



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0046547
(43) 공개일자 2024년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6827 (2018.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6827 (2018.05)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2024-7007861
(22) 출원일자(국제) 2022년08월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년03월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/039895
(87) 국제공개번호 WO 2023/018756
국제공개일자 2023년02월16일
(30) 우선권주장
63/231,585 2021년08월10일 미국(US)

(71) 출원인
더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드
미국 02142 매사추세츠주 캄브리지 메인 스트리트 415
매사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 매사추세츠 캄브리지 매사추세츠 애브뉴 77
(72) 발명자
왕, 샤오
미국 02142 매사추세츠 캄브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
정, 후
미국 02142 매사추세츠 캄브리지 메인 스트리트 415 더 브로드 인스티튜트, 인코퍼레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

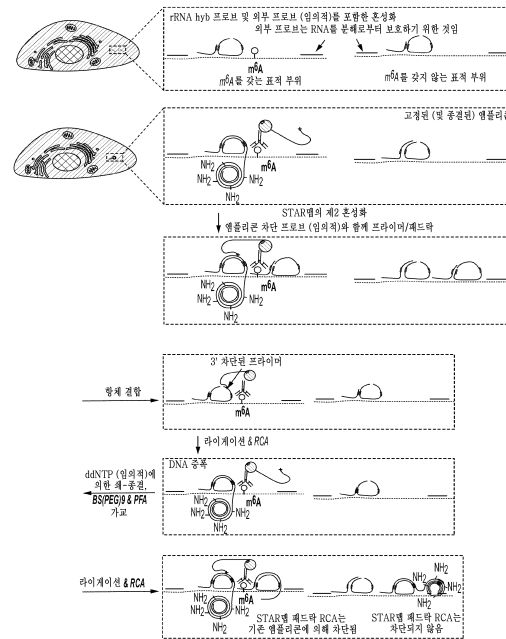
전체 청구항 수 : 총 338 항

(54) 발명의 명칭 계내 에피트랜스크립토프로파일링

(57) 요약

본 개시내용은 세포에서 에피트랜스크립토프 RNA 변형을 프로파일링하기 위한 방법, 조성물 및 시스템을 제공한다. 본 개시내용은 또한 세포 내의 1개 이상의 관심 RNA와 RNA-결합 단백질(예를 들어, 관심 RNA 상에 에피트랜스크립토프 변형을 도입하는 단백질) 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법을 제공한다. 또한, 본 개시내용은 무손(뒷면에 계속)

대표도



도 12a

상 조직 내의 세포를 포함한 세포에서의 에피트랜스크립톰 RNA 변형의 프로파일 또는 RNA 결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용의 프로파일에 기초하여 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립톰 변형 또는 1개 이상의 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용을 조정할 수 있는 후보 작용제를 스크리닝하거나 시험하는 방법이 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 본 개시내용은 또한 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 유용할 수 있는, 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 프로브 쌍 및 프로브 세트가 또한 본 개시내용에 기재된다. 추가적으로, 본 개시내용은 본원에 기재된 프로브 중 임의의 것을 포함하는 키트를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/154 (2013.01)

(72) 발명자

런, 경이

미국 02139 메사추세츠 캠프리지 메사추세츠 애브
뉴 77 메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지 내

텐, 자쿰

미국 02139 메사추세츠 캠프리지 메사추세츠 애브
뉴 77 메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지 내

귀, 켄팅

미국 02139 메사추세츠 캠프리지 메사추세츠 애브
뉴 77 메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지 내

명세서

청구범위

청구항 1

세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 프로파일링하는 방법으로서,

- a) 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
 - i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
 - b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
 - c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
 - d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
 - e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계
- 를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형이 N^6 -메틸아데노신 (m^6A), N^1 -메틸아데노신 (m^1A), 슈도우리딘, $N^6,2'$ -O-디메틸아데노신 (m^6Am), 7-메틸구아노신 (m^7G), N^4 -아세틸시티딘 (ac^4C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시티딘 (m^5C)인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형이 N^6 -메틸아데노신 (m^6A)인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 단백질이 PAPG를 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 세포를 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 항체는 PAPG에 의해 인식되고 결합되는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 항체가 2차 항체인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 세포를, 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하고 제2 프로브의 2차 항체에 의해 인식되는 1차 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 세포가 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉되는 것인 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 1차 항체가 항- m^6A 항체, 항- m^1A 항체, 항-슈도우리딘 항체, 항- m^6Am 항체, 항- m^7G 항체, 항- ac^4C 항체, 항-Nm 항체, 또는 항- m^5C 항체인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 에피트랜스크립톰 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제가 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 단백질이 m^6A -특이적 YTH 도메인 단백질인 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제가 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 중합 블로커를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 중합 블로커가 제2 프로브의 3' 단부에 위치하는 것인 방법.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 핵산 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 역전된 핵산 잔기가 역전된 티민 잔기인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드가 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제3 올리고뉴클레오타이드 프로브가 관심 RNA의 상이한 부분에 상보적인 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 구조:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[올리고뉴클레오타이드 바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제3 프로브에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서 각 경우의]-[는 임의적인 링커를 나타내는 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 구조:

5'-[에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커를 나타내는 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브가 구조:

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커를 나타내는 것인 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 40

세포에서 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 프로파일링하는 방법으로서,

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

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

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

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

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립톰 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형이 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A), N¹-메틸아데노신 (m¹A), 슈도우리딘, N⁶,2'-O-디메틸아데노신 (m⁶Am), 7-메틸구아노신 (m⁷G), N⁴-아세틸시티딘 (ac⁴C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시티딘 (m⁵C)인 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형이 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A)인 방법.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제40항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 단백질이 PAPG를 포함하는 것인 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 세포를 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 항체는 PAPG에 의해 인식되고 결합되는 것인 방법.

청구항 47

제40항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 항체가 2차 항체인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 세포를, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하고 제2 프로브의 2차 항체에 의해 인식되는 1차 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 세포가 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉되는 것인 방법.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 1차 항체가 항-m⁶A 항체, 항-m¹A 항체, 항-슈도우리딘 항체, 항-m⁶Am 항체, 항-m⁷G 항체, 항-ac⁴C 항체, 항-Nm 항체, 또는 항-m⁵C 항체인 방법.

청구항 52

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제가 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 단백질이 m⁶A-특이적 YTH 도메인 단백질인 방법.

청구항 55

제52항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형에 결합하는 작용제가 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제40항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 57

제40항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 58

제40항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 방법.

청구항 59

제40항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 60

제40항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 61

제40항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 62

제40항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 63

제40항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브의 각각의 부분이 임의적인 링커에 의해 연결된 것인 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 각 경우의 임의적인 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드

같이인 방법.

청구항 65

제40항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 구조:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3';

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3';

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3';

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-3';

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'; 또는

5'-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

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

청구항 66

제40항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 구조:

5'-[에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

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

청구항 67

제40항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 DNA를 포함하는 것인 방법.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA가 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA (tRNA), 또는 리보솜 RNA (rRNA)인 방법.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형이 다수의 세포에서 동시에 프로파일링 되는 것인 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형이 10개 초과인 세포, 20개 초과인 세포, 50개 초과인 세포, 100개 초과인 세포, 200개 초과인 세포, 300개 초과인 세포, 400개 초과인 세포, 500개 초과인 세포, 또는 1000개 초과인 세포에서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 세포가 복수의 세포 유형을 포함하는 것인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 세포 유형이 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 펩티고세포, 근육 세포, 심근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포, 간 세포, 평활근 및 골격근 세포, 조혈 세포, 림프구, 단핵구, 호중구, 대식세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 및 뉴런으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 무손상 조직 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 무손상 조직이 고정된 조직 샘플인 방법.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서, 조직이 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직인 방법.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과 RNA의 에피트랜스크립토 변형이 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 77

제1항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 다수의 상이한 에피트랜스크립토 변형이 세포에서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 78

제1항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 유전자 특이적 서열인 방법.

청구항 79

제1항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 서열분석 단계가 동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소 서열분석 (SEDAL)을 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 80

제1항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 서열분석 단계가 2, 3, 4, 5회 또는 5회 초과로 반복되는 것인 방법.

청구항 81

제1항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스가 히드로겔인 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 히드로겔이 폴리비닐 알콜 히드로겔, 폴리에틸렌 글리콜 히드로겔, 폴리아크릴레이트 히드로겔 또는 폴리아크릴아미드 히드로겔인 방법.

청구항 83

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 롤링 서클 증폭을 수행하는 단계가 아민-변형된 뉴클레오타이드를 제공하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 아민-변형된 뉴클레오타이드는 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 내로 혼입되는 것인 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계가 1개 이상의 앰플리콘의 아민-변형된 뉴클레오타이드를 아크릴산 N-히드록시숙신이미드 에스테르와 반응시키고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스를 공중합시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 85

제1항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 내의 추가의 분자를 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 추가의 분자가 비변형된 RNA, DNA, 단백질, 탄수화물 또는 지질인 방법.

청구항 87

제85항 또는 제86항에 있어서, 추가의 분자가 비변형된 RNA인 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 비변형된 RNA가

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

i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 및 비변형된 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 비변형된 관심 RNA에 상보적인 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

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

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

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 비변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계

에 의해 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 89

제1항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 에피트랜스크립톰 RNA 변형 프로파일을 다양한 세포 유형의 에피트랜스크립톰 RNA 변형 프로파일을 포함하는 참조 데이터와 비교함으로써 프로파일링된 세포의 세포 유형을 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 90

제1항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 세포에서 1개 이상의 유전자를 과다발현 또는 녹아웃시켜 1개 이상의 유전자가 관심 RNA의 에피트랜스크립톰 변형에 수반되는지 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 91

제1항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)-(e)를 다수의 시점에 반복하여 시간 경과에 따라 세포에서의 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 92

세포에서 RNA-결합 단백질과 1개 이상의 관심 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법으로서,

a) 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:

i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

- iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, RNA-결합 단백질이 YTH 패밀리 단백질 (예를 들어, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1, 또는 YTHDC2), IGF2BP 패밀리 단백질 (예를 들어, IGF2BP1, IGF2BP2, 또는 IGF2BP3), 또는 FMR1을 포함하는 것인 방법.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 95

제92항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분이 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 세포를 RNA-결합 단백질을 인식하는 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 RNA-결합 단백질을 인식하는 항체는 단백질에 의해 인식되고 결합되는 것인 방법.

청구항 97

제92항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 항체가 2차 항체인 방법.

청구항 99

제98항에 있어서, 세포를, RNA-결합 단백질을 인식하고 제2 프로브의 2차 항체에 의해 인식되는 1차 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 100

제99항에 있어서, 세포가 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉되는 것인 방법.

청구항 101

제92항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분이 RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 작용제를 포함하는 것인 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 작용제가 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 103

제101항에 있어서, RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 작용제가 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 104

제92항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 중합 블로커를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 중합 블로커가 제2 프로브의 3' 단부에 위치하는 것인 방법.

청구항 106

제104항 또는 제105항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 핵산 잔기를 포함하는 것인 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 역전된 핵산 잔기가 역전된 티민 잔기인 방법.

청구항 108

제92항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 109

제92항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드가 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 110

제92항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제3 올리고뉴클레오타이드 프로브가 관심 RNA의 상이한 부분에 상보적인 것인 방법.

청구항 111

제92항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 구조:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[올리고뉴클레오타이드 바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제3 프로브에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

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

청구항 112

제92항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 113

제92항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 114

제92항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 방법.

청구항 115

제92항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5-15, 6-14,

7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 116

제92항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 117

제92항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 118

제92항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 119

제92항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 구조:

5'-[RNA-결합 단백질을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 120

제92항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 121

제92항 내지 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 122

제92항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브가 구조:

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 123

제92항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 124

제92항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 125

제92항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 126

제92항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이인 방법.

청구항 127

제92항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA가 메신저 RNA (mRNA), 전달 RNA (tRNA), 또는 리보솜 RNA (rRNA)인 방법.

청구항 128

제92항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, RNA-결합 단백질과 관심 RNA 사이의 상호작용이 다수의 세포에서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 129

제128항에 있어서, RNA-결합 단백질과 관심 RNA 사이의 상호작용이 10개 초과인 세포, 20개 초과인 세포, 50개 초과인 세포, 100개 초과인 세포, 200개 초과인 세포, 300개 초과인 세포, 400개 초과인 세포, 500개 초과인 세포, 또는 1000개 초과인 세포에서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 130

제129항에 있어서, 세포가 복수의 세포 유형을 포함하는 것인 방법.

청구항 131

제130항에 있어서, 세포 유형이 줄기 세포, 전구 세포, 뉴런 세포, 성상세포, 수지상 세포, 내피 세포, 소교세포, 펩티고세포, 근육 세포, 심근 세포, 중간엽 세포, 상피 세포, 면역 세포, 간 세포, 평활근 및 골격근 세포, 조혈 세포, 림프구, 단핵구, 호중구, 대식세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 및 뉴런으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 132

제92항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 무손상 조직 내에 존재하는 것인 방법.

청구항 133

제132항에 있어서, 무손상 조직이 고정된 조직 샘플인 방법.

청구항 134

제132항 또는 제133항에 있어서, 조직이 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직인 방법.

청구항 135

제92항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, RNA-결합 단백질과 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과의 관심 RNA 사이의 상호작용이 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 136

제92항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, RNA-결합 단백질과 관심 RNA 사이의 다수의 상이한 상호작용이 세포에서 동시에 프로그래밍되는 것인 방법.

청구항 137

제92항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 유전자 특이적 서열인 방법.

청구항 138

제92항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, 서열분석 단계가 동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소 서열분석 (SEDAL)을 수행하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 139

제92항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 서열분석 단계가 2, 3, 4, 5회 또는 5회 초과로 반복되는 것인 방법.

청구항 140

제92항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스가 히드로겔인 방법.

청구항 141

제140항에 있어서, 히드로겔이 폴리비닐 알콜 히드로겔, 폴리에틸렌 글리콜 히드로겔, 폴리아크릴레이트 히드로겔 또는 폴리아크릴아미드 히드로겔인 방법.

청구항 142

제92항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 롤링 서클 증폭을 수행하는 단계가 아민-변형된 뉴클레오타이드를 제공하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 아민-변형된 뉴클레오타이드는 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 내로 혼입되는 것인 방법.

청구항 143

제142항에 있어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계가 1개 이상의 앰플리콘의 아민-변형된 뉴클레오타이드를 아크릴산 N-히드록시숙신이미드 에스테르와 반응시키고, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘 및 중합체 매트릭스를 공중합시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 144

제92항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 내의 추가의 분자를 프로파일링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 145

제144항에 있어서, 추가의 분자가 RNA, DNA, 단백질, 탄수화물 또는 지질인 방법.

청구항 146

제92항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 RNA-RBP 상호작용 프로파일을 다양한 세포 유형의 RNA-RBP 프로파일을 포함하는 참조 데이터와 비교함으로써 프로파일링된 세포의 세포 유형을 결정하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 147

대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:

i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

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

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;

여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 148

대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법으로서,

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

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

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

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

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;

여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 149

대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법으로서,

a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:

i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

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

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;

여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 150

제147항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형, 또는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용이 대조군 실험으로서 대상체로부터 채취한 세포와 함께 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 151

제147항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일, 또는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일이 참조 데이터베이스를 구성하는 것인 방법.

청구항 152

제147항 또는 제148항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형이 N^6 -메틸아데노신 (m^6A), N^1 -메틸아데노신 (m^1A), 슈도우리딘, $N^6,2'$ -O-디메틸아데노신 (m^6Am), 7-메틸구아노신 (m^7G), N^4 -아세틸시티딘 (ac^4C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시티딘 (m^5C)인 방법.

청구항 153

제147항 또는 제148항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형이 N^6 -메틸아데노신 (m^6A)인 방법.

청구항 154

제149항에 있어서, RNA-결합 단백질이 YTH 패밀리의 단백질 (예를 들어, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1, 또는 YTHDC2), IGF2BP 패밀리의 단백질 (예를 들어, IGF2BP1, IGF2BP2, 또는 IGF2BP3), 또는 FMR1인 방법.

청구항 155

제147항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가 면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 정신 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비노생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 156

제147항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 조직에 존재하는 것인 방법.

청구항 157

제156항에 있어서, 조직이 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직인 방법.

청구항 158

제156항 또는 제157항에 있어서, 조직이 대상체로부터 채취한 조직 샘플인 방법.

청구항 159

제158항에 있어서, 대상체가 비-인간 실험 동물인 방법.

청구항 160

제158항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 161

1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토 변형을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법으로서,

a) 후보 작용제로 처리되고 있거나 처리된 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각

의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:

- i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;

여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 에피트랜스크립토 RNA 변형을 조정한다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 162

1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토 변형을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법으로서,

- a) 후보 작용제로 처리되고 있거나 처리된 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서:
 - i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함하고;
 - ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;

여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 에피트랜스크립토 RNA 변형을 조정한다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 163

RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법으로서,

- a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
 - i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분

을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

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

e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;

여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용을 조정한다는 것을 나타내는 것인 방법.

청구항 164

제161항 또는 제162항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형이 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A), N¹-메틸아데노신 (m¹A), 슈도우리딘, N⁶,2'-O-디메틸아데노신 (m⁶Am), 7-메틸구아노신 (m⁷G), N⁴-아세틸시티딘 (ac⁴C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시티딘 (m⁵C)인 방법.

청구항 165

제161항 또는 제162항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형이 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A)인 방법.

청구항 166

제163항에 있어서, RNA-결합 단백질이 YTH 패밀리의 단백질 (예를 들어, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1, 또는 YTHDC2), IGF2BP 패밀리의 단백질 (예를 들어, IGF2BP1, IGF2BP2, 또는 IGF2BP3), 또는 FMR1인 방법.

청구항 167

제161항 내지 제166항 중 어느 한 항에 있어서, 후보 작용제가 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물인 방법.

청구항 168

제161항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 후보 작용제가 공지된 약물 또는 FDA-승인된 약물인 방법.

청구항 169

제167항 또는 제168항에 있어서, 단백질이 항체 또는 항체 변이체인 방법.

청구항 170

제167항 또는 제168항에 있어서, 핵산이 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)인 방법.

청구항 171

제161항 내지 제170항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토 변형을 조정하는 것이 질환 또는 장애의 증상을 감소, 경감 또는 제거하는 것과 연관되는 것인 방법.

청구항 172

제171항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 정신 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 173

대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

- a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
 - i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;
- e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계; 및
- f) 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 174

대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

- a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서:
 - i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함하고;
 - ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;
- e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계; 및
- f) 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 175

대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서,

- a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
 - i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;
- e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계; 및
- f) 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용 프로파일에서 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 176

제173항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토믹스 변형, 또는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용이 대조군 실험으로서 동시에 프로파일링되는 것인 방법.

청구항 177

제173항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토믹스 변형 프로파일, 또는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일이 참조 데이터를 구성하는 것인 방법.

청구항 178

제173항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, 치료가 치료제의 투여, 수술 또는 방사선 요법을 포함하는 것인 방법.

청구항 179

제173항 내지 제178항 중 어느 한 항에 있어서, 치료제가 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물인 방법.

청구항 180

제173항 내지 제179항 중 어느 한 항에 있어서, 치료제가 공지된 약물 또는 FDA-승인된 약물인 방법.

청구항 181

제179항 또는 제180항에 있어서, 단백질이 항체 또는 항체 변이체인 방법.

청구항 182

제179항 또는 제180항에 있어서, 핵산이 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA

(dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)인 방법.

청구항 183

제173항 내지 제182항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가 면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 정신 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비노생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환인 방법.

청구항 184

제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하는 프로브 쌍으로서, 여기서

- i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함하고;
- ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 185

제184항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형이 N^6 -메틸아데노신 (m^6A), N^1 -메틸아데노신 (m^1A), 슈도우리딘, $N^6,2'$ -O-디메틸아데노신 (m^6Am), 7-메틸구아노신 (m^7G), N^4 -아세틸시티딘 (ac^4C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시티딘 (m^5C)인 프로브 쌍.

청구항 186

제184항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형이 N^6 -메틸아데노신 (m^6A)인 프로브 쌍.

청구항 187

제184항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 188

제184항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 단백질 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 189

제188항에 있어서, 단백질이 PAPG를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 190

제189항에 있어서, PAPG가 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 항체를 인식하고 그에 결합하는 것인 프로브 쌍.

청구항 191

제184항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 192

제191항에 있어서, 항체가 2차 항체인 프로브 쌍.

청구항 193

제192항에 있어서, 2차 항체가 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 1차 항체에 결합하는 것인 프로브 쌍.

청구항 194

제193항에 있어서, 1차 항체가 항-m⁶A 항체인 프로브 쌍.

청구항 195

제184항 내지 제194항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 에피트랜스크립토 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 196

제195항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제가 단백질을 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 197

제196항에 있어서, 단백질이 m⁶A-특이적 YTH 도메인 단백질인 프로브 쌍.

청구항 198

제197항에 있어서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제가 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 199

제184항 내지 제198항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 쌍.

청구항 200

제184항 내지 제199항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 쌍.

청구항 201

제184항 내지 제200항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 프로브 쌍.

청구항 202

제184항 내지 제201항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 쌍.

청구항 203

제184항 내지 제202항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이인 프로브 쌍.

청구항 204

제184항 내지 제203항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 쌍.

청구항 205

제184항 내지 제204항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 쌍.

청구항 206

제184항 내지 제205항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브의 각각의 부분이 임의적인 링커에 의해 연결된 것인 프로브 쌍.

청구항 207

제206항에 있어서, 각 경우의 임의적인 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 쌍.

청구항 208

제184항 내지 제207항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 구조:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3';

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3';

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3';

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-3';

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'; 또는

5'-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서 각 경우의]-[는 임의적인 링커를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 209

제184항 내지 제208항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 구조:

5'-[에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서 각 경우의]-[는 임의적인 링커를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 210

제184항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 DNA를 포함하는 것인 프로브 쌍.

청구항 211

제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 프로브 세트로서, 여기서

i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 212

제211항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형이 N^6 -메틸아데노신 (m^6A), N^1 -메틸아데노신 (m^1A), 슈도우리딘, $N^6,2'$ -O-디메틸아데노신 (m^6Am), 7-메틸구아노신 (m^7G), N^4 -아세틸시티딘 (ac^4C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시티딘 (m^5C)인 프로브 세트.

청구항 213

제211항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형이 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A)인 프로브 세트.

청구항 214

제211항 내지 제213항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 215

제211항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 단백질 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 216

제215항에 있어서, 단백질이 PAPG를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 217

제216항에 있어서, PAPG가 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 항체를 인식하고 그에 결합하는 것인 프로브 세트.

청구항 218

제211항 내지 제214항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 219

제218항에 있어서, 항체가 2차 항체인 프로브 세트.

청구항 220

제219항에 있어서, 2차 항체가 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 1차 항체를 인식하는 것인 프로브 세트.

청구항 221

제220항에 있어서, 세포가 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉되는 것인 프로브 세트.

청구항 222

제220항 또는 제221항에 있어서, 1차 항체가 항-m⁶A 항체, 항-m¹A 항체, 항-슈도우리딘 항체, 항-m⁶Am 항체, 항-m⁷G 항체, 항-ac⁴C 항체, 항-Nm 항체, 또는 항-m⁵C 항체인 프로브 세트.

청구항 223

제211항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 224

제223항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제가 단백질을 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 225

제224항에 있어서, 단백질이 m⁶A-특이적 YTH 도메인 단백질인 프로브 세트.

청구항 226

제223항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합하는 작용제가 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것

인 프로브 세트.

청구항 227

제211항 내지 제226항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 중합 블로커를 추가로 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 228

제227항에 있어서, 중합 블로커가 제2 프로브의 3' 단부에 위치하는 것인 프로브 세트.

청구항 229

제227항 또는 제228항에 있어서, 중합 블로커가 역전된 핵산 잔기를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 230

제229항에 있어서, 역전된 핵산 잔기가 역전된 티민 잔기인 프로브 세트.

청구항 231

제211항 내지 제230항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 232

제211항 내지 제231항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 233

제211항 내지 제232항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제3 올리고뉴클레오타이드 프로브가 관심 RNA의 상이한 부분에 상보적인 것인 프로브 세트.

청구항 234

제211항 내지 제233항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 구조:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[올리고뉴클레오타이드 바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제3 프로브에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서 각 경우의]-[는 임의적인 링커를 나타내는 것인 프로브 세트.

청구항 235

제211항 내지 제234항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 236

제211항 내지 제235항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 237

제211항 내지 제236항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 프로브 세트.

청구항 238

제211항 내지 제237항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 239

제211항 내지 제238항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 240

제211항 내지 제239항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 241

제211항 내지 제240항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 242

제211항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 구조:

5'-[에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커를 나타내는 것인 프로브 세트.

청구항 243

제211항 내지 제242항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 244

제211항 내지 제243항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 245

제211항 내지 제244항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브가 구조:

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커를 나타내는 것인 프로브 세트.

청구항 246

제211항 내지 제245항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 247

제211항 내지 제246항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 248

제211항 내지 제247항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 249

제211항 내지 제248항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 250

제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 프로브 세트로서, 여기서

- i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 251

제250항에 있어서, RNA-결합 단백질이 YTH 패밀리의 단백질 (예를 들어, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1, 또는 YTHDC2), IGF2BP 패밀리의 단백질 (예를 들어, IGF2BP1, IGF2BP2, 또는 IGF2BP3), 또는 FMR1을 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 252

제250항 또는 제251항에 있어서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체를 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 253

제250항 내지 제252항 중 어느 한 항에 있어서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분이 단백질을 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 254

제253항에 있어서, 단백질이 RNA-결합 단백질을 인식하는 항체를 인식하고 그에 결합하는 것인 프로브 세트.

청구항 255

제250항 내지 제252항 중 어느 한 항에 있어서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 256

제255항에 있어서, 항체가 2차 항체인 프로브 세트.

청구항 257

제256항에 있어서, 2차 항체가 RNA-결합 단백질을 인식하는 1차 항체를 인식하는 것인 프로브 세트.

청구항 258

제257항에 있어서, 세포가 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉되는 것인 프로브 세트.

청구항 259

제250항 내지 제258항 중 어느 한 항에 있어서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분이 RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 260

제259항에 있어서, RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 작용제가 단백질을 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 261

제259항에 있어서, RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 작용제가 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 262

제250항 내지 제261항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 중합 블록을 추가로 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 263

제262항에 있어서, 중합 블록이 제2 프로브의 3' 단부에 위치하는 것인 프로브 세트.

청구항 264

제262항 또는 제263항에 있어서, 중합 블록이 역전된 핵산 잔기를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 265

제264항에 있어서, 역전된 핵산 잔기가 역전된 티민 잔기인 프로브 세트.

청구항 266

제250항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 267

제250항 내지 제266항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드가 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 268

제250항 내지 제267항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제3 올리고뉴클레오타이드 프로브가 관심 RNA의 상이한 부분에 상보적인 것인 프로브 세트.

청구항 269

제250항 내지 제268항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 구조:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[올리고뉴클레오타이드 바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제3 프로브에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서 각 경우의]-[는 임의적인 링커를 포함하는 것인 프로브 세트.

청구항 270

제250항 내지 제269항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 271

제250항 내지 제270항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 272

제250항 내지 제271항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 프로브 세트.

청구항 273

제250항 내지 제272항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 274

제250항 내지 제273항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 275

제250항 내지 제274항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 276

제250항 내지 제275항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 277

제250항 내지 제276항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 구조:

5'-[RNA-결합 단백질을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커를 나타내는 것인 프로브 세트.

청구항 278

제250항 내지 제277항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4-20, 5-19, 6-18, 7-17, 8-16, 9-15, 10-14, 또는 11-13개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 279

제250항 내지 제278항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분이 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 280

제250항 내지 제279항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 프로브가 구조:

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

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

청구항 281

제250항 내지 제280항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 282

제250항 내지 제281항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분이 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 283

제250항 내지 제282항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 284

제250항 내지 제283항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브 세트.

청구항 285

제184항 내지 제210항 중 어느 한 항의 다수의 프로브 쌍 또는 제211항 내지 제284항 중 어느 한 항의 다수의 프로브 세트를 포함하는 복수의 프로브로서, 여기서 각각의 프로브 쌍 또는 프로브 세트는 상이한 관심 RNA에

상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 복수의 프로브.

청구항 286

제285항에 있어서, 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과의 프로브 쌍 또는 프로브 세트를 포함하는 복수의 프로브.

청구항 287

제184항 내지 제210항 중 어느 한 항의 프로브 쌍 또는 제211항 내지 제284항 중 어느 한 항의 프로브 세트를 포함하는 키트.

청구항 288

제287항에 있어서, 제184항 내지 제210항 중 어느 한 항의 다수의 프로브 쌍 또는 제211항 내지 제284항 중 어느 한 항의 다수의 프로브 세트를 포함하며, 여기서 각각의 프로브 쌍 또는 프로브 세트는 상이한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 키트.

청구항 289

제288항에 있어서, 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과의 프로브 쌍 또는 프로브 세트를 포함하는 키트.

청구항 290

제287항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 추가로 포함하는 키트.

청구항 291

제287항 내지 제290항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 효소를 추가로 포함하는 키트.

청구항 292

제291항에 있어서, 1종 이상의 효소가 리가제를 포함하는 것인 키트.

청구항 293

제291항 또는 제292항에 있어서, 1종 이상의 효소가 폴리머라제를 포함하는 것인 키트.

청구항 294

제287항 내지 제293항 중 어느 한 항에 있어서, 아민-변형된 뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 키트.

청구항 295

제287항 내지 제294항 중 어느 한 항에 있어서, 중합체 매트릭스를 제조하기 위한 시약 및 단량체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 296

세포에서 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 프로파일링하기 위한 시스템으로서,

a) 세포;

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

i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함하고;

ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레

오티드 부분을 포함함;

c) 현미경; 및

d) 컴퓨터

를 포함하는 시스템.

청구항 297

제296항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형이 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A), N¹-메틸아데노신 (m¹A), 슈도우리딘, N⁶,2'-O-디메틸아데노신 (m⁶Am), 7-메틸구아노신 (m⁷G), N⁴-아세틸시티딘 (ac⁴C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시티딘 (m⁵C)인 시스템.

청구항 298

제296항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형이 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A)인 시스템.

청구항 299

제296항 내지 제298항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 시스템.

청구항 300

제296항 내지 제299항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 시스템.

청구항 301

제300항에 있어서, 항체가 2차 항체인 시스템.

청구항 302

제301항에 있어서, 2차 항체가 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 1차 항체에 결합하는 것인 시스템.

청구항 303

제302항에 있어서, 1차 항체가 항-m⁶A 항체, 항-m¹A 항체, 항-슈도우리딘 항체, 항-m⁶Am 항체, 항-m⁷G 항체, 항-ac⁴C 항체, 항-Nm 항체, 또는 항-m⁵C 항체인 시스템.

청구항 304

제296항 내지 제303항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 시스템.

청구항 305

제304항에 있어서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 결합하는 작용제가 단백질을 포함하는 것인 시스템.

청구항 306

제305항에 있어서, 단백질이 m⁶A-특이적 YTH 도메인 단백질인 시스템.

청구항 307

제296항 내지 제306항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이인 시스템.

청구항 308

제296항 내지 제307항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이인 시스템.

청구항 309

제296항 내지 제308항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 시스템.

청구항 310

제296항 내지 제309항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21 개의 뉴클레오타이드 길이인 시스템.

청구항 311

제296항 내지 제310항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이인 시스템.

청구항 312

제296항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이인 시스템.

청구항 313

제296항 내지 제312항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열이 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이인 시스템.

청구항 314

제296항 내지 제313항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브의 각각의 부분이 임의적인 링커에 의해 연결된 것인 시스템.

청구항 315

제314항에 있어서, 각 경우의 임의적인 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이인 시스템.

청구항 316

제296항 내지 제315항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브가 구조:

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3';

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3';

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3';

5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-3';

5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'; 또는

5'-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서 각 경우의]-[는 임의적인 링커를 포함하는 것인 시스템.

청구항 317

제296항 내지 제316항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 프로브가 구조:

5'-[에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서 각 경우의]-[는 임의적인 링커를 포함하는 것인 시스템.

청구항 318

제296항 내지 제317항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 프로브 및 제2 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 DNA를 포함하는 것인 시스템.

청구항 319

하기를 포함하는 시스템:

- a) 세포;
- b) 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 세트, 여기서:
 - i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함함;
- c) 현미경; 및
- d) 컴퓨터.

청구항 320

하기를 포함하는 시스템:

- a) 세포;
- b) 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 세트, 여기서:
 - i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
 - iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함함;
- c) 현미경; 및
- d) 컴퓨터.

청구항 321

에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 또 다른 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 프로브.

청구항 322

제321항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형이 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A), N¹-메틸아데노신 (m¹A), 슈도우리딘, N⁶,2'-O-디메틸아데노신 (m⁶Am), 7-메틸구아노신 (m⁷G), N⁴-아세틸시티딘 (ac⁴C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시티딘 (m⁵C)인 프로브.

청구항 323

제322항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형이 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A)인 프로브.

청구항 324

제321항 내지 제323항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브.

청구항 325

제321항 내지 제324항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 프로브의 부분이 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 프로브.

청구항 326

제325항에 있어서, 항체가 2차 항체인 프로브.

청구항 327

제326항에 있어서, 2차 항체가 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 1차 항체에 결합하는 것인 프로브.

청구항 328

제327항에 있어서, 1차 항체가 항-m⁶A 항체인 프로브.

청구항 329

제321항 내지 제328항 중 어느 한 항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 인식하는 프로브의 부분이 에피트랜스크립톰 RNA 변형에 결합하는 작용제를 포함하는 것인 프로브.

청구항 330

제329항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형에 결합하는 작용제가 단백질을 포함하는 것인 프로브.

청구항 331

제330항에 있어서, 단백질이 m⁶A-특이적 YTH 도메인 단백질인 프로브.

청구항 332

제331항에 있어서, 에피트랜스크립톰 RNA 변형에 결합하는 작용제가 항체 또는 항체 변이체를 포함하는 것인 프로브.

청구항 333

제321항 내지 제332항 중 어느 한 항에 있어서, 또 다른 프로브의 부분에 상보적인 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브.

청구항 334

제321항 내지 제333항 중 어느 한 항에 있어서, 또 다른 프로브의 부분에 상보적인 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할되는 것인 프로브.

청구항 335

제321항 내지 제334항 중 어느 한 항에 있어서, 프로브의 각각의 부분이 임의적인 링커에 의해 연결된 것인 프로브.

청구항 336

제335항에 있어서, 각 경우의 임의적인 링커가 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이인 프로브.

청구항 337

제321항 내지 제336항 중 어느 한 항에 있어서, 구조:

5'-[에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분]-[또 다른 프로브에 상보적인 부분]-3'

를 포함하며, 여기서 각 경우의]-[는 임의적인 링커를 포함하는 것인 프로브.

청구항 338

제321항 내지 제337항 중 어느 한 항에 있어서, 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분이 DNA를 포함하는 것인 프로브.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2021년 8월 10일에 출원된 미국 가출원 U.S.S.N. 63/231,585의 우선권을 주장하며, 이는 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 세포 RNA는 효소-촉매된 변형의 풍부한 화학적 레퍼토리 (즉, 에피트랜스크립토스)를 함유한다 (Roundtree, I. A. et al., Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. Cell 169, 1187 (2017)). 모델 유기체의 유전자 분석은 RNA-변형 효소가 고등 진핵생물에 필수적임을 밝혀내었다. 또한, RNA-변형 경로는 세포 운명, 기관 발달, 및 인간 질환 (예를 들어, 암)을 조절하는 것으로 확인되었다 (Jonkhout, N. et al., The RNA modification landscape in human disease. RNA 23, 1754 (2017); Li, X. et al., Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. Nature Methods 14, 23 (2017)). 그러나, 이들 에피트랜스크립토스 변형이 복잡한 생물학적 시스템에서 세포 기능에 어떻게 영향을 미치는지에 대한 이해는 여전히 제한적이다. 이는 RNA 변형의 전통적인 분석이 벌크 RNA 서열분석 또는 질량 분광분석법을 사용한 수백만개의 세포의 혼합물에 의존하기 때문이다 (Li, X. et al., Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. Nature Methods 14, 23 (2017)). 그러나, 단일-세포 서열분석 접근법에 의한 최근 연구는 다세포 유기체가 다양한 세포 유형으로 이루어지고, 심지어 명백하게 균질한 세포 집단도 가변 단일-세포 상태를 갖는다는 것을 밝혀내었다. 또한, 동일한 유형의 RNA 변형이 세포 유형 및 생리학적 상황에 따라 반대되는 조절 효과를 가질 수 있다. 단일-세포 RNA 서열분석 기술이 트랜스크립토스 분석을 위해 변환되었지만, 에피트랜스크립토스 연구에서의 단일-세포 해상 및 세포하 해상도의 결여는 생물학적 조직에서의 RNA 변형 패턴의 이질성을 모호하게 하였고, RNA 변형이 상이한 세포 유형에 걸쳐 유전자 발현을 어떻게 조절하는지 본 발명자들이 분석하는 능력을 손상시켰다. 따라서, 단일-세포 해상 및/또는 세포하 해상에서 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 프로파일링하기 위한 시스템이 필요하다.

발명의 내용

[0004] 이전에 개발된 단일-세포 RNA 서열분석 방법과 연관된 한계를 다루기 위해, RNA 변형의 3차원 (3D) 계내 서열분석을 위한 플랫폼, 뿐만 아니라 RNA와 이러한 RNA 변형을 설치하는 단백질 사이의 상호작용을 프로파일링하기 위한 플랫폼을 개발하였다 (도 1, 10a, 12a, 13a, 및 13c). 이들 플랫폼은 무손상 생물학적 조직 내 단일-세포에서 또는 심지어 세포하 해상에서 RNA 변형에 의해 매개되는 유전자 조절 메커니즘을 분석하는 데 이용될 수

있다. 따라서, 에피트랜스크립토 RNA 변형 (예를 들어, N^6 -메틸아데노신 (m^6A))은 RNA-결합 단백질 (예를 들어, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 설치하는 효소)과 RNA 사이의 상호작용과 함께 프로파일링될 수 있다. 본원에 개시된 방법, 프로브, 조성물, 및 시스템은 다양한 조직에서 다양한 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일링에 광범위하게 적용가능하다. 이들 방법 및 시스템은 또한 다양한 세포 유형에서 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질이 세포 상태를 규정하고, 예를 들어 뇌 기능을 조절하기 위해 상호작용하는 방법을 연구하는 데 유용할 수 있다 (Widagdo, J. et al., The m^6A -epitranscriptomic signature in neurobiology: from neurodevelopment to brain plasticity. Journal of Neurochemistry 147, 137 (2018)). 본원에 기재된 방법, 조성물 및 시스템은 또한 복잡한 생물학적 시스템에서 단일-세포 또는 세포하 해상 (DNA 앰플리콘의 크기 및 광학 한계 둘 다에 의존하여, 대략 150-400 nm 공간 해상)에서 전사후 유전자 조절 메커니즘의 새로운 원리를 확립하는 데, 뿐만 아니라 건강한 상태 및 질환에서 RNA 화학적 지문 (에피트랜스크립토 RNA 변형)의 역할을 발견하는 데 유용할 수 있다. 본원에 기재된 방법, 조성물 및 시스템은 또한 무손상 조직 (예를 들어, 인간 또는 비-인간 대상체에 의해 또는 그로부터 제공된 조직 샘플, 예컨대 생검) 내에 존재하는 세포에 대해 사용될 수 있다.

[0005] 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 세포 또는 다수의 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 프로파일링하기 위한 방법, 조성물, 및 시스템을 제공한다 (예를 들어, 도 1, 10a, 및 12a 참조). 본원에 개시된 방법 및 시스템에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍 또는 프로브 세트와 접촉될 수 있고, 이는 본원에 추가로 기재되어 있으며, 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA를 (예를 들어, 롤링 서클 증폭에 의해) 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 데 사용될 수 있다. 이어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키고, 서열분석하여 전사체의 정체 및 중합체 매트릭스 내의 그의 위치를 결정할 수 있다 (예를 들어, 본원에 추가로 기재된 바와 같은 SEDAL 서열분석 (동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소 서열분석)을 포함). 변형된 관심 전사체의 위치를 사용하여, 적어도 1개의 에피트랜스크립토 변형을 포함하는 관심 RNA를 프로파일링할 수 있고, 시공간적 정보를 수득하여 에피트랜스크립토 변형, 세포하 위치, 및 시기가 건강한 상태 및 질환에서 세포 기능에 어떻게 영향을 미치는지에 대한 이해를 개선시킬 수 있다. 방법 및 시스템은, 예를 들어, 이환 조직 샘플 및 건강한 조직 샘플로부터의 세포 (또는 다수의 세포)에서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 비교하는 데; 또는 예를 들어 작용제 (예를 들어, 치료제 또는 잠재적 치료제, 예컨대 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질, 또는 탄수화물)로 처리된 세포 및 비처리된 세포, 또는 이환 세포 및 건강한 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 비교하는 데 유용할 수 있다.

[0006] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 프로파일링하는 방법을 제공하며, 이는:

[0007] a) 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브"), 제2 프로브 (즉, "스플린트 프로브") 및 제3 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하고, 여기서:

[0008] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열), 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0009] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0010] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0011] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

[0012] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

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

[0014] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 에피트랜스크립톰 RNA 변형을 프로파일링하는 방법을 제공하며, 이는:

[0016] a) 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 (즉, "페드락 프로브") 및 제2 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하고, 여기서:

[0017] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열)을 포함하고;

[0018] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0019] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

[0020] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0021] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0022] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립트 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함한다. 단지 2개의 프로브가 본원의 방법에 사용되는 특정 실시양태에서, 스플린트 프로브는 사용되지 않는다.

[0023] 따라서, 이들 방법은 (예를 들어, 무손상 조직 내의) 세포 또는 세포 집단 내에서 또는 세포의 소기관 내에서 1 개 이상의 관심 에피트랜스크립토 변형에 의해 변형된 관심 RNA의 위치를 결정하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과,의 관심 RNA가 본원에 기재된 방법을 사용하여 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형은 N^6 -메틸아데노신 (m^6A), N^1 -메틸아데노신 (m^1A), 슈도우리딘, $N^6,2'$ -O-디메틸아데노신 (m^6Am), 7-메틸구아노신 (m^7G), N^4 -아세틸시티딘 (ac^4C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시티딘 (m^5C)이다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 세포 또는 다수의 세포에서, 또는 세포하 위치, 예컨대 1개 이상의 특정한 소기관에서 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하기 위한 방법, 프로브, 조성물 및 시스템을 제공한다 (예를 들어, 도 13a 및 13c 참조). 본원에 개시된 방법 및 시스템에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍 또는 프로브 세트와 접촉될 수 있고, 이는 본원에 추가로 기재되어 있으며, RNA-결합 단백질에 의해 결합된 관심 RNA를 (예를 들어, 롤링 서클 증폭에 의해) 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 데 사용될 수 있다. 이어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키고, 서열분석하여 전사체의 정체 및 중합체 매트릭스 내의 그의 위치를 결정할 수 있다 (예를 들어, 본원에 추가로 기재된 바와 같은 SEDAL 서열분석 (동적 어닐링 및 라이게이션에 의한 오류-감소 서열분석)을 포함). 변형된 관심 전사체의 위치를 사용하여, 적어도 1개의 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 관심 RNA를 프로파일링할 수 있고, 시공간적 정보를 수득하여 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용, 이러한 상호작용의 세포하 위치, 및 이러한 상호작용의 시기가 건강한 상태 및 질환에서 세포 기능에 어떻게 영향을 미치는지에 대한 이해를 개선시킬 수 있다. 방법 및 시스템은, 예를 들어, 이환 조직 샘플 및 건강한 조직 샘플로부터의 세포 (또는 다수의 세포)에서 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 비교하는 데; 또는 예를 들어 작용제 (예를 들어, 치료제 또는 잠재적 치료제)로 처리된 세포 및 비처리된 세포, 또는 이환 세포 및 건강한 세포에서 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 비교하는 데 유용할 수 있다.

[0025] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 RNA-결합 단백질과 1개 이상의 관심 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:

[0026] a) 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브"), 제2 프로브 (즉, "스플린트 프로브") 및 제3 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하고, 여기서:

[0027] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는

고유한 서열), 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0028] ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0029] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0030] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

[0031] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0032] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0033] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함한다.

[0034] 따라서, 이들 방법은 (예를 들어, 무손상 조직 내의) 세포 또는 세포 집단 내에서 또는 세포의 소기관 내에서 1개 이상의 RNA-결합 단백질 (예를 들어, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 설치하는 효소)에 의해 결합된 관심 RNA의 위치를 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0035] 본원에 기재된 방법, 조성물, 및 시스템은 조직 (예를 들어, 발생 중인 조직, 정상 조직, 이환 조직, 치료된 조직)에서 에피트랜스크립토 RNA 변형 및 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 연구하는 데, 다양한 질환을 진단하고 치료하는 데, 연구 목적을 위해, 및 약물 발견에 유용할 수 있다. 따라서, 한 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체, 또는 건강하거나 건강한 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 세포 또는 다수의 세포에 대해 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA 또는 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 관심 RNA의 발현은 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포 (예를 들어, 건강한 개체로부터의 세포, 또는 건강한 개체의 집단으로부터의 다수의 세포)에서의 동일한 변형된 관심 RNA의 발현과 비교될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포의 에피트랜스크립토 RNA 변형 프로파일 또는 세포에서의 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용 프로파일 (관심 단일 RNA 또는 다중 RNA, 예를 들어 특정 질환 서명 포함)에서의 임의의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낼 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포 (예를 들어, 정상 세포)에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형 및/또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 발현과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포 (예를 들어, 정상 세포)에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형 및/또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용은 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포의 프로파일은 비-이환 세포에 대한 이러한 참조 데이터와 비교될 수 있다.

[0036] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 1개 이상의 관심 RNA의 에피트랜스크립토 변형 또는 RNA-결합 단백질과 1개 이상의 관심 RNA 사이의 상호작용을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법은 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하에 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 발현 및/또는 세포 (예를 들어, 정상 세포 또는 이환 세포)에서의 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용의 프로파일은 1종 이상의 후보 작용제에 노출되지 않은 세포에서의 동일한 변형된 관심 RNA 또는 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 RNA의 발현과 비교될 수 있다. 후보 작용제(들)에 노출되지 않은 세포에 비해 에피트랜스크립토 RNA 변형 프로파일 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용 프로파일에서의 임의의 차이는 1개 이상의 관심 RNA의 에피트랜스크립토 변형이 후보 작용제(들)에 의해 조정된다는 것을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 질환의 치료와 연관된 것으로 공지된 특정한 서명 (예를 들어, 다수의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA, 또는 RNA-결합 단백질과 다수의 관심 RNA 사이의 상호작용의 서명)을 사용하여, 에피트랜스크립토 RNA 변형 및/또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 목적하는 방식으로 조정하여 질환을 치료할 수 있는 작용제를 확인할 수 있다. 본원에 기재된 방법 및 시스템은 또한, 예를 들어 1개 이상의 세포를 후보 작용제 또는 공지된 약물 (또는 예를 들어 화합물의 스크리닝 라이브러리에 제공된 바와 같은 다수의 후보 작용제 및/또는 공지된 약물의 조합)로 처리한 경우 특이적 에피트랜스크립토 RNA 변형 서명 또는 RNA-결합 단백질-RNA

상호작용 서명을 관찰함으로써, 특정 부작용을 갖는 약물을 확인하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 방법 및 시스템은 또한, 에피트랜스크립토스 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용의 기본 생물학을 연구하는 데 유용할 수 있는 연구 시약 또는 화학적 프로브를 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0037] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 에피트랜스크립토스 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하기 위한 방법 및 시스템은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 에피트랜스크립토스 RNA 변형 프로파일 또는 1개 이상의 관심 RNA의 RNA-결합 단백질과의 상호작용 프로파일은 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 에피트랜스크립토스 RNA 변형 프로파일 또는 1개 이상의 관심 RNA의 RNA-결합 단백질과의 상호작용 프로파일과 비교될 수 있다. 이어서, 비-이환 세포에 비해 에피트랜스크립토스 RNA 변형 프로파일 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용 프로파일에서 임의의 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료 (예를 들어, 제약 작용제, 수술, 방사선 요법, 수술, 물리 요법, 생활방식 변화 등)가 투여될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토스 RNA 변형 및/또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 에피트랜스크립토스 RNA 변형과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포 (예를 들어, 정상 세포)에서의 에피트랜스크립토스 RNA 변형 및/또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용은 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포에서의 에피트랜스크립토스 RNA 변형 및/또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용은 비-이환 세포에 대한 이러한 참조 데이터와 비교될 수 있다.

[0038] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨) 및 제2 프로브 (또한 본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)를 포함하는 프로브 쌍을 제공하며, 여기서:

[0039] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열)을 포함하고;

[0040] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다.

[0041] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브"), 제2 프로브 (즉, "스플린트 프로브") 및 제3 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하는 프로브 세트를 제공하며, 여기서:

[0042] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0043] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0044] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다.

[0045] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브"), 제2 프로브 (즉, "스플린트 프로브") 및 제3 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하는 프로브 세트를 제공하며, 여기서:

[0046] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0047] ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0048] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다.

[0049] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 키트 (예를 들어, 본원에 개시된 프로브 쌍 또는 프로브 세트 중 임의의 것을 포함하는 키트)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 바와 같은 다수의 프로브 쌍 또는 프로브 세트를 포함하며, 이들 각각은 특정 에피트랜스크립토스 변형된 관심 RNA 또는 특정한 RNA-결합 단백질과 관심

RNA 사이의 상호작용을 확인하는 데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 키트는 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과와 프로브 쌍을 포함한다. 특정 실시양태에서, 키트는 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과와 프로브 세트를 포함한다. 본원에 기재된 키트는 또한 세포, 효소, 예컨대 리가제 및/또는 폴리머라제, 아민-변형된 뉴클레오타이드, RNA 변형에 결합하는 작용제 (예를 들어, 1차 항체, 2차 항체, 단백질, 펩티드, 압타머, 소분자 등), 완충제, 시약 (염료, 염색제, 완충제 등 포함), 및 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 단량체를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 유용한 임의의 다른 시약 또는 성분을 포함할 수 있다.

- [0050] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 프로파일링하기 위한 시스템을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 시스템은 하기를 포함한다:
- [0051] a) 세포 (예를 들어, 단리된 세포, 또는 무손상 조직 내에 존재하는 세포);
- [0052] b) 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브") 및 제2 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하는 1개 이상의 프로브 쌍, 여기서:
- [0053] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열)을 포함하고;
- [0054] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함함;
- [0055] c) 현미경; 및
- [0056] d) 컴퓨터.
- [0057] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 시스템을 제공한다:
- [0058] a) 세포;
- [0059] b) 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 세트, 여기서:
- [0060] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0061] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0062] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함함;
- [0063] c) 현미경; 및
- [0064] d) 컴퓨터.
- [0065] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 시스템을 제공한다:
- [0066] a) 세포;
- [0067] b) 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 세트, 여기서:
- [0068] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0069] ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0070] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함함;

[0071] c) 현미경; 및

[0072] d) 컴퓨터.

[0073] 본원에 기재된 프로브 (즉, 프로브 쌍 및 프로브 세트) 중 임의의 것이 본 개시내용에 의해 고려되는 시스템에서 사용될 수 있다.

[0074] 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

[0075] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고, 본 개시내용의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함되며, 이는 본원에 제시된 구체적 실시양태의 상세한 설명과 조합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참조하는 것에 의해 보다 잘 이해될 수 있다.

도 1은 m⁶A-변형된 RNA를 계내 프로파일링하는 방법의 개요를 제공한다. 2차 항-m⁶A 항체는 동일한 RNA 상에 존재하는 패드락 프로브에 어닐링하는 중합성 DNA 프라이머에 접합된다. 이어서, 공동-국재화된 DNA 프라이머 및 패드락 프로브로부터 관능화된 cDNA 앰플리콘이 생성된다. 그 후, 화학적으로 관능화된 cDNA 앰플리콘은 폴리 아크릴아미드 매트릭스에 공유 연결되어, 조직 광학적 소거 및 생체분자 프로세싱이 가능하게 된다.

도 2a-2d는 m⁶A RNA 변형의 단일-세포 계내 프로파일링의 예를 보여준다. 도 2a는 m⁶A-변형된 베타-액틴 RNA의 검출을 보여준다. 도 2b-2c는 여러 음성 대조군, 즉 1차 항체 없음 (도 2b), 접합된 DNA가 없는 2차 항체 인큐 베이전 (도 2c), 및 2차 항체 없음 (도 2d)을 제공한다.

도 3a-3d는 단일-세포 계내 에피트랜스크립토크 프로파일링을 가능하게 함으로써 생물학적 조직에서 RNA 변형 매개된 유전자 조절을 해석하는 방법을 보여주는 영상이다. 도 3a는 진행 메신저 RNA에 대한 다양한 화학적 변형을 보여준다. 모든 변형 부위의 집합은 에피트랜스크립토크로 명명된다. 도 3b는 상이한 세포 유형, 상태, 및 세포하 위치에 걸친 에피트랜스크립토크 상태의 단일-세포 이질성을 보여주는 개략도를 제공한다. 이들 질문은 이전에 개발된 벌크 트랜스크립토크 또는 에피트랜스크립토크 분석 방법에 의해 다루어지지 않았다. 도 3c는 RNA 및 RNA 변형의 3차원 (3D) 계내 서열분석을 보여준다. DNA-접합된 변형-특이적 결합체는 무손상 조직에서 변형된 RNA를 선택적으로 시각화하기 위해 세포 mRNA에 혼성화하는 RNA-서열-특이적 DNA 프로브와 함께 사용된다. 각각의 RNA-서열-특이적 프로브는 유전자의 정체를 코딩하는 바코드를 함유하며, 이는 영상-기반 계내 서열분석을 통해 판독된다. 화학적 변형 상태를 갖는 RNA의 3D에서의 이러한 고도로 멀티플렉스화된 단일-세포 정량화는 세포 유형 및 에피트랜스크립토크 세포 상태의 단일-세포 발견을 가능하게 한다. 도 3d는 뇌 활동 동안 RNA 변형의 4가지의 가능한 변화에 의해 예시된 바와 같이, 조직에서 RNA 변형-매개된 유전자 조절을 해석하는 것을 보여준다. RNA-변형 경로의 유전자 발현 변화와 함께, 에피트랜스크립토크 패턴의 이동은 상이한 세포 및 뇌 영역에서 가능한 유전자 조절 스킴에 대한 정보를 제공한다. 계내 에피트랜스크립토크 서열분석은 또한 유전자 조절 메커니즘을 완전히 분석하기 위해 정확한 유전자 교란과 조합될 수 있다.

도 4는 벌크 에피트랜스크립토크 서열분석 방법에 의해 답을 찾을 수 없는 RNA 변형에 관한 질문을 보여주는 개략도를 제공한다.

도 5는 돌연변이유발 및 비-돌연변이유발 에피트랜스크립토크 RNA 변형의 예를 보여준다.

도 6은 뇌 기능에서의 m⁶A의 역할을 보여주는 개략도를 제공한다. m⁶A 변형은 가역적이고, mRNA 생활 주기의 다중 단계를 조절하는 m⁶A-결합 단백질에 의해 인식된다. m⁶A-단백질 복합체는 시냅스에서 풍부화된 것으로 밝혀졌다. m⁶A 경로의 변경은 다중 생리학적 기능에 영향을 미치고, 정신 장애의 스펙트럼과 연관된다.

도 7은 3D-m⁶A-seq 방법의 개략도를 제공한다. 뇌 조직의 준비 후, DNA-접합된 m⁶A-특이적 결합체는 RNA-서열-특이적 DNA 프로브와 함께 무손상 조직 내의 세포 mRNA에 혼성화할 것이다. m⁶A-변형된 부위만이 cDNA 앰플리

콘으로서 효소적으로 복제되고, 비-변형된 RNA는 증폭되지 않는다. 각각의 RNA-서열-특이적 프로브는 유전자의 전체 및 m^6A 부위를 코딩하는 바코드를 함유하며, 이는 계내 서열분석 (SEDAL)을 통해 판독된다.

도 8은 RNA 변형의 단일-세포 계내 서열분석을 사용하여 수행될 수 있는 4가지의 예시적인 생물학적 조사의 개략도를 제공한다. (1) m^6A 메틸륨이 세포-유형 및 영역 특이적인지 결정하기 위한 피질의 3D- m^6A -seq 맵핑의 사용; (2) 활성-조절된 유전자 (ARG)가 상이한 세포 유형에서 차등 발현되는지, 및 m^6A 상태가 ARG와 공동으로-달라지는지 결정하기 위한 뉴런 배양물 (KCl 탈분극) 또는 마우스 시각 피질 (암/명 조건화)의 전반적 자극을 연구하기 위한 3D- m^6A -seq의 사용; (3) m^6A 가 상이한 뇌 영역에서 회로 선호도 및 달라진 반응을 갖는지 결정하기 위한 특정 경험 (예를 들어, 급성 구속 스트레스) 동안 m^6A 역학을 연구하기 위한 3D- m^6A -seq의 사용; 및 (4) 어떠한 인자가 상이한 세포 유형에서 에피트랜스크립토 패턴을 형상화하고 유전자 발현을 조절하는지, 및 신경 자극 동안 m^6A -의존성 유전자 조절이 모든 뉴런에 대해 보편적인지 또는 뇌에서의 평균 활성과 비교하여 특정 신경 회로의 규정된 뉴런 세포 유형에서 보다 활성인지 (또는 보다 침묵성인지) 결정하기 위한 m^6A 경로 단백질 (예를 들어, 메틸트랜스퍼라제, 데메틸라제, 및 결합 단백질)의 단일-세포 m^6A 패턴 및 유전자 발현 수준의 통합 분석.

도 9a 내지 9d는 공간 에피트랜스크립토믹스의 배경 및 적용을 보여준다. 도 9a는 m^6A 및 그의 연관된 RNA-결합 단백질 (RBP)이 다양한 중요한 경로를 조절한다는 것을 보여준다. 도 9b 및 9c는 본원에 제공된 방법이 해명을 위해 적용될 수 있는 에피트랜스크립토믹스에서의 지식 갭을 보여준다. 도 9d는 계내 단일-세포 에피트랜스크립토믹스의 개략도를 제공한다.

도 10a-10e는 m^6A -맵 v1의 설계 및 원리를 보여준다. 도 10a는 m^6A -맵 v1의 작업흐름을 보여준다. 도 10b는 PAPG-올리고를 합성하는 데 사용된 접합 전략을 보여준다. 도 10c는 항체-PAPG-올리고 검출을 통한 HeLa 세포에서의 액틴 β (ACTB) 부위 1217 m^6A 의 검출을 입증하며, 이는 음성 대조군에 비해 20-30배의 신호 풍부화를 보여준다. 도 10d는 항체-비의존성 비오틀화된-YTH-스트랩타비딘-올리고 검출을 통한 HeLa 세포에서의 전이 연관 페 선암종 전사체 1 (MALAT1) 부위 2601 m^6A 의 검출을 입증하며, 이는 음성 대조군에 비해 풍부화를 보이지 않는다. 도 10e는 항체-PAPG-올리고 검출을 통한 마우스 해마에서의 MALAT1 부위 1248 m^6A 의 검출을 입증하며, 이는 음성 대조군에 비해 대략 15-배의 신호 풍부화를 보여준다.

도 11a-11b는 PAPG에 대한 2차 항체의 치환을 보여준다. 도 11a는 사이트클릭(SiteClick) 항체 표지 키트에 의해 사용된 표지 화학을 보여준다 (알킨-올리고와의 후속 접합은 클릭 화학을 사용하여 수행될 수 있음). 도 11b는 항체-PAPG-올리고 검출 및 항체-항체-올리고 검출을 통한 HeLa 세포에서의 ACTB 부위 1217 m^6A 의 검출을 입증한다. 항체-항체-올리고 검출 스킴은 IgG 대조군에 비해 훨씬 더 낮은 신호 풍부화를 보여주었다.

도 12a-12d는 m^6A -맵 v2의 설계 및 원리를 보여준다. 도 12a는 m^6A -메틸화된 RNA 및 그의 비-메틸화된 대응물의 동시 검출을 달성하는, m^6A -맵 v2의 작업흐름을 보여준다. 도 12b는 동일한 RNA를 표적화하는 프로브의 "승자-독식" 거동을 입증하며: 2개의 STAR맵 프로브 쌍 (PCT 공개 번호 WO 2019/199579 참조, 본원에 참조로 포함됨)이 HeLa 세포에서 동일한 ACTB mRNA를 표적화하는 경우에, 이들 중 단지 1개만이 각각의 ACTB mRNA 분자에서 증폭될 것이다. 도 12c는 m^6A -맵 v2를 통한 HeLa 세포에서의 MALAT1 부위 2601 m^6A 의 검출을 입증하며, 이는 M 및 초기 G1 기에서의 보다 높은 m^6A 화학량론을 보여준다. 도 12d는 m^6A -맵 v2를 통한 HeLa 세포에서의 ACTB 부위 1217 m^6A 의 검출을 입증하며, 이는 비-분열 세포에서의 보다 높은 m^6A 화학량론을 보여준다.

도 13a-13c는 RBP-맵 원리 및 실험 결과를 보여준다. 도 13a는 단일 RBP-RNA 상호작용 맵핑에 대한 작업흐름을 보여준다. 도 13b는 3xFLAG-YTH(WT/mut)-T2A-mCherry로 형질감염된 HeLa 세포가 도 13a에 제시된 작업흐름을 통해 ACTB의 YTH 결합에 대해 시험되었음을 보여준다. 도 13c는 멀티플렉스화된 RBP-RNA 맵핑에 대한 작업흐름을 보여준다. 각각의 항체는, 그에 어닐링된 상응하는 캡-충전 프로브를 갖는 고유한 DNA 프라이머에 접합된다. 먼저, 3-부분 프로브가 mRNA에 혼성화된다. 이어서, 상이한 RBP를 표적화하는 상이한 항체의 혼합물이 샘플에 첨가된 후, 라이게이션 및 RCA가 이루어진다. 프로브 상의 바코드 정보는 계내 서열분석을 통해

관독될 수 있다.

도 14는 m^6A -맵 100-유전자 데이터 집합 실험에서의 제1 라운드 서열분석의 대표적인 영상을 제공한다. ch01 및 ch04는 STAR맵 앰플리콘에 상응하며, ch02 및 ch03은 m^6A 앰플리콘에 상응한다.

도 15a-15h는 m^6A -맵 v1 100-유전자 데이터세트의 품질 관리 및 통계 개관을 보여준다. 웰 표지: A1: STAR맵; A2-항- m^6A : m^6A -맵 v1, 압캡 ab151230 사용; A3-항- m^6A : m^6A -맵 v1, SYSY 202003 사용; B3-항- m^6A : m^6A -맵 v1, 인비트로젠 RM362 사용; B2-항- m^6A : m^6A -맵 v1의 음성 대조군, CST 2729S 정상 토끼 IgG 사용. 도 15a는 각각의 유전자에 대한 세포당 관독물의 평균 수를 보여준다. 도 15b는 각각의 웰에서의 신호-대-잡음 비 (항- m^6A 신호 vs. IgG의 비를 사용하여 계산됨)를 보여준다. 도 15c는 각각의 웰에서의 검출된 유전자 및 세포당 관독물을 보여준다. 도 15d는 웰 A2와 웰 B3 사이의 추정된 상대 m^6A 화학량론의 상관관계를 보여준다. 도 15e는 추정된 m^6A 화학량론과 STAR맵 관독물 사이의 상관관계를 보여준다. 도 15f는 각각의 웰에서 측정된 각각의 유전자에 대한 상대 m^6A 화학량론을 보여준다. 도 15g는 대표적인 유전자좌의 m^6A -맵 v1에 의한 추정된 m^6A 화학량론 vs. 보고된 m^6A 화학량론의 비교를 제공한다. 도 15h는 도 15g에 제시된 데이터의 산점도를 제공한다.

도 16a-16c는 m^6A -맵 v1 100-유전자 데이터세트의 세포하 분석 및 세포 주기 분석을 보여준다. 도 16a는 RNA 세포하 국제화에 대한 m^6A 축적의 효과를 보여준다 (x-축: m^6A 축적된 부분 vs. 주어진 RNA의 비- m^6A 축적된 부분의 핵 백분율의 $\log_2$ 배수-변화; y-축: p 값의 $-\log_{10}$). 도 16b는 세포 주기가 FUCCI 형광 강도를 사용하여 결정되었음을 보여준다. 도 16c는 세포-주기 의존성 m^6A 변동을 갖는 대표적인 유전자를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] 정의

[0077] 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); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991)]. 본원에 사용된 하기 용어는 달리 명시되지 않는 한 그에 대해 부여된 의미를 갖는다.

[0078] 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.

[0079] 본원에 사용된 용어 "앰플리콘"은 증폭 반응 (즉, 유전자 단편 또는 표적 서열의 1개 이상의 카피의 생산) 또는 복제 반응의 산물인 핵산 (예를 들어, 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 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 연쇄된 다중 앰플리콘을 포함하는 단일 핵산 분자로서 올리고뉴클레오타이드의 다중 선형 카피를 생산하는 롤링 서클 증폭 (RCA)에 의해 형성될 수 있다.

[0080] "항체"는 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리에 속하는 당단백질을 지칭한다. 용어 항체 및 이뮤노글로불린은 상호교환 가능하게 사용된다. 일부 예외로, 포유동물 항체는 전형적으로 각각 2개의 큰 중쇄 및 2개의 작은 경쇄를 갖는 기본 구조 단위로 제조된다. 여러 상이한 유형의 항체 중쇄, 및 여러 상이한 종류의 항체가 존재하며, 이들은 이들이 보유하는 중쇄에 기초하여 상이한 이소형으로 함께 그룹화된다. 포유동물에서 5종의 상이한 항체 이소형 (IgG, IgA, IgE, IgD 및 IgM)이 공지되어 있으며, 이는 상이한 역할을 수행하고, 이들이 마주치는 각각의 상이한 유형의 이물질에 대해 적절한 면역 반응을 지시하는 것을 돕는다. 본원에 사용된 용어 "항체"는 또한 항체 단편, 나노바디 및 단일 체 항체, 뿐만 아니라 항체의 변이체를 포괄한다. 용어 "항체 변이체"는 또한 항체 단편을 포괄하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 변이체는 질환 또는 장애 (예를 들어, 대상체로부터 채취한 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서의 변화와 연관된 것)에 대한

치료로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 항체는 본원에 기재된 바와 같이 올리고뉴클레오타이드 프로브에 접합된다. 특정 실시양태에서, 항체는 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 결합한다 (예를 들어, 항체는 항- m^6A 항체, 항- m^1A 항체, 항-슈도우리딘 항체, 항- m^6Am 항체, 항- m^7G 항체, 항- ac^4C 항체, 항-Nm 항체, 또는 항- m^5C 항체임).

[0081] 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 방법 및 시스템에 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. 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.

[0082] 본 개시내용의 방법 및 시스템에 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, 대식 세포, 자연 킬러 세포, 비만 세포, 지방세포, 면역 세포, 뉴런, 간세포, 및 특정한 기관과 관련된 세포 (예를 들어, 흥선, 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 방법 및 시스템에서 사용하기 위해 또한 고려된다. 일부 실시양태에서, 세포는 소교세포, 성상세포, 펩티고세포, 흥분성 뉴런 또는 억제 뉴런이다. 특정 실시양태에서, 세포는 HeLa 세포이다. 일부 실시양태에서, 다수의 세포 유형의 세포가 동일한 샘플 내에 존재한다.

[0083] 용어 "상보적"은 서로 수소 결합하는 염기를 포함하는 2개의 올리고뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, DNA 또는 RNA)을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 2개의 올리고뉴클레오타이드 서열 사이의 상보성의 정도는 완전한 상보성에서 상보성 없음 (예를 들어, 100% 상보성, 99% 상보성, 98% 상보성, 97% 상보성, 96% 상보성, 95% 상보성, 90% 상보성, 85% 상보성, 80% 상보성, 또는 80% 미만의 상보성)까지 다양할 수 있다. 예를 들어, 2개의 올리고뉴클레오타이드 서열은 서로 단지 부분적으로 상보적일 수 있다 (예를 들어, 본원에 기재된 프로브에서, 프로브의 단지 한 부분만이 또 다른 프로브 또는 관심 RNA에 상보적임). 일부 실시양태에서, 서열은 또 다른 서열의 단지 한 부분에 대해서만 상보적이다. 일부 실시양태에서, 서열은 특정 조건 (예를 들어, 특정 염 농도, pH 등) 하에 또 다른 서열에 상보적이다.

[0084] 용어 "에피트랜스크립토스 변형", "에피트랜스크립토스 RNA 변형", 및 "전사후 변형"은 본 개시내용 전반에 걸쳐 상호교환가능하게 사용된다. 에피트랜스크립토스 변형은 세포 내의 RNA의 임의의 생화학적 변형을 포함한다. 이러한 변형은, 예를 들어 다양한 위치에서의 뉴클레오타이드의 메틸화를 포함한 화학적 변형일 수 있다. 화학적 에피트랜스크립토스 변형은 N^6 -메틸아데노신 (m^6A), N^1 -메틸아데노신 (m^1A), 슈도우리딘, $N^6,2'$ -O-디메틸아데노신 (m^6Am), 7-메틸구아노신 (m^7G), N^4 -아세틸시티딘 (ac^4C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시토신 (m^5C)을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 변형은 N^6 -메틸아데노신 (m^6A)이다. 다른 화학적 에피트랜스크립토스 RNA 변형은 아데노신-에서-이노신 돌연변이 및 퀴오오신을 포함한다 (즉, 퀴오오신은 RNA 내의 또 다른 뉴클레오타이드를 대체함). 리보솜 RNA (rRNA), 전달 RNA (tRNA), 및 메신저 RNA (mRNA)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 유형의 세포 RNA가 에피트랜스크립토스 변형될 수 있다. 다른 에피트랜스크립토스 변형은 문헌 [Kumar, S. et al., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9 (2021); 및 Harcourt, E. M. et al., *Nature*. 541, 339-346 (2017)]에 기재된 것을 포함한다.

[0085] 용어 "폴리뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드 서열", "핵산", "핵산 분자", "핵산 서열", 및 "올리고뉴클레오타이드"는 DNA 및 RNA 내의 일련의 뉴클레오타이드 염기 ("뉴클레오타이드"로도 불림)를 지칭하고, 2개 이상의 뉴클레오타이드의 임의의 쇄를 의미한다. 폴리뉴클레오타이드는 키메라 혼합물 또는 유도체 또는 그의 변형된 버전, 및 단일-

가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 분자의 안정성, 그의 혼성화 파라미터 등을 개선시키기 위해 염기 모이어티, 당 모이어티, 또는 포스페이트 백본에서 변형될 수 있다. "압타머"는 특이적 표적 분자 (예를 들어, 에피트랜스크립토 변형)에 결합하는 올리고뉴클레오타이드 분자의 유형이다.

[0086]

"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. 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, 오직 천연 아미노산만을 함유할 수 있다. 또한, 단백질 내의 아미노산 중 1개 이상은, 예를 들어 화학적 실체, 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. 단백질은 또한 질환 또는 장애 (예를 들어, 대상체로부터 채취한 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서의 변화와 연관된 것)에 대한 치료로서 투여되는 치료 단백질일 수 있다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 또는 항체 변이체 (항체 단편 포함)이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 에피트랜스크립토 RNA 변형 (예를 들어, m⁶A-특이적 YTH 도메인 단백질)에 결합한다.

[0087]

"RNA-결합 단백질"은 RNA 또는 RNA의 에피트랜스크립토 변형에 결합할 수 있는 임의의 단백질을 지칭한다. 예를 들어, RNA-결합 단백질은 RNA 상에 에피트랜스크립토 변형을 도입하는 단백질일 수 있다. RNA-결합 단백질은 또한 RNA의 에피트랜스크립토 변형을 인식하고 그에 결합하는 단백질일 수 있다. 특정 실시양태에서, RNA-결합 단백질은 YTH 패밀리 단백질 (예를 들어, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1, 또는 YTHDC2), IGF2BP 패밀리 단백질 (예를 들어, IGF2BP1, IGF2BP2, 또는 IGF2BP3), 또는 FMR1을 포함한다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 프로파일링될 수 있는 추가의 RNA-결합 단백질은 또한 문헌 [Wang, X. et al., N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. Cell 161, 1388-1399, doi:10.1016/j.cell.2015.05.014 (2015); Wang, X. et al., N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. Nature 505, 117-120, doi:10.1038/nature12730 (2014); Shi, H. et al., YTHDF3 facilitates translation and decay of N(6)-methyladenosine-modified RNA. Cell Res 27, 315-328, doi:10.1038/cr.2017.15 (2017); Xiao, W. et al., Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. Mol Cell 61, 507-519, doi:10.1016/j.molcel.2016.01.012 (2016); Roundtree, I. A. et al., YTHDC1 mediates nuclear export of N(6)-methyladenosine methylated mRNAs. Elife 6, doi:10.7554/eLife.31311 (2017); Hsu, P. J. et al., Ythdc2 is an N(6)-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. Cell Res 27, 1115-1127, doi:10.1038/cr.2017.99 (2017); Huang, H. et al., Recognition of RNA N(6)-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. Nat Cell Biol 20, 285-295, doi:10.1038/s41556-018-0045-z (2018); 및 Edens, B. M. et al., FMRP Modulates Neural Differentiation through m(6)A-Dependent mRNA Nuclear Export. Cell Rep 28, 845-854 e845, doi:10.1016/j.celrep.2019.06.072 (2019)]에 개시된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0088]

"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.

[0089]

용어 "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 조직 샘플 (예컨대 조직 절편, 외과적 생검, 및 조직의 바늘 생검); 세포 샘플; 또는 세포 분획, 단편 또는 소기관 (예컨대 세포를 용해시키고 그의 성분을 원심분리 등에 의해 분리함으로써 획득됨)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 획득됨), 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 중앙 생검이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 뇌 조직이다. 일부 실시양태에서, 조직은 심장 조직이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 중추 신경계 (예를 들어, 뇌)로부터의 조직이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용된 세포는 이

러한 샘플 또는 생물학적 샘플로부터 유래한다.

[0090] 투여가 고려되는 "대상체"는 인간 (즉, 임의의 연령군의 남성 또는 여성, 예를 들어 소아 대상체 (예를 들어, 영아, 소아 또는 청소년) 또는 성인 대상체 (예를 들어, 청년, 중년 성인 또는 노년 성인)) 또는 비-인간 동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물 (예를 들어, 영장류 (예를 들어, 시노몰구스 원숭이 또는 레서스 원숭이) 또는 마우스)이다. 용어 "환자"는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 환자는 인간이다. 인간은 임의의 발달 단계의 남성 또는 여성일 수 있다. 질환 또는 장애의 치료를 "필요로 하는" 대상체 또는 환자는 비제한적으로 질환 또는 장애의 임의의 위험 인자 또는 증상을 나타내는 것들을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 실험 동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 개, 또는 비-인간 영장류)이다.

[0091] 본원에 사용된 용어 "치료제"는 질환 또는 장애를 치료하거나, 또는 질환 또는 장애의 증상을 감소 또는 완화시키는 데 사용될 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료제는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 공지된 약물 및/또는 FDA-승인된 약물이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 수용체, 또는 그의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 시토킨이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다.

[0092] 치료 또는 치료제의 "치료 유효량"은 상태의 치료에서 치료 이익을 제공하거나 또는 상태와 연관된 1종 이상의 증상을 지연 또는 최소화하기에 충분한 양이다. 치료 또는 치료제의 치료 유효량은 상태의 치료에서 치료 이익을 제공하는, 단독의 또는 다른 요법과 조합된 요법의 양을 의미한다. 용어 "치료 유효량"은 전체 요법을 개선시키고/거나, 상태의 증상, 징후 또는 원인을 감소 또는 회피하고/거나, 또 다른 치료제의 치료 효능을 증진시키는 양을 포괄할 수 있다.

[0093] 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 운문상 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.

[0094] 용어 "치료", "치료하다" 및 "치료하는"은 본원에 기재된 질환의 역전, 완화, 그의 발병의 지연 또는 그의 진행의 억제력을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료는 질환의 1종 이상의 징후 또는 증상이 발생하였거나 또는 관찰된 후에 (예를 들어, 예방적으로 또는 질환의 의심 또는 위험 시) 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 사용하여, 건강한 세포 또는 조직과 비교하여 세포 또는 조직에서 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서 변화가 관찰된 후에 투여될 수 있다.

[0095] 특정 실시양태의 상세한 설명

[0096] 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 않

는 한, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0097] 본 개시내용은 세포 또는 다수의 세포 (예를 들어, 무손상 조직 내에 존재하는 세포, 또는 단리된 세포)에서 단일-세포 해상 및 세포하 해상에서 에피트랜스크립토크 RNA 변형을 프로파일링하기 위한 방법, 조성물 및 시스템을 제공한다. 또한 본 개시내용은 세포 내의 1개 이상의 관심 RNA와 RNA-결합 단백질 (예를 들어, 관심 RNA 상에 에피트랜스크립토크 변형을 도입하는 단백질) 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법을 제공한다. 또한 본 개시내용은 무손상 조직 내의 세포를 포함한 세포에서의 에피트랜스크립토크 RNA 변형의 프로파일 또는 RNA 결합 단백질과 RNA(들) 사이의 상호작용의 프로파일에 기초하여 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은 또한 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토크 변형 또는 1개 이상의 RNA(들)와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용을 조정할 수 있는 후보 작용제를 스크리닝하거나 시험하는 방법이 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 본원에 기재된 방법을 수행하는 데 유용할 수 있는 프로브 쌍 및 프로브 세트, 뿐만 아니라 본원에 기재된 프로브 중 임의의 것을 포함하는 키트가 또한 본 개시내용에 제공된다.

[0098] 세포에서 에피트랜스크립토크 RNA 변형 또는 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법

[0099] 한 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 (또는 다수의 세포에서, 예를 들어 무손상 조직 내의 것) 에피트랜스크립토크 RNA 변형을 프로파일링하는 방법을 제공한다. 본원에 개시된 방법에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍 또는 프로브 세트와 접촉될 수 있고, 이는 본원에 추가로 기재되어 있으며, 적어도 1개의 에피트랜스크립토크 변형을 포함하는 관심 RNA를 확인하고 위치를 찾아내어 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 데 사용될 수 있다. 이어서, 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키고, 서열분석하여 전사체의 정체 및 중합체 매트릭스 내의 그의 위치를 결정할 수 있다 (예를 들어, 본원에 추가로 기재된 바와 같은 SEDAL 서열분석을 통해). 변형된 관심 전사체의 위치를 사용하여, 세포 내의 에피트랜스크립토크-변형된 RNA를 프로파일링할 수 있다.

[0100] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 에피트랜스크립토크 RNA 변형을 프로파일링하는 방법을 제공하며, 이는:

[0101] a) 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브"), 제2 프로브 (즉, "스플린트 프로브") 및 제3 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하고, 여기서:

[0102] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열), 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0103] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토크 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0104] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0105] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

[0106] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0107] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0108] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토크 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 (또는 다수의 세포에서, 예를 들어 무손상 조직 내의 것) 에피트랜스크립토크 RNA 변형을 프로파일링하는 방법을 제공하며, 이는

[0110] a) 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브") 및 제2 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하고, 여기서:

- [0111] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열)을 포함하고;
- [0112] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- [0113] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0114] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0115] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- [0116] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0117] 임의의 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일링이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형은 N^6 -메틸아데노신 (m^6A), N^1 -메틸아데노신 (m^1A), 슈도우리딘, $N^6,2'$ -O-디메틸아데노신 (m^6Am), 7-메틸구아노신 (m^7G), N^4 -아세틸시티딘 (ac^4C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시토신 (m^5C)이다. 다른 에피트랜스크립토 변형은 문헌 [Kumar, S. et al., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9 (2021); 및 Harcourt, E. M. et al., *Nature*. 541, 339-346 (2017)]에 기재된 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형은 아데노신-에서-이노신 변형이다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 변형은 퀘우오신 (즉, 퀘우오신은 RNA 내의 또 다른 뉴클레오타이드를 대체함), 폴리아데닐화, 인트론 스플라이싱, 또는 히스톤 mRNA 프로세싱이다. 특정 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형은 N^6 -메틸아데노신 (m^6A)이다. 단일 에피트랜스크립토 변형이 세포에서 본원에 개시된 방법을 사용하여 프로파일링될 수 있거나, 또는 다수의 상이한 에피트랜스크립토 변형이 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과) 세포에서 동시에 프로파일링될 수 있다.
- [0118] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 에피트랜스크립토 RNA 변형을 프로파일링하는 방법은 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 프로브 세트를 사용하는 것을 고려한다. 이러한 방법은 본원에서 "3-프로브 전략"으로 지칭되는 것을 이용한다. 프로브 세트 중 제2 프로브 (또한 본원에서 "스플린트 프로브"로도 지칭됨)는 에피트랜스크립토 RNA 변형 (즉, 특정한 관심 RNA 상에 존재하는 전사후 변형)을 인식하는 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 캡티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 압타머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 소분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브는 비오틴-스트렙타비딘 상호작용을 포함하는 메커니즘을 통해 에피트랜스크립토 변형에 결합한다. 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 프로브의 부분은 단백질 (예를 들어, 항체 또는 항체 변이체, 또는 특이적 에피트랜스크립토 변형에 달리 결합할 수 있는 임의의 단백질)일 수 있다. 특정 실시양태에서, 단백질은 PAPG이다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함한다. 예를 들어, 제2 프로브는 2차 항체를 포함할 수 있고, 1차 항체는 에피트랜스크립토 RNA 변형에의 결합에 사용될 수 있다. 이어서, 제2 프로브 상의 2차 항체는 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합된 1차 항체를 인식한다. 예를 들어, 도 1을 참조한다. 또 다른 예에서, 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 항체에 결합할 수 있는 단백질 PAPG를 포함할 수 있다. 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 단백질인 경우에, 방법은 임의로 세포를 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 항체는 제2 프로브의 단백질 (예를 들어, PAPG)에 의해 인식되고 결합된다. 특정 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 (예를 들어, 2차 항체) 또는 항체 변이체를 포함한다. 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 2차 항체인 경우에, 방법은 임의로 세포를, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하고 제2 프로브의 2차 항체에 의해 인식되는 1차 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전 또는 후에 1차 항체와 접촉될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 1차 항체는 항- m^6A 항체, 항- m^1A 항체, 항-슈도우리딘 항체, 항- m^6Am 항체, 항- m^7G 항체, 항- ac^4C 항체, 항-Nm 항체, 또는 항-

m^5C 항체이다. 1차 항체 대신에, 본 개시내용은 또한 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합할 수 있는 임의의 작용제를 본원에 기재된 프로브 상에서 사용하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합하는 제2 프로브의 부분은 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질은 m^6A -특이적 YTH 도메인 단백질이다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체를 포함한다.

[0119] 일부 실시양태에서, 프로브 세트 중 제2 프로브는 추가로 중합 블로커를 포함한다. 중합 블로커는 본원에 기재된 방법의 단계 (c)의 롤링 서클 증폭에서 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브가 프라이머로서 사용되는 것을 방지할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 3' 단부에 존재한다. 중합 블로커는, 예를 들어 폴리머라제가 중합을 위한 프라이머로서 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것을 방지하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 차단된 3' 히드록실 기를 포함하는 (예를 들어, 3' 히드록실 기 상에 산소 보호기를 포함하는) 핵산 잔기이다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 3' 히드록실 기 대신에 수소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 추가의 뉴클레오타이드가 첨가되는 것을 방지하는 3' 히드록실 기 대신에 임의의 화학적 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 핵산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 아데노신, 티민, 시토신, 구아노신 또는 우리딘 잔기이다. 특정 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 티민 잔기이다.

[0120] 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분에 더하여, 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 본원에 제공된 프로브 세트에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 프로브의 각각의 세트 상에서 동일할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 각각의 제1 및 제2 프로브 상에서 공유하다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0121] 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 각각의 부분은 임의적인 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 임의적인 링커는 뉴클레오타이드 링커이다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용된 프로브 세트 중 제2 프로브는 구조:

[0122] 5'-[에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0123] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오타이드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분 및 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 클릭 화학을 통해 서로 부착된다 (예를 들어, 도 10b 참조).

[0124] 본원에 기재된 방법에 사용된 프로브 세트 중 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 4-20, 약 5-19, 약 6-18, 약 7-17, 약 8-16, 약 9-15, 약 10-14, 또는 약 11-13개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할된다.

[0125] 본원에 개시된 방법에 사용된 프로브 세트 중 제1 프로브는 또한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이이다.

[0126] 본원에 개시된 방법에 사용된 프로브 세트 중 제1 프로브는 또한 뉴클레오타이드의 특이적 서열로 구성된 올리고

뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 바코드는 관심 RNA (즉, 적어도 1개의 특정 한 에피트랜스크립토 변형으로 변형된 RNA)를 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함할 수 있다.

[0127] 제1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 부분의 임의의 순서로의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분은 임의적인 링커에 의해 또 다른 부분에 연결된다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 구조:

[0128] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[올리고뉴클레오타이드 바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제3 프로브에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0129] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 프로브 세트를 구성하는 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분 중 임의의 것은 DNA를 포함한다.

[0130] 본원에 제공된 방법에 사용된 프로브 세트 중 제3 프로브 (또한 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)는 관심 RNA에 상보적인 부분 및 프로브 세트 중 제1 프로브에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0131] 특정 실시양태에서, 프로브 세트 중 제3 프로브는 구조:

[0132] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0133] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0134] 일부 실시양태에서, 본원의 에피트랜스크립토 RNA 변형을 프로파일링하기 위해 개시된 방법은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하는 프로브 쌍을 사용하는 것을 고려한다. 이러한 방법은 본원에서 "2-프로브 전략"으로 지칭되는 것을 이용한다. 프로브 쌍 중 제2 프로브 (또한 본원에서 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)는 에피트랜스크립토 RNA 변형 (즉, 특정한 관심 RNA 상에 존재하는 전사후 변형)을 인식하는 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 앵타머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 소분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브는 비오틴-스트렙타비딘 상호작용을 포함하는 메카니즘을 통해 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합한다. 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 프로브의 부분은 단백질 (예를 들어, 항체 또는 항체 변이체, 또는 특이적 에피트랜스크립토 변형에 달리 결합할 수 있는 임의의 단백질)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함한다. 예를 들어, 제2 프로브는 2차 항체를 포함할 수 있고, 1차 항체는 에피트랜스크립토 RNA 변형에의 결합에 사용될 수 있다. 이어서, 제2 프로브 상의 2차 항체는 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합된 1차 항체를 인식한다. 예를 들어, 도 1을 참조한다. 특정 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 (예를 들어, 2차 항체) 또는 항체 변이체를 포함한다. 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 2차 항체인 경우에, 방법은 임의로 세포를, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하고 제2 프로브의 2차 항체에 의해 인식되는 1차 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전 또는 후에 1차 항체와 접촉될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 1차 항체는 항-⁶mA 항체, 항-¹mA 항체, 항-슈도우리딘 항체, 항-⁶Am 항체, 항-⁷mG 항체, 항-ac⁴C 항체, 항-Nm 항체, 또는 항-⁵mC 항체이다. 항체 대신에, 본 개시내용은 또한 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합할 수 있는 임의의 작용제를 본원에 기재된 프로브 상에서 사용하는 것을 고려한다. 일

부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질은 PAPG이다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 단백질을 포함하는 경우에, 방법은 세포를 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함하며, 여기서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 항체는 PAPG에 의해 인식되고 결합된다. 특정 실시양태에서, 단백질은 에피트랜스크립토 RNA 변형에 직접 결합할 수 있는 m⁶A-특이적 YTH 도메인 단백질이다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 변형에 직접 결합하고, 항체 또는 항체 변이체를 포함한다.

[0135] 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분에 더하여, 프로브 쌍 중 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 본원에 제공된 프로브 쌍에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 프로브의 각각의 세트 상에서 동일할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 각각의 프로브 쌍 상에서 고유하다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0136] 일부 실시양태에서, 프로브 쌍 중 제2 프로브의 각각의 부분은 임의적인 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 임의적인 링커는 뉴클레오타이드 링커이다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 제2 프로브는 구조:

[0137] 5'-[에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0138] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오타이드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0139] 본원에 기재된 방법에 사용된 프로브 쌍 중 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할된다.

[0140] 본원에 개시된 방법에 사용된 프로브 쌍 중 제1 프로브는 또한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이이다.

[0141] 본원에 개시된 방법에 사용된 프로브 쌍 중 제1 프로브는 또한 뉴클레오타이드의 특이적 서열로 구성된 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 바코드는 관심 RNA (즉, 적어도 1개의 특정한 에피트랜스크립토 변형으로 변형된 RNA)를 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함할 수 있다.

[0142] 프로브의 쌍 중 제1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 부분의 임의의 순서로의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분은 임의적인 링커에 의해 또 다른 부분에 연결된다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 구조:

[0143] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-

3';

- [0144] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3';
- [0145] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3';
- [0146] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-3';
- [0147] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'; 또는
- [0148] 5'-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'
- [0149] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브 및/또는 제2 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분 중 임의의 것은 DNA를 포함한다.
- [0150] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포에서 RNA-결합 단백질과 1개 이상의 관심 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0151] a) 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
- [0152] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0153] ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0154] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- [0155] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0156] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0157] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- [0158] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함한다.
- [0159] 임의의 RNA-결합 단백질과 1개 이상의 관심 RNA의 상호작용은 본원에 제공된 방법을 사용하여 프로파일링될 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질은 RNA 상에 에피트랜스크립토 변형을 도입하는 단백질이다. 특정 실시양태에서, RNA-결합 단백질은 YTH 패밀리의 단백질 (예를 들어, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1, 또는 YTHDC2), IGF2BP 패밀리의 단백질 (예를 들어, IGF2BP1, IGF2BP2, 또는 IGF2BP3), 또는 FMR1을 포함한다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 프로파일링될 수 있는 추가의 RNA-결합 단백질은 또한 문헌 [Wang, X. et al., N(6)-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency. *Cell* 161, 1388-1399, doi:10.1016/j.cell.2015.05.014 (2015); Wang, X. et al., N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* 505, 117-120, doi:10.1038/nature12730 (2014); Shi, H. et al., YTHDF3 facilitates translation and decay of N(6)-methyladenosine-modified RNA. *Cell Res* 27, 315-328, doi:10.1038/cr.2017.15 (2017); Xiao, W. et al., Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Mol Cell* 61, 507-519, doi:10.1016/j.molcel.2016.01.012 (2016); Roundtree, I. A. et al., YTHDC1 mediates nuclear export of N(6)-methyladenosine methylated mRNAs. *Elife* 6, doi:10.7554/eLife.31311 (2017); Hsu, P. J. et al., Ythdc2 is an N(6)-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Res* 27, 1115-1127, doi:10.1038/cr.2017.99 (2017); Huang, H. et al., Recognition of RNA N(6)-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol* 20, 285-295, doi:10.1038/s41556-018-0045-z (2018); 및 Edens, B. M. et al., FMRP Modulates Neural Differentiation through m(6)A-Dependent mRNA Nuclear Export. *Cell Rep* 28, 845-854 e845,

doi:10.1016/j.celrep.2019.06.072 (2019)]에 개시된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0160] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 RNA-결합 단백질과 관심 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법은 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 프로브 세트를 사용하는 것을 고려한다. 프로브 세트 중 제2 프로브 (또한 본원에서 "스플린트 프로브"로도 지칭됨)는 RNA-결합 단백질 (예를 들어, RNA 상에 에피트랜스크립토솜 변형을 도입하는 효소)을 인식하는 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 결합하는 제2 프로브의 부분은 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 결합하는 제2 프로브의 부분은 압타머를 포함한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 결합하는 제2 프로브의 부분은 소분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브는 비오틴-스트렙타비딘 상호작용을 포함하는 메카니즘을 통해 RNA-결합 단백질에 결합한다. RNA-결합 단백질을 인식하는 프로브의 부분은 단백질 (예를 들어, 항체 또는 항체 변이체, 또는 특이적 RNA-결합 단백질에 달리 결합할 수 있는 임의의 단백질)일 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함한다. 예를 들어, 제2 프로브는 2차 항체를 포함할 수 있고, 1차 항체는 RNA-결합 단백질에의 결합에 사용될 수 있다. 이어서, 제2 프로브 상의 2차 항체는 RNA-결합 단백질에 결합된 1차 항체를 인식한다. 예를 들어, 도 13a 및 13c를 참조한다. 특정 실시양태에서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 (예를 들어, 2차 항체) 또는 항체 변이체를 포함한다. RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분이 2차 항체인 경우에, 방법은 임의로 세포를, RNA-결합 단백질을 인식하고 제2 프로브의 2차 항체에 의해 인식되는 1차 항체와 접촉시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전 또는 후에 1차 항체와 접촉될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉된다. 1차 항체 대신에, 본 개시내용은 또한 RNA-결합 단백질을 인식하고 직접 결합할 수 있는 임의의 작용제를 본원에 기재된 프로브 상에서 사용하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 제2 프로브의 부분은 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체를 포함한다.
- [0161] 일부 실시양태에서, 프로브 세트 중 제2 프로브는 추가로 중합 블록어를 포함한다. 중합 블록어는 본원에 기재된 방법의 단계 (c)의 롤링 서클 증폭에서 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브가 프라이머로서 사용되는 것을 방지할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블록어는 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 3' 단부에 존재한다. 중합 블록어는, 예를 들어 폴리머라제가 중합을 위한 프라이머로서 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것을 방지하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블록어는 차단된 3' 히드록실기를 포함하는 (예를 들어, 3' 히드록실기 상에 산소 보호기를 포함하는) 핵산 잔기이다. 일부 실시양태에서, 중합 블록어는 3' 히드록실기 대신에 수소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블록어는 추가의 뉴클레오타이드가 첨가되는 것을 방지하는 3' 히드록실기 대신에 임의의 화학적 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블록어는 역전된 핵산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블록어는 역전된 아데노신, 티민, 시토신, 구아노신 또는 우라실 잔기이다. 특정 실시양태에서, 중합 블록어는 역전된 티민 잔기이다.
- [0162] RNA-결합 단백질을 인식하는 부분에 더하여, 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 본원에 제공된 프로브 세트에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 프로브의 각각의 세트 상에서 동일할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 각각의 제1 및 제2 프로브 상에서 공유하다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0163] 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 각각의 부분은 임의적인 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 임의적인 링커는 뉴클레오타이드 링커이다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용된 프로브 세트 중 제2 프로브는 구조:
- [0164] 5'-[RNA-결합 단백질을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'
- [0165] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오타이드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

- [0166] 본원에 기재된 방법에 사용된 프로브 세트 중 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 4-20, 약 5-19, 약 6-18, 약 7-17, 약 8-16, 약 9-15, 약 10-14, 또는 약 11-13개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할된다.
- [0167] 본원에 개시된 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법에 사용된 프로브 세트 중 제1 프로브는 또한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0168] 본원에 개시된 방법에 사용된 프로브 세트 중 제1 프로브는 또한 뉴클레오타이드의 특이적 서열로 구성된 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 바코드는 관심 RNA (즉, 적어도 1개의 RNA-결합 단백질에 의해 결합되는 RNA)를 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함할 수 있다.
- [0169] 제1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 부분의 임의의 순서로의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분은 임의적인 링커에 의해 또 다른 부분에 연결된다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 구조:
- [0170] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[올리고뉴클레오타이드 바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제3 프로브에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'
- [0171] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 프로브 세트를 구성하는 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분 중 임의의 것은 DNA를 포함한다.
- [0172] 본원에 제공된 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법에 사용된 프로브 세트 중 제3 프로브 (또한 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)는 관심 RNA에 상보적인 부분 및 프로브 세트 중 제1 프로브에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0173] 특정 실시양태에서, 프로브 세트 중 제3 프로브는 구조:
- [0174] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'
- [0175] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.
- [0176] 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 세포이다. 본 개시내용은 또한 다수의 세포 상에서 본원에 기재된 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 동시에 프로파일링하는 방법을 수행하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, 방법은

17일에 공개된 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2019/199579에 추가로 기재되어 있으며, 각각은 본원에 참조로 포함된다. 간략하게, 검출가능한 표지 (즉, 예를 들어 영상화를 통해 추가의 올리고뉴클레오타이드 프로브의 위치를 시각화하는 데 사용될 수 있는 임의의 표지)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프로브가 세포에 제공된다. 특정 실시양태에서, 검출가능한 표지는 형광 (예를 들어, 형광단)이다. 추가의 올리고뉴클레오타이드 프로브는 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열에 상보적이고, 따라서 관심 RNA 정체에 연결되고, 이는 세포 내의 (또는 방법이 세포외 해상에서, 예를 들어 개별 소기관의 위치를 확인하기 위한 염색 하에 수행되는 경우에 소기관 내의) 관심 RNA의 위치를 확인하는 데 사용될 수 있다.

[0181] 본원에 기재된 방법에 사용되는 (예를 들어, SEDAL 서열분석에 사용되는) 추가의 올리고뉴클레오타이드 프로브는 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 영상화 기술을 사용하여 관독될 수 있다. 예를 들어, 추가의 올리고뉴클레오타이드 프로브가 형광단을 포함하는 실시양태에서, 형광단은 관심 RNA를 확인하기 위해 영상화를 사용하여 관독될 수 있다. 상기 논의된 바와 같이, 추가의 올리고뉴클레오타이드 프로브는 관심대상인 특정 RNA를 검출하기 위해 사용되는, 제1 올리고뉴클레오타이드 프로브 상의 바코드 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 형광단을 포함하는 추가의 올리고뉴클레오타이드 프로브의 위치를 영상화함으로써, 샘플 내의 관심대상인 특정 RNA의 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. 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.

[0182] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법은 세포 내의 추가의 분자를 프로파일링하는 방법과 조합될 수 있다. 예를 들어, 추가의 RNA (에피트랜스크립토 변형되지 않은 RNA 및 RNA-결합 단백질에 의해 결합되지 않은 RNA 포함)의 발현은 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분을 포함하지 않는 프로브를 사용하여 에피트랜스크립토 변형된 RNA 또는 1개 이상의 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 RNA와 함께 프로파일링될 수 있다. 다른 유형의 분자 (예를 들어, DNA, 단백질, 탄수화물 또는 지질)를 프로파일링하는 방법도 또한 본원에 기재된 방법과 조합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 프로파일링되는 추가의 분자는 비변형된 RNA이다. 일부 실시양태에서, 비변형된 RNA를 프로파일링하는 것은

[0183] a) 세포를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 및 제2 프로브를 포함하고, 여기서:

[0184] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 및 비변형된 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0185] ii) 제2 프로브는 비변형된 관심 RNA에 상보적인 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함하는 것인 단계;

[0186] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

[0187] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0188] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0189] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 비변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함한다.

[0190] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 세포의 에피트랜스크립토 RNA 변형 프로파일 (또는 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일)을 다양한 세포 유형의 에피트랜스크립토 RNA 변형 프로파일 (또는 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일)을 포함하는 참조 데이터와 비교함으로써 프로파일링된 세포의 세포 유형을 결정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포에서 1개 이상의 유전자를 과다발현 또는 녹아웃시켜 1개 이상의 유전자가 관심 RNA의 에피트랜스크립토 변형에 수반되는지 결정하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 단계 (a)-(e)를 다수의 시점에 반복하여 시간 경과에 따라 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포 또는 다수의 세포에서의 에피트랜스크립토 변형된 RNA 또는 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일이 무손상 조직 내에서 면역 반응에 의해 어떻게 영향을 받

는지, 또는 프로파일이 종양에 대한 근접성으로 인해 어떻게 영향을 받는지 검사하는 것을 추가로 포함한다.

- [0191] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 중 임의의 것은 변형된 관심 RNA의 위치를 세포하 해상으로 (즉, 세포 내의 특이적 소기관 내에서; DNA 앰플리콘의 크기 및 광학 한계 둘 다에 의존하여 대략 150-400 nm 공간 해상도로) 해석하는 것을 추가로 포함한다. 이는 관련 기술분야에 널리 공지된 소기관 염색 절차를 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 다양한 소기관, 예컨대 내형질 세망 (ER), 세포골격 및 미토콘드리아가 염색될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포에서 다양한 소기관을 염색하는 데 사용되는 작용제는 소분자 염료, 항체 및/또는 단백질 염료를 포함한다.
- [0192] 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법
- [0193] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체, 또는 건강하거나 건강한 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 세포 또는 다수의 세포 (예를 들어, 무손상 조직 내의 것)에 대해 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 다양한 관심 RNA의 발현은 비-이환 세포 또는 비-이환 조직 샘플로부터의 세포 (예를 들어, 건강한 개체로부터의 세포, 또는 건강한 개체의 집단으로부터의 다수의 세포)에서의 동일한 관심 RNA의 발현과 비교될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포의 에피트랜스크립토 RNA 변형 프로파일 또는 세포에서의 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용 프로파일 (관심 단일 RNA 또는 다중 RNA, 예를 들어 특정 질환 서명 포함)에서의 임의의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낼 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 발현과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용은 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포에서의 발현은 비-이환 세포에 대한 이러한 참조 데이터와 비교될 수 있다.
- [0194] 일부 실시양태에서, 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법은
- [0195] a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
- [0196] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0197] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0198] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- [0199] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0200] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0201] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- [0202] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;
- [0203] 여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낸다.
- [0204] 일부 실시양태에서, 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법은
- [0205] a) 대상체로부터 채취한 세포 (또는 다수의 세포, 예를 들어 무손상 조직 내의 것)를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브") 및 제2 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하고, 여기서:
- [0206] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부

분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열)을 포함하고;

- [0207] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- [0208] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0209] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0210] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- [0211] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토스 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;
- [0212] 여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 에피트랜스크립토스 RNA 변형의 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낸다.
- [0213] 일부 실시양태에서, 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하는 방법은
- [0214] a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
- [0215] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0216] ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0217] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- [0218] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0219] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0220] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- [0221] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 RNA-결합 단백질에 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;
- [0222] 여기서 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일에서의 차이는 대상체가 질환 또는 장애를 갖는다는 것을 나타낸다.
- [0223] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토스 RNA 변형, 또는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용은 본원에 개시된 방법을 사용하여 대조군 실험으로서 대상체로부터 채취한 세포와 함께 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 이환 세포에서의 발현과 비교되는, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토스 RNA 변형의 프로파일, 또는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일은 방법이 이전에 1개 이상의 비-이환 세포에 대해 수행된 때로부터 참조 데이터를 구성한다. 대상체에서 질환 또는 장애의 진단을 위한 임의의 에피트랜스크립토스 RNA 변형의 프로파일링이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형은 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A), N¹-메틸아데노신 (m¹A), 슈도우리딘, N⁶,2'-O-디메틸아데노신 (m⁶Am), 7-메틸구아노신 (m⁷G), N⁴-아세틸시티딘 (ac⁴C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시토신 (m⁵C)이다. 다른 에피트랜스크립토스 변형은 문헌 [Kumar, S. et al., Frontiers in Cell and Developmental Biology. 9 (2021); 및 Harcourt, E. M. et al., Nature. 541, 339-346 (2017)]에 기재된 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형은 아데노신-에서-이노신 변형이다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 변형은 퀴오오신 (즉, 퀴오오신은 RNA 내의 또 다른 뉴클레오타이드를 대체함), 폴리아데닐화, 인트론 스플라이싱, 또는 히스톤 mRNA 프로세싱이다. 특정

실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형은 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A)이다. 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하기 위해 단일 에피트랜스크립토 변형이 세포에서 본원에 개시된 방법을 사용하여 프로파일링될 수 있거나, 또는 다수의 상이한 에피트랜스크립토 변형이 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과) 세포에서 동시에 프로파일링될 수 있다. RNA와 임의의 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일링이 또한 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질은 RNA 상에 에피트랜스크립토 변형을 도입하는 효소이다. 특정 실시양태에서, RNA-결합 단백질은 YTH 패밀리의 단백질 (예를 들어, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, YTHDC1, 또는 YTHDC2), IGF2BP 패밀리의 단백질 (예를 들어, IGF2BP1, IGF2BP2, 또는 IGF2BP3), 또는 FMR1이다. 대상체에서 질환 또는 장애를 진단하기 위해 RNA와 단일 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용이 세포에서 본원에 개시된 방법을 사용하여 프로파일링될 수 있거나, 또는 다수의 상이한 RNA-결합 단백질 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)과의 상호작용이 세포에서 동시에 프로파일링될 수 있다.

[0224] 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, 정신 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환이다.

[0225] 일부 실시양태에서, 세포는 조직 (예를 들어, 상피 조직, 결합 조직, 근육 조직 또는 신경 조직)에 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.

[0226] 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법

[0227] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법은 대상체 (예를 들어, 질환 또는 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 것으로 생각되는 대상체)로부터 채취한 샘플로부터의 세포에서 (또는 다수의 세포에서, 예를 들어 무손상 조직 내의 것) 수행될 수 있다. 이어서, 세포에서의 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토 변형 프로파일 또는 RNA-결합 단백질과 1개 이상의 RNA 사이의 상호작용 프로파일은 비-이환 조직 샘플로부터의 세포에서의 동일한 관심 RNA의 에피트랜스크립토 변형 프로파일 또는 RNA-결합 단백질과의 상호작용 프로파일과 비교될 수 있다. 이어서, 비-이환 세포에 비해 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형 프로파일 또는 RNA-결합 단백질과 1개 이상의 RNA 사이의 상호작용 프로파일에서 임의의 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료가 투여될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형 및/또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용은 대조군 실험으로서 이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형과 함께 프로파일링될 수 있다. 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형 및/또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용은 또한 이전에 프로파일링되었을 수 있고, 이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용 프로파일은 비-이환 세포에 대한 이러한 참조 데이터와 비교될 수 있다.

[0228] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이는:

[0229] a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:

[0230] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0231] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0232] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

- [0233] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0234] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0235] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;
- [0236] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토름 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계; 및
- [0237] f) 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 에피트랜스크립토름 RNA 변형의 프로파일에서 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0238] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이는:
- [0239] a) 대상체로부터 채취한 세포 (또는 다수의 세포, 예를 들어 무손상 조직 내의 것)를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브") 및 제2 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하고, 여기서:
- [0240] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열)을 포함하고;
- [0241] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토름 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- [0242] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0243] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0244] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;
- [0245] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토름 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계; 및
- [0246] f) 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 에피트랜스크립토름 RNA 변형의 프로파일에서 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0247] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 이는:
- [0248] a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
- [0249] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0250] ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0251] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- [0252] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0253] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0254] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계;
- [0255] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계; 및

- [0256] f) 1개 이상의 비-이환 세포에 비해 세포에서 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용 프로파일에서 차이가 관찰되는 경우에 대상체에게 질환 또는 장애에 대한 치료를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0257] 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형, 또는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용은 본원에 개시된 방법을 사용하여 대조군 실험으로서 동시에 프로파일링된다. 일부 실시양태에서, 이환 세포의 프로파일과 비교되는, 1개 이상의 비-이환 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형 데이터, 또는 1개 이상의 비-이환 세포에서의 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용의 프로파일은 방법이 이전에 비-이환 세포에 대해 수행된 시점으로부터 참조 데이터를 구성한다.
- [0258] 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. 일부 실시양태에서, 치료제는 공지된 약물 및/또는 FDA-승인된 약물이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 항체 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 수용체, 또는 그의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시양태에서, 단백질은 시토킨이다. 특정 실시양태에서, 핵산은 mRNA, 안티센스 RNA, miRNA, siRNA, RNA 압타머, 이중 가닥 RNA (dsRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다.
- [0259] 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, 근육결 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애, 신경계 장애, 안과 질환 또는 심혈관 질환이다.
- [0260] 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, 지방, 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. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플의 에피트랜스크립토 프로파일은 다양한 상태 예컨대 당뇨병, 정신 장애, 간 질환, 신장 질환, 혈액 질환, 내분비 또는 외분비 장애, 심장 질환, 암 요법 예컨대 화학요법, 표적화 요법, 면역요법 (예를 들어, 체크포인트 억제, CAR-T, 암 백신 등), 대사 장애, 또는 면역 및 자가면역 장애를 치료하기 위한 약리학 적 개입을 포함하나 이에 제한되지는 않는 요법을 가이드하는 예후 결정에 대한 정보를 제공한다.
- [0261] 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토 변형을 조정할 수 있는 작용제에 대한 스크리닝 방법
- [0262] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 1개 이상의 관심 RNA의 에피트랜스크립토 변형을 조정할 수 있거나 또는 RNA-결합 단백질과 관심 RNA 또는 1개 이상의 RNA 사이의 상호작용을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본원에 기재된 에피트랜스크립토 RNA 변형 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법은 1종 이상의 후보 작용제의 존재 하에 세포에서 (또는 다수의 세포에서, 예를 들어 무손상 조직 내의 것) 수행될 수 있다. 이어서, 세포 (예를 들어, 정상 세포 또는 이환 세포)에서의 다양한 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA 또는 RNA-결합 단백질에 의한 결합된 관심 RNA의 발현은 1종 이상의 후보 작용제에 노출되지 않은 세포에서의 동일한 관심 RNA의 발현과 비교될 수 있다. 후보 작용제(들)에 노출되지 않은 세포에 비해 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일 또는 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용 프로파일에서의 임의의 차이는 1개 이상의 관심 RNA의 에피트랜스크립토 변형 또는 1개 이상의 관심 RNA와 1개 이상의 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용이 후보 작용제(들)에 의해 조정된다는 것을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 질환의 치료와 연관된 것으로 공지된 특정한 서명 (예를 들어, 다중 관심 RNA의 에피트랜스크립토 변형의 서명, 또는 RNA-결합 단백질과 다중 관심 RNA의 상호작용의 서명)을 사용하여, 목적하는 방식으로 에피트랜스크립토 RNA 변형을 조정할 수 있는 후보 작용제를 확인할 수 있다. 본원에 기재된 방법은 또한, 예를 들어 1개 이상의 세포를 후보 작용제 또는 공지된 약물로 처리한 경우 특이적 에피트랜스크립토 RNA 변형 서명 또는 RNA-결합 단백질과 관심 RNA 사이의 상호작용의 서명을 관찰함으로써, 특정 부작용을 갖는 약물을 확인하는 데 사용될 수 있다.
- [0263] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토 변형을 조정할 수 있는 작용제를 스크리

닝하는 방법을 제공하며, 이는

- [0264] a) 후보 작용제로 처리되고 있거나 처리된 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
- [0265] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0266] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0267] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- [0268] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0269] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0270] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- [0271] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;
- [0272] 여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 에피트랜스크립토 RNA 변형을 조정한다는 것을 나타낸다.
- [0273] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토 변형을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공하며, 이는
- [0274] a) 후보 작용제 (또는 예를 들어 화합물의 스크리닝 라이브러리에 제공된 바와 같은 다수의 후보 작용제 및/또는 공지된 약물의 조합)로 처리되고 있거나 처리된 세포 (또는 다수의 세포, 예를 들어 무손상 조직 내의 것)를 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 쌍은 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브") 및 제2 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하고, 여기서:
- [0275] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열)을 포함하고;
- [0276] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;
- [0277] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;
- [0278] c) 제2 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;
- [0279] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및
- [0280] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 각각의 에피트랜스크립토 변형된 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;
- [0281] 여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 세포에서의 에피트랜스크립토 RNA 변형의 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 에피트랜스크립토 RNA 변형을 조정한다는 것을 나타낸다.
- [0282] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용을 조정할 수 있는 작용제를 스크리닝하는 방법을 제공하며, 상기 방법은:
- [0283] a) 대상체로부터 채취한 세포를 1개 이상의 프로브 세트와 접촉시키는 단계이며, 여기서 각각의 프로브 세트는 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하고, 여기서:
- [0284] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관

심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0285] ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0286] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하는 것인 단계;

[0287] b) 제1 프로브의 5' 단부 및 3' 단부를 함께 라이게이션시켜 원형 올리고뉴클레오타이드를 생산하는 단계;

[0288] c) 제3 프로브를 프라이머로서 사용하여 롤링 서클 증폭을 수행하여 원형 올리고뉴클레오타이드를 증폭시켜 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 생산하는 단계;

[0289] d) 1개 이상의 연쇄된 앰플리콘을 중합체 매트릭스에 포매시키는 단계; 및

[0290] e) 중합체 매트릭스에 포매된 연쇄된 앰플리콘 또는 그의 부분을 서열분석하여 세포에서 RNA-결합 단백질에 의해 결합된 각각의 관심 RNA의 정체 및 위치를 결정하는 단계를 포함하며;

[0291] 여기서 후보 작용제의 부재 하에 비해 후보 작용제의 존재 하에 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용 프로파일에서의 차이는 후보 작용제가 RNA와 RNA-결합 단백질 사이의 상호작용을 조정한다는 것을 나타낸다.

[0292] 일부 실시양태에서, 후보 작용제는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산, 지질 또는 탄수화물이다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제는 공지된 약물 또는 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 올리고뉴클레오타이드 (ASO)이다. 일부 실시양태에서, 다수의 후보 작용제가 스크리닝 라이브러리로서 제공된다. 임의의 후보 작용제가 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 특히, 1개 이상의 관심 RNA의 에피트랜스크립토믹스 변형 또는 1개 이상의 관심 RNA와 RNA-결합 단백질의 상호작용을 조정할 수 있는 것으로 생각되는 임의의 후보 작용제가 본원에 기재된 방법을 사용하여 스크리닝될 수 있다. 일부 실시양태에서, 후보 작용제에 의한 1개 이상의 관심 RNA의 에피트랜스크립토믹스 변형 및/또는 1개 이상의 관심 RNA와 RNA-결합 단백질의 상호작용의 조정은 질환 또는 장애의 증상을 감소, 완화 또는 제거하거나, 또는 질환 또는 장애의 발생 또는 진행을 예방하는 것과 연관된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 유전 질환, 증식성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 간 질환, 비장 질환, 폐 질환, 혈액 질환, 신경계 질환, 정신 질환, 위장 (GI) 관 질환, 비뇨생식기 질환, 감염성 질환, 근골격 질환, 내분비 질환, 대사 장애, 면역 장애, 중추 신경계 (CNS) 장애 또는 심혈관 질환이다.

[0293] 프로브

[0294] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 에피트랜스크립토믹스 RNA 변형을 프로파일링하기 위한 방법 및 시스템에 사용하기 위한 프로브 쌍을 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (또한 본원에서 "페드락" 프로브로도 지칭됨) 및 제2 프로브 (또한 본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)를 포함하는 프로브 쌍을 제공하며, 여기서:

[0295] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열)을 포함하고;

[0296] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토믹스 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다.

[0297] 본원에 기재된 모든 프로브는 언급된 성분 각각의 사이에 다양한 뉴클레오타이드 길이의 스페이서 또는 링커를 임의로 가질 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 성분은 서로 직접 (즉, 포스포디에스테르 결합에 의해) 연결될 수 있다. 본원에 기재된 모든 프로브는 표준 뉴클레오타이드를 포함할 수 있거나, 또는 표준 뉴클레오타이드 중 일부는 관련 기술분야에 공지된 임의의 변형된 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다.

[0298] 프로브 쌍 중 제2 프로브 (또한 본원에서 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)는 에피트랜스크립토믹스 RNA 변형 (즉, 특정한 관심 RNA 상에 존재하는 전사후 변형)을 인식하는 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토믹스 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토믹스 RNA

변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 압타머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 소분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브는 비오틴-스트렙타비딘 상호작용을 포함하는 메커니즘을 통해 에피트랜스크립토 변형에 결합한다. 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 프로브의 부분은 단백질 (예를 들어, 항체 또는 항체 변이체, 또는 특이적 에피트랜스크립토 변형에 달리 결합할 수 있는 임의의 단백질)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질은 PAPG이다. 특정 실시양태에서, PAPG는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 항체를 인식하고 그에 결합한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함한다. 예를 들어, 제2 프로브는 2차 항체를 포함할 수 있고, 1차 항체는 에피트랜스크립토 RNA 변형에의 결합에 사용될 수 있다. 이어서, 제2 프로브 상의 2차 항체는 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합된 1차 항체를 인식한다. 예를 들어, 도 1을 참조한다. 특정 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 (예를 들어, 2차 항체) 또는 항체 변이체를 포함한다. 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분이 2차 항체인 경우에, 2차 항체는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 1차 항체에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1차 항체는 항- m^6A 항체, 항- m^1A 항체, 항-슈도우리딘 항체, 항- m^6Am 항체, 항- m^7G 항체, 항- ac^4C 항체, 항-Nm 항체, 또는 항- m^5C 항체이다. 다른 에피트랜스크립토 변형은 문헌 [Kumar, S. et al., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9 (2021); 및 Harcourt, E. M. et al., *Nature*. 541, 339-346 (2017)]에 기재된 것을 포함하며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. 항체 대신에, 본 개시내용은 또한 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합할 수 있는 임의의 작용제를 본원에 기재된 프로브 상에서 사용하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질은 m^6A -특이적 YTH 도메인 단백질 또는 그의 부분이다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체를 포함한다.

[0299] 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분에 더하여, 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 본원에 제공된 프로브 쌍에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 프로브의 각각의 세트 상에서 동일할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 각각의 프로브 쌍 상에서 공유하다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0300] 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 각각의 부분은 임의적인 링커에 의해 연결된다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 링커는 비-뉴클레오타이드 링커 (예를 들어, 아미노산, 화학적 링커, 중합체 등)이다. 일부 실시양태에서, 프로브 쌍 중 제2 프로브는 구조:

[0301] 5'-[에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0302] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오타이드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0303] 본원에 제공된 프로브 쌍 중 제1 프로브 (또한 본원에서 "페드락" 프로브로도 지칭됨)는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할된다.

[0304] 본원에 제공된 프로브 쌍 중 제1 프로브는 또한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약

26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이이다.

- [0305] 본원에 개시된 프로브 쌍 중 제1 프로브는 또한 뉴클레오타이드의 특이적 서열로 구성된 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 바코드는 관심 RNA (즉, 적어도 1개의 에피트랜스크립토 변형으로 변형된 RNA)를 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함할 수 있다.
- [0306] 제1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 부분의 임의의 순서로의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 각각의 부분은 임의적인 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 임의적인 링커는 뉴클레오타이드 링커이다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 임의적인 링커는 뉴클레오타이드 이외의 다른 유형의 연결을 포함한다 (예를 들어, 화학적 링커, 펩티드 링커 등). 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 구조:
- [0307] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3';
- [0308] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3';
- [0309] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-3';
- [0310] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-3';
- [0311] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[바코드 서열]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'; 또는
- [0312] 5'-[바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'
- [0313] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브 및/또는 제2 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분 중 임의의 것은 DNA를 포함한다.
- [0314] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 에피트랜스크립토 RNA 변형을 프로파일링하기 위한 방법 및 시스템에 사용하기 위한 프로브 세트를 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨) 및 제2 프로브 (또한 본원에서 "스플린트" 프로브로도 지칭됨) 및 제3 프로브 (또한 본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)를 포함하는 프로브 쌍을 제공하며, 여기서:
- [0315] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0316] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0317] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다.
- [0318] 본원에 기재된 프로브 세트의 모든 프로브는 언급된 성분 각각의 사이에 다양한 뉴클레오타이드 길이의 스페이서 또는 링커를 임의로 가질 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 성분은 서로 직접 (즉, 포스포디에스테르 결합에 의해) 연결될 수 있다. 본원에 기재된 모든 프로브는 표준 뉴클레오타이드를 포함할 수 있거나, 또는 표준 뉴클레오타이드 중 일부는 관련 기술분야에 공지된 임의의 변형된 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다.
- [0319] 프로브 세트 중 제2 프로브 (또한 본원에서 "스플린트 프로브"로도 지칭됨)는 에피트랜스크립토 RNA 변형 (즉, 특정한 관심 RNA 상에 존재하는 전사후 변형)을 인식하는 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 압타머를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형에 결합하는 제2 프로브의 부분은 소분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브는 비오틴-스트렙타비딘 상호작용을 포함하는 메커니즘을 통해 에피트랜스크립토 변형에 결합한다. 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하

는 프로브의 부분은 단백질 (예를 들어, 항체 또는 항체 변이체, 또는 특이적 에피트랜스크립토스 변형에 달리 결합할 수 있는 임의의 단백질)일 수 있다. 특정 실시양태에서, 단백질은 PAPG이다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함한다. 예를 들어, 제2 프로브는 2차 항체를 포함할 수 있고, 1차 항체는 에피트랜스크립토스 RNA 변형에의 결합에 사용될 수 있다. 이어서, 제2 프로브 상의 2차 항체는 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 결합된 1차 항체를 인식한다. 예를 들어, 도 1을 참조한다. 또 다른 예에서, 제2 프로브는 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 결합하는 항체에 결합할 수 있는 단백질 PAPG를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PAPG는 항체를 인식하고 그에 결합하고, 항체는 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하고 그에 결합한다. 특정 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 (예를 들어, 2차 항체) 또는 항체 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차 항체는 에피트랜스크립토스 RNA를 인식하고 그에 결합하는 1차 항체를 인식하고 그에 결합한다. 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전 또는 후에 1차 항체와 접촉될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉된다. 일부 실시양태에서, 1차 항체는 항- m^6A 항체, 항- m^1A 항체, 항-슈도우리딘 항체, 항- m^6Am 항체, 항- m^7G 항체, 항- ac^4C 항체, 항-Nm 항체, 또는 항- m^5C 항체이다. 1차 항체 대신에, 본 개시내용은 또한 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합할 수 있는 임의의 작용제를 본원에 기재된 프로브 상에서 사용하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합하는 제2 프로브의 부분은 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 단백질은 m^6A -특이적 YTH 도메인 단백질이다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토스 RNA 변형에 직접 결합하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체를 포함한다.

[0320] 일부 실시양태에서, 프로브 세트 중 제2 프로브는 추가로 중합 블록을 포함한다. 중합 블록은 본원에 기재된 방법의 단계 (c)의 롤링 서클 증폭에서 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브가 프라이머로서 사용되는 것을 방지할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블록은 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 3' 단부에 존재한다. 중합 블록은, 예를 들어 폴리머라제가 중합을 위한 프라이머로서 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것을 방지하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블록은 차단된 3' 히드록실기를 포함하는 (예를 들어, 3' 히드록실기 상에 산소 보호기를 포함하는) 핵산 잔기이다. 일부 실시양태에서, 중합 블록은 3' 히드록실기 대신에 수소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블록은 추가의 뉴클레오타이드가 첨가되는 것을 방지하는 3' 히드록실기 대신에 임의의 화학적 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블록은 역전된 핵산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블록은 역전된 아데노신, 티민, 시토신, 구아노신 또는 우리딘 잔기이다. 특정 실시양태에서, 중합 블록은 역전된 티민 잔기이다.

[0321] 에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분에 더하여, 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 본원에 제공된 프로브 세트에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 프로브의 각각의 세트 상에서 동일할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 각각의 제1 및 제2 프로브 상에서 공유하다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0322] 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 각각의 부분은 임의적인 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 임의적인 링커는 뉴클레오타이드 링커이다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 프로브 세트 중 제2 프로브는 구조:

[0323] 5'-[에피트랜스크립토스 RNA 변형을 인식하는 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0324] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오타이드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0325] 본원에 기재된 프로브 세트 중 제1 프로브 (또한 본원에서 "페드락" 프로브로도 지칭됨)는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 4-20, 약 5-19, 약 6-18, 약 7-17, 약 8-16, 약 9-15, 약 10-14, 또는 약 11-13개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약

8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할된다.

[0326] 본원에 개시된 프로브 세트 중 제1 프로브는 또한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이이다.

[0327] 본원에 개시된 프로브 세트 중 제1 프로브는 또한 뉴클레오타이드의 특이적 서열로 구성된 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 바코드는 관심 RNA (즉, 적어도 1개의 특정한 에피토펙스프린 변형으로 변형된 RNA)를 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함할 수 있다.

[0328] 제1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 부분의 임의의 순서로의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분은 임의적인 링커에 의해 또 다른 부분에 연결된다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 구조:

[0329] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[올리고뉴클레오타이드 바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제3 프로브에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0330] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 프로브 세트를 구성하는 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분 중 임의의 것은 DNA를 포함한다.

[0331] 본원에 제공된 프로브 세트 중 제3 프로브 (또한 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)는 관심 RNA에 상보적인 부분 및 프로브 세트 중 제1 프로브에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0332] 특정 실시양태에서, 프로브 세트 중 제3 프로브는 구조:

[0333] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0334] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0335] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하기 위한 방법 및 시스템에 사용하기 위한 프로브 세트를 제공한다. 한 측면에서, 본 개시내용은 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨) 및 제2 프로브 (또한 본원에서 "스플린트" 프로브로도 지칭됨) 및 제3 프로브 (또한 본원에서 "프라이머" 프로브로도 지칭됨)를 포함하는 프로브 쌍을 제공하며, 여기서:

[0336] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

[0337] ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;

- [0338] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다.
- [0339] RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하기 위한 프로브 세트 중 제2 프로브 (또한 본원에서 "스플린트 프로브"로도 지칭됨)는 RNA-결합 단백질 (예를 들어, RNA 상에 에피트랜스크립툼 변형을 도입하는 효소)을 인식하는 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 결합하는 제2 프로브의 부분은 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 결합하는 제2 프로브의 부분은 압타머를 포함한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 결합하는 제2 프로브의 부분은 소분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브는 비오틴-스트렙타비딘 상호작용을 포함하는 메커니즘을 통해 RNA-결합 단백질에 결합한다. RNA-결합 단백질을 인식하는 프로브의 부분은 단백질 (예를 들어, 항체 또는 항체 변이체, 또는 특이적 RNA-결합 단백질에 달리 결합할 수 있는 임의의 단백질)일 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체에 결합하는 작용제를 포함한다. 예를 들어, 제2 프로브는 2차 항체를 포함할 수 있고, 1차 항체는 RNA-결합 단백질에의 결합에 사용될 수 있다. 이어서, 제2 프로브 상의 2차 항체는 RNA-결합 단백질에 결합된 1차 항체를 인식한다. 예를 들어, 도 13a 및 13c를 참조한다. 특정 실시양태에서, RNA-결합 단백질을 인식하는 제2 프로브의 부분은 항체 (예를 들어, 2차 항체) 또는 항체 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차 항체는 RNA-결합 단백질을 인식하는 1차 항체를 인식하고 그에 결합한다. 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전 또는 후에 1차 항체와 접촉될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포는 1개 이상의 프로브 쌍과 접촉되기 전에 1차 항체와 접촉된다. 1차 항체 대신에, 본 개시내용은 또한 RNA-결합 단백질을 인식하고 직접 결합할 수 있는 임의의 작용제를 본원에 기재된 프로브 상에서 사용하는 것을 고려한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 제2 프로브의 부분은 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, RNA-결합 단백질에 직접 결합하는 제2 프로브의 부분은 항체 또는 항체 변이체를 포함한다.
- [0340] 일부 실시양태에서, 프로브 세트 중 제2 프로브는 추가로 중합 블로커를 포함한다. 중합 블로커는 본원에 기재된 방법의 단계 (c)의 롤링 서클 증폭에서 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브가 프라이머로서 사용되는 것을 방지할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브의 3' 단부에 존재한다. 중합 블로커는, 예를 들어 폴리머라제가 중합을 위한 프라이머로서 제2 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하는 것을 방지하는 임의의 화학적 모이어티일 수 있다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 차단된 3' 히드록실기를 포함하는 (예를 들어, 3' 히드록실기 상에 산소 보호기를 포함하는) 핵산 잔기이다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 3' 히드록실기 대신에 수소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 추가의 뉴클레오타이드가 첨가되는 것을 방지하는 3' 히드록실기 대신에 임의의 화학적 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 핵산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 아데노신, 티민, 시토신, 구아노신 또는 우리딘 잔기이다. 특정 실시양태에서, 중합 블로커는 역전된 티민 잔기이다.
- [0341] RNA-결합 단백질을 인식하는 부분에 더하여, 제2 프로브는 또한 제1 프로브의 부분에 상보적인 부분을 포함한다. 본원에 제공된 프로브 세트에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 프로브의 각각의 세트 상에서 동일할 수 있다. 일부 실시양태에서, 서로 상보적인 제1 및 제2 프로브의 부분은 각각의 제1 및 제2 프로브 상에서 공유하다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3-20, 약 4-19, 약 5-18, 약 6-17, 약 7-16, 약 8-15, 약 9-14, 약 10-13, 또는 약 11-12개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제2 프로브의 부분은 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다.
- [0342] 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 각각의 부분은 임의적인 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 임의적인 링커는 뉴클레오타이드 링커이다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 프로브 세트 중 제2 프로브는 구조:
- [0343] 5'-(RNA-결합 단백질을 인식하는 부분)-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'
- [0344] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 링커 (예를 들어, 뉴클레오타이드 링커)를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제2 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.
- [0345] 본원에 기재된 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법에 사용된 프로브 세트 중 제1 프로브 (또한 본원에서 "패드락" 프로브로도 지칭됨)는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 4-20, 약 5-19, 약 6-18, 약

7-17, 약 8-16, 약 9-15, 약 10-14, 또는 약 11-13개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제2 프로브의 부분에 상보적인 제1 프로브의 부분은 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 또는 약 20개의 뉴클레오타이드 길이이다. 특정 실시양태에서, 제2 프로브에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 제1 프로브의 5' 단부와 3' 단부 사이에서 분할된다.

[0346] 본원에 개시된 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법에 사용된 프로브 세트 중 제1 프로브는 또한 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10-30, 약 11-29, 약 12-28, 약 13-27, 약 14-26, 약 15-25, 약 16-24, 약 17-23, 약 18-22, 또는 약 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분은 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30개, 또는 30개 초과 뉴클레오타이드 길이이다.

[0347] 본원에 개시된 프로브 세트 중 제1 프로브는 또한 뉴클레오타이드의 특이적 서열로 구성된 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1-10, 약 2-9, 약 3-8, 약 4-7, 또는 약 5-6개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열은 약 1, 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 또는 약 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드 프로브의 바코드는 관심 RNA (즉, 적어도 1개의 RNA-결합 단백질에 의해 결합되는 RNA)를 확인하는 데 사용되는 유전자-특이적 서열을 포함할 수 있다.

[0348] 제1 올리고뉴클레오타이드 프로브의 부분의 임의의 순서로의 배열이 본 개시내용에 의해 고려된다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분은 임의적인 링커에 의해 또 다른 부분에 연결된다. 특정 실시양태에서, 임의적인 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브는 구조:

[0349] 5'-[제2 프로브에 상보적인 부분]-[올리고뉴클레오타이드 바코드 서열]-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제3 프로브에 상보적인 부분]-[제2 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0350] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 프로브 세트를 구성하는 프로브의 올리고뉴클레오타이드 부분 중 임의의 것은 DNA를 포함한다.

[0351] 본원에 제공된 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 방법에 사용된 프로브 세트 중 제3 프로브 (또한 "프라이머 프로브"로도 지칭됨)는 관심 RNA에 상보적인 부분 및 프로브 세트 중 제1 프로브에 상보적인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10-30, 11-29, 12-28, 13-27, 14-26, 15-25, 16-24, 17-23, 18-22, 또는 19-21개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 관심 RNA에 상보적인 제3 프로브의 부분은 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5-15, 6-14, 7-13, 8-12 또는 9-11개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 제1 프로브의 부분에 상보적인 제3 프로브의 부분은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 뉴클레오타이드 길이이다.

[0352] 특정 실시양태에서, 프로브 세트 중 제3 프로브는 구조:

[0353] 5'-[관심 RNA에 상보적인 부분]-[제1 프로브에 상보적인 부분]-3'

[0354] 를 포함하며, 여기서]-[는 임의적인 뉴클레오타이드 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서,]-[는 제1 프로브의 2개의 부분 사이의 직접 연결 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 나타낸다.

[0355] 본원에 기재된 모든 프로브는 언급된 성분 각각의 사이에 다양한 뉴클레오타이드 길이의 스페이서 또는 링커를 임의로 가질 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 성분은 서로 직접 (즉, 포스포디에스테르 결합에 의해) 연결될 수 있다. 본원에 기재된 모든 프로브는 표준 뉴클레오타이드를 포함할 수 있거나, 또는 표준 뉴클레오타이드 중 일부는 관련 기술분야에 공지된 임의의 변형된 뉴클레오타이드로 치환될 수 있다.

[0356] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 다수의 프로브 쌍 또는 프로브 세트를 포함하는 복수의 프로브를 제공한다. 특정 실시양태에서, 복수의 프로브에서 각각의 프로브 쌍 또는 프로브 세트는 상이한

관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 복수의 프로브는 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과인 프로브 쌍 또는 프로브 세트를 포함한다.

[0357] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 프로브 중 임의의 것의 다수의 세트를 포함하는 라이브러리를 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 프로브 중 임의의 것의 다수의 쌍을 포함하는 라이브러리를 제공한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 제공된 프로브 세트 또는 쌍으로부터의 다수의 제1 프로브, 본원에 제공된 프로브 세트 또는 쌍으로부터의 다수의 제2 프로브, 또는 본원에 제공된 프로브 세트로부터의 다수의 제3 프로브를 포함하는 라이브러리를 제공한다.

[0358] 키트

[0359] 키트가 또한 본 개시내용에 의해 제공된다. 한 측면에서, 제공된 키트는 본원에 기재된 바와 같은 프로브 중 1개 이상을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 프로브 쌍 또는 프로브 세트 중 임의의 것, 또는 다수의 프로브 쌍 또는 프로브 세트를 포함한다. 특정 실시양태에서, 키트는 1개 초과, 2개 초과, 3개 초과, 4개 초과, 5개 초과, 10개 초과, 20개 초과, 30개 초과, 40개 초과, 50개 초과, 100개 초과, 200개 초과, 500개 초과, 1000개 초과, 2000개 초과, 또는 3000개 초과인 프로브 쌍 또는 프로브 세트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 용기 (예를 들어, 바이알, 앰플, 병, 및/또는 분배기 패키지, 또는 다른 적합한 용기)를 추가로 포함할 수 있다. 키트는 또한 대조군 실험을 수행하기 위한 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 개시된 방법을 수행하기 위한 다른 시약 (예를 들어, 효소, 예컨대 리가제 또는 폴리머라제, 본원에 기재된 바와 같은 아민-변형된 뉴클레오타이드, 1차 항체, 2차 항체, 완충제, 및/또는 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 시약 및 단량체)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 프로파일링하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 추가적으로, 에피트랜스크립토 변형된 RNA와 함께 비변형된 RNA를 프로파일링하는 데 유용하다 (즉, 키트는 또한 비변형된 관심 RNA를 프로파일링하기 위한 프로브 쌍을 포함함). 일부 실시양태에서, 키트는 세포에서 RNA-결합 단백질과 RNA 사이의 상호작용을 프로파일링하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 대상체에서 질환을 진단하는 데 유용하다. 일부 실시양태에서, 키트는 1개 이상의 RNA의 에피트랜스크립토 변형을 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.

[0360] 시스템

[0361] 한 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 에피트랜스크립토 RNA 변형을 프로파일링하기 위한 시스템을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 시스템은 하기를 포함한다:

[0362] a) 세포 (또는 다수의 세포, 예를 들어 무손상 조직 내의 것);

[0363] b) 제1 프로브 (즉, "패드락 프로브") 및 제2 프로브 (즉, "프라이머 프로브")를 포함하는 1개 이상의 프로브 쌍, 여기서:

[0364] i) 제1 프로브는 제2 프로브에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열 (예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 SEDAL 서열분석에 의해, 예를 들어 각각의 관심 RNA를 확인하는 데 사용되는 고유한 서열)을 포함하고;

[0365] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함함;

[0366] c) 현미경; 및

[0367] d) 컴퓨터.

[0368] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 시스템을 제공한다:

[0369] a) 세포;

[0370] b) 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 세트, 여기서:

- [0371] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0372] ii) 제2 프로브는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0373] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함함;
- [0374] c) 현미경; 및
- [0375] d) 컴퓨터.
- [0376] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 시스템을 제공한다:
- [0377] a) 세포;
- [0378] b) 제1 프로브, 제2 프로브 및 제3 프로브를 포함하는 1개 이상의 프로브 세트, 여기서:
- [0379] i) 제1 프로브는 제2 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열, 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분, 및 제3 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0380] ii) 제2 프로브는 RNA-결합 단백질을 인식하는 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함하고;
- [0381] iii) 제3 프로브는 관심 RNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분 및 제1 프로브의 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 부분을 포함함;
- [0382] c) 현미경; 및
- [0383] d) 컴퓨터.
- [0384] 본원에 기재된 프로브 (즉, 프로브 쌍) 중 임의의 것이 본 개시내용에 의해 고려되는 시스템에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형은 N^6 -메틸아데노신 (m^6A), N^1 -메틸아데노신 (m^1A), 슈도우리딘, $N^6,2'$ -O-디메틸아데노신 (m^6Am), 7-메틸구아노신 (m^7G), N^4 -아세틸시티딘 (ac^4C), 2'-O-메틸화 (Nm), 또는 5-메틸시토신 (m^5C)이다. 특정 실시양태에서, 에피트랜스크립토 RNA 변형은 N^6 -메틸아데노신 (m^6A)이다.
- [0385] 일부 실시양태에서, 시스템은 컴퓨터 상에서 실행되는 소프트웨어를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 다른 시약 (예를 들어, 효소, 에컨대 리가제 또는 폴리머라제, 본원에 기재된 바와 같은 아민-변형된 뉴클레오타이드, 1차 항체, 2차 항체, 완충제, 및/또는 중합체 매트릭스 (예를 들어, 폴리아크릴아미드 매트릭스)를 제조하기 위한 시약 및 단량체)을 추가로 포함할 수 있다.
- [0386] 실시예
- [0387] 실시예 1: 계내 에피트랜스크립토의 단일-세포 프로파일링
- [0388] 염색체 아키텍처로부터 세포-표면 단백질 디스플레이까지 광범위한 별개의 정보를 포괄하는 단일-세포 멀티-오믹스 기술 스펙트럼이 개발되었다. 본원에 기재된 에피트랜스크립토 RNA 변형의 단일-세포 프로파일링을 위한 방법론은 그의 주목할 만한 다능성 및 상이한 용도에 적합화되는 능력으로 인해 단일-세포 멀티-오믹스 기술 분야에서 고유하다. RNA-히드로겔 가교, 대사 표지, DNA 바코딩, 및 계내 서열분석을 비롯한 다양한 화학적 및 생명공학적 도구는 에피트랜스크립토 RNA 변형을 고처리량 방식으로 검출하기 위해 본원에 기재된 방법에서 조합된다. 본원에 기재된 방법은 RNA 변형을 이해하고 에피트랜스크립토 변형과 연관된 인간 질환의 이해를 증진시키는 데 유용하다.
- [0389] 트랜스크립토의 화학적 변형은 RNA 활성, 프로세싱 (예를 들어, 프리-mRNA), 안정성, 유출 및 번역의 조절에서 중요한 역할을 한다. 세포 RNA의 이들 화학적 변형은 다양하고 편재되어, 유전자 발현을 조절하는 데 있어서 추가의 복잡성 층을 제공한다. 에피트랜스크립토믹스는 제2 세대 서열분석에서 연구되었지만, RNA 변형의 이해를 발전시키기 위해, 변형된 RNA의 공간 배열을 천연 세포 환경에서, 뿐만 아니라 멀티플렉스화되고 고처리량

방식으로 연구하기 위한 전략에 대한 필요가 존재한다. 본원에 기재된 방법은 RNA 변형-결합 모이어티 (예를 들어, RNA-변형 결합 항체)를 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 접합시키는 프로브의 사용을 통해 이들 2가지의 이슈를 다룬다. 따라서, 특이적 에피트랜스크립톰 변형을 갖는 RNA의 정체는 프로브 상에 존재하는 올리고뉴클레오타이드 바코드 서열을 사용하여 순차적으로 디코딩되고 확인될 수 있다 (도 1).

[0390] 이러한 방법의 유용성은 mRNA 프로세싱, 번역 및 분해에서 중요한 에피트랜스크립톰 마커인 가장 풍부하고 보편적인 RNA 변형 중 하나, N⁶-메틸아데노신 (m⁶A)의 검출을 통해 입증된다. m⁶A-변형된 베타-액틴 전사체가 세포에서 검출되었다 (도 2a-2d). 베타-액틴은 m⁶A에 의해 변형된 세포에서 흔하고 풍부한 mRNA이다. 미가공 영상은 베타-액틴 mRNA에 상응하는 신호가 여러 음성 대조군 (도 2b-2d)과 비교하여 관찰될 수 있음을 보여준다 (도 2a).

[0391] 실시예 2: 무손상 조직에서의 RNA 변형의 단일 세포 계내 분석

[0392] 최근의 증거는 RNA 변형이 단지 미묘한 구조적 변형인자일 뿐만 아니라 활성 유전자 조절인자임을 보여주었다.³ 특히, mRNA 변형 (예를 들어, N⁶-메틸아데노신)은 스플라이싱, 핵 유출, 저장, 세포 국제화, 번역 및 붕괴를 포함한, RNA 전사체의 탄생부터 사멸까지의 수명 주기의 거의 모든 단계에 영향을 미친다.³ 그러나, mRNA 변형이 비-화학량론적인 이유는 여전히 공지되어 있지 않다. 주어진 유전자에 대해, 많은 변형 부위가 100% 표시되지 않고, 다수의 RNA-탈변형 효소가 변형 상태를 동적으로 조정한다. 벌크 샘플링에 의해 심하게 혼동되는, mRNA 거동에서 이들 대조적인 RNA 변형 상태가 어떤 역할을 하는지 결정하기 위해서는 새로운 방법이 요구된다. 또한, mRNA 변형이 세포 내부의 mRNA의 세포하 위치에 어떻게 영향을 미치는지도 공지되어 있지 않다. mRNA 변형의 비-화학량론적 속성을 고려하면, 적어도 2가지의 타당한 가설이 존재한다: 단일 세포 내에서, 상이한 변형 상태를 갖는 mRNA는 단백질 생산 위치 및 지속기간을 정확하게 제어하기 위해 상이한 시공간적 특성을 가짐; 또는 명백한 비-화학량론은 상이한 세포 상태 및 세포 유형을 혼란한 결과이며, 이는 이전 측정이 모두 수백만개의 세포로 수행되었기 때문이다. 마지막으로, mRNA 변형의 효과가 상이한 세포 유형 및 상태 사이에서 어떻게 달라지는지도 또한 공지되어 있지 않다. 벌크 에피트랜스크립톰 서열분석 결과는 상이한 기관이 상이한 발생 및 질환 병기에 걸쳐 변화하는 별개의 에피트랜스크립톰 서명을 갖는다는 것을 밝혀내었다.³ 더욱이, 임의의 주어진 기관 내의 세포 유형의 다양성을 고려하면, 세포-유형 특이적 변형 패턴을 밝혀내기 위해 단일-세포 에피트랜스크립톰 서열분석 방법이 필요하다. 이러한 다양성의 분석은 에피트랜스크립톰 경로의 보다 깊은 이해를 가능하게 할 것이다.

[0393] 현행 벌크 에피트랜스크립톰 서열분석 방법은 이들이 투입 물질로서 수백만개의 세포를 필요로 한다는 것을 비롯하여 수많은 제한을 갖는다. 이는 단일-분자 화학량론 및 단일-세포 감수성의 손실로 이어진다. 또한, 공간 관계가 필수불가결한 적용, 예컨대 발생 경로 및 뉴런 조직에서, 해리된 조직 샘플은 불충분하다.⁵ 현재, RNA 변형에 대한 영상화 방법은 한 번에 단지 1개의 유전자만을 표적화할 수 있거나, 또는 유전자 정체별 구별 없이 합산으로서 모든 변형 부위를 검출할 수 있다. 많은 변형된 RNA가 큰 유전자 군으로서 조절된다는 것은 주목할 만하다. 따라서, 의미있는 데이터 분석을 위해 적어도 수백개의 변형된 유전자 (이상적으로는 트랜스크립톰-전반)를 동시에 측정하는 것이 필요하다.

[0394] 전체적으로, 본원에 기재된 방법은 공간 해상도에 의한 단일-세포 에피트랜스크립톰 프로파일링을 위한 변환 툴박스를 나타낸다. 이러한 시스템은 다양한 생물학적 과정에서 폭넓게 적용된다. RNA 변형은 모든 진핵 세포, 및 세포 핵 내부에서 복제되는 RNA 바이러스 사이에서 공유되기 때문에, RNA 변형은 암, 면역학, RNA 바이러스학 등에서 활발하게 연구되었다. 또한, 이들 변형의 공간 분포는 신경과학, 줄기 세포 분화 및 발생 생물학을 비롯한 분야에서 중요한 가능성이 있다. 본원에 기재된 방법은 또한 RNA 변형이 어떻게 상이한 세포 유형에 걸쳐 세포 기능을 조절하고 단일-세포 사건이 어떻게 집합적으로 조직 기능에 영향을 미치는지에 대한, 기존의 접근법 및 새로운 과학적 지식에 의해서는 차트화될 수 없는, 뇌의 통합적인 트랜스크립톰 및 에피트랜스크립톰 공간 세포 아틀라스를 제공하는 잠재력을 갖는다. m⁶A 이외에, 유사한 전략을 사용하여 접근할 수 있는 다른 유형의 mRNA 변형 (예를 들어, 1-메틸아데노신, 슈도우리딘 등)이 존재한다. 또한, tRNA도 다수의 다양한 변형을 갖는다.³ 증가하는 증거는 이들이 또한 다양한 신호, 스트레스 및 인간 질환에 반응하여 단백질 번역에 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸다.^{3,5}

- [0395] N⁶-메틸아데노신 (m⁶A)은 모든 고등 진핵생물의 메신저 RNA에 존재하는 가장 보편적인 내부 변형이다. 이러한 변형은 비-화학적이고, 결핍이 척추동물에 있어서 치명적인 m⁶A 메틸트랜스퍼라제 복합체 METTL3/14 ("기록자")에 의해 설치되며; 그의 존재는 발생, 생식, 및 영양소 대사에 영향을 미치는 m⁶A 데메틸라제 (ALKBH5/FTO; "소거자")에 의해 추가로 동적으로 조절된다.³ m⁶A-결합 단백질, YTHDF 및 YTHDC의 패밀리는 m⁶A-변형된 mRNA를 특이적으로 인식하고, mRNA 스플라이싱, 유출, 번역, 및 분해를 조절한다.^{12,13} 이와 함께, m⁶A 조절 단백질은 줄기 세포 분화 및 동물 발생 동안 필수적인 신속한 반응 및 제어가능한 단백질 생산을 유전자 발현에 부여한다^{3,14}.
- [0396] 설치류의 벌크 m⁶A-서열분석은 m⁶A가 전체 뇌 트랜스크립톰에서 보편적이며, 수천개의 코딩 유전자 및 수백개의 비-코딩 유전자를 변형시킨다는 것을 밝혀내었다 (도 6).^{15,16} 동물에서의 m⁶A 경로의 연구는 m⁶A가 피질발생, 마우스 중뇌에서의 도파민성 신호전달, 파리의 비행 및 운동 거동, 성체 마우스에서의 신경발생, 및 마우스에서의 축삭 재생을 포함하여, 뉴런 기능을 조정한다는 것을 시사하였다. m⁶A의 상향조절은 뇌 성숙, 행동 경험 및 기억 형성과 함께 발생하는 것으로 관찰되었으며, 이는 m⁶A 축적과 뇌 활성 사이의 연관성을 시사한다.⁶ 정상 생리학적 과정 이외에도, m⁶A 존재비 및 m⁶A 메틸트랜스퍼라제 및 데메틸라제의 유전자 변이체는 주의력-결핍/과잉행동 장애 (ADHD), 주요 우울 장애 (MDD), 중독, 간질 및 신경변성과 연관되었다.¹⁷
- [0397] 그러나, m⁶A와 뇌 기능 사이의 연관성에 대한 이들 이전 발견에도 불구하고, 연관성과 메카니즘 사이에 방대한 지식 차이가 여전히 존재한다. 단일-세포 RNA 서열분석은 수백개의 분자적으로 규정된 세포 유형을 밝혀낸 반면¹⁸, 벌크 m⁶A-seq는 단일-세포 수준에서의 m⁶A 에피트랜스크립톰의 잠재적 다양성을 차폐한다. 예를 들어, m⁶A 데메틸라제 FTO는 중-선조체-전전두 영역의 도파민-신호전달 보상 회로를 통해 보상 거동을 조절하고¹⁹, 이는 m⁶A-의존성 유전자 조절이 규정된 뉴런 세포 유형에서 보다 현저하고 특이적 신경 회로로 편향될 수 있음을 시사한다. 또한, 많은 뇌-관련 연구는 마우스의 표현형을 설명하기 위해 세포 배양물에서 m⁶A로부터 발견된 분자 메카니즘을 직접적으로 인정하고 이용한다. 이러한 방법론은 m⁶A 경로가 다중 효소 및 결합 단백질을 수반하고, 이들의 상이한 조합이 극적으로 상이한 기능적 결과를 초래할 수 있기 때문에 문제가 될 수 있다. 또한, 이러한 시험관내 실험은 이들 세포 거동의 많은 상황 의존성을 제거한다. 따라서, 시험관내 세포-배양 모델을 사용하는 대신, 거동 표현형을 설명하기 위해 관심 동물 모델에서 m⁶A 에피트랜스크립톰을 직접 연구하는 것이 고도로 바람직하다. 요약하면, 무손상 조직에서의 계내 m⁶A-seq의 결여는 중요한 한계임이 명백하고, 본원에 기재된 방법은 이들 이슈를 다룬다.
- [0398] m⁶A-특이적 결합제, 근접 증폭, 및 계내 RNA 서열분석을 이용함으로써 3D-m⁶A-seq를 위한 방법을 개발하였다 (도 7): (1) m⁶A-결합제 (항-m⁶A 항체 또는 생화학적으로 정제된 m⁶A-특이적 YTH 도메인 단백질^{12,13})를 DNA 프라이머와 접합시키고 이를 관심 샘플을 염색하는 데 사용하였다; (2) 이어서 DNA 패드락 프로브를 사용하여 m⁶A 부위에 근접한 RNA 서열에 혼성화시켰다. 벌크 m⁶A-seq로부터 이전에 수득된 m⁶A 부위는 이들 프로브의 설계에 대한 정보를 제공하며, 그의 라이브러리는 수천개의 m⁶A 부위의 고도로 멀티플렉스화된 표적화를 가능하게 하였다; (3) 패드락 프로브가 RNA-주형화된 DNA 리가제 (예를 들어, 스플린트R)에 의해 원형화되었다; (4) m⁶A 부위에 근접한 원형화된 DNA 프로브는 이어서 롤링 서클 증폭 (RCA, 수천개의 탠덤 반복부)에 의해 증폭되는 반면, 이들 근처의 비메틸화된 부위는 원형화에 필요한 m⁶A 결합제에 부착된 상보적 프라이머의 결여로 인해 증폭될 수 없었다; (5) 각각의 패드락 프로브는 유전자 정체 (>1000개 유전자)를 코딩하는 5-염기 또는 보다 긴 바코드 및 전사체 내의 m⁶A-부위 정체를 코딩하는 또 다른 1-염기 바코드를 함유하였다 (5 라운드의 서열분석은 전사체당 최대 20개의 부위를 허용하고; >99% m⁶A 변형된 유전자는 전사체당 <20개의 부위를 가짐); (6) 유전자 정체 및 m⁶A-부위 정체를 각각 6 라운드의 조합 SEDAL 서열분석 및 5 라운드의 순차적 SEDAL 서열분석에 의해 관독하였

다¹¹. 이러한 3D-m⁶A-seq의 결과는 유전자 정체, 3D 좌표, 및 m⁶A 피크의 수/위치에 의해 해석된 단일 RNA 분자의 집합이다. 이러한 데이터를 직접 가시화하고 분석하여 유전자 발현의 공간 분포를 세포하 해상도로 (DNA 염 플리콘의 크기 및 광학 한계 둘 다에 의존하여 대략 150-400 nm 공간 해상도로¹¹) 밝혀낼 수 있다. 세포하 염색 (예를 들어, 니슬 염색) 및 세포 분할 후, RNA는 각각의 세포에서 기인했을 수 있다. 이어서, 데이터를 동시 세포-유형 분류, 유전자 발현의 단일-세포 변이의 평가, 및 m⁶A 메틸화 상태에 대해 분석할 수 있다.

[0399]

이전의 연구는 (1) 활성화-조절된 유전자 (ARG) 및 시냅스 RNA가 m⁶A-변형되었고; (2) m⁶A 경로의 파괴가 신경 가소성 및 장기 기억의 형성을 손상시켰고; (3) 동물이 규정된 유형의 거동 (공포, 보상, 스트레스 등)과 연관됨에 따라 전반적인 m⁶A 존재비가 변화하였다는 증거에 기초하여 m⁶A와 신경 활성 사이에 강한 연관성을 확립하였다. 본원에 개시된 방법은 전반적인 신경 자극 동안 m⁶A의 시공간적 패턴을 세포하 해상에서 추가로 분석하는데 유용하다. 3D-m⁶A-seq는 신경 활성화의 분자-수준 조사를 위한 2가지의 가장 확립된 생물학적 시스템을 연구하는 데 적용될 수 있다: 1차 뉴런 세포 배양물의 염화칼륨 (KCl) 탈분극 및 마우스의 암/명 조건화 (도 8)¹¹. 전반적인 뉴런 자극에 반응한 m⁶A 에피트랜스크립토의 시공간적 역학 및 단일-세포 다양성을 추적하기 위해 자극 전 및 자극 후 일련의 시점에 샘플을 수집하여, 극초기 유전자 (IEG) 대 후기-반응 유전자 (LRG)에서의 m⁶A RNA의 분포를 평가할 수 있다.

[0400]

단일-세포 해석된 m⁶A 패턴을 수득한 후, 이러한 패턴을 형상화하는 유전자 조절 메커니즘을 추가로 정확하게 할 수 있다. 이러한 이슈를 다루기 위해 2가지 접근법이 사용될 수 있다: (1) 단백질이 발현 및 m⁶A 패턴에서의 변화와 연관된다는 가설을 생성하기 위한 m⁶A-관련 단백질 (메틸트랜스퍼라제, 데메틸라제, 및 결합 단백질)의 발현 수준과 함께 단일-세포 m⁶A 패턴의 통합 분석; (2) 어느 인자가 상이한 세포 유형에서 에피트랜스크립토 유전자 발현 조절에 영향을 미칠 수 있는지 결정하기 위한 세포-유형 특이적 유전자 교란 (녹다운 또는 과다발현) 실험.

[0401]

기존의 벌크 에피트랜스크립토 서열분석 방법은 수백만개의 세포를 투입 물질로서 필요로 하여, 단일-분자 화학량론, 단일-세포 감수성 및 공간 해상도가 결여되었다. RNA 변형의 현행 영상화 방법은 한 번에 단지 1개의 유전자만을 표적화할 수 있거나, 또는 유전자 정체를 구별하지 않으면서 합산으로서 모든 변형 부위를 검출할 수 있다. RNA 변형의 3D 계내 서열분석은 전례없는 해상도 및 정밀도로 에피트랜스크립토의 동시의, 고도로 멀티플렉스화된 맵핑: 무손상 생물학적 조직 내의 수천개의 유전자에 대한 3D 좌표에 의한 단일-분자 화학량론을 가능하게 한다.

[0402]

실시예 3: 단일-세포 에피트랜스크립토믹스의 3차원 계내 프로파일링

[0403]

트랜스크립토믹스는 상류 계층으로부터 하류 프로테오믹스로 정보를 전송하는 중추적 메커니즘으로서의 역할을 하여, 수많은 세포 과정을 조절한다. 최근 수년간, 단일-세포 RNA 서열분석 및 공간 트랜스크립토믹스 기술은 모든 종류의 생물학적 샘플의 트랜스크립토믹스를 성공적으로 맵핑하여, 다양한 시스템에서 복잡한 세포-대-세포 이질성을 밝혀내었다. 그러나, RNA 서열을 넘어서는 추가의 정보가 트랜스크립토믹스에 포매되어 있다. 즉, 에피트랜스크립토믹스로 불리는 이러한 추가의 정보는 mRNA 상의 화학적 변형, 예컨대 N⁶-메틸아데노신 (m⁶A), 및 mRNA 합성, 전위, 번역, 및 분해에 이르는 mRNA 수명 주기의 거의 모든 단계를 조절하는 데 있어서 중요한, 이들과 회합되는 RNA-결합 단백질 (RBP)을 포함한다. 에피트랜스크립토믹스의 공간적으로-해석된 단일-세포 프로파일을 아는 것은 mRNA가 상이한 세포 유형 및 상태에서 어떻게 조절되는지에 대한 보다 완전한 이해를 위해 중요하다. 또한, m⁶A의 세포하 분포, 및 패턴이 m⁶A의 조절 역할과 어떻게 연관되는지에 대해서는 거의 공지되어 있지 않다. 본 개시내용은 세포하 해상에서의 m⁶A의 3차원 (3D) 계내 프로파일링을 위한 최첨단 기술 플랫폼인 계내 m⁶A 맵핑 (m⁶A-맵)을 위한 방법을 기재한다. 이 방법은 m⁶A의 공간 분포에 대한 신선한 관점을 제공할 목적으로 세포하 수준에서 영상화-기반 단일-세포 설명을 생성하는 데 사용된다. 근본적인 연구 관점에서, 이 방법은 다른 RNA 변형, 그의 연관된 RBP, 및 그의 상호작용의 이해를 돕기 위해 일반화될 수 있다. 무손상 조직에 대한 m⁶A-맵의 적용은 또한 비정상적 m⁶A 수준과 관련된 질환 및 장애의 원인의 확인 및 발생의 이해를 용이하게 한다.

- [0404] 상이한 세포 상태 및 유형을 보다 잘 이해하기 위해, 트랜스크립톰 수준에서 이질성을 맵핑하기 위해 다양한 단일-세포 및 공간 트랜스크립톰 프로파일링 방법이 개발되었지만, 이들 도구는 이중 트랜스크립톰의 기저를 이루는 메커니즘을 밝히는 대신 단지 세포 상태만을 도시한다. 따라서, 에피게놈 및 에피트랜스크립톰은 이들이 mRNA 수명 주기의 모든 단계의 조절을 담당하는 핵산에 의해 운반되는 추가의 정보를 포함하기 때문에, 단일-세포 수준에서 공간 해상도에 의해 조사될 필요가 있다.
- [0405] 모든 에피트랜스크립톰 변형 중에서, m^6A 가 가장 풍부하고, mRNA에 대한 거의 틀림없이 가장 중요한 변형이며, 이는 mRNA 번역 효율, 안정성, 전위 및 스플라이싱을 조절하는 것으로 보고되어 있다 (도 9a). 더욱이, m^6A 는 또한 학습 및 기억, 암 진행, 및 신경변성을 포함한, 조직 수준에서의 많은 생물학적 과정에 연루된다. 따라서, 상이한 세포는 이중 m^6A 메틸롬을 나타내고, 그의 트랜스크립톰을 조절하기 위해 상이한 방식으로 m^6A 를 이용할 가능성이 있다.
- [0406] 그럼에도 불구하고, 에피트랜스크립톰 연구에서의 단일-세포 해상도의 결여는 생물학적 조직에서의 m^6A 패턴의 이질성을 모호하게 하였고, m^6A 가 상이한 세포 유형에 걸쳐 유전자 발현을 어떻게 조절하는지 분석하는 능력을 손상시켰다. 지금까지, 상이한 세포 유형 및 상태에서 mRNA가 m^6A 에 의해 어떻게 조절되는지 및 세포하 분포 패턴이 m^6A 의 조절 역할과 어떻게 연관되는지에 대해서는 거의 공지되어 있지 않았다 (도 9b). 예를 들어, 정확하게 세포-유형/상태-특이적 m^6A 메틸롬이 무엇인지, 동일한 세포 유형이 m^6A 메틸롬에 기초하여 과립상 하위유형으로 나뉠 수 있는지, m^6A -mRNA 및 비- m^6A -mRNA가 세포하 수준 및 조직 수준에서 상이한 국재화를 나타내는지, 이중 m^6A 가 상이한 세포 유형에서 RNA 생활 주기의 상이한 동역학에 어떻게 영향을 미치는지, 및 많은 다른 이러한 질문은 답을 찾지 못한 채로 남아있다 (도 9c).
- [0407] 이전에, m^6A 변형을 정성적으로 및 정량적으로 검출하기 위한 다양한 도구가 개발되었지만, 이들 중 어느 것도 고처리량 및 단일-세포, 단일-염기 및 공간 해상도를 동시에 제공하지 않았다. 본 개시내용은 이전 방법의 상향 언급된 한계를 극복하고 m^6A 메틸롬을 세포하 해상에서 해석하는 신규 방법인 m^6A -맵 (m^6A 의 단일-세포 계내 맵핑)을 기재한다 (도 9d).
- [0408] HeLa 세포에서의 방법 설계 및 개발 (m^6A -맵 v1)
- [0409] 먼저, 각각의 세트가 프라이머 및 5' 인산화된 고유하게 바코딩된 패드락 프로브를 포함하는 것인 2개의 세트의 3-부분 프로브를 각각의 추정 m^6A 부위 옆의 mRNA 영역에 계내 혼성화시켰다. 민감하고 특이적인 m^6A 검출을 달성하기 위해, m^6A 인식을 올리고뉴클레오타이드 프로브 (프로브 세트에서 제3 프로브)의 동원과 연결시켰다. 항체의 Fc 영역을 특이적으로 인식하는 키메라 단백질인 PAPG를 올리고에 접합시켰다 (도 10b). 올리고는 패드락 프로브의 계내 근접 라이게이션을 위한 스플린트 프로브로서의 역할을 한다. 이러한 방식으로, m^6A 를 갖는 부위만이 원형화된 그의 상응하는 패드락 프로브를 가질 것이다. 추가적으로, 자가형광 및 광학 산란을 극복하기 위해, 원형화된 패드락 프로브를 계내 볼링 서클 증폭 (RCA)을 사용하여 증폭시켰다. 다중 라운드의 서열분석 및 스트리핑 동안 앰플리콘의 위치를 보존하고 세포 구조를 안정화하기 위해, 아미노-알킬-dUTP를 RCA 반응에 첨가하여 증폭 생성물 (앰플리콘)이 1급 아민 기로 관능화되도록 하였고, 이는 추가로 메타크릴산 N-히드록시숙신이미드 에스테르 (MA-NHS)에 의해 아크릴로일화되었고 폴리아크릴아미드 히드로겔 네트워크에 포매되었다. 마지막으로, 패드락 프로브 상의 바코드를 계내 서열분석하여, 최대 수천개의 유전자까지 다중도를 달성하였다 (도 10a). 세포 배양물 및 조직 둘 다에서의 단일 m^6A 부위 (ACTB 및 MALAT1)의 검출은 비-특이적 IgG 대조군에 비해 항- m^6A 군에서의 15-30-배의 신호 풍부화에 의해 입증되었다 (도 10c 및 10e).
- [0410] 상기 기재된 작업흐름에서, PAPG는 2차 항체로 대체될 수 있다. 2차 항체는 예를 들어 사이트클릭 항체 표지 키트를 사용하여 올리고에 접합될 수 있다 (도 11a). m^6A -맵 v1을 토끼 2차 항체로 시험하였다 (도 11b). 항체-비의존성 비오틴화-YTH-스트렙타비딘-올리고 검출 스킴을 또한 시험하였다 (도 10d).
- [0411] 방법은 또한 여러 방식으로 최적화될 수 있다. 예를 들어: (1) 프로브의 최적 위치는 관심 m^6A 부위로부터 10

nt인 것으로 밝혀졌고; (2) 가양성인 rRNA m⁶A 부위로부터의 m⁶A 신호를 감소시키기 위해 m⁶A 부위를 함유하는 rRNA 서열에 혼성화할 수 있는 rRNA 차단 프로브를 혼성화 혼합물에 부가할 수 있고; (3) 혼성화 전에 mRNA를 히드로겔에 고정시킨 후 프로테아제 처리하는 것은 샘플 내의 보다 우수한 항체 확산을 가능하게 할 수 있다 (예를 들어, RNA와 우선적으로 반응하는 EDC를 사용하여 중합성 핸들을 RNA에 부착시킬 수 있음).

[0412] HeLa 세포에서의 방법 설계 및 개발 (m⁶A-맵 v2)

[0413] m⁶A-맵 v1은 오직 m⁶A-변형된 RNA만을 검출할 수 있지만 비메틸화된 RNA는 검출할 수 없으며, 하기 고려사항을 고려하면 메틸화된 RNA 및 비메틸화된 RNA 둘 다를 동시에 검출하는 것은 매우 가치가 있다: (1) 마커 유전자 발현을 사용한 세포 상태 또는 세포 유형의 분류; (2) 특정 유전자로부터의 보다 높은 m⁶A 신호가 보다 높은 발현 수준으로 인한 것인지 또는 보다 높은 m⁶A 분율로 인한 것인지 구별하기 위한 m⁶A 화학량론의 추정; (3) 메틸화된 RNA 및 비메틸화된 RNA의 차등 국제화 사이의 비교; 및 (4) 다른 계내 서열분석 데이터와의 통합. 이러한 이슈를 다루기 위해 업데이트된 방법, m⁶A-맵 v2를 고안하였다. 제2 혼성화 전의 단계는 m⁶A-맵 v1과 동일하다. 제1 RCA 후에, STAR맵 프로브를 사용하여 제2 혼성화를 수행하며, 이는 비-m⁶A RNA의 검출을 가능하게 하고, 이어서 라이게이션 및 제2 RCA가 이어진다 (도 12a). RNA에 부착된 DNA 앰플리콘이 이미 존재하는 경우에, 제1 DNA 앰플리콘이 이용가능한 공간의 대부분을 차지하였기 때문에 제2 RCA는 발생할 수 없을 것이다 (도 12b). 이에 의해 m⁶A 및 비-m⁶A RNA 둘 다는 개별적으로 정량화될 수 있고, m⁶A RNA의 분율이 계산될 수 있다. 세포 배양물 중 단일 m⁶A 부위 (ACTB 및 MALAT1)에서의 m⁶A 분율의 정량화가 입증되었다 (도 12c 및 12d). 상이한 세포 주기 기에서의 m⁶A 분율은 실제로 상이하였고, m⁶A RNA 및 비-m⁶A RNA는 별개의 세포하 국제화를 나타내었다.

[0414] HeLa 세포에서의 방법 설계 및 개발 (RBP-RNA 맵핑)

[0415] 대부분의 mRNA 변형이 다양한 RBP의 차등 결합을 통해 그의 기능을 달성하기 때문에, m⁶A 외에 RBP-RNA 상호작용은 에피트랜스크립토의 또 다른 중요한 측면이다. 다수의 단일-세포 RBP-RNA 인터랙툼 맵핑 방법이 개발되었지만, 이들 방법은 리보솜-mRNA 상호작용을 특이적으로 검출하기 위해 맞춤형되거나 또는 외인성 유전자 구축물의 형질감염을 필요로 한다. 또한, 이는 세포의 공간적 위치 및 RBP-RNA 상호작용의 세포하 위치를 보존할 수 없다.

[0416] 또한, m⁶A는 때때로 상황에 따라 모순되는 기능을 갖고, 주요 이유는 완전히 상이한 하류 경로를 촉발하는 상이한 관독기 RBP에 의해 결합될 수 있기 때문이다. 멀티플렉스화 검출 방법은 해석을 위해 이상적일 것이다. 따라서, 올리고-접합된 항체의 정보를 패드락 프로브에 전달한 후, 전달된 바코드 정보를 계내 서열분석하는 것을 포함하는 계내 멀티플렉스화 RBP-RNA 맵핑 기술을 개발하였다 (도 13a). 단일 RBP-RNA 맵핑의 실현가능성은 이미 입증되었고 (도 13b), 다음 단계는 이러한 방법을 멀티플렉스화하는 것이다 (도 13c). 이러한 방법은 에피트랜스크립토 및 RBP-RNA 상호작용이 세포-상태/유형-특이적 트랜스크립토 조절 및 조직 기능에 어떻게 기여하는지 결정하는 데 유용하다.

[0417] 개념 증명 연구로서 HeLa 세포에서의 100-유전자 검출

[0418] m⁶A-맵이 다수의 m⁶A 부위를 고처리량 방식으로 동시에 검출할 수 있음을 추가로 입증하기 위해, 형광 유비쿼틴화-기반 세포 주기 지시자 (FUCCI) HeLa 세포 상에서 100-유전자 검출을 수행하였다. 공간 트랜스크립토 프로파일링 (STAR맵) 및 m⁶A-맵 v1을 동시에 수행하였다. 상이한 판매업체로부터의 항체를, 최고 검출 효율을 갖는 것을 선택하기 위해 시험하였다. 핵은 DAPI로 염색하고, 세포체는 플라밍고(Flamingo)로 염색하고, 내형질 세포망 (ER)은 콘카나발린 A로 염색하였고, 이는 3종의 중간 정도로 발현된 하우스키핑 유전자 (HMBS, MRPL19, 및 PGK1)에 대한 프로브의 시각화를 가능하게 하였다. IgG 대조군에 비해 일관된 항-m⁶A 신호 풍부화가 관찰되었고 (도 14), 방법 최적화에서 달성된 신호-대-잡음 비 (SNR)가 추가로 검증되었다.

[0419] m⁶A-맵 v1 100-유전자 데이터셋으로부터의 발견

[0420] m⁶A-맵 v1의 계내 서열분석 데이터 및 FUCCI 영상화 데이터를 디컨볼루션, 스팟 발견, 관독물 배정, 세포 및 세

포하 분할, 정렬, 필터링, 및 정규화에 의해 사전프로세싱하였다. m^6A -맵의 관독물의 수는 STAR맵에서의 것보다 더 낮았다 (도 15a 및 15c). 인비트로젠 RM362 항- m^6A 항체는 최상의 신호-대-잡음 비 (SNR)를 달성하였고, 대부분의 유전자에 대해 SNR 25에 도달하였다 (도 15b). 2종의 항- m^6A 항체 사이에서, 측정된 m^6A 화학량론 (m^6A -맵에서의 관독물 / STAR맵에서의 관독물)의 상관관계는 잘 상관되었으며, 이는 방법의 강건성을 입증한다 (도 15d). 상이한 유전자의 m^6A 화학량론은 그의 발현 수준과 약간 음의 상관관계를 가졌고, 이는 m^6A 가 주로 mRNA 붕괴를 촉진한다는 것을 나타낸다 (도 15e). 방법은 상대 m^6A 화학량론을 반-정량적으로 추정하는 데 사용될 수 있으며, 이는 일부 대표적인 유전자에 대한 문헌-보고된 화학량론과 양의 상관관계를 나타낸다 (도 15f 및 15h).

[0421] m^6A 생물학을 벤치마킹하고 그에 대한 보다 많은 생물학적 통찰을 획득하기 위해, m^6A vs. 비- m^6A mRNA의 세포하 분포 패턴을 분석하였다. 보다 많은 m^6A 축적을 갖는 mRNA는 세포하에 보다 용이하게 국제화되는 경향이 있는 것으로 밝혀졌으며, 이는 m^6A 의 생물학적 기능이 핵 유출을 촉진한다는 것을 확인시켜 준다 (도 16a). m^6A 축적에 의해 강하게 영향을 받는 유전자는 번역과 관련된 많은 유전자, 예컨대 EEF2, SRP19, 및 MRPL20을 포함하며, 이는 m^6A 가 번역-관련 단백질의 효율적인 생산에 중요할 수 있음을 나타낸다. YTHDC1-표적화 mRNA는 핵 유출을 위해 m^6A 에 대해 보다 높은 의존성을 나타낼 수 있다.

[0422] 세포-주기 분석을 또한 데이터세트 상에서 수행하였다. FUCCI 형광 강도를 각각의 세포에 대해 정량화하여 상이한 세포의 세포 주기 기를 결정하였다 (도 16b). m^6A 화학량론을 각각의 유전자에 대해 상이한 세포 주기 기에서 계산하였다. 많은 유전자가 세포-주기 의존성 m^6A 변동을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 전사 조절과 관련된 유전자인 SMAD3은 G1 및 S에서 보다 높은 m^6A 화학량론을 갖지만 G2M에서는 보다 낮은 것으로 나타났고, 이는 문헌에서의 결과와 일치하였다 (Fei, Q. et al., YTHDF2 promotes mitotic entry and is regulated by cell cycle mediators. PLoS Biol 18, e3000664 (2020)). 또한, SON을 비롯한 다른 유전자도 S 및 G1에서 보다 높은 m^6A 화학량론을 갖지만 G2M에서는 보다 낮았고, 한편 일부, 예컨대 MALAT1은 G2M 및 G1에서 보다 높은 m^6A 화학량론을 갖지만 S에서는 보다 낮은 것으로 밝혀졌다.

[0423] 논의

[0424] 요약하면, 수백 또는 수천개의 m^6A 유전자좌를 단일 세포에서 세포하 해상으로 측정하고 각각의 유전자좌에 대한 상대 화학량론을 반-정량적 방식으로 추정하는 데 사용될 수 있는 신규 전략, m^6A -맵을 개발하였다. m^6A -맵은 상이한 에피트랜스크립톰 상태가 RNA의 세포하 국제화에 영향을 미치는지, 에피트랜스크립톰이 세포-대-세포 이질성을 어떻게 나타내는지, 및 m^6A 수준이 상이한 세포 주기 기에서 변동하는지와 같은, 에피트랜스크립톰과 관련된 신규한 생물학적 통찰을 발견하는 데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 방법은 세포 배양 및 조직 샘플에 대해 계내 m^6A 생물학을 연구하기 위한 다목적 도구이다.

[0425] 참고문헌

1. Zhu, C., Preissl, S. & Ren, B. *Nat Methods* 17, 11–14 (2020).
2. Wang X., Allen W., Wright M., Sylwestrak E., Samusik N., Vesuna S., Evans K., Liu C., Ramakrishnan C., Liu J., Nolan G.P., Bava F.A., Deisseroth K. *Science* (2018).
3. Roundtree, I.A. *et al.* Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. *Cell* 169, 1187 (2017).
4. Jonkhout, N. *et al.* The RNA modification landscape in human disease. *RNA* 23, 1754 (2017).
5. Li, X. *et al.* Epitranscriptome sequencing technologies: decoding RNA modifications. *Nature Methods* 14, 23 (2017).
6. Widagdo, J. *et al.* The m⁶A-epitranscriptomic signature in neurobiology: from neurodevelopment to brain plasticity. *Journal of Neurochemistry* 147, 137 (2018).
7. Chen, K. H. *et al.* Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* 348, 6090 (2015).
8. Shah, S. *et al.* seqFISH accurately detects transcripts in single cells and reveals robust spatial organization in the hippocampus. *Neuron* 94, 752 (2017).
9. Ke, R. *et al.* *In situ* sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells. *Nature Methods* 10, 857 (2013).
10. Lee, J. H. *et al.* Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*. *Science* 343, 1360 (2014).
11. Wang, X. *et al.* Three-dimensional intact-tissue sequencing of single-cell transcriptional states. *Science* 361, eaat5691 (2018).
12. Wang, X. *et al.* N⁶-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* 505, 117 (2014).
13. Wang, X. *et al.* N⁶-methyladenosine modulates messenger RNA translation Efficiency. *Cell* 161, 1388 (2015).
14. Zhao, B.S. *et al.* m⁶A-dependent maternal mRNA clearance facilitates zebrafish maternal-to-zygotic transition. *Nature* 542, 475 (2017).

[0426]

15. Dominissini, D. *et al.* The topology of the human and mouse m⁶A RNA methylomes revealed by m⁶A-seq. *Nature* 485, 201 (2012).
16. Meyer, K. D. *et al.* Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3'UTRs and near stop codons. *Cell* 149, 1635 (2012).
17. McGuinness, D.H. *et al.* m⁶A RNA methylation: the implications for health and disease. *Journal of Cancer Science and Clinical Oncology* 105 (2014).
18. Fishell, G. & Heintz, N. The neuron identity problem: form meets function. *Neuron* 80, 602 (2013).
19. Hess, M.E. *et al.* The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nature Neuroscience* 16, 1042 (2013).
20. Chen, F. *et al.* Expansion Microscopy. *Science* 347, 543 (2015).
21. Cox, D.B.T. *et al.* RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 358, 1019 (2017).
22. Liu, N. *et al.* Probing N⁶-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long non-coding RNA. *RNA* 19, 1848 (2013).
23. Engel, M. *et al.* The Role of m⁶A/m-RNA Methylation in Stress Response Regulation. *Neuron* 99, 389 (2018).

[0427]

[0428] 참조로서 포함됨

[0429]

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.

[0430] 등가물 및 범주

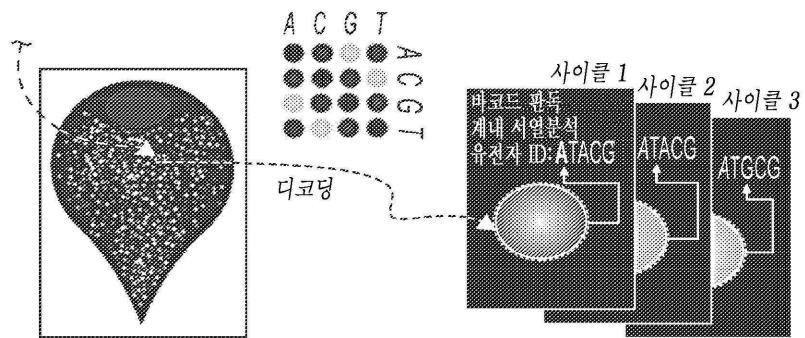
[0431] 단수형태는 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원들 사이에 "또는"을 포함하는 실시양태 또는 기제는 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 군 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정 에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 그와 관련되는 경우에 충족된 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 사용되거나, 또는 달리 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.

[0432] 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, 중점이 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 구체적인 값 또는 하위범위를, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 범위의 하한치 단위의 1/10까지 가정할 수 있다.

[0433] 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.

[0434] 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.

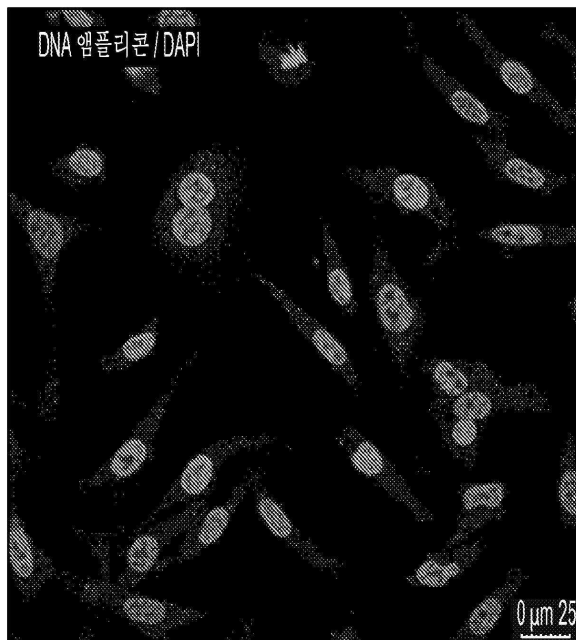
도면1ii



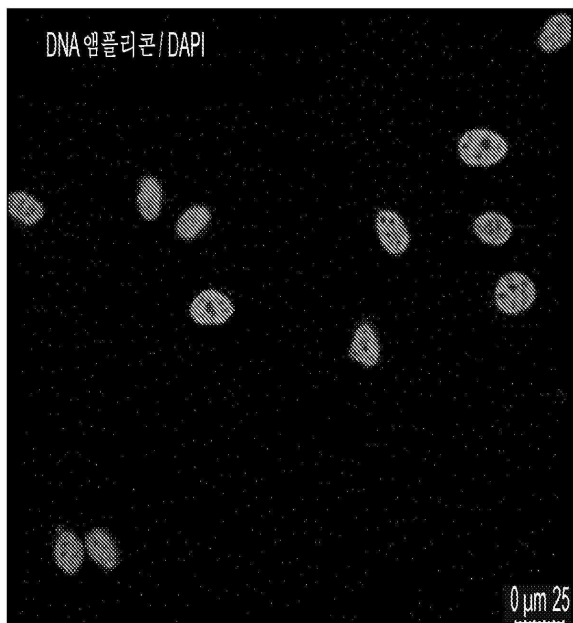
도면2a



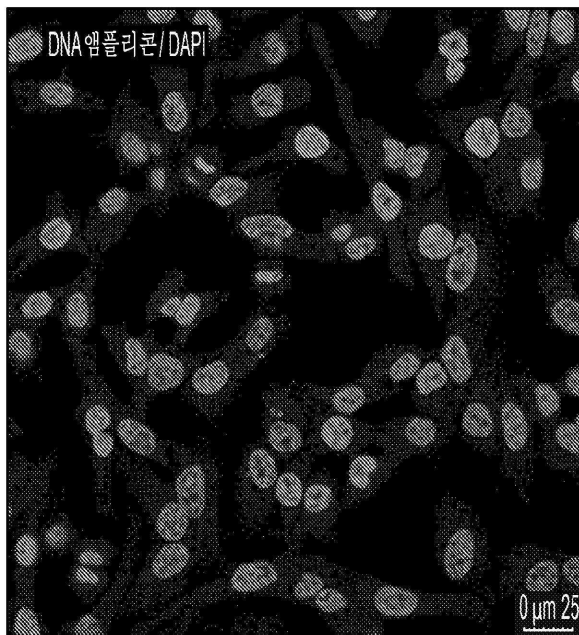
도면2b



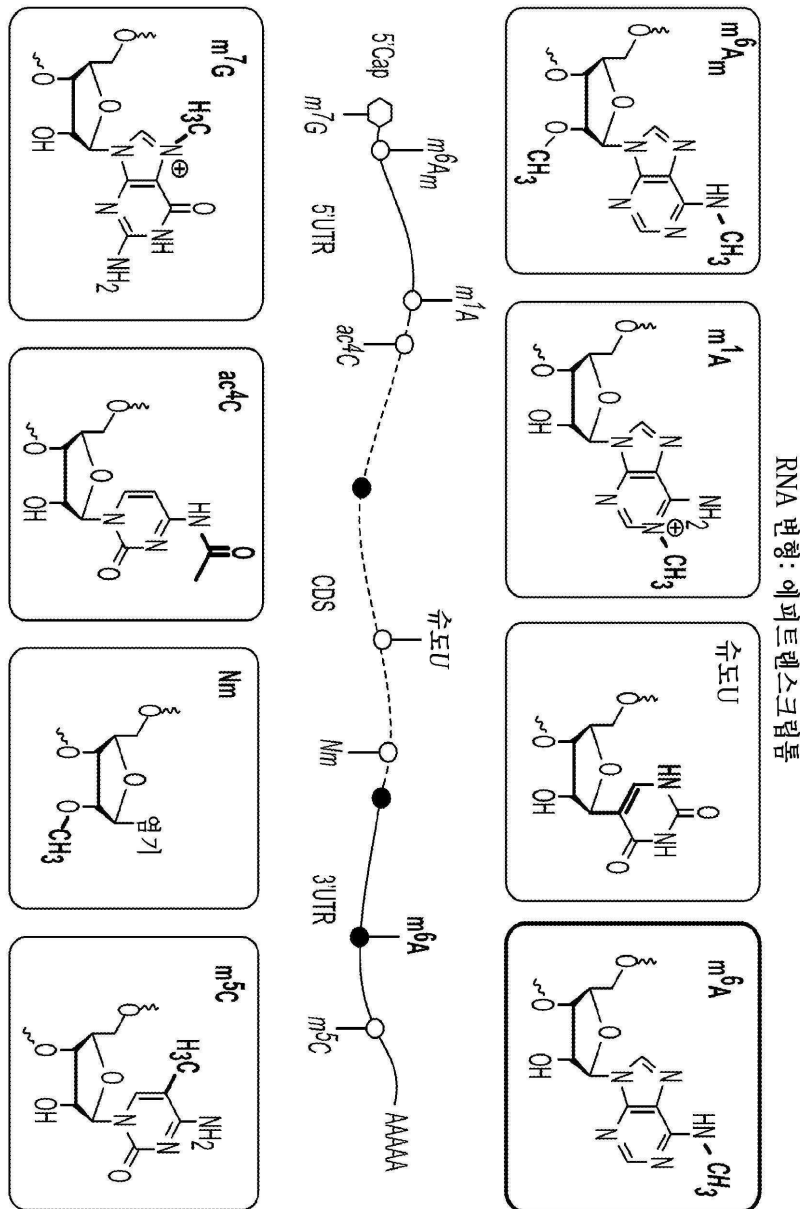
도면2c



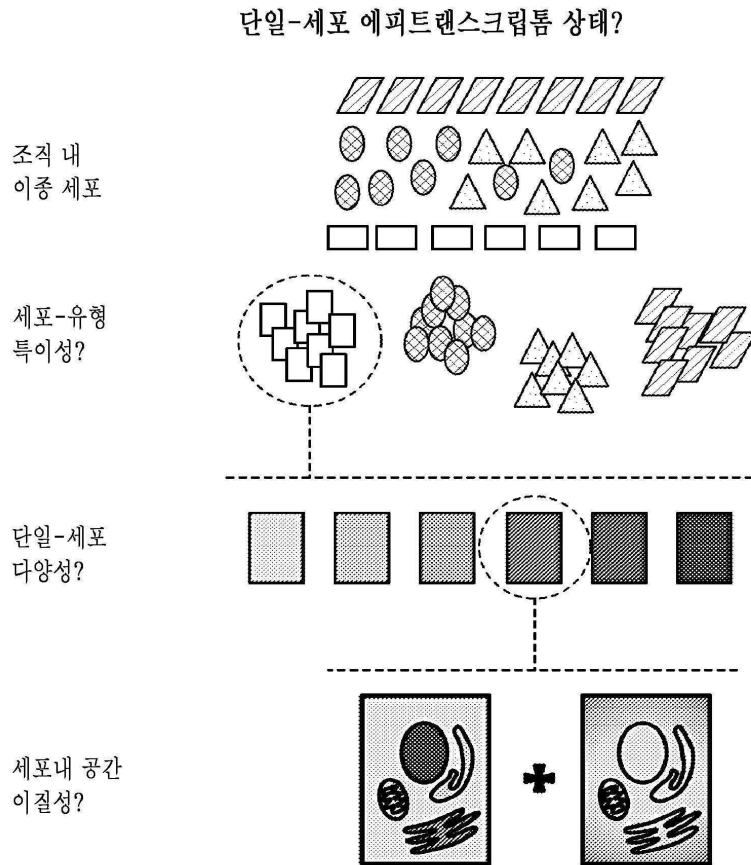
도면2d



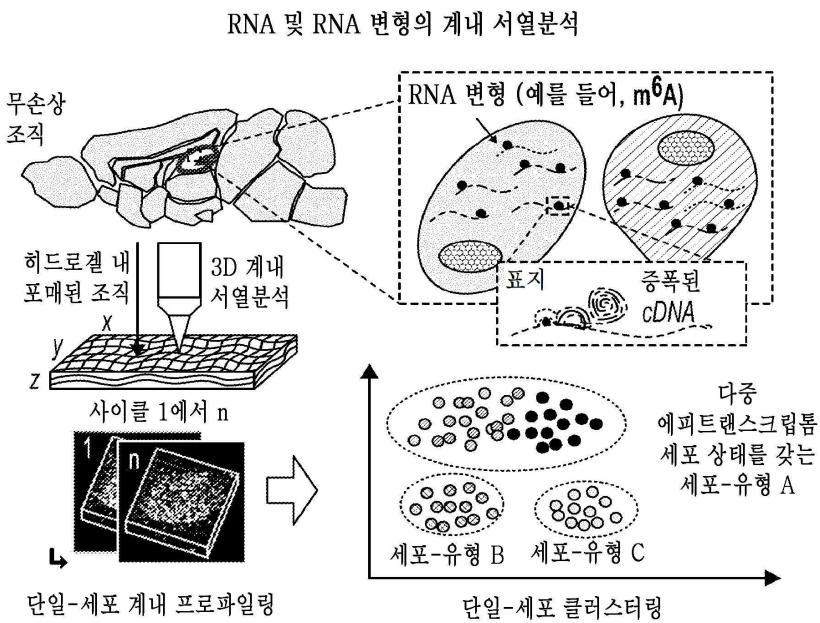
도면3a



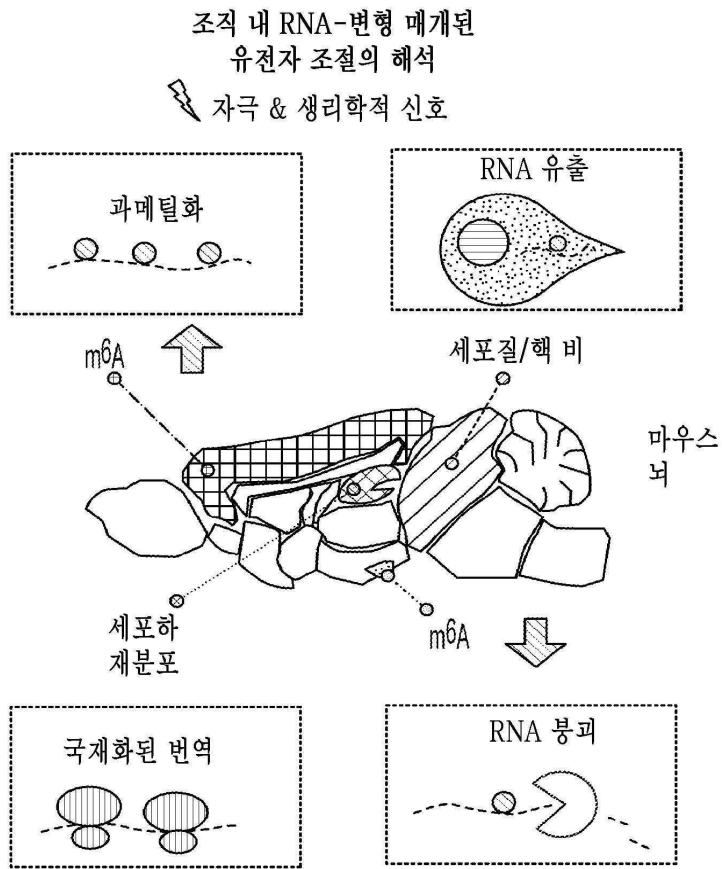
도면3b



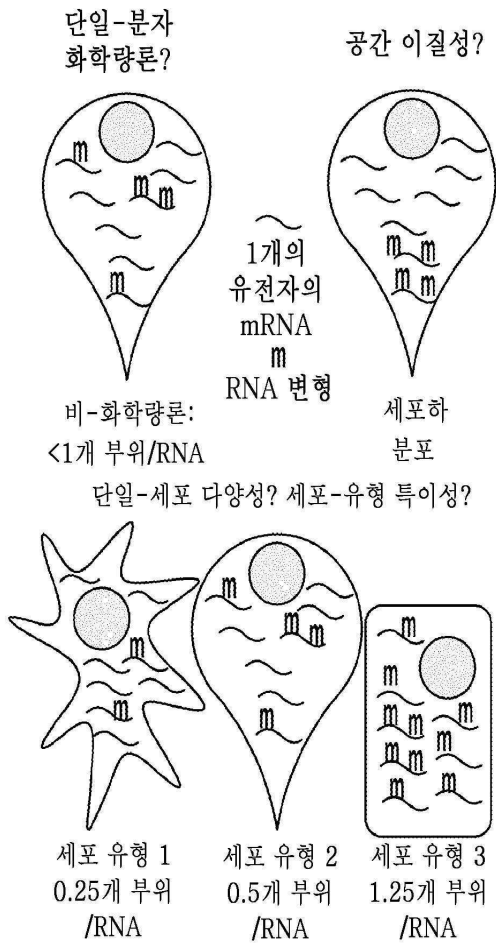
도면3c



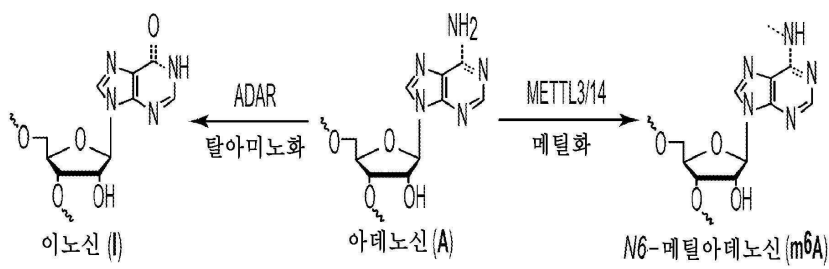
도면3d



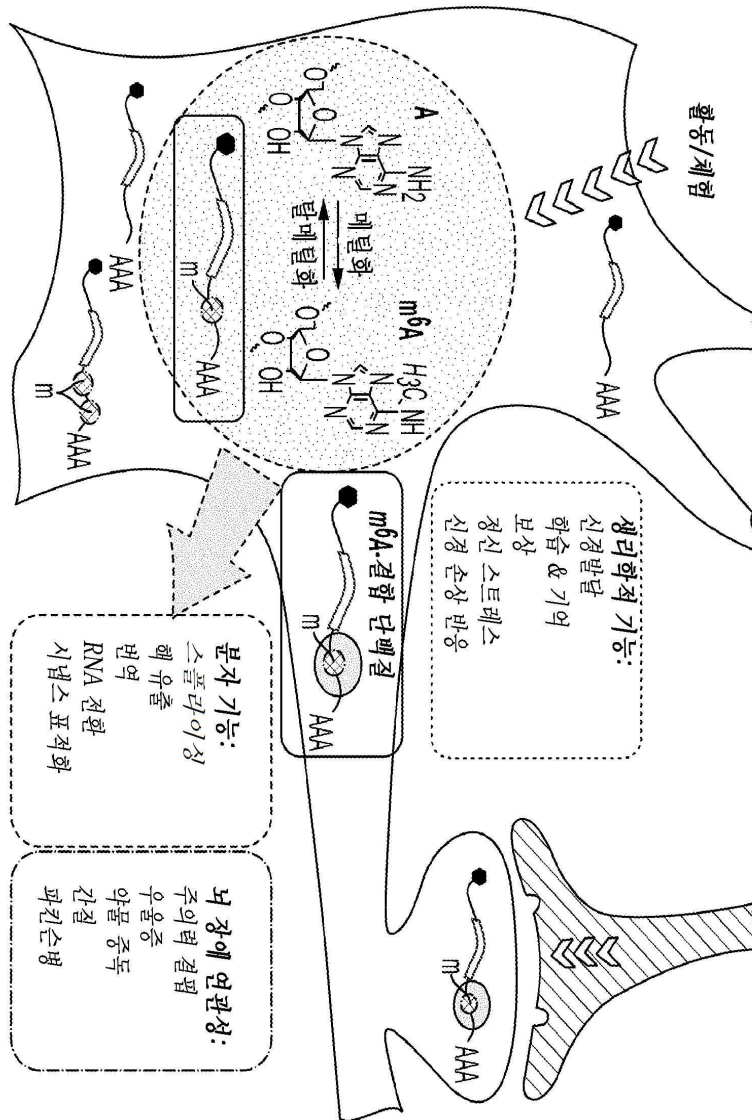
도면4



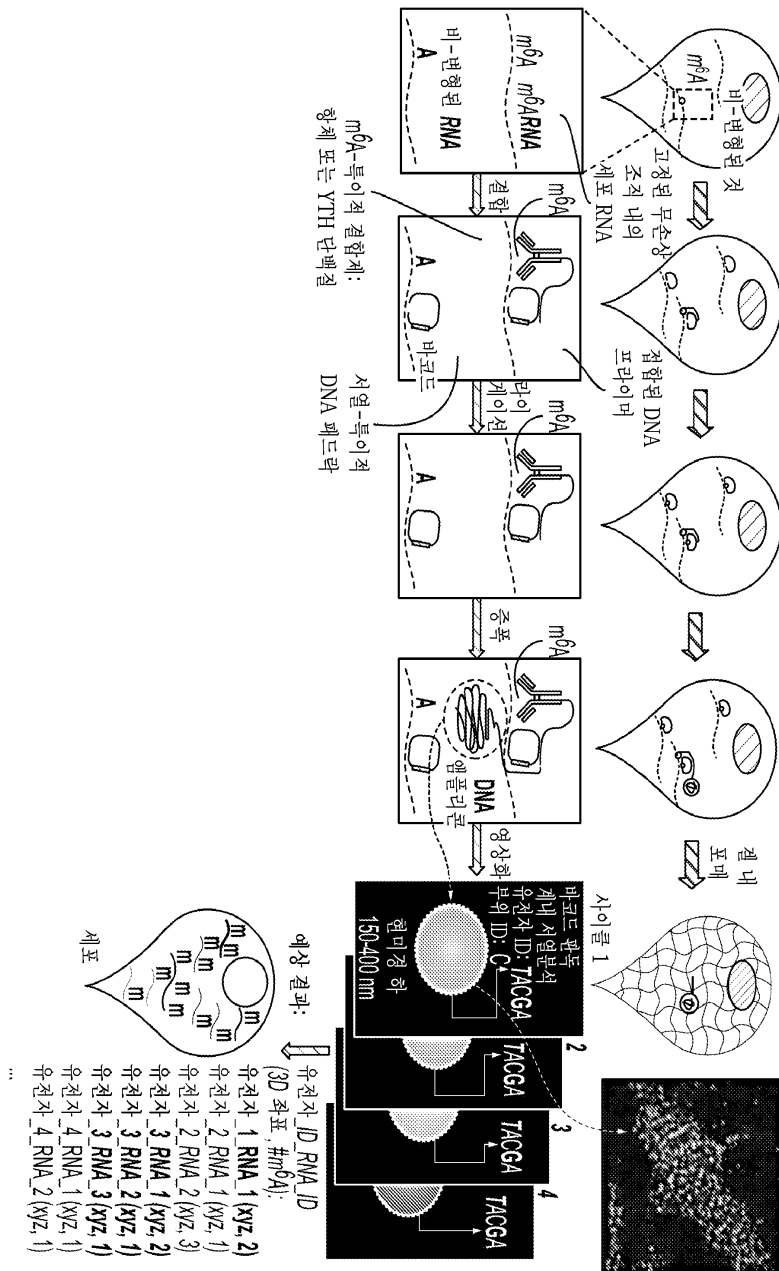
도면5



도면6

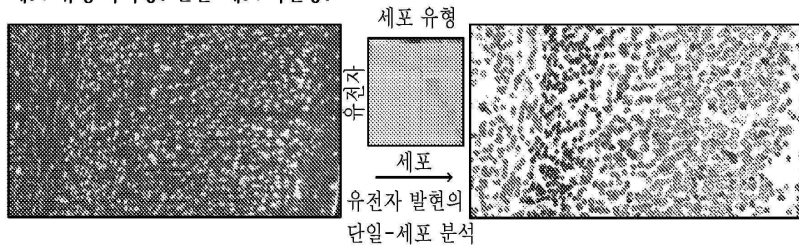


도면7



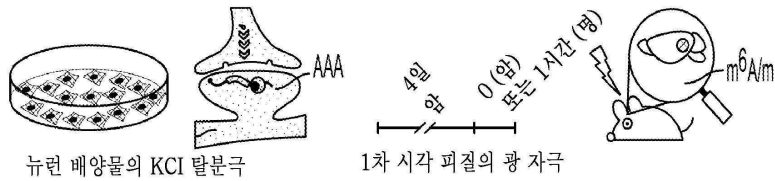
도면8

공간적 에피트랜스크립토미 세포 아틀라스:
세포-유형 특이성? 단일-세포 이질성?



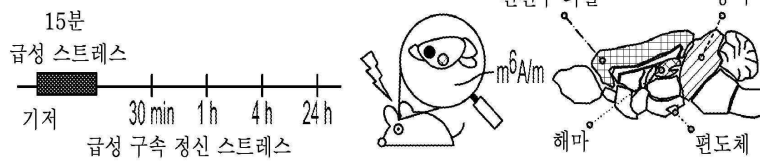
전반적 자극:

활성-조절 유전자 (ARG)의 역학? 세포하 재분포?



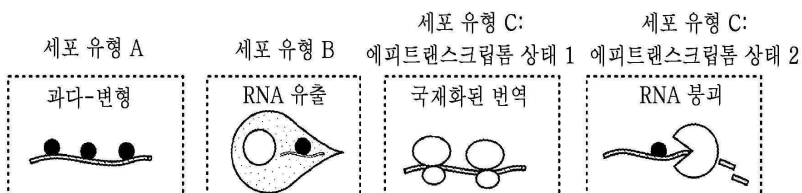
특정 경험:

신경-회로 특이성? 세포-유형 특이성?

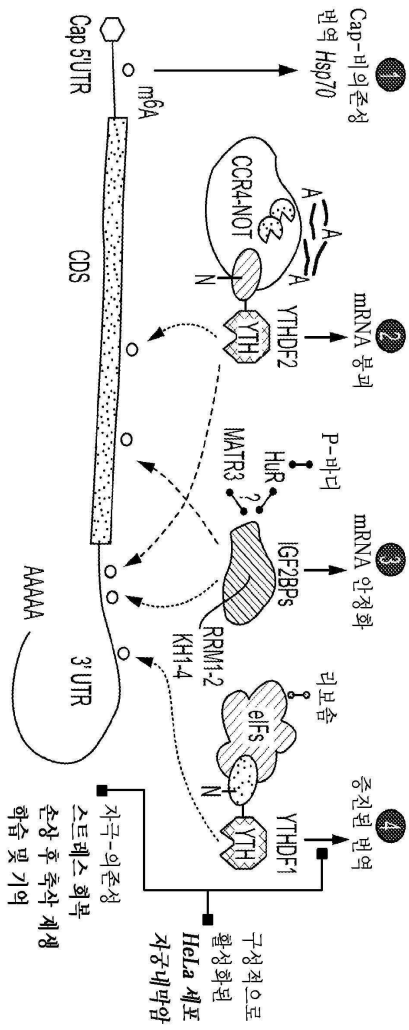
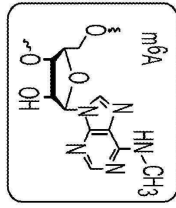


단일-세포 에피트랜스크립토미 패턴으로부터 유전자 조절 메커니즘까지:

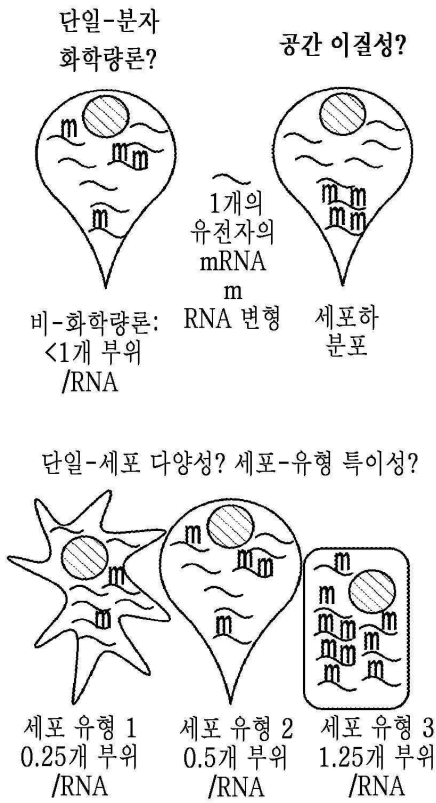
RNA 유출, 번역, 또는 안정성? 어떤 인자에 의해 매개되나?



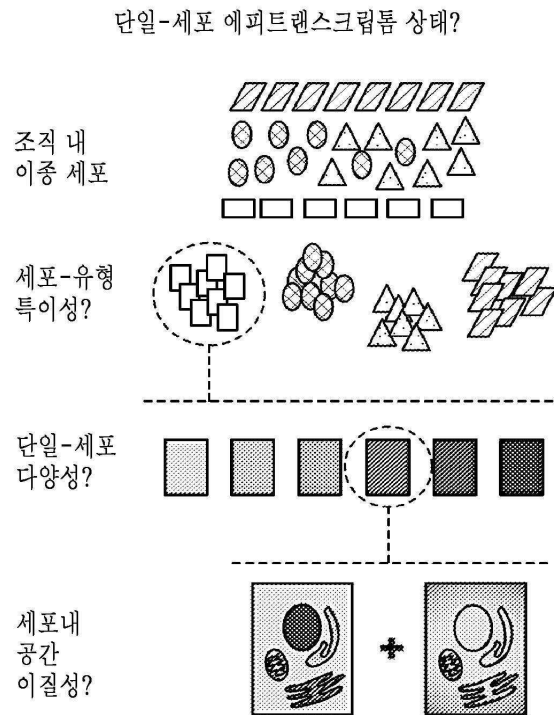
도면 9a



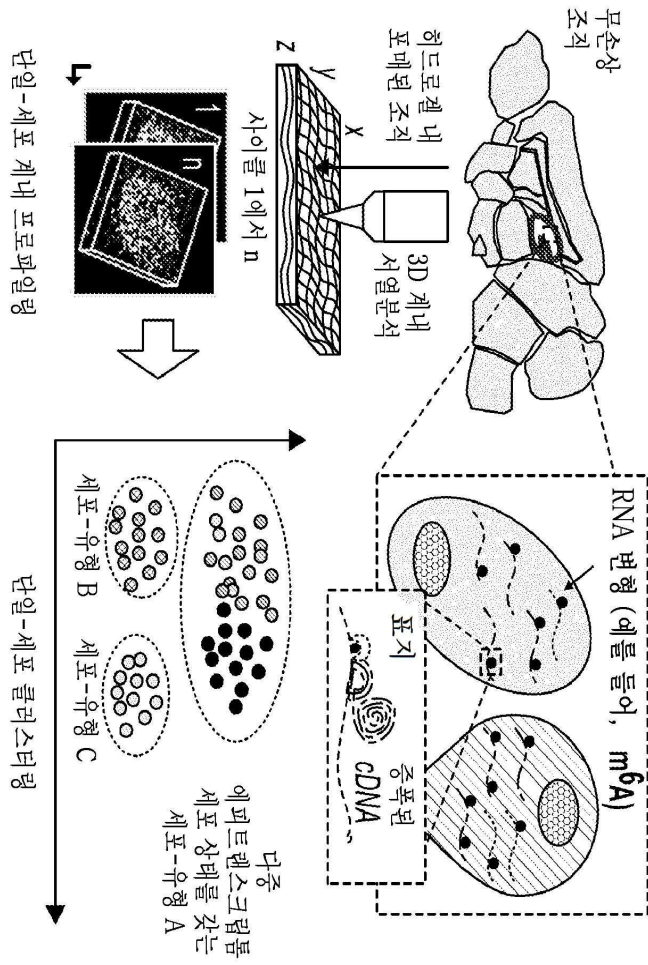
도면9b



도면9c

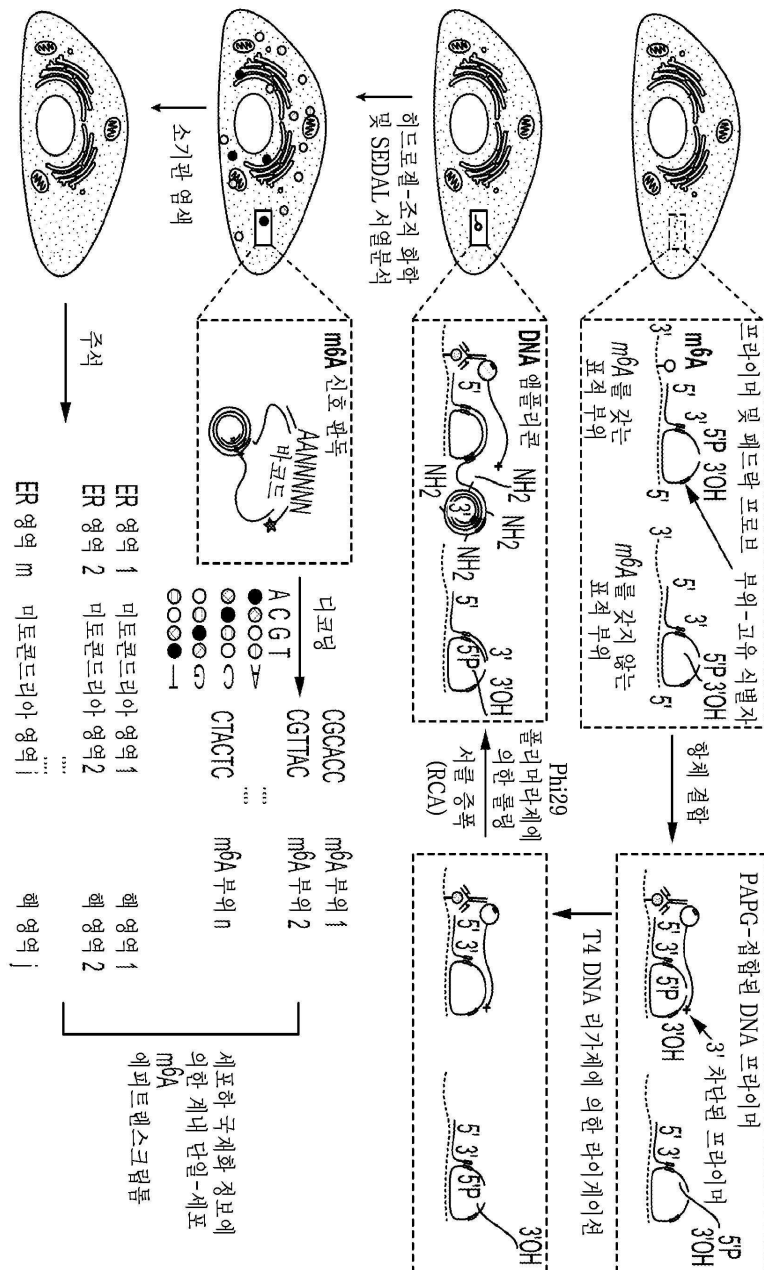


RNA 및 RNA 변형의 계내 서열분석

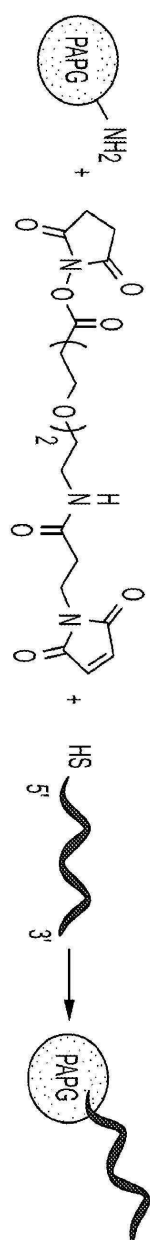


도면9d

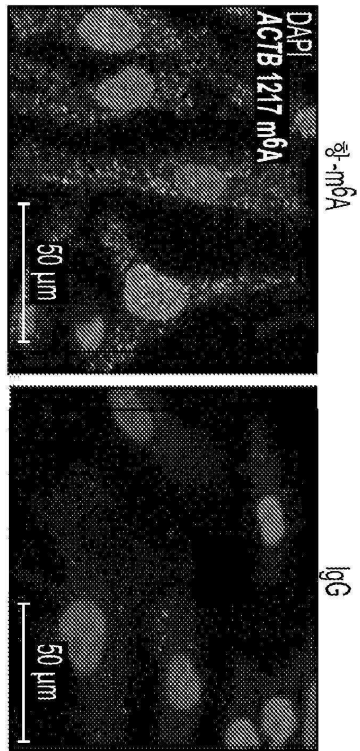
도면10a



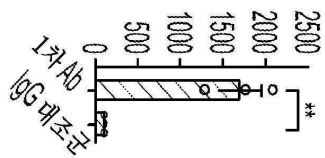
도면10b



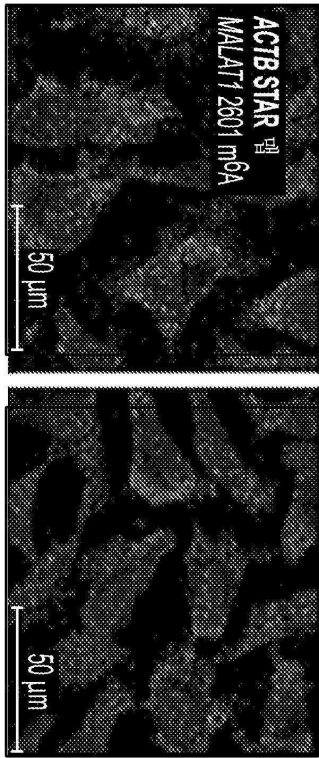
도면10c



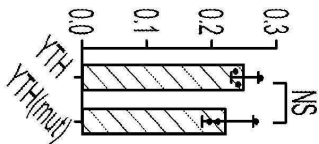
세포당 평균 m6A 강도 (A.U.)



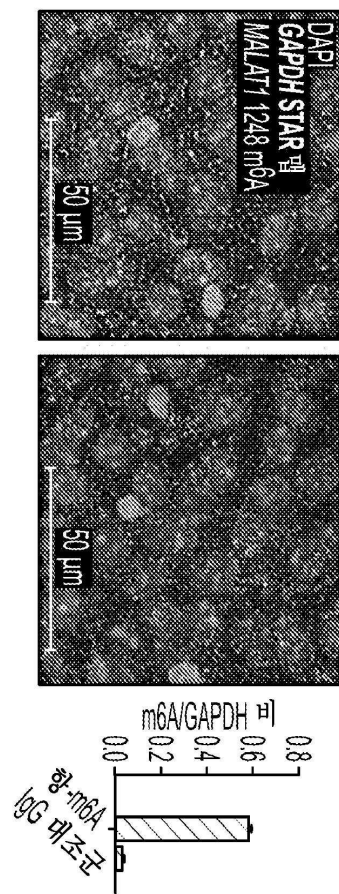
도면10d



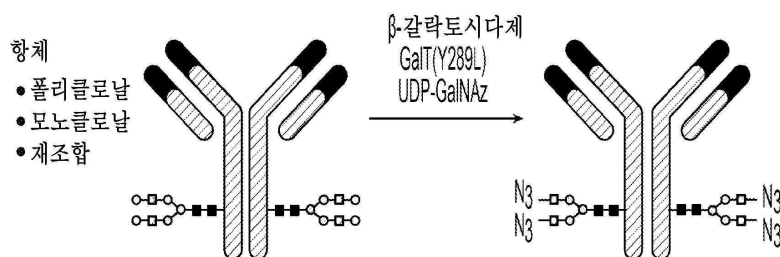
세포당 평균 m6A 강도(A.U.)



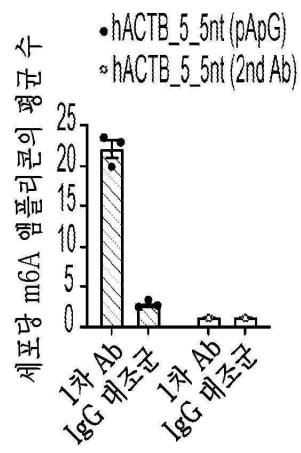
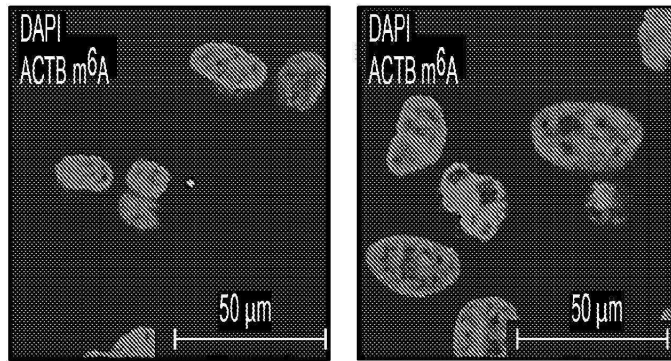
도면10e



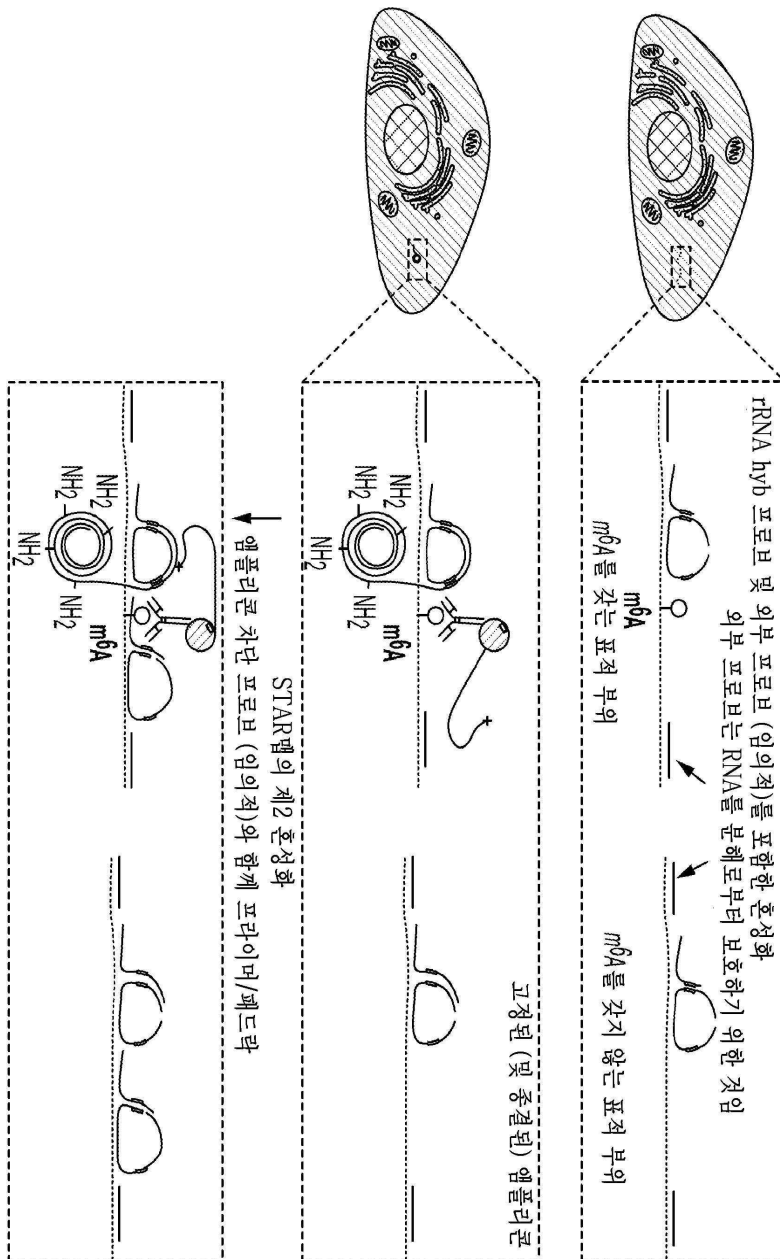
도면11a



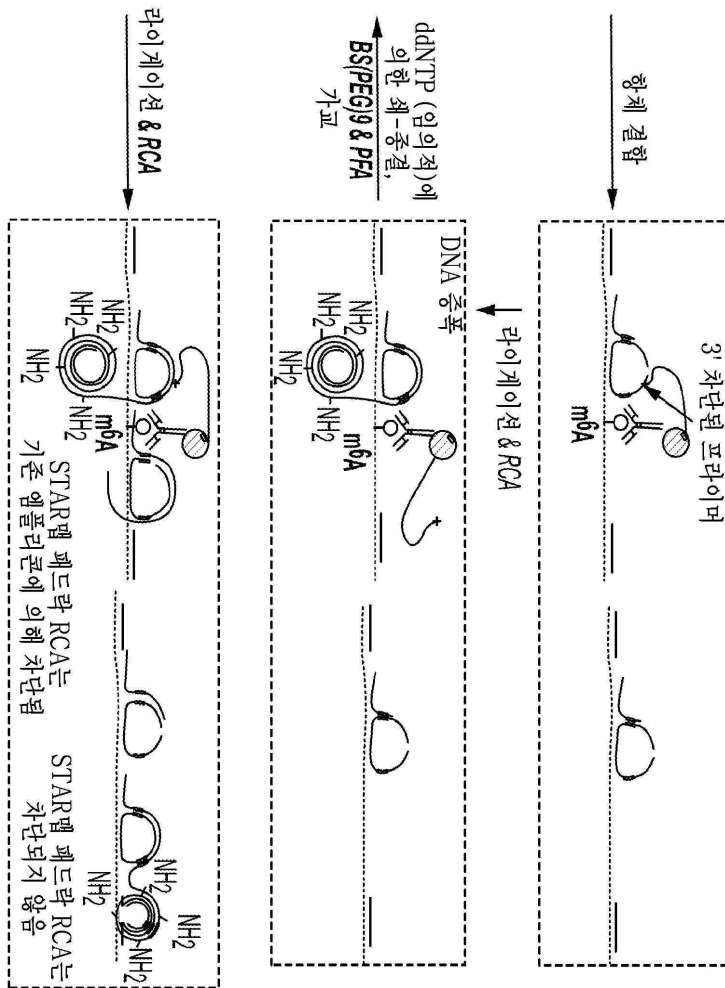
도면11b



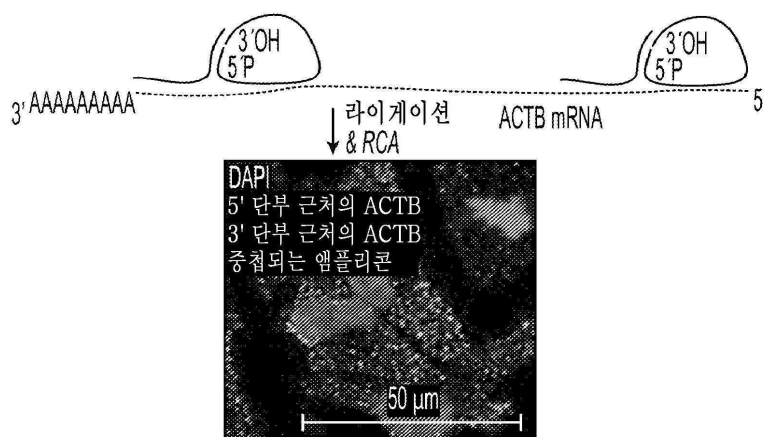
도면12ai



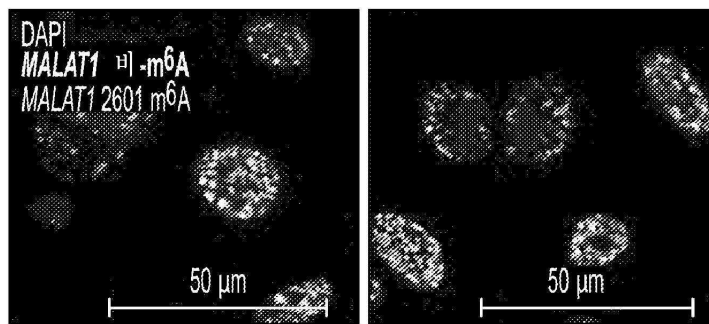
도면12aii



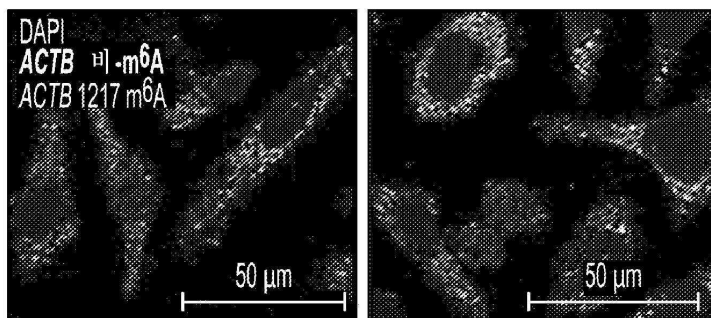
도면12b



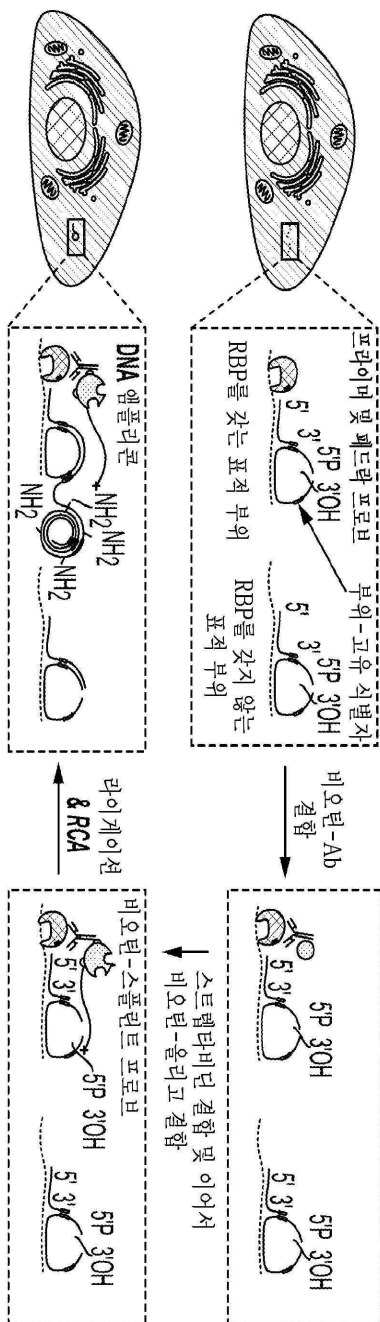
도면12c



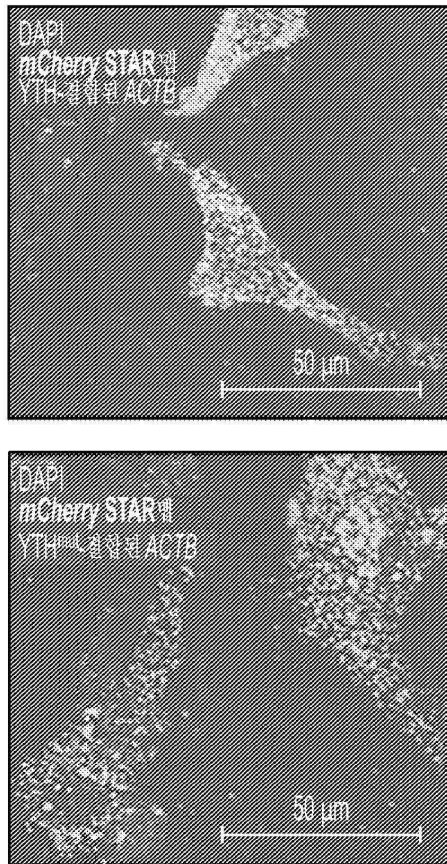
도면12d



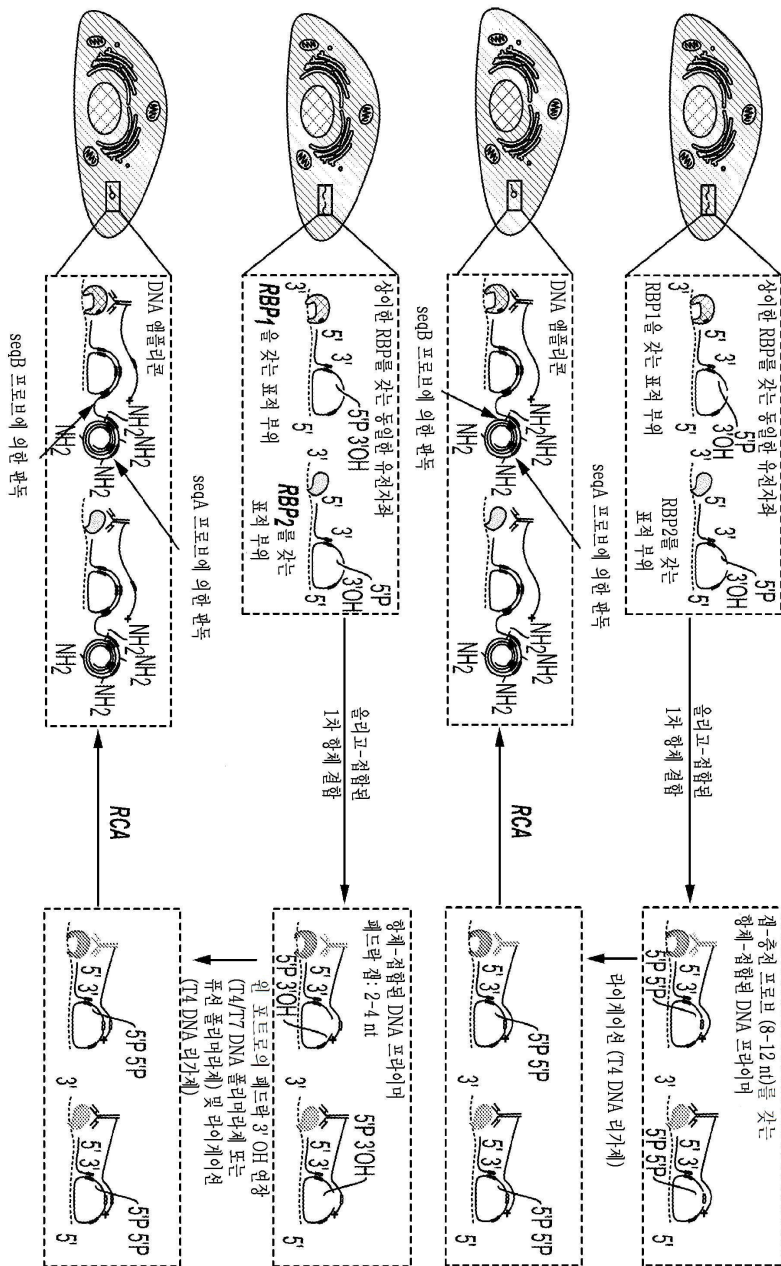
도면 13a



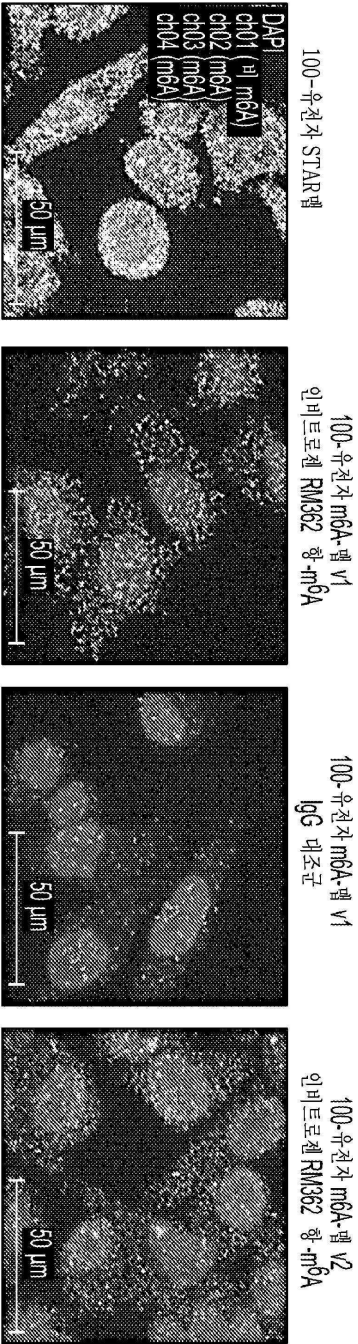
도면 13b



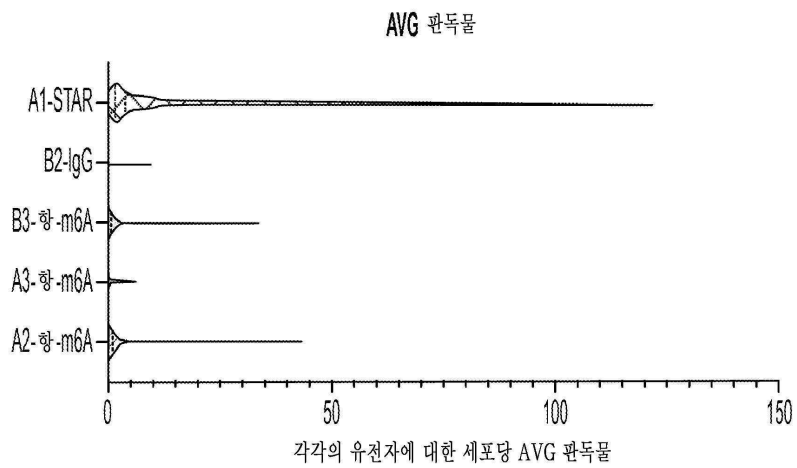
도면 13c



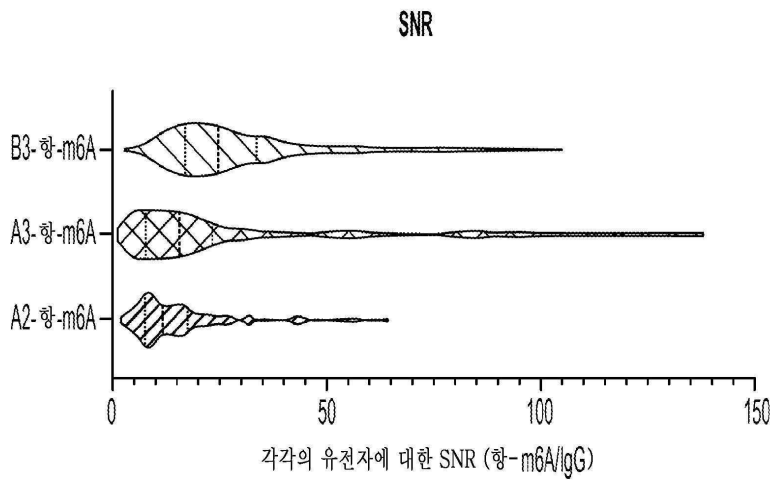
도면14



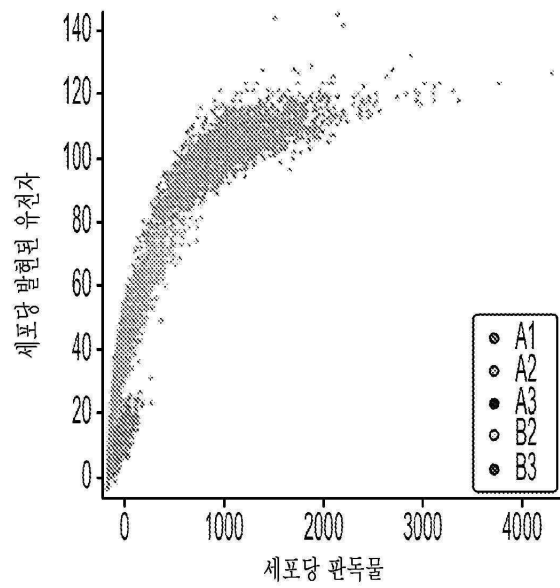
도면 15a



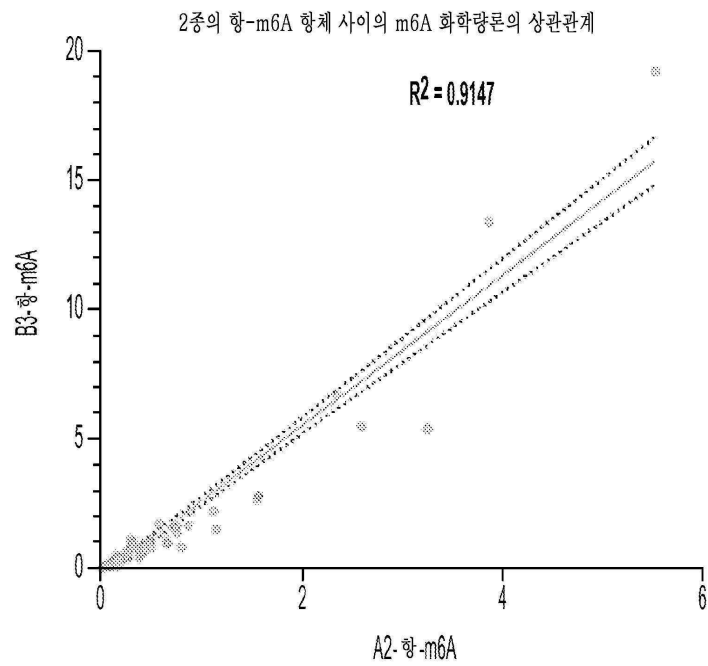
도면 15b



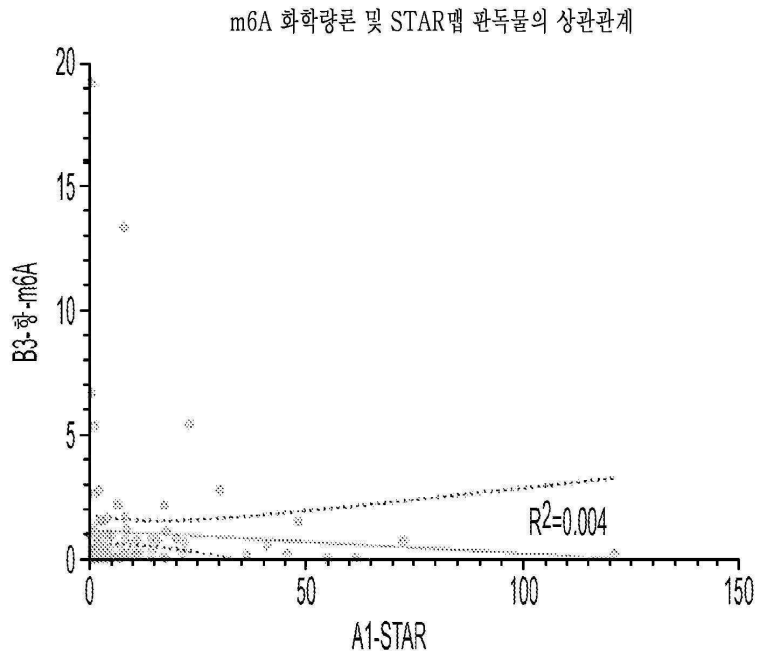
도면15c



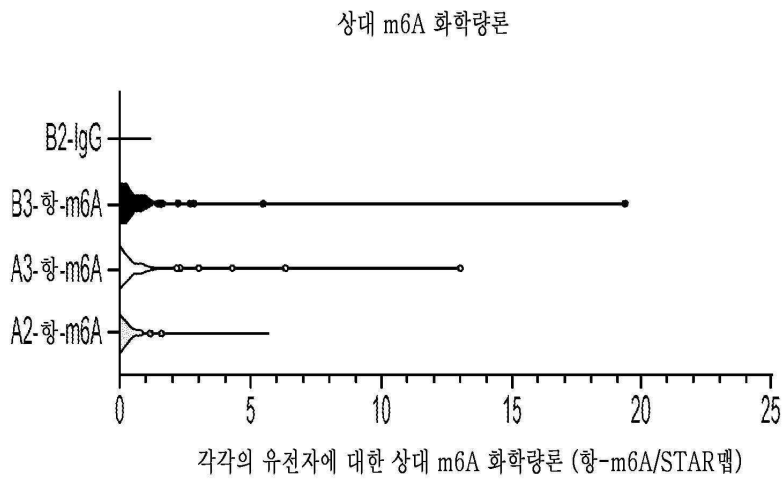
도면15d



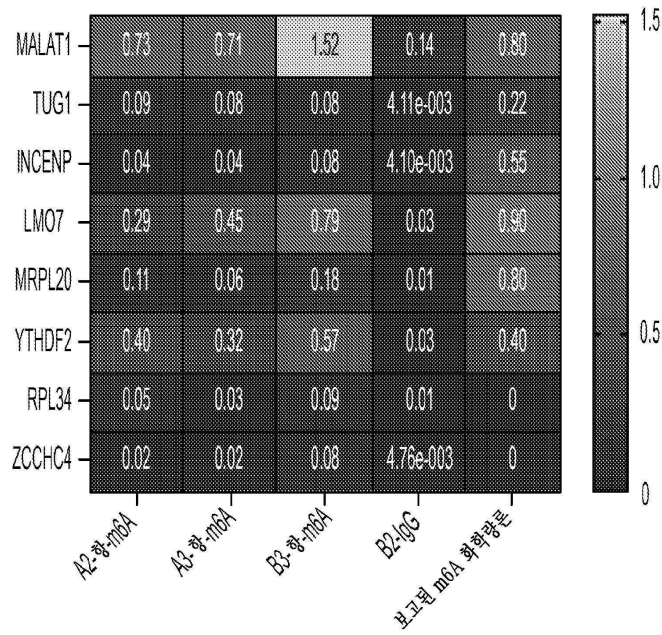
도면15e



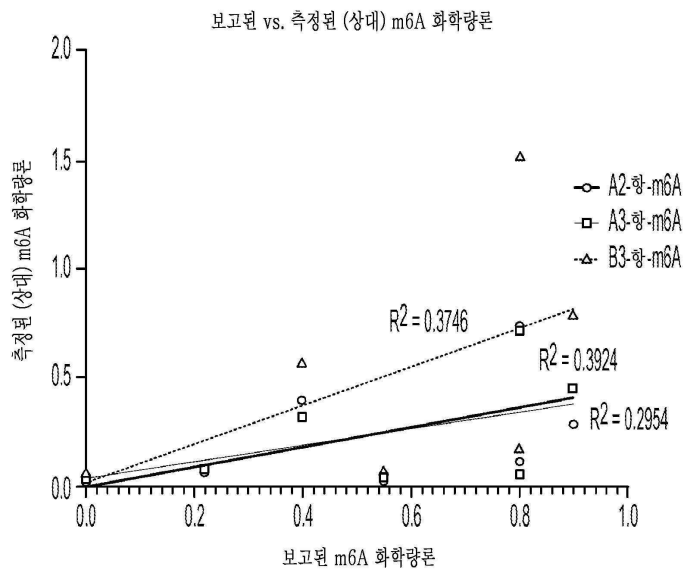
도면15f



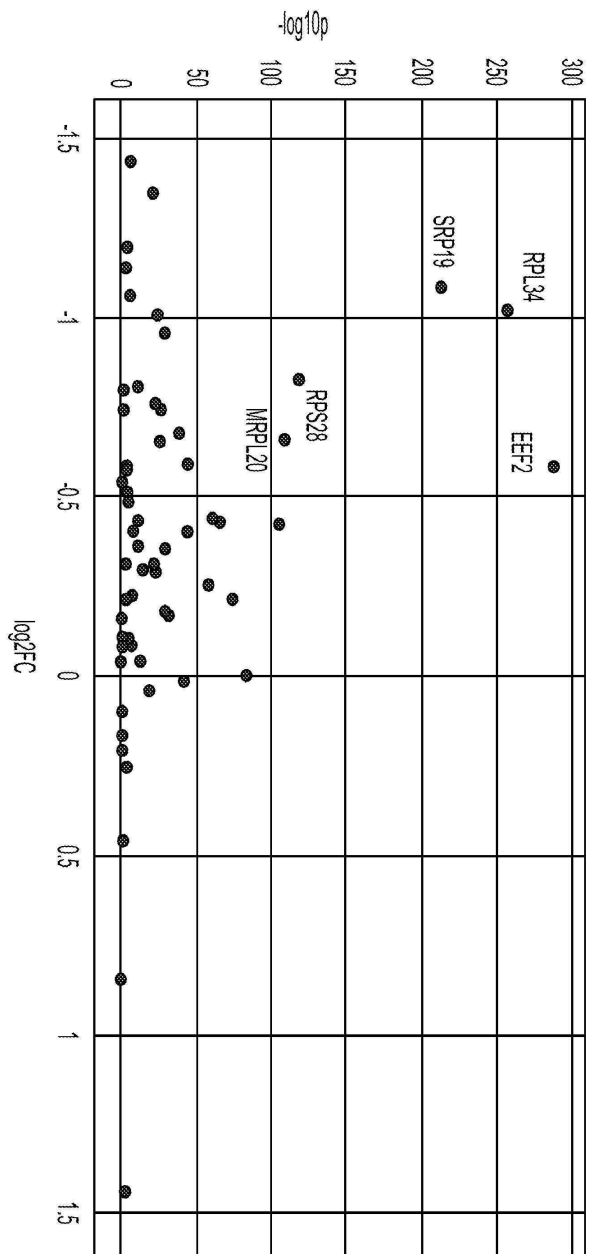
도면15g



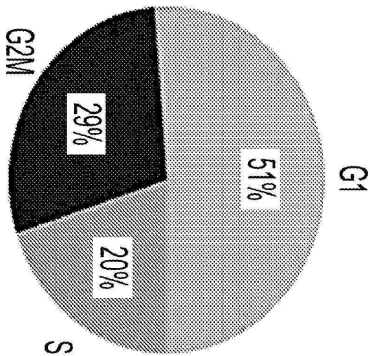
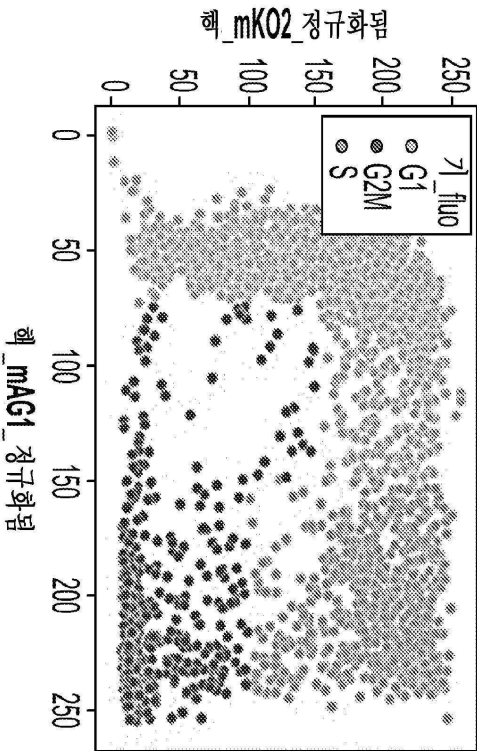
도면15h



도면16a



도면16b



도면16c

