유형으로 정렬된 대표적인 마커에 대한 유전자 발현 열지도를 제공한다. 64-유전자 데이터는 최고-수준 클러스터링 결과를 성공적으로 재현하였다. 각각의 유전자에 대한 발현을 각각의 세포 내의 모든 유전자에 걸쳐 z-점수화한다. 도 9c는 검증 데이터세트의 4개의 샘플로부터의 36,625개의 세포의 전사체학 프로파일에 대한 비-선형 차원 감소를 가시화하는 균일 매니폴드 근사 (UMAP) 플롯을 제공한다. 13종의 상위-수준 클러스터 (피질 흥분성 뉴런 (CTX-Ex, 8,640개의 세포), 억제 뉴런 (In, 2,858개의 세포), CA1 흥분성 뉴런 (CA1-Ex, 2,967개의 세포), CA2 흥분성 뉴런 (CA2-Ex, 331개의 세포), CA3 흥분성 뉴런 (CA3-Ex, 1751개의 세포), 치상회 (DG, 4,560개의 세포), 성상세포 (Astro, 3,423개의 세포), 내피 세포 (Endo, 1,661개의 세포), 소교세포 (Micro, 2,183개의 세포), 핍지교세포 (Oligo, 5,268개의 세포), 핍지교세포 전구체 세포 (OPC, 711개의 세포), 평활근 세포 (SMC, 1,146개의 세포), 및 혼합된 미확인 세포 (Mix, 1126개의 세포)를 나타내는 플롯이 제공된다. 도 9d 및 9e는 2,766-유전자 데이터세트 (도 9d) 및 64-유전자 데이터세트 (도 9e)에서 4개의 샘플의 피질 및 해마 영역에서의 상위-수준 세포 유형의 공간 아틀라스를 나타낸다. 축척 막대, 100 μm. 도 9f 및 9g는 2,766-유전자 데이터세트 (f) 및 64-유전자 검증 데이터세트 (g)의 8- 및 13-개월 샘플 모두에서 상이한 거리 간격의 Aβ 플라크 주위의 세포 유형 조성을 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 각각의 상위-수준 세포 유형의 백분율을 나타내는 적층 막대 플롯이 제공된다. 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성을 참조로서 포함시켰다.

도 10a-10e는 소교세포 집단의 추가적인 유전자 발현 및 공간 정보를 나타낸다. 도 10a는 8-개월 대조군 및 타우PS2APP 샘플에서의 소교세포 하위유형의 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 우측에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 도 10b는 8-개월 샘플에서 타우PS2APP 샘플에 대한 상이한 거리 간격의 Aβ 플라크 주위의 세포 유형 조성을 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40 및 40-50 μm)에서의 각 소교세포 하위군의 백분율을 나타내는 적층 막대 플롯이 제공된다. 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성이 참조로서 포함된다. 도 10c는 가상시간에 의해 착색된 소교세포의 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 우측에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 도 10d는 플라크에 대한 소교세포의 가상시간 값을 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40 및 40-50 μm)에서의 소교세포에 대한 가상시간의 분포를 나타내는 박스 플롯이 제공된다. 모든 소교세포의 분포가 참조로서 포함되었다. 박스 음영은 중앙 가상시간을 나타낸다. 도 10e는 소교세포 차등 발현에 대한 볼케이노 플롯을 제공한다. 플롯은 8- 및 13-개월 샘플에서의 AD 및 대조군 샘플에 걸친 소교세포의 유전자 발현을 나타낸다 (y-축: -log 조정된 p-값, x-축: 평균 로그 배수 변화). 차등 발현된 유전자 (조정된 p-값 < 0.05, logFC의 절대값 > 0.1)는 양성 배수-변화 값 (상향-조정됨) 또는 음성 배수-변화 값 (하향-조정됨)을

갖는다.

도 11a-11e는 성상세포 세포 집단에 대한 추가의 유전자 발현 및 공간 정보를 나타낸다. 도 11a는 8-개월 샘플에서 대조군 및 타우PS2APP 샘플 내 성상세포 하위유형의 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 우측에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 도 11b는 타우PS2APP 8-개월 샘플에 대한 상이한 거리 간격의 Aβ 플라크 주위의 세포 유형 조성을 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 각각의 성상세포 하위집단의 백분율을 나타내는 적층 막대 플롯이 제공된다. 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성이 참조로서 포함된다. 도 11c는 성상세포 세포 집단의 가상시간에 의해 음영처리된 성상세포의 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 우측에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 도 11d는 플라크와 관련된 가상시간을 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 성상세포에 대한 가상시간의 분포를 나타내는 박스 플롯이 제공된다. 모든 성상세포의 분포가 참조로서 포함되었다. 도 11e는 성상세포에서의 차등 유전자 발현을 나타내는 볼케이노 플롯을 제공한다. AD 및 대조군 8- 및 13-개월 샘플에 걸친 성상세포의 유전자 발현을 나타내는 플롯이 제공된다 (y-축: -log 조정된 p-값, x-축: 평균 로그 배수 변화). 차등 발현된 유전자 (조정된 p-값 < 0.05, logFC의 절대값 > 0.1)는 양성 배수-변화 값 (상향-조정됨) 또는 음성 배수-변화 값 (하향-조정됨)을 갖는다.

도 12a-12f는 핍지교세포 및 OPC 세포 집단의 추가의 유전자 발현 및 공간 정보를 나타낸다. 도 12a는 대조군 및 타우PS2APP 8-개월 샘플 둘 다의 핍지교세포 및 OPC 집단에 대한 세포-분해 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 우측에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 도 12b는 타우PS2APP 8-개월 샘플에 대한 상이한 거리 간격의 Aβ 플라크 주위의 세포 유형 조성을 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 각각의 핍지교세포 하위집단 및 OPC의 백분율을 나타내는 적층 막대 플롯이 제공된다. 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성이 참조로서 포함된다. 도 12c는 핍지교세포 관련 세포군에 대한 가상시간에 의해 음영처리된 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 2개의 배율 섹션 (I, II)을 우측에 나타낸다. 축척 막대, 10 μm. 도 12d는 플라크와 관련된 가상시간을 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 핍지교세포에 대한 가상시간의 분포를 나타내는 박스 플롯이 제공된다. 모든 핍지교세포의 분포가 참조로서 포함되었다. 도 12e는 플라크와 관련하여 가상시간을 나타낸다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 OPC에 대한 가상시간의 분포를 나타내는 박스 플롯이 제공된다. 모든 OPC의 분포가 참조로서 포함된다. 도 12e는 핍지교세포에서의 차등 발현을 나타내는 볼케이노 플롯을 제공한다. AD 및 대조군 8- 및 13-개월 샘플에 걸친 핍지교세포의 유전자 발현을 나타내는 플롯이 제공된다 (y-축: -log 조정된 p-값, x-축: 평균 로그 배수 변화). 차등 발현된 유전자 (조정된 p-값 < 0.05, logFC의 절대값 > 0.1)는 양성 배수-변화 값 (상향-조정됨) 또는 음성 배수-변화 값 (하향-조정됨)을 갖는다.

도 13a-13g는 뉴런 집단에 대한 추가의 유전자 발현 및 공간 정보를 나타낸다. 도 13a는 4개의 샘플의 흥분성 뉴런 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 도 13b는 4개의 샘플의 억제 뉴런 집단에 대한 공간 지도를 제공한다. 축척 막대, 100 μm. 도 13c는 흥분성 뉴런의 플라크 주위의 영역별 세포 밀도 및 세포 유형 조성을 나타낸다. 각각의 샘플에 대한 피질 및 피질하 영역 둘 다에서의 각각의 흥분성 뉴런 서브-클러스터의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다 (상단). 막대 플롯에서의 음영은 도 13a의 세포 유형 범례에 상응한다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 각각의 흥분성 뉴런 서브-클러스터의 백분율을 나타내는 적층 막대 차트가 또한 제공된다 (하단). 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성이 참조로서 포함된다. 도 13d는 억제 뉴런의 플라크 주위의 영역별 세포 밀도 및 세포 유형 조성을 나타낸다. 각각의 샘플에 대한 피질 및 피질하 영역 둘 다에서의 각각의 억제 뉴런 서브-클러스터의 밀도 (mm^2당 계수)를 나타내는 적층 막대 차트가 제공된다 (상단). 막대 플롯에서의 음영은 도 13b의 세포 유형 범례에 상응한다. Aβ 플라크 주위의 각각의 거리 간격 (0-10, 10-20, 20-30, 30-40, 및 40-50 μm)에서의 각각의 억제 뉴런 서브-클러스터의 백분율을 나타내는 적층 막대 차트가 또한 제공된다 (하단). 각각의 영역에서, 전체 세포 유형 조성이 참조로서 포함되었다. 도 13e-13g는 SynGO를 사용하여 흥분성 뉴런, 억제 뉴런, 및 타우 병리상태를 갖는 CA1 세포로부터의 DEG의 시냅스 유전자 온톨로지 용어 풍부화를 나타낸다. 선버스트 플롯의 음영은 1% FDR에서의 풍부화 $-\log_{10}$ Q-값을 나타낸다.

도 14a 내지 14e는 AD 마우스 뇌의 경로 및 공간 분석을 나타낸다. 도 14a는 AD 8-개월 샘플에서 각각의 관심 세포 유형의 상향조절된 유전자가 풍부된 생물학적 과정 관련 용어를 나타내는 유전자 온톨로지 열지도를 제공

한다. 항은 항 크기: 20-1000에 의해 필터링된다. 타일의 음영은 풍부화 $-\log_{10}$(FDR) 값을 나타낸다. 도 14b는 인리치먼트맵(EnrichmentMap) 및 오토애노테이트(AutoAnnotate) 앱으로 시토스케이프(Cytoscape)를 사용하여 뉴런 세포 (흥분성, 억제 뉴런) 및 비-뉴런 세포 (소교세포, 성상세포 및 핍지교세포)에서 차등 발현된 유전자 (abs(LogFC) > 0.1, 윌콕스 시험 p 값 < 0.05)로부터 생성된 기능적 풍부화 맵을 제공한다. 각각의 원은 GO 용어를 나타내고, 각각의 세포 클러스터로부터의 DEG의 공통적이고 상이한 기여를 설명하기 위해 세포 유형에 의해 음영처리된다. 타원은 오토애노테이트에 의해 클러스터링된 GO 용어의 성상을 나타낸다. 도 14c (좌측)는 AD 13-개월 샘플에서 관련 세포 유형과 Aβ 플라크 사이의 평균 최근접-이웃 거리를 나타내는 열지도를 제공한다. 평균 최근접-이웃 거리는 다음에 의해 계산된다: 1) 모든 세포 및 플라크에 대해, 서로의 대상에 대한 유클리드 거리를 계산한 다음, 각각의 세포 유형 또는 플라크의 최근접 세포를 발견하고, 거리를 저장함. 2) 관심 대상의 모든 비교 (즉, Micro 대 플라크)에 대해, 그의 거리 분포의 평균을 계산함. 도 14c (우측)는 도 14c (좌측)와 동일한 거리를 나타내지만, 셔플링된 (무작위화된) 세포 유형 표지를 사용한다. 도 14d (좌측)는 AD 8-개월 샘플 내의 관련 세포 유형과 Aβ 플라크 사이의 평균 최근접-이웃 거리를 나타내는 열지도를 제공한다. 계산은 도 14c에서 사용된 것과 동일하다. 도 14d (우측)는 도 14d (좌측)와 동일한 거리를 나타내지만 셔플링된 (무작위화된) 세포 유형 표지를 사용한다. 도 14e는 25 μm 고리 외부의 세포와 비교하여 25 μm 고리 내의 세포로부터의 AD 8-개월 샘플의 플라크 근접 영역에서 상향조절된 유전자를 나타내는 매트릭스 플롯을 제공한다.

도 15는 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 것과 관련된 방법의 한 실시양태의 흐름도이다.

도 16은 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 것과 관련된 방법의 한 실시양태의 흐름도이다.

도 17은 카메라를 사용하여 적어도 하나의 영상을 캡처하는 것과 관련된 방법의 한 실시예의 흐름도이다.

도 18은 복수의 영상으로부터 공간 위치를 공간적으로 정렬하는 한 실시양태의 흐름도이다.

도 19는 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 세포 유형의 세포 수를 결정하는 것과 관련된 방법의 한 실시양태의 흐름도이다.

도 20은 세포의 세포 유형을 결정하는 것과 관련된 방법의 한 실시양태의 흐름도이다.

도 21은 다양한 기능 또는 방법이 구현될 수 있는 컴퓨터 시스템의 블록 다이어그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 정의

[0046] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 의미를 갖는다. 하기 참고문헌은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명에 사용된 많은 용어의 일반적 정의를 제공한다: 문헌 [Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); and Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)]. 본원에 사용된 하기 용어는 달리 명시되지 않는 한 그에 대해 부여된 의미를 갖는다.

[0047] 용어 "투여하다", "투여하는" 및 "투여"는 대상체 내에 또는 대상체 상에 치료제 또는 요법제, 또는 치료제 또는 요법제의 조성물을 이식, 흡수, 섭취, 주사, 흡입 또는 달리 도입하는 것을 지칭한다.

[0048] 본원에 사용된 용어 "앰플리콘"은 증폭 반응 (즉, 유전자 단편 또는 표적 서열의 1개 이상의 카피의 생산) 또는 복제 반응의 산물인 핵산 (예를 들어, DNA 또는 RNA)을 지칭한다. 앰플리콘은, 예를 들어 PCR 또는 다른 중합 반응을 사용하여 인공적으로 형성될 수 있다. 용어 "연쇄된 앰플리콘"은 함께 연결되어 단일 핵산 분자를 형성하는 다중 앰플리콘을 지칭한다. 연쇄된 앰플리콘은, 예를 들어 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 연쇄된 다중 앰플리콘을 포함하는 단일 핵산 분자로서 올리고뉴클레오티드의 다중 선형 카피를 생산하는 롤링 서클 증폭 (RCA)에 의해 형성될 수 있다.

[0049] "항체"는 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 당단백질을 지칭한다. 용어 항체 및 이뮤노글로불린은 상호교환 가능하게 사용된다. 일부 예외로, 포유동물 항체는 전형적으로 각각 2개의 큰 중쇄 및 2개의 작은 경쇄를 갖는

기본 구조 단위로 제조된다. 여러 상이한 유형의 항체 중쇄, 및 여러 상이한 종류의 항체가 존재하며, 이들은 이들이 보유하는 중쇄에 기초하여 상이한 이소형으로 함께 그룹화된다. 포유동물에서 5종의 상이한 항체 이소형 (IgG, IgA, IgE, IgD 및 IgM)이 공지되어 있으며, 이는 상이한 역할을 수행하고, 이들이 마주치는 각각의 상이한 유형의 이물질에 대해 적절한 면역 반응을 지시하는 것을 돕는다. 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 항체는 관심 단백질 (예를 들어, 세포에서 발현되는 임의의 관심 단백질)에 결합한다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 또한 항체 단편 및 나노바디, 뿐만 아니라 항체의 변이체 및 항체 단편 및 나노바디의 변이체를 포괄한다.

[0050] 용어 "암"은 제어불가능하게 증식하고 정상 신체 조직을 침윤 및 파괴하는 능력을 갖는 비정상 세포의 발생을 특징으로 하는 질환의 부류를 지칭한다. 예를 들어, 문헌 [Stedman's Medical Dictionary, 25th ed.; Hensyl ed.; Williams & Wilkins: Philadelphia, 1990]을 참조한다. 예시적인 암은 청신경종; 선암종; 부신암; 항문암; 혈관육종 (예를 들어, 림프관육종, 림프관내피육종, 혈관육종); 충수암; 양성 모노클로날 감마글로불린병증; 담도암 (예를 들어, 담관암종); 방광암; 유방암 (예를 들어, 유방의 선암종, 유방의 유두상 암종, 유방암, 유방의 수질성 암종); 뇌암 (예를 들어, 수막종, 교모세포종, 신경교종 (예를 들어, 성상세포종, 핍지교종), 수모세포종); 기관지암; 카르시노이드 종양; 자궁경부암 (예를 들어, 자궁경부 선암종); 융모막암종; 척삭종; 두개인두종; 결장직장암 (예를 들어, 결장암, 직장암, 결장직장 선암종); 결합 조직암; 상피 암종; 상의세포종; 내피육종 (예를 들어, 카포시 육종, 다발성 특발성 출혈성 육종); 자궁내막암 (예를 들어, 자궁암, 자궁 육종); 식도암 (예를 들어, 식도의 선암종, 바렛 선암종); 유잉 육종; 안구암 (예를 들어, 안내 흑색종, 망막모세포종); 가족성 과다호산구증가증; 담낭암; 위암 (예를 들어, 위 선암종); 위장 기질 종양 (GIST); 배세포암; 두경부암 (예를 들어, 두경부 편평 세포 암종, 구강암 (예를 들어, 구강 편평 세포 암종), 인후암 (예를 들어, 후두암, 인두암, 비인두암, 구인두암)); 조혈암 (예를 들어, 백혈병, 예컨대 급성 림프구성 백혈병 (ALL) (예를 들어, B-세포 ALL, T-세포 ALL), 급성 골수구성 백혈병 (AML) (예를 들어, B-세포 AML, T-세포 AML), 만성 골수구성 백혈병 (CML) (예를 들어, B-세포 CML, T-세포 CML), 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL) (예를 들어, B-세포 CLL, T-세포 CLL)); 림프종, 예컨대 호지킨 림프종 (HL) (예를 들어, B-세포 HL, T-세포 HL) 및 비-호지킨 림프종 (NHL) (예를 들어, B-세포 NHL, 예컨대 미만성 대세포 림프종 (DLCL) (예를 들어, 미만성 대 B-세포 림프종), 여포성 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종 (CLL/SLL), 외투 세포 림프종 (MCL), 변연부 B-세포 림프종 (예를 들어, 점막-연관 림프성 조직 (MALT) 림프종, 결절성 변연부 B-세포 림프종, 비장 변연부 B-세포 림프종), 원발성 종격 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포성 림프종 (즉, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증), 모발상 세포 백혈병 (HCL), 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B-림프모구성 림프종 및 원발성 중추 신경계 (CNS) 림프종); 및 T-세포 NHL, 예컨대 전구체 T-림프모구성 림프종/백혈병, 말초 T-세포 림프종 (PTCL) (예를 들어, 피부 T-세포 림프종 (CTCL) (예를 들어, 균상 식육종, 세자리 증후군), 혈관면역모세포성 T-세포 림프종, 결절외 자연 킬러 T-세포 림프종, 장병증 유형 T-세포 림프종, 피하 지방층염-유사 T-세포 림프종, 및 역형성 대세포 림프종); 상기 기재된 바와 같은 1종 이상의 백혈병/림프종의 혼합물; 및 다발성 골수종 (MM)), 중쇄 질환 (예를 들어, 알파 쇄 질환, 감마 쇄 질환, 뮤 쇄 질환); 혈관모세포종; 하인두암; 염증성 근섬유모세포성 종양; 면역세포성 아밀로이드증; 신장암 (예를 들어, 신모세포종 일명 윌름스 종양, 신세포 암종); 간암 (예를 들어, 간세포성암 (HCC), 악성 간세포암); 폐암 (예를 들어, 기관지원성 암종, 소세포 폐암 (SCLC), 비소세포 폐암 (NSCLC), 폐의 선암종); 평활근육종 (LMS); 비만세포증 (예를 들어, 전신 비만세포증); 근육암; 골수이형성 증후군 (MDS); 중피종; 골수증식성 장애 (MPD) (예를 들어, 진성 다혈구혈증 (PV), 본태성 혈소판증가증 (ET), 골수섬유증 (MF)으로도 공지된 원인불명 골수 화생 (AMM), 만성 특발성 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병 (CML), 만성 호중구성 백혈병 (CNL), 과다호산구성 증후군 (HES)); 신경모세포종; 신경섬유종 (예를 들어, 신경섬유종증 (NF) 유형 1 또는 유형 2, 슈반세포종증); 신경내분비암 (예를 들어, 위장췌장 신경내분비 종양 (GEP-NET), 카르시노이드 종양); 골육종 (예를 들어, 골암); 난소암 (예를 들어, 낭선암종, 난소 배아성 암종, 난소 선암종); 유두상 선암종; 췌장암 (예를 들어, 췌장 선암종, 관내 유두상 점액성 신생물 (IPMN), 도세포 종양); 음경암 (예를 들어, 음경 및 음낭의 파제트병); 송과체종; 원시 신경외배엽종양 (PNT); 형질 세포 신생물; 부신생물성 증후군; 상피내 신생물; 전립선암 (예를 들어, 전립선 선암종); 직장암; 횡문근육종; 타액선암; 피부암 (예를 들어, 편평 세포 암종 (SCC), 각화극세포종 (KA), 흑색종, 기저 세포 암종 (BCC)); 소장암 (예를 들어, 충수암); 연부 조직 육종 (예를 들어, 악성 섬유성 조직구종 (MFH), 지방육종, 악성 말초 신경초 종양 (MPNST), 연골육종, 섬유육종, 근육종); 피지선 암종; 소장암; 한선 암종; 활막종; 고환암 (예를 들어, 정상피종, 고환 배아성 암종); 갑상선암 (예를 들어, 갑상선의 유두상 암종, 유두상 갑상선 암종 (PTC), 수질성 갑상선암); 요도암; 질암; 및 외음부암 (예를 들어, 외음부의 파제트병)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0051] 본원에 사용된 "세포"는 세포 집단 (예를 들어, 조직, 샘플, 생검, 기관 또는 기관양)에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포의 집단은 복수의 상이한 세포 유형으로 구성된다. 본 개시내용의 방법에 사용하기 위한 세포는 유기체, 유기체로부터 유래된 단일 세포 유형, 또는 세포 유형의 혼합물 내에 존재할 수 있다. 자연 발생 세포 및 세포 집단, 유전자 조작된 세포주, 트랜스제닉 동물로부터 유래된 세포, 대상체로부터의 세포 등이 포함된다. 실질적으로 임의의 세포 유형 및 크기가 본원에 기재된 방법 및 시스템에 수용될 수 있다. 적합한 세포는 박테리아, 진균, 식물 및 동물 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포 (예를 들어, 복합 세포 집단, 예컨대 자연 발생 조직)이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간으로부터의 것이다. 특정 실시양태에서, 세포는 의료 절차, 예컨대 생검을 통해 대상체 (예를 들어, 인간)로부터 수집된다. 대안적으로, 세포는 배양된 집단 (예를 들어, 복합 집단으로부터 유래된 배양물, 또는 세포가 다중 계통으로 분화된 것인 단일 세포 유형으로부터 유래된 배양물)일 수 있다. 세포는 또한 조직 샘플에서 계내 제공될 수 있다.

[0052] 본 개시내용의 방법에 사용하기 위해 고려되는 세포 유형은 줄기 및 전구 세포 (예를 들어, 배아 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 신경 능선 세포 등), 내피 세포, 근육 세포, 심근 세포, 평활근 및 골격근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 조혈 세포, 림프구, 예컨대 T-세포 (예를 들어, Th1 T 세포, Th2 T 세포, Th0 T 세포, 세포독성 T 세포) 및 B 세포 (예를 들어, 프리-B 세포), 단핵구, 수지상 세포, 호중구, 대식세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 면역 세포, 뉴런, 간세포, 및 특정한 기관과 관련된 세포 (예를 들어, 흉선, 내분비선, 췌장, 뇌, 뉴런, 신경교, 성상세포, 수지상세포, 및 그의 유전자 변형 세포)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 세포는 또한 상이한 유형의 형질전환된 또는 신생물성 세포 (예를 들어, 상이한 세포 기원의 암종, 상이한 세포 유형의 림프종 등) 또는 임의의 종류의 암성 세포 (예를 들어, 본원에 개시된 임의의 암으로부터의 것)일 수 있다. 상이한 기원의 세포 (예를 들어, 외배엽, 중배엽, 및 내배엽)가 본 개시내용의 방법에서 사용하기 위해 또한 고려된다. 일부 실시양태에서, 세포는 소교세포, 성상세포, 핍지교세포, 흥분성 뉴런 또는 억제 뉴런이다. 일부 실시양태에서, 다중 세포 유형의 세포가 동일한 샘플 내에 존재한다.

[0053] 본원에 사용된 용어 "검출제"는 임의의 관심 단백질 또는 펩티드의 존재 또는 위치를 검출하는 데 사용될 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 1개 이상의 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 본원에 개시된 방법에 사용된 각각의 검출제는 관심 단백질 또는 펩티드에 결합한다. 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있는 검출제는 단백질, 펩티드, 핵산 및 소분자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 검출제는 관심 단백질에 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 검출제는 항체 단편, 항체 변이체 및 나노바디를 포함한다. 특정 실시양태에서, 검출제는 압타머를 포함한다. 특정 실시양태에서, 검출제는 수용체 또는 그의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출제는 소분자 염료 (예를 들어, 소분자 X-34)를 포함한다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "유전자"는 코딩 서열 앞의 조절 서열 (5' 비-코딩 서열) 및 뒤의 조절 서열 (3' 비-코딩 서열)을 포함한 단백질을 발현하는 핵산 단편을 지칭한다.

[0055] 본원에 사용된 "유전자 발현"은 유전자로부터의 정보가 유전자 산물의 합성에 사용되는 과정을 지칭한다. 유전자 산물은 단백질 및 RNA 전사체 (예를 들어, 메신저 RNA, 전달 RNA, 또는 소형 핵 RNA)를 포함한다. 유전자 발현은 전사 및 번역을 포함한다. 전사는 DNA의 섹션이 RNA 폴리머라제에 의해 RNA로 전사되는 과정이다. 번역은 RNA가 리보솜에 의해 펩티드 또는 단백질로 번역되는 과정이다. 본원에 사용된 용어 "유전자 정보"는 1개 이상의 유전자 및/또는 1개 이상의 RNA 전사체 (예를 들어, 임의의 수의 유전자 및/또는 RNA 전사체)를 지칭한다.

[0056] "신경변성 질환"은 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 타우병증 (전두측두엽 치매 포함), 및 헌팅톤병을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 신경 세포의 손실로 나타나는 신경계 질환의 유형을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 신경변성 질환은 알츠하이머병이다. 알츠하이머병의 원인은 잘 이해되지 않지만, 대부분의 경우에 유전적 기초를 포함하는 것으로 생각된다. 상기 질환은 뇌 피질에서의 뉴런 및 시냅스의 손실을 특징으로 하며, 이는 이환 영역의 위축을 초래한다. 생화학적으로, 알츠하이머병은 뇌에서의 비정상적으로 폴딩된 아밀로이드 베타 단백질 및 타우 단백질의 플라크 축적으로 인한 단백질 미스폴딩 질환을 특징으로 한다. 알츠하이머병의 증상은 최근 사건을 기억하는 것의 어려움, 언어 문제, 방향감각상실, 기분 동요, 동기 상실, 자기-무시, 및 행동 문제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 궁극적으로, 신체 기능은 서서히 상실되고, 알츠하이머병은 결국 사망으로 이어진다. 치료는 현재 질환으로 인한 인지 문제의 치료 (예를 들어, 아세틸콜린에스테라제 억제제 또는 NMDA 수용체 길항제 사용), 정신사회적 개입 (예를 들어, 행동-지향적 또는 인지-지향적 접근법), 및 일반적 간병을 목표로 한다. 질환의 진행을 완전히 정지 또는 역전시키는 데 이용가능한 치료

는 현재 없다.

[0057] 용어 "폴리뉴클레오티드", "뉴클레오티드 서열", "핵산", "핵산 분자", "핵산 서열", 및 "올리고뉴클레오티드"는 DNA 및 RNA 내의 일련의 뉴클레오티드 염기 ("뉴클레오티드"로도 불림)를 지칭하고, 2개 이상의 뉴클레오티드의 임의의 쇄를 의미한다. 폴리뉴클레오티드는 키메라 혼합물 또는 유도체 또는 그의 변형된 버전, 및 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어 분자의 안정성, 그의 혼성화 파라미터 등을 개선시키기 위해 염기 모이어티, 당 모이어티, 또는 포스페이트 백본에서 변형될 수 있다.

[0058] "단백질", "펩티드" 또는 "폴리펩티드"는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기의 중합체를 포함한다. 상기 용어는 임의의 크기, 구조 또는 기능의 단백질, 폴리펩티드 및 펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 단백질은 적어도 3개의 아미노산 길이일 것이다. 단백질은 개별 단백질 또는 단백질의 집합을 지칭할 수 있다. 본 발명의 단백질은 비록 관련 기술분야에 공지된 비-천연 아미노산 (즉, 자연에서 발생하지 않지만 폴리펩티드 쇄에 혼입될 수 있는 화합물) 및/또는 아미노산 유사체를 대안적으로 이용할 수 있지만, 바람직하게는 천연 아미노산만을 함유한다. 또한, 단백질 내의 아미노산 중 1개 이상은, 예를 들어 화학 물질, 예컨대 탄수화물 기, 히드록실 기, 포스페이트 기, 파르네실 기, 이소파르네실 기, 지방산 기, 접합 또는 관능화를 위한 링커의 첨가, 또는 다른 변형에 의해 변형될 수 있다. 단백질은 또한 단일 분자일 수 있거나 또는 다중-분자 복합체일 수 있다. 단백질은 자연 발생 단백질 또는 펩티드의 단편일 수 있다. 단백질은 자연 발생, 재조합, 합성, 또는 그의 임의의 조합일 수 있다.

[0059] 본원에 사용된 "가상시간"은 세포에서 유전자의 차등 발현을 모델링하는 방법을 지칭하고, 단일-세포 서열분석 데이터에 대한 문헌 [Van den Berge, K. et al. Trajectory-based differential expression analysis for single-cell sequencing data. Nature Communications 2020, 11, 1-13] (본원에 참조로 포함됨)에 추가로 기재되어 있다.

[0060] "전사체" 또는 "RNA 전사체"는 DNA 서열의 RNA 폴리머라제-촉매된 전사로부터 생성된 생성물이다. RNA 전사체가 DNA 서열의 상보적 카피인 경우, 이는 1차 전사체로 지칭되거나, 또는 이는 1차 전사체의 전사후 프로세싱으로부터 유래된 RNA 서열일 수 있고 성숙 RNA로 지칭된다. "메신저 RNA (mRNA)"는 인트론이 없고 세포에 의해 폴리펩티드로 번역될 수 있는 RNA를 지칭한다. "cRNA"는 재조합 cDNA 주형으로부터 전사된 상보적 RNA를 지칭한다. "cDNA"는 mRNA 주형에 상보적이고 그로부터 유래된 DNA를 지칭한다.

[0061] 용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 조직 샘플 (예컨대, 조직 절편, 외과적 생검, 및 조직의 바늘 생검); 세포 샘플 (예를 들어, 세포학적 도말표본 (예컨대, Pap 또는 혈액 도말표본) 또는 미세절제에 의해 수득된 세포의 샘플); 또는 세포 분획, 단편 또는 소기관 (예컨대, 세포를 용해시키고 그의 성분을 원심분리 등에 의해 분리함으로써 수득됨)을 포함한 임의의 샘플을 지칭한다. 생물학적 샘플의 다른 예는 혈액, 혈청, 소변, 정액, 분변물, 뇌척수액, 간질액, 점액, 눈물, 땀, 고름, 생검 조직 (예를 들어, 외과적 생검 또는 바늘 생검에 의해 수득됨), 유두 흡인물, 유액, 질액, 타액, 스왑 (예컨대, 협측 스왑), 또는 제1 생물학적 샘플로부터 유래된 생체분자를 함유하는 임의의 물질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 생물학적 샘플은 대상체로부터 채취한 외과적 생검, 예를 들어 본원에 기재된 조직 중 임의의 것의 생검이다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 종양 생검 (예를 들어, 암으로 진단되거나, 암을 갖는 것으로 의심되거나, 또는 암을 갖는 것으로 생각되는 대상체로부터의 것)이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 뇌 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직은 심장 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직은 근육 조직이다.

[0062] 투여가 고려되는 "대상체"는 인간 (즉, 임의의 연령군의 남성 또는 여성, 예를 들어 소아 대상체 (예를 들어, 영아, 소아 또는 청소년) 또는 성인 대상체 (예를 들어, 청년, 중년 성인 또는 노년 성인)) 또는 비-인간 동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물 (예를 들어, 영장류 (예를 들어, 시노몰구스 원숭이 또는 레서스 원숭이) 또는 마우스)이다. 용어 "환자"는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 환자는 인간이다. 인간은 임의의 발달 단계의 남성 또는 여성일 수 있다. 질환 또는 장애의 치료를 "필요로 하는" 대상체 또는 환자는 비제한적으로 질환 또는 장애 (예를 들어, 알츠하이머병)의 임의의 위험 인자 또는 증상을 나타내는 것들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스)이다.

[0063] 치료 또는 치료제의 "치료 유효량"은 상태의 치료에서 치료 이익을 제공하거나 또는 상태와 연관된 1종 이상의 증상을 지연 또는 최소화하기에 충분한 양이다. 치료 또는 치료제의 치료 유효량은 상태의 치료에서 치료 이익을 제공하는, 단독의 또는 다른 요법과 조합된 요법의 양을 의미한다. 용어 "치료 유효량"은 전체 요법을 개선시키고/거나, 상태의 증상, 징후 또는 원인을 감소 또는 회피하고/거나, 또 다른 치료제의 치료 효능을 증진시

키는 양을 포괄할 수 있다.

[0064] 본원에 사용된 "조직"은 동일한 기원으로부터의 세포 및 그의 세포외 매트릭스의 군이다. 함께, 세포는 특정 기능을 수행한다. 다중 조직 유형의 연합은 함께 기관을 형성한다. 세포는 상이한 세포 유형일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조직은 상피 조직이다. 상피 조직은 기관 표면 (예를 들어, 피부의 표면, 기도, 연기관, 생식관, 및 소화관의 내부 내층)을 덮는 세포에 의해 형성된다. 상피 조직은 보호 기능을 수행하고, 또한 분비, 배출 및 흡수에 수반된다. 상피 조직의 예는 단순 편평 상피, 중층 편평 상피, 단순 입방 상피, 이행 상피, 가성중층 상피, 원주 상피 및 선상피를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 조직은 결합 조직이다. 결합 조직은 무생물 물질 (예를 들어, 세포외 매트릭스)에 의해 분리된 세포로 구성된 섬유성 조직이다. 결합 조직은 기관에 형상을 제공하고, 기관을 제자리에 유지시킨다. 결합 조직은 섬유성 결합 조직, 골격 결합 조직 및 유체 결합 조직을 포함한다. 결합 조직의 예는 혈액, 골, 힘줄, 인대, 지방, 및 윤문상 조직을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 조직은 근육 조직이다. 근육 조직은 근육 세포로부터 형성된 활성 수축 조직이다. 근육 조직은 힘을 생성하고 운동을 유발하는 기능을 한다. 근육 조직은 평활근 (예를 들어, 기관의 내부 내층에서 발견되는 바와 같음), 골격근 (예를 들어, 전형적으로 골에 부착된 바와 같음), 및 심장 근육 (예를 들어, 심장에서 발견되는 바와 같음, 여기서 이는 수축하여 유기체 전반에 걸쳐 혈액을 펌핑함)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조직은 신경 조직이다. 신경 조직은 중추 신경계 및 말초 신경계를 포함하는 세포를 포함한다. 신경 조직은 뇌, 척수, 두개 신경 및 척수 신경 (예를 들어, 운동 뉴런)을 형성한다. 특정 실시양태에서, 조직은 뇌 조직이다. 특정 실시양태에서, 조직은 태반 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직은 심장 조직이다.

[0065] 용어 "치료", "치료하다" 및 "치료하는"은 본원에 기재된 질환 (예를 들어, 알츠하이머병)의 역전, 완화, 그의 발병의 지연 또는 그의 진행의 억제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료는 질환의 1종 이상의 징후 또는 증상이 발생하였거나 또는 관찰된 후에 (예를 들어, 예방적으로 (본원에 추가로 기재될 수 있음) 또는 질환의 의심 또는 위험 시에) 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 치료는 질환의 징후 또는 증상의 부재 하에 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료는 증상의 발병 전에 (예를 들어, 대상체 또는 대상체의 가족 구성원에서의 증상의 병력에 비추어) 감수성 대상체에게 투여될 수 있다. 치료는 또한 증상이 해결된 후에, 예를 들어 재발을 지연시키거나 또는 방지하기 위해 계속될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는, 본원에 개시된 방법을 사용하고 건강한 세포 또는 조직과 비교하여 세포 또는 조직에서 1개 이상의 관심 핵산 및/또는 단백질의 유전자 및/또는 단백질 발현에서의 변경을 관찰한 후에 투여될 수 있다.

[0066] 본원에 사용된 용어 "종양" 및 "신생물"은 조직의 비정상적 덩어리를 지칭하며, 여기서 덩어리의 성장은 정상 조직의 성장을 능가하고 그와 조화되지 않는다. 종양은 하기 특징에 따라 "양성" 또는 "악성"일 수 있다: 세포 분화의 정도 (형태 및 기능성 포함), 성장 속도, 국부 침습 및 전이. "양성 신생물"은 일반적으로 잘 분화되고, 악성 신생물보다 특징적으로 더 느린 성장을 가지며, 기원 부위에 국재화된 채로 남아있다. 또한, 양성 신생물은 원위 부위로 침윤, 침습 또는 전이되는 능력을 갖지 않는다. 예시적인 양성 신생물은 지방종, 연골종, 선종, 연성섬유종, 노인성 혈관종, 지루성 각화증, 흑색점 및 피지 증식증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 특정 "양성" 종양은 이후에 악성 신생물을 생성할 수 있으며, 이는 종양의 신생물성 세포의 하위집단에서의 추가의 유전적 변화로부터 일어날 수 있고, 이들 종양은 "전암성 신생물"로 지칭된다. 예시적인 전암성 신생물은 기형종이다. 대조적으로, "악성 신생물"은 일반적으로 불량하게 분화되고 (역형성), 주위 조직의 진행성 침윤, 침습 및 파괴를 동반하는 특징적으로 급속한 성장을 갖는다. 게다가, 악성 신생물은 일반적으로 원위 부위로 전이하는 능력을 갖는다. 용어 "전이", "전이성" 또는 "전이하다"는 원발성 또는 원래 종양으로부터 또 다른 기관 또는 조직으로의 암성 세포의 확산 또는 이동을 지칭하고, 전형적으로 속발성 (전이성) 종양이 위치하는 기관 또는 조직의 것이 아니라 원발성 또는 원래 종양의 조직 유형의 "속발성 종양" 또는 "속발성 세포 덩어리"의 존재에 의해 확인가능하다. 예를 들어, 골로 이동한 전립선암은 전이된 전립선암으로 언급되고, 골 조직에서 성장 중인 암성 전립선암 세포를 포함한다.

[0067] 특정 실시양태의 상세한 설명

[0068] 본원에 기재된 측면은 구체적 실시양태, 시스템, 조성물, 방법, 또는 구성에 제한되지 않고, 따라서 물론 달라질 수 있다. 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 측면을 기재하기 위한 것이며, 본원에 구체적으로 정의되지 않는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0069] 본 개시내용은 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 (즉, 동일한 세포 내에서 유전자 및 단백질 발현을 동시에 맵핑하는) 방법 및 시스템을 제공한다. 본 개시내용은 또한 대상체에서 질환 또는 장애 (예를 들어, 알

츠하이머병 또는 암)를 진단하는 방법을 제공한다. 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는 후보 작용제를 스크리닝하거나 또는 시험하는 방법이 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 본 개시내용은 또한 질환 또는 장애, 예컨대 신경계 장애 (예를 들어, 알츠하이머병)의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 유용할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브의 쌍, 뿐만 아니라 본원에 기재된 임의의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 키트가 또한 본 개시내용에 의해 기재된다. 추가적으로, 본 개시내용은 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하기 위한 방법, 장치, 시스템, 및 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체를 제공한다.

[0070] 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 방법

[0071] 한 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 방법을 제공한다 (예를 들어, 도 1a 및 1b 참조). 본원에 개시된 방법에서, 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시킬 수 있으며, 이는 본원에 추가로 기재되고, 전사체를 (예를 들어, 롤링 서클 증폭에 의해) 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 데 사용될 수 있다. 이어서, 세포를 1종 이상의 검출제 (예를 들어, 항체)와 접촉시킬 수 있고, 여기서 각각의 검출제는 세포 내의 관심 단백질에 결합한다. 이어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시킬 수 있고, 1개 이상의 앰플리콘을 서열분석하여 (예를 들어, 본원에 추가로 기재된 바와 같은 SEDAL 서열분석 (동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소를 갖는 서열분석)을 통해) 전사체의 정체 및 중합체 매트릭스 내의 그의 위치를 결정할 수 있다. 중합체 매트릭스 내의 1개 이상의 관심 단백질에 결합된 검출제 (예를 들어, 항체)의 위치는 또한 영상화 (예를 들어, 공초점 현미경검사를 통해)에 의해 결정되어, 세포 내의 전사체 및 관심 단백질의 위치가 맵핑되도록 할 수 있다. 관심 전사체 및 단백질의 위치를 사용하여, 개별 세포, 세포하 위치 및 소기관을 확인할 수 있다. 방법은, 예를 들어 이환된 및 건강한 조직 샘플로부터의 세포 (또는 다중 세포)를 비교하는 데 유용할 수 있다.

[0072] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 방법을 제공한다:

[0073] a) 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

[0074] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

[0075] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0076] b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0077] c) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0078] d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

[0079] e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0080] f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0081] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포 내의 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계. 일부 실시양태에서, 1개의 핵산 및 관심 단백질의 발현은 본원에 기재된 방법을 사용하여 맵핑된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 중 임의의 것은 동일한 세포 (또는 예를 들어 조직 샘플에서 다중 세포) 내에서 복수의 관심 핵산 및 관심 단백질의 발현을 맵핑하는 데 사용될 수 있다.

[0082] 본원에 개시된 방법에서 임의의 세포 유형의 사용이 본 개시내용에 의해 고려된다 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 세포 유형). 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 인간 세포이

다. 일부 실시양태에서, 세포는 신경계로부터의 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 암 세포이다. 본 개시내용은 또한 다중 세포에 대해 본원에 기재된 방법을 동시에 수행하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, 방법은 동일한 세포 유형의 다중 세포 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 상이한 세포 유형의 세포를 포함하는 다중 세포 상에서 수행된다. 본원에 개시된 방법을 사용하여 유전자 및 단백질 발현이 맵핑될 수 있는 세포 유형은 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 핍지교세포, 근육 세포, 심근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포 및 간 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 세포는 소교세포, 성상세포, 핍지교세포, 흥분성 뉴런 및/또는 억제 뉴런이다. 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포들은 투과화된 세포이다 (예를 들어, 세포는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계 전에 투과화됨). 특정 실시양태에서, 세포 또는 세포들은 무손상 조직 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 조직 유형) 내에 존재한다. 특정 실시양태에서, 무손상 조직은 고정된 조직 샘플이다. 일부 실시양태에서, 무손상 조직은 다중 세포 유형 (예를 들어, 소교세포, 성상세포, 핍지교세포, 흥분 뉴런 및/또는 억제 뉴런)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조직은 심장 조직, 림프절 조직, 간 조직, 근육 조직, 골 조직, 눈 조직 또는 귀 조직이다.

[0083] 본원에 기재된 방법에서 유전자 발현이 프로파일링되는 관심 핵산(들)은 세포의 게놈 DNA로부터 발현된 전사체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산은 DNA이다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산은 RNA이다. 특정 실시양태에서, 관심 핵산은 mRNA이다. 본원에 기재된 방법은 한 번에 하나의 관심 핵산에 대해 또는 동시에 다수의 관심 핵산에 대해 세포에서 유전자 발현을 프로파일링하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 또는 다중 세포에서의 유전자 발현은 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 3000개 초과, 5000개 초과, 10,000개 초과, 15,000개 초과, 20,000개 초과, 25,000개 초과, 또는 30,000개 초과의 관심 핵산에 대해 동시에 맵핑된다. 특정 실시양태에서, 세포 또는 다중 세포에서의 유전자 발현은 동시에 최대 1백만개 관심 핵산에 대해 프로파일링된다.

[0084] 본원에 개시된 방법은 또한 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 프로브로서 제공되는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 사용을 고려한다. 본원에 기재된 방법에 사용되는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 각각 뉴클레오티드의 특이적 서열로 구성된 제1 바코드 서열 및 제2 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 제2 바코드 서열은 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 사이에 추가의 상보성 부위를 제공하여, 이전의 올리고뉴클레오티드 프로브 설계에 비해 이점을 제공한다. 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 본원에 기재된 방법에서 관심 핵산의 검출의 특이성을 증가시킬 수 있다 (즉, 제2 바코드 서열을 포함하지 않았던 제1 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 방법을 수행하였던 경우와 비교 시). 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 또한 본원에 기재된 방법에서 관심 핵산의 비-특이적 증폭을 감소시키는 역할을 할 수 있다.

[0085] 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드는 관심 핵산을 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함할 수 있다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드의 사용은, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2019/199579 및 문헌 [Wang et al., Science 2018, 361, 380] (둘 다 그 전문이 본원에 참조로서 포함됨)에 추가로 기재되어 있다.

[0086] 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분 및 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단과 3' 말단 사이에서 분할된다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약

37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0087] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[제1 바코드 서열]-[제2 바코드 서열]-3'

[0088] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 임의적인 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 2개의 부분들 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0089] 본원에 개시된 방법에 사용되는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)는 뉴클레오티드의 특이적 서열로 구성된 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 10개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0090] 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 관심 핵산에 상보적인 부분 및 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산의 상이한 부분에 상보적이며, 그에 결합한다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0091] 5'-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'

[0092] 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오티드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 2개의 부분들 사이의 직접 연결을 나타낸다.

[0093] 본원에 개시된 방법은 또한 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 검출가능한 표지 (즉, 예를 들어 영상화를 통해 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 위치를 가시화하는 데 사용될 수 있는 임의의 표지)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 검출가능한 표지는 형광 (예를 들어, 형광단)이다. 본원에 기재된 바와 같이, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 관심 핵산을 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열이다. 일부 실시양태에서, 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계는 관심 핵산을 확인하기 위해 수행된다. 관심 핵산을 확인하는 이러한 방법은 동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소를 갖는 서열분석 (SEDAL 서열분석)으로 공지되어 있고, 문헌 [Wang, X. et al., Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. Science 2018, 36, eaat5691], 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2019/199579 (이들 각각은 본원에 참조로서 포함됨)]에 추가로 기재되어 있다.

[0094] 본원에 기재된 방법에 사용되는 (예를 들어, SEDAL 서열분석에 사용되는) 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 영상화 기술을 사용하여 판독될 수 있다. 예를 들어, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브가 형광단을 포함하는 실시양태에서, 형광단은 관심 핵산을 확인하기 위해 영상화를 사용하여 판독될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하며, 이는 특정 관심 핵산을 검출하기 위해 사용된다. 형광단을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브의 위치를 영상화함으로써, 샘플 내의 해당 특정 관심 핵산의 위치를 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 영상화하는 단계는 형광 영상화를 포함한다. 특정 실시양태에서, 영상화하는 단계는 공초점 현미경검사를 포함한다. 특정 실시양태에서, 영상화하는 단계는 에피형광 현미경검사를 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치는 동일한 영상화 라운드에서 결정된다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치는 별개의 영상화 라운드에서 결정된다. 특정 실시양태에서, 2 라운드의 영상화가 수행된다. 특정 실시양태에서, 3 라운드의 영상화가 수행된다. 특정 실시양태에서, 4 라운드의 영상화가 수행된다. 특정 실시양태에서, 5 라운드 이상의 영상화가 수행된다.

[0095] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합한다. 일부 실시양태에서, 검출제는 단백질, 펩티드, 핵산 또는 소분자이다.

특정 실시양태에서, 검출제는 항체이다. 특정 실시양태에서, 검출제는 항체 단편, 항체 변이체 또는 나노바디이다. 특정 실시양태에서, 검출제는 압타머이다. 특정 실시양태에서, 검출제는 수용체 또는 그의 단편이다. 관심 단백질에 결합하는 임의의 항체의 사용이 본 개시내용에 의해 고려된다. 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있는 항체는 또한 항체 단편, 뿐만 아니라 전장 항체 또는 항체 단편의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 검출제는 각각 고유한 검출가능한 표지 (예를 들어, 형광단)를 포함하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 방법은 1종 이상의 항체를 2차 검출제와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 관심 단백질에 결합하는 각 항체는 상이한 2차 검출제와 접촉될 수 있다. 일부 실시양태에서, 2차 검출제는 2차 항체 (즉, 관심 단백질에 결합된 항체 중 하나에 결합하는 항체)이다. 특정 실시양태에서, 2차 항체는 검출가능한 표지를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차 항체의 검출가능한 표지는 형광단이다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 검출제는 각각 관심 단백질에 결합하는 항체이고, 관심 단백질에 결합하는 각 항체는 고유한 올리고뉴클레오티드 서열에 접합된다. 이어서, 1종 이상의 항체를 1종 이상의 항체에 접합된 올리고뉴클레오티드 서열에 상보적인 검출가능한 표지 (예를 들어, 형광단)에 접합된 올리고뉴클레오티드와 접촉시켜, 1종 이상의 항체의 위치가 가시화되도록 할 수 있다 (예를 들어, 공초점 현미경검사 또는 형광을 검출하기 위한 임의의 다른 수단에 의함).

[0096] 일부 실시양태에서, 관심 단백질에 결합하는 검출제는 소분자 염료이다. 특정 실시양태에서, 소분자 염료는 X-34이다. 예를 들어, X-34 (베타-시트 구조에 대한 고도로 형광인 마커로서 통상적으로 사용되는 형광 아밀로이드-특이적 염료)가 세포 내의 Aβ 플라크의 존재를 검출하여 알츠하이머병과 연관된 병리학적 변화를 결정하는 데 사용될 수 있다. Aβ 플라크를 검출하는 데 있어서의 X-34의 용도는 관련 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [Styren, S. D. et al. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. J. Histochem. Cytochem. 2000, 48(9), 1223-1232] (본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 중합체 매트릭스에 포매된 각각의 1종 이상의 검출제 각각을 2차 검출제와 접촉시키는 단계는 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시키는 단계 후에 수행된다. 일부 실시양태에서, 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계는 포매 단계 전에 수행된다.

[0097] 본원에 제공된 방법은 세포하 해상도에서 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 임의의 방법은 200 nm, 150 nm, 100 nm, 50 nm, 40 nm, 30 nm, 20 nm, 또는 10 nm의 세포하 해상도에서 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 방법은 200 nm의 세포하 해상도에서 수행된다.

[0098] 다양한 중합체 매트릭스의 사용이 본 개시내용에 의해 고려되고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 검출제가 포매될 수 있는 임의의 중합체 매트릭스가 본원에 기재된 방법에 사용하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 중합체 매트릭스는 히드로겔 (즉, 친수성인 가교된 중합체의 네트워크)이다. 일부 실시양태에서, 히드로겔은 폴리비닐 알콜 히드로겔, 폴리에틸렌 글리콜 히드로겔, 소듐 폴리아크릴레이트 히드로겔, 아크릴레이트 중합체 히드로겔 또는 폴리아크릴아미드 히드로겔이다. 특정 실시양태에서, 히드로겔은 폴리아크릴아미드 히드로겔이다. 이러한 히드로겔은, 예를 들어 아크릴아미드 및 비스-아크릴아미드를 포함하는 완충제 중에서 샘플을 인큐베이션하고, 완충제를 제거하고, 중합 혼합물 (예를 들어, 과황산암모늄 및 테트라메틸에틸렌디아민을 포함함) 중에서 샘플을 인큐베이션함으로써 제조될 수 있다.

[0099] 일부 실시양태에서, 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계는 반응성 화학적 기로 변형된 뉴클레오티드 (예를 들어, 5-(3-아미노알릴)-dUTP)를 제공하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 화학적 기로 변형된 뉴클레오티드는 증폭 반응에 사용된 뉴클레오티드의 약 5%, 약 6%, 약 7%, 약 8%, 약 9%, 또는 약 10%를 구성한다. 예를 들어, 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계는 아민-변형된 뉴클레오티드를 제공하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 증폭 과정 동안, 아민-변형된 뉴클레오티드는 이들이 생산될 때 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 내로 혼입된다. 생성된 앰플리콘은 1급 아민으로 관능화되고, 이는 또 다른 상용성 화학적 모이어티 (예를 들어, N-히드록시숙신이미드)와 추가로 반응하여 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계를 용이하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계는 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘의 아민-변형된 뉴클레오티드를 아크릴산 N-히드록시숙신이미드 에스테르와 반응시키고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스를 공중합시키는 것을 포함한다.

[0100] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 세포에서 유전자 발현을 맵핑하는 방법을 제공한다:

[0101] a) 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

[0102] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

[0103] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0104] b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0105] c) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0106] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0107] e) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0108] f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 영상화하여 세포 내의 관심 핵산의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계.

[0109] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 방법을 제공한다:

[0110] a) 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

[0111] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고;

[0112] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분 및 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분을 포함하는 것인 단계;

[0113] b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0114] c) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0115] d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

[0116] e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0117] f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0118] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포 내의 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계.

[0119] 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법

[0120] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 유전자 및 단백질 발현을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 것으로 생각되거나 또는 가질 위험이 있는 대상체, 또는 건강하거나 또는 건강한 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포 또는 다중 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서 다양한 관심 핵산 및 단백질의 발현을 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포 (예를 들어, 건강한 개체로부터의 세포, 또는 건강한 개체의 집단으로부터의 다중 세포)에서의 동일한 관심 핵산 및 단백질의 발현과 비교할 수 있다. 비-이환 세포에

서의 발현에 비해 관심 핵산 및/또는 관심 단백질 (또는 다중 관심 핵산 및/또는 관심 단백질, 예를 들어 특정 질환 서명)의 발현에서의 임의의 변경은 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낼 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 발현과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현이 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포에서의 발현이 비-이환 세포에 대한 이러한 기준 데이터와 비교될 수 있다.

[0121] 일부 실시양태에서, 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법은 하기를 포함하며:

[0122] a) 대상체로부터 채취한 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

[0123] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

[0124] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0125] b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0126] c) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0127] d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

[0128] e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0129] f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0130] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포 내의 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계;

[0131] 여기서 1개 이상의 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산 및/또는 관심 단백질의 발현에서의 변경은 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0132] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현은 대조군 실험으로서 본원에 개시된 방법을 사용하여 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 이환 세포에서의 발현과 비교되는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현 데이터는 방법이 이전에 1개 이상의 비-이환 세포에 대해 수행된 때로부터의 참조 데이터를 포함한다.

[0133] 임의의 질환 또는 장애의 진단이 본원에 기재된 방법에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환 또는 심혈관 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 신경변성 장애이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 알츠하이머병이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암이다.

[0134] 일부 실시양태에서, 세포는 조직에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조직은 대상체로부터의 조직 샘플이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스)이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 가축이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 고정된 조직 샘플을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조직 샘플은 생검 (예를 들어, 골, 골수, 유방, 위장관, 폐, 간, 췌장, 전립선, 뇌, 신경, 신장, 자궁내막, 자궁경부, 림프절, 근육 또는 피부 생검)이다. 특정 실시양태에서, 생검은 종양 생검이다. 특정 실시양태에서, 조직은 뇌 조직이다. 특정 실시양태에서, 조직은 중추 신경계로부터의 것이다.

[0135] 본원에 개시된 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법에서 임의의 세포 유형의 사용이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 암 세포이다. 본 개시내용은 또한 다중 세포에 대해 본원에 기재된 방법을 동시에 수행하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, 방법은 동일한 세포 유형의 다중 세포 상에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 상이한 세포 유형의 다중 세포 상에서 수행된다. 본원에 개시된 방법을 사용하여 유전자 및 단백질 발현이 맵핑될 수 있는 세포 유형은 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 핍지교세포, 근육 세포, 심근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포 및 간 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 세포는 소교세포, 성상세포, 핍지교세포, 흥분성 뉴런 및/또는 억제 뉴런이다.

[0136] 다양한 관심 핵산 및 관심 단백질이 본원에 개시된 방법을 사용하여 프로파일링될 수 있다. 예를 들어, 질환 또는 장애 (예를 들어, 알츠하이머병)와 연관된 것으로 공지되거나 또는 생각되는 임의의 관심 핵산 또는 단백질의 발현이 본원에 개시된 방법을 사용하여 맵핑될 수 있고, 질환 또는 장애의 진단에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산은 Vsnl1, Snap25, Dnm1, Slc6a1, Aldoc, Bsg, Ctss, Plp1, Cst7, Ctsb, Apoe, Trem2, C1qa, P2ry12, Gfap, Vim, Aqp4, Clu, Plp1, Mbp, C4b, Ccnb2, Gpm6a, Ddit3, Dapk1, Myo5a, Tspan7, 및 Rhoc로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 관심 단백질은 아밀로이드 베타 (Aβ) 펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, Aβ 펩티드는 Aβ 플라크의 형태로 존재한다. 일부 실시양태에서, 관심 단백질은 타우 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 타우 단백질은 봉입체 (p-타우)의 형태로 세포에 존재한다. Aβ 플라크 및/또는 p-타우의 존재는, 예를 들어 대상체에서 신경변성 질환 (예를 들어, 알츠하이머병)을 진단하는 데 사용될 수 있다.

[0137] 1종 이상의 관심 단백질을 검출하기 위한 다양한 검출제의 사용이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 관심 단백질이 Aβ 펩티드를 포함하는 경우, Aβ 펩티드는 소분자 검출제 (예를 들어, 소분자 형광 염료)를 사용하여 검출된다. 특정 실시양태에서, 소분자 검출제는, 예를 들어 문헌 [Styren, S. D. et al. X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. J. Histochem. Cytochem. 2000, 48(9), 1223-1232] (본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 X-34이다. 일부 실시양태에서, 관심 단백질이 타우 단백질 또는 p-타우를 포함하는 경우, 타우 단백질은 p-타우 1차 항체를 사용하여 검출된다. 특정 실시양태에서, 방법은 p-타우 1차 항체를 2차 항체로 검출하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차 항체는 검출가능한 표지 (예를 들어, 형광단)에 접합된다.

[0138] 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하기 위한 본원에 개시된 방법을 사용하여, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 발현에 비해 검사될 관심 핵산 및/또는 관심 단백질의 발현에서의 변경은 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산 및/또는 관심 단백질의 발현에서의 변경은 플라크에 매우 근접한 세포 유형을 확인하는 데 사용된다. 예를 들어, 특정 세포 유형이 플라크에 근접하여 확인되는 경우에 대상체가 알츠하이머을 갖거나 또는 알츠하이머병을 갖는 것으로 의심될 수 있다. 일부 실시양태에서, 플라크는 Aβ 플라크이다. 특정 실시양태에서, 플라크에 매우 근접한 질환-연관 소교세포 세포 유형 (예를 들어, C1qa, Trem2, Cst7, Ctsb 및/또는 Apoe의 높은 발현을 포함함)의 확인은 대상체가 알츠하이머병을 갖거나 또는 알츠하이머병을 가질 위험이 있다는 것을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 플라크에 매우 근접한 질환-연관 성상세포 세포 유형 (예를 들어, Gfap, Vim, 및/또는 Apoe의 높은 발현을 포함함)의 확인은 대상체가 알츠하이머병을 갖거나 또는 가질 위험이 있음을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 플라크에 매우 근접한 핍지교세포 전구체 세포 유형 (예를 들어, Cldn11, Klk6, Serpina3n 및/또는 C4b의 높은 발현을 포함함)의 확인은 대상체가 알츠하이머병을 갖거나 또는 가질 위험이 있음을 나타낸다. 플라크에 매우 근접한 세포는 플라크의 약 10 μm 이내, 약 20 μm 이내, 약 30 μm 이내, 약 40 μm 이내, 또는 약 50 μm 이내인 세포를 포함할 수 있다.

[0139] 본원에 개시된 방법은 또한 관심 번역후 변형 (예를 들어, 인산화, 글리코실화, 유비퀴틴화, 니트로실화, 메틸화, 아세틸화, 지질화 등)으로 변형된 단백질을 맵핑하는 데 사용될 수 있다. 특정 세포 유형에 대한 이러한 변형된-단백질의 위치를 연구하는 것은, 단백질 변형, 예컨대 인산화가 암 발생 및 진행 동안 중요한 역할을 하기 때문에, 예를 들어 암 연구, 진단 및 치료를 위한 유용한 도구를 제공할 수 있다.

[0140] 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법

[0141] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 관심 핵산 또는 단백질의, 또는 다중 관심 핵산 및/또는 단백질의 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 방법은 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하에 세포에서 수행될 수 있다. 이어서,

세포 (예를 들어, 정상 세포, 또는 이환 세포)에서의 다양한 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현을 1종 이상의 후보 작용제에 노출되지 않은 세포에서의 동일한 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현과 비교할 수 있다. 후보 작용제(들)에 노출되지 않은 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산(들) 및/또는 단백질(들)의 발현에서의 임의의 변경은 관심 핵산(들) 및/또는 단백질의 발현이 후보 작용제(들)에 의해 조정된다는 것을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 질환의 치료와 연관된 것으로 공지된 특정한 서명 (예를 들어, 핵산 및 단백질 발현 서명)을 이용하여, 목적하는 방식으로 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는 후보 작용제를 확인할 수 있다. 본원에 기재된 방법은 또한, 예를 들어 1개 이상의 세포를 후보 작용제 또는 공지된 약물로 처리할 때 특이적 핵산 및 단백질 발현 서명을 조사함으로써 특정 부작용을 갖는 약물을 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0142] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공하며:

[0143] a) 후보 작용제로 처리되고 있거나 또는 처리된 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

[0144] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

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

[0146] b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

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

[0148] d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

[0149] e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0150] f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계; 및

[0151] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포에서 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하고, 임의로 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하는 단계;

[0152] 여기서 후보 작용제의 부재 하의 발현에 비해 후보 작용제의 존재 하의 관심 핵산 및/또는 관심 단백질의 발현에서의 변경은 후보 작용제가 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정한다는 것을 나타낸다.

[0153] 일부 실시양태에서, 후보 작용제는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물이다. 특정 실시양태에서, 소분자는 항암 치료제이다. 일부 실시양태에서, 소분자는 공지된 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 소분자는 FDA-승인된 약물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 단편 또는 항체 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 수용체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 시토카인이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)이다. 임의의 후보 작용제가 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 특히, 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는 것으로 생각되는 임의의 후보 작용제가 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제에 의한 유전자 및/또는 단백질 발현의 조정은 질환 또는 장애의 증상의 감소, 경감 또는 제거, 또는 질환 또는 장애의 발생 또는 진행의 예방과 연관된다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제에 의해 조정되는 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환 또는 심혈관 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는

장애는 알츠하이머병이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암이다.

[0154] 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법

[0155] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 유전자 발현 및 단백질 발현을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 것으로 생각되거나 또는 가질 위험이 있는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현을 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 동일한 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현과 비교할 수 있다. 이어서, 질환 또는 장애에 대한 치료는 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산 및/또는 단백질의 발현에서의 임의의 변경이 관찰되는 경우에 대상체에게 투여될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 발현과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현이 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포에서의 발현이 비-이환 세포에 대한 이러한 기준 데이터와 비교될 수 있다.

[0156] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다:

[0157] a) 대상체로부터 채취한 세포를 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 쌍은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하고, 여기서

[0158] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

[0159] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적인 것인 단계;

[0160] b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단 및 3' 말단을 함께 라이게이션하여 원형 올리고뉴클레오티드를 생산하는 단계;

[0161] c) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오티드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0162] d) 세포를 1종 이상의 검출제와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합하는 것인 단계;

[0163] e) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 1종 이상의 검출제를 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;

[0164] f) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시키는 단계;

[0165] g) 중합체 매트릭스에 포매된 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스에 포매된 1종 이상의 검출제를 영상화하여 세포에서 관심 핵산 및 관심 단백질의 위치를 결정하는 단계; 및

[0166] h) 1개 이상의 비-이환 세포에서의 발현에 비해 관심 핵산 및/또는 관심 단백질의 발현에서의 변경이 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계.

[0167] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현은 대조군 실험으로서 본원에 개시된 방법을 사용하여 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 이환 세포에서의 발현과 비교되는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 유전자 및 단백질 발현 데이터는 방법이 이전에 비-이환 세포에 대해 수행된 시점으로부터의 참조 데이터를 포함한다.

[0168] 질환 또는 장애에 대한 임의의 적합한 치료가 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 치료제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 수술을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 영상화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 추가의 진단 방법을 수행하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료는 방사선 요법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물이다. 특정 실시양태에서, 소분자는 항암 치료제이다. 일부 실시양태에서, 소분자는 공지된 약물이다. 일부 실시양태에서, 소분자는 FDA-승인된 약물이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 단편 또는 항체 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 수용체, 또는 그의 단편 또는 변

이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 시토카인이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 (ASO)이다.

[0169] 임의의 질환 또는 장애의 치료는 본원에 기재된 방법에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환 또는 심혈관 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 신경변성 질환이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 알츠하이머병이다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 장애는 암이다.

[0170] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 생물학적 샘플을 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 조직 샘플을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조직 샘플은 생검 (예를 들어, 골, 골수, 유방, 위장관, 폐, 간, 췌장, 전립선, 뇌, 신경, 신장, 자궁내막, 자궁경부, 림프절, 근육 또는 피부 생검)이다. 특정 실시양태에서, 생검은 종양 생검이다. 특정 실시양태에서, 생검은 고형 종양 생검이다. 일부 실시양태에서, 조직 샘플은 뇌 조직 샘플이다. 특정 실시양태에서, 조직 샘플은 중추 신경계 조직 샘플이다.

[0171] 올리고뉴클레오티드 프로브

[0172] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 방법 및 시스템에 사용하기 위한 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공한다.

[0173] 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "패드락" 프로브로도 언급됨) 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "프라이머" 프로브로도 언급됨)를 포함하는 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 제공하고, 여기서:

[0174] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

[0175] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고;

[0176] 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적이다.

[0177] 본원에 기재된 모든 올리고뉴클레오티드 프로브는 언급된 성분 각각의 사이에 다양한 뉴클레오티드 길이의 스페이서 또는 링커를 임의로 가질 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오티드 프로브의 성분은 서로 직접 연결될 수 있다. 본원에 기재된 모든 올리고뉴클레오티드 프로브는 표준 뉴클레오티드를 포함할 수 있거나, 또는 표준 뉴클레오티드 중 일부는 관련 기술분야에 공지된 임의의 변형된 뉴클레오티드를 치환할 수 있다.

[0178] 본원에 기재된 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 각각 뉴클레오티드의 특이적 서열로 구성된 제1 바코드 서열 및 제2 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열은 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 10개의 뉴클레오티드 길이이다. 제2 바코드 서열은 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브 사이에 추가의 상보성 부위를 제공하여, 이전의 올리고뉴클레오티드 프로브 설계에 비해 이점을 제공한다. 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 (예를 들어, 본원에 개시된 임의의 방법에서 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하는 경우) 관심 핵산의 검출의 특이성을 증가시킬 수 있다. 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 또한 관심 핵산의 비-특이적 증폭을 감소시키는 역할을 할 수 있다.

[0179] 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드는 관심 핵산을 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을

포함할 수 있다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오티드 프로브 상의 바코드의 사용은, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2019/199579 및 문헌 [Wang et al., Science 2018, 361, 380] (둘 다 그 전문이 본원에 참조로서 포함됨)에 추가로 기재되어 있다.

[0180] 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분 및 관심 핵산에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 5' 말단과 3' 말단 사이에서 분할된다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산에 상보적인 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0181] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[제1 바코드 서열]-[제2 바코드 서열]-3'

[0182] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 임의적인 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 2개의 부분들 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0183] 본원에 개시된 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브 (본원에서 "프라이머" 프로브로도 언급됨)의 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 뉴클레오티드의 특이적 서열로 구성된 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 약 5 내지 약 15, 약 6 내지 약 14, 약 7 내지 약 13, 약 8 내지 약 12, 또는 약 9 내지 약 11개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 10개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0184] 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 또한 관심 핵산에 상보적인 부분 및 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산의 상이한 부분에 상보적이며, 그에 결합한다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산에 상보적인 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 또는 약 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30, 약 31, 약 32, 약 33, 약 34, 약 35, 약 36, 약 37, 약 38, 약 39 또는 약 40개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 하기 구조를 포함한다:

[0185] 5'-[관심 핵산에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3'

[0186] 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 임의적인 뉴클레오티드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 2개의 부분들 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0187] 일부 실시양태에서, 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브는 제3 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 검출가능한 표지를 포함한다. 특정 실시양태에서, 검출가능한 표지는 형광단이다. 본원에 기재된 바와 같이, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적이다. 일부 실시양태에서, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열은 관심 핵산을 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열이다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 (예를 들어, SEDAL 서열분석을 통해) 관심 핵산을 확인하는 데 사용된다.

[0188] 키트

[0189] 키트가 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 한 측면에서, 제공된 키트는 본원에 기재된 바와 같은 1개 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 용기 (예를 들어, 바이알, 앰플, 병, 및/또는 분배기 패키지, 또는 다른 적합한 용기)를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 복수의 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 1종 이상의 검출제 (예를 들어, 퀜티드, 단백질, 예컨대 항체, 핵산, 예컨대 압타머, 또는 소분자, 예컨대 형광 염료)를 추가로 포함하며, 여기서 각각의 검출제는 관심 단백질에 결합한다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 검출제는 항-p-타우 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 소분자 검출제 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 X-34)를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 제3 올리고뉴클레오티드 프로브

를 추가로 포함한다. 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제1 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제3 올리고뉴클레오티드 프로브는 검출가능한 표지 (예를 들어, 형광단)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 올리고뉴클레오티드 프로브의 2개 이상의 세트로 구성된 라이브러리를 포함하며, 여기서 올리고뉴클레오티드 프로브의 각각의 세트는 특정 관심 핵산을 확인하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 키트는 다수의 관심 단백질을 검출하기 위한 검출제의 라이브러리를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 방법을 수행하기 위한 다른 시약 (예를 들어, 세포, 리가제, 폴리머라제, 아민-변형된 뉴클레오티드, 1차 항체, 2차 항체, 완충제, 및/또는 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 시약)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 프로파일링하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 질환 (예를 들어, 알츠하이머병)을 진단하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 유전자 및/또는 단백질 발현을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 데 유용하다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 키트는 키트의 사용에 대한 지침서를 추가로 포함한다.

[0190] 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하기 위한 방법, 장치, 및 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체

[0191] 다양한 측면에서, 본 개시내용은 하나 이상의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 방법 (즉, 다수의 샘플들 사이의 서로에 대한, 예를 들어 이환 조직과 비교한 건강한 조직에 대한 특정 세포 유형의 공간 분포에서의 변동을 관찰하는 방법)을 제공한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 영상은 본원에 개시된 방법 중 임의의 것을 사용하여 수득된다. 도 15는 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 것과 관련된 방법의 한 실시양태의 흐름도이다. 공정 흐름(1500)은 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때 공정 흐름(1500)을 수행하는 복수의 명령으로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체가 존재할 수 있다. 공정 흐름(1500)은 단계(1502), 단계(1504), 단계(1506), 단계(1508), 및 단계(1510)를 포함한다. 단계(1502)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 적어도 하나의 영상 내의 복수의 세포 각각에 대해, 적어도 하나의 영상 내의 세포의 공간 위치를 수신한다. 단계(1504)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 적어도 하나의 영상 내의 복수의 단백질 각각에 대해, 영상 내의 단백질의 공간 위치를 수신한다. 단계(1506)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는, 복수의 단백질 중 제1 단백질에 대해, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하고, 여기서 거리는 복수의 세포의 공간 위치의 적어도 일부 및 복수의 단백질의 공간 위치의 적어도 일부에 기초하여 결정된다. 단계(1508)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 제1 세포 유형의 세포 수에 기초하여, 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인한다. 단계(1510)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동의 표시를 출력한다.

[0192] 도 16은 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 것에 관한 방법 (즉, 다수의 샘플들 사이의 서로에 대한, 예를 들어 이환 조직과 비교한 건강한 조직에 대한 특정 세포 유형의 공간 분포에서의 변동을 관찰하는 방법)의 한 실시양태의 흐름도이다. 공정 흐름(1600)은 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때 공정 흐름(1600)을 수행하는 복수의 명령으로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체가 존재할 수 있다. 공정 흐름(1600)은 단계(1602), 단계(1604), 단계(1606), 및 단계(1608)를 포함한다. 단계(1602)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는, 복수의 세포 중 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 세포에 대해, 제1 세포 유형과 연관된 세포의 제1 백분율을 결정한다. 단계(1604)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는, 적어도 하나의 영상에서 복수의 세포 중 제1 세포 유형과 관련된 세포의 제2 백분율을 결정한다. 단계(1606)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 제1 백분율을 제2 백분율과 비교하여 비교 결과를 얻는다. 단계(1608)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 비교 결과를 사용하여 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인한다.

[0193] 도 17은 카메라를 사용하여 적어도 하나의 영상을 캡처하는 것과 관련된 방법의 한 실시예의 흐름도이다. 공정 흐름(1700)은 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때 공정 흐름(1700)을 수행하는 복수의 명령으로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체가 존재할 수 있다. 공정 흐름(1700)은 단계(1702) 및 단계(1704)를 포함한다. 단계(1702)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 복수의 영상 중 제1 영상을 캡처하고, 제1 영상은 복수의 세포의 공간 위치를 결정하는 데 사용된다. 단계(1704)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 복수의 영상 중 제2

영상을 캡처하고, 제2 영상은 복수의 단백질의 공간 위치를 결정하는 데 사용된다.

[0194] 도 18은 복수의 영상으로부터 공간 위치를 공간적으로 정렬하는 한 실시양태의 흐름도이다. 공정 흐름(1800)은 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때 공정 흐름(1800)을 수행하는 복수의 명령으로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체가 존재할 수 있다. 공정 흐름(1800)은 단계(1802) 및 단계(1804)를 포함한다. 단계(1802)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 제1 영상으로부터의 복수의 세포의 공간 위치를 제2 영상으로부터의 복수의 단백질의 공간 위치와 공간적으로 정렬한다. 단계(1804)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 공간적으로 정렬된 공간 위치에 기초하여, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정한다.

[0195] 도 19는 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 것과 관련된 방법의 한 실시양태의 흐름도이다. 공정 흐름(1900)은 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때 공정 흐름(1900)을 수행하는 복수의 명령으로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체가 존재할 수 있다. 공정 흐름(1900)은 단계(1902) 및 단계(1904)를 포함한다. 단계(1902)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 제1 세포 유형의 세포로부터 복수의 단백질 중 최근접 단백질까지의 최소 거리를 결정한다. 단계(1904)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 최소 거리를 역치 거리와 비교한다.

[0196] 도 20은 세포를 세포 유형과 연관시키는 것과 관련된 방법의 한 실시양태의 흐름도이다. 공정 흐름(2000)은 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서에 의해 실행될 때 공정 흐름(2000)을 수행하는 복수의 명령으로 코딩된 적어도 하나의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체가 존재할 수 있다. 공정 흐름(2000)은 단계(2002) 및 단계(2004)를 포함한다. 단계(2002)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 세포의 유전자 정보 (예를 들어, 유전자 및/또는 단백질 발현에 관한 정보)를 수신한다. 단계(2004)에서, 적어도 하나의 컴퓨터 프로세서는 세포의 유전자 정보에 기초하여, 세포를 복수의 세포 유형으로부터의 세포 유형과 연관시키고, 여기서 복수의 세포 유형은 제1 세포 유형을 포함한다.

[0197] 본원에 제공된 개시내용의 임의의 실시양태와 관련하여 사용될 수 있는 컴퓨터 시스템(2100)의 예시적인 구현을 도 21에 나타낸다. 컴퓨터 시스템(2100)은 하나 이상의 컴퓨터 프로세서(2110) 및 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체, 예를 들어 메모리(2120) 및 하나 이상의 비휘발성 저장 매체(2130)를 포함하는 하나 이상의 제조 물품을 포함할 수 있다. 컴퓨터 프로세서(2110)는 임의의 적합한 방식으로 메모리(2120) 및 비휘발성 저장 장치(2130)에 데이터를 기록하고, 그로부터 데이터를 판독하는 것을 제어할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 기능성 또는 방법, 예컨대 공정 흐름(1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000)과 연관된 방법, 또는 예를 들어, 적어도 하나의 영상에서 세포 유형의 공간 변동을 확인하는 것 (즉, 다수의 샘플들 사이의 서로에 대한, 예를 들어 이환 조직과 비교한 건강한 조직에 대한 특정 세포 유형의 공간 분포에서의 변동을 관찰하는 것), 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인하는 것, 카메라를 사용하여 적어도 하나의 영상을 캡처하는 것, 복수의 영상으로부터 공간 위치를 공간적으로 정렬하는 것, 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의 수를 결정하는 것, 또는 세포를 세포 유형과 연관시키는 것 등과 같은 방법을 수행하기 위해, 프로세서(2110)는 하나 이상의 비-일시적 컴퓨터 판독가능 저장 매체, 예를 들어 프로세서(2110)에 의한 실행을 위한 프로세서-실행가능 명령을 저장하는 비-일시적 컴퓨터-실행가능 저장 매체로서 작용하는 메모리(2120)에 저장된 하나 이상의 컴퓨터 프로세서-실행가능 명령을 실행할 수 있다.

[0198] 세포에서의 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하기 위한 시스템

[0199] 본 개시내용은 또한 세포에서 유전자 및 단백질 발현을 맵핑하기 위한 시스템을 제공한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 a) 세포; 및 b) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브 및 제2 올리고뉴클레오티드 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프로브의 1개 이상의 쌍을 포함하고, 여기서:

[0200] i) 제1 올리고뉴클레오티드 프로브는 제2 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 바코드 서열, 및 제2 바코드 서열을 포함하고;

[0201] ii) 제2 올리고뉴클레오티드 프로브는 관심 핵산에 상보적인 부분, 제1 올리고뉴클레오티드 프로브에 상보적인 부분, 및 바코드 서열을 포함하고, 여기서 제2 올리고뉴클레오티드 프로브의 바코드 서열은 제1 올리고뉴클레오티드 프로브의 제2 바코드 서열에 상보적이다.

[0202] 일부 실시양태에서, 시스템은 현미경 (예를 들어, 공초점 현미경)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시

스템은 컴퓨터를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 현미경검사 및/또는 영상 분석 (예를 들어, 본원에 기재된 영상 분석 방법 중 임의의 것을 사용함)을 수행하기 위한 소프트웨어를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 리가제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 폴리머라제를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 아민-변형된 뉴클레오티드를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 시약을 추가로 포함한다. 본 개시내용의 시스템 내의 세포는 본원에 개시된 세포 유형 중 임의의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 시스템은 다중 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 상이한 세포 유형의 것이다. 특정 실시양태에서, 세포는 조직 내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 조직은 대상체에 의해 또는 대상체로부터 제공된 조직 샘플이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0203] 실시예

[0204] 실시예 1: 스타맵 프로 방법의 개발

[0205] 아밀로이드-β 플라크 및 신경원섬유 타우 엉킴은 알츠하이머병 (AD)의 신경병리학적 특징이지만, AD 병리생리 상태의 기저를 이루는 분자 사건 및 세포 메카니즘은 공간 및 시간 차원에서 잘 이해되지 않은 채로 남아있다. 스타맵 프로 방법을 개발하고, AD 마우스 모델의 뇌 조직에서 단일-세포 전사 상태 및 단백질 질환 마커 (아밀로이드-β 응집체 및 타우 병리상태)를 동시에 검출하기 위해 적용하였다. 세포하 해상도 (200 nm)에서의 가상 시간 궤적 구축 및 차등 유전자 발현의 공동 분석으로, AD 병리상태에서의 세포 유형 및 상태의 고해상도 공간 지도를 구축하였다. 질환-연관 소교세포 (DAM) 세포는 질환 진행의 초기 개시로부터 아밀로이드-β 플라크와 직접 접촉하는 내부 쉘을 형성하는 것으로 밝혀진 반면에, 질환-연관 성상세포 (DAA) 및 핍지교세포 전구체 세포 (OPC)는 후기 질환 단계에서 아밀로이드-β 플라크를 둘러싸는 외부 쉘에 풍부하였다. 과인산화 타우는 주로 흥분성 뉴런 및 축삭 과정에서 나타났다. 게다가, 질환-연관 유전자 경로는 다양한 세포 유형에 걸쳐 정확하고 검증되었으며, 이는 신경교 세포에서의 염증성 및 신경교증 과정 및 성인 해마 신경발생의 감소를 시사한다.

[0206] 이전의 스타맵 방법은 조직학적 염색 (면역- 또는 소분자 염색)과 비상용성이었고, 1024개의 유전자를 검출하는 데 제한되었다. 스타맵 프로에서 이같은 한계를 극복하기 위해, 먼저 실험 프로토콜을 간소화하여 항체 (AT8 항체, 인산화 타우 검출) 및 염료 염색 (X-34, Aβ 플라크 검출)을 라이브러리 제조 및 계내 서열분석 단계에 혼입시켰다 (도 1b, 8a, 및 8b). 뇌 조직의 세포내 mRNA를 한 쌍의 DNA 프로브 (프라이머 및 패드락, 도 1c)에 의해 검출하고, cDNA 앰플리콘으로서 효소적으로 증폭시켰다. 단백질을 1차 항체로 표지한 다음, cDNA 앰플리콘 및 1차 항체 둘 다를 히드로겔 매트릭스에 포매시킨다. 각각의 cDNA 앰플리콘은 계내 SEDAL (동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소를 갖는 서열분석) 서열분석을 통해 판독되고 (문헌 [Wang et al., 2018]), 이어서 단백질 신호를 시각화하기 위해 형광 단백질 염색 (2차 항체 염색 및 소분자 염료 X-34 염색)되는 유전자-고유한 식별자 (바코드)를 함유한다.

[0207] 이어서, DNA 프로브 내의 유전자-코딩 바코드를 5개의 뉴클레오티드 (nt)로부터 20,000개 초과의 유전자를 코딩하기에 충분한 10개의 nt (10^6 코딩 용량)로 확장시켰다. 게다가, 추가의 5-nt 바코드를 라이게이션 부위 근처에 전략적으로 설계하였고, 이는 미스매칭된 프라이머-패드락 쌍의 비-특이적 증폭을 감소시킴으로써 유전자 검출의 특이성을 증가시킨다 (도 8c). 이어서, 바코드 설계는 라이게이션 부위 근처에 미스매치를 도입함으로써 검증되었다. 결과는 검출불가능한 신호를 나타내었으며, 이는 스타맵 프로 방법이 높은 특이성을 가짐을 시사한다 (도 8d 및 8e).

[0208] 아밀로이드 침착 및 과인산화 타우를 비롯한 AD-관련 병리상태가 세포 수준에서 전사 반응에 어떻게 영향을 미치는지를 조사하기 위해, 8 라운드의 계내 서열분석을 수행하여 2766개의 유전자를 맵핑하고, 1 라운드의 서열분석후 영상화를 수행하여 (도 1d) 타우PS2APP 마우스 및 대조군 마우스로부터의 뇌의 얇은 관상 섹션에 Aβ 플라크 및 인산화 타우 (p-타우)를 위치시켰다. 트랜스제닉 타우PS2APP 마우스는 과인산화 및 응집되는 인간 MAPT의 돌연변이체 형태 (P301L)를 발현하는 것에 추가로, 플라크 형성으로 이어지는 높은 수준의 A 베타 (Aβ) 펩티드를 생산하는 돌연변이체 형태의 인간 아밀로이드 전구체 단백질 (APP K670N/M671L) 및 프레세닐린 2 (N141I)를 발현한다. 섹션을 8개월 (타우 및 Aβ 병리상태가 준비되고 확장되는 연령) 및 13개월 (중증 병리상태 및 상승된 신경염증성 활성을 갖는 보다 진행성 질환 단계)에 분석하였다 (문헌 [Lee et al., 2021]). AD에서 가장 감수성인 영역 중 2개인 피질 및 해마를 주로 조사하였다. 타우PS2APP에서의 공간 단백질 신호는 Aβ 플라크 신호가 피질 및 해마 영역 둘 다에 분포되었고, p-타우 면역반응성이 주로 해마의 CA1 영역에 분포되었다는 이전의 보고 (문헌 [Grueninger et al. 2010), Lee et al. Neuron 2021])의 결과와 매칭되었으며 (도

1d), 이는 스타맵 프로에서의 단백질 검출의 충실도를 시사한다. 2마리의 타우PS2APP 마우스로부터의 19,932개의 세포 및 2마리의 대조군 마우스 (비-트랜스제닉 한배새끼)로부터의 17,135개의 세포를 세포하 해상도 (복셀 크기가 95 nm x 95 nm x 346 nm임, 도 1a)에서 맵핑하였다. 3차원 RNA 판독물의 2차원 평면으로의 투사, 단일-세포 전사 프로파일 (면적이 > 1000 픽셀 또는 9.025 μm^2 및 세포당 > 68개의 RNA 판독물, 또한 STAR 방법 참조)의 세포 분할 및 품질-대조군 필터링 후, 모든 4개의 샘플로부터 풀링된 나머지 33,106개의 세포를 하류 분석에 적용하였다.

[0209] 실시예 2: 계층적 세포 분류 및 공간 분석

[0210] 스타맵 프로 데이터로부터 세포 유형을 확인하기 위해, 상위-수준 클러스터링이 세포를 모든 샘플에 의해 공유되는 공통 세포 유형으로 분류하는 역할을 하고 하위-수준 클러스터링이 질환-연관 하위유형을 추가로 확인하는 역할을 하는 계층적 클러스터링 전략을 채택하였다. 상위-수준 클러스터링 동안, 라이덴 알고리즘을 균일 매니폴드 근사 및 투영 (UMAP)으로 모든 전사체학 프로파일의 저차원 표현에 적용하였다 (문헌 [McInnes et al., 2018; Traag et al., 2019]). 13종의 주요 세포 유형을 이전에 보고된 유전자 마커 및 조직 형태에 따라 명확한 주석으로 확인하였다 (도 2a, 도 9a). 예를 들어, 흥분성 뉴런에 이온 채널 및 시냅스 신호전달과 관련된 유전자, 예컨대 Vsnl1, Snap25, 및 Dnm1의 높은 발현 수준으로 주석을 달았다. 억제 뉴런을 감마-아미노부티르산 (GABA) 수송체 Slc6a1의 풍부화에 의해 분리하였다. 다른 비-뉴런 세포 유형 특이적 마커, 예컨대 성상세포에 대해 Aldoc, 내피 세포에 대해 Bsg, 소교세포에 대해 Ctss, 및 핍지교세포에 대해 Plp1을 또한 사용하여 상응하는 클러스터에 주석을 달았다 (도 9a). 타우PS2APP 샘플의 UMAP 플롯은 대조군 샘플의 것과 비교하여 성상세포, 소교세포, 핍지교세포 및 치상회 (DG) 세포의 차등 분포를 나타냈으며, 이는 질환-연관 세포 하위유형을 시사한다 (도 2a). 따라서, 각각의 주요 세포 유형 내의 이질성을 조사하였고, 24종의 하위-수준 클러스터가 그의 전사체학 서명에 기초하여 확인되었다 (도 2b).

[0211] 세포하 해상도에서 보존된 공간 정보로부터 이익을 얻으면서, 4개의 샘플의 피질 및 해마 영역에서 조직병리학 특징과 함께 공간 세포-유형 아틀라스를 생성하였다 (도 2c 및 도 9d). 상이한 샘플의 모든 공간 세포 아틀라스는 피질 및 해마 영역의 유사한 해부학적 구조를 나타냈으며, 이는 상위-수준 클러스터링 결과의 강건성 및 신뢰도를 확인시켜 준다. 또한 몇몇 주요 세포 유형은 타우PS2APP 샘플에서 Aβ 플라크 근처에서 다양한 공간 분포를 나타냈고, p-타우 신호는 13개월에 해마 영역에서 명백해졌다 (도 2c). Aβ 플라크에 대한 공간적 관계로 세포-유형 조성을 추가로 정량하기 위해, 각각의 세포의 중심으로부터 그의 최근접 플라크의 가장자리까지의 거리를 측정하였다. 이어서, 세포를 Aβ 플라크로부터의 거리 (5개의 10-μm 동심원 고리에서)의 함수로서 계수하고, 주요 세포 유형 주석에 기초하여 분류하였다 (도 2d, 2e, 및 9f). 13종의 주요 세포 유형 중에서, 소교세포, 성상세포, 및 핍지교세포 전구체 세포 (OPC)가 전체 세포-유형 조성과 비교하여 타우PS2APP 샘플에서 플라크 주위에 풍부하였다. 소교세포는 10 μm 고리에서 가장 보편적인 세포 유형이었다. OPC 및 성상세포는 20-30 μm 거리에서 중간 정도의 풍부화를 나타냈다. 나머지 세포 유형은 10-20 μm 고리에서 비교적 고갈되었다.

[0212] 상위-수준 세포 클러스터링 및 공간 분석은 소교세포, 성상세포, OPC, 핍지교세포, 및 뉴런 세포가 전사 프로파일, 공간 위치, 또는 양쪽 특색에서의 변화를 나타냈음을 밝혀냈다. 따라서, 이들 세포 유형을 심도있는 하위-수준 클러스터링 분석을 위해 선택하여 질환-연관 세포 하위유형 및 유전자 경로를 정밀화하였다. AD는 연속적인 분자 및 세포 변이를 수반하는 본질적으로 진행성 질환이다. 그러나, 클러스터링 분석은 별개의 세포 유형만을 확인하고, 연속적인 세포-상태 전이를 설명할 수 없다. 질환 진행에 따라 세포 상태의 구배를 포착하고 상이한 하위유형 사이의 관계를 결정하기 위해, 세포 분화 궤적을 재구축하기 위해 널리 사용되는 컴퓨터 도구인 모노클 가상시간 분석 (문헌 [Cao et al., 2019])을 하기 섹션에서 서브클러스터 분석과 보완하여 사용하였다.

[0213] 실시예 3: 질환-연관 소교세포는 조기 질환 발병으로부터 Aβ 플라크와 직접 접촉함

[0214] 소교세포가 플라크 바로 근처에서 풍부화된다는 것을 확인한 후 (도 2e), 전사체학 프로파일의 서브-클러스터링 분석에 의해 소교세포 집단 내의 이질성을 조사하였다. 3종의 하위집단을 확인하고, 각각 Micro1 (n = 779), Micro2 (n = 415), 및 Micro3 (n = 529)으로 명명하였다 (도 3a). Micro1 및 Micro2 하위유형은 모든 4개의 샘플에 존재한 반면에, Micro3 집단은 타우PS2APP 샘플에서 8개월에서 13개월까지 크게 확장되었고, 대조군 샘플에서 거의 부재하였다 (도 3a). 또한, Micro3 서브클러스터는 질환-연관 소교세포 (DAM)의 공지된 마커이고 신경변성과 연관된 높은 수준의 C1qa, Trem2, Cst7, Ctsb, 및 Apoe를 발현하였다 (문헌 [Friedman et al., 2018; Keren-Shaul et al., 2017]) (도 3b). 그의 질환 모델과의 강한 연관성 및 공지된 DAM 유전자 마커와의

일치를 고려하여, Micro3을 DAM으로서 주석을 달았다.

[0215] 이어서, 세포-상태 전이의 연속 구배를 가상시간 궤적 분석에 의해 소교세포에서 추가로 재구성하였다. 소교세포 집단은 실제 질환 진행 타임라인과 매우 잘 정렬된 선형 가상시간 궤적을 나타냈다. 대조군 샘플에서의 소교세포는 궤적의 출발점에서 풍부화된 반면에, 타우PS2APP 샘플에서의 소교세포는 8개월에서 13개월까지 연속 경로를 따라 이동을 유지하였다 (도 3c-3e). Micro3 서브클러스터가 궤적을 따라 보다 늦은 가상시간 지점에서 존재한 반면에, Micro1 및 Micro2 둘 다는 궤적을 따라 초기 가상시간 값에서 중간 가상시간 값으로 확산되었다 (도 3d-3e). 다음으로, 3종의 소교세포 서브클러스터의 공간 분포를 분석하였다. (i) 3종의 서브클러스터 모두가 타우PS2APP 샘플의 피질 및 해마 영역 양쪽 모두에 존재하였음 (도 3f-3g); (ii) Micro3이 타우PS2APP 마우스에서 거의 배타적으로 존재하였지만, 대조군 샘플에서는 그렇지 않았음 (도 3h, 도 10a); (iii) Micro2가 타우PS2APP 및 대조군 샘플 양쪽 모두에서 피질 영역에서보다 해마 영역에서 더 높은 밀도를 나타냈음 (도 3h)이 관찰되었다. Aβ 플라크 주위의 세포-유형 조성 분석의 경우, (i) 8개월에, 플라크 주위의 10 μm 고리 내의 모든 세포의 64.5%가 소교세포였고, 특히, 소교세포의 73.3%가 Micro3임이 관찰되었으며 (도 10b); (ii) 13개월에, 그 수가 각각 75.8% 및 81.5%로 증가하였다 (도 3h, 하단). 또한, Micro2가 엄격하게 질환-특이적이지는 않지만, 이는 다른 (비-소교세포) 세포 유형과 비교하여 플라크 근처의 10-μm 고리 내에서 유의하게 풍부화되었고 (도 3h 및 도 10b), 이는 Micro2가 Aβ 플라크에 또한 반응한다는 것을 시사한다. 소교세포의 공간 세포 아틀라스를 가상시간 값으로 추가로 플롯팅하고, 플라크 근처의 가상시간 분포를 세포-유형 분석에 사용된 것과 유사한 동심 고리 정량화를 사용하여 컴퓨터 계산하였다. 결과는 플라크 근처 (10 μm 이내)의 소교세포가 플라크로부터 멀리 떨어진 세포보다 더 높은 가상시간 값을 갖는 예상된 관찰을 나타냈으며, 이는 소교세포가 Aβ 플라크를 향해 이동할 때 소교 활성화의 시공간적 궤적을 나타낸다 (도 10c 및 10d).

[0216] 분자 수준에서 AD 병리상태에 대한 소교세포 반응의 보다 포괄적인 이해를 얻기 위해, 이어서 타우PS2APP 마우스 대 대조군 마우스에서의 소교세포의 유전자 발현을 비교하였다 (도 10e). AD 샘플에서 확인된 대부분의 상향조절된 DEG는 생물학적 과정, 예컨대 세포 활성화의 조절 (Cst7, Apoe, Cd9, 및 Clec7a), 염증 반응 (즉, Trem2, Ccl6, 및 Cd68), 항원 프로세싱 및 제시 (즉, Ctss 및 H2-k1)에 수반되는 DAM 유전자 마커였다. 다른 한편으로는, 이환 샘플에서 소교세포의 하향조절된 유전자는 해부학적 구조 형태발생의 조절 (즉, Sparc, Numb, Cdc42), 세포내이입 (Calm1 및 Bin1), 및 수송의 양성 조절 (즉, P2ry12 및 Glud1)과 관련되었다. 가장 유의한 DEG 및 세포 유형 마커의 하위세트를 선택하고, 그의 발현 변이를 마우스의 추가의 세트를 사용하여 64개의 유전자 데이터세트에서 검증하였다 (도 3i).

[0217] 실시예 4: 질환-연관 성상세포는 후기 단계에서 플라크-DAM 복합체 근처에서 출현함

[0218] 성상세포는 타우PS2APP와 대조군 샘플 사이에 유의한 차이를 갖는 또 다른 비-뉴런 세포 집단이었다. 성상세포의 하위-수준 클러스터링 분석은 3종의 전사체적으로 별개의 하위집단 Astro1 (n = 1,068), Astro2 (n = 1,271), 및 Astro3 (n = 545)을 확인하였다 (도 4a). 모든 3종의 서브클러스터가 모든 샘플에서 관찰되었지만; 매우 소수의 Astro3 세포가 대조군 마우스에 존재하였고, Astro3 집단은 타우PS2APP 마우스에서 8개월에서 13개월까지 크게 확장되었다 (도 4a). 이전의 연구는 Gfap의 특징적인 상향조절을 갖는 질환-연관 성상세포 (DAA)를 확인하였고, Astro3의 유전자 마커는 DAA의 것과 유사하였다 (문헌 [Habib et al., 2020]) (즉, Gfap, Vim, 및 Apoe, 도 4b). 따라서, Astro3 클러스터는 그의 전사체학 프로파일과 DAA의 유사성 및 그의 AD 모델과의 연관성 때문에 DAA로 주석을 달았다. 또한, Astro1 및 Astro2는 이전에 보고된 저- 및 중간-Gfap 세포 집단에 상응한다 (문헌 [Habib et al., 2020]).

[0219] Astro1-3 하위유형에 걸친 많은 마커 유전자의 겉보기 선형 구배에도 불구하고, 분기 경로가 성상세포 집단의 가상시간 궤적 분석으로부터 관찰되었다 (도 4c). 가상시간 궤적을 따라 서브클러스터 주석을 시각화함으로써, 가장 긴 경로 (하부 경로)가 Astro1 (출발점) 및 Astro 2 (종점)로부터의 구배와 매칭되며, 질환 진행과의 명백한 연관성은 없는 것으로 확인되었다. 대조적으로, 분기점으로부터의 짧은 분지 (상부 경로)는 비-이환 상태 (대부분 Astro2)에서 Astro3 (DAA)으로의 전이를 나타냈다 (도 4d).

[0220] 성상세포의 공간 세포 지도는 Astro1이 피질 및 해마 뉴런 근처에 위치하는 한편, Astro2는 뇌량 및 소강 분자층(stratum lacunosum-moleculare)이 풍부하다는 것을 추가로 나타냈다 (도 4f-4h 및 도 11a). 조직 병리상태와 관련된 세포-유형 분석은 DAM이 10 μm 내에서 플라크와 직접 상호작용하여 DAM-플라크 복합체를 형성하는 반면에, Astro3 (DAA)은 피질 및 해마 영역 둘 다에서 플라크로부터 상대적으로 더 멀리에서 (20-40 μm) 풍부화되었음을 밝혀냈다. 피질, 뇌량 및 해마 영역에서, 플라크 주위의 20-40 μm 범위의 세포의 각각 약 3.1%, 7.8% 또는 10.1%가 13-개월 타우PS2APP 샘플에서 DAA였다 (도 4h). 또한, Astro2는 또한 8개월에 플라크 근처

에 풍부하였고, 20-40 μm 범위에서 모든 세포의 3-16%에 기여하였지만; Astro2의 존재는 13개월에 2-7%로 하락하였다 (도 4h 및 11b). Astro2에서 Astro3으로의 질환-연관 전사체학 가상시간 궤적과 조합하여, 플라크 근처에서 8개월에서 13개월로의 Astro2에서 Astro3 집단으로의 관찰된 이동 (도 4d, 상부 경로)은 질환 진행에 따라 플라크 근처에서 Astro2에서 Astro3 (DAA)으로의 전환이 있을 수 있음을 시사한다.

[0221] 타우PS2APP 및 대조군 샘플의 성상세포에서 대부분의 DEG는 신경교 세포 분화 (즉, Gfap, Vim, Clu, 및 Stat3) 및 세포외 매트릭스 (즉, Ctsb 및 Bcan)와 관련되었다 (도 11e). 가상시간 임베딩 시에 확인된 상위 DEG의 유전자 발현 수준을 나타냄으로써, Gfap 및 Vim의 발현 프로파일은 DAA와 최상의 상관관계를 나타내었고, 질환-연관 분지를 따라 분자 구배와 유사하였다 (도 4i, 상부 경로). DEG로부터의 풍부화된 GO 용어는 뉴런 투사 발생의 음성 조절 및 신경교 세포 증식의 양성 조절, 뿐만 아니라 중간 필라멘트 조직화를 포함하며 (도 4j), 이는 AD 질환 모델에서의 전반적인 신경교증 과정을 시사한다. 다시, 가장 유의한 DEG 및 세포 유형 마커의 하위세트를 선택하고, 그의 발현 변이를 64개의 유전자 검증 데이터세트에서 또한 관찰하였다 (도 4k).

[0222] 실시예 5: 핍지교세포 하위유형 및 전구체 세포는 플라크의 중간 부근에서 풍부화됨

[0223] 다음에, 핍지교세포 계열 세포에 대해 하위-수준 클러스터링 분석을 수행하였고, 4종의 클러스터가 확인되었다 (도 5a 및 5b): Oligo1 (n = 4,295), Oligo2 (n = 181), Oligo3 (n = 490), 및 OPC (n = 549). 핍지교세포의 유전자 마커 Plp1은 모든 클러스터에 걸쳐 비교적 균일한 발현을 나타낸 반면에, Klk6 및 Cldn11은 각각 Oligo2 및 Oligo3 집단을 표시하였다 (도 5b). 타우PS2APP 질환 모델 및 대조군 샘플은 UMAP 임베딩 시에 모든 4종의 세포 집단의 유사한 분포를 나타내었다 (도 5a).

[0224] OPC 및 핍지교세포 세포의 조합된 집단의 가상시간 궤적 분석은 OPC에서 성숙 핍지교세포로의 공지된 분화 경로를 재현하였다 (도 5c, 하부 궤적). 성상세포와 유사하게, 질환-연관 궤적은 OPC에서 핍지교세포로의 주요 경로 옆에서 분기하였다 (도 5c, 상부 분지). 타우PS2APP 샘플로부터의 핍지교세포는 8-개월 타우PS2APP 및 대조군 샘플과 비교하여 질환-연관 궤적 분지 주위에서 크게 풍부화되었다 (도 5c). 또한, 질환-연관 궤적은 모든 3종의 Oligo1-3 하위유형을 함유하였다 (도 5d). 전반적으로, 13개월에서의 이환 샘플 중 세포의 가상시간 분포는 13개월에서의 대조군 샘플 및 8-개월에서의 이환 샘플 둘 다와 비교하여 상당히 더 높은 평균을 가졌다 (도 5e).

[0225] 공간 지도 및 세포 밀도 계산 (도 5f-5h, 상단, 및 도 12a)으로부터, 타우PS2APP에서 Oligo2 및 Oligo3 집단의 세포 밀도는 대조군 샘플과 비교하여 13개월에 이환 샘플에서 100-200% 더 높은 것으로 관찰되었다. 따라서, Oligo2 및 Oligo3은 질환-풍부 핍지교세포로 주석을 달았다. Aβ 플라크 근처의 세포-유형 분포 분석으로부터, OPC는 8개월 및 13개월 둘 다에서 타우PS2APP 마우스에서 플라크 주위의 20-40 μm 고리에서 풍부화된 것으로 밝혀졌다 (도 5h 및 14b). 또한, Oligo2 및 Oligo3은 또한 TauPSAPP 마우스에서, 특히 피질하 영역에서 플라크로부터 20-40 μm 거리에서 풍부하였다.

[0226] 타우PS2APP 마우스 대 대조군 마우스 비교로부터 핍지교세포에서의 DEG 분석을 통해, 13-개월령 타우PS2APP 마우스에서 강하게 상향조절된 유전자의 군 (즉, Cldn11, Klk6, Serpina3n, 및 C4b)을 확인하고, 검증하였다. 대조적으로, 8-개월령 타우PS2APP 및 대조군 마우스 사이의 DEG의 배수 변화는 덜 유의하였고, DEG 중 일부는 이후의 실험적 검증에서 일관되지 않은 변화를 나타냈다 (도 5k 및 14f). GO 용어 분석은 질환 진행 동안 시토카인 생산, 뉴런 사멸의 조절, 및 시냅스 가소성 및 수초화의 조절에서 핍지교세포의 주요 생물학적 과정을 나타냈다. 질환-연관 가상시간 궤적에 따른 추가의 DEG 분석은 핍지교세포에서 Klk6, Cldn11, 및 C4b 유전자의 질환 연관성을 추가로 확인하였다 (도 5j).

[0227] 실시예 6: Aβ 플라크 및 타우 엉킴에 대한 뉴런 세포의 반응

[0228] 비-뉴런 세포에서의 세포 변화 이외에, 뉴런에서의 전사체학 반응은 신경변성의 메카니즘을 이해하는 데 중요하다. 뉴런 세포 집단의 하위-수준 클러스터링 분석을 수행하고, 8종의 흥분성 뉴런 서브클러스터 및 4종의 억제 뉴런 서브클러스터를 확인하였다. 뉴런의 공간 세포 지도에서 가시화된 바와 같이 (도 6a, 6b, 13a, 및 13b), 피질 흥분성 뉴런의 4종의 하위유형은 상이한 피질 층 (CTX-Ex1-4)에 상응한다. 해마 영역 내의 흥분성 뉴런 유형은 주요 유형 (DG, CA1, CA2, 및 CA3)과 동일하고, 각각의 주요 유형 내에서 추가적인 서브클러스터가 확인되지 않았다. 억제 뉴런의 4종의 하위유형 중에서, Pvalb 및 Sst 뉴런은 피질에서 풍부화된 반면에, Cnr1 및 Lamp5 뉴런은 해마에서 과도하게 나타났다.

[0229] 다음에, 뉴런-유형 조성물 및 그의 전사체학 프로파일을 Aβ 플라크와 관련하여 조사하였다. 일반적으로, 플라크 근처의 비-뉴런 세포 (소교세포, 성상세포, OPC 및 핍지교세포)의 이동 및 확장으로 인해, 모든 뉴런 세포의

백분율은 플라크 근처에서 낮았고, 플라크까지의 거리와 양의 상관관계가 있었다. 그러나, 해마 영역에서, 플라크 주위의 뉴런 집단은 대부분 DG 세포를 포함하였고, 이는 대부분의 플라크가 DG 근처에서 출현하였다는 관찰과 일치한다. 최근의 보고는 DG에서의 성인 해마 신경발생 (AHN) 활성이 AD의 인간 환자에서 급격하게 감소한다는 것을 나타냈다. 따라서, 타우PS2APP 마우스 모델에서의 Aβ 플라크가 또한 가상시간 궤적 분석에 의해 DG의 AHN에 영향을 미치는지 여부를 시험하였다. 8개월에, DG 근처에 플라크가 거의 없었기 때문에, 타우PSAPP 및 대조군 마우스에서 DG 세포의 가상시간 분포는 구별할 수 없었다. 그러나, 13개월에, DG 근처의 플라크의 증가된 수를 동반하여, 가상시간 궤적은 각각 타우PS2APP 및 대조군 샘플에서 DG 집단에 상응하는 2개의 분지로 분기되었다. 추가적으로, 신경발생과 관련되기 때문에 DG 영역 내의 뉴런의 분자 반응을 추가로 조사하였다. 가상시간 분석에 따르면, 13개월에서의 샘플은 2개의 상이한 경로를 따랐다. 13개월에서의 이환 샘플에서, Dapk1과 같은 유전자는 상향조절되었으며, 이는 또한 뉴런 사멸 조절에 수반되었다 (도 6i 및 6j).

[0230] 타우 엉킴에 의해 유도된 변경을 조사하기 위해, 각각의 세포의 총 픽셀 면적에 대한 타우 양성 픽셀의 수의 비를 계산함으로써 각각의 세포 내의 타우 단백질 강도를 정량화하였다. 축삭 내의 타우 엉킴이 세포에 잘못 기인할 수 있기 때문에, 이어서 역치를 사용하여 각각의 샘플 내의 타우 양성 뉴런을 선택하였다. 이 경우, 8개월에서의 샘플 내 대부분의 타우 양성 흥분성 뉴런은 CTX-Ex2 집단에 있었던 반면에, 13개월에서 이들 대부분은 CA1 영역에서 발견되었다. 억제 뉴런의 경우, 대부분의 타우 양성 세포는 Pvalb 집단으로부터 유래된 반면에, 13개월에서는 이들 대부분이 Sst 집단으로부터 유래되었다 (도 6e). 플라크 주위의 타우 신호를 또한 정량화하였고, 피질 영역에서는 타우 신호가 플라크 근처에서 풍부화되었지만, 피질하 영역에서는 패턴이 관찰되지 않았음이 발견되었다 (도 6f).

[0231] 마지막으로, 모든 하위유형을 흥분성 및 억제 뉴런의 2개의 큰 카테고리로 풀링하고, 타우PS2APP와 대조군 샘플 사이의 뉴런의 DEG를 분석함으로써 뉴런에 대한 Aβ 플라크 및 타우 엉킴의 조합된 효과를 검사하였다. 전반적으로, 흥분성 및 억제 뉴런 세포 집단으로부터 확인된 DEG는 고도로 일관되었다. GO 용어 분석은 확인된 DEG가 세포 주기 조절 (Ccnb2), 뉴런 분화 (Gpm6a), 및 뉴런 사멸의 조절 (Ddit3)의 생물학적 과정에서 풍부화되었음을 나타냈다 (도 6g 및 6h).

[0232] 실시예 7: AD 병리상태에서의 질환-연관 세포의 통합 분석

[0233] 상기 기재된 분석은 개별 주요 세포 유형 내에서 질환-연관 하위유형 및 DEG를 해부하는 데 초점을 맞추었다. 다중 세포 유형으로부터의 AD 유전자 경로의 포괄적인 그림을 합성하기 위해, 4종의 주요 세포 유형 (소교세포, 성상세포, 핍지교세포 및 뉴런)으로부터의 DEG를 사용하여 유전자 세트 농축 분석 (GSEA)을 수행하였다. GO 용어 풍부화 열지도에 나타낸 바와 같이 (도 7a 및 14a), 13개월에 생물학적 과정에서 비-뉴런 세포의 유의하게 풍부화된 용어의 대부분은 신경교 세포 분화 및 신경교 세포 발생이었으며, 이는 질환-연관 집단의 출현을 재현한 반면에, 뉴런의 것은 시냅스 신호전달, 인지 및 시냅스 가소성의 조절을 수반한다. 이어서, 표적화된 세포 유형에서 풍부화된 모든 주석을 수집하고, 그의 유사성에 기초하여 그룹화하였다. GO 풍부화 맵을 생성하고, AD에서의 주요 참가자의 세포-유형-특이적 및 공유 주석 둘 다를 나타냈다 (도 14b). 집단이 병리학적 부위와 직접 상호작용함에 따라, 면역 반응, 염증 반응 및 리소솜과 관련된 세포-유형 특이적 용어는 소교세포에서 풍부화되었다. 세포 운동성, 형태발생 및 분화와 관련된 용어는 다중 세포 유형에 걸쳐 공유되었다.

[0234] AD 및 대조군 샘플의 비교에서 확인된 DEG 이외에, 플라크로부터 멀리 떨어진 (25 μm 초과의 거리) 세포와 비교하여 플라크에 근접한 (25 μm 이내) 세포를 사용하여 공간 DEG를 또한 계산하였다. 플라크 근접 영역에서 특이적으로 상향조절된 유전자를 플라크 유도된 유전자 (PIG)로 간주하였다. 16개의 PIG가 8개월에 확인되었고, 29개의 PIG가 AD 샘플에서 13개월에 확인되었다 (도 7b 및 14g). AD 8-개월 샘플 내 16개의 PIG 모두가 AD 13-개월 샘플 내 PIG에 포함되었다 (도 7c). 플라크로부터 10 μm 이내에 풍부화된 PIG는 주로 DAM 마커 유전자, 예컨대 Trem2, Cst7, Ctsb, Apoe 및 Cd9인 것으로 밝혀졌다 (도 7b 및 14g). DAA 마커 Vim은 AD 13-개월 샘플에서 플라크로부터의 20 내지 30 μm 영역에서 상향조절되었다 (도 7b). 이는 DAA가 AD 13-개월 샘플에서 플라크로부터의 20 내지 30 μm 영역에서 풍부화되었다는 이전의 발견과 일관된다 (도 4h). 밝혀지지 않은 PIG를 또한 18-개월 AppNL-G-F 마우스에서 이전에 보고된 PIG와 비교하였다. 결과는 AD 13-개월 샘플 내 PIG의 58.9% (29명 중 17명) 및 AD 8-개월 샘플 내 PIG의 87.5% (16명 중 14명)가 보고된 PIG와 중첩되었음을 나타냈다 (도 7c). 높은 중첩 비는 공간적으로 보존된 RNA 신호를 검출하기 위한 스타맵 프로의 정확도를 암시하였다.

[0235] 각각의 세포 유형과 Aβ 플라크 사이의 공간 관계에 대한 더욱 포괄적이고 정량적인 이해를 얻기 위해, 평균 유클리드 거리를 플라크, DAM, DAA, 및 뉴런으로부터 이들의 최근접 이웃까지 컴퓨터 계산하였다 (도 14c 및

14e). 셔플링된 참조물 (도 14d 및 14f)과 비교하여, DAM이 아밀로이드 플라크의 가장 가까운 이웃인 것으로 밝혀졌다. 플라크 대신에, DAA는 DAM까지의 거리가 더 짧았고, 이는 DAA가 DAM-플라크 복합체와 접촉한다는 것을 시사한다. 이러한 발견을 추가로 검증하기 위해, 이어서 세포를 각각의 플라크로부터 상이한 거리 간격으로 정량화하고, 그의 세포 유형 동일성에 기초하여 그룹화하였다 (도 7d). 요약하면, DAM은 플라크에 가장 가깝고, 0-20 μm 영역에서 풍부하였다. DAA 및 OPC는 플라크까지의 거리 면에서 비교적 유사하였고, 20-40 μm 영역에 분포되었다. 핍지교세포 및 뉴런은 외부 영역에서 보다 높은 밀도를 가졌다 (도 7d). 이러한 공간 정보에 기초하여, AD 8-개월 샘플 및 AD 13-개월 샘플에서 플라크 주위의 세포 분포 패턴의 다이어그램을 생성하였다 (도 7e). 두 단계 모두에서, DAM은 플라크와 직접 접촉하여 내부 코어를 형성한다. 질환 진행과 함께, 더 많은 DAA가 나타났고, 제2의 플라크 최근접 영역에서 풍부화되었다. 플라크 근접 영역에서의 OPC의 풍부화를 또한 타우PS2APP 13-개월 샘플의 다이어그램에 나타냈다. 이들 표적화된 세포 유형에서 마커 유전자 또는 DEG를 또한 다이어그램에 표지하였다.

[0236] 논의

[0237] 스타맵 프로는 단일 세포 해상도에서 동일한 조직 섹션 내의 RNA 및 단백질 신호의 계내 검출을 위해 개발되었다. 스타맵에 기초하여, 그의 검출 능력 및 특이성이 추가로 개선되었고, 공간 정보를 보존하면서 단일-세포 해상도에서 RNA 및 단백질을 동시에 프로파일링하는 새로운 기능성이 제공되었다. 스타맵 프로는 보다 포괄적인 방식으로 생물계를 연구할 기회를 제공하고, 다중-모드 공간 유전자 발현 분석을 가능하게 한다. 단백질이 가장 흔한 질환 특징이기 때문에, 본원에 기재된 방법은 병리상태 연구에서 널리 사용될 잠재력을 갖는다. 질환 특징 근처에서의 유전자 발현 변화를 조사하기 위해 스타맵 프로를 사용하는 것은 질환 발병기전의 이해를 진보시킬 것이다. 원래의 스타맵은 RNA 신호만을 검출하고, 풍부한 단백질을 정확하게 나타낼 수 없거나 또는 단백질 변형을 검출할 수 없다. 대조적으로, 스타맵 프로의 면역염색 전략은 상이한 단백질 종류 뿐만 아니라 단백질 변형을 구별할 수 있으며, 이는 단백질 변형, 예컨대 인산화가 암 발생 및 진행 동안 중요한 역할을 하기 때문에 암 연구에 유용한 도구를 제공한다.

[0238] 스타맵 프로를 적용하여 AD 마우스 모델에서 RNA 및 AD 병리상태 단백질 신호를 검출하였다. 공간적으로 보존된 단일-세포 RNA 신호로, Aβ 플라크와 관련된 세포 분포 패턴을 밝히기 위해 세포 유형 공간 지도를 생성하였고, 소교세포가 플라크 근접 영역에서 유의하게 풍부한 것으로 밝혀졌다. 이어서, 5종의 표적화된 세포 유형 (소교세포, 성상세포, 핍지교세포, 흥분성 뉴런, 및 억제 뉴런)의 서브-클러스터링 분석을 수행하였다. 결과는 DAM 및 DAA의 출현, 뿐만 아니라 Aβ 플라크 근접 영역에서의 그의 풍부화 거동을 확인한 포괄적인 공간 지도를 제공한다. 이는 이전의 연구와 일치하였고, 스타맵 프로의 검출 정확도를 추가로 검증하였다. 플라크 주위의 세포 분포를 분석할 때, DAM이 Aβ 플라크 주위의 최근접 영역에 분포하고, 이어서 DAA가 DAM 근처의 외부 영역에 분포하는 것으로 밝혀졌다. 이는 DAM의 분포가 Aβ 플라크에 의해 직접적으로 영향을 받을 수 있고, 이어서 DAA가 DAM에 의해 영향을 받을 수 있음을 암시한다. 실제로, 이전의 연구는 DAA 마커 유전자 Gfap 및 Vim의 발현이 높은 반응성 성상세포가 활성화된 소교세포에 의해 유도되었음을 밝혀냈다. 세포 유형 분포 패턴에 관하여, OPC가 근접 플라크 영역에서 풍부한 것으로 또한 밝혀졌다. 플라크 근처의 이들 OPC는 AD의 병리상태에 수반되는 핍지교세포로 분화될 수 있다.

[0239] 5종의 주요 세포 유형에서의 병리상태-반응성 전사 서명을 또한 제공하였다. 대부분의 유전자 마커는 세포-유형-특이적이고 특이적 교란에 관여할 수 있는 반면에, 일부 DEG는 세포 유형에 걸쳐 공유되는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, Gfap는 모든 주요 세포 유형에서 상향조절되었다. 이는 다양한 세포 유형의 알츠하이머병-특이적 서브클러스터에서 높은 Gfap 발현을 또한 나타낸 이전의 단일-핵 연구와 일치하였다. 소교세포 및 성상세포는 또한 CTSB와 같은 DEG를 공유하였다. 경로 분석은 또한 상이한 세포 유형으로부터의 DEG가 유사한 생물학적 과정에 수반되었음을 나타냈다.

[0240] 방법

[0241] 마우스

[0242] 모든 동물 절차는 제넨테크 동물 실험 윤리 위원회 (IACUC)에 의해 승인된 동물 관리 가이드라인을 따랐고, 동물 실험은 IACUC 정책 및 NIH 가이드라인에 따라 수행되었다. 스타맵 프로에 사용된 마우스는 인간 타우의 P301L 돌연변이체 및 $PS2_{N141I}$ 및 APP_{swe} ($PS2APP^{homo}$; $P301L^{hemi}$)를 발현하는 pR5-183 세포주 및 비-트랜스제닉 대조군을 포함한다.

[0243] 스타맵 프로를 위한 조직 수집 및 샘플 제조

[0244] 동물을 이소플루란으로 마취시키고, 신속하게 참수시켰다. 뇌 조직을 제거하고, O.C.T에 둔 다음, 액체 질소 중에서 동결시키고, -80℃에서 유지하였다. 마우스 뇌 조직 섹션의 경우, 뇌를 저온유지장치 (라이카(Leica) CM1950)로 옮기고, 관상 섹션에서 20 μm 슬라이스로서 절단하였다. 뇌 섹션을 실온에서 15분 동안 1X PBS 완충제 중 4% PFA로 고정시키고, 차가운 메탄올로 투과화하고, -80℃에서 1시간 동안 두었다.

[0245] 공간 RNA 및 단백질 신호를 검출하기 위한 스타맵 프로.

[0246] 샘플을 -80℃ 내지 실온에서 5분 동안 취한 다음, PBSTR 완충제 (PBS 중 0.1% 트윈-20, 0.1 U/μL SUPERase·In RNase 억제제)로 세척하였다. 세척 후, 샘플을 36시간 동안 진탕 및 파라필름 랩핑과 함께 40℃ 가습 오븐에서 300 μl 1X 혼성화 완충제 (2X SSC, 10% 포름아미드, 1% 트윈-20, 0.1 mg/ml 효모 tRNA, 20 mM RVC, 0.1 U/μL SUPERase·In RNase 억제제, 및 풀링된 SNAIL 프로브, 올리고당 1 nM)와 함께 인큐베이션하였다. 샘플을 37℃에서 PBSTR로 2회 및 고염 세척 완충제 (PBSTR 중에 용해된 4X SSC)로 1회 세척하였다. 최종적으로, 샘플을 PBSTR로 실온에서 1회 헹구었다. 이어서, 샘플을 라이게이션 혼합물 (0.5 mg/ml BSA 및 0.2 U/μL의 SUPERase-In RNase 억제제가 보충된 1X T4 DNA 리가제 완충제 중 T4 DNA 리가제의 1:10 희석)과 함께 실온에서 2시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 라이게이션 후에, 샘플을 PBASR 완충제로 2회 세척한 다음, 롤링 서클 증폭 (RCA) 혼합물 (250 μM dNTP, 20 μM 5-(3-아미노알릴)-dUTP, 0.5 mg/ml BSA, 및 0.2 U/μL의 SUPERase-In RNase 억제제로 보충된 1X Phi29 완충제 중 Phi29 DNA 폴리머라제의 1:10 희석물)과 함께 30℃에서 2시간 동안 부드럽게 진탕시키면서 인큐베이션하였다. 샘플을 PBST (PBS 중 0.1% 트윈-20)로 2회 세척하고, 차단 용액 (PBST 중 5 mg/ml BSA)으로 실온에서 30분 동안 차단하였다. 샘플을 p-타우 1차 항체 (차단 용액 중 1:100 희석)와 함께 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 PBST로 각각 5분 동안 3회 세척하였다. 이어서, 샘플을 PBST 중 20 mM 아크릴산 NHS 에스테르로 1시간 동안 처리한 다음, PBST로 1회 헹구었다. 샘플을 단량체 완충제 (2X SSC 중 4% 아크릴아미드, 0.2% 비스-아크릴아미드) 중에서 15분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이어서, 완충제를 흡인하고, 35 중합 혼합물 (단량체 완충제 중에 용해된 0.2% 테트라메틸에틸렌디아민, 0.2%과황산암모늄)을 샘플의 중앙에 첨가하고, 즉시 겔 슬릭 코팅된 커버슬립으로 덮었다. 중합 반응을 실온에서 1시간 동안 수행한 다음, PBST에 의해 각각 5분 동안 2회 세척하였다. 샘플을 37℃에서 1시간 동안 탈인산화 혼합물 (0.5 mg/ml BSA로 보충된 1X 컷스마트 완충제 중 쉬림프 알칼리성 포스파타제의 1:100 희석물)로 처리한 다음, PBST에 의해 각각 5분 동안 3회 세척하였다.

[0247] 계내 RNA 서열분석을 위해, 각각의 사이클은 샘플을 스트리핑 완충제 (H_2O 중 60% 포름아미드 및 0.1% 트리톤-X-100)로 실온에서 10분 동안 2회 처리하고, 이어서 PBST를 각각 5분 동안 3회 세척하는 것으로 시작하였다. 샘플을 서열분석 혼합물 (0.5 mg/ml BSA, 10 μM 판독 프로브 및 5 μM 형광 올리고로 보충된 1XT4 DNA 리가제 완충제 중 T4 DNA 리가제의 1:25 희석)과 함께 실온에서 적어도 3시간 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 각각 10분 동안 세척 및 영상화 완충제 (2X SSC 중 10% 포름아미드)에 의해 3회 세척한 다음, 영상화를 위해 세척 및 영상화 완충제에 침지시켰다. 라이카 TCS SP8 공초점 현미경을 사용하여 영상을 획득하였다. 8 사이클의 영상화를 수행하여 2766개의 유전자를 검출하였다.

[0248] RNA 신호의 계내 서열분석 후에, 샘플을 X-34 용액 (1X PBS 중 10 μM X-34, 40% 에탄올 및 0.02 M NaOH) 중에서 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 1X PBS로 3회 세척하고, 80% EtOH 중에서 1분 동안 인큐베이션한 다음, PBS로 각각 1분 동안 3회 세척하였다. 이어서, 샘플을 2차 항체 (차단 용액 중 1:80 희석)와 함께 실온에서 12시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 PBST로 각각 5분 동안 3회 세척하였다. 아이오딘화프로피듐 (PI) 염색을 세포 분할의 목적을 위해 제조업체의 지침에 따라 수행하였다. 또 다른 라운드의 영상화를 수행하여 공간 단백질 신호를 검출하였다.

[0249] 얇은-섹션 스타맵 프로 데이터 처리.

[0250] 모든 영상 처리 단계는 피톤(Python) 3.6에서의 MATLAB R2019b 및 관련 오픈-소스 패키지를 사용하여 실행하였고, 문헌 [Wang et al., 2018]에 따라 적용하였다.

[0251] 영상 전처리: 다차원 히스토그램 매칭을 MATLAB 함수 "이미스트매치"를 사용하여 각각의 타일 상에서 수행하였다. 제1 서열분석 라운드에서 제1 색 채널의 영상을 참조물로서 사용하여 조도 및 콘트라스트 수준을 균일하게 만들었다.

[0252] 영상 정합: 영상 정합을 문헌 [Wang et al., 2018]에 따라 적용하였다. 모든 번역 오프셋에서 2개의 영상 부피 사이의 교차-상관관계를 컴퓨터 계산하기 위해 3차원 고속 푸리에 변환 (FFT)을 사용하여 전역 영상 정합을 달성하였다. 최대 상관관계 계수의 위치를 확인하고, 오프셋을 보상하기 위해 영상 부피를 변환하는 데 사용하였

다.

[0253] 스팟 콜링: 정합 후, 개별 도트를 서열분석의 제1 라운드 상에서 각각의 색 채널에서 개별적으로 확인하였다. 3D에서 국부 최대치를 발견함으로써 직경이 대략 6 픽셀인 도트를 확인하였다. 각각의 도트를 확인한 후, 모든 4개의 채널에 걸쳐 그 도트에 대한 우세한 색을 각각의 라운드에 대해 도트 위치 주위의 5x5x3 복셀 부피에서 결정하였다.

[0254] 바코드 필터링: 먼저 품질 점수에 기초하여 도트를 필터링하였다. 품질 점수는 각각의 서열분석 라운드에서의 각각의 도트가 색의 혼합물보다는 하나의 색으로부터 유래된 정도를 정량화하였다. 바코드 DNA 서열의 2-염기 코딩 후에 예상된 색 서열에 기초하여, 바코드 코드북을 색 공간으로 전환시켰다. 품질 역치를 통과한 도트 색 서열 및 코드북에서 매칭된 서열을 유지하고, 바코드가 나타내는 특정 유전자로 확인하였고; 모든 다른 도트는 거부되었다. 이어서, 하류 분석을 위해 고품질 도트 및 코드북에서의 연관된 유전자 정체를 저장하였다.

[0255] 2D 세포 분할: 핵을 스타디스트(StarDist) 2D 기계 학습 모델 (문헌 [Schmidt et al., 2018])에 의해 서열분석의 최종 라운드 후 스티치된 DAPI 채널의 최대 강도 투사로부터 자동으로 확인하였다. 이어서, 세포 위치를 분할된 DAPI 영상으로부터 추출하였다. 세포체는 스티치된 니슬 염색 및 병합된 앰플리콘 영상의 오버레이에 의해 나타내어졌다. 최종적으로, 이어서 마커-기반 워터쉐드 변환을 적용하여, 조합된 역치화 세포체 지도 및 핵의 확인된 위치에 기초하여 역치화 세포체를 분할하였다. 이어서, 2D에서 각각의 분할된 세포 영역과 중첩되는 점을 그 세포에 할당하여, 세포당 유전자 발현 매트릭스를 계산하였다.

[0256] 세포 유형 분류: 2-수준 클러스터링 전략을 적용하여 데이터세트에서 주요 및 하위-수준 세포 유형 둘 다를 확인하였다. 본 섹션에서의 프로세싱 단계는 스캔피(Scanpy) v1.4.6 (문헌 [Wolf et al., 2018]) 및 피톤 3.6에서의 다른 맞춤형 스크립트를 사용하여 실행되었고, 문헌 [Wang et al., 2018]에 따라 적용되었다. 필터링, 정규화 및 스케일링 후에, 주요-성분 분석 (PCA)을 적용하여 세포 발현 매트릭스의 차원을 감소시켰다. 설명된 분산 비에 기초하여, 상위 PC를 사용하여 관찰의 이웃 그래프를 컴퓨터 계산하였다. 이어서, 라이덴 알고리즘을 사용하여 잘 연결된 세포를 전사체학 프로파일의 저차원 표현에서 클러스터로서 확인하였다. 세포를 균일 매니폴드 근사 및 투영 (UMAP)을 사용하여 디스플레이하고, 그의 세포 유형에 따라 색-코딩하였다. 이어서, 각각의 상위-수준 클러스터에 대한 세포를 PCA 분해를 이용하여 서브클러스터링한 다음, 라이덴 클러스터링하여 하위-수준 세포 유형을 결정하였다.

[0257] 공간 분석

[0258] 플라크 분할: 공간 분석은 플라크 분할로 시작한다. EBImage 패키지에서 'bwlabel' 기능을 사용함으로써, 플라크를 플라크 채널의 2원 영상으로부터 분할할 수 있다. 이어서, 각각의 플라크의 크기 및 중심을 'computeFeatures.moment' 및'computeFeatures.shape' 함수를 사용하여 계산한다. 최종적으로, 400 픽셀 미만의 면적 (대략 36.7 μm^2와 동일함)을 갖는 플라크가 필터링될 것이다.

[0259] 플라크 주위의 세포 분포: 세포 위치 *PC*가 데이터 전처리 단계로부터 수득됨에 따라, n 세포 및 m 플라크를 갖는 샘플을 고려하고, 각각의 세포 $i \in \{1, 2, ..., n\}$ 에 대해, 그의 최근접 플라크 거리는 하기와 같다:

[0260] $$ND_i = min\{\|PC_i - PP_j\|_2\}, j \in \{1, 2, ..., m\}$$

[0261] 다음에, 본 발명자들은 상이한 범위에 속하는 모든 세포 유형에 대한 세포의 수를 계수한다. 범위는 0-10 μm (고리 1) 내지 40-50 μm (고리 5)로 설정된다. 세포의 총수의 차이를 제거하기 위해, 고리 내의 각각의 세포 유형의 백분율을 계산함으로써 통계를 정규화한다. 이러한 분석의 그래프 설명이 도 2d에 제시된다. 전체 통계를 위해, 각각의 세포 유형의 백분율을 전체 샘플에서 계산하였다.

[0262] 유형-대-유형 거리 계산: *n*개의 세포 및 *m*개의 플라크를 갖는 샘플에서, 이들을 좌표 *P* 및 유형 표지 (플라크, DAA, DAM 등)를 갖는 대상으로서 처리하였다. *t* 유형의 표지가 존재하고 각각의 유형에 대한 대상의 세트가 $S_1, S_2, ..., S_t$인 것으로 가정하면, 유형 *i*에서 유형 *j*까지의 유형-대-유형 거리는 다음과 같다:

[0263] $$D_{ij} = \frac{\sum_{k \in S_i} min\{\|P_k - P_l\|_2\}}{\#S_i}, l \in S_j$$

[0264] 셔플링된 대조군 분석은 동일한 알고리즘을 사용하지만 표지를 무작위로 할당하여 수행하였다 (세포/플라크의

수는 동일하게 유지됨).

[0265] 차등 발현 및 경로 분석

[0266] 차등 발현 분석: DE 분석을 수행하기 전에, 데이터세트는 1) 샘플 내의 유전자 계수를 그 샘플에 대한 *세포당 총 계수*의 중앙값으로 나누고, 모든 샘플에 대한 *세포당 총 계수*의 중앙값의 평균 값으로서 정의되는 스케일 인자를 곱하고; 2) 하나의 슈도-계수를 더하여 log2 변환을 수행함으로써 정규화된다.

[0267] $$\text{스케일 인자} = \frac{\sum \text{중앙값(세포당 총 계수)}}{\text{샘플의 수}}$$

[0268] DE 유전자는 세우라트(Seurat)에서의 '핀드마커스(FindMarkers)' 기능을 사용하여 2개의 세포 군 사이에서 윌콕슨 순위 합계 검정을 수행함으로써 확인된다. '질환 대 대조군'과 같은 비교를 위해, 2개의 세포 군은 타우 PS2APP 및 대조군 샘플로부터 특정 유형의 세포를 자연적으로 추출한다. '플라크에 근접함 대 플라크로부터 멀리 떨어져 있음'의 비교에 대해, '플라크에 근접한' 세포는 최근접 플라크 거리가 < 25 μm인 세포이고, 모든 다른 세포는 '플라크로부터 멀리 떨어져 있음'으로 정의된다. 'CA1 타우+ 대 타우-'의 비교에서, 타우+ CA1 세포를 세포체의 면적에 대한 타우 신호 면적의 분율에 따라 필터링하였다. 그 분획의 역치는 0.3으로 설정된다.

[0269] 일부 저발현 유전자를 필터링하기 위해, 어느 하나의 세포군에서 발현하는 유전자가 검출되는 세포의 분획에 대한 최소 역치를 0.1로 설정한다. 하기 역치 값을 또한 생성된 유전자 목록에 적용하여 비-유의한 유전자를 필터링하였다: log 배수 변화의 절대값 > 0.1, p-값 < 0.05.

[0270] DE 결과를 시각화하기 위해, 본 발명자들은 'EnhancedVolcanoplot' 패키지를 사용하여 볼케이노 플롯을 생성하였다. logFC > 0인 DE 유전자는 적색으로 착색되고, 다른 유전자는 청색으로 착색된다. LogFC 역치를 통과하는 데 실패한 유의한 유전자 (p-값 < 0.05)는 녹색으로 착색된다. 모든 다른 유의하지 않은 유전자는 회색으로 착색된다. 극도로 높은 -log(P-값) 또는 logFC를 갖는 일부 유전자는 캡핑됨을 주목한다.

[0271] 유전자 온톨로지 (GO) 풍부화 분석:

[0272] 웹사이트 g:프로파일러를 사용하여 각각의 비교의 DE 유전자에 대한 GO 풍부화 분석을 수행하였다: 질환 및 대조군 샘플 또는 타우 양성 및 음성 또는 플라크 근접 및 플라크로부터의 멀리 떨어진 (25 μm이 역치로서 사용됨) 세포들 사이의 DE 유전자의 목록이 GO 분석의 입력값이다. 통계적 도메인 범위는 주석달린 유전자로 제한된다. 유의성 역치는 g:SCS를 사용하여 결정하고, 사용자 역치는 0.05로 설정하였다. 풍부화 분석에 적용되는 기능적 카테고리의 크기를 제한하기 위해, < 20 또는 > 1000개의 유전자를 갖는 GO 용어를 필터링하였다. 결과를 추가의 기능적 풍부화 분석을 위한 입력값으로서 사용하기 위해 일반 풍부화 맵 (GEM; generic enrichment map) 포맷으로 다운로드하였다.

[0273] 인리치먼트맵(v3.3.1) 및 오토애노테이트(v1.3.3) 앱으로 시토스케이프(v3.8.2)를 사용하여 5종 주요 세포 유형의 DEG (Ex/In/Astro/Micro/Oligo)로부터의 GO 풍부화 결과를 통합하고, 가시화하였다. g:프로파일러로 수득된 통계적으로 유의한 GO & KEGG 용어의 목록을 하기 파라미터와 함께 시토스케이프로 불러왔다: 노드(GO/KEGG 용어) 컷-오프를 조정된 p-값 < 0.05 및 FDR q-값 < 0.1로 설정하였고; 에지 (각각의 노드의 유전자 목록 사이의 유사성을 나타냄)는 0.375의 유사성 역치를 사용하였다. 각각의 노드는 각각의 세포 클러스터로부터의 DEG의 공통적이고 상이한 기여를 설명하기 위해 세포 유형에 의해 색상 코딩된다. 오토애노테이트를 사용하여 풍부화 지도에 자동으로 주석을 달고, 워드쿨드(WordCould) 앱을 사용하여 각각의 클러스터의 3-단어 표지를 생성시켰다.

[0274] SynGO 풍부화 도구를 사용하여 흥분성 뉴런, 억제 뉴런, 및 타우 병리상태를 갖는 CA1 세포로부터의 DEG로 풍부화된 시냅스 기능을 추가로 특징화하였다. 뇌 발현된 유전자를 배경 유전자 목록으로 사용하였다.

[0275] 참고문헌

1. Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica. 82*, 239–259.

2. Busche, M.A., and Hyman, B.T. (2020). Synergy between amyloid-β and tau in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience. 23*, 1183–1193.

3. Cao, J., Spielmann, M., Qiu, X., Huang, X., Ibrahim, D.M., Hill, A.J., Zhang, F., Mundlos, S., Christiansen, L., Steemers, F.J., *et al.* (2019). The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature. 566*, 496–502.

4. Chen, W.-T., Lu, A., Craessaerts, K., Pavie, B., Sala Frigerio, C., Corthout, N., Qian, X., Laláková, J., Kühnemund, M., Voytyuk, I., *et al.* (2020). Spatial Transcriptomics and In Situ Sequencing to Study Alzheimer's Disease. *Cell. 182*, 976–991.e19.

5. Grubman, A., Chew, G., Ouyang, J.F., Sun, G., Choo, X.Y., McLean, C., Simmons, R.K., Buckberry, S., Vargas-Landin, D.B., Poppe, D., *et al.* (2019). A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nat. Neurosci. 22*, 2087–2097.

6. Grueninger, F., Bohrmann, B., Czech, C., Ballard, T.M., Frey, J.R., Weidensteiner, C., von Kienlin, M., and Ozmen, L. (2010). Phosphorylation of Tau at S422 is enhanced by Aβ in TauPS2APP triple transgenic mice. *Neurobiol. Dis. 37*, 294–306.

7. Habib, N., McCabe, C., Medina, S., Varshavsky, M., Kitsberg, D., Dvir-Szternfeld, R., Green, G., Dionne, D., Nguyen, L., Marshall, J.L., *et al.* (2020). Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nat. Neurosci. 23*, 701–706.

8. Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science. 297*, 353–356.

9. Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T.K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., *et al.* (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell. 169*, 1276–1290.e17.

10. Lau, S.-F., Cao, H., Fu, A.K.Y., and Ip, N.Y. (2020). Single-nucleus transcriptome analysis reveals dysregulation of angiogenic endothelial cells and neuroprotective glia in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences. 117*, 25800–25809.

[0276]

11. Lee, S.-H., Meilandt, W.J., Xie, L., Gandham, V.D., Ngu, H., Barck, K.H., Rezzonico, M.G., Imperio, J., Lalehzadeh, G., Huntley, M.A., *et al.* (2021). Trem2 restrains the enhancement of tau accumulation and neurodegeneration by β-amyloid pathology. *Neuron. 109*, 1283–1301.e6.

12. Masters, C.L., Bateman, R., Blennow, K., Rowe, C.C., Sperling, R.A., and Cummings, J.L. (2015). Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers. 1*, 15056.

13. Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J.Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., *et al.* (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature. 570*, 332–337.

14. McInnes, L., Healy, J., Saul, N., and Großberger, L. (2018). UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection. *Journal of Open Source Software. 3*, 861.

15. Ståhl, P.L., Salmén, F., Vickovic, S., Lundmark, A., Navarro, J.F., Magnusson, J., Giacomello, S., Asp, M., Westholm, J.O., Huss, M., *et al.* (2016). Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science. 353*, 78–82.

16. Stuart, T., and Satija, R. (2019). Integrative single-cell analysis. *Nat. Rev. Genet. 20*, 257–272.

17. Traag, V.A., Waltman, L., and van Eck, N.J. (2019). From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. *Sci. Rep. 9*, 5233.

18. Wang, X., Allen, W.E., Wright, M.A., Sylwestrak, E.L., Samusik, N., Vesuna, S., Evans, K., Liu, C., Ramakrishnan, C., Liu, J., *et al.* (2018). Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science. 361*.

19. Zhou, Y., Song, W.M., Andhey, P.S., Swain, A., Levy, T., Miller, K.R., Poliani, P.L., Cominelli, M., Grover, S., Gilfillan, S., *et al.* (2020). Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nat. Med. 26*, 131–142.

[0277]

[0278] 참조로서 포함됨

[0279] 본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개된 특허 출원, 과학 학술지 논문, 및 다른 공개물을 언급하며, 이들 모두는 본원에 참조로서 포함된다. 본 발명의 하나 이상의 실시양태의 세부사항이 본원에 제시된다. 본 발명의 다른 특색, 목적 및 이점은 상세한 설명, 도면, 실시예 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

[0280] 등가물 및 범주

[0281] 단수형태는 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 포함하는 실시양태 또는 기재는 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 군 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 경우에 충족된 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 실시양태를 포함한다. 본 발명은 군 구성원 중 하나 초과 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 실시양태를 포함한다.

[0282] 또한, 본 개시내용은 열거된 청구항 중 하나 이상으로부터의 하나 이상의 제한, 요소, 조항 및 서술적 용어가 또 다른 청구항에 도입된 모든 변형, 조합 및 순열을 포괄한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 종속항인 임의의 청구항은 동일한 기본 청구항에 종속항인 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 요소가 목록으로서, 예를 들어 마쿠쉬 군 포맷으로 제시된 경우, 요소의 각각의 하위군이 또한 개시되며, 임의의 요소(들)가 군으로부터 제거될 수 있다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발명의 측면이 특정한 요소 및/또는 특색을 포함하는 것으로 언급되는 경우에, 본 개시내용의 특정 실시양태 또는 본 개시내용의 측면은 이러한 요소 및/또는 특색으로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 단순성의 목적을 위해, 이들 실시양태는 본원에 구체적으로 제시되지 않았다. 또한, 용어 "포함하는" 및 "함유하는"은 개방적이고 추가의 요소 또는 단계의 포함을 허용하는 것으로 의도됨에 주목한다. 범위가 주어지는 경우,

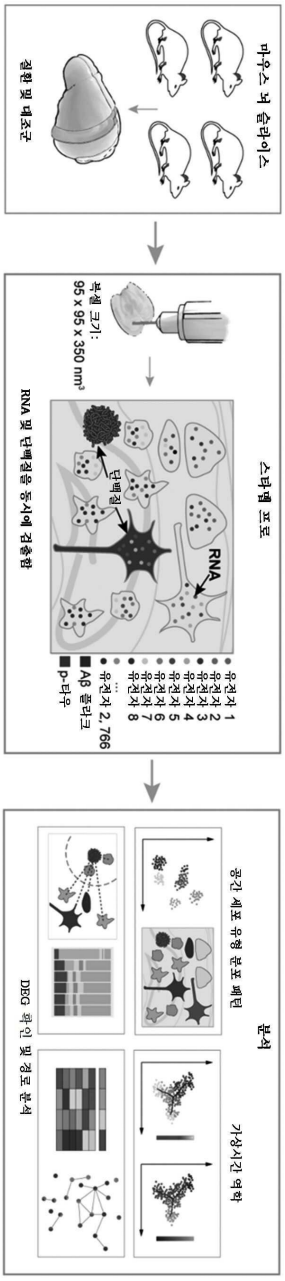
종점이 포함된다. 또한, 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥 및 관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해로부터 명백하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은 본 발명의 상이한 실시양태에서 언급된 범위 내의 임의의 구체적 값 또는 하위범위를, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 범위의 하한치 단위의 1/10까지 가정할 수 있다.

[0283] 본 출원은 다양한 허여된 특허, 공개 특허 출원, 학술지 논문 및 다른 공개물을 언급하며, 이들 모두는 본원에 참조로서 포함된다. 임의의 포함된 참고문헌과 본 명세서 사이에 상충이 존재하는 경우, 본 명세서가 우선할 것이다. 또한, 선행 기술에 속하는 본 발명의 임의의 특정한 실시양태는 실시양태 중 어느 하나 이상으로부터 명백하게 배제될 수 있다. 이러한 실시양태는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 것으로 여겨지기 때문에, 이들은 배제가 본원에 명백하게 제시되지 않더라도 배제될 수 있다. 본 발명의 임의의 특정한 실시양태는 선행 기술의 존재와 관련되든 관련되지 않든 임의의 이유로 임의의 실시양태로부터 배제될 수 있다.

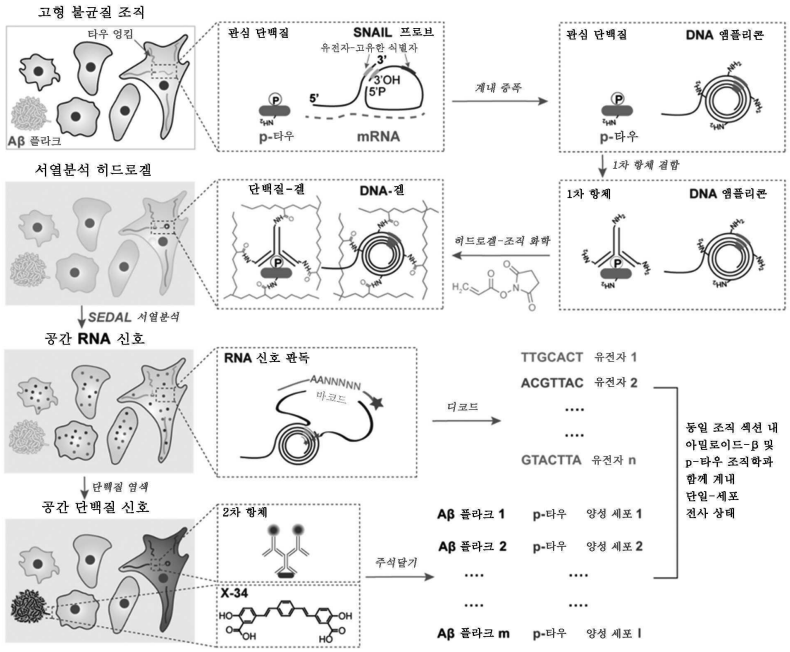
[0284] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험만을 사용하여 본원에 기재된 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태의 범주는 상기 설명에 제한되는 것으로 의도되지 않으며, 오히려 첨부된 실시양태에 제시된 바와 같다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 하기 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 취지 또는 범주로부터 벗어나지 않으면서 본 설명에 대한 다양한 변화 및 변형이 이루어질 수 있음을 인지할 것이다.

도면

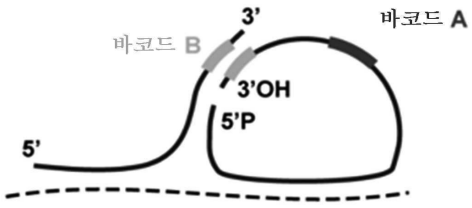
도면1a


마우스 뇌 슬라이스
절편 및 냉동
스파셜 프로
RNA 및 단백질을 동시에 정량화
복셀 크기:
95 x 95 x 350 nm³
덴드라이트
RNA
유전자 1
유전자 2
유전자 3
유전자 4
유전자 5
유전자 6
유전자 7
유전자 8
…
유전자 2,766
Aβ 플라크
p-타우
분석
유전자 발현 공간 패턴
가상시간 궤적
DEG 확인 및 경로 분석

도면1b

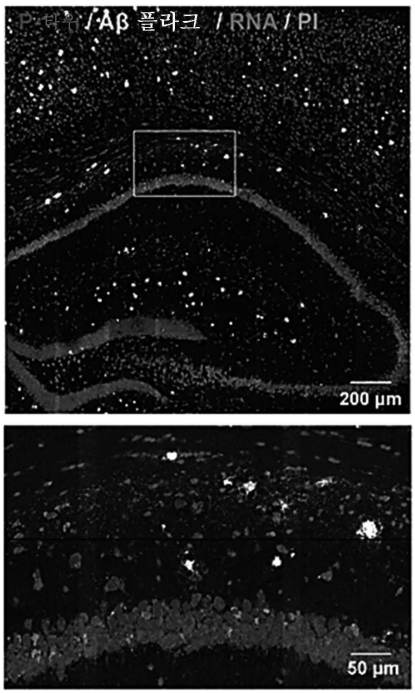


도면1c

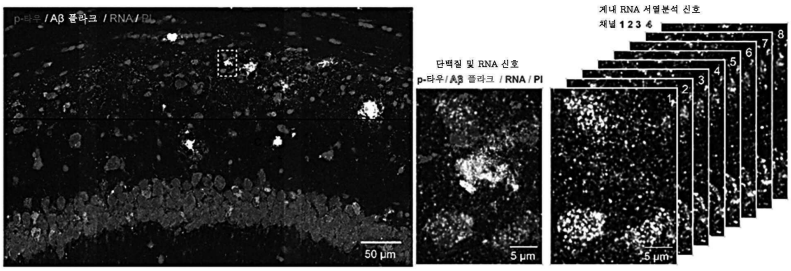


코딩 용량: $4^{10} \approx 10^6$

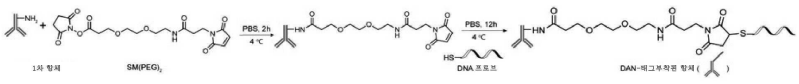
도면1d



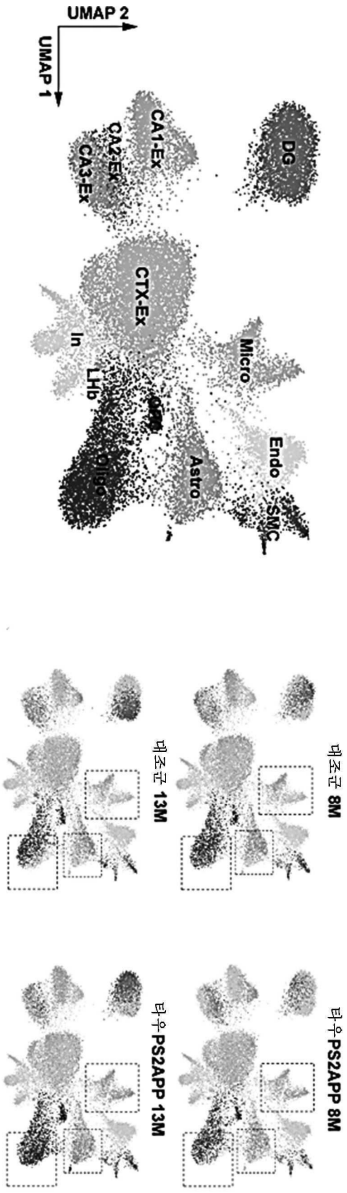
도면1e



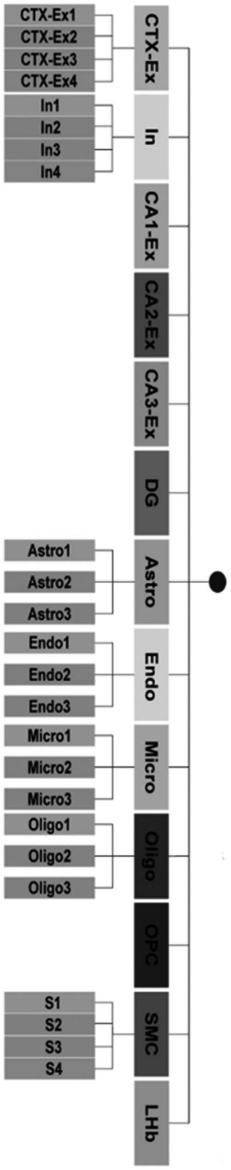
도면1f



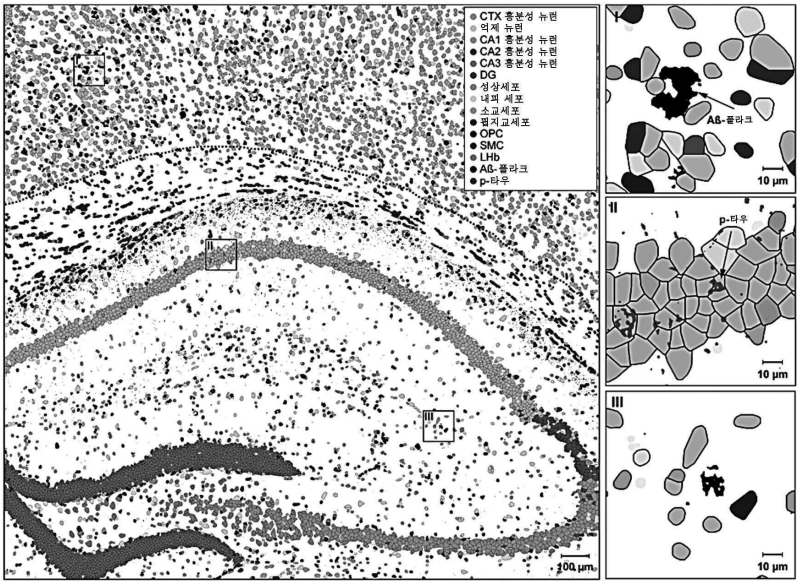
도면2a


UMAP 2
UMAP 1
CA1-Ex
CA2-Ex
CA3-Ex
DG
CTX-Ex
In
LHb
Micro
Endo
SMC
Astro
대조군 8M
대조군 13M
타우PS2APP 8M
타우PS2APP 13M

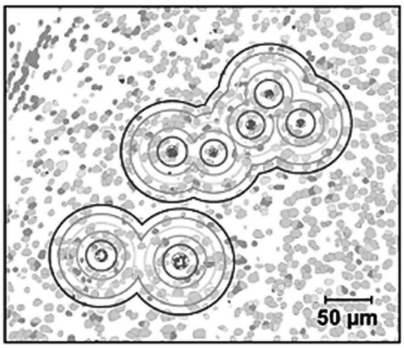
도면2b


CTX-Ex1
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
In1
In2
In3
In4
Astro1
Astro2
Astro3
Endo1
Endo2
Endo3
Micro1
Micro2
Micro3
Oligo1
Oligo2
Oligo3
S1
S2
S3
S4
CTX-Ex
In
CA1-Ex
CA2-Ex
CA3-Ex
DG
Astro
Endo
Micro
Oligo
OPC
SMC
LHb

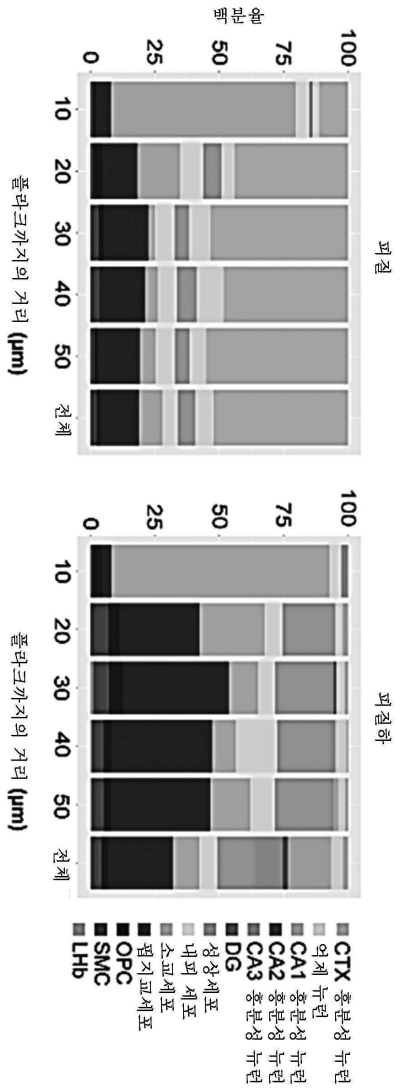
도면2c


CTX 흥분성 뉴런
억제 뉴런
CA1 흥분성 뉴런
CA2 흥분성 뉴런
CA3 흥분성 뉴런
DG
성상세포
내피 세포
소교세포
핍지교세포
OPC
SMC
LHb
Aß-플라크
p-타우
100 μm
I
Aß-플라크
10 μm
II
p-타우
10 μm
III
10 μm

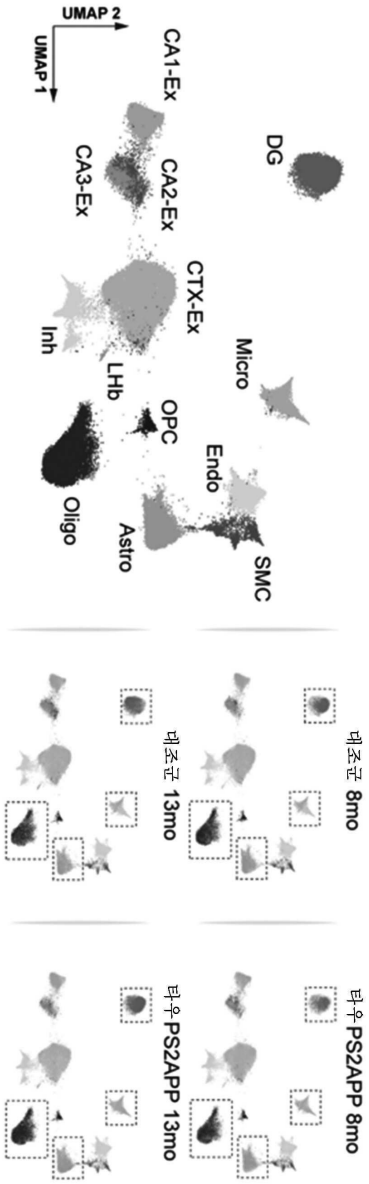
도면2d


50 μm

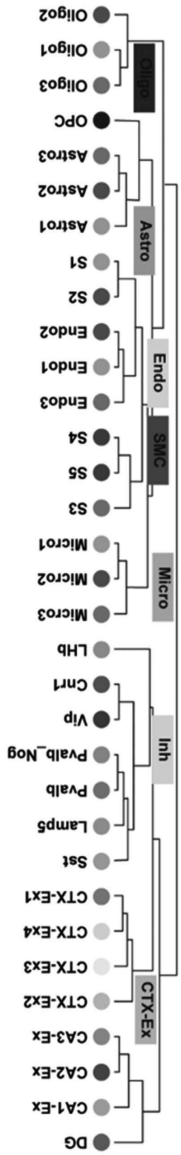
도면2e


피질
피질하
백분율
100
75
50
25
0
10
20
30
40
50
전체
플라크까지의 거리 (μm)
CTX 흥분성 뉴런
억제 뉴런
CA1 흥분성 뉴런
CA2 흥분성 뉴런
CA3 흥분성 뉴런
DG
성상세포
뇌피 세포
소교세포
핍지교세포
OPC
SMC
LHb

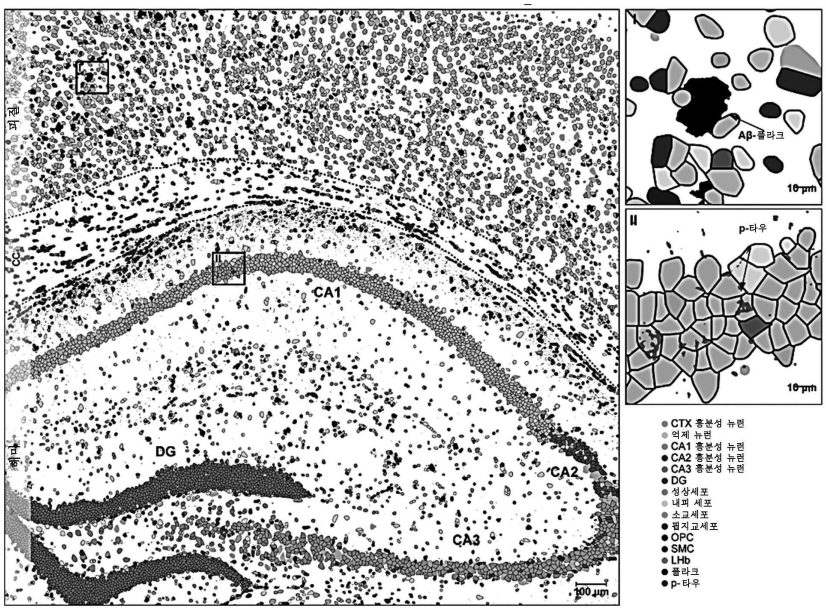
도면2f


UMAP 2
UMAP 1
CA1-Ex
CA3-Ex
CA2-Ex
DG
CTX-Ex
Inh
LHb
Micro
OPC
Endo
Oligo
Astro
SMC
대조군 8mo
대조군 13mo
타우PS2APP 8mo
타우PS2APP 13mo

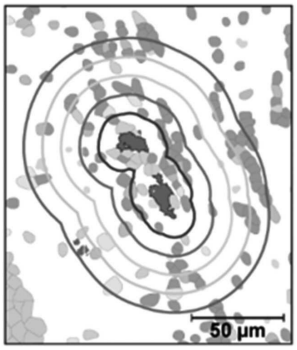
도면2g


Oligo2
Oligo1
Oligo3
OPC
Astro3
Astro2
Astro1
S1
S2
Endo2
Endo1
Endo3
S4
S5
S3
Micro1
Micro2
Micro3
LHb
Cnr1
Vip
Pvalb_Nog
Pvalb
Lamp5
Sst
CTX-Ex1
CTX-Ex4
CTX-Ex3
CTX-Ex2
CA3-Ex
CA2-Ex
CA1-Ex
DG
Oligo
Astro
Endo
SMC
Micro
Inh
CTX-Ex

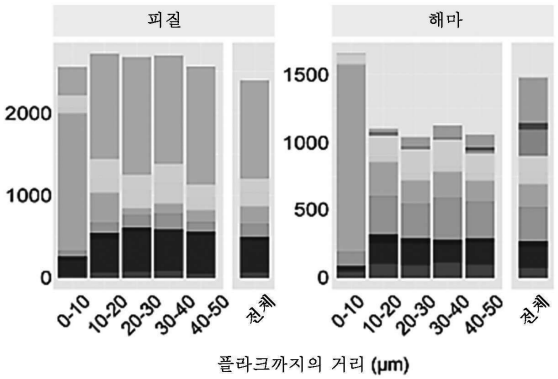
도면2h



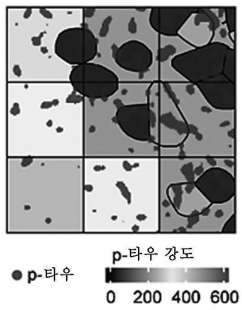
도면2i



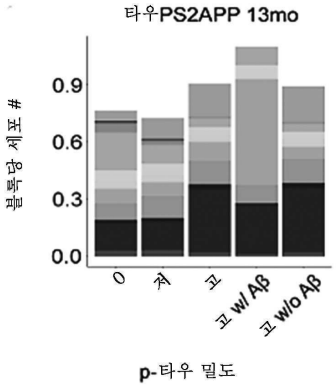
도면2j



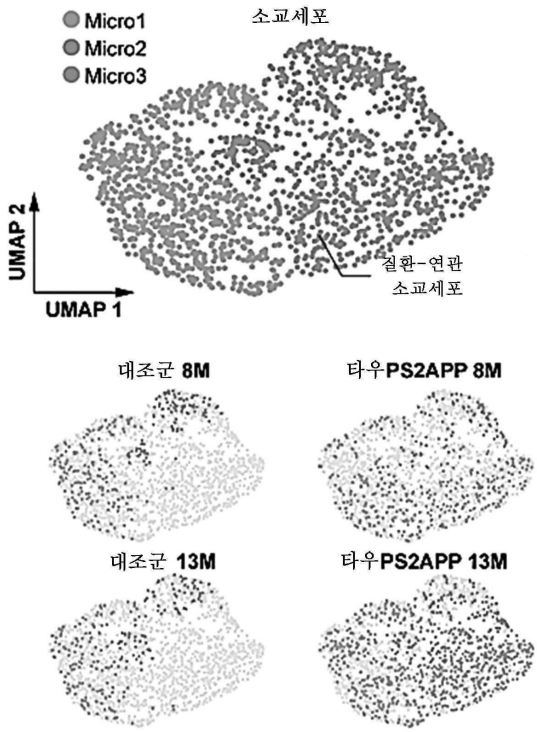
도면2k



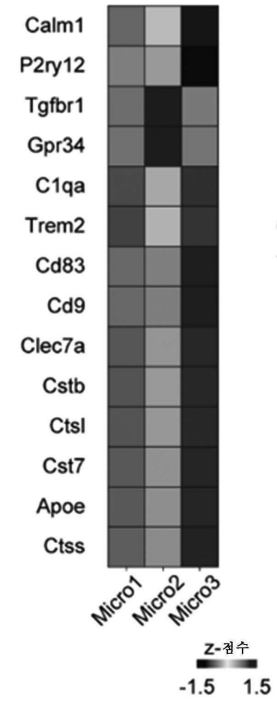
도면21



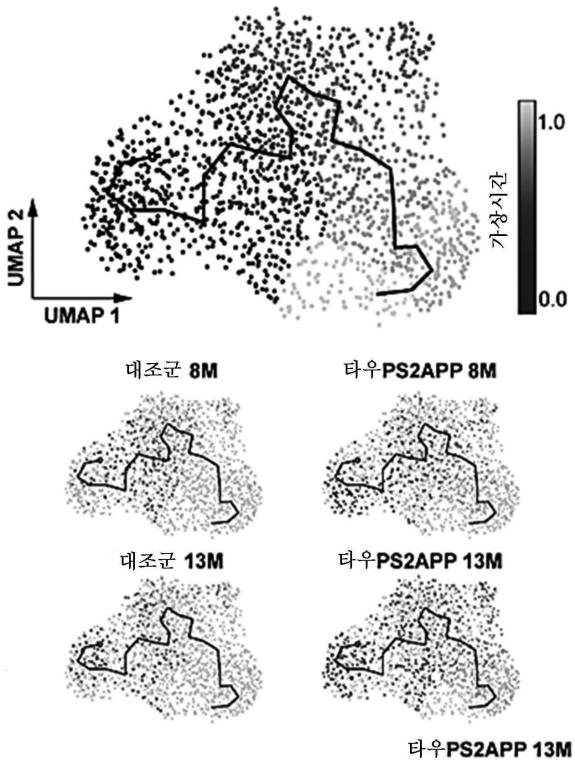
도면3a



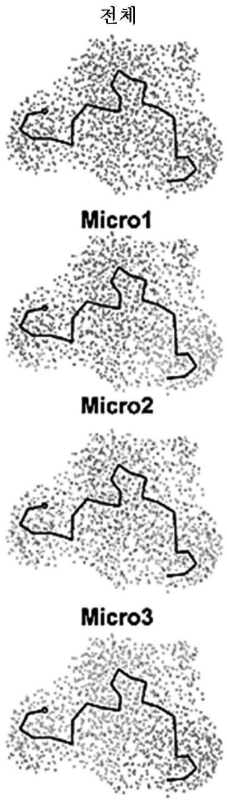
도면3b


Calm1
P2ry12
Tgfbr1
Gpr34
C1qa
Trem2
Cd83
Cd9
Clec7a
Cstb
Ctsl
Cst7
Apoe
Ctss
Micro1
Micro2
Micro3
Z-점수
-1.5
1.5

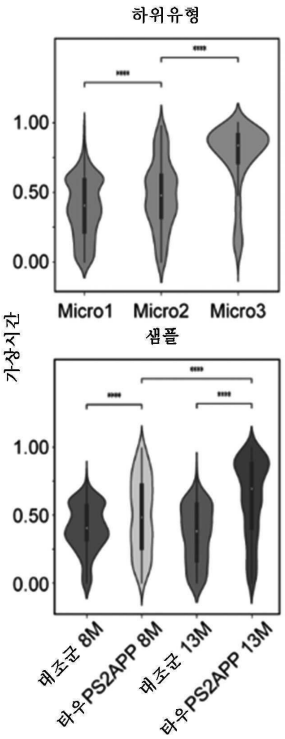
도면3c


UMAP 2
UMAP 1
가상시간
1.0
0.0
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M
타우PS2APP 13M

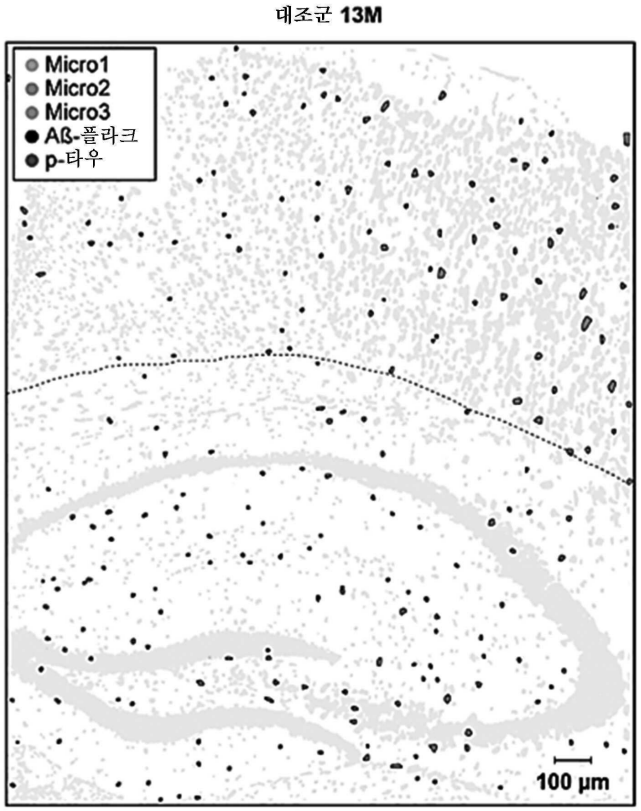
도면3d


전체
Micro1
Micro2
Micro3

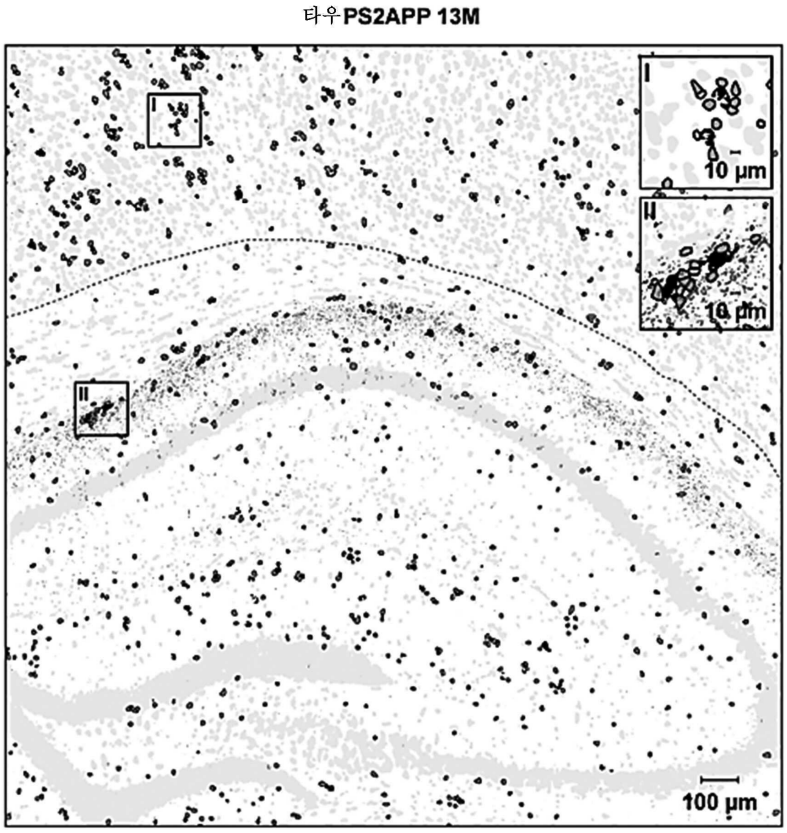
도면3e


하위유형
1.00
0.50
0.00
Micro1
Micro2
Micro3
샘플
가상시간
1.00
0.50
0.00
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M

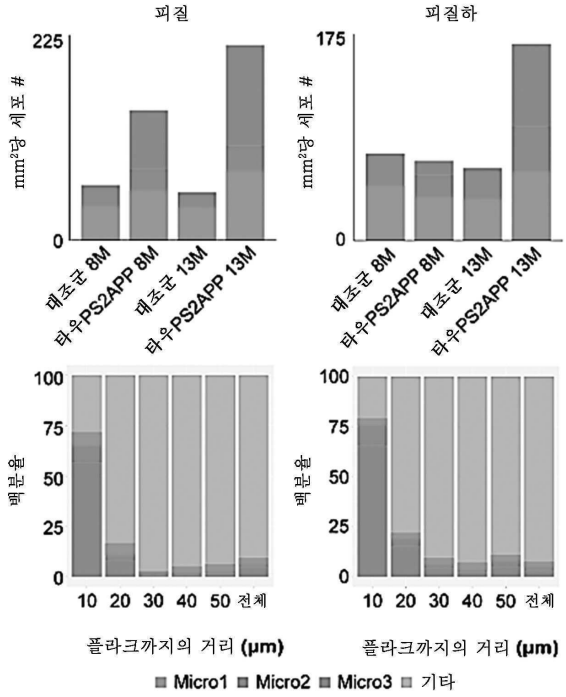
도면3f


대조군 13M
Micro1
Micro2
Micro3
Aß-플라크
p-타우
100 μm

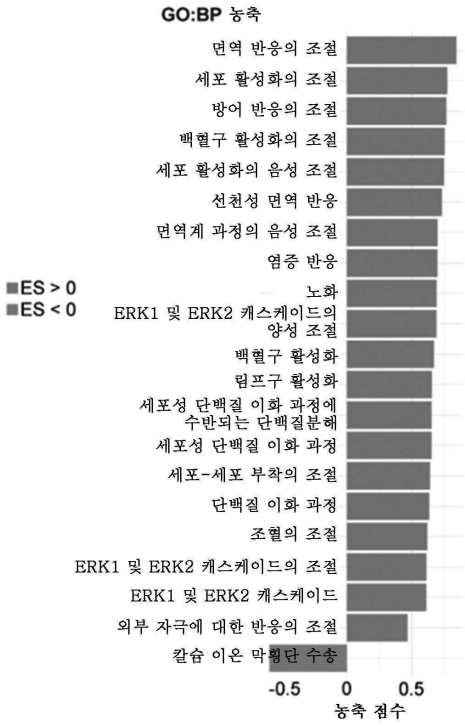
도면3g


타우PS2APP 13M
I
II
10 μm
10 μm
100 μm

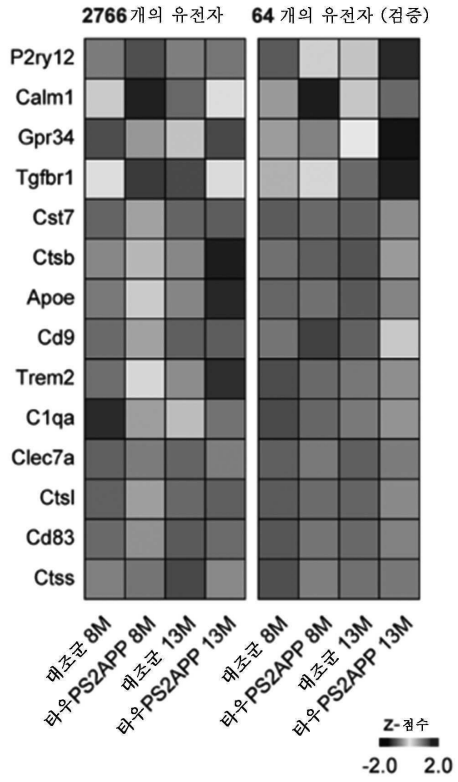
도면3h


피질
피질하
225
175
0
mm²당 세포 #
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M
100
75
50
25
0
백분율
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)
Micro1 Micro2 Micro3 기타

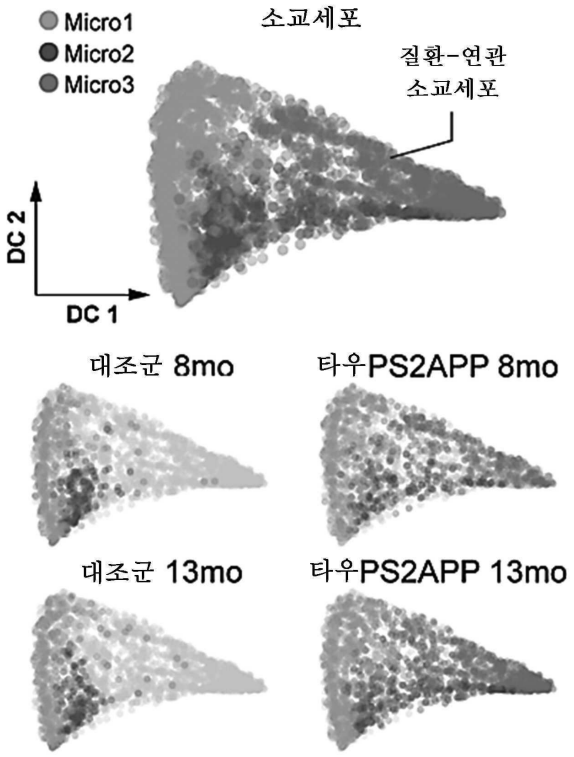
도면3i


GO:BP 농축
면역 반응의 조절
세포 활성화의 조절
방어 반응의 조절
백혈구 활성화의 조절
세포 활성화의 음성 조절
선천성 면역 반응
면역계 과정의 음성 조절
염증 반응
노화
ERK1 및 ERK2 캐스케이드의 양성 조절
백혈구 활성화
림프구 활성화
세포성 단백질 이화 과정에 수반되는 단백질분해
세포성 단백질 이화 과정
세포-세포 부착의 조절
단백질 이화 과정
조혈의 조절
ERK1 및 ERK2 캐스케이드의 조절
ERK1 및 ERK2 캐스케이드
외부 자극에 대한 반응의 조절
칼슘 이온 막횡단 수송
ES > 0
ES < 0
-0.5
0
0.5
농축 점수

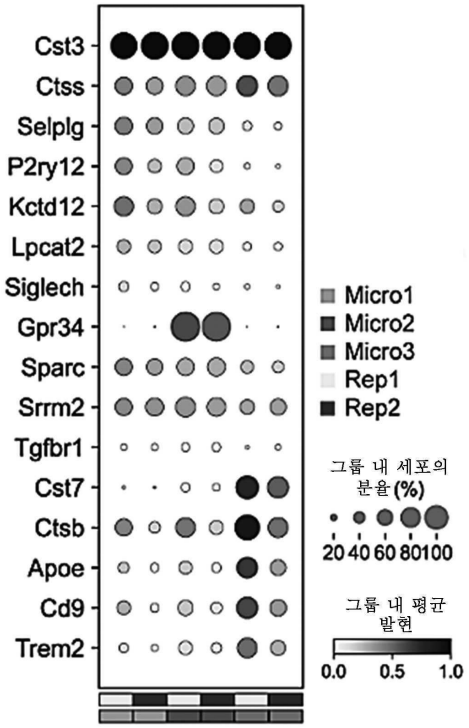
도면3j


2766개의 유전자
64 개의 유전자 (검증)
P2ry12
Calm1
Gpr34
Tgfbr1
Cst7
Ctsb
Apoe
Cd9
Trem2
C1qa
Clec7a
Ctsl
Cd83
Ctss
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M
Z-점수
-2.0
2.0

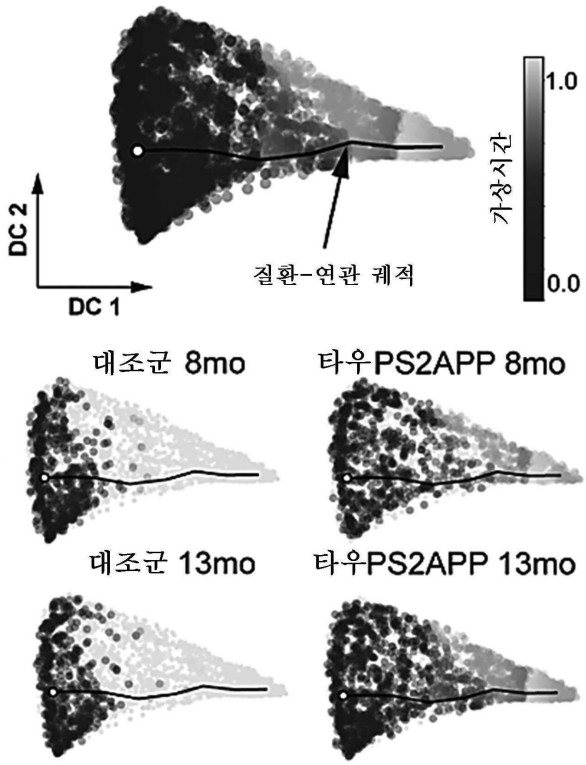
도면3k


Micro1
Micro2
Micro3
소교세포
질환-연관
소교세포
DC 2
DC 1
대조군 8mo
타우PS2APP 8mo
대조군 13mo
타우PS2APP 13mo

도면31


Cst3
Ctss
Selplg
P2ry12
Kctd12
Lpcat2
Siglech
Gpr34
Sparc
Srrm2
Tgfbr1
Cst7
Ctsb
Apoe
Cd9
Trem2
Micro1
Micro2
Micro3
Rep1
Rep2
그룹 내 세포의 분율(%)
20 40 60 80 100
그룹 내 평균 발현
0.0 0.5 1.0

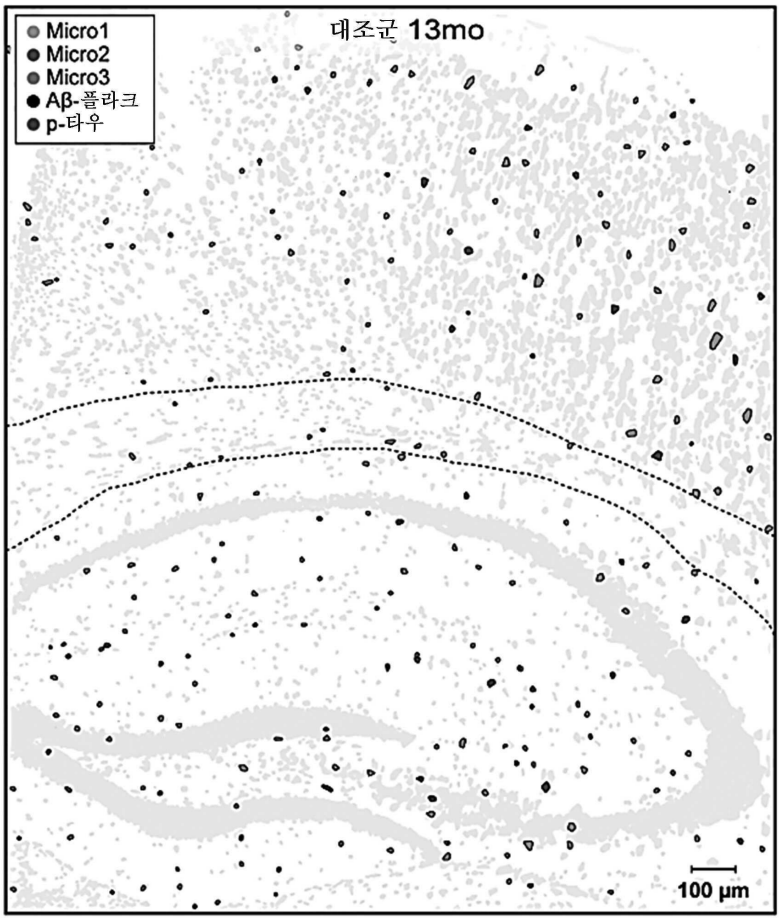
도면3m


DC 2
DC 1
질환-연관 궤적
가상시간
1.0
0.0
대조군 8mo
타우PS2APP 8mo
대조군 13mo
타우PS2APP 13mo

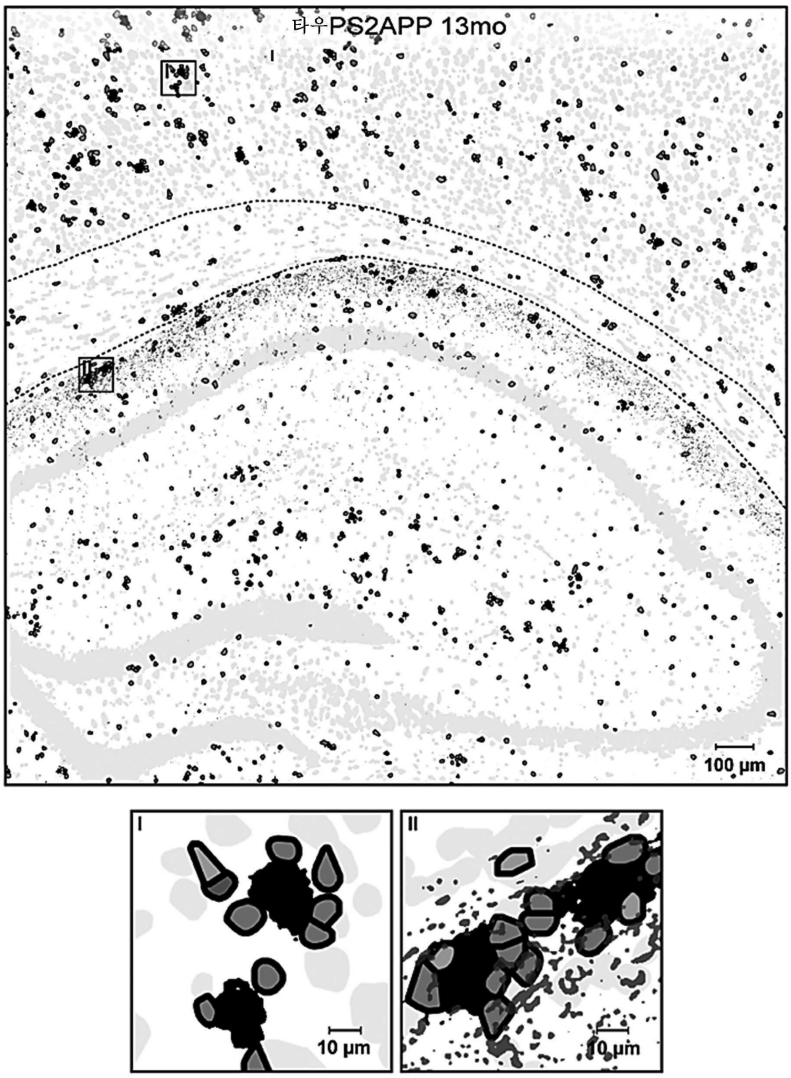
도면3n



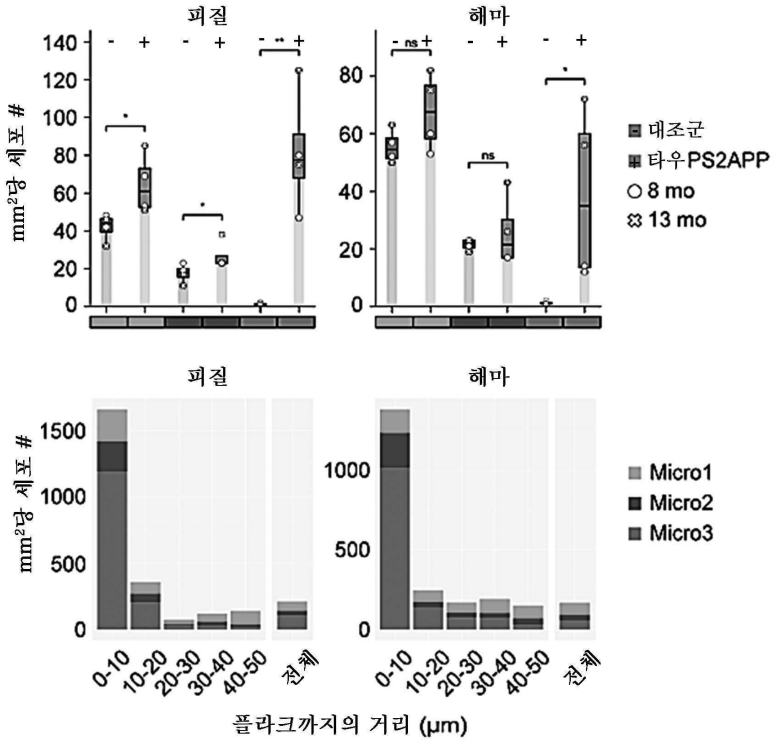
도면30



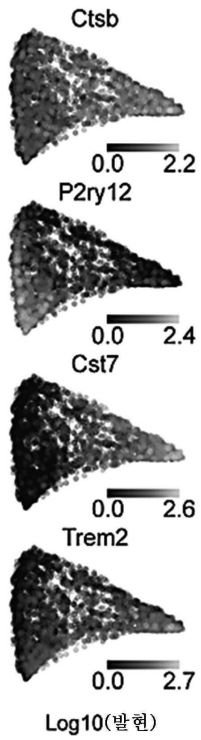
도면3p



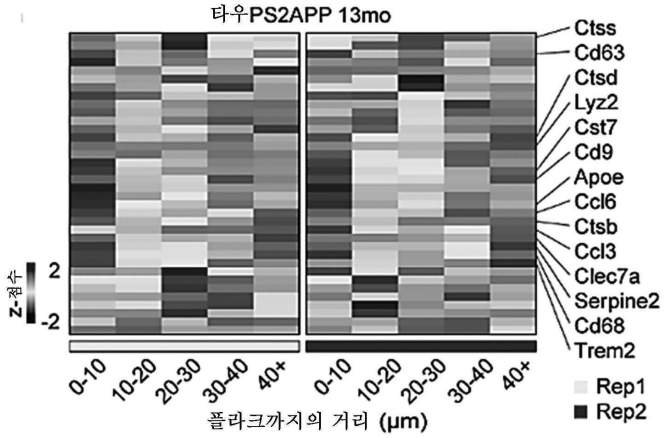
도면3q


피질
해마
mm²당 세포 #
대조군
타우PS2APP
8 mo
13 mo
Micro1
Micro2
Micro3
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
전체
플라크까지의 거리 (μm)

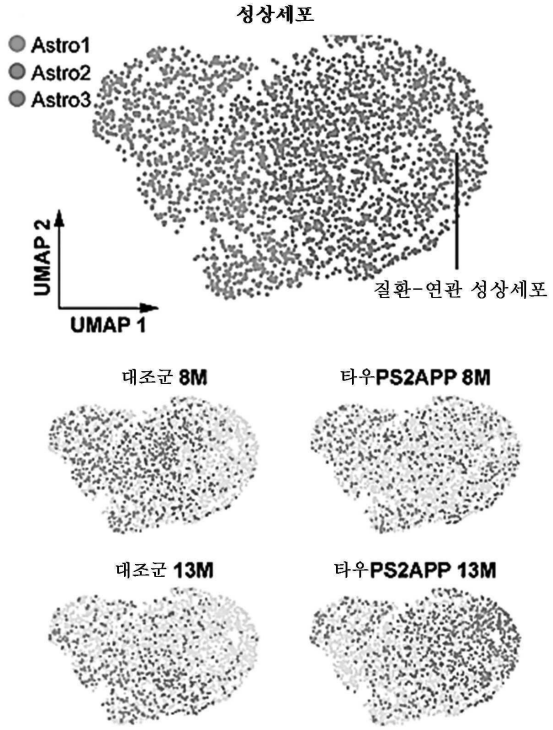
도면3r


Ctsb
0.0 2.2
P2ry12
0.0 2.4
Cst7
0.0 2.6
Trem2
0.0 2.7
Log10(발현)

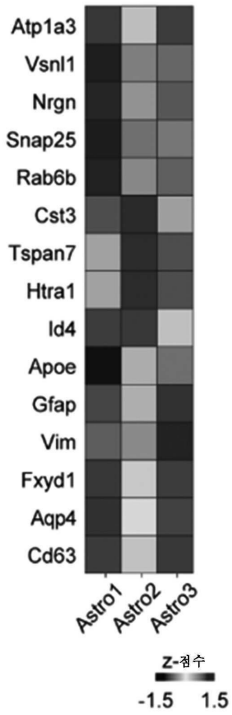
도면3s


타우PS2APP 13mo
Ctss
Cd63
Ctsd
Lyz2
Cst7
Cd9
Apoe
Ccl6
Ctsb
Ccl3
Clec7a
Serpine2
Cd68
Trem2
Z-점수
2
-2
0-10
10-20
20-30
30-40
40+
Rep1
Rep2
플라크까지의 거리 (μm)

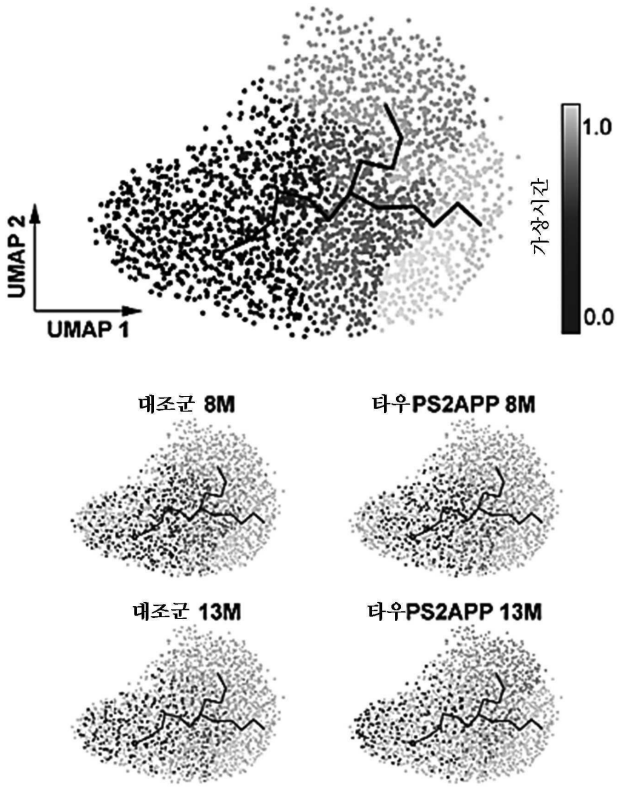
도면4a


성상세포
Astro1
Astro2
Astro3
UMAP 2
UMAP 1
질환-연관 성상세포
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M

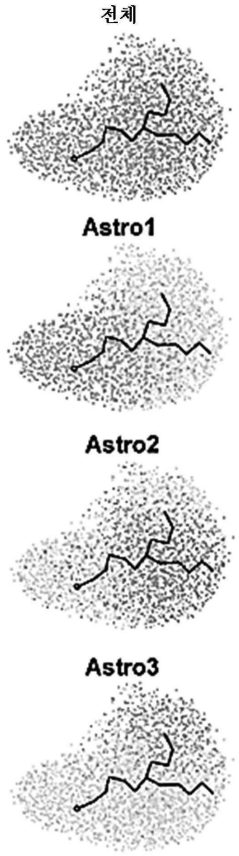
도면4b


Atp1a3
Vsnl1
Nrgn
Snap25
Rab6b
Cst3
Tspan7
Htra1
Id4
Apoe
Gfap
Vim
Fxyd1
Aqp4
Cd63
Astro1
Astro2
Astro3
Z-점수
-1.5
1.5

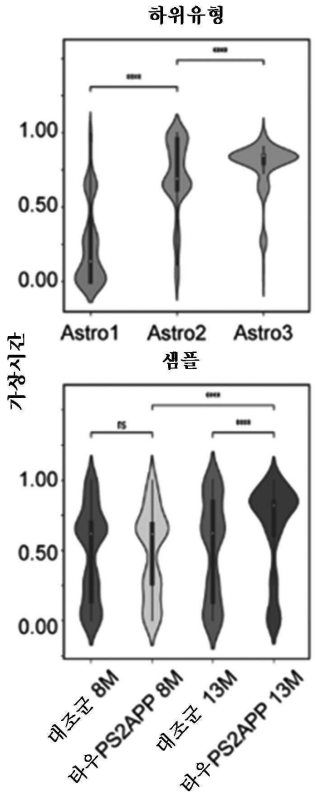
도면4c


UMAP 2
UMAP 1
가상시간
1.0
0.0
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M

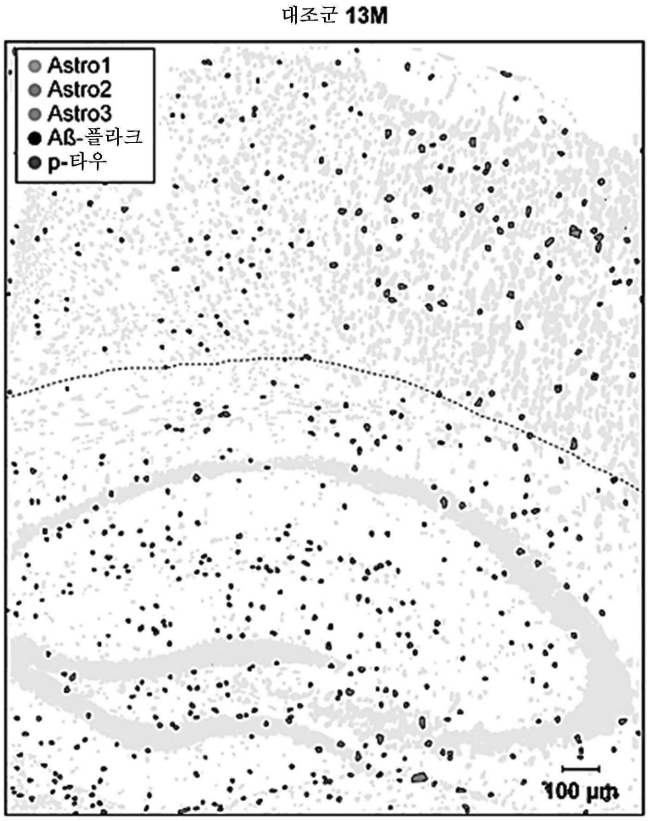
도면4d


전체
Astro1
Astro2
Astro3

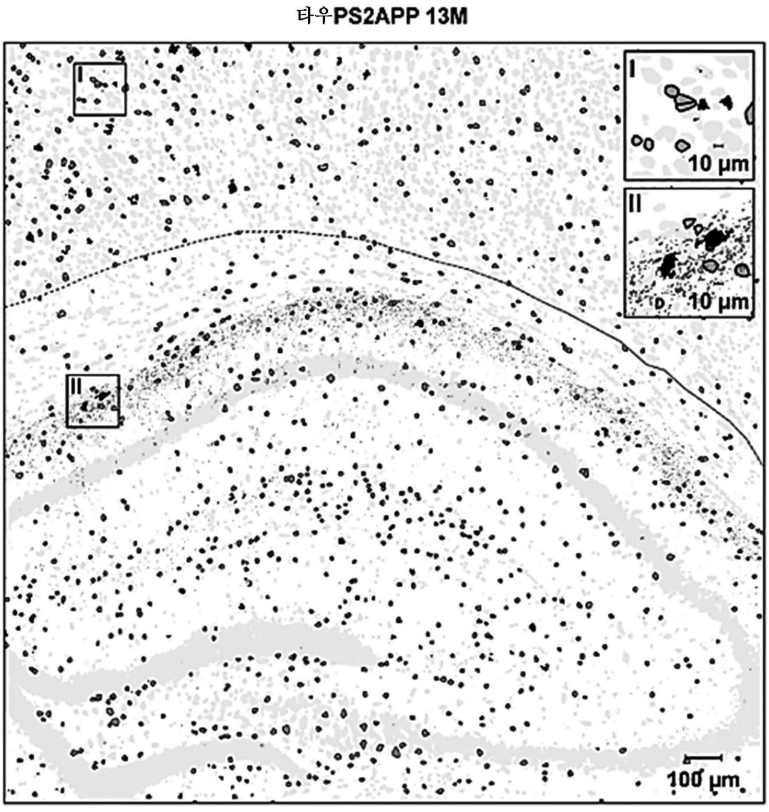
도면4e


하위유형
1.00
0.50
0.00
Astro1
Astro2
Astro3
가상시간
샘플
ns
1.00
0.50
0.00
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M

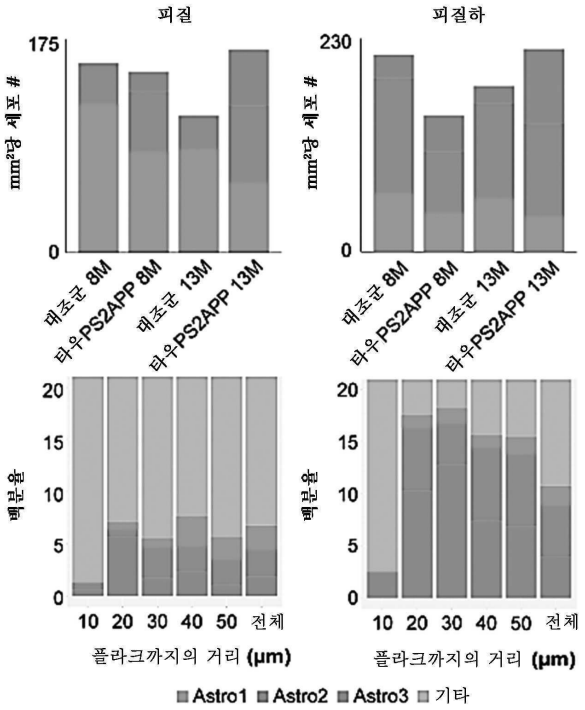
도면4f


대조군 13M
Astro1
Astro2
Astro3
Aß-플라크
p-타우
100 μm

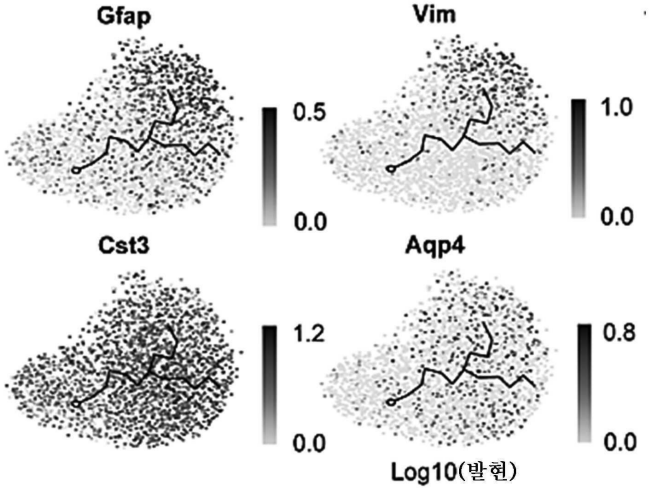
도면4g


타우PS2APP 13M
I
II
I
10 μm
II
10 μm
100 μm

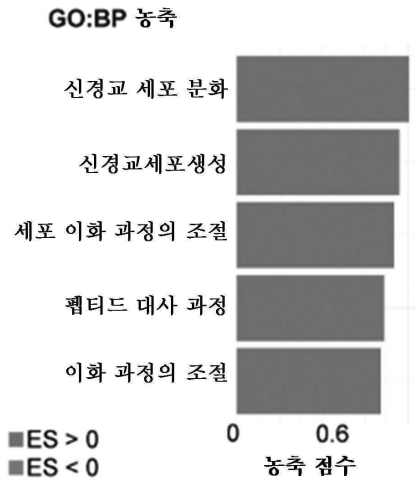
도면4h


피질
피질하
175
230
mm²당 세포 #
0
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M
20
15
10
5
백분율
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)
Astro1 Astro2 Astro3 기타

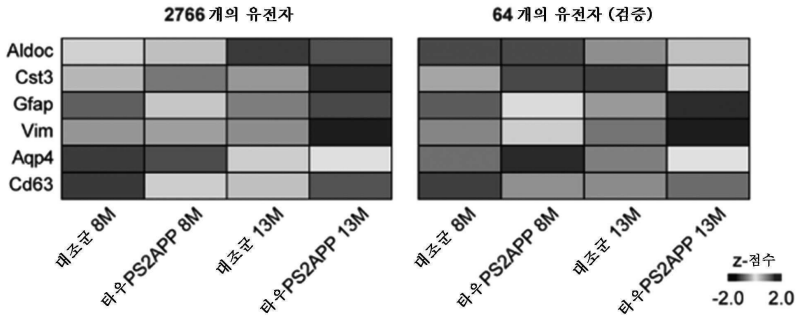
도면4i


Gfap
Vim
Cst3
Aqp4
0.5
0.0
1.0
1.2
0.8
Log10(발현)

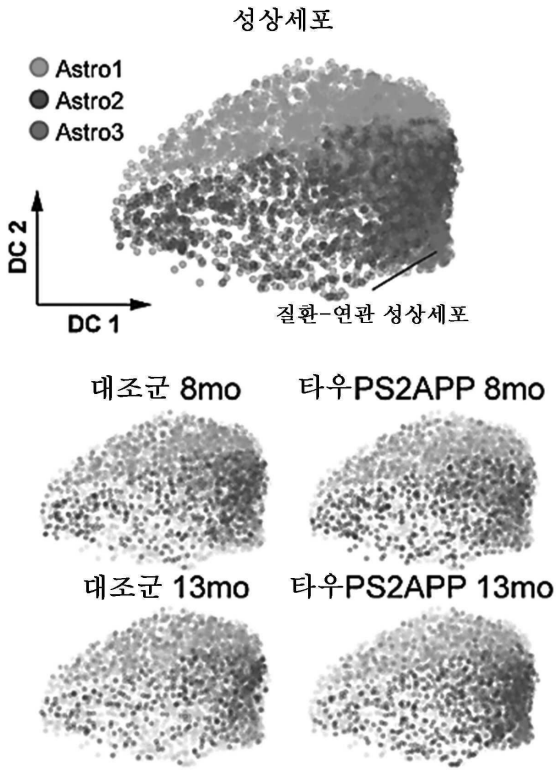
도면4j


GO:BP 농축
신경교 세포 분화
신경교세포생성
세포 이화 과정의 조절
펩티드 대사 과정
이화 과정의 조절
ES > 0
ES < 0
0
0.6
농축 점수

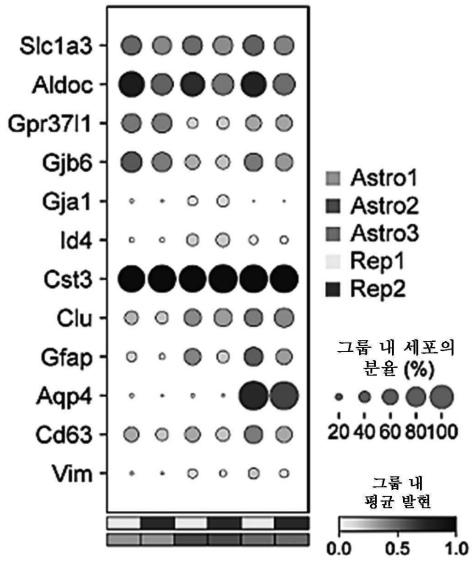
도면4k


2766 개의 유전자
64 개의 유전자 (검증)
Aldoc
Cst3
Gfap
Vim
Aqp4
Cd63
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M
Z-점수
-2.0
2.0

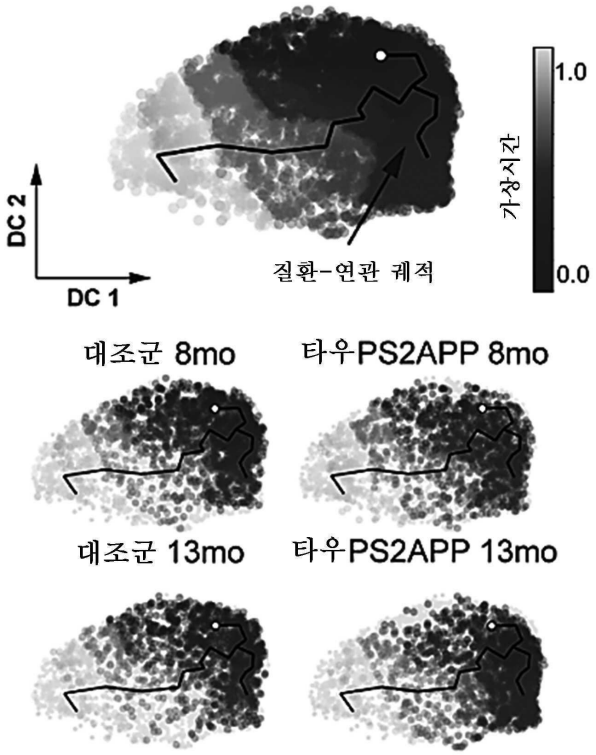
도면41


성상세포
Astro1
Astro2
Astro3
DC 2
DC 1
질환-연관 성상세포
대조군 8mo
타우PS2APP 8mo
대조군 13mo
타우PS2APP 13mo

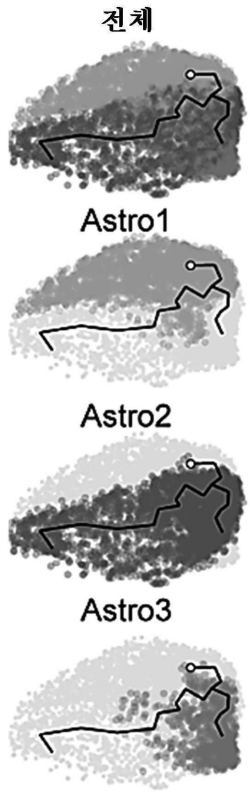
도면4m


Slc1a3
Aldoc
Gpr37l1
Gjb6
Gja1
Id4
Cst3
Clu
Gfap
Aqp4
Cd63
Vim
Astro1
Astro2
Astro3
Rep1
Rep2
그룹 내 세포의 분율 (%)
20 40 60 80 100
그룹 내 평균 발현
0.0 0.5 1.0

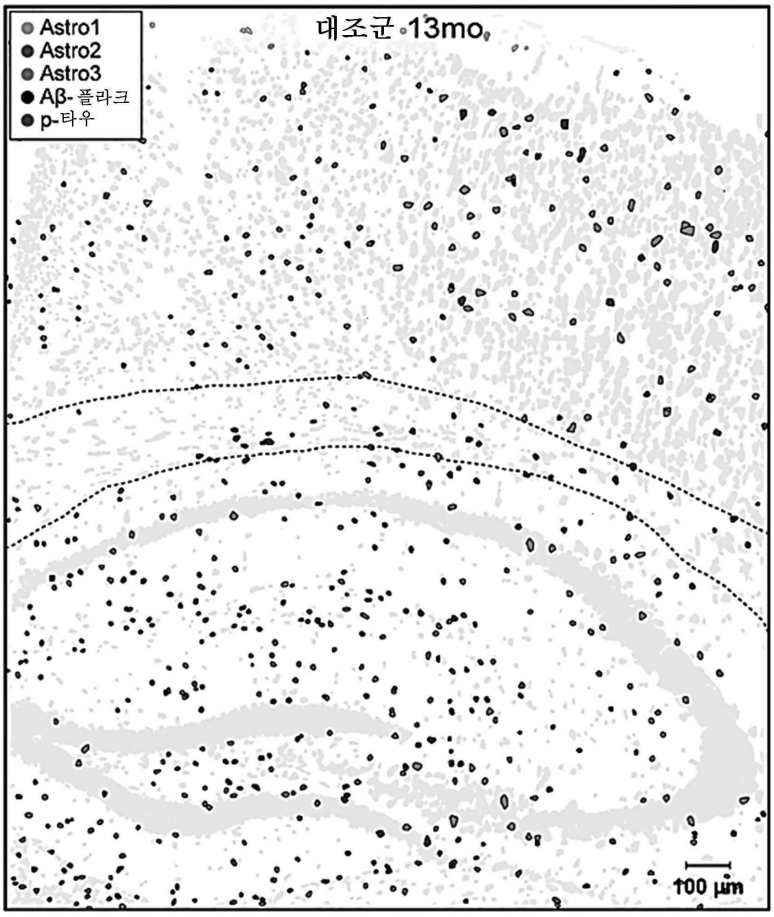
도면4n


DC 2
DC 1
질환-연관 궤적
가상시간
1.0
0.0
대조군 8mo
타우PS2APP 8mo
대조군 13mo
타우PS2APP 13mo

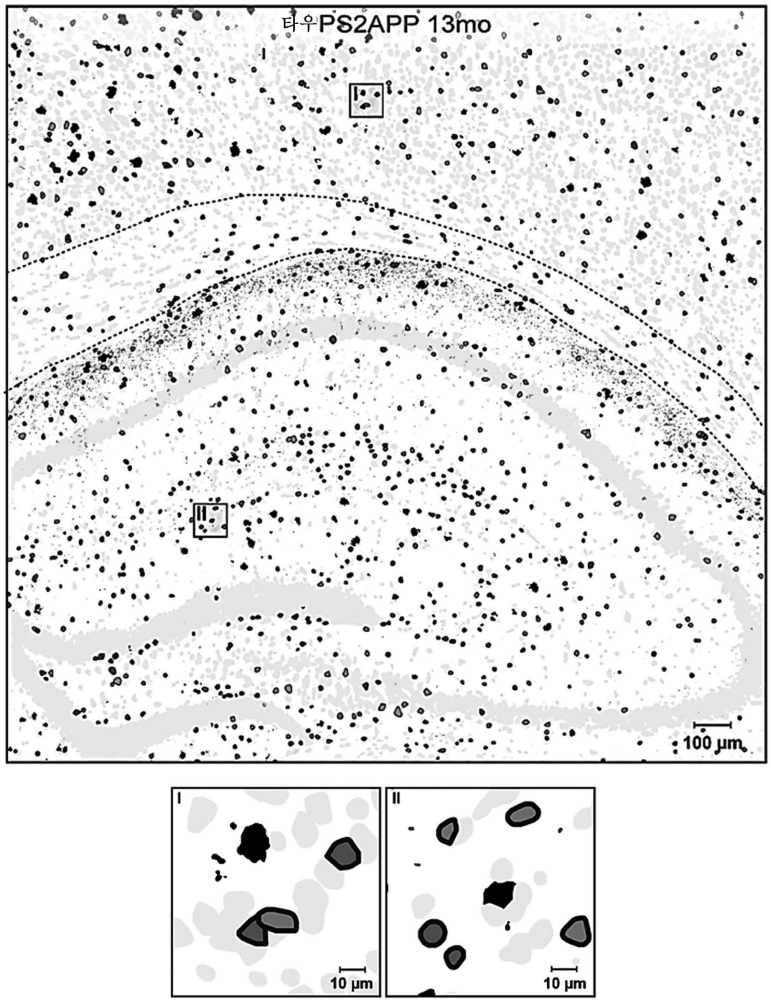
도면4o


전체
Astro1
Astro2
Astro3

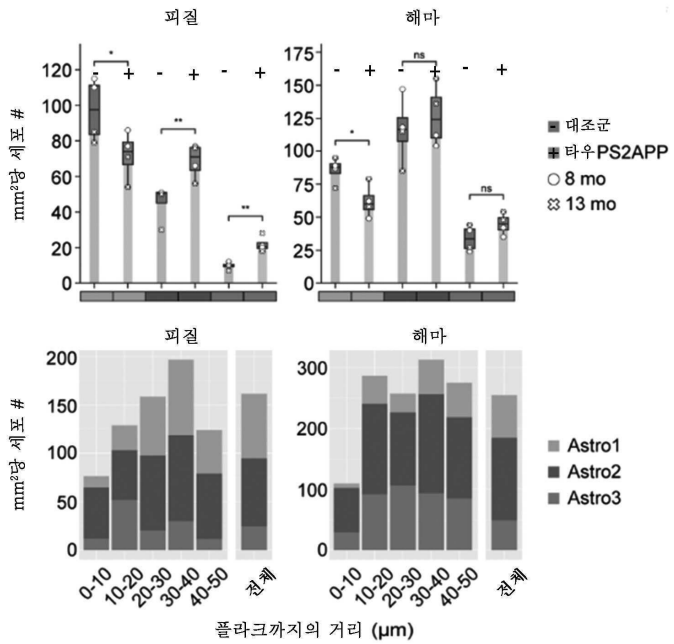
도면4p



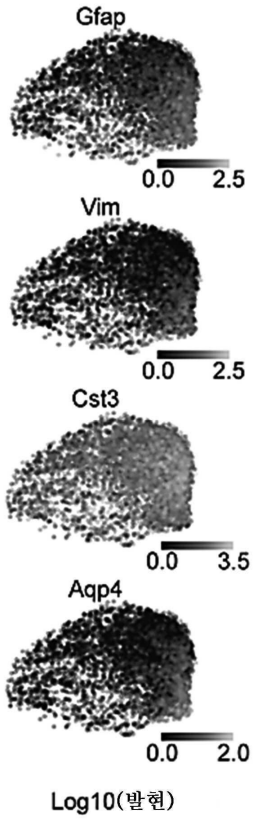
도면4q


타우PS2APP 13mo
I
II
100 μm
I
10 μm
II
10 μm

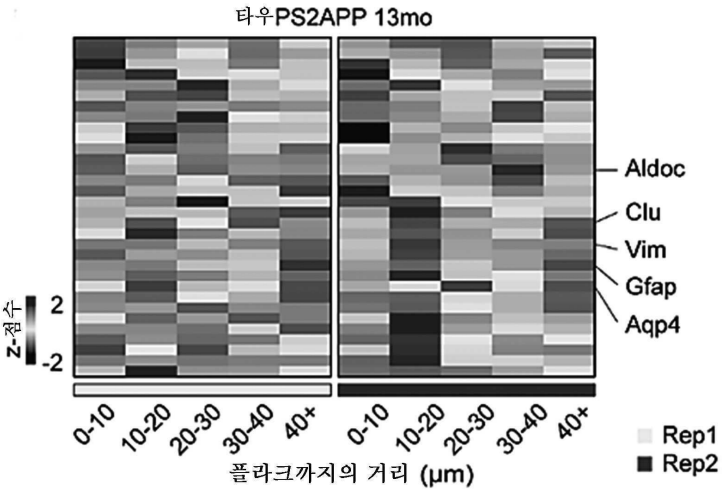
도면4r


피질
해마
mm²당 세포 #
대조군
타우PS2APP
8 mo
13 mo
Astro1
Astro2
Astro3
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
전체
플라크까지의 거리 (μm)

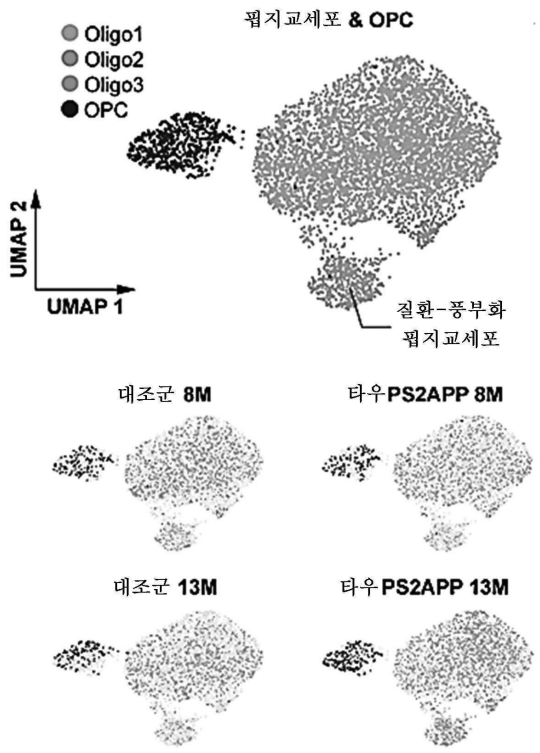
도면4s


Gfap
0.0
2.5
Vim
0.0
2.5
Cst3
0.0
3.5
Aqp4
0.0
2.0
Log10(발현)

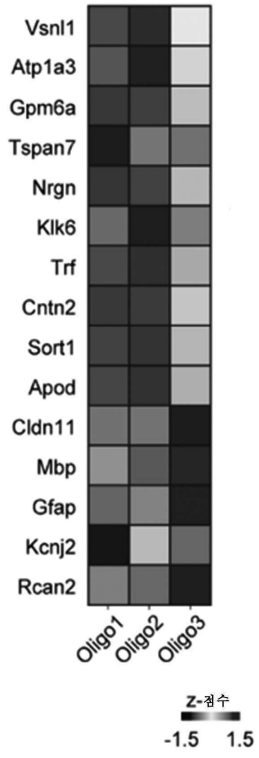
도면4t


타우PS2APP 13mo
Aldoc
Clu
Vim
Gfap
Aqp4
z-점수
2
-2
0-10
10-20
20-30
30-40
40+
0-10
10-20
20-30
30-40
40+
Rep1
Rep2
플라크까지의 거리 (μm)

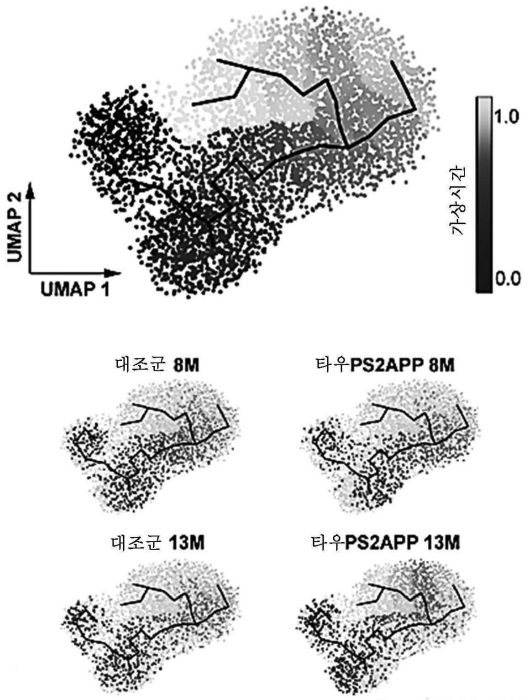
도면5a


핍지교세포 & OPC
Oligo1
Oligo2
Oligo3
OPC
UMAP 2
UMAP 1
질환-풍부화
핍지교세포
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M

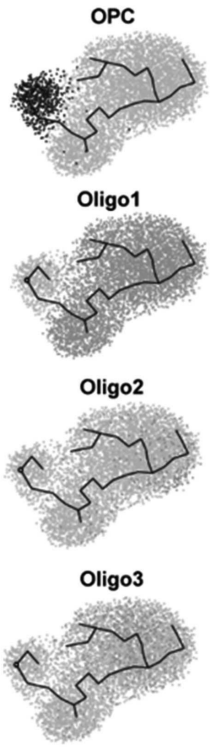
도면5b


Vsnl1
Atp1a3
Gpm6a
Tspan7
Nrgn
Klk6
Trf
Cntn2
Sort1
Apod
Cldn11
Mbp
Gfap
Kcnj2
Rcan2
Oligo1
Oligo2
Oligo3
Z-점수
-1.5
1.5

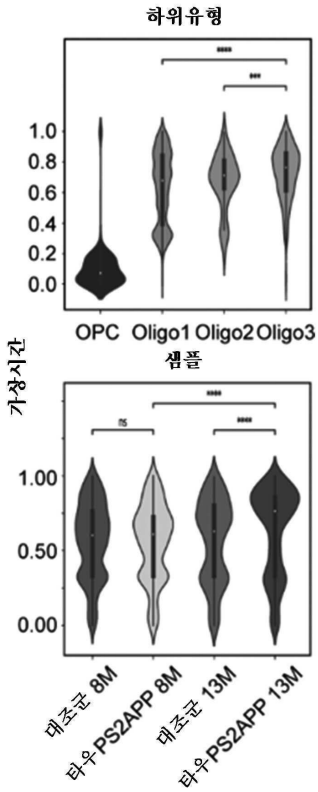
도면5c


UMAP 2
UMAP 1
가상시간
1.0
0.0
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M

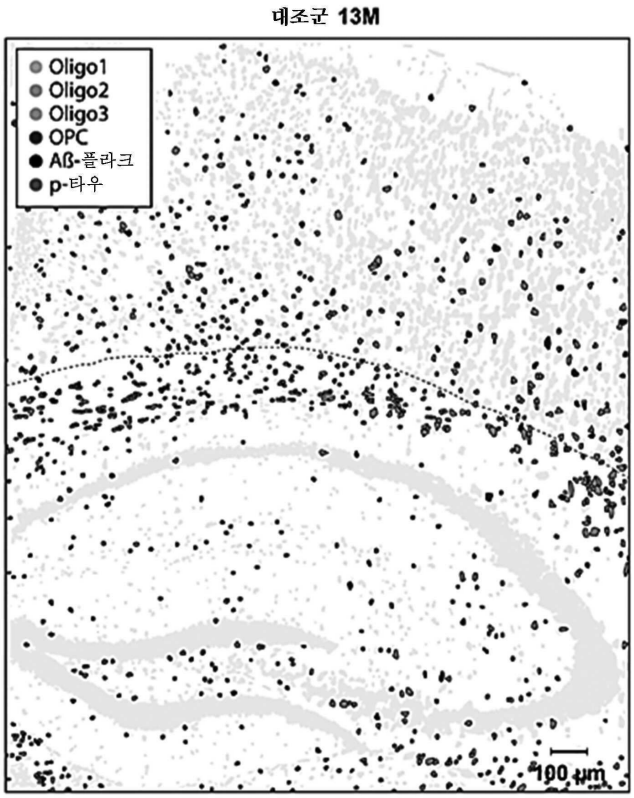
도면5d


OPC
Oligo1
Oligo2
Oligo3

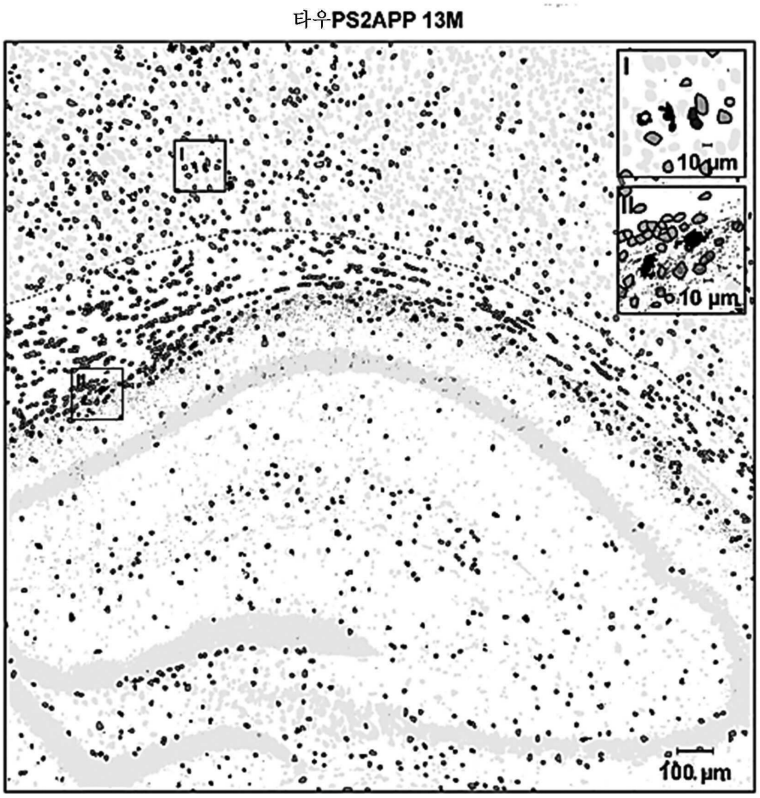
도면5e


하위유형
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
OPC
Oligo1
Oligo2
Oligo3
가상시간
샘플
1.00
0.50
0.00
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M

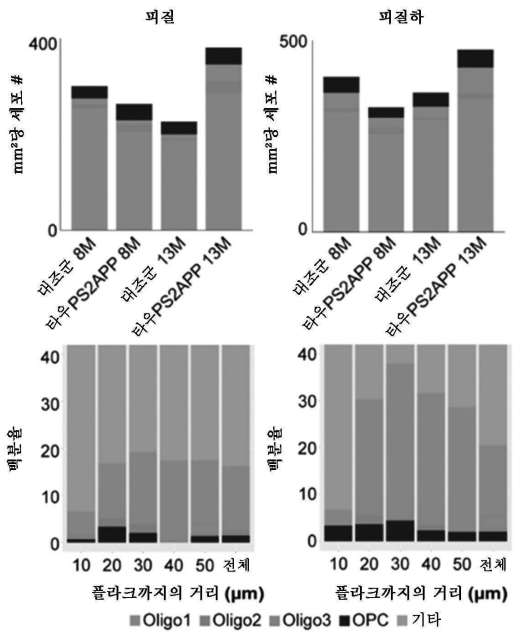
도면5f


대조군 13M
Oligo1
Oligo2
Oligo3
OPC
Aß-플라크
p-타우
100 μm

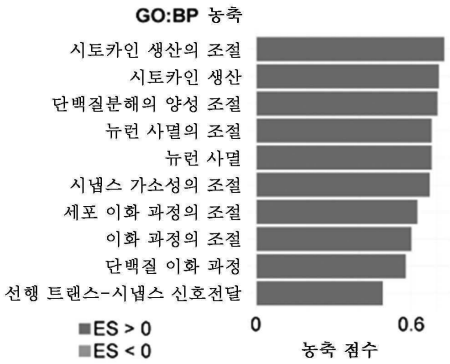
도면5g


타우PS2APP 13M
I
10 μm
II
10 μm
100 μm

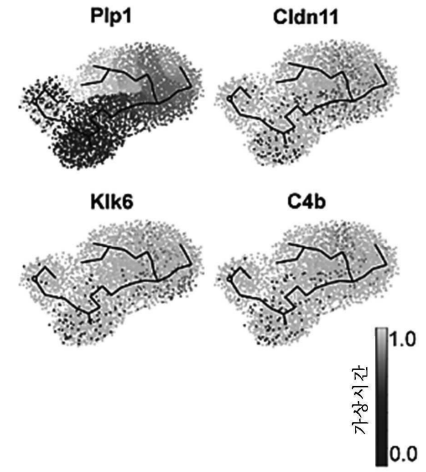
도면5h


피질
피질하
mm²당 세포 #
400
500
0
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M
백분율
40
30
20
10
0
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)
Oligo1 Oligo2 Oligo3 OPC 기타

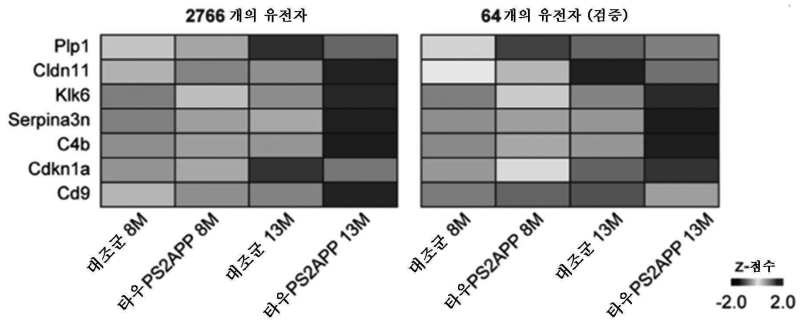
도면5i



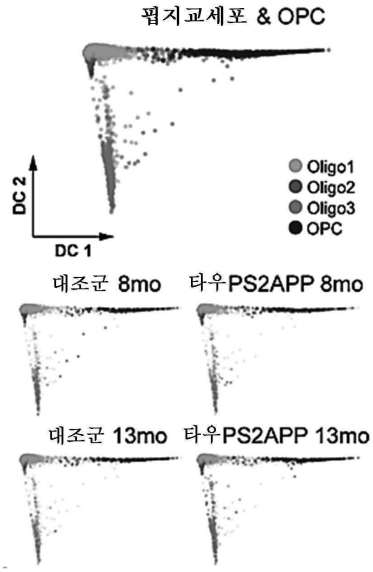
도면5j



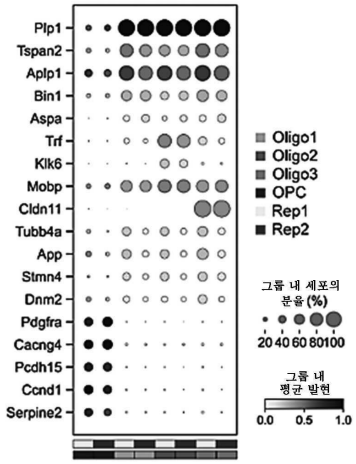
도면5k



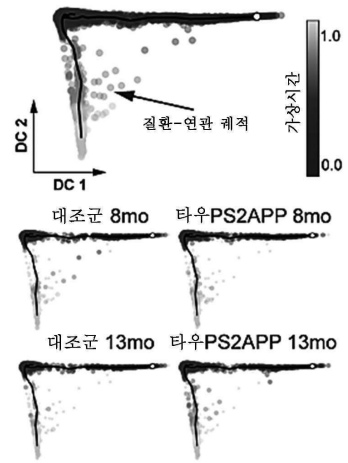
도면51



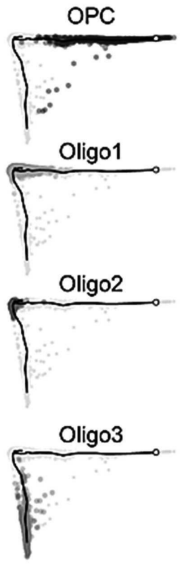
도면5m



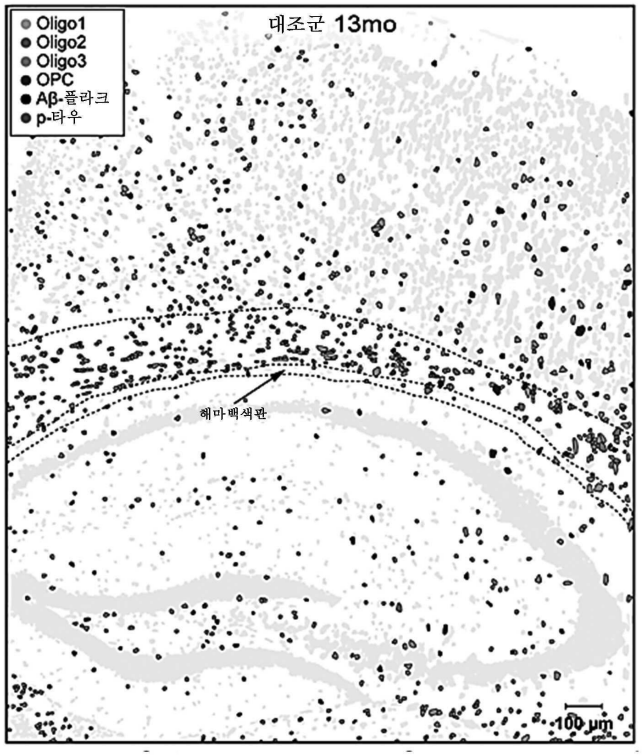
도면5n



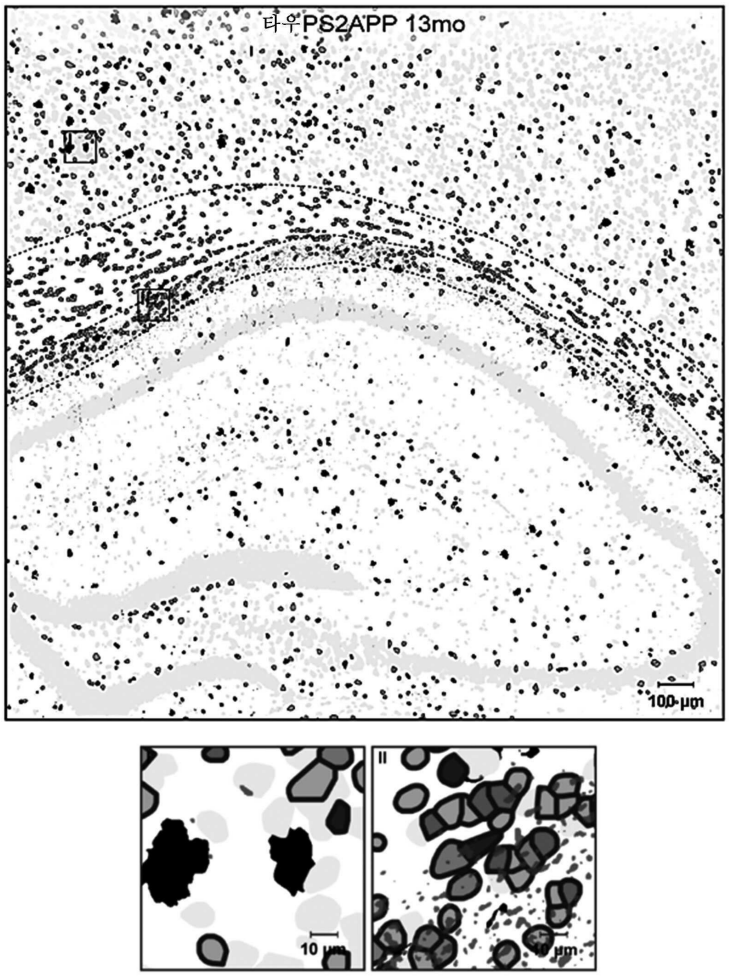
도면5o


OPC
Oligo1
Oligo2
Oligo3

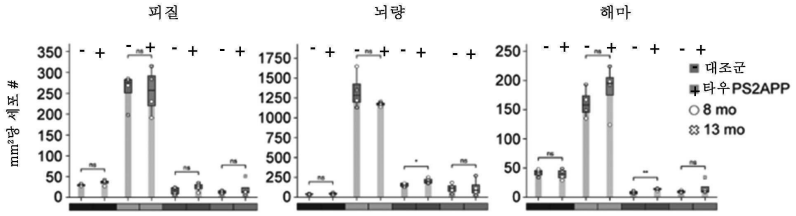
도면5p


Oligo1
Oligo2
Oligo3
OPC
Aβ-플라크
p-타우
대조군 13mo
혜마백색판
100 μm

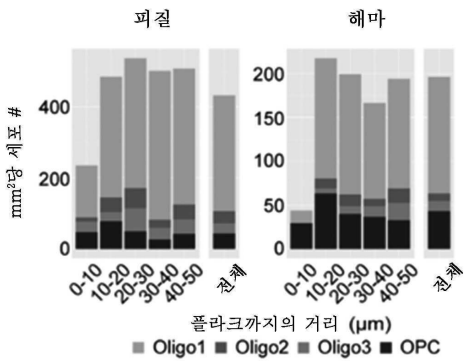
도면5q



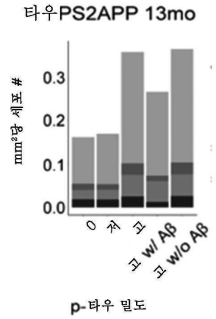
도면5r



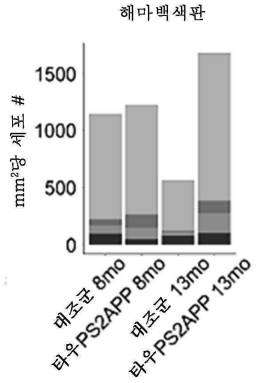
도면5s



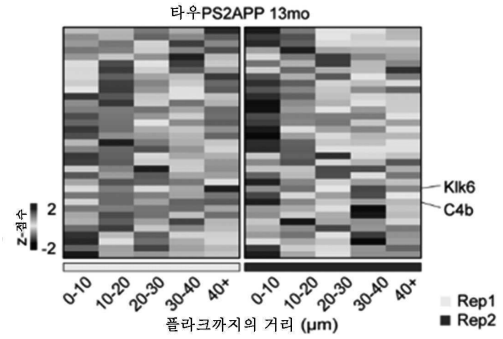
도면5t



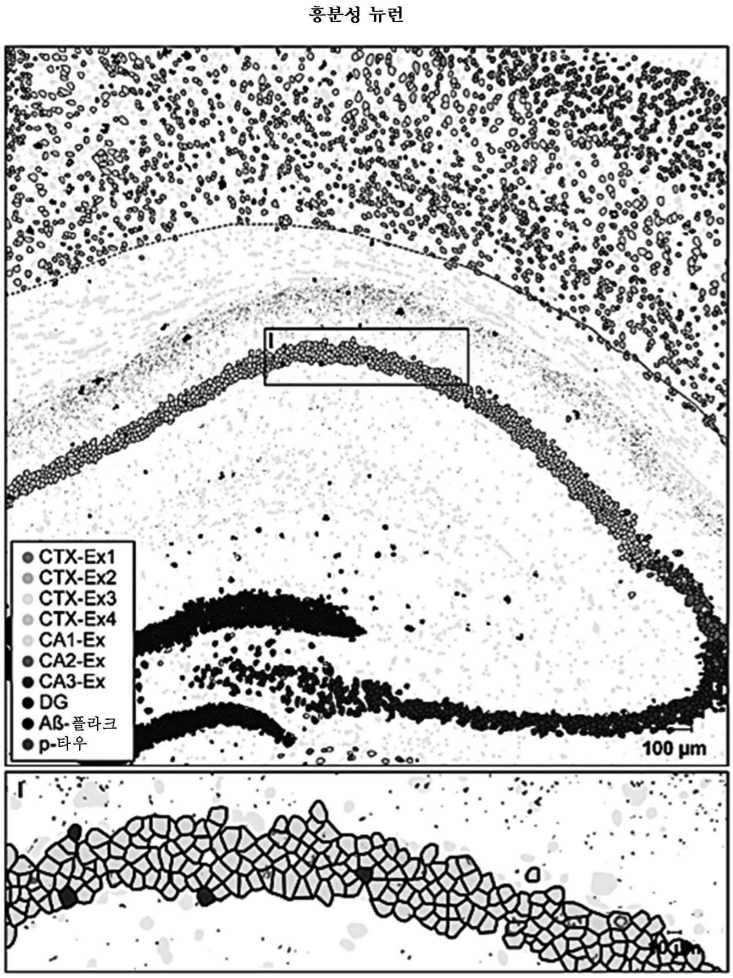
도면5u



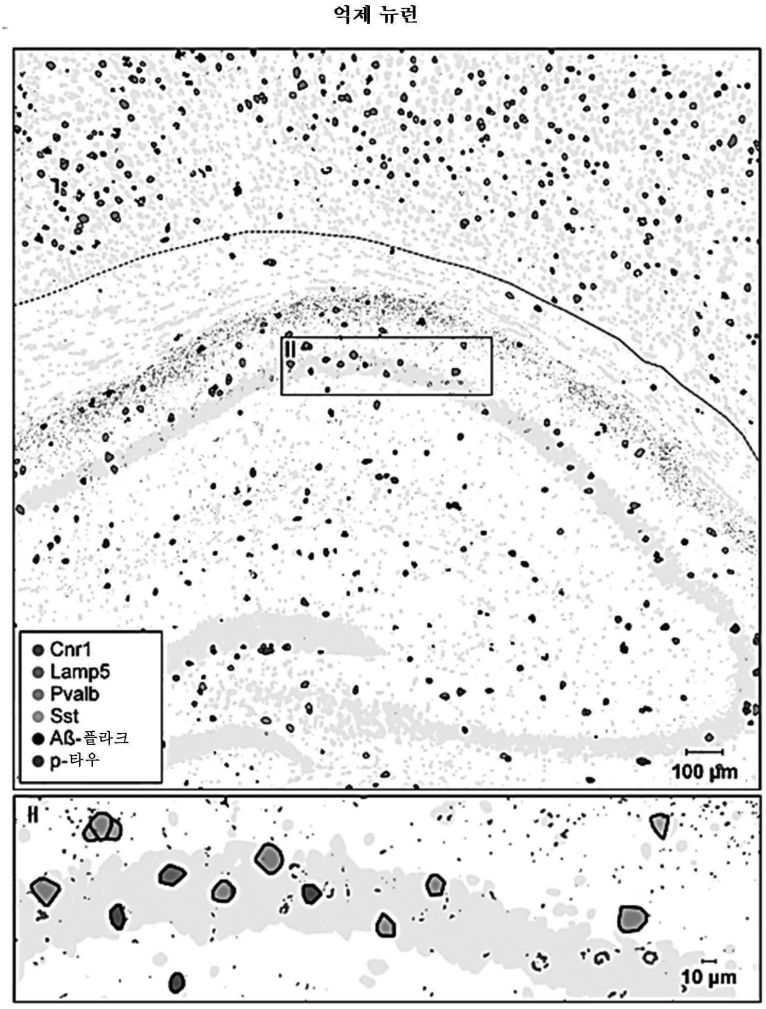
도면5v



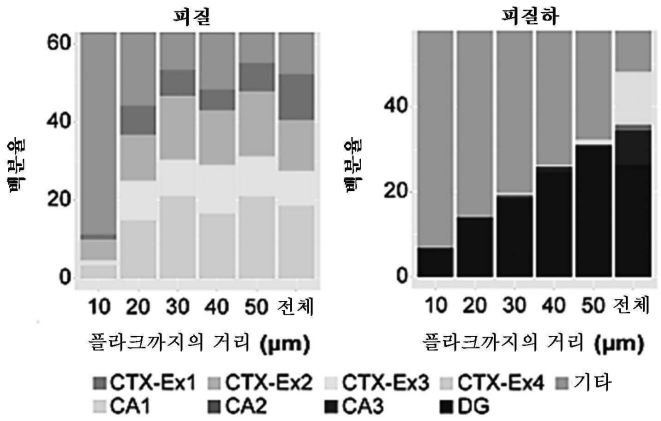
도면6a


흥분성 뉴런
CTX-Ex1
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
CA1-Ex
CA2-Ex
CA3-Ex
DG
Aß-플라크
p-타우
100 μm

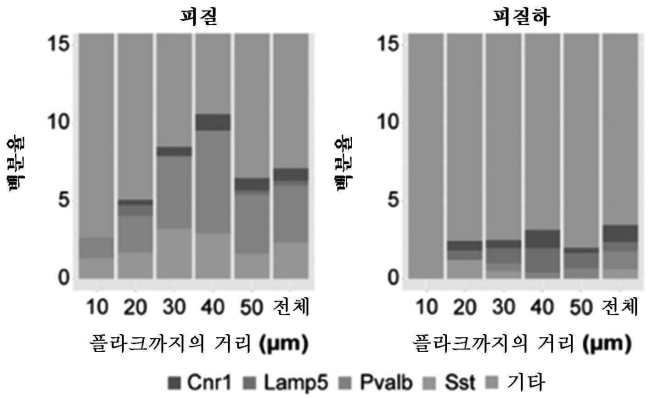
도면6b


억제 뉴런
Cnr1
Lamp5
Pvalb
Sst
Aß-플라크
p-타우
100 μm
II
II
10 μm

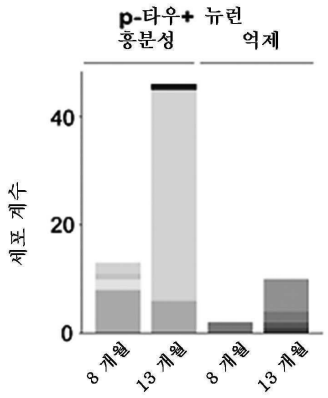
도면6c


피질
피질하
60
40
20
0
백분율
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)
CTX-Ex1
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
기타
CA1
CA2
CA3
DG

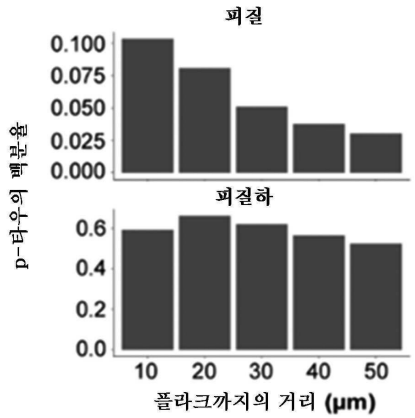
도면6d



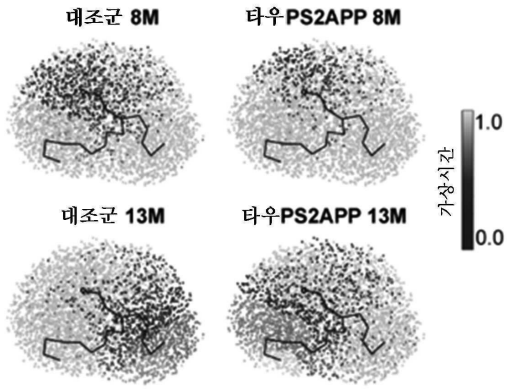
도면6e



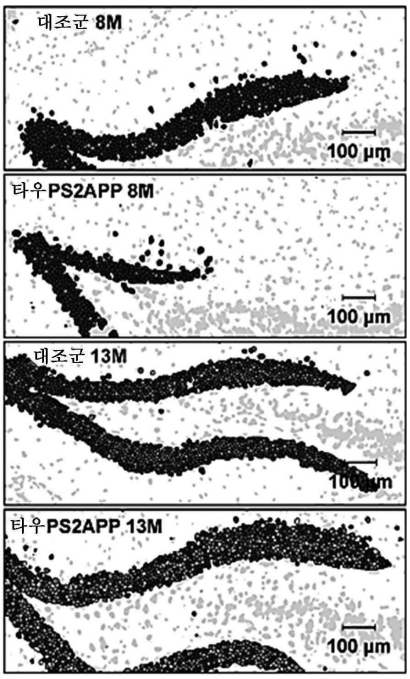
도면6f



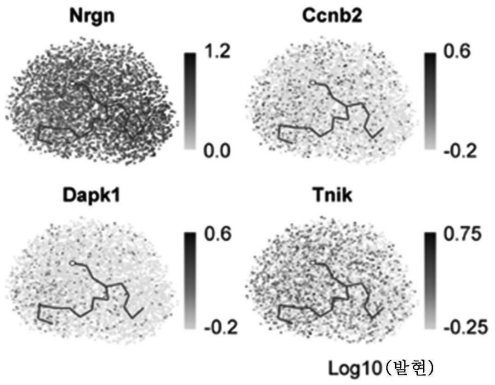
도면6g



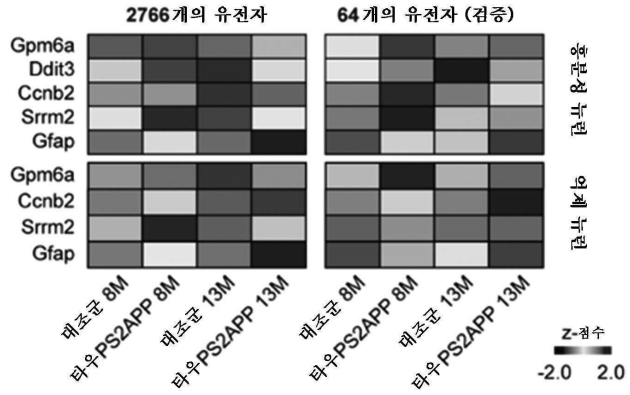
도면6h



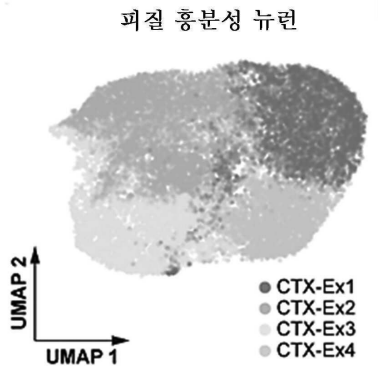
도면6i



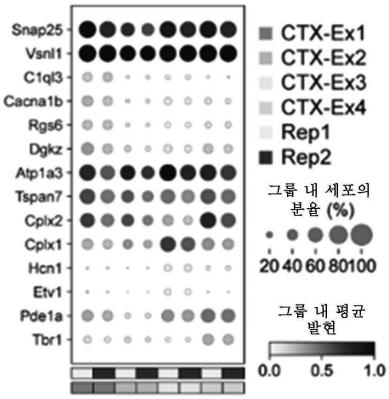
도면6j



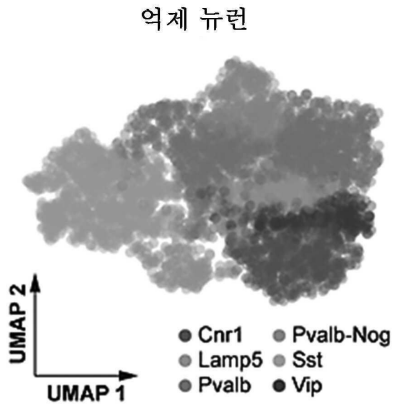
도면6k



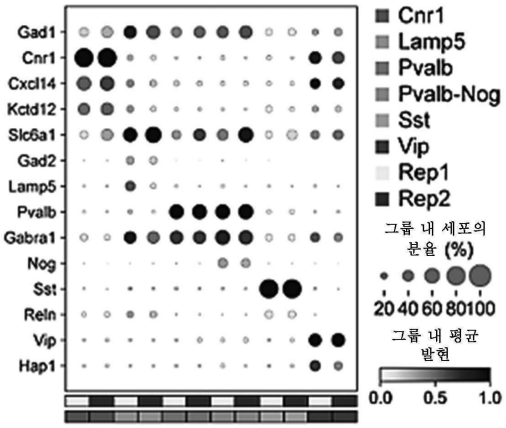
도면6l



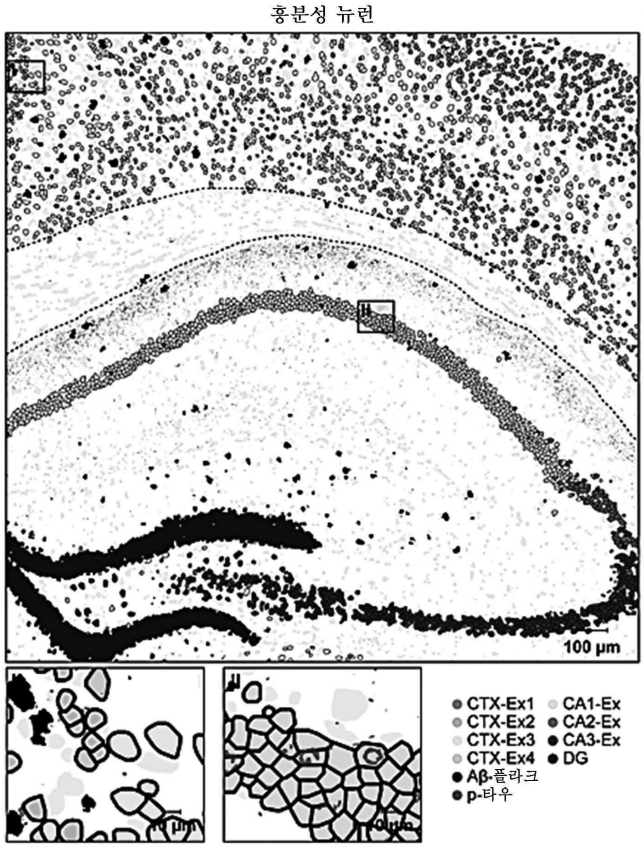
도면6m


억제 뉴런
UMAP 2
UMAP 1
Cnr1
Pvalb-Nog
Lamp5
Sst
Pvalb
Vip

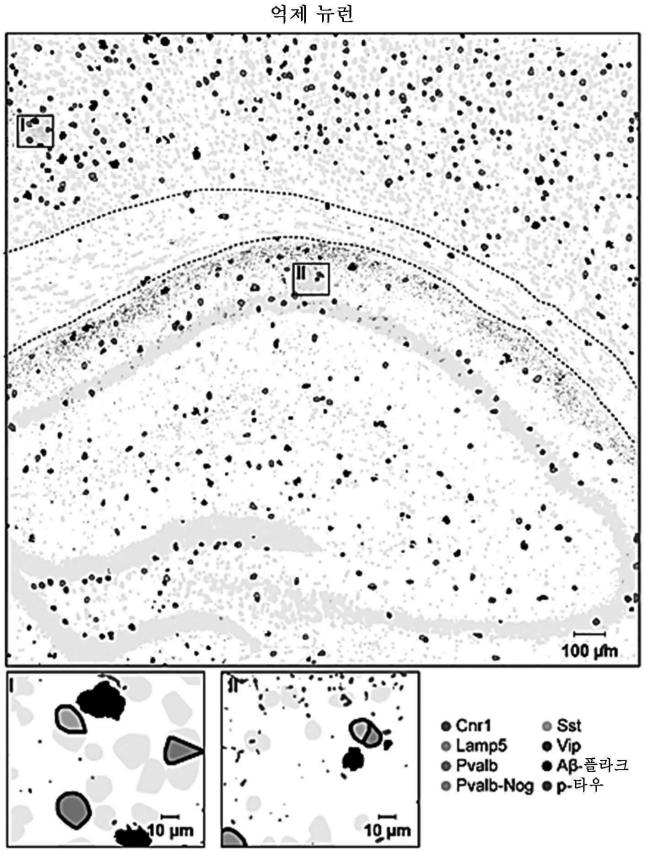
도면6n


Gad1
Cnr1
Cxcl14
Kctd12
Slc6a1
Gad2
Lamp5
Pvalb
Gabra1
Nog
Sst
Reln
Vip
Hap1
Cnr1
Lamp5
Pvalb
Pvalb-Nog
Sst
Vip
Rep1
Rep2
그룹 내 세포의 분율 (%)
20 40 60 80 100
그룹 내 평균 발현
0.0 0.5 1.0

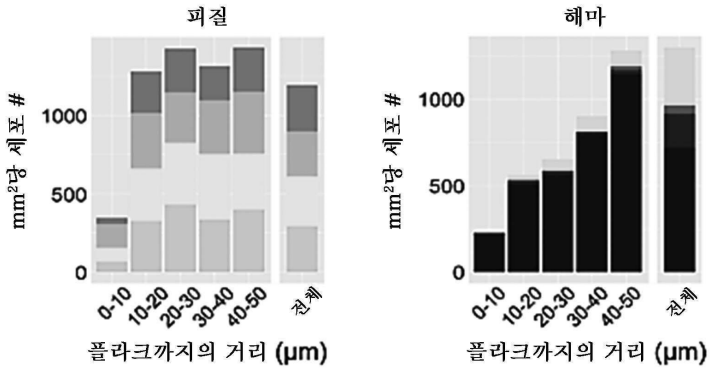
도면60


흥분성 뉴런
100 μm
CTX-Ex1
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
Aβ-플라크
p-타우
CA1-Ex
CA2-Ex
CA3-Ex
DG

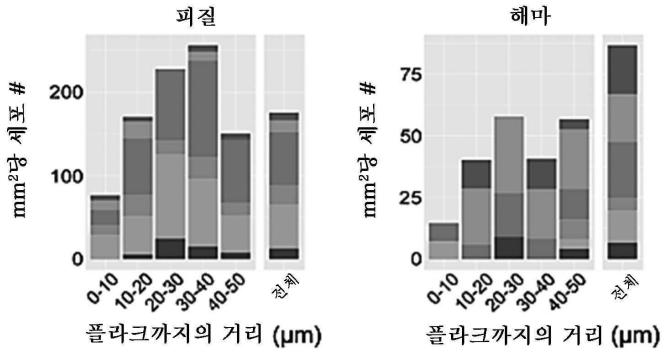
도면6p


억제 뉴런
100 μm
10 μm
10 μm
Cnr1
Lamp5
Pvalb
Pvalb-Nog
Sst
Vip
Aβ-플라크
p-타우

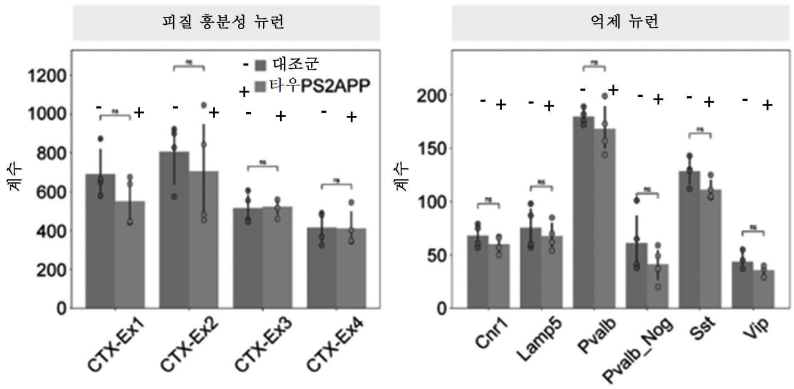
도면6q


피질
해마
mm²당 세포 #
1000
500
0
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
전체
플라크까지의 거리 (μm)

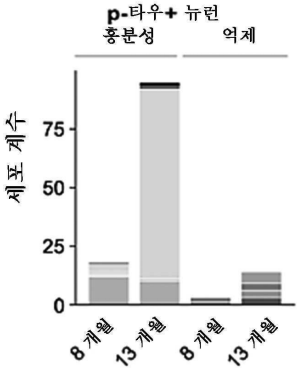
도면6r



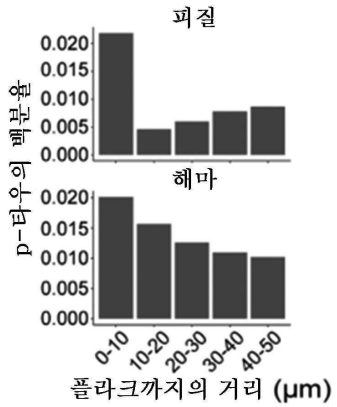
도면6s



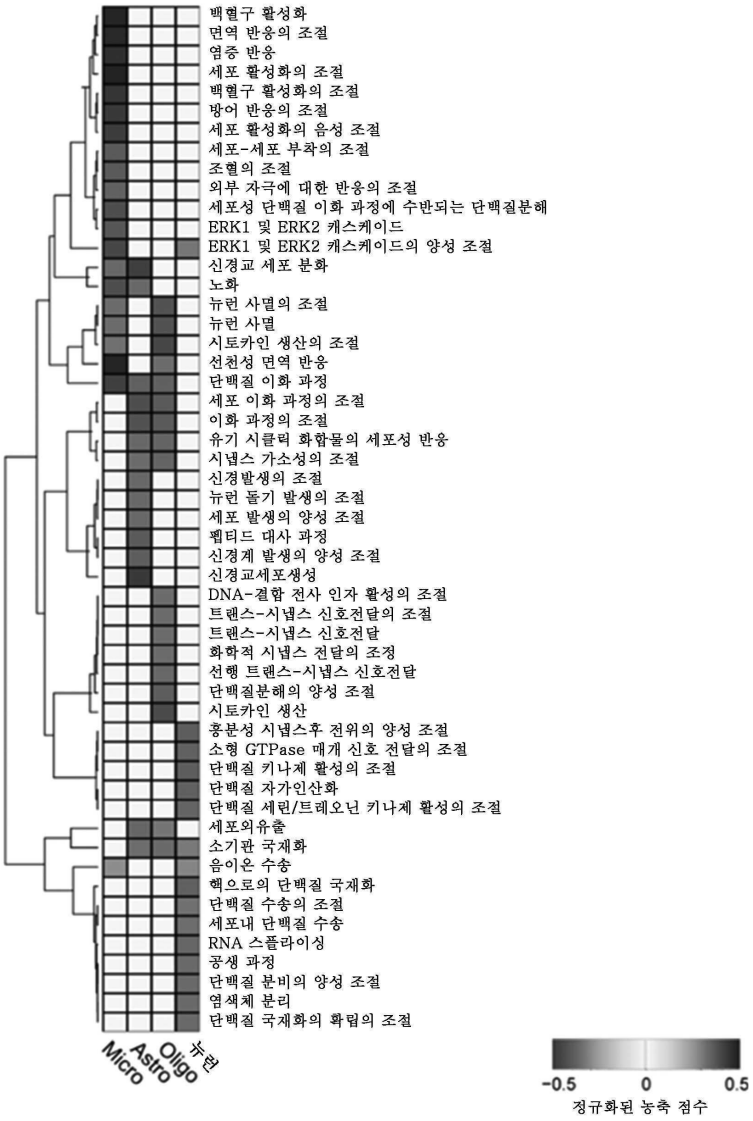
도면6t



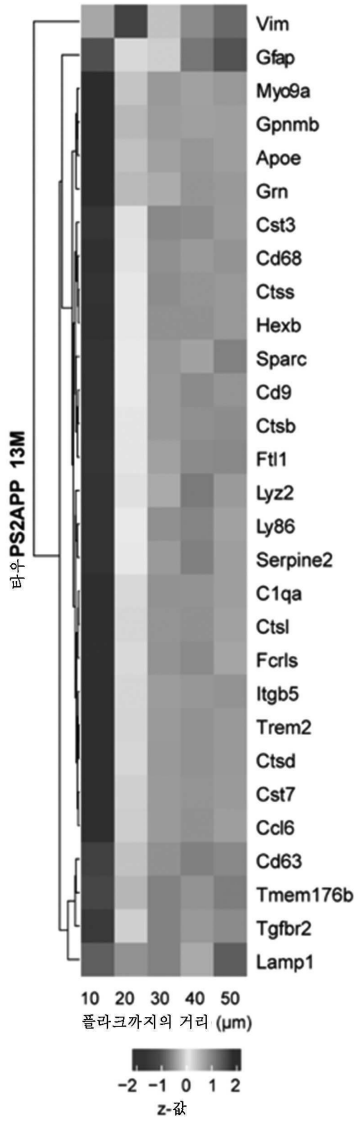
도면6u


피질
해마
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
p-타우의 펩타이드 분율
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
플라크까지의 거리 (μm)

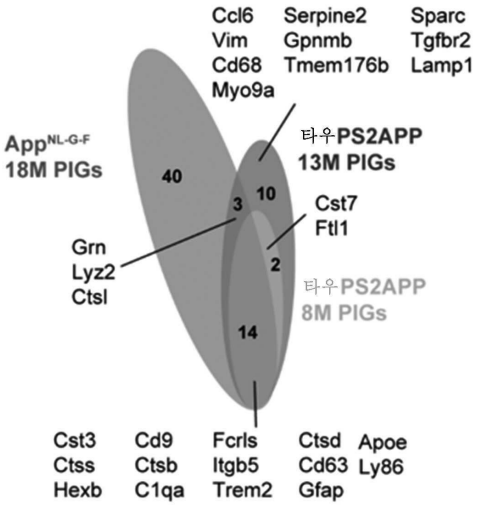
도면7a


백혈구 활성화
면역 반응의 조절
염증 반응
세포 활성화의 조절
백혈구 활성화의 조절
방어 반응의 조절
세포 활성화의 음성 조절
세포-세포 부착의 조절
조혈의 조절
외부 자극에 대한 반응의 조절
세포성 단백질 이화 과정에 수반되는 단백질분해
ERK1 및 ERK2 캐스케이드
ERK1 및 ERK2 캐스케이드의 양성 조절
신경교 세포 분화
노화
뉴런 사멸의 조절
뉴런 사멸
시토카인 생산의 조절
선천성 면역 반응
단백질 이화 과정
세포 이화 과정의 조절
이화 과정의 조절
유기 시클릭 화합물의 세포성 반응
시냅스 가소성의 조절
신경발생의 조절
뉴런 돌기 발생의 조절
세포 발생의 양성 조절
펩티드 대사 과정
신경계 발생의 양성 조절
신경교세포생성
DNA-결합 전사 인자 활성의 조절
트랜스-시냅스 신호전달의 조절
트랜스-시냅스 신호전달
화학적 시냅스 전달의 조정
선행 트랜스-시냅스 신호전달
단백질분해의 양성 조절
시토카인 생산
흥분성 시냅스후 전위의 양성 조절
소형 GTPase 매개 신호 전달의 조절
단백질 키나제 활성의 조절
단백질 자가인산화
단백질 세린/트레오닌 키나제 활성의 조절
세포외유출
소기관 국재화
음이온 수송
핵으로의 단백질 국재화
단백질 수송의 조절
세포내 단백질 수송
RNA 스플라이싱
공생 과정
단백질 분비의 양성 조절
염색체 분리
단백질 국재화의 확립의 조절
Micro
Astro
Oligo
뉴런
-0.5
0
0.5
정규화된 농축 점수

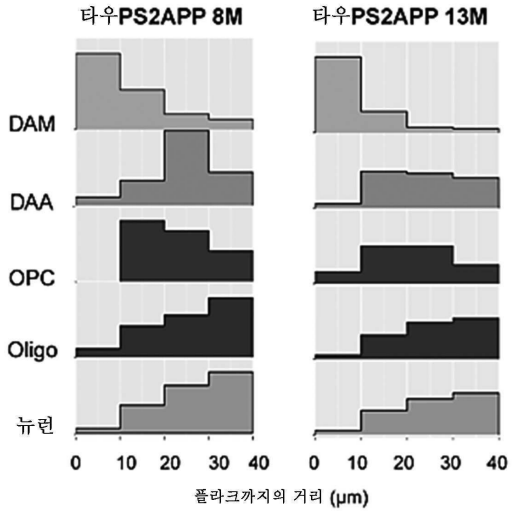
도면7b


Vim
Gfap
Myo9a
Gpnmb
Apoe
Grn
Cst3
Cd68
Ctss
Hexb
Sparc
Cd9
Ctsb
Ftl1
Lyz2
Ly86
Serpine2
C1qa
Ctsl
Fcrls
Itgb5
Trem2
Ctsd
Cst7
Ccl6
Cd63
Tmem176b
Tgfbr2
Lamp1
타우PS2APP 13M
10 20 30 40 50
플라크까지의 거리 (μm)
−2 −1 0 1 2
z-값

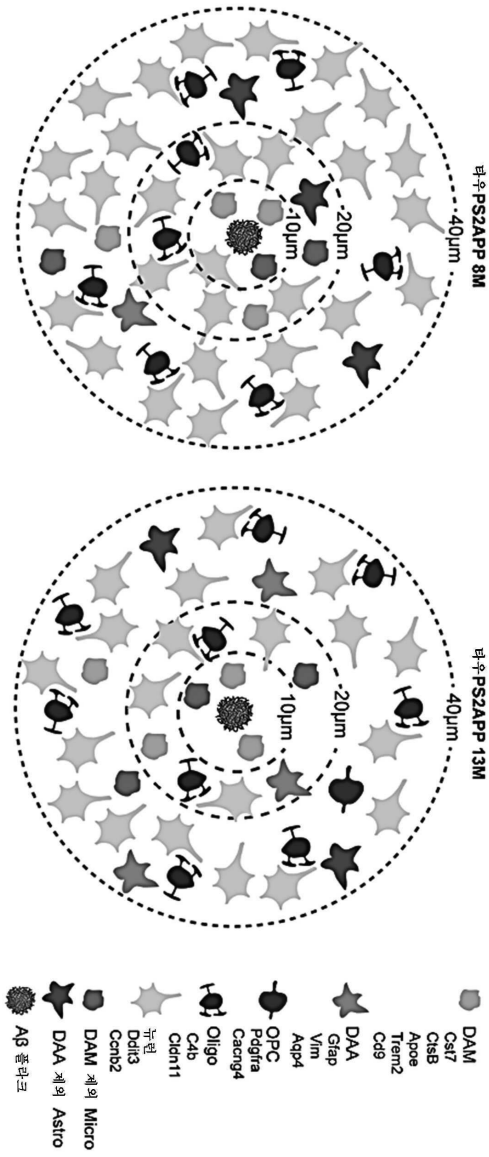
도면7c


Ccl6 Serpine2 Sparc
Vim Gpnmb Tgfbr2
Cd68 Tmem176b Lamp1
Myo9a
App NL-G-F
18M PIGs
타우PS2APP
13M PIGs
40
3
10
Cst7
Ftl1
Grn
Lyz2
Ctsl
2
타우PS2APP
8M PIGs
14
Cst3 Cd9 Fcrls Ctsd Apoe
Ctss Ctsb Itgb5 Cd63 Ly86
Hexb C1qa Trem2 Gfap

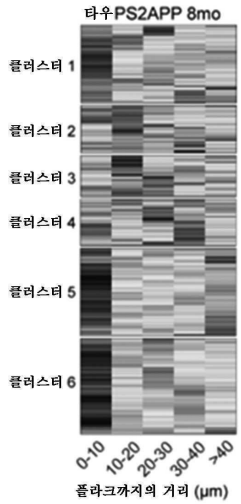
도면7d


타우PS2APP 8M
타우PS2APP 13M
DAM
DAA
OPC
Oligo
뉴런
0 10 20 30 40
0 10 20 30 40
플라크까지의 거리 (μm)

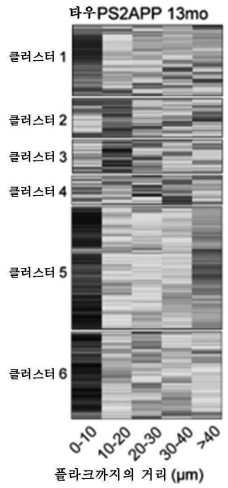
도면7e


타우PS2APP 8M
40μm
20μm
10μm
타우PS2APP 13M
40μm
20μm
10μm
DAM
Csf7
CtsB
Apoe
Trem2
Cd9
DAA
Gfap
Vim
Aqp4
OPC
Pdgfra
Cacng4
Oligo
C4b
Cldn11
뉴런
Ddit3
Ccnb2
DAM 계외 Micro
DAA 계외 Astro
Aβ 플라크

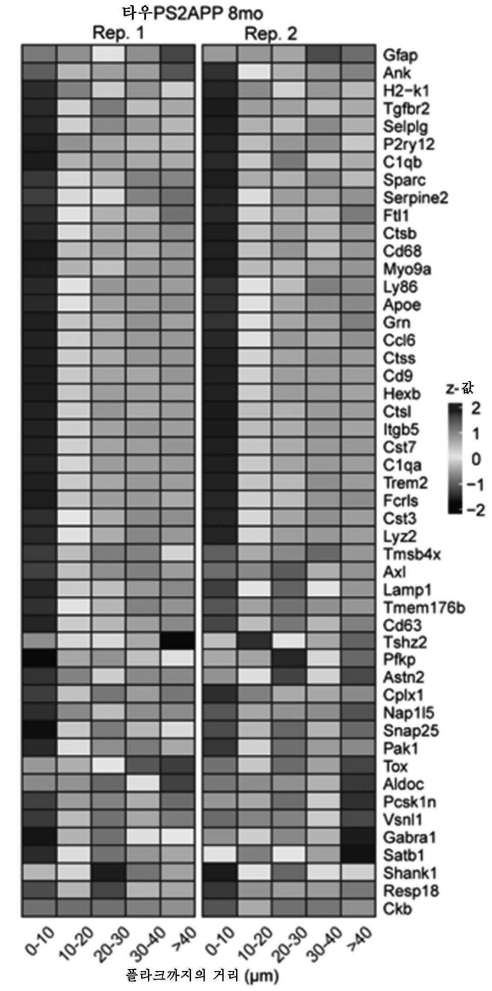
도면7f


타우PS2APP 8mo
클러스터 1
클러스터 2
클러스터 3
클러스터 4
클러스터 5
클러스터 6
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
플라크까지의 거리 (μm)

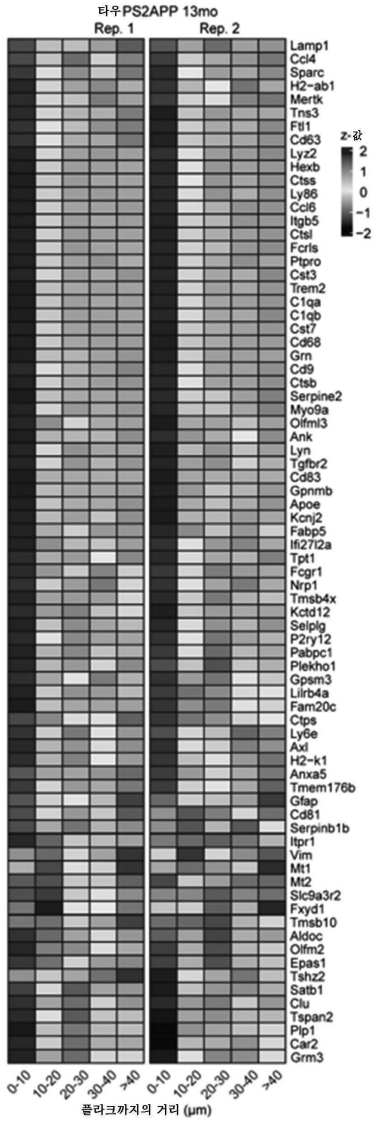
도면7g


타우PS2APP 13mo
클러스터 1
클러스터 2
클러스터 3
클러스터 4
클러스터 5
클러스터 6
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
플라크까지의 거리 (μm)

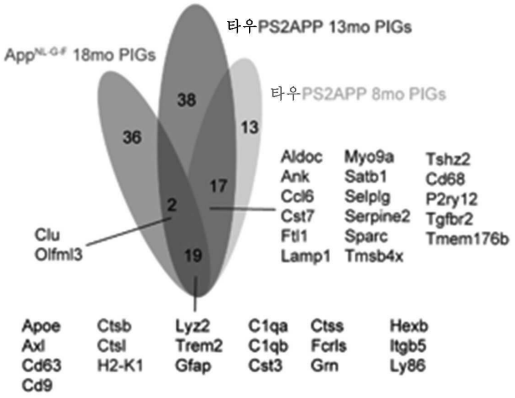
도면7h


타우PS2APP 8mo
Rep. 1
Rep. 2
Gfap
Ank
H2-k1
Tgfbr2
Selplg
P2ry12
C1qb
Sparc
Serpine2
Ftl1
Ctsb
Cd68
Myo9a
Ly86
Apoe
Grn
Ccl6
Ctss
Cd9
Hexb
Ctsl
Itgb5
Cst7
C1qa
Trem2
Fcrls
Cst3
Lyz2
Tmsb4x
Axl
Lamp1
Tmem176b
Cd63
Tshz2
Pfkp
Astn2
Cplx1
Nap1l5
Snap25
Pak1
Tox
Aldoc
Pcsk1n
Vsnl1
Gabra1
Satb1
Shank1
Resp18
Ckb
Z-값
2
1
0
−1
−2
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
플라크까지의 거리 (μm)

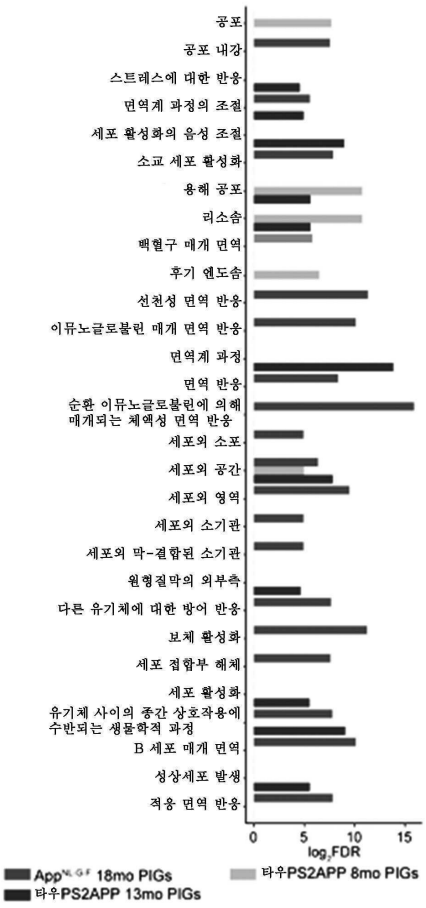
도면7i


타우PS2APP 13mo
Rep. 1
Rep. 2
Z-값
2
1
0
−1
−2
Lamp1
Ccl4
Sparc
H2-ab1
Mertk
Tns3
Ftl1
Cd63
Lyz2
Hexb
Ctss
Ly86
Ccl6
Itgb5
Ctsl
Fcrls
Ptpro
Cst3
Trem2
C1qa
C1qb
Cst7
Cd68
Grn
Cd9
Ctsb
Serpine2
Myo9a
Olfml3
Ank
Lyn
Tgfbr2
Cd83
Gpnmb
Apoe
Kcnj2
Fabp5
Ifi27l2a
Tpt1
Fcgr1
Nrp1
Tmsb4x
Kctd12
Selplg
P2ry12
Pabpc1
Plekho1
Gpsm3
Lilrb4a
Fam20c
Ctps
Ly6e
Axl
H2-k1
Anxa5
Tmem176b
Gfap
Cd81
Serpinb1b
Itpr1
Vim
Mt1
Mt2
Slc9a3r2
Fxyd1
Tmsb10
Aldoc
Olfm2
Epas1
Tshz2
Satb1
Clu
Tspan2
Plp1
Car2
Grm3
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
0-10
10-20
20-30
30-40
>40
플라크까지의 거리 (μm)

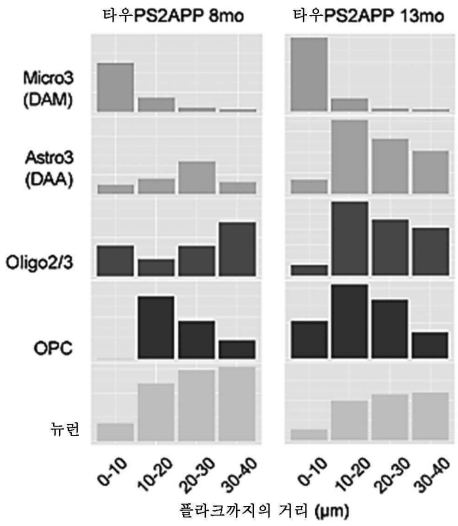
도면7j


타우PS2APP 13mo PIGs
App^NL-G-F 18mo PIGs
타우PS2APP 8mo PIGs
38
36
13
17
2
19
Aldoc
Ank
Ccl6
Cst7
Ftl1
Lamp1
Myo9a
Satb1
Selplg
Serpine2
Sparc
Tmsb4x
Tshz2
Cd68
P2ry12
Tgfbr2
Tmem176b
Clu
Olfml3
Apoe
Axl
Cd63
Cd9
Ctsb
Ctsl
H2-K1
Lyz2
Trem2
Gfap
C1qa
C1qb
Cst3
Ctss
Fcrls
Grn
Hexb
Itgb5
Ly86

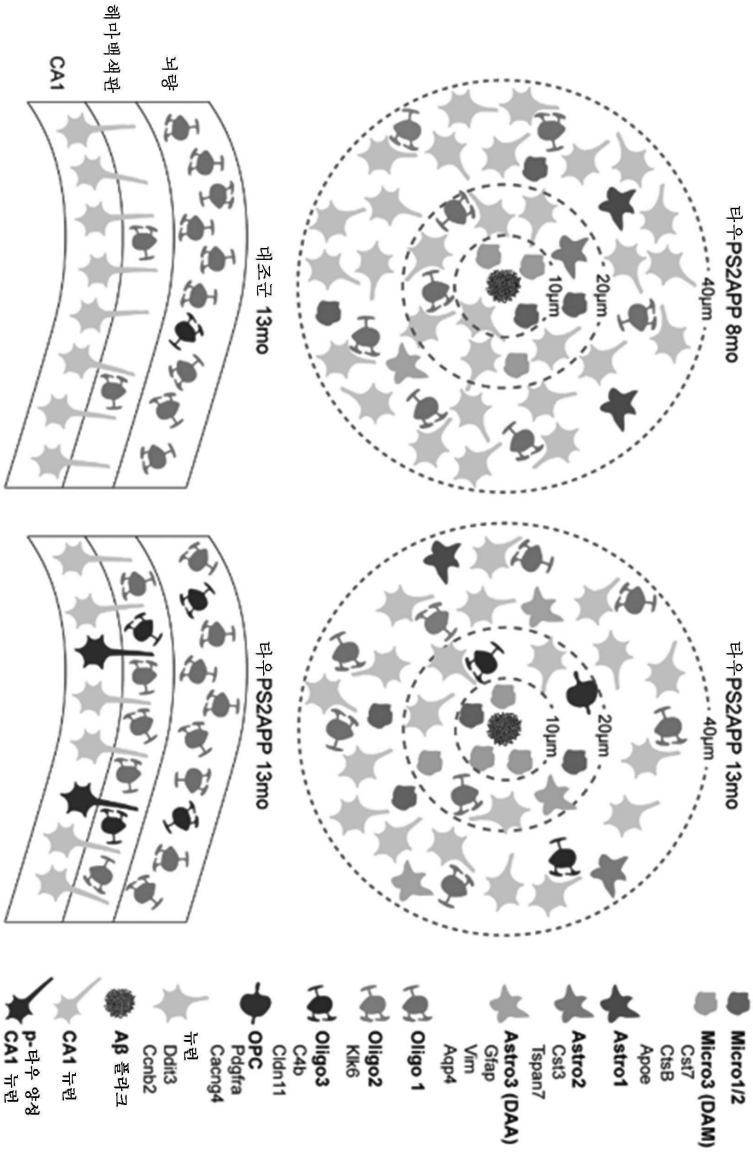
도면7k


공포
공포 내강
스트레스에 대한 반응
면역계 과정의 조절
세포 활성화의 음성 조절
소교 세포 활성화
용해 공포
리소솜
백혈구 매개 면역
후기 엔도솜
선천성 면역 반응
이뮤노글로불린 매개 면역 반응
면역계 과정
면역 반응
순환 이뮤노글로불린에 의해 매개되는 체액성 면역 반응
세포외 소포
세포외 공간
세포외 영역
세포외 소기관
세포외 막-결합된 소기관
원형질막의 외부측
다른 유기체에 대한 방어 반응
보체 활성화
세포 접합부 해체
세포 활성화
유기체 사이의 종간 상호작용에 수반되는 생물학적 과정
B 세포 매개 면역
성상세포 발생
적응 면역 반응
0
5
10
15
log2FDR
App NL-G-F 18mo PIGs
타우PS2APP 13mo PIGs
타우PS2APP 8mo PIGs

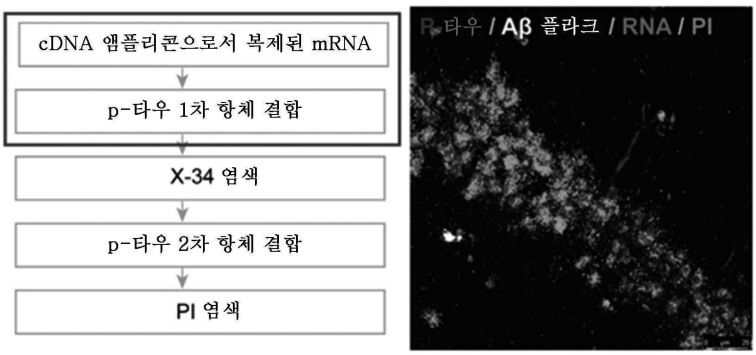
도면7l


타우PS2APP 8mo
타우PS2APP 13mo
Micro3 (DAM)
Astro3 (DAA)
Oligo2/3
OPC
뉴런
0-10
10-20
20-30
30-40
플라크까지의 거리 (μm)

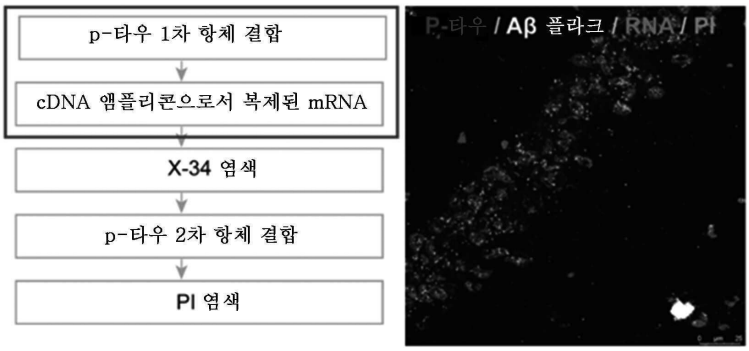
도면7m


CA1
해마백질판
뇌량
대조군 13mo
타우PS2APP 13mo
타우PS2APP 8mo
타우PS2APP 13mo
10μm
20μm
40μm
p-타우 양성 CA1 뉴런
CA1 뉴런
Aβ 플라크
뉴런
Ddit3
Ccnb2
OPC
Pdgfra
Cacng4
Oligo3
C4b
Cldn11
Oligo2
Klk6
Oligo 1
Aqp4
Astro3 (DAA)
Gfap
Vim
Astro2
Cst3
Tspan7
Astro1
Apoe
Micro3 (DAM)
Cst7
CtsB
Micro1/2

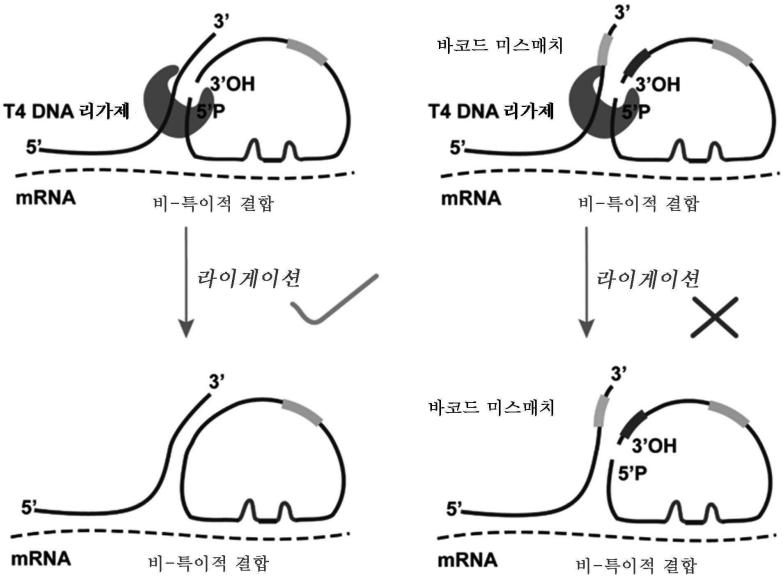
도면8a


cDNA 앰플리콘으로서 복제된 mRNA
p-타우 1차 항체 결합
X-34 염색
p-타우 2차 항체 결합
PI 염색
p-타우 / Aβ 플라크 / RNA / PI

도면8b

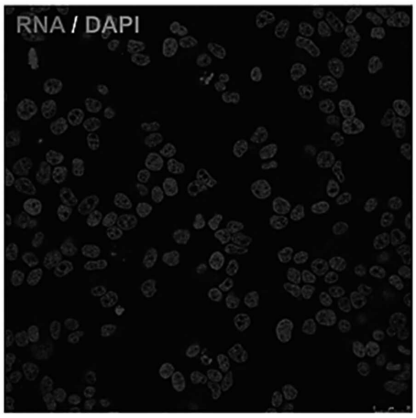


도면8c

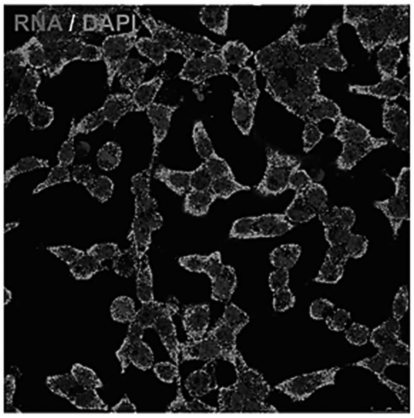


스타맵 스타맵 프로

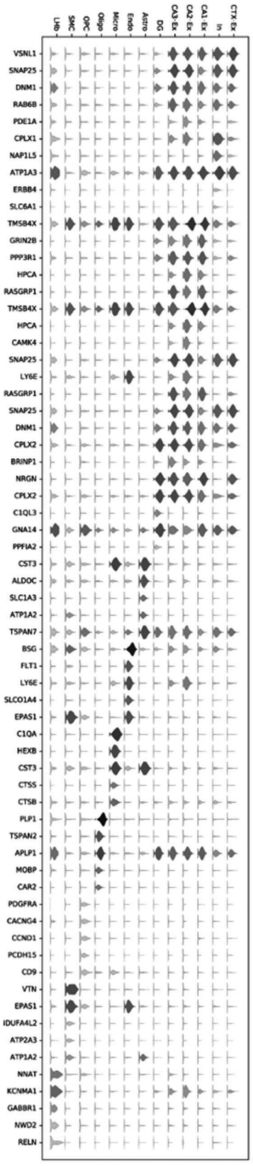
도면8d



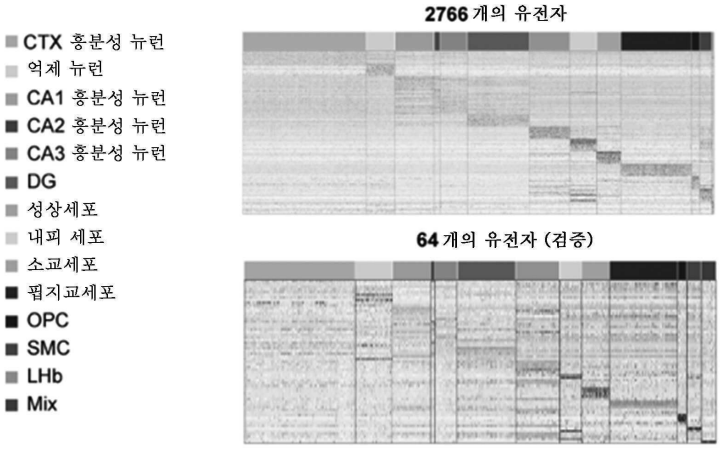
도면8e


RNA / DAPI

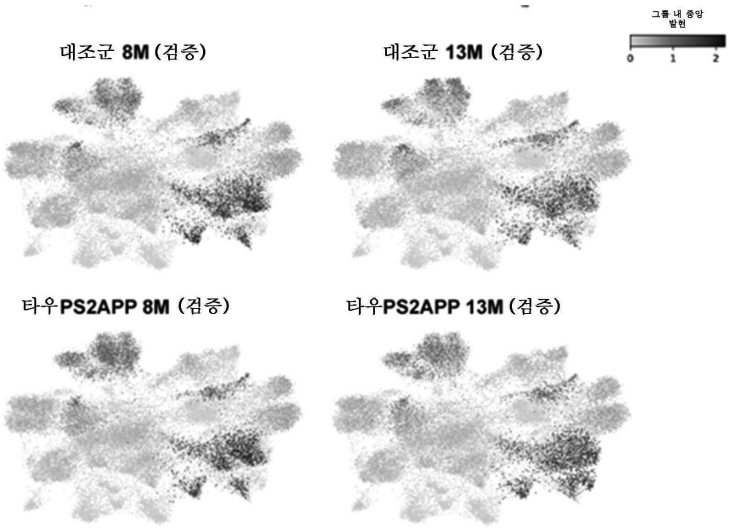
도면9a


Lyb
SMC
OPC
Oligo
Mgcn
Endo
Astro
DG
CA3
CA2
CA1
In
CTX
VSNL1
SNAP25
DNM1
RAB6B
PDE1A
CPLX1
NAP1L5
ATP1A3
ERBB4
SLC6A1
TMSB4X
GRIN2B
PPP3R1
HPCA
RASGRP1
TMSB4X
HPCA
CAMK4
SNAP25
LY6E
RASGRP1
SNAP25
DNM1
CPLX2
BRINP1
NRGN
CPLX2
C1QL3
GNA14
PPP1A2
CST3
ALDOC
SLC1A3
ATP1A2
TSPAN7
BSG
FLT1
LY6E
SLCO1A4
EPAS1
C1QA
HEXB
CST3
CTSS
CTSB
PLP1
TSPAN2
APLP1
MOBP
CAR2
PDGFRA
CACNG4
CCND1
PCDH15
CD9
VTN
EPAS1
IDUFA4L2
ATP2A3
ATP1A2
NNAT
KCNMA1
GABBR1
NWD2
RELN

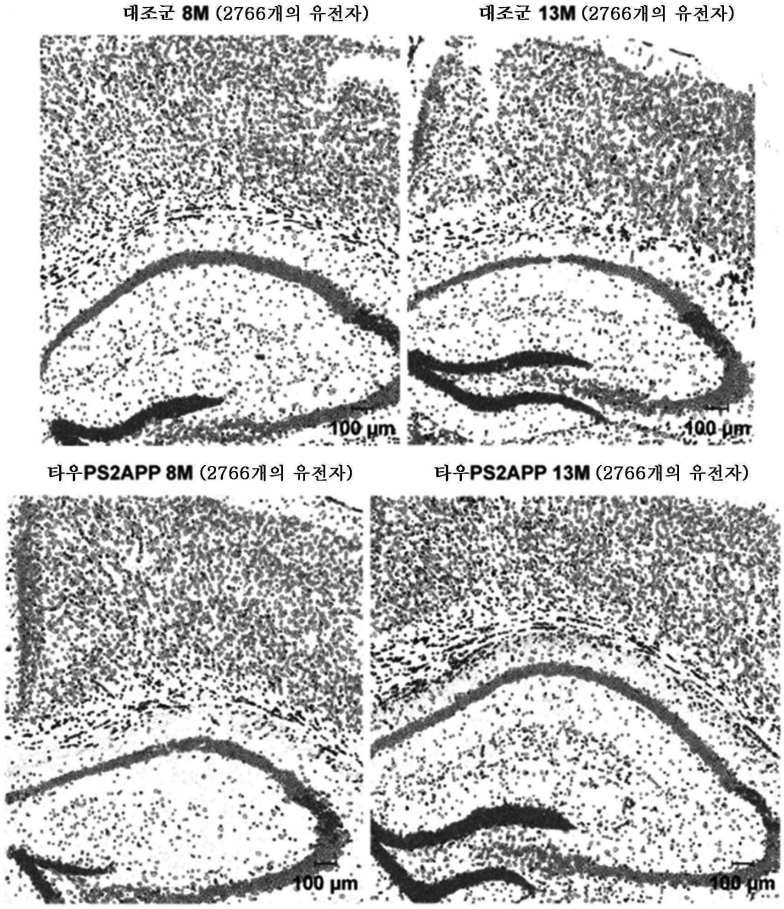
도면9b


2766 개의 유전자
CTX 흥분성 뉴런
억제 뉴런
CA1 흥분성 뉴런
CA2 흥분성 뉴런
CA3 흥분성 뉴런
DG
성상세포
내피 세포
소교세포
핍지교세포
OPC
SMC
LHb
Mix
64 개의 유전자 (검증)

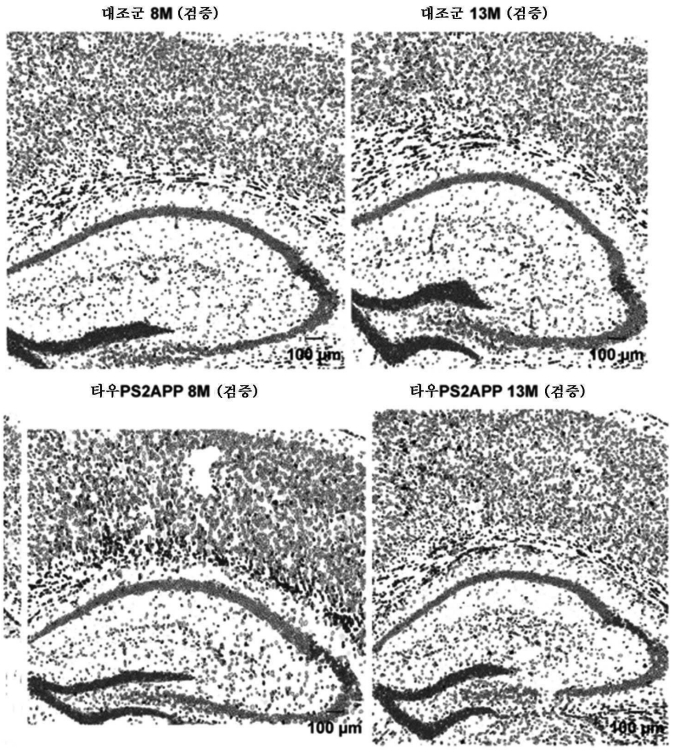
도면9c


그룹 내 중앙 발현
0
1
2
대조군 8M (검증)
대조군 13M (검증)
타우PS2APP 8M (검증)
타우PS2APP 13M (검증)

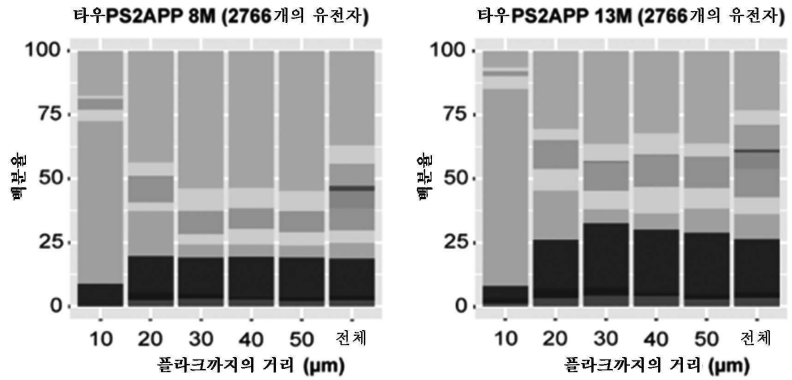
도면9d


대조군 8M (2766개의 유전자)
대조군 13M (2766개의 유전자)
100 μm
100 μm
타우PS2APP 8M (2766개의 유전자)
타우PS2APP 13M (2766개의 유전자)
100 μm
100 μm

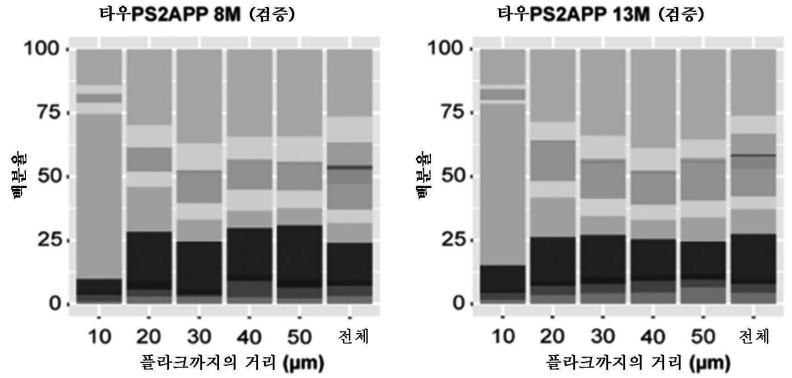
도면9e


대조군 8M (검증)
대조군 13M (검증)
100 μm
100 μm
타우PS2APP 8M (검증)
타우PS2APP 13M (검증)
100 μm
100 μm

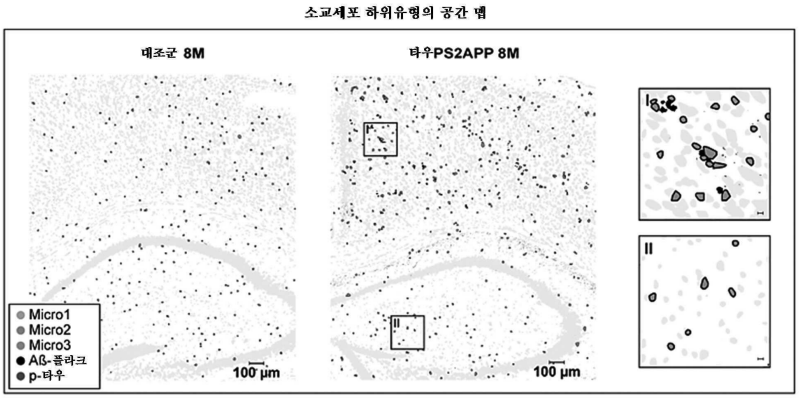
도면9f



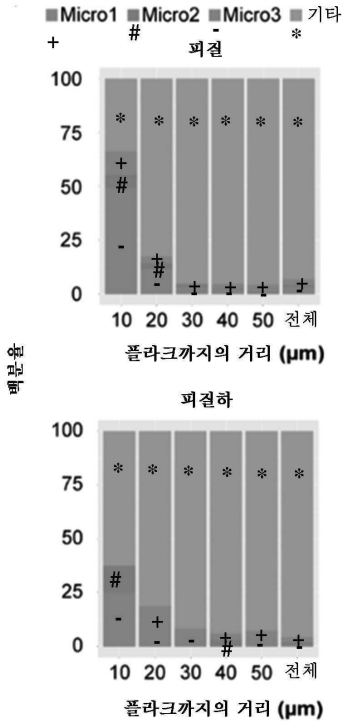
도면9g



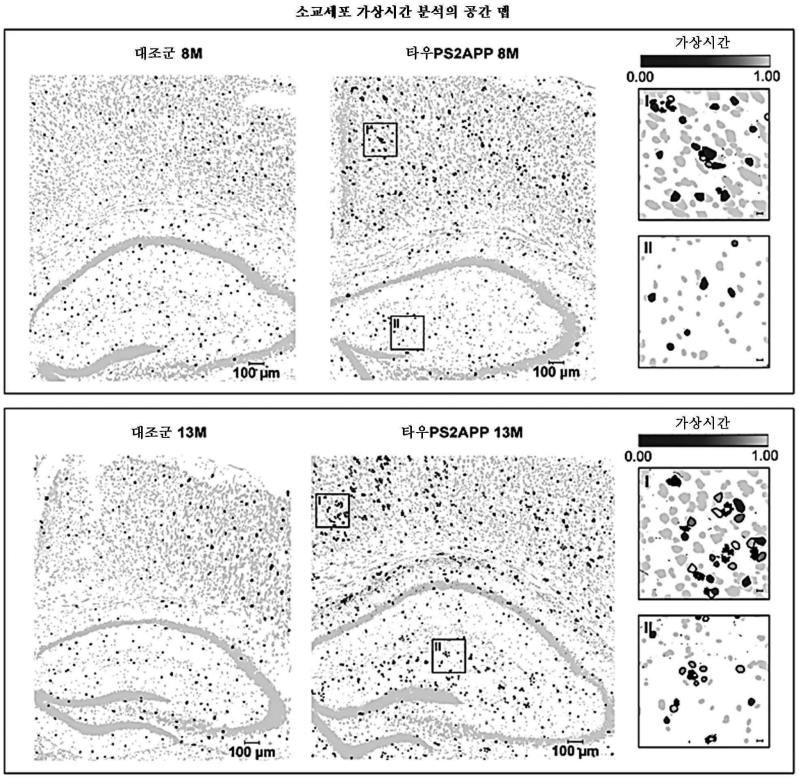
도면10a



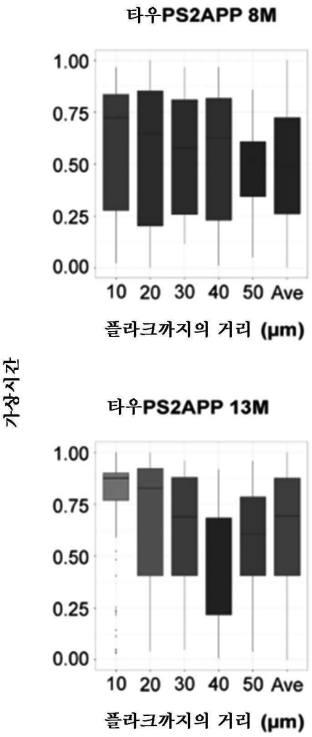
도면10b


Micro1
Micro2
Micro3
기타
피질
100
75
50
25
0
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)
확률분율
피질하
100
75
50
25
0
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)

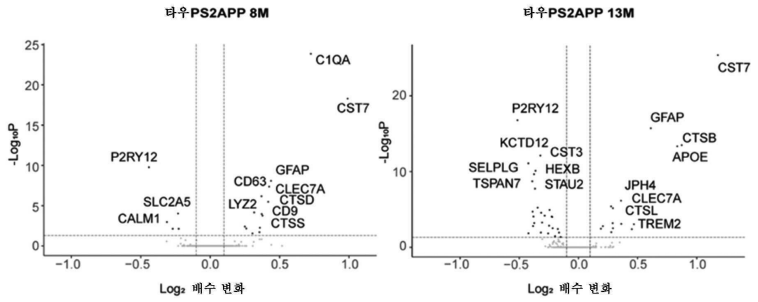
도면10c


소교세포 가상시간 분석의 공간 맵
대조군 8M
타우PS2APP 8M
가상시간
0.00
1.00
100 μm
100 μm
대조군 13M
타우PS2APP 13M
가상시간
0.00
1.00
100 μm
100 μm

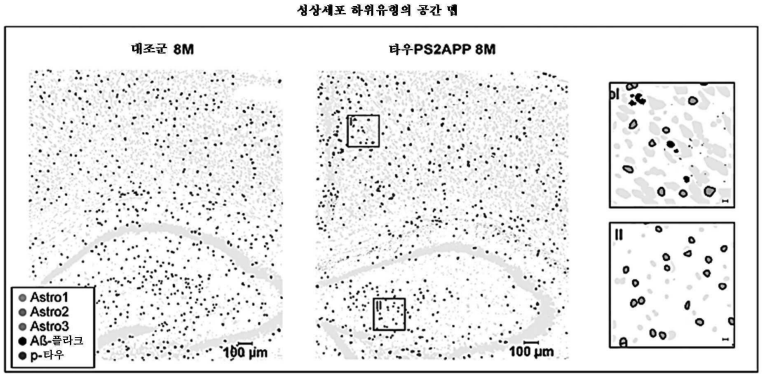
도면10d



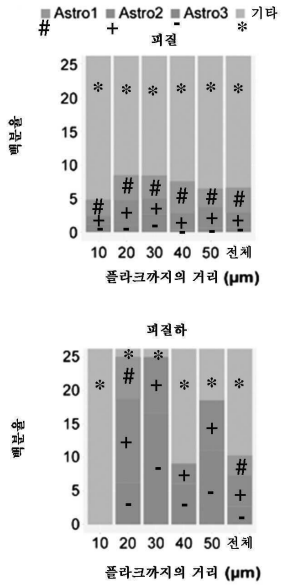
도면10e



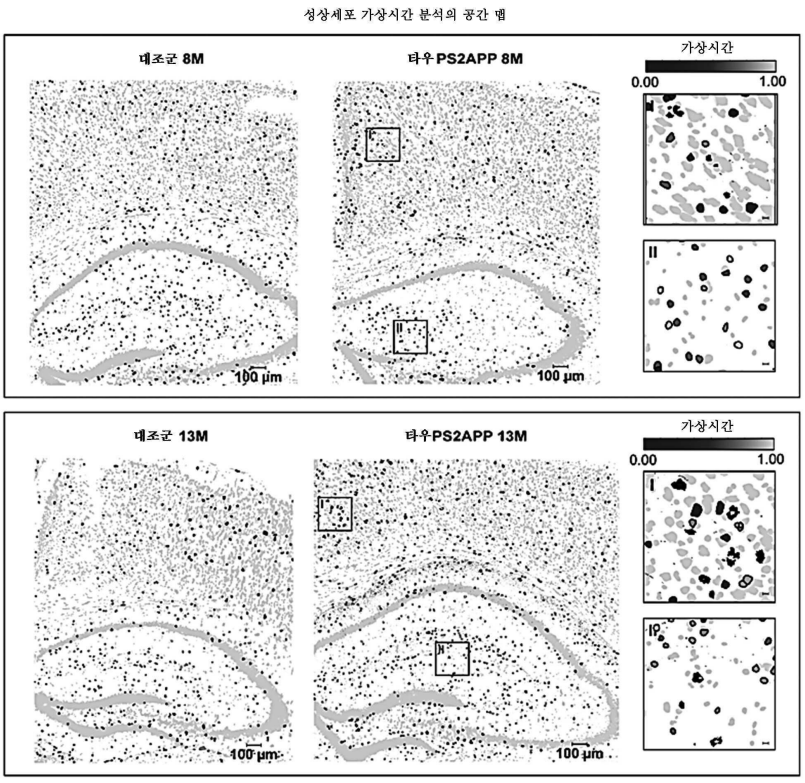
도면11a



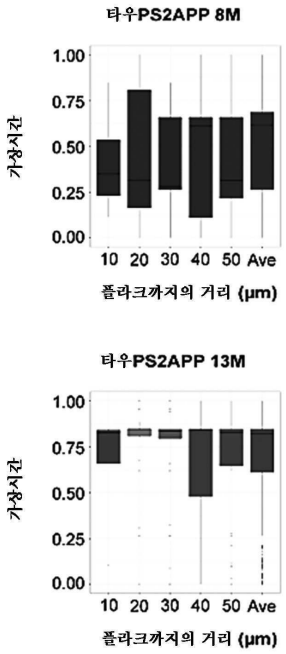
도면11b


Astro1
Astro2
Astro3
기타
피질
백분율
25
20
15
10
5
0
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)
피질하
백분율
25
20
15
10
5
0
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)

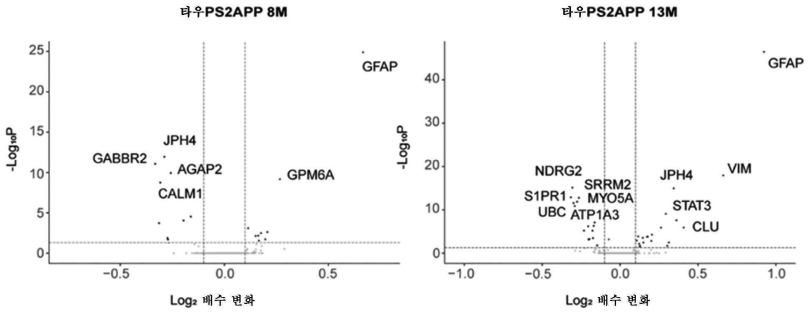
도면11c


성상세포 가상시간 분석의 공간 맵
대조군 8M
타우PS2APP 8M
가상시간
0.00
1.00
100 μm
100 μm
대조군 13M
타우PS2APP 13M
가상시간
0.00
1.00
100 μm
100 μm

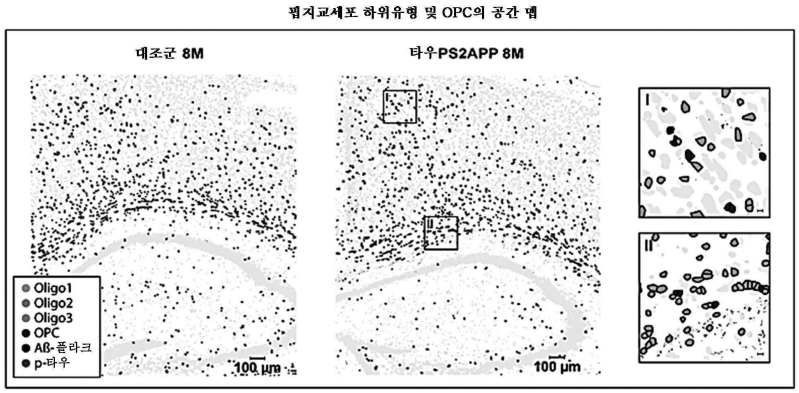
도면11d



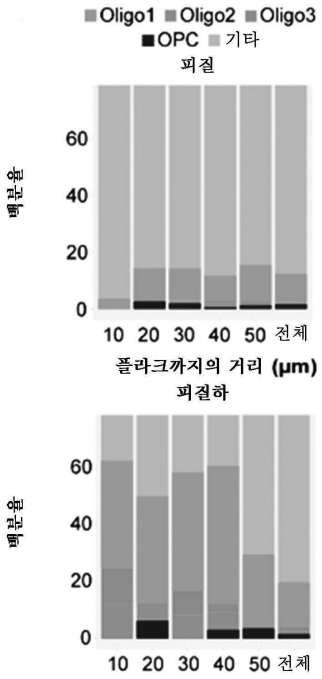
도면11e



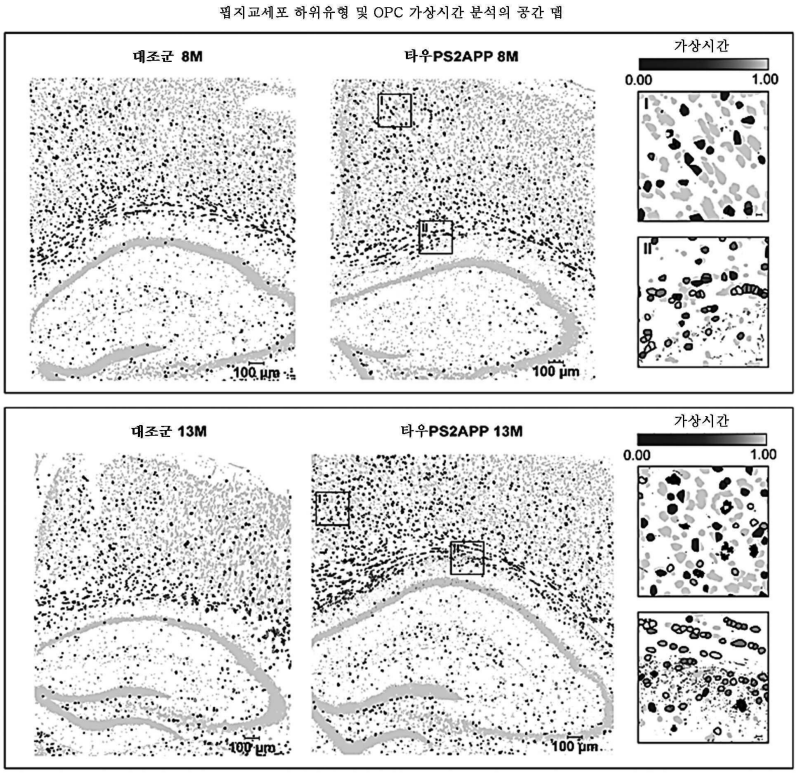
도면12a



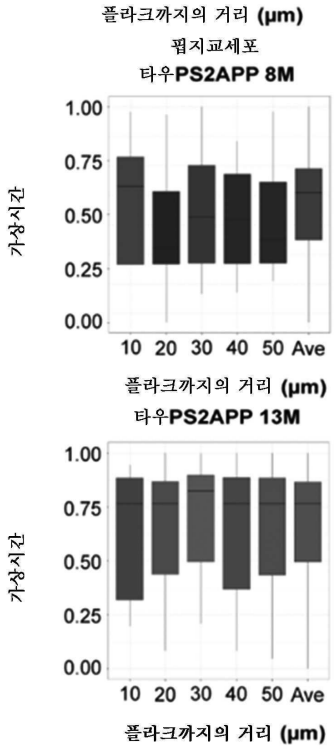
도면12b


Oligo1 Oligo2 Oligo3
OPC 기타
피질
60
40
20
0
백분율
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)
피질하
60
40
20
0
백분율
10 20 30 40 50 전체

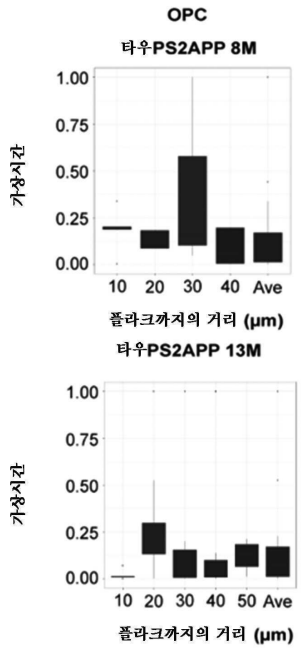
도면12c


웹지교세포 하위유형 및 OPC 가상시간 분석의 공간 맵
대조군 8M
타우PS2APP 8M
가상시간
0.00
1.00
100 μm
100 μm
대조군 13M
타우PS2APP 13M
가상시간
0.00
1.00
100 μm
100 μm

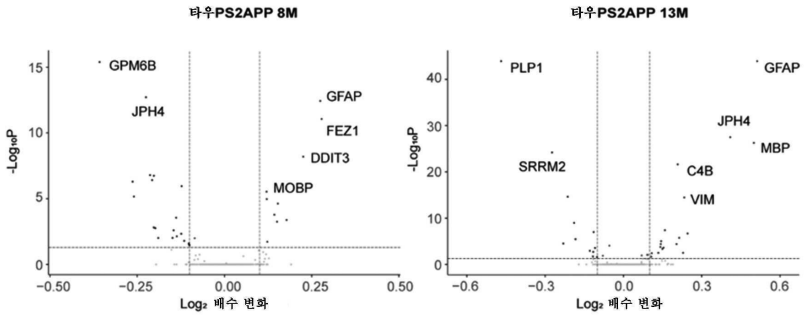
도면12d


플라크까지의 거리 (μm)
펩지교세포
타우PS2APP 8M
가상시간
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 50 Ave
플라크까지의 거리 (μm)
타우PS2APP 13M
가상시간
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 50 Ave
플라크까지의 거리 (μm)

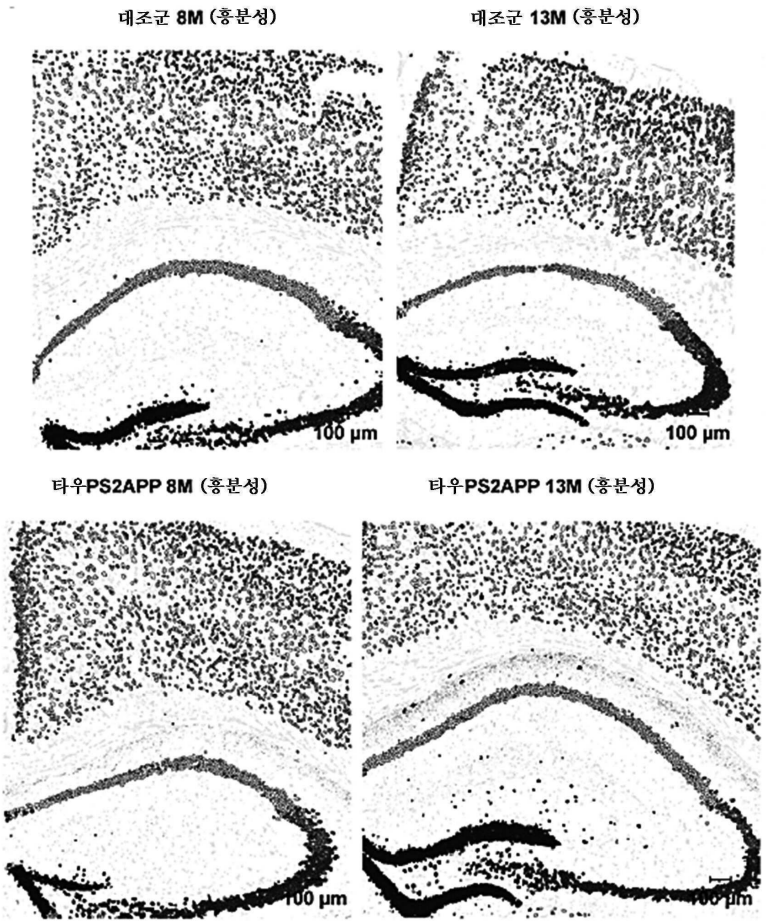
도면12e


OPC
타우PS2APP 8M
가상시간
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 Ave
플라크까지의 거리 (μm)
타우PS2APP 13M
가상시간
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
10 20 30 40 50 Ave
플라크까지의 거리 (μm)

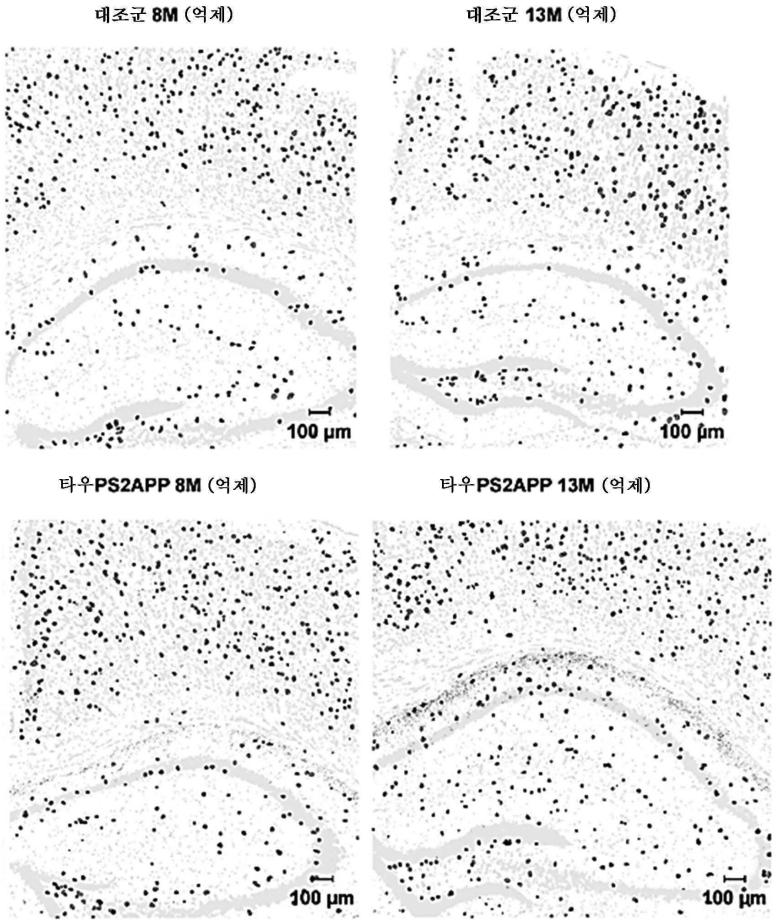
도면12f


타우PS2APP 8M
타우PS2APP 13M
GPM6B
JPH4
GFAP
FEZ1
DDIT3
MOBP
PLP1
SRRM2
C4B
VIM
MBP
-Log10P
Log2 배수 변화

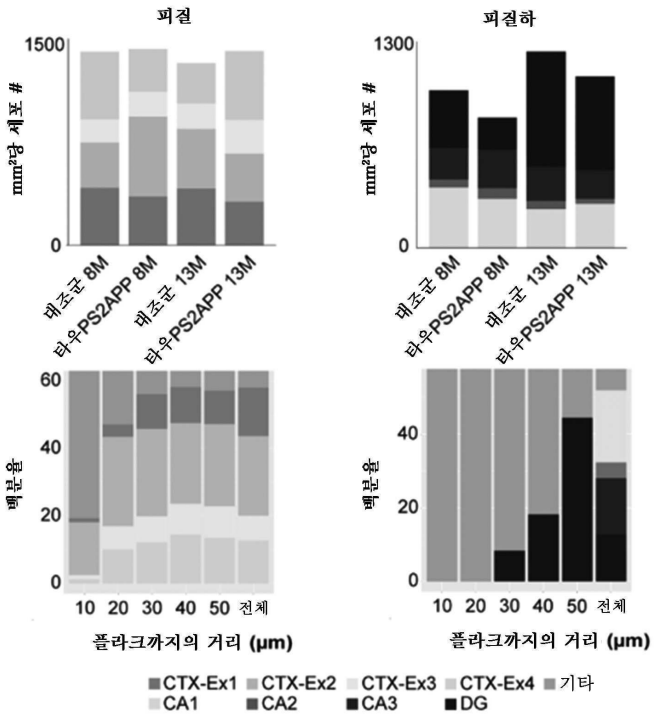
도면13a


대조군 8M (흥분성)
대조군 13M (흥분성)
타우PS2APP 8M (흥분성)
타우PS2APP 13M (흥분성)
100 μm

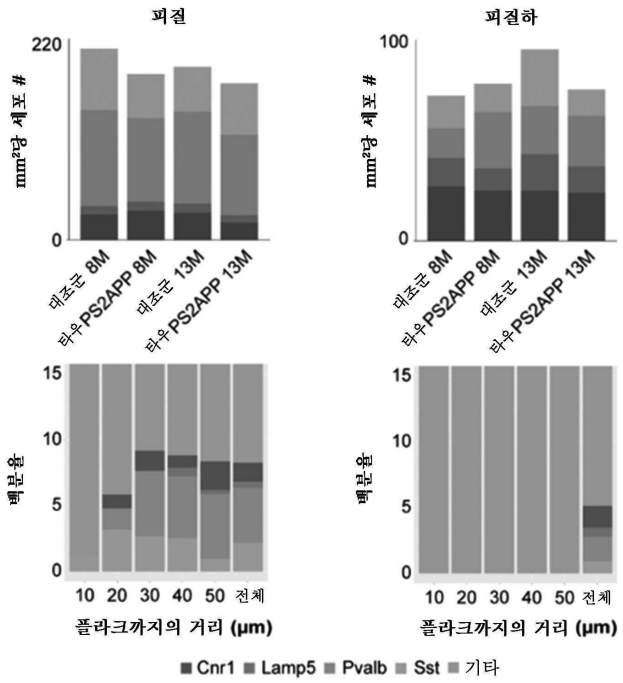
도면13b


대조군 8M (억제)
대조군 13M (억제)
타우PS2APP 8M (억제)
타우PS2APP 13M (억제)
100 μm
100 μm
100 μm
100 μm

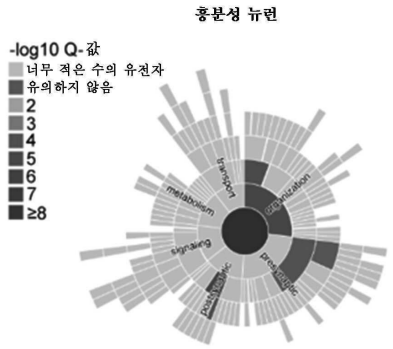
도면13c


피질
피질하
1500
1300
0
mm²당 세포 #
대조군 8M
타우PS2APP 8M
대조군 13M
타우PS2APP 13M
60
40
20
0
백분율
10 20 30 40 50 전체
플라크까지의 거리 (μm)
CTX-Ex1
CTX-Ex2
CTX-Ex3
CTX-Ex4
기타
CA1
CA2
CA3
DG

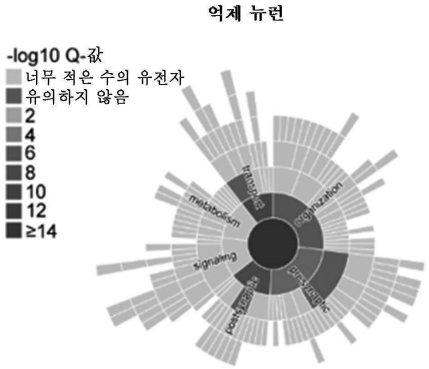
도면13d



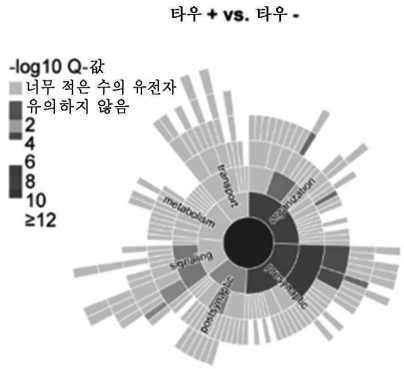
도면13e



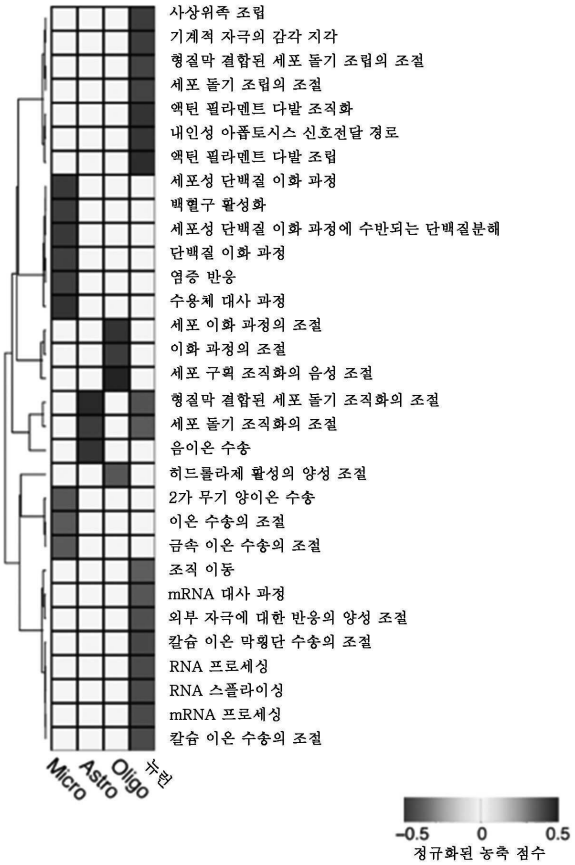
도면13f



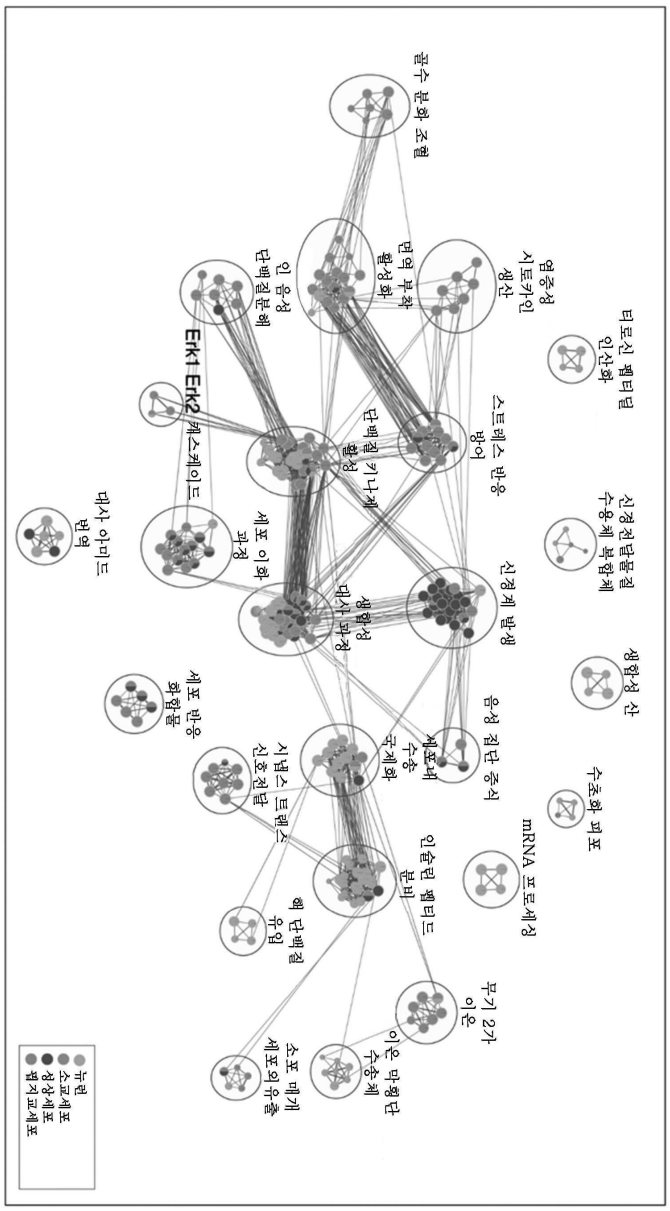
도면13g


타우 + vs. 타우 -
-log10 Q-값
너무 적은 수의 유전자
유의하지 않음
2
4
6
8
10
≥12
transport
organization
metabolism
signaling
morphogenesis
biosynthetic

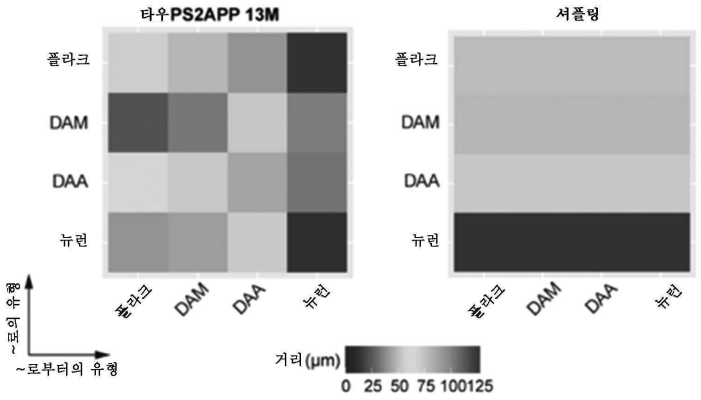
도면14a


사상위족 조립
기계적 자극의 감각 지각
형질막 결합된 세포 돌기 조립의 조절
세포 돌기 조립의 조절
액틴 필라멘트 다발 조직화
내인성 아폽토시스 신호전달 경로
액틴 필라멘트 다발 조립
세포성 단백질 이화 과정
백혈구 활성화
세포성 단백질 이화 과정에 수반되는 단백질분해
단백질 이화 과정
염증 반응
수용체 대사 과정
세포 이화 과정의 조절
이화 과정의 조절
세포 구획 조직화의 음성 조절
형질막 결합된 세포 돌기 조직화의 조절
세포 돌기 조직화의 조절
음이온 수송
히드롤라제 활성의 양성 조절
2가 무기 양이온 수송
이온 수송의 조절
금속 이온 수송의 조절
조직 이동
mRNA 대사 과정
외부 자극에 대한 반응의 양성 조절
칼슘 이온 막횡단 수송의 조절
RNA 프로세싱
RNA 스플라이싱
mRNA 프로세싱
칼슘 이온 수송의 조절
Micro
Astro
Oligo
뉴런
-0.5
0
0.5
정규화된 농축 점수

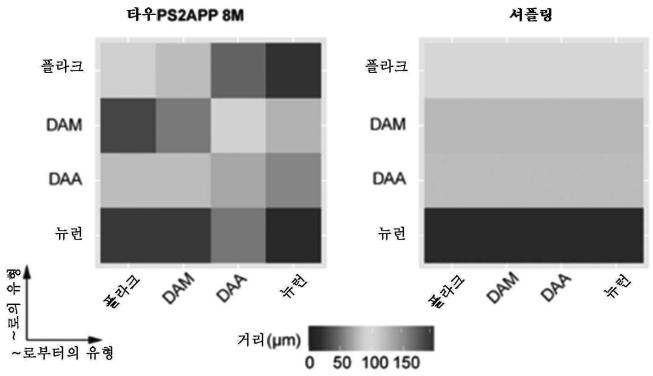
도면14b


글수 분화 조절
염증성 시토카인 생산
면역 부착 활성화
인 음성 단백질분해
티로신 펩티딜 인산화
스트레스 반응 망어
단백질 키나제 활성
신경전달물질 수용체 복합체
ErK1 ErK2 캐스케이드
대사 아미드 번역
세포 이화 과정
신경계 발생
생합성 대사 과정
생합성 산
세포 반응 화합물
음성 질단 증식
시냅스 신호전달
수송 국제화
세포부
수초화 피포
mRNA 프로세싱
인슐린 펩티드 분비
예 단백질 유입
뉴런
소교세포
성상세포
엽지교세포

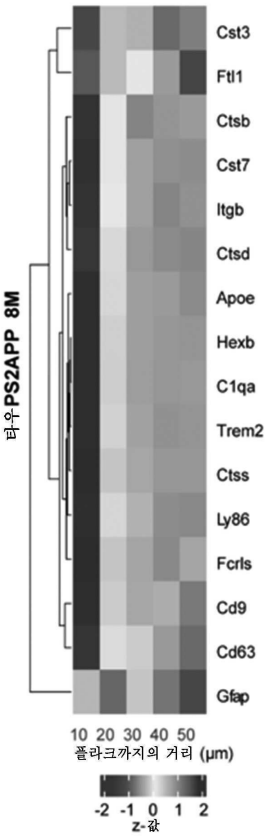
도면14c


타우PS2APP 13M
셔플링
플라크
DAM
DAA
뉴런
~로부터의 유형
거리(μm)
0 25 50 75 100125

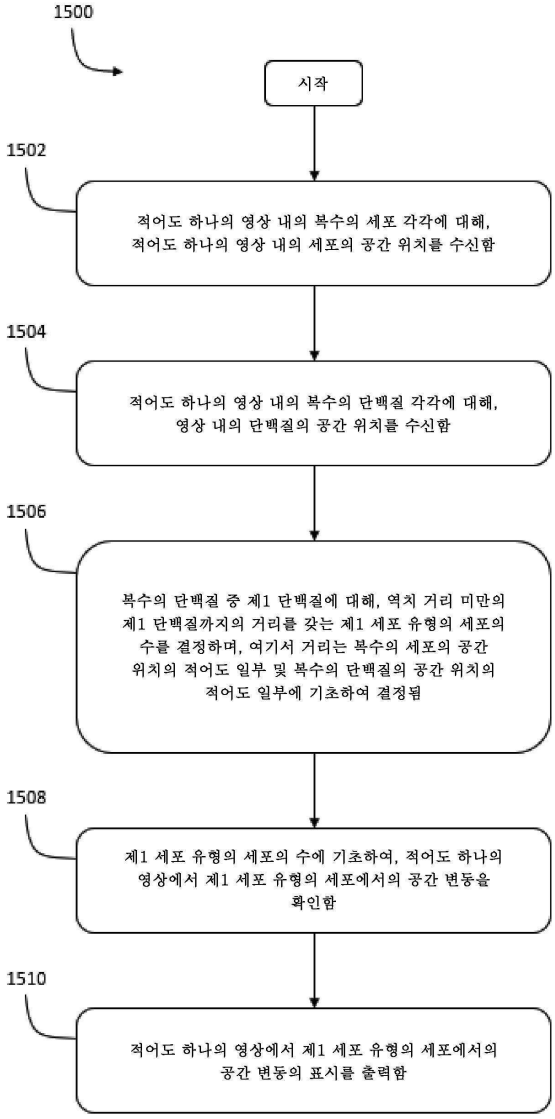
도면14d


타우PS2APP 8M
셔플링
플라크
DAM
DAA
뉴런
~로의 유형
~로부터의 유형
거리(μm)
0 50 100 150

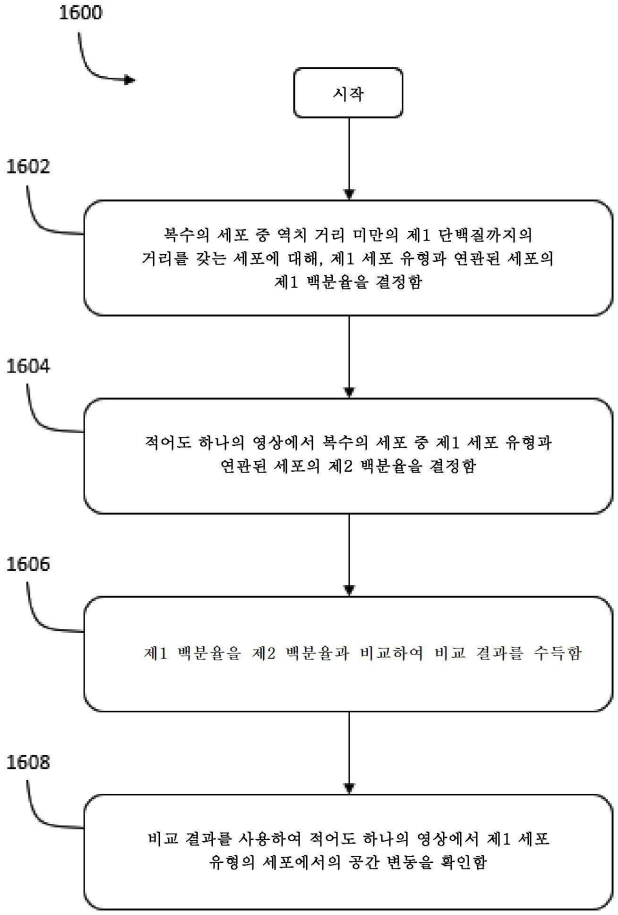
도면14e


타우PS2APP 8M
Cst3
Ftl1
Ctsb
Cst7
Itgb
Ctsd
Apoe
Hexb
C1qa
Trem2
Ctss
Ly86
Fcrls
Cd9
Cd63
Gfap
10 20 30 40 50
플라크까지의 거리 (μm)
-2 -1 0 1 2
z-값

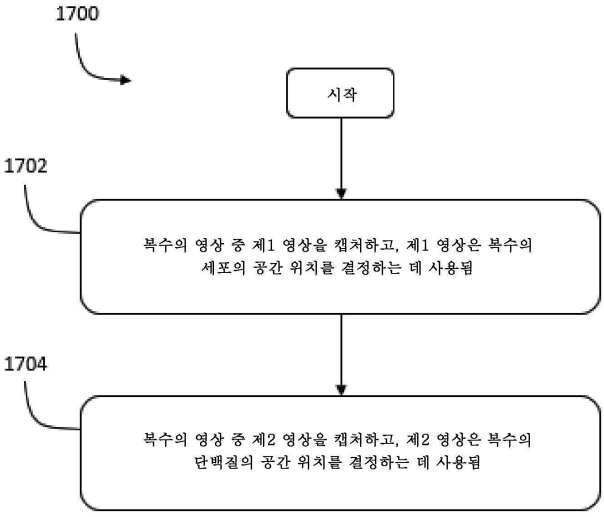
도면15


1500
시작
1502
적어도 하나의 영상 내의 복수의 세포 각각에 대해,
적어도 하나의 영상 내의 세포의 공간 위치를 수신함
1504
적어도 하나의 영상 내의 복수의 단백질 각각에 대해,
영상 내의 단백질의 공간 위치를 수신함
1506
복수의 단백질 중 제1 단백질에 대해, 역치 거리 미만의
제1 단백질까지의 거리를 갖는 제1 세포 유형의 세포의
수를 결정하며, 여기서 거리는 복수의 세포의 공간
위치의 적어도 일부 및 복수의 단백질의 공간 위치의
적어도 일부에 기초하여 결정됨
1508
제1 세포 유형의 세포의 수에 기초하여, 적어도 하나의
영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을
확인함
1510
적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의
공간 변동의 표시를 출력함

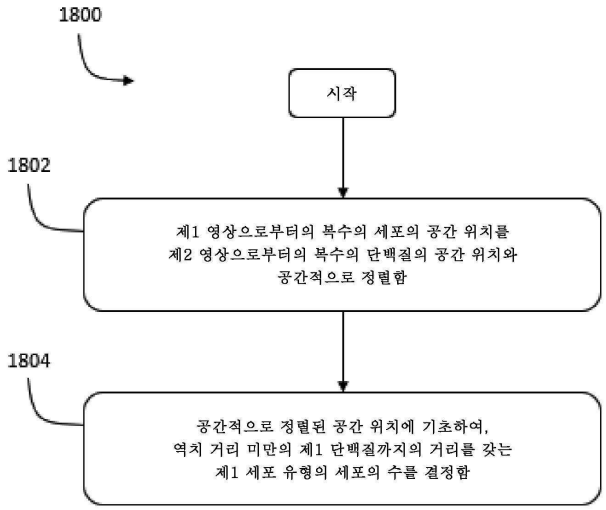
도면16


1600
시작
1602
복수의 세포 중 역치 거리 미만의 제1 단백질까지의 거리를 갖는 세포에 대해, 제1 세포 유형과 연관된 세포의 제1 백분율을 결정함
1604
적어도 하나의 영상에서 복수의 세포 중 제1 세포 유형과 연관된 세포의 제2 백분율을 결정함
1606
제1 백분율을 제2 백분율과 비교하여 비교 결과를 수득함
1608
비교 결과를 사용하여 적어도 하나의 영상에서 제1 세포 유형의 세포에서의 공간 변동을 확인함

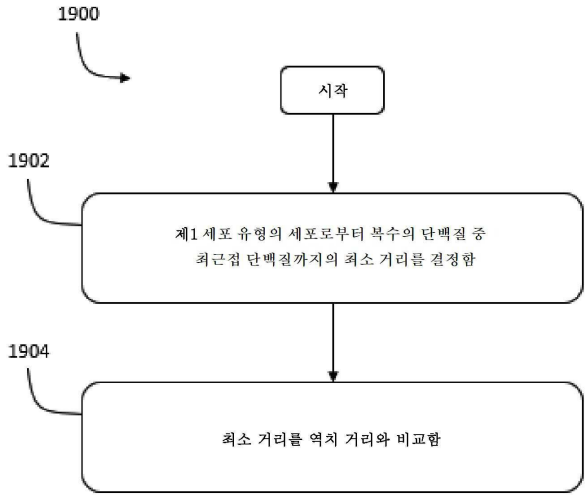
도면17


1700
시작
1702
복수의 영상 중 제1 영상을 캡처하고, 제1 영상은 복수의 세포의 공간 위치를 결정하는 데 사용됨
1704
복수의 영상 중 제2 영상을 캡처하고, 제2 영상은 복수의 단백질의 공간 위치를 결정하는 데 사용됨

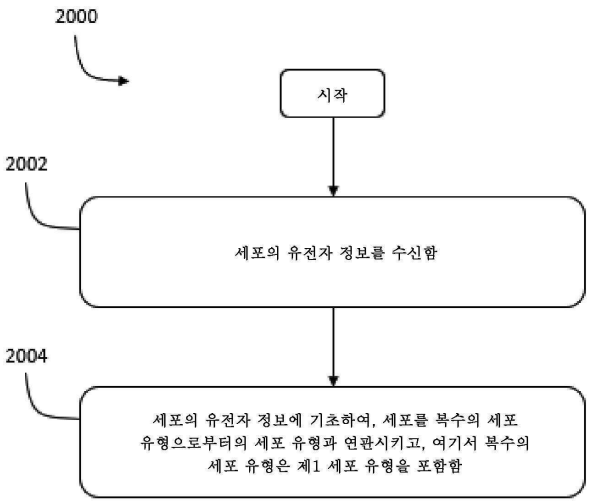
도면18



도면19



도면20



도면21

