



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0024527
(43) 공개일자 2022년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/90 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/90 (2013.01)
A01K 67/0275 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7001180
(22) 출원일자(국제) 2020년06월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년01월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/037946
(87) 국제공개번호 WO 2020/257205
국제공개일자 2020년12월24일
(30) 우선권주장
62/862,576 2019년06월17일 미국(US)

(71) 출원인
세다르스-신나이 메디칼 센터
미합중국 씨에이 90048-1865 로스엔젤레스 8700베
버리 불레매드
(72) 발명자
브레유닉 조슈아
미국 캘리포니아 90036 로스엔젤레스 웨스트 3드
스트리트 6280 아파트먼트 104
다니엘푸어 모이즈
미국 캘리포니아 90024 로스엔젤레스 컴스톡 애비
뉴 250
(74) 대리인
리엔목특허법인

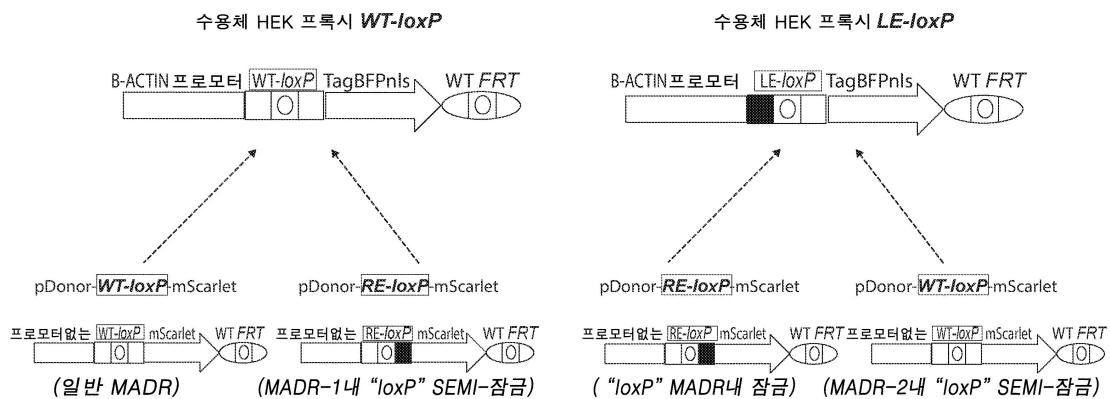
전체 청구항 수 : 총 70 항

(54) 발명의 명칭 생체내 이중 재조합효소-매개된 카세트 교환 (dRMCE)을 위한 시스템 및 방법 그리고 이들의 질환 모델

(57) 요약

이중 재조합효소-매개된 카세트 교환에서 사용을 위한 공여자 벡터 및 시스템이 본원에 기재된다. 이식유전자 발현의 일관되고, 엄격하며, 손쉬운 조사를 위한 동물 모델 및 인간 세포가 또한 기재된다. 이들 동물 모델을 사용하는 치료적 약물의 스크리닝 방법, 그리고 치료 방법이 추가로 기재된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61P 25/16 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C12N 15/102 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2800/30 (2013.01)

C12N 2800/40 (2013.01)

(72) 발명자

김 기범

미국 캘리포니아 91606 노스 할리우드 모델라 애비뉴 6220

아알라-사르미엔토 알베르토

미국 캘리포니아 90250 호쏜 웨스트 134쑈 스트리트 4047 아파트먼트 #9

양 에이미

미국 캘리포니아 90034 로스앤젤레스 사우쓰 베드포드 스트리트 1946 아파트먼트 2

명세서

청구범위

청구항 1

RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 폴리아데닐화 신호 또는 전사 정지 요소,
 RNA를 인코딩하는 상기 핵산 또는 이식유전자, 및
 페어링된 재조합효소 인식 부위
 를 포함하는 프로모터-없는 공여자 벡터; 및
 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위에 특이적인 재조합효소를 인코딩하는 2개 유전자를 포함하는 1개 발현 벡터, 또는
 2개 발현 벡터로서, 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위들 중 하나에 특이적인 제1 재조합효소를 인코딩하는 1개 유전자를 포함하는 상기 제1 발현 벡터, 및 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위들 중 다른 것에 특이적인 제2 재조합효소를 인코딩하는 1개 유전자를 포함하는 상기 제2 발현 벡터
 를 포함하는, 시스템.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터-없는 공여자 벡터가 플라스미드, 바이러스성 벡터, 및 박테리아성 인공 염색체 (BAC)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 시스템.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터-없는 공여자 벡터가 상기 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 적어도 4개 폴리아데닐화 신호를 포함하는, 시스템.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터-없는 공여자 벡터가 전사후 조절 요소를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터-없는 공여자 벡터가 상기 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 하류에 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터-없는 공여자 벡터가 스플라이스 수용자로 시작하는 개방 판독 프레임 (ORF)을 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터-없는 공여자 벡터가 형광성 리포터를 추가로 포함하는, 시스템.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 바이러스성 벡터가 아데노-연관된 바이러스성 (AAV) 벡터인, 시스템.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 재조합효소를 포함하는 상기 발현 벡터가 조직-특이적 프로모터 하에 있는, 시스템.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위가 loxP 및 플립파아제 인

식 표적 (FRT)이고, 상기 재조합효소가 cre 및 flp인, 시스템.

청구항 11

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위가 변형된 loxP 및/또는 변형된 플립파아제 인식 표적 (FRT)이고, 상기 재조합효소가 cre 및 flp인, 시스템.

청구항 12

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위가 VloxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)이고, 상기 재조합효소가 VCre 및 flp인, 시스템.

청구항 13

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위가 SloxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)이고, 상기 재조합효소가 SCre 및 flp인, 시스템.

청구항 14

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합효소가 PhiC31 재조합효소이고 상기 재조합효소 인식 부위가 attB 및 attP인, 시스템.

청구항 15

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합효소가 Nigri, Panto, 또는 Vika이고 재조합효소 인식 부위 각각이 nox, pox, 및 vox인, 시스템.

청구항 16

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위의 한쪽 또는 양쪽이 돌연변이를 포함하는, 시스템.

청구항 17

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA가 siRNA, shRNA, sgRNA, lncRNA 또는 miRNA인, 시스템.

청구항 18

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식유전자 또는 상기 RNA가 질환 연관된 돌연변이를 포함하는, 시스템.

청구항 19

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식유전자 또는 상기 RNA가 기능획득 (GOF) 유전자 돌연변이, 기능상실 (LOF) 유전자 돌연변이, 또는 양쪽을 포함하는, 시스템.

청구항 20

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식유전자가 세포자멸사를 예방하거나 뉴런성 세포의 생존을 촉진시키거나, 뉴런성 세포의 증식을 증가시키거나, 뉴런성 세포의 분화를 촉진시키는 인자를 포함하는, 시스템.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 인자가 성장 인자인, 시스템.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 성장 인자가 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF), 뉴트린, 성장/분화 인자 (GDF) 5, 중뇌 성상세포-유래된 신경영양 인자 (MANF), 대뇌 도파민작용성 신경영양 인자 (CDNF), 또는 이들의

조합을 포함하는, 시스템.

청구항 23

제 21 항에 있어서, 상기 성장 인자가 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF)를 포함하는, 시스템.

청구항 24

제 1 항에 있어서, 상기 프로모터-없는 공여자 벡터가

PGK 폴리아데닐화 신호 (pA);

삼량체화된 SV40pA;

RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자;

loxP 및 플립카아제 인식 표적 (FRT);

토끼 베타-글로빈 pA; 및

우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)

를 포함하는, 시스템.

청구항 25

RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 폴리아데닐화 신호 또는 전사 정지 요소;

RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자; 및

페어링된 재조합효소 인식 부위

를 포함하는, 프로모터-없는 공여자 벡터.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 프로모터-없는 공여자 벡터가 플라스미드, 바이러스성 벡터, 및 박테리아성 인공 염색체 (BAC)로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 프로모터-없는 공여자 벡터.

청구항 27

제 25 항에 있어서, 상기 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 적어도 4개 폴리아데닐화 신호를 포함하는, 프로모터-없는 공여자 벡터.

청구항 28

제 25 항에 있어서, 전사후 조절 요소를 추가로 포함하는, 프로모터-없는 공여자 벡터.

청구항 29

제 25 항에 있어서, 상기 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 하류에 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함하는, 프로모터-없는 공여자 벡터.

청구항 30

제 25 항에 있어서, 상기 이식유전자 또는 RNA가 종양유전자, 종양 억제인자 유전자의 기능상실 (LOF) 돌연변이, 원-종양유전자의 기능획득 (GOF) 돌연변이, 위유전자, siRNA, shRNA, sgRNA, lncRNA, miRNA, 후성 변형, 인간 질환과 연관된 비-코딩 유전적 또는 후성 이상, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 프로모터-없는 공여자 벡터.

청구항 31

제 25 항에 있어서, 상기 이식유전자가 세포자멸사를 예방하거나 뉴런성 세포의 생존을 촉진시키거나, 뉴런성 세포의 증식을 증가시키거나, 또는 뉴런성 세포의 분화를 촉진시키는 인자를 포함하는, 프로모터-없는 공여자

백터.

청구항 32

제 31 항에 있어서, 상기 인자가 성장 인자인, 프로모터-없는 공여자 백터.

청구항 33

제 32 항에 있어서, 상기 성장 인자가 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF), 뉴트린, 성장/분화 인자 (GDF) 5, 중뇌 성상세포-유래된 신경영양 인자 (MANF) 또는 대뇌 도파민작용성 신경영양 인자 (CDNF), 또는 이들의 조합을 포함하는, 프로모터-없는 공여자 백터.

청구항 34

제 32 항에 있어서, 상기 성장 인자가 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF)를 포함하는, 프로모터-없는 공여자 백터.

청구항 35

제 25 항에 있어서, 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위의 한쪽 또는 양쪽이 돌연변이를 포함하는, 프로모터-없는 공여자 백터.

청구항 36

제 25 항에 있어서, 상기 바이러스성 백터가 아데노-연관된 바이러스성 (AAV) 백터인, 프로모터-없는 공여자 백터.

청구항 37

제 25 항에 있어서,

PGK 폴리아데닐화 신호 (pA);

삼량체화된 SV40pA;

RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자;

LoxP 및 플립과아제 인식 표적 (FRT);

토끼 베타-글로빈 pA; 및

우드치크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)

를 포함하는, 프로모터-없는 공여자 백터.

청구항 38

제 1 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항의 시스템으로 상기 포유동물 세포를 형질감염 또는 형질도입시키는 단계를 포함하는, 포유동물 세포의 유전적 조작 방법.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 인간 세포이고, 상기 시스템이 AAVS1 좌위, H11 좌위, 또는 HPRT1 좌위를 표적하고, 상기 방법이 시험관내 또는 생체외 방법인, 방법.

청구항 40

제 38 항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 마우스 세포이고 상기 시스템이 ROSA26 좌위, Hipp11 좌위, Tigre 좌위, ColA1 좌위, 또는 Hprt 좌위를 표적하는, 방법.

청구항 41

제 38 항에 있어서, 상기 세포에 하나 이상의 재조합효소 효소를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 42

제 41 항에 있어서, 상기 하나 이상의 재조합효소 효소가 Cre 재조합효소, 플립과아제 재조합효소, Cre 및 플립과아제 재조합효소, Nigri 재조합효소, Panto 재조합효소 또는 Vika 재조합효소를 포함하는, 방법.

청구항 43

제 38 항에 있어서, 상기 포유동물 세포가 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 또는 조직 전구 세포를 포함하는, 방법.

청구항 44

비-인간 동물 모델로서,

제 1 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항의 시스템을 포함하는 비-인간 동물

을 포함하며,

상기 이식유전자 또는 RNA가 종양유전자, 종양 억제인자 유전자의 기능상실 (LOF) 돌연변이, 원-종양유전자의 기능획득 (GOF) 돌연변이, 위유전자, siRNA, shRNA, sgRNA, lncRNA, miRNA, 후성 변형, 인간 질환과 연관된 비-코딩 유전적 또는 후성 이상, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 비-인간 동물 모델.

청구항 45

제 44 항에 있어서, 상기 비-인간 동물 모델이 개인화된 비-인간 동물 모델 인간 대상체의 암이고 상기 이식유전자 또는 RNA가 상기 인간 대상체의 암에 기반된, 비-인간 동물 모델.

청구항 46

제 44 항에 있어서, 상기 비-인간 동물 모델이 개인화된 비-인간 동물 모델 인간 대상체의 질환 또는 병태이고 상기 이식유전자 또는 RNA가 상기 인간 대상체의 질환 또는 병태에 기반되는, 비-인간 동물 모델.

청구항 47

제 44 항에 있어서, 기능획득 돌연변이 (GOF), 기능상실 돌연변이 (LOF), 또는 양쪽을 포함하는, 비-인간 동물 모델.

청구항 48

제 1 항의 시스템으로 상기 비-인간 동물 모델을 형질감염 또는 형질도입시키는 단계

를 포함하는, 제 44 항에 따른 비-인간 동물 모델의 생성 방법으로서,

상기 이식유전자 또는 RNA가 종양유전자, 종양 억제인자 유전자의 기능상실 (LOF) 돌연변이, 원-종양유전자의 기능획득 (GOF) 돌연변이, 위유전자, siRNA, shRNA, sgRNA, lncRNA, miRNA, 후성 변형, 인간 질환과 연관된 비-코딩 유전적 또는 후성 이상, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 49

제 44 항의 비-인간 동물 모델을 제공하는 단계;

상기 약물 후보를 상기 비-인간 동물 모델에 투여하는 단계; 및

상기 비-인간 동물 모델에 관한 상기 약물 후보의 효과를 사정하는 단계

를 포함하는, 약물 후보의 효과의 사정 방법.

청구항 50

제 1 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항의 시스템 또는 제 25 항 내지 제 37 항 중 어느 한 항의 프로모터-없는 공여자 벡터를 포함하는, 포유동물 세포.

청구항 51

제 50 항에 있어서, 상기 세포가 인간 세포인, 세포.

청구항 52

제 50 항에 있어서, 상기 세포가 다능성 세포인, 세포.

청구항 53

제 52 항에 있어서, 상기 다능성 세포가 유도된 다능성 세포인, 세포.

청구항 54

제 50 항의 포유동물 세포를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 장애를 지닌 개체에게 유전자 산물의 전달 방법.

청구항 55

제 54 항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환 또는 장애가 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 또는 알츠하이머병을 포함하는, 방법.

청구항 56

제 54 항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환 또는 장애가 파킨슨병을 포함하는, 방법.

청구항 57

제 54 항에 있어서, 상기 신경퇴행성 질환 또는 장애가 근위축성 측삭 경화증 (ALS)을 포함하는, 방법.

청구항 58

제 50 항의 포유동물 세포를 상기 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서의 상기 뇌에서 GDNF 단백질 수준의 증가 방법.

청구항 59

게놈성 통합된 이식유전자를 포함하는 포유동물 세포로서, 상기 게놈성 통합된 이식유전자가 신경영양 인자를 포함하고, AAVS1 좌위, H11 좌위, 또는 HPRT1 좌위를 포함하는 게놈성 부위에 통합되는, 포유동물 세포.

청구항 60

제 59 항에 있어서, 상기 세포가 인간 세포인, 포유동물 세포.

청구항 61

제 60 항에 있어서, 상기 인간 세포가 유도된 다능성 줄기 세포인, 포유동물 세포.

청구항 62

제 59 항 내지 제 61 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경영양 인자가 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF), 뉴트린, 성장/분화 인자 (GDF) 5, 중뇌 성상세포-유래된 신경영양 인자 (MANF), 대뇌 도파민작용성 신경영양 인자 (CDNF), 또는 이들의 조합을 포함하는, 포유동물 세포.

청구항 63

제 62 항에 있어서, 상기 신경영양 인자가 GDNF인, 포유동물 세포.

청구항 64

제 59 항 내지 제 61 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경영양 인자가 유도성 프로모터의 제어 하에 있는, 포유동물 세포.

청구항 65

제 64 항에 있어서, 상기 유도성 프로모터가 테트라사이클린 유도성 프로모터인, 포유동물 세포.

청구항 66

제 64 항 또는 제 65 항에 있어서, 상기 신경영양 인자 및/또는 상기 유도성 프로모터가 재조합효소 인식 부위, 전위가능한 요소의 탠덤 반복부, 또는 절연인자 서열 중 하나 이상에 의해 측정되는, 포유동물 세포.

청구항 67

제 66 항에 있어서, 상기 신경영양성 인자 및/또는 상기 유도성 프로모터가 페어링된 재조합효소 인식 부위에 의해 측정되는, 포유동물 세포.

청구항 68

제 67 항에 있어서, 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위가 변이체 재조합효소 인식 부위 및 야생형 재조합효소 인식 부위를 포함하는, 포유동물 세포.

청구항 69

제 67 항에 있어서, 상기 변이체 재조합효소 인식 부위가 상기 야생형 재조합효소 인식 부위에 비교해서 재조합 효소에 의해 감소된 절단을 나타내는, 포유동물 세포.

청구항 70

제 67 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 페어링된 재조합효소 인식 부위가 LoxP 부위 또는 FRT 부위를 포함하는, 포유동물 세포.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

[0001] 관련된 출원의 교차-참조

[0002] 본원은 2019년 6월 17일 출원된, 미국 가특허 출원 번호 62/862,576에 대한 우선권 주장을 35 U.S.C. § 119(e) 하에서 포함하고, 이의 전체 내용은 이로써 참고로 편입된다.

[0003] 연방 지원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0004] 본 발명은 국립 보건원에 의해 수여된 CA202900 및 CA236687 하에 정부 지원으로 제작되었다. 정부는 본 발명에서 특정 권리를 갖는다.

[0005] 배경

[0006] 유전적으로 조작된 마우스 모델 (GEMM)은 일시적- 및 조직-특이적 방식으로 생체내 유전자 기능을 분석하기 위한 패러다임이었다. 하지만, GEMM 생성이 값비싼 힘든 과정이기 때문에, 많은 대안적 이식유전자 접근법, 예컨대 전기천공 (EP)-매개된 및 바이러스성 유전자 전달이 체세포 모자이크를 창출하는 보다 신속하고 효율적인 방법으로서 점점 더 많이 채택되었다. 양쪽 방법이 바이러스 또는 외래 DNA를 지닌 특이적 조직을 주사시켜 주변 세포를 형질도입하고 체세포 모자이크를 창출하는 것을 수반한다. EP는 트랜스포존을 사용하거나 덜 효율적으로 CRISPR/Cas9 그리고 공여자 템플릿의 후속 삽입으로 게놈-삽입된 DNA를 산출할 수 있다. 그들의 스피드에도 불구하고, 이들 방법은 더욱 널리 퍼진 채택을 단념시키는 주요 함정을 갖는다. 바이러스성 벡터는 제한된 페이로드를 갖고, 면역 반응을 선동하며, 특별한 전문지식을 요구하고, 반면 양쪽 트랜스포존 및 바이러스성 방법은 그들의 예측할 수 없는 게놈성 통합 패턴, 가능한 삽입성 돌연변이생성, 및 후성 이식유전자 침묵화로 고통받는다. 양쪽은 이식유전자 카피 수 가변성 및 과대발현 인공물 예컨대 세포독성 및 전사적 스펙칭으로 고통받고, 이 때문에 클론성 유전자형/표현형 가변성은 상당한 혼란 인자이다.

[0007] 다수의 이들이 기능획득 (GOF) 종양유전자인, 수백의 재발성, 추정적 암 드라이버 돌연변이의 식별로, 아마 종

양 억제인자 돌연변이와 공동으로, 이들 잠재적 종양유전자를 모델링할 수 있는 다루기 쉬운 *생체내* 플랫폼을 창출하는 것이 필수적이다. 각 GOF 종양유전자 경우에, 별개의 방식으로 기능할 수 있는 수십 가지의 상이한 재발성 미스센스 돌연변이가 종종 있다. 많은 잘-알려진 종양 억제인자 돌연변이체는 기능상실 (LOF) 표현형이고, 이를 위하여 대규모 KO-마우스 컨소시엄을 활용하여 다중-KO-마우스 (예를 들면, Pten/p53/Nf1-KO)를 육종할 수 있다. 그래도, 그러한 마우스 창출하기는 상당히 시간-소모성이고, 고가이며, 방법론적 혼동을 일으키기 쉽다. 대안적으로, CRISPR/Cas9 시스템은 마우스에서 생체내 다중 KO를 동시에 유도할 수 있지만, 상당히 의도하지 않은 표적외 게놈 변경을 가질 수 있다.

발명의 내용

[0008] 발명의 개요

[0009] 일 양태에서, GOF 및 LOF 돌연변이의 조합을 저렴하게 뿐만 아니라 GEMM형 방식으로 동시에 모델링할 수 있는 유연한 생체내 플랫폼이 본원에 제공된다. 우리는 성공적 이중 재조합효소 매개된 카세트 교환 (dRMCE, 또는 MADR)이 재조합된 세포의 확정적인 유전적 표지화를 지닌 잘-특성화된 리포터 마우스의 체세포에서 *제자리* 촉매화될 수 있다는 것을 논증한다. 게다가, 우리는, 환자-특이적 드라이버 돌연변이를 포함하여, GOF 및 LOF 돌연변이의 혼합물을 지닌 모자이크현상 생성에서 이러한 시스템의 유용성을 논증한다. 궁극적으로, 우리의 MADR 종양 모델은 이러한 방법이 다양한 추정적 종양 드라이버 돌연변이를 테스트 및 연구하기 위한 더 높은-처리량, 첫-통과 실험이 될 잠재력을 갖고, 환자-특이적 방식으로 전임상 약물 발견을 위한 신속한 파이프라인을 제공한다는 것을 논증한다.

[0010] 세포 요법에서 사용을 위하여 이식유전자 세포를 확립하는데 유용한 시스템, 핵산, 및 벡터가 본원에 기재된다. 이들 벡터는 게놈성 자리에서 안정적으로 통합된 이식유전자를 지닌 세포를 창출하는데 사용된 현행 방법과 연관된 문제를 우회한다. 현행 문제는 배수성의 제어의 부족, 통합 부위의 제어의 부족, 이식유전자 삽입체 크기에 관한 제한을 포함한다. 본원에 기재된 시스템은 이들 문제를 해결하고, 세포 요법의 더욱 안전한 더욱 재현 가능한 방법을 허용한다. 이들 시스템 그리고 이들을 이용하는 방법은 신경퇴행성 질환, 예컨대 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 또는 알츠하이머병을 지닌 대상체에게 유전자 산물 예컨대 신경영양 인자 및/또는 성장 인자를 전달하는데 유용한 세포 및 세포주의 확립에 적용가능하다.

[0011] 일 양태에서, 게놈성 통합된 이식유전자를 포함하는 포유동물 세포가 본원에 기재되고, 여기서 게놈성 통합된 이식유전자는 신경영양 인자를 포함하고, AAVS1 좌위, H11 좌위, 또는 HPRT1 좌위를 포함하는 게놈성 부위에 통합된다. 특정 구현예에서, 세포는 인간 세포이다. 특정 구현예에서, 인간 세포는 유도된 다능성 줄기 세포이다. 특정 구현예에서, 신경영양 인자는 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF), 뉴트린, 성장/분화 인자 (GDF) 5, 중뇌 성상세포-유래된 신경영양 인자 (MANF), 대뇌 도파민작용성 신경영양 인자 (CDNF), 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 신경영양 인자는 GDNF이다. 특정 구현예에서, 신경영양 인자는 유도성 프로모터의 제어 하에 있다. 특정 구현예에서, 유도성 프로모터는 테트라사이클린 또는 독시사이클린 유도성 프로모터이다. 특정 구현예에서, 신경영양 인자 및/또는 유도성 프로모터는 재조합효소 인식 부위, 전위가능한 요소의 탠덤 반복부, 또는 절연인자 서열 중 하나 이상에 의해 측정된다. 특정 구현예에서, 이식유전자의 단일 카피는 세포의 게놈으로 통합된다. 다양한 구현예에서, 신경영양 인자 및/또는 유도성 프로모터는 페어링된 재조합효소 인식 부위에 의해 측정된다. 다양한 구현예에서, 페어링된 재조합효소 인식 부위는 변이체 재조합효소 인식 부위 및 야생형 재조합효소 인식 부위를 포함한다. 다양한 구현예에서, 변이체 재조합효소 인식 부위는 야생형 재조합효소 인식 부위에 비교해서 재조합효소에 의해 감소된 절단을 나타낸다. 다양한 구현예에서, 페어링된 재조합효소 인식 부위는 LoxP 부위 또는 FRT 부위를 포함한다.

[0012] 또 다른 양태에서 (a) RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 폴리아데닐화 신호 또는 전사 정지 요소, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자, 및 페어링된 재조합효소 인식 부위를 포함하는, 프로모터-없는 공여자 벡터, (b) 및 페어링된 재조합효소 인식 부위에 특이적인 재조합효소를 인코딩하는 2개 유전자를 포함하는 1개 발현 벡터, 또는 페어링된 재조합효소 인식 부위들 중 하나에 특이적인 제1 재조합효소를 인코딩하는 1개 유전자를 포함하는 제1 발현 벡터, 및 페어링된 재조합효소 인식 부위들 중 다른 것에 특이적인 제2 재조합효소를 인코딩하는 1개 유전자를 포함하는 제2 발현 벡터인, 2개 발현 벡터를 포함하는 시스템이 본원에 기재된다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 플라스미드, 바이러스성 벡터, 및 박테리아성 인공 염색체 (BAC)로 이루어지는 군으로부터 선택하였다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 적어도 4개 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 전사후 조절 요소를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 RNA를

인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 하류에 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 PGK 폴리아데닐화 신호 (pA); 삼량체화된 SV40pA; RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자; loxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT); 토끼 베타-글로빈 pA; 및 우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)를 포함한다. 특정 구현예에서, 페어링된 재조합효소 인식 부위는 loxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)이고, 재조합효소는 cre 및 flp이다. 특정 구현예에서, 페어링된 재조합효소 인식 부위는 VloxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)이고, 재조합효소는 VCre 및 flp이다. 특정 구현예에서, 페어링된 재조합효소 인식 부위는 SloxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)이고, 재조합효소는 SCre 및 flp이다. 특정 구현예에서, 재조합효소는 PhiC31 재조합효소이고 재조합효소 인식 부위는 attB 및 attP이다. 특정 구현예에서, 여기서 재조합효소는 Nigri, Panto, 또는 Vika이고 재조합효소 인식 부위는 nox, pox, 및 vox, 각각이다. 특정 구현예에서, 여기서 페어링된 재조합효소 인식 부위의 한쪽 또는 양쪽은 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, RNA는 siRNA, shRNA, sgrRNA, lncRNA 또는 miRNA이다. 특정 구현예에서, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자는 질환 연관된 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자는 기능획득 (GOF) 유전자 돌연변이, 기능상실 (LOF) 유전자 돌연변이, 또는 양쪽을 포함한다. 특정 구현예에서, 이식유전자는 세포자멸사를 예방하거나 뉴런성 세포의 생존을 촉진시키는, 뉴런성 세포의 증식을 증가시키는, 또는 뉴런성 세포의 분화를 촉진시키는 인자를 포함한다. 특정 구현예에서, 인자는 성장 인자이다. 특정 구현예에서, 성장 인자는 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF), 뉴트린, 성장/분화 인자 (GDF) 5, 중뇌 정상세포-유래된 신경영양 인자 (MANF), 대뇌 도파민작용성 신경영양 인자 (CDNF), 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 성장 인자는 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF)를 포함한다. 특정 구현예에서, 공여자 벡터는 스플라이스 수용자로 시작하는 개방 판독 프레임 (ORF)을 포함한다. 특정 구현예에서, 공여자 벡터는 형광성 리포터를 포함한다. 특정 구현예에서, 시스템을 포함하는 포유동물 세포가 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 세포는 인간 세포이다. 특정 구현예에서, 세포는 다능성 세포이다. 특정 구현예에서, 다능성 세포는 유도된 다능성 세포이다. 특정 구현예에서, 세포는 네루오데그네라티브 장애를 갖는 대상체에게 유전자 산물 (예를 들면, 성장 인자, 신경영양 인자)의 전달 방법으로서, 개체에게 포유동물 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법에서 사용을 위한 것이다. 특정 구현예에서, 신경퇴행성 장애는 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 또는 알츠하이머병을 포함한다. 특정 구현예에서, 신경퇴행성 장애는 파킨슨병을 포함한다. 특정 구현예에서, 신경퇴행성 장애는 근위축성 측삭 경화증 (ALS)을 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 개체에서의 뇌에서 GDNF 단백질 수준의 증가 방법으로서, 개체에게 포유동물 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법에서 사용을 위한 것이다.

[0013]

또 다른 양태에서, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 폴리아데닐화 신호 또는 전사 정지 요소; RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자; 및 페어링된 재조합효소 인식 부위를 포함하는 프로모터-없는 공여자 벡터가 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 플라스미드, 바이러스성 벡터, 및 박테리아성 인공 염색체 (BAC)로 이루어지는 군으로부터 선택하였다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 적어도 4개 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 특정 구현예에서, 이식유전자 또는 RNA는 종양유전자, 종양 억제인자 유전자의 기능상실 (LOF) 돌연변이, 원-종양 유전자의 기능획득 (GOF) 돌연변이, 위유전자, siRNA, shRNA, sgrRNA, lncRNA, miRNA, 후성 변형, 인간 질환과 연관된 비-코딩 유전적 또는 후성 이상, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 전사후 조절 요소를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 하류에 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 페어링된 재조합효소 인식 부위의 한쪽 또는 양쪽은 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 PGK 폴리아데닐화 신호 (pA); 삼량체화된 SV40pA; 이식유전자 또는 RNA; loxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT); 토끼 베타-글로빈 pA; 및 우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)를 포함한다. 특정 구현예에서, 이식유전자는 세포자멸사를 예방하거나 뉴런성 세포의 생존을 촉진시키는, 뉴런성 세포의 증식을 증가시키는, 또는 뉴런성 세포의 분화를 촉진시키는 인자를 포함한다. 특정 구현예에서, 인자는 성장 인자이다. 특정 구현예에서, 성장 인자는 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF), 뉴트린, 성장/분화 인자 (GDF) 5, 중뇌 정상세포-유래된 신경영양 인자 (MANF), 대뇌 도파민작용성 신경영양 인자 (CDNF), 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 성장 인자는 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF)를 포함한다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터를 포함하는 포유동물 세포가 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 특정 구현예에서, 포유동물 세포는 다능성 세포이다. 특정 구현예에서, 다능성 세포는 유도된 다능성 세포이다. 특정 구현예에서, 세포는 개체에서 네루오데그네라티브 장애를 갖는 대상체에게 유전자 산물 (예를 들면, 성장 인자, 신경영양 인자)의 전달 방법으로서, 개체에게 포유동물 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법에서 사용을 위한 것이다. 특정 구현예에서, 신경퇴행성 장애는 파킨슨병, 근위축성 측

삭 경화증 (ALS), 또는 알츠하이머병을 포함한다. 특정 구현예에서, 신경퇴행성 장애는 파킨슨병을 포함한다. 특정 구현예에서, 신경퇴행성 장애는 근위축성 측삭 경화증 (ALS)을 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 개체에서 뇌에서 GDNF 단백질 수준의 증가 방법으로서, 개체에게 포유동물 세포를 투여하는 단계를 포함하는 방법에서 사용을 위한 것이다.

[0014]

또 다른 양태에서, 본원에 기재된 시스템으로 포유동물 세포를 형질감염 또는 형질도입시키는 단계를 포함하는, 포유동물 세포의 유전적 조작 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 포유동물 세포는 인간 세포이고, 시스템은 AAVS1 좌위, H11 좌위, 또는 HPRT1 좌위를 표적하고, 본 방법은 *시험관내* 또는 *생체외* 방법이다. 특정 구현예에서, 포유동물 세포는 마우스 세포이고, 시스템은 ROSA26 좌위, Hipp11 좌위, Tigre 좌위, ColA1 좌위, 또는 Hprt 좌위를 표적한다. 특정 구현예에서, 본 방법은 세포에 투여하는 단계 또는 세포를 하나 이상의 재조합 효소 효소와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 재조합효소 효소는 Cre 재조합 효소, 플립과아제 재조합효소, Cre 및 플립과아제 재조합효소, Nigri 재조합효소, Panto 재조합효소 또는 Vika 재조합효소를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0015]

도면의 간단한 설명

예시적 구현예는 참조된 도면에서 실례된다. 본원에 개시된 구현예 및 도면이 제한적이기보다 오히려 실례적으로 간주되기 위한 것이다.

도 1, 패널 A 내지 M은, *mTmG* 마우스 또는 인간 라인에서 MADR이 *시험관내* 유전적 리포터-정의된 개체군을 생성하는 것을 묘사한다.

A) Flp-Cre 벡터는 MADR 공여자 벡터의 존재 하에 *Rosa26^{mTmG}* 대립유전자에서 어느 한쪽 Cre-매개된 절제 또는 dRMCE를 촉매화시켜, 2개의 별개의 재조합 산물을 초래한다.

B) 이형접합성 *Rosa26^{WT/mTmG}* mNSC의 뉴클레오펙션은 3개 가능한 계통: tdTomato+, EGFP+, 및 TagBFP2+를 초래한다.

C) 비-중첩형 형광성 색상으로 대표적 세포의 생 이미지화. 스케일 바, 100 μ m

D) 단일-세포 웨스턴 블랏을 위한 세포 제조의 개략도.

E) MADR 및 PiggyBac 이식유전자 세포를 비교하는 형광 강도의 빈도.

F) PiggyBac 및 MADR 그룹을 위한 단일-세포 웨스턴 블랏의 대표적 예. (이것이 순수한 개체군이 아니고 그래서 일부 세포가 Histone H3 로딩 대조군 단백질을 발현시키지만 TagBFP2는 하지 않는다는 것을 유의한다. 또한, 많은 레인은 이 검정에 전형적이듯이 비어있다.)

G) MADR MAX를 위한 MADR-상용성 TRE-SM-FP 플라스미드.

H) Dox는 *시험관내* 4개 독립적 리포터의 직교 이미지화를 허용하는 효율적인 SM-FP 발현을 유도시킨다. 스케일 바, 100 μ m

I) 고 배율 공초점 z-섹션은 각 세포가 단일 SM-FP 리포터를 발현시킨다는 것을 논증한다. 스케일 바, 10 μ m

J) TALEN 또는 CRISPR/Cas9에 의해 HUMAN MADR에 대하여 표적화하는 AAVS1 좌위의 개략도

K) tdTomato 및 TagBFP2-V5-nls를 발현시키는 AAVS1-표적된 MADR 수용체 부위를 함유하는 HEK293T 세포 스케일 바, 100 μ m

L) 비-삽입된 tdTomato+ 세포들 중에서 GFP 또는 BFP 자가형광을 보여주는 pDONOR SM-FP-myc (Bright) 또는 TagBFP-3XFlag로 형질감염된 MADR-HEK293T 세포. 스케일 바, 100 μ m

M) 상호 배타적인 방식으로 tdTomato 및 SM-FP-myc를 나타내는 L로부터 세포의 고 배율 이미지. 스케일 바, 10 μ m

도 2, 패널 A 내지 O는, 이형접합성 *mTmG*에서 MADR이 *생체내* 계통의 효율적인 추적을 허용하는 것을 묘사한다

A) Flp-Cre 벡터 및 공여자 플라스미드의 DNA 혼합물로 P2 이형접합성 *Rosa26^{WT/mTmG}* 새끼내 VZ/SVZ 세포를 표적

하는 표준 산후 전기천공 프로토콜

- B) 산후 EP는 *시험관내* 뉴클레오펙션 실험을 재현하고 EP 2주 후에 EGFP+ 및 tdTomato+ 계통과 함께 TagBFP2+ MADR을 산출한다. 스케일 바, 100 μ m
 - C) 재조합효소 및 공여자 플라스미드의 상이한 농도는 *생체내* 양쪽 MADR 및 Cre-절제 재조합 반응의 다양한 효율을 초래한다. 모든 혼합물은 핵 TagBfp2 리포터 플라스미드를 함유하였다. (이 정량으로부터 대표적 이미지에 대하여 **도 9D** 참고.) 오차 바는 평균의 표준 오차 (SEM)를 나타낸다.
 - D) 멀티플렉스 표지화 같은 조합적 MADR MAX "브레인보우"를 위한 플라스미드 전달의 개략도
 - E) 멀티플렉스 SM-FP-기반된 MADR MAX EP된 세포를 표시하고 SM-FP-연결된 에피토프 태그에 대하여 면역염색하는 후구의 저 배율 이미지. 스케일 바, 100 μ m
 - F) 뉴런 당 단일 SM-FP 에피토프 태그의 발현을 나타내는 E로부터 세포의 고 배율 이미지. 스케일 바, 10 μ m
 - G) 확장 현미경검사 및 명시야 이미지 예의 개략도
 - H) 이식유전자 세포의 Nf1 및 SM-FP-myc 표지화의 동시 녹다운을 위한 pDonor SM-FP-myc sh.Nf1 miR-E 플라스미드
 - I) 리포터 표지화된 세포-EGFP 및 SM-FP-myc (즉, Nf1 녹다운 세포)의 2개 개체군을 보여주는 EP된 줄무늬체의 이미지.
 - J) 확장전 SM-FP-myc 세포체
 - K) J에서 세포의 확장후
 - L) "초-해상도" 상세를 표시하는 확장후 EGFP 성상세포.
 - M) MATR (3차 재조합효소를 이용한 모자이크 분석)에 대한 pDonor-TagBFP2-P2A-VCRe 및 F1Ex VCRe 리포터 플라스미드의 개략도
 - N) Flp0-2A-Cre, pDonor-TagBFP2, HypBase 및 F1Ex VCRe 리포터를 지닌 EP된 줄무늬체. 스케일 바, 50 μ m
 - O) VCRe-의존적 F1Ex 리포터 (SM-FP-myc)를 나타내는 Flp0-2A-Cre, pDonor-TagBFP2-2A-VCRe, HypBase 및 F1Ex VCRe 리포터를 지닌 N에서 보여진 마우스의 한배새끼의 줄무늬체. 스케일 바, 50 μ m
- 도 3, 패널 A 내지 M은 MADR 유전자도입을 이용하는 기능상실 조작을 묘사한다
- A) TagBFP2 리포터에 묶인 Nf1, Pten, 및 Trp53에 대한 miR-E shRNA를 위한 공여자 작제물
 - B) qPCR에 의한 멀티-miR-E 기능의 녹다운 효능의 검증.
 - C) 종양이 아닌 TagBFP2+ 세포의 과형성을 보여주는 6-개월령 마우스 시상 단면. 스케일 바, 1mm
 - D) TagBFP2-V5 리포터 단백질 및 SpCas9의 MADR을 위한 플라스미드
 - E) TdTomato-/EGFP- 신경교종 세포의 시퀀싱은 Nf1 및 Trp53에서 InDel을 나타낸다. 서열번호:3, 서열번호:4, 서열번호: 5, 서열번호:6, 최상부에서 최하부, 각각.
 - F) 공-EP된 PCR-유래된 sgRNA와 TagBFP2-V5 리포터 및 Cas9의 MADR 삽입은 양쪽 반구의 관상 단면에서 3개 유전적 리포터-정의된 개체군의 표지화를 통해서 관찰가능한 고급 신경교종을 산출한다. 스케일 바, 1000 μ m
 - G) 신경교종 세포는 상당한 이질성의 작은 주머니를 지닌 주로 Olig2+이다 (백색 화살표). 스케일 바, 1000 μ m
 - H) **도 3G**에서 백색 화살표로 지정된 영역에 집중하는 고 배율 Olig2 및 tdTomato 이미지.
- 스케일 바, 100 μ m
- I) CD44 중간엽 종양 마커에 대하여 양성물을 논증하는 **도 3H**로부터 대강 인접한 섹션 및 영역에서 CD44 및 tdTomato 면역염색. 스케일 바, 100 μ m
 - J) SM-FP-myc 리포터 단백질 및 FNLS Cas9n 염기 편집기의 MADR을 위한 플라스미드.
 - K) sgRNA-표적화 부위 (녹색 문자)는 C->T 염기 변환을 유도시켜 (적색 소문자 'c'는 표적됨) Nf1, Trp53, 및

Pten에서 미성숙한 정지 코돈을 생산한다. 서열번호:7, 서열번호:8, 서열번호: 9, sgRNA 표적화 부위를 포함하는 최상부에서 최하부 서열, 각각. 서열번호:10, 서열번호:11, 서열번호:12, 서열번호:13, 서열번호:14, 서열번호:15, 최상부에서 최하부 펩타이드, 각각.

L) 공-EP된 PCR-유래된 sgRNA와 myc 리포터 및 FNLS Cas9n의 MADR 삽입은 관상 단면에서 3개 유전적 리포터-정의된 개체군의 표지화를 통해서 EP 2개월 후에 OPC 전구의 관찰가능한 확장을 산출한다. 스케일 바, 1000 μ m

M) myc+ 개체군을 보여주는 고 배율 tdTomato (1), EGFP (2), 및 Myc 태그 (3) 이미지. 스케일 바, 100 μ m

도 4, 패널 A 내지 L은, *Hras*^{G12V}와 생체내 MADR을 사용하는 체세포 신경교종의 생성이 이러한 종양유전자의 투약 효과를 나타내고 인간 종양융합 단백질이 뇌실막 종양을 생성하는 것을 묘사한다

A-B) E14.5 RCE +/- 어미에 MADR의 자궁내 EP를 위한 개략도

C) *Hras*^{G12V} 종양유전자를 지닌 RCE 마우스내 자궁내 EP는 침윤성 신경교종의 증거가 아닌 TagBFP+ 정상세포 *Rosa26*^{HrasG12V}의 모자이크 패치를 생산한다

D) 동형접합성 mt/mg 수용체 마우스에서 MADR 후 가능한 성과의 개략도

E) TagBFP2-*Hras*^{G12V} 종양유전자를 지닌 동형접합성 mt/mg 마우스의 P2 EP

F) *Hras*^{G12V} 종양유전자를 지닌 동형접합성 *Rosa26*^{mTmG} P2 새끼에서 산후 EP는 2개 상이한 종양 유형 (청색-단독 *Rosa26*^{HrasG12V X2} 및 청색-및-녹색 *Rosa26*^{HrasG12V X1})을 생산한다 스케일 바: 2mm

G) EP 3개월 후 동형접합성 mTmG내 대표적 종양 형성. 청색-단독 *Rosa26*^{HrasG12V X2} 세포는 청색-및-녹색 *Rosa26*^{HrasG12V X1}보다 종양의 더 큰 섹션을 차지하여, 인-Rb1 단백질 발현과 상관한다. 스케일 바: 1mm

H) G로부터 영역 1 및 2의 줌-인 이미지는 인산화된-Rb1 발현이 주로 청색-단독 세포와 상관한다는 것을 보여준다. 스케일 바: 50 μ m

I) 뇌실막세포종-연관된 융합 단백질의 발현을 위한 플라스미드 개략도

J) YAP1-MAML1D; p16/p19 Cas9 표적화 유도된 뇌실막세포종형 종양의 스티치.

K) 뇌실막세포종 MADR 모델 마우스의 생존 분석

L) 3 개월령 C11orf95-RELA; p16/p19 Cas9-표적된 마우스내 뇌실막세포종형 종양

도 5, 패널 A 내지 Q는, 소아 GBM에서 관찰된 재발성 돌연변이를 활용하는 MADR 신경교종 모델의 생성이 인간 아형과 일치하는 표현형을 산출한다는 것을 묘사한다

A) 다발성 재발성 소아 신경교종 드라이버 돌연변이를 이용한 MADR을 위한 공여자 플라스미드의 개략도

B) 선조 및 피질 배아 틈새를 동시에 표적화하는데 이용된 플라스미드 전달 및 전극 스위치의 개략도

C) 표적되는 각각의 피질 (마그네타) 및 선조 (오렌지) 배아 틈새를 보여주는 B로부터 확대된 도

D) EP 100일 후 이형접합성 mTmG내 대표적 종양. 핵 EGFP+ *Rosa26*^{H3f3a-K27M/Pdgfra/Trp53} 세포는 큰 선조 종양을 형성한다. 인서트 D-1은 상당한 피질 침윤의 부족을 보여준다.

E) 한배새끼 *Rosa26*^{H3f3aG34R/Pdgfra/Trp53}은 줄무늬체 및 피질에서 아교 과형성을 나타내지만 종양은 분명하지 않다.

F) EP 120일 후에 K27M 종양은 주로 피질하이다.

G) EP 120일 후에 피질로-침윤하는 G34R 종양.

H-I) 저 배율 (H), 및 고 배율 (I)에서 K27M 종양의 공초점 병리학.

J) G34R 종양의 저 배율 병리학.

K) Pdgfra D842V 및 Trp53 R270H를 모두 함유하는 H3.3. 그룹 (WT-청색, K27M-녹색, 및 G34R-적색)에 걸친 생

존의 비교.

L) K27M의 부위 대 G34R 종양의 차트. *-G34R 그룹에서 종양 성장의 나중 착수 그리고 그들의 일치하지 않는 생존 시간 때문에, 우리는 초기 종양 부위를 확실하게 규명하기 위해 사멸 전에 7개 G34R 샘플들 중 2개를 수집할 수 없었다.

M-N) K27M 및 G34R 플라스미드의 공-전기천공을 위한 실험적 개략도

O-P) 순차적 섹션에서 공-EP된 종양의 G34R 및 K27M 면역염색. (인셋에서 보여진 SM_FP-myc.)

Q) 종양으로부터 정규화된 세포 카운트의 정량화

도 6, 패널 A 내지 L은, MADR 신경교종 모델의 단일-세포 RNA-시퀀싱-기반된 분석을 묘사한다

A) 세포 해리 및 scRNA-seq의 개략도

B) (Filbin 등, 2018)로부터 HVG 프로그램 P1-4에 기반된 클러스터에 의해 착색된, 3개 별개의 종양으로부터 3개 MADR 마우스 K27M scRNA-seq 데이터세트의 CCA 정렬을 묘사하는 UMAP

C) 마우스 K27M 세포의 비편향된 클러스터링에서 출현하는 마커 유전자를 묘사하는 히트맵

D) 마우스 K27M 종양의 CCA로부터 프로그램 및 발현 특징도.

E) 클러스터에 의해 착색된, 6개 별개의 종양 (Filbin 등, 2018)으로부터 6개 인간 K27M 데이터세트의 CCA 정렬을 묘사하는 UMAP

F) 인간 K27M 세포의 비편향된 클러스터링에서 출현하는 마커 유전자를 묘사하는 히트맵

G) 인간 K27M 종양의 CCA로부터 프로그램 및 발현 특징도.

H) 클러스터에 의해 착색된, 3개 MADR 마우스 K27M 데이터세트 및 6개 인간 K27M 데이터세트 (Filbin 등, 2018)의 CCA 정렬을 묘사하는 UMAP

I) 조합된 마우스 및 인간 K27M 종양의 CCA로부터 프로그램 및 발현 특징도.

J) 샘플에 의해 착색된 마우스 및 인간 뇌로부터 9개 K27M 데이터세트의 CCA 정렬을 묘사하는 UMAP

K) (Filbin 등, 2018)로부터 유전자 목록을 사용하는 히트맵은 쥐와 및 인간 K27M 신경교종 세포들 사이에서 유전자 발현의 높은 일치도를 나타낸다.

L) scRNA-seq 유래된 증식 매트릭스는 마우스 및 인간 샘플에 걸쳐 비교가능하다

도 7, 패널 A 내지 N은, H3.3 K27M 전사적 네트워크 및 snATAC-seq 분석을 묘사한다

A) 인간 K27M 세포의 SCENIC 2원 레굴론-기반된 클러스터링에서 출현하는 마커 유전자를 묘사하는 히트맵

B) 마우스 K27M 세포로부터 SCENIC 히트맵

C) 인간 K27M 샘플로부터 EZH2, E2F1, MYBL1, 및 BRCA1에 대하여 레굴론 발현을 묘사하는 2원화된 t-SNE

D) 마우스 K27M 샘플로부터 Ezh2, E2f1, Mybl1, 및 BRCA1에 대하여 레굴론 발현을 묘사하는 2원화된 t-SNE

E-F) C 및 D에서 유전자에 대하여 mRNA 발현 특징도를 묘사하는 t-SNE. C 및 D에서 레굴론과 비교된 클러스터 특이성의 부족을 유의한다.

G-H) 세포 유형-특이적 상향조절 NANOG, OCT4, SOX2, MYC 표적 유전자, 그리고 배아 줄기 세포 (ES)-연관된 유전자 세트 및 인간 세포 (G)에 대하여 PRC2, SUZ12, EED, 및 H3K27-결합된 유전자 세트 및 마우스 (H)에서 상사 유전자/유전자세트의 과소발현을 묘사하는 t-SNE 특징도.

I) snATAC-seq 샘플 제조의 개략도

J) P50, K) E18) 및 L) K27M 마우스 뇌로부터 sc- 및 snATAC 데이터세트의 tSNE

M) snATAC-seq K27M 종양 세포로부터 MSigDB 항목

N) snATAC-seq, scATAC-seq, 및 벌크 ATAC-seq의 게놈 브라우저 정렬. *-종양 MG는 K27M 세포로 포획된 snATAC-seq 소아교 클러스터의 오버레이된 (적색/흑색) 정렬이다. NPC - 산후 신경 전구 세포; K27M ATAC - 벌

크 마우스 K27M 종양 세포.

도 8, 패널 A 내지 N은, 도 1에 관련된, FACS 분석, 비-클론성 개체군 수준에서 올바른 단백질 번역의 확인, 유도성 MADR, 및 MADR "프록시" 라인에 의해 이형접합성 *mTmG* mNSC내 MADR 효율의 측정을 묘사한다. 본 연구에서 이용된 재조합효소-발현 플라스미드 (및 미니서클)의 개략도

A) FACS 분석은 신경 줄기 세포에서 대략적 MADR 효율을 나타내지만, 그들의 촉매적 효율에서 Flp-2A-Cre와 Flp-IRES-Cre 사이에서 명백한 차이는 없다

B) 분류된 세포는 tdTomato 또는 EGFP가 아닌 *Hras*^{G12V}를 발현시킨다. 스케일 바, 50 μm

C) FACS- 음성 개체군에서 비-클론성 응집체 세포로부터 정상 이식유전자 생산 및 이의 부족을 나타내는 웨스턴 블랏. tdTomato 발현의 제거는 또한 관찰된다.

D) 지적된 부위에 PCR 분석에 적용된 플라스미드 및 대립유전자의 개략도.

E) PCR 스크리닝 분석은 rtTA-V10-AU1 카세트가 푸로마이신 치료에 저항성인 세포에서 CAG-프로모터의 하류에 올바르게 통합되는 것을 나타낸다

F) 독시사이클린 유도시 rtTA-V10-AU1 및 또한 EGFP의 발현을 보여주는 도 2C로부터 세포주의 웨스턴 블랏 분석

G) MADR-상용성 TRE-EGFP 플라스미드

H) 이형접합성 *mTmG* mNSC는 푸로마이신으로 치료된 G에서 플라스미드로 뉴클레오펙션되고, 무색 개체군으로 변환한다. 스케일 바: 10 μm

I) rtTA-V10-AU1을 구성적으로 발현하는 세포주에서 EGFP 발현의 유도. 스케일 바: 50 μm

J) 독시사이클린 치료시 EGFP 및 D111을 발현시키는 양방향 tet-반응 요소를 지닌 TRE 세포주

K) Dox가 있거나 없는 세포의 면역형광은 EGFP 및 mD111의 누출도 및 동질 발현 수준의 상대적 부족을 논증한다. 스케일 바: 20 μm

L) 배지에 Dox 첨가 전 및 후 mRNA 풍부도의 qPCR 측정. (Ctrl 플라스미드는 mD111 CDS가 부족하지만 달리 K에서 플라스미드와 동일하다.)

M) 시험관내 MADR 작제물 테스트를 위한 mT/mG-기반된 "프록시" 세포주. 마우스 N2a 세포는 ROSA26 mT/mG를 조작하는데 사용된 동일한 플라스미드로 CRISPR/Cas9-의존적 상동성 의존적 복구 (HDR)를 경험하였다. 후속 MADR 형질도입 및 분류하기는 대안적 리포터 라인을 클로닝하는데 사용되었다.

N) 마우스 N2a 세포는 ROSA26 좌위에서 CAG-LF-mTFP1의 안정적 삽입으로 창출되었다. Flp0-2A-Cre 및 pDonor mScarlet은 이 라인의 dRMCE를 논증하는데 사용된다.

도 9, 패널 A 내지 N은, 도 2에 관련된, 통합의 특이성을 확인하는 생체내 MADR 및 대조군 실험의 특성규명을 묘사한다

A) EP 2일 후에, 세포는 TagBFP2 발현하기를 시작한다. 스케일 바: 50 μm; 인서트: 10 μm

B) EP 2주 후 아교생성 및 방사성 아교. 화살표는 VZ에서 회귀 녹색-및-청색 이중 양성 세포를 나타낸다. 양쪽 마커를 지닌 뉴런은 이 시점에 OB에서 관찰될 수 있다. 스케일 바: 100 μm; 인서트: 20 μm

C) EP 1주 후 EGFP (mG) 및 TagBFP (MADR) 세포를 보여주는 공초점 z 스택의 프로젝션.

D) C에서 묘사된 동일한 영역의 Foxj1 면역염색. VZ 영역을 따라 국소화된 핵 표지를 유의한다. * - "마우스 온 마우스" 면역염색으로 인한 혈관 염색.

E) EGFP (mG) 없음을 표시하는, MADR TagBFP 단일 양성 방사성 아교 세포.

F) 3개 MADR TagBFP 및 EGFP (mG) 이중-양성 세포-모두 Foxj1 전사 인자를 발현시킴. TagBFP와 EGFP 발현의 역 상관관계가 있는 것으로 보이는 것을 유의한다.

G) 가장 밝은 MADR 표지화를 지닌 세포가 가장 어두운 EGFP를 갖는다는 것을 보여주는 F로부터 백색 박스의 배율.

- H) tdTomato 및 EGFP에 대하여 음성인, TagBFP2+ 위성 아교의 쌍의 고-배율 공초점 이미지. 스케일 바: 10 μ m
- I) 도 2D에서 묘사된 플라스미드 적정 정량의 VZ로부터 SM_FP-HA (공여자), EGFP (mG), 및 TagBFP2-nls (청색)의 대표적 이미지
- J) hyPBase-통합된 EGFP 리포터를 지닌 VZ/SVZ에서 EP-된 세포 더하기 다양한 공여자 벡터 및 재조합효소의 계통 추적은 EP 2주 후까지 임의의 통합을 보여주지 않는다. 스케일 바: 100 μ m
- K) 반전된 loxP 배향을 지닌 공여자 벡터는 Hras^{G12V}를 발현시키는데 실패하고 과형성을 생산하지 않는다. (동일한 시점에 통합된 플라스미드의 비교를 위하여, 도 11A 참고.) 스케일 바: 100 μ m. 서열번호:16, 서열번호:17, 최상부 및 최하부, 각각.
- L) Alexa 750 형광단을 사용하는 증가하는 스펙트럼적 유연성에 대하여 5가지 색상 이미지화의 예.
- M) 405 채널에서 항-EGFP, 488 채널에서 항-Olig2, 및 555 채널에서 항-Pdgfra로 면역염색된 mT/mG 뇌의 스티치. H1) 강렬한 tdTomato 자가형광을 유의한다.
- N) 상당히 감소된 mT tdTomato 자가형광을 보여주는, 동일한 뇌 표백후 스티치 I1) 표백으로 인해 488 파장에서 검출가능한 EGFP 신호의 유사한 부족을 유의한다.
- 도 10, 패널 A 내지 G는, 도 3에 관련된, 생체내 MADR 기능상실 계통의 특성규명 그리고 CRISPR과의 비교를 묘사한다
- A) EP 3개월 후에, TagBFP2 리포터에 묶인 멀티-miR-E를 발현시키는 세포는 주로 Pdgfra+ OPC이다. 스케일 바: 100 μ m
- B) 멀티-miR-E MADR 마우스의 후구에서 TagBFP2+ 뉴런.
- C-D) Nf1, Trp53, 및 Pten의 에피소적 Cas9-매개된 멀티플렉스 돌연변이는 백질관 근처 국소화된 Olig2+ 종양에 piggyBac- 전위된 EGFP+ 세포의 형질전환을 산출한다.
- E) V5⁺ 종양-유래된 세포 개체군은 종양의 초점 영역에서 Tdtomato+ 혈관구조에 병치되어 발견될 수 있다.
- F) 시퀀싱된 애플리콘의 계통성 정렬을 사용하여 Pten에서 미성숙한 정지 코돈을 유도하기 위한 염기 편집의 확인.
- G) Crispri (dCas9-KRAB-MeCP2) 또는 Cas13/RX에 의한 녹다운을 위하여, 또는 HiFi EspCas9로 녹아웃/계놈 편집을 위하여 생성된 MADR CRISPR/Cas9 변이체. 적절한 sgRNA 변이체를 발현시키기 위한 U6/miRFP670 리포터 플라스미드는 끊임없는 sgRNA 클로닝 및 발현에 대하여 BsmBI 유형 II 제한 효소를 위한 부위로 작제되었다. CS - 이중 BsmBI 클로닝 부위
- 도 11, 패널 A 내지 L은, 도 4에 관련하여, MADR 신경교종 및 뇌실막세포종 세포 운명 변화 및 이동성 역학의 검사를 묘사한다
- A) TagBFP2+ 영역에서 Sox9/Gfap+ 신경아교종을 나타내는 RCE-기반된 Hras^{G12V} 모자이크.
- B1 & B2) Ribotrap 이형접합체를 사용하는 직교 RNA 단리 또는 계통 추적 연구를 허용하기 위해 생체내 MADR과 잠재적으로 상용성인 마우스 라인. 추가적으로, 이 방법은, 예로서, 중요한 엑손 주위 loxP 및 FRT를 축적하는 수천의 유전자-트랩 마우스로 확장할 수 있다. 그러한 좌위에 생체내 MADR은 i) 좌위에 이형접합성/동형접합성 무표지 세포의 계통 추적, 뿐만 아니라 ii) 이식유전자로 좌위를 스와핑할 것이다. B1) 서열번호:18 - 최소의 FRT 서열, 서열번호:19 - FRT 서열, 서열번호:18 - 최소의 FRT 서열, 서열번호:18 - 최소의 FRT 서열, 서열번호:18 - 최소의 FRT 서열, 최상부에서 최하부, 각각. B2) 서열번호:18 - 최소의 FRT 서열, 서열번호:18 - 최소의 FRT 서열, 최상부 및 최하부, 각각
- C) EP 2주 후는 tdTomato 카세트의 Cre-매개된 절제를 경험한 EGFP+ 세포와 성공적 MADR을 지닌 Hras^{G12V+} 세포 사이의 명확한 계통 분기를 보여준다. 스케일 바: 100 μ m
- D) EP 혼합물에서 10 ng/ μ l만큼 낮은 재조합효소-발현 벡터는 MADR을 생체내 축매화시킬 수 있다. 스케일 바: 100 μ m

- E)** pBase-매개된 통합후 더 밝은 *EGFP-Hras*^{G12V} 세포는 인산화된 Rb1을 발현시킨다. 스케일 바: 200 μm
- F-J)** pDonor- (E) Kras G12A, (F-G) YAP1-MAML1D, 또는 (H) C11orf95-RELA의 전기천공 1개월 후 선조 아교생성.
- K-L)** 이들 종양의 침윤의 부족을 표시하는 변연을 밀어내는 뇌실막세포종의 고 배율.
- 도 12, 패널 A 내지 X는, 도 5와 관련된, 멀티-시스트론성 종양, 이차 요소, 및 생존력 스크린의 특성규명을 묘사한다
- A)** 이형접합성 mTmG mNSC에서 MADR 후 이식유전자 발현의 시험관내 사정은 *Pdgfra*, V5 (*Trp53*^{R270H}), 및 P53과 핵 EGFP의 공- 발현을 보여준다. tdTomato 또는 이식유전자 발현 없이 막 EGFP로 mG 세포 오염의 존재를 유의한다. 스케일 바: 50 μm
- B)** 핵 EGFP (H3f3a)와 *Trp53* 공-발현의 확인. 스케일 바: 50 μm
- C)** K27M-발현 계통 (핵 EGFP; 및 mG EGFP - 막 EGFP)의 사전-종양 상을 표시하는 관상 단면
- D-G)** 적절한 항체로 특이적 면역표지화에 의한 각각의 이식유전자의 발현을 확인하는, 항-H3mutK27M 및 항-H3mutG34R 항체로 K27M (**D,G**) 및 G34R (**E-F**) 종양의 면역염색.
- H)** 공-전기천공된 동물에서 K27M 및 G34R (K27M- 및 G34R-함유 플라스미드)의 이중 면역염색은 세포 당 단 1개 H3f3a 돌연변이체 변이체의 발현을 확인한다.
- I)** *Rosa26*^{H3f3aG34R/Pdgfra/Trp53} EGFP+ 종양 세포는 H3K27에 저메틸화된다.
- J)** 종양 변연의 고 배율 도.
- K)** K27M 돌연변이체 종양 세포의 면역표지화는 이웃한 뉴런과 비교해서 핵주위 위성증 그리고 감소된 H3K27Me 표지화를 논증한다.
- L)** GBM을 유도하기 위한 *Nf1/Trp53*의 CRISPR/Cas9 표적화는 감소된 H3K27Me3을 산출하지 않는다
- M-N)** H3K27Ac는 종양 세포에서 관찰되지만 표지화의 강도는 둘러싸는 야생형 세포와 비교해서 현저히 증가되지 않는다.
- O-Q)** K27M 종양 세포에서 *Bmi1* 상향조절의 저 배율 (**O-02**) 및 고 배율 이미지 (**P-Q**). 화살표는 침윤하는 세포를 가리키고 점선은 종양 변연을 묘사한다. **P)** 침윤하는 K27M 세포가 용기에 병치됨을 보여주는 O-01내 영역의 최대 프로젝션.
- R)** 변연에서 서브세트 K27M 및 G34R 돌연변이체 세포는 정상세포 마커 *Aldh1l1*으로 면역표지화중일 수 있고 비대를 표시한다.
- S)** K27M 및 G34R 돌연변이체 세포의 하위개체군은 회소돌기아교세포 마커 *Cspg4*를 발현시킨다.
- T)** Akaluc를 이용한 종양 성장의 비-침윤성 이미지화 및 신경교종의 동시 생성을 위한 MADR 플라스미드의 개략도.
- U)** T로부터 플라스미드로 전기천공된 그리고 아칼루민으로 주사된 한배새끼 옆에 대조군 동물.
- V)** 상이한 형광성 단백질로 세포 사이클 이벤트의 식별을 위하여 PIP 데그론 융합 및 hGEM1/110 융합을 함유하는, MADR FUCCI 변이체. 변이체는 또한 근적외선 형광성 단백질로 세포 사이클 이벤트의 경계구분 및 신경교종의 동시 생성을 위하여 생성되었다. 이미지는 Venus/mCherry MADR FUCCI 플라스미드의 안정적 삽입이 있는 N2a 프록시 라인을 보여준다.
- W)** tdTomato+ NPC 및 EGFP+ 종양 개체군의 과생을 위한 개략도는 동시 "페어링된" 독성 스크리닝에 대하여 동일한 현미해부를 형성한다.
- X)** Akt1/2 키나아제 억제제는 양쪽 NPC 및 MADR K27M 개체군에서 증식을 감소시키고 한편 *Vacquinol-1*은 K27M 종양 개체군에서 우선적으로 증식을 감소시킨다. 결과는 4개 생물학적 복제물로부터 조합되고 각 세포 유형의 2개 독립적 라인을 대표한다.

도 13, 패널 A 내지 M은, 도 6에 관련된, MADR 돌연변이체 모델의 단일-세포 RNA-seq를 묘사한다

A) 3개 마우스 K27M 종양 scRNA-seq 데이터세트의 CNV 분석

B) 마우스 K27M 종양의 CC1 및 CC2 벡터 정렬

C) CC에 걸친 마우스 K27M 종양의 이중가중치 중간상관 플롯

D) 샘플에 의해 착색된 마우스 뇌로부터 3개 K27M 데이터세트의 CCA 정렬을 묘사하는 UMAP

E) 마우스 K27M 종양에서 유전자의 발현을 묘사하는 특징도.

F) Filbin 등 (*Science* 2018)으로부터 인간 K27M scRNA-seq 종양의 루벡 클러스터링.

G) CSF1R 및 H) MOG 발현 맵은 CCA로 움직이기 전에 여과되는 클러스터를 묘사함.

I) 여과후 인간 K27M 종양의 클러스터링.

J) CC에 걸친 인간 K27M 종양의 이중가중치 중간상관 플롯

K) 샘플에 의해 착색된 CCA 정렬 인간 K27M 종양의 UMAP.

L) 인간 K27M 종양에서 유전자의 발현을 묘사하는 특징도.

M) 모든 샘플 (즉, 도 6H)의 CCA로부터 갈라진 그리고 본래 샘플에 의해 묘사된 프로그램 특징도. Filbin 등 (*Science* 2018)으로부터 프로그램보다 오히려 고도로-가변적 유전자에 의한 클러스터링은 선택된 클러스터링 파라미터에 의존하여 약간 변경된 클러스터링을 초래한다.

도 14, 패널 A 내지 Z는, 도 7에 관련된, MADR 돌연변이체 모델의 SCENIC, H3K27me3 ChIP-seq, 및 snATAC-seq 분석을 묘사한다

(A,C,E,G,I) SCENIC 처리된 K27M 인간 종양 세포의 t-분포 확률적 이웃 임베딩 (t-SNE) (B,D,F,H,J) K27M 마우스 종양 세포의 SCENIC-유래된 t-SNE. 샘플은 샘플 (A,B; 즉 본래의 환자 또는 마우스), 세포 유형 (C,D), S-상 스코어 (E,F), G2M-상 스코어 (G,H), 및 중첩하는 세포 사이클 상 (I,J)에 의해 그룹화된다.

K) H3K27Me3에 대하여 종양 해리 및 하류 분석 예컨대 scRNA-seq, scATAC-seq, 또는 ChIP-seq를 위한 일반 위크플로우. 동일한 종양 공급원이 scRNA-seq 분석 및 ChIP-seq에 사용되었지만 독립적 종양이 scATAC-seq 샘플에 사용되었음을 유의한다.

L) 3개 마우스 K27M 종양으로부터 H3K27Me3 ChIP-seq 데이터의 클러스터링

M) L에서의 클러스터로부터 유전자에 대하여 scRNA-seq-유래된 UMAP의 스코어링

N) 넘버링된 클러스터를 지닌 P50 뇌로부터 scATAC-seq 데이터세트의 tSNE

O) 희소돌기아교세포 (Mog), OPC (Pdgfra), 정상세포 (Aqp4), 미세아교세포 (C1qb), 뉴런 (Snap25), 및 인터뉴런 (Gad2, Pvalb, Sst) 개체군에 대한 마커 유전자. 각 클러스터에 대하여 별개의 신호 대 잡음을 유의한다.

P) 표준 클러스터링 후 E18 뇌로부터 3개 조합된 scATAC-seq 데이터세트의 tSNE

Q) P 조화후 정렬로부터 샘플의 tSNE

R) 넘버링된 클러스터를 지닌 E18 데이터세트의 tSNE

S) Sox9 (정상세포/줄기 세포), Olig2 (줄기 세포/희소돌기아교세포 계통), Csf1r (미세아교세포), 및 Gfap (정상세포)에 대한 유전자 접근가능성. 별개의 개체군에 더욱 배타적이고 아교 클러스터와 용이하게 회합하는, Gfap와 비교해서 Sox9 및 Olig2의 미세아교세포 또는 아교 특이성에 대하여 명확한 개체군/클러스터 격리의 부족을 유의한다.

T) K27M 종양 세포 및 공-포획 선천적 면역 개체군에서 유래된 scATAC-seq 데이터세트의 tSNE

U) Sox9, Olig2, Csf1r, 및 Gfap에 대하여 유전자 접근가능성. 재차, 더 많은 접근가능성을 나타내는, Gfap와 비교해서 Sox9 및 Olig2의 명확한 개체군/클러스터 격리의 부족을 유의한다. Csf1r은 Sox9 및 Olig2보다 주목할 만하게 더욱 접근가능하고 선천적 면역 클러스터와 회합된다.

V) K27M 종양 개체군의 CisTopic 및 CellRanger-기반된 클러스터링은 종양 및 면역 개체군의 묘하게 상이한 서

브클러스터링을 초래한다.

W) 유전자 접근가능성은 미세아교세포성 개체군을 명확하게 정의하지만 Sox9 및 Sox10은, P50 정상 뇌와 달리, 종양에서 공-격리하는데 실패한다.

X) Sox10 (녹색) 및 Sox9 (적색)를 블렌딩하는 K27M scRNA-seq 특징도는 Sox10 및 Sox9가 종양 클러스터 내내 그리고 심지어 **W** 및 게놈 브라우저 데이터 (**도 7N**)에서 유전자 접근가능성에 따라서 개별 세포 내에서 고도로 발현되는 것을 논증한다

Y) P50 정상세포 및 OPC 클러스터를 위한 mSigDB 항목

Z) K27M 종양 클러스터로부터 DAR에서 풍부화된 모티프. IEG 및 ES-연관된 TF의 풍부화를 유의한다. **1.** 서열번호:20; **2.** 서열번호:21; **3.** 서열번호:22; **9.** 서열번호:23; **12.** 서열번호:24; **30.** 서열번호:25; **41.** 서열번호:26; **56.** 서열번호:27; **61.** 서열번호:28; **62.** 서열번호:29; **64.** 서열번호:30; **71.** 서열번호:31; **85.** 서열번호:32; **86.** 서열번호:33; **89.** 서열번호:34; **100.** 서열번호:35.

도 15는 2개 수용체 HEK 프록시 세포주 및 2개 pDonors mScarlet, 및 그래서, 4개 실험적 조건에서 MADR, SEMI-잠금 "loxP" MADR, 및 "loxP" MADR에서 잠금에 대하여 테스트된 조건의 개략도를 묘사한다.

도 16은 IncuCyte 시간-경과 현미경으로 형질감염 18 및 24 시간 후 "loxP" MADR-1에서 보통 MADR 및 SEMI-잠금을 묘사한다 (RE-loxP 돌연변이체에서 적색 형광성 세포의 증가를 유의한다).

도 17은 IncuCyte 시간-경과 현미경으로 형질감염 18 및 24 시간 후 "loxP" MADR에서 잠금 그리고 "loxP" MADR-2에서 SEMI-잠금을 묘사한다 (RE-loxP 돌연변이체 + LE-LoxP 수용체 조건에서 적색 형광성 세포의 증가를 유의한다)

도 18은 MADR-1에서 SEMI-잠금, MADR에서 잠금, MADR 및 "loxP" MADR-2에서 SEMI-잠금의 스피드 및 효율을 묘사하는 결과의 요약을 묘사한다. (돌연변이된 공여자를 지닌 양쪽 조건이 더 양호한 MADR 삽입을 나타냈다는 것을 유의한다.)

도 19는 MADR-1에서 SEMI-잠금 및 "loxP" MADR에서 잠금의 비교를 묘사한다.

도 20A 및 20B는 형질감염 18, 24, 30 및 36 시간 후에 MADR-1에서 SEMI-잠금, MADR에서 잠금을 묘사하고, 이는 야생형 LoxP 부위에 비교해서 MADR 효율의 현저한 증가를 표시한다.

도 21은 결합 특성에 의한 MADR에서 QUASI 잠금을 묘사한다.

도 22는 "FRT" MADR-1에서 SIMI-잠금 및 MADR에서 Quasi-잠금의 비교를 묘사한다.

도 23은 IncuCyte 시간-경과 현미경으로 형질감염 12, 16, 및 20 시간 후 "FRT" MADR-1에서 SEMI-잠금, Quasi-잠금을 묘사한다. RE-loxP 돌연변이체+LE-FRT 돌연변이체를 운반하는 pDonors를 이용한 MADR 삽입의 더 빠른 것 그리고 증가를 유의한다). 화살촉은 적색 형광성 세포를 묘사한다.

도 24는 MADR mT/mG 수용체 세포주 및 묘사된 플라스미드 요소들을 지닌 시험관내 AAV를 사용하여 대표적 바이러성 MADR을 묘사한다. 2개 AAV 바이러스가 사용되었고, 하나는 FlpO-2A-Cre를 발현시키고 한편 다른 것은 비-발현된 (반전된) TagBFP 리포터 유전자를 갖는다. TagBFP가 홀로 세포에 형질도입되는 경우, 발현되는 것으로 보이지 않는다. 하지만, FlpO-2A-Cre 바이러스의 존재 하에서, MADR 수용체 좌위를 지닌 세포는 tdTomato 및 EGFP 이식유전자의 발현을 상실하는 것으로 보이고 TagBFP를 발현하기 시작한다.

도 25는 AAV pDonor CMV RevOrientation TagBFP2 3Flag + AAV FlpO Cre를 묘사한다. mTmG 마우스에서 형질도입 30 일 후 (이 조건에서만 많은 청색 자가형광성 뉴런성 세포체의 존재를 유의한다).

도 26은 AAV pDonor CMV RevOrientation TagBFP2 3Flag 음성 대조군을 묘사한다 (tagBFP 자가형광 또는 Cre 재조합 [즉 EGFP] 없음을 유의한다)

도 27은 AAV FlpO Cre 음성 대조군을 묘사한다 (Cre 재조합으로부터 광대한 EGFP 그러나 TagBFP 없음을 유의한다).

도 28은, 인간 유도된 다능성 줄기 세포에서 검증된, 기능 MADR 카세트, AAVS-pACT-loxP-TagBFP-V5-nls WPRE FRT를 도시한다.

도 29는 마우스 뇌에서 생체내 검증된 MADR, GLAST-Flp-Cre 및 GFAP-Flp-CRE의 조직-특이적 작용을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**[0016] 발명의 설명**

[0017] 당업자는, 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는, 본원에 기재된 것들에 유사하거나 동등한 많은 방법 및 물질을 인식할 것이다. 정말로, 본 발명은 기재된 방법 및 물질에 어떤 식으로든 제한되지 않는다. 본 발명의 목적을 위하여, 하기 용어들은 아래 정의된다.

[0018] 본원에 사용된 경우에 용어 "약"은 참조된 숫자 표시와 관련하여 사용된 때, 달리 본원에 구체적으로 제공되지 않는 한, 참조된 숫자 표시 플러스 또는 마이너스 참조된 숫자 표시의 최대 5%를 의미한다. 예를 들어, 언어 "약 50%"는 45% 내지 55%의 범위를 포함한다. 다양한 구현예에서, 용어 "약"은 참조된 숫자 표시와 관련하여 사용된 때, 청구항에 구체적으로 제공되면, 참조된 숫자 표시 플러스 또는 마이너스 그 참조된 숫자 표시의 최대 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 또는 0.25%를 의미할 수 있다.

[0019] 일부 구현예에서, "대조군 요소"는 프로모터 영역, 폴리아데닐화 신호, 전사 종결 서열, 상류 조절 도메인, 복제의 기원, 내부 리보솜 진입 부위 ("IRES"), 인핸서, 및 기타 등등을 집합적으로 지칭하고, 이는 수용체 세포에서 코딩 서열의 복제, 전사 및 번역을 집합적으로 제공한다. 선택된 코딩 서열이 적절한 숙주 세포에서 복제, 전사 및 번역될 수 있는 한, 이들 대조군 요소들의 모두가 항상 존재할 필요는 없다.

[0020] 본원에 사용된 경우에 재조합효소 인식 부위에 관하여 "페어링된"은 2개 재조합효소 인식 부위로, 인용된 유전적 요소 (예를 들면, 관심의 유전자, 프로모터 또는 다른 조절 요소)에 대한 1개 5' 그리고 명시된 유전적 요소에 대한 1개 3'를 지칭한다. 페어링된 재조합효소 인식 부위는 동일할 수 있고 (예를 들면, LoxP-LoxP), 야생형 및 변이체 부위 (예를 들면, LoxP-Lox71 또는 그 반대), 또는 야생형 또는 변이체 (예를 들면, FRT-LoxP 또는 FRT-Lox66)이든 2개 상이한 기원의 부위를 포함한다. 야생형 LoxP는 서열 ATAACCTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT (서열번호:17)를 포함한다. 야생형 FRT는 서열 GAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAAGTTC (서열번호:18)를 포함한다. 이들 서열의 변이체는 하나 이상의 뉴클레오타이드에 의해 가변하는 임의의 서열이고 그 재조합효소 (예를 들면, Lox 부위의 경우 Cre 그리고 FRT 부위의 경우 플립과아제)에 의해 절단될 수 있다. 특정 구현예에서, 그러한 변이체는 더 낮은 효율로 그들의 재조합효소에 의해 절단될 수 있다.

[0021] 일부 구현예에서, "프로모터 영역"은 DNA 조절 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 영역을 지칭하기 위해 그 보통 의미로 본원에 사용되고, 여기서 조절 서열은 RNA 폴리머라제를 결합시킬 수 있고 하류 (3'-방향) 코딩 서열의 전사를 개시할 수 있는 유전자에서 유래된다.

[0022] 일부 구현예에서, "작동가능하게 연결된"은 그렇게 기재된 구성요소들이 그들의 평소 기능을 수행하기 위해 구성되는 요소들의 배열을 지칭한다. 그래서, 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 대조군 요소는 코딩 서열의 발현을 유효화시킬 수 있다. 대조군 요소는, 이들이 이들의 발현을 지시하도록 기능하는 한, 코딩 서열과 연속적일 필요는 없다. 그래서, 예를 들어, 개재하는 미번역된 그러나 전사된 서열은 프로모터 서열과 코딩 서열 사이 존재할 수 있고 프로모터 서열은 코딩 서열에 "작동가능하게 연결된" 것으로 여전히 간주될 수 있다.

[0023] 일부 구현예에서, 공여자 벡터를 참고하여 본원에 사용된 경우에 "프로모터-없는"은 진핵성 프로모터를 갖지 않는 벡터를 지칭한다.

[0024] 세포를 이식유전자로 만드는데 사용하기 위한 외인성 핵산 및 벡터가 본원에 기재된다. 특정 구현예에서, 세포는 포유동물 세포이다. 특정 구현예에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 특정 구현예에서, 포유동물 세포는 다능성 능력을 지닌 인간 세포 예컨대 태아 세포, 배아 줄기 세포, 전구 세포 또는 유도된 다능성 세포이다. 특정 구현예에서, 이들 이식유전자 세포는 신경퇴행성 질환을 위한 요법으로서 알맞게 사용하는데 유용하다.

[0025] 일부 구현예에서, 핵산에 관하여 "외인성"은 핵산이 재조합 핵산 작제물의 일부이거나, 그 천연 환경에 있지 않다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 외인성 핵산은 또 다른 종에 도입된 1개 종으로부터의 서열, 즉, 이종 핵산일 수 있다. 전형적으로, 그러한 외인성 핵산은 재조합 핵산 작제물을 통해 다른 종에 도입된다. 외인성 핵산은 또한 유기체에 고유한 그리고 그 유기체의 세포에 재도입된 서열일 수 있다. 고유한 서열을 포함하는 외인성 핵산은 외인성 핵산에 연결된 비-천연 서열, 예를 들면, 재조합 핵산 작제물에서 고유한 서열을 증폭하는 비-고유한 조절 서열의 존재에 의해 자연 발생 서열과 종종 구별될 수 있다. 이밖에도, 안정적으로 형질전환된 외인성 핵산은 전형적으로 고유한 서열이 발견되는 위치 이외의 위치에 통합된다. 특정 구현예에서, 외인성 핵산은 "안전한" 작제물 부위에 표적된다. "안전한" 부위는 유전자 및 그들의 연관된 조절 서열이 없는 게놈성 영역이고, 정상 세포성 기능 방해 또는 세포의 중앙유전자적 형질전환 개시의 낮은 가망을 소유한다. 특정 구현예에서, 알려진

안전한 부위는 AAVS1 좌위이다. 외인성 요소는, 예를 들어 유전적 재조합을 사용하여 핵산 작제물에 첨가될 수 있다. 유전적 재조합은 유전적 정보의 신규한 세트를 인코딩하는 DNA의 새로운 분자를 형성하기 위한 DNA 가닥의 파괴 및 재결합이다.

[0026] 본원에 사용된 경우에, 용어들 "상동", "상동성", 또는 "퍼센트 상동성"은, 참조 서열에 비해, 핵산 서열을 기재하기 위해 본원에 사용된 때 Karlin 및 Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)에서와 같이 수정됨)에 의해 기재된 식을 사용하여 결정될 수 있다. 그러한 식은 Altschul 등 (J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990)의 기본 국소 정렬 검색 도구 (BLAST) 프로그램에 편입된다. 서열의 퍼센트 상동성은, 본원의 출원일 기준으로, BLAST의 가장 최근 버전을 사용하여 결정될 수 있다.

[0027] 본 개시내용의 핵산에 의해 인코딩된 폴리펩타이드가 본원에 또한 기재된다. 용어들 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기들의 중합체를 지칭하기 위해 교환가능하게 사용되고, 최소 길이에 제한되지 않는다. 항체 및 항체쇄 및 다른 펩타이드, 예를 들면, 링커 및 결합 펩타이드를 포함하는, 폴리펩타이드는 천연 및/또는 비-천연 아미노산 잔기를 포함하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 상기 용어들은 또한 폴리펩타이드의 발현후 변형, 예를 들어, 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 인산화, 및 기타 등등을 포함한다. 일부 양태에서, 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 폴리펩타이드는 고유한 또는 천연 서열에 관하여 변형을 함유할 수 있다. 이들 변형은, 부위-지향된 돌연변이생성을 통해서처럼, 고의적일 수 있거나, 예컨대 단백질을 생산하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오차를 통해서, 우연적일 수 있다.

[0028] 참조 폴리펩타이드 서열에 관하여 퍼센트 (%) 서열 동일성은, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해, 필요하면, 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 그리고 서열 동일성의 일부로서 임의의 보전적 치환을 고려하지 않고, 참조 폴리펩타이드 서열에서 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서 아미노산 잔기의 백분율이다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성 결정하기의 목적을 위한 정렬은 가령, 공공으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 알려지는 다양한 식으로 달성될 수 있다. 비교되는 중인 서열의 전장에 대해 최대의 정렬을 달성하는데 필요한 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터는 결정될 수 있다. 본원에서 목적을 위하여, 하지만, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 생성된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 Genentech, Inc.에 의해 저작되었고, 소스 코드는 미국 워싱턴 D.C. 저작권청, 20559에 사용자 문서첨부로 제출되었고, 여기에서 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되었다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아 사우스 샌프란시스코 Genentech, Inc.로부터 공공으로 이용가능하거나, 소스 코드로 컴파일될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은, 디지털 UNIX V4.0D를 포함하는, UNIX 작동 시스템에서 사용을 위하여 컴파일될 수 있다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고 가변하지 않는다.

[0029] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교에 이용되는 상황에서, (주어진 아미노산 서열 B에, 와, 또는 에 대해 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로서 대안적으로 문구화될 수 있는) 주어진 아미노산 서열 B에, 와, 또는 에 대해 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성은 다음과 같이 계산된다: 100 곱하기 분수 X/Y , 식중 X는 A 및 B의 그 프로그램의 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 동일한 매치로서 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에서 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않은 경우, A 대 B의 % 아미노산 서열 동일성이 B 대 A의 % 아미노산 서열 동일성에 같지 않을 것임이 인지될 것이다. 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 % 아미노산 서열 동일성 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 직전 단락에서 기재된 대로 수득된다.

[0030] 본원에 사용된 경우에 용어 "개체", "대상체", 및 "환자"는 교환가능하고, 신경퇴행성 질환으로 진단된, 상기 질환에 시달린 것으로 의심된, 또는 신경퇴행성 질환에 대하여 하나 이상의 위험-인자를 갖는 것으로서 선택된 개체를 포함한다. 특정 구현예에서, 개체는 포유동물이다. 특정 구현예에서, 개체는 인간이다.

[0031] GEMM-기반된 접근법은 번거로운 마우스 공학 및 상당한 교배를 여전히 수반한다. 반대로, 전기천공 및 바이러스성 유전자도입은 발달 및 질환에 대한 신속한 체세포 이식유전자 조사를 가능하게 했지만 GEMMS의 정밀도가 부족하다. 트랜스포존은 발달성 연구 및 생체내 중앙 모델링에서 안정적 체세포 이식유전자를 생산하는데 더욱 대증적이고 있다. 하지만, 이들 방법은 랜덤 게놈성 삽입, 이식유전자 섯다운을 포함하는 위치 효과 변동, 그리고 카피 수 가변성으로 고생한다. MADR은 이들 방법과 연관된 고유 단점을 극복하고, 사전정의된 삽입 부위 및 카피 수를 지닌 체세포 모자이크 창출하기 그리고 콜로니 유지의 무시할만한 양 요구하기를 위한 강력한 전략이다. 우리는 신속하고 유연하게 여러 중앙 드라이버에 대하여 돌연변이의 조합된 모드 (GOF/LOF)를 생성하

는 MADR의 범용성을 논증하였다.

[0032]

일 양태에서, 본원에서 본 방법은 조직의 숙주에서 모자이크 및 종양을 창출하기 위해 MADR을 활용한다. 추가적으로, 비-통합 바이러스성 벡터는 삽입적 돌연변이생성을 회피하기 위해 MADR 성분을 전달하는데 이용될 수 있었다. 생체내 유전적 조작 접근법의 비교가 표 1에서 제공된다. MADR 방법의 일부 구현예에서, 조작하기 위한 시간은 플라스미드 당 약 2 주이다. MADR 방법의 일부 구현예에서, 카피 수는 수용체의 집합성에 따라 1-2이다. MADR 방법의 일부 구현예에서, 육종은 표적 균주 당 1개 라인으로 수행된다. MADR 방법의 일부 구현예에서, 발현은 좌위 침묵화에 의존하여 일반적으로 안정적이다. MADR 방법의 일부 구현예에서, 페이로드는 플라스미드 한도에 의해 지배된다. MADR 방법의 일부 구현예에서, 초점성은 전극 배향에 의존한다. MADR 방법의 일부 구현예에서, 효율은 100% 삽입에 접근하기 위해 적정될 수 있다. MADR 방법의 일부 구현예에서, 이식유전자는 Flp/Cre 회색 전에 잠재적으로 안팎으로 호핑할 수 있다. 일부 구현예에서, MADR 방법은 다른 방법과 상용성/상보적, 예를 들면, CRISPR/Cas 변이체, HITI, Slendr, 및/또는 Base 작성기와 직교이다.

표 1. 생체내 유전적 조작을 위한 접근법의 비교

방법	GEMM	표준 EP	전치-매개된 EP	바이러스	CRISPR Cas9/Cpf1	HITI	SLENDR	염기 작성
조작 및 생성을 위한 시간	개월	~2 주 / 플라스미드	~2 주 / 플라스미드	>4-6 주	~2 주 / 플라스미드	~2 주 (플라스미드); 개월 (바이러스)	~2 주 (플라스미드); 개월 (바이러스)	~2 주 / 플라스미드
카피 수	1-2 / 녹-인	고도로 가변적	고도로 가변적 (최대 수백)	가변적이지만 아마 EP 보더 적음	1-2 그러나 용이하게 제어가능	1-2 그러나 용이하게 제어가능	1-2 그러나 용이하게 제어가능	1-2 그러나 용이하게 제어가능
육종	조건부 대립유전자에 대해 더욱 복잡	필요하지 않음	필요하지 않음	RCAS/Tva에만 필요	필요하지 않음	필요하지 않음	필요하지 않음	필요하지 않음
발현의 안정성	좌위 침묵화에 따라 일반적으로 안정적	회색 및/또는 침묵화 경향	침묵화 및 삽입적 효과 경향	침묵화 및 삽입적 효과 경향	돌연변이 부위 의존적 발현	삽입 부위 또는 융합 파트너 의존적 발현	삽입 부위 또는 융합 파트너 의존적 발현	돌연변이 부위 의존적 발현
페이로드	표적화 작제물에 의해 제한됨*	플라스미드 제한에 의해 전형적으로 지배됨*	플라스미드 제한에 의해 전형적으로 지배됨*	바이러스성 페이로드에 제한됨	플라스미드 제한에 의해 전형적으로 지배됨 그러나 바이러스성 변이체는 바이러스성 페이로드 영향받는다*	플라스미드 제한에 의해 전형적으로 지배됨 그러나 바이러스성 변이체는 바이러스성 페이로드 영향받는다*	플라스미드 제한에 의해 전형적으로 지배됨 그러나 바이러스성 변이체는 바이러스성 페이로드 영향받는다*	플라스미드 제한에 의해 전형적으로 지배됨 그러나 바이러스성 변이체는 바이러스성 페이로드 영향받는다*
초점성	시스 조절 요소에 의존한다	초점성은 전극 배향에 의존한다	초점성은 전극 배향에 의존한다	주사 부위로부터 단방향적 확산 패턴	초점성은 전극 배향 (플라스미드 버전) 또는 바이러스성 유포 (AAV/LV)에 의존한다	초점성은 전극 배향 (플라스미드 버전) 또는 바이러스성 유포 (AAV)에 의존한다	초점성은 전극 배향 (플라스미드 버전) 또는 바이러스성 유포 (AAV)에 의존한다	초점성은 전극 배향 (플라스미드 버전) 또는 바이러스성 유포 (AAV/LV)에 의존한다

[0033]

효율	전형적으로 100%	100%	100%	100%	100% 접근 그러나 표적의 및 이질성 불명확, 주로 LOF	전형적으로 <20% 그러나 이것에 도달하기 위해 미니서클 DNA 를 요구한다	전형적으로 <5%	최대 80% 그러나 표적의 및 이질성 불명확 특히 다중화 경우
기타 주석	돌연변이 혼합 및 매칭에 최소 순종적	플라스미드는 드물게 통합하거나 예상불가능하게 통합한다	무작위 삽입, 초생리학적 표현은 이식유전자에 안팎으로 호핑하여 침묵화될 수 있다	무작위 삽입, 잠재적 초생리학적 표현은 침묵화될 수 있고, 세포 면역율 고무할 수 있고, RCAS/Tva 모델은 >50,000 조류 바이러스 생산 세포의 주사를 종종 사용하여-- 잠재적 면역 상호작용 및 외상을 유발시킨다	면역원성, 확실히 계통 추적하기 어려움, 낮은 HDR 효율	다중화 돌연변이체 대립유전자 도전	다중화 돌연변이체 대립유전자 도전	면역원성 불명확, 돌연변이체 세포를 확실히 계통 추적하기 어려움

*BAC DNA 는 활용될 수 있다

**-.이것은 총 세포 수율을 감소시킨다

[0034]

[0035]

MADR 방법은 2개 상이한 재조합효소의 활용을 수반한다. 재조합효소의 발현을 구동시키는 프로모터들의 조합을 주의해서 선택함으로써 MADR 표적화의 세포 유형 특이성을 제한시킬 수 있다. 일부 구현예에서, *생체내* MADR은 박테리아성 인공 염색체로 수행된다. 형광성 리포터 또는 재조합효소, 예컨대 VCre의 발현을 구동시키는 계놈성 단편의 큰 덩어리를 보유하는 공여자 플라스미드는 각 말단에 첨가된 loxP 및 FRT 부위로 창출될 수 있어, 추가로 더 높은-복잡성 계통 추적 연구를 가능하게 한다. 일부 구현예에서, 완전 통합 쪽으로 반응 평형을 이동시키는, 자가-절제 FlpO-2A-Cre가 본원에 기재된다. 일부 경우에, 이것은 MADR 효율을 최대화시킨다.

[0036]

차세대 시퀀싱은 종양에서 보여진 재발성 체세포 돌연변이의 카탈로그를 기하급수적으로 증가시켰다. 추가로, 조직학적으로 유사한 종양이 상이한 표현형 (예를 들면 K27M 대 G34R)을 지닌 이질적인 유전적 토대를 종종 가질 수 있다는 것이 이제 점점 더 인정된다. 우리는 GOF 및 LOF 돌연변이를 조합시킴으로써 다양한 신경교종 유형의 신속한 '개인화된' 모델링을 위한 플랫폼으로서 MADR 사용에 대하여 원리의 증명을 보여준다. 우리가 아는 한, 우리의 MADR-기반된 모델은 K27M 대 G34R 돌연변이에 의한 종양 성장의 시공간적 조절을 재현하는데 성공적인 유일한 모델이다. 추가로, 개별 동물에서 *생체내* 나란히 K27M 및 G34R 돌연변이체 세포를 명백히 비교함으로써--MADR의 독특한 이점--우리는 G34R에 비교해서 종양 성장을 가속화시키는 K27M의 증가된 능력을 관찰하였다. 그래서, 우리의 K27M 및 G34R 모델이 양쪽 100% 침투성인 반면, 밀접하게 자리잡힌 잔기에 이들 별개의 돌연변이는 종양 성장 역학 및 종양 기원 부위에 뚜렷하고 강력한 영향을 발휘한다. 우리는 YAP1-MAMLD1 및 C11orf95-RELA 뇌실막세포종 모델의 우리의 신규한 병렬 비교에서 유사하게 놀라운 패턴을 주목하여, 이에 의해 동일한 세포 개체군에서 동기화된 MADR 유전자도입이 이질적 생존 시간으로 이어졌다. 이것은 종양 아형에 대하여 임상 발병 연령이 돌연변이의 시간 또는 세포 기원만을 반영 할 수 있는 것이 아니라, 드라이버-돌연변이 지시된 성장 역학에서 고도로-의존적이라는 것을 시사한다. PRC2 복합 불활성화 후 활성화되는 인헨서의 면에서 "역 연대기"가 있다. 단일-세포 접근법과 조합된 우리의 신규한 모델을 사용하여, K27M 종양 세포가 원시 ES형 전사적 및 후성 상태에서 절정에 이르는 오래 끈 전-종양 병기를 나타낸다는 우리의 관찰은 K27M 돌연변이가 발달적 인헨서의 이 동일한 역 연대기 재활성화를 나타낸다는 가능성과 일치한다.

- [0037] 요약하면, 우리의 발견은 고-해상도 GOF 및 LOF 모자이크의 생성을 민주화할 것을 약속하는 것인, 강력한 유전적 방법론으로서 MADR을 확립시켜, 소규모 실험실에서 생체내 넓은 스펙트럼의 유전적 아형을 모델링하도록 한다. 추가적으로, 이러한 유전적 프레임워크는 이중 재조합효소 인식 부위로 이미 조작된 수천의 마우스 라인에 적용가능하고, MADR 수용체 부위로 조작될 수 있는 임의의 세포, 오르가노이드 또는 유기체에 쉽게 적용될 수 있다. 유전적 접근법의 기존의 축적과 조합되는 MADR의 능력, 그 단일-세포 분해능, 그리고 시퀀싱 기술과의 그 상용성을 감안하면, 이들 도구는 발달 및 질환에서 유전자 기능의 효율적인, 더 높은 처리량 조사를 가능하게 한다.
- [0038] 따라서, 본 발명의 구현에는, 적어도 부분적으로, 이들 발견에 기반된다.
- [0039] 관심의 이식유전자로 세포를 이식유전자로 만들기 위한 핵산 및/또는 벡터의 시스템이 본원에 기재된다. 이식유전자는 2개 상이한 재조합효소 인식 부위, 예컨대 LoxP 및 FLT에 의해 축적될 수 있어, 관심의 이식유전자를 세포의 계놈의 특이적 부위에 도입하는 것을 허용한다. 특정 구현예에서, 관심의 이식유전자는 신경영양 인자를 포함한다. 특정 구현예에서, 신경영양 인자는 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF), 뉴트린, 성장/분화 인자 (GDF) 5, 중뇌 성상세포-유래된 신경영양 인자 (MANF), 대뇌 도파민작용성 신경영양 인자 (CDNF), 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 신경영양 인자는 GDNF를 포함한다. 특정 구현예에서, 2개 이상의 신경영양 인자는 세포의 계놈에 표적화를 위하여 동일한 또는 상이한 핵산/벡터에 포함될 수 있다.
- [0040] 특정 구현예에서, 관심의 이식유전자는 유도성 프로모터의 제어 하에 있다. 유도성 프로모터는 전사를 허용하고, 그래서 유도화 제제의 투여에 의해 제어되도록 관심의 이식유전자에 의해 인코딩된 폴리펩타이드의 생산을 허용한다. 유도성 프로모터는 유도화 제제의 부재 하에서 활성화되지 않거나 최소한으로만 활성화되는 것이다. 이것은 이식유전자를 포함하는 벡터 또는 이식유전자를 포함하는 벡터를 포함하는 세포가 투여된 개체에서 신경영양 인자의 생산이 튜닝 또는 조정되도록 한다. 이것은, 너무 높은 신경영양 인자의 수준이 원치않는 부작용을 갖고, 너무 낮은 수준이 치료적으로 효과적이지 않을 수 있음에 따라, 향상된 안전성 및 증가된 치료적 잠재력을 허용한다. 특정 구현예에서, 유도성 프로모터는 테트라사이클린-조절된 프로모터이다. 특정 구현예에서, 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 관심의 이식유전자는 GDNF, 뉴트린, GDF 5, MANF, CDFN, 또는 이들의 조합을 포함한다. 특정 구현예에서, 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 관심의 이식유전자는 GDNF이다.
- [0041] 특정 구현예에서, 시스템, 핵산 및/또는 벡터는 추가로 작은-분자 화합물에 의해 활성화되는 합성 전사 인자를 구성적으로 발현시키는 발현 카세트를 포함한다. 특정 구현예에서, 합성 유도성 전사 인자는 역 테트라사이클린-제어된 전사활성제 (rtTA)이다. rtTA 전사활성제는 테트라사이클린 계열 항생제 예컨대 독시사이클린에 의해 유도성이다. 특정 구현예에서, 합성 전사 인자는 유도성 요소의 제어 하에서 신경영양 인자의 것과 동일한 핵산/벡터 또는 제2 핵산/벡터에서 공급된다.
- [0042] 특정 구현예에서, 본원에 기재된 시스템, 벡터, 및 핵산에 의해 공급될 수 있는 신경영양 인자는 GDNF를 포함한다. GDNF 유전자는, 전사 및 번역시, 어느 한쪽 노출된 벡터 또는 벡터를 포함하는 세포(들)이 투여된 개체에게 GDNF 폴리펩타이드를 공급한다. GDNF 유전자는 GDNF 폴리펩타이드를 인코딩하고, 예를 들어, 내인성 GDNF 유전자로부터 적어도 하나 또는 모든 인트론이 부족한 개방 관독 프레임 (ORF)을 포함하는 핵산 서열이다. 특정 구현예에서, GDNF 유전자는 서열번호: 1에서 제시된 DNA 서열에 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상동이다. 특정 구현예에서, GDNF 유전자는 서열번호: 2에서 제시된 아미노산 서열에 적어도 약 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 폴리펩타이드를 인코딩한다.
- [0043] 특정 구현예에서, 이식유전자는 절연인자 서열에 의해 축적될 수 있다. 절연인자 서열은 이질염색질의 번식을 방지하는 유전적 요소이고, 이식유전자를 "절연"시키는데 사용될 수 있고 그 조절 서열은 후성 침묵화를 형성한다. 특정 구현예에서, 절연인자 서열은 초파리의 집시 절연인자, *Fab* 패밀리 절연인자, 또는 닭 β -글로빈 절연인자(chS4)일 수 있다.
- [0044] 본원에 기재된 시스템, 핵산 및/또는 벡터는 신경퇴행성 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 유전자 산물을 전달하는 방법에서 유용하다. 특정 구현예에서, 핵산 및/또는 벡터는 신경퇴행성 질환을 지닌 개체에게 투여되도록 세포의 계놈에서 알려진 안전한 부위에 통합된다. 신경퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 또는 근위축성 측삭 경화증 (ALS)일 수 있다. 추가적으로, 이들 핵산 및/또는 벡터는 개체의 뇌, 개체의 중뇌, 또는 개체의 흑색질에서 GDNF, 뉴트린, GDF 5, MANF 또는 CDFN 단백질 수준을 증가시키는 방법에서 유용하다. 특정 구현예에서, 핵산/벡터는 개체의 뇌, 개체의 중뇌, 또는 개체의 흑색질에서 GDNF 단백질 수준을 증가시키는 방법에서 사용된다.

- [0045] 신경퇴행성 질환 또는 병태를 갖는 대상체에게 유전자 산물의 전달 방법은 본원에 또한 기재된다. 특정 구현예에서, 신경퇴행성 장애는 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 또는 알츠하이머병을 포함한다. 특정 구현예에서, 본 방법은 필요로 하는 개체에게 본원에 기재된 핵산/백터를 포함하는 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 방법은 필요로 하는 개체에게 본원에 기재된 유도성 GDNF를 포함하는 핵산/백터를 포함하는 세포를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0046] 신경퇴행성 질환 또는 병태에 시달린 개체에게 다량의 세포를 투여하는 단계로서, 세포가 유도성 프로모터에 작동가능하게 커플링된 GDNF 유전자를 포함하는 게놈성 통합된 백터를 포함하고, GDNF 유전자 및 유도성 프로모터가 비-바이러스성 탠덤 반복부 또는 재조합효소 인식 부위에 의해 축적되는, 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 병태를 갖는 대상체, 또는 신경퇴행성 질환 또는 병태에 시달린 개체에게 유전자 산물을 전달하는 방법이 본원에 기재된다.
- [0047] a) 신경퇴행성 질환 또는 병태에 시달린 개체에게 다량의 세포를 투여하는 단계로서, 세포가 유도성 프로모터에 작동가능하게 커플링된 GDNF 유전자를 포함하는 게놈성 통합된 백터를 포함하고, GDNF 유전자 및 유도성 프로모터가 비-바이러스성 탠덤 반복부에 의해 축적되는, 단계; 및 b) 개체에게 유도화 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 병태에 시달린 개체의 뇌에서 GDNF 수준의 증가 방법이 본원에 또한 기재된다. 특정 구현예에서, 유도화 제제는 독시사이클린이다.
- [0048] 개체에게 유도화 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 신경퇴행성 질환 또는 병태에 시달린 개체의 뇌에서 GDNF 수준의 증가 방법이 본원에 또한 기재되고; 여기서 개체는 다량의 세포가 이전에 투여되었고, 여기서 세포는 유도화 제제에 의해 활성화된 유도성 프로모터에 작동가능하게 커플링된 GDNF 유전자를 포함하는 게놈성 통합된 백터를 포함한다. 특정 구현예에서, 유도화 제제는 독시사이클린이다.
- [0049] **시스템**
- [0050] 본 발명의 다양한 구현예는, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 폴리아데닐화 신호 또는 전사 정지 요소, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자, 및 페어링된 재조합효소 인식 부위를 포함하는, 프로모터-없는 공여자 백터; 및 페어링된 재조합효소 인식 부위에 특이적인 재조합효소를 인코딩하는 2개 유전자를 포함하는 1개 발현 백터를 포함하는 시스템을 제공한다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 백터는 플라스미드, 바이러스성 백터, 및 박테리아성 인공 염색체 (BAC)로 이루어지는 군으로부터 선택하였다.
- [0051] 본 발명의 다른 구현예는, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 폴리아데닐화 신호 또는 전사 정지 요소, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자, 및 페어링된 재조합효소 인식 부위를 포함하는 프로모터-없는 공여자 백터; 및 2개 발현 백터로, 페어링된 재조합효소 인식 부위들 중 하나에 특이적인 제1 재조합효소를 인코딩하는 1개 유전자를 포함하는 제1 발현 백터, 및 페어링된 재조합효소 인식 부위들 중 다른 것에 특이적인 제2 재조합효소를 인코딩하는 1개 유전자를 포함하는 제2 발현 백터를 포함하는 시스템을 제공한다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 백터는 플라스미드, 바이러스성 백터, 및 박테리아성 인공 염색체 (BAC)로 이루어지는 군으로부터 선택하였다.
- [0052] 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 백터는 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 적어도 4개 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 백터는 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 2, 3, 4, 5 또는 6개 폴리아데닐화 신호에 포함한다.
- [0053] 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 백터는 추가로 전사후 조절 요소를 포함한다. 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 백터는 추가로 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함한다.
- [0054] 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 백터는 추가로 스플라이스 수용자로 시작하는 개방 관독 프레임 (ORF)을 포함한다.
- [0055] 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 백터는 추가로 형광성 리포터를 포함한다.
- [0056] 다양한 구현예에서, 바이러스성 백터는 아데노-연관된 바이러스성 (AAV) 백터이다. 다양한 구현예에서, AAV 백터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, 또는 AAV9이다. 다양한 구현예에서 바이러스성 AAV 백터는 하이브리드 AAV 백터이고; 예를 들어, 여기서 캡시드는 선택된 세포 친화성을 표시하는 또 다른 혈청형에서 유래된다.
- [0057] 특정한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 백터는 PGK 폴리아데닐화 신호 (pA); 삼량체화된 SV40pA; RNA를 인코

당하는 핵산 또는 이식유전자; loxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT); 토끼 베타-글로빈 pA; 및 우드치크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)를 포함한다.

[0058] 비-제한 예로서, 페어링된 재조합효소 인식 부위는 loxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)일 수 있고, 재조합효소는 cre 및 flp일 것이고; 페어링된 재조합효소 인식 부위는 VloxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)일 수 있고, 더 우드 비는 VCre 및 flp이고; 페어링된 재조합효소 인식 부위는 SloxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)일 수 있고, 재조합효소는 SCre 및 flp일 것이다. 추가 비-제한 예로서, 재조합효소는 PhiC31 재조합효소일 수 있고, PhiC31 인식 부위는 attB 및 attP일 수 있다. PhiC31은 attB 및 attP 부위를 인식하고 attR 및 attL 부위를 창출한다. 그래서, attB를 지닌 플라스미드 및 attP를 지닌 표적 부위는 PhiC31의 존재 하에서 삽입을 촉매화시킬 것이다. 또한, 추가 비-제한 예로서, 재조합효소는 Nigri, Panto, 또는 Vika일 수 있고 그들의 동족 부위는 nox, pox, 및 vox, 각각이다.

[0059] 다양한 양태에서 페어링된 재조합효소 인식 부위는 이식유전자 또는 유도성 이식유전자의 숙주 세포의 게놈에 통합의 효율을 증가시키기 위해 선택된다. 특정 구현예에서, 변이체 LoxP 부위는 야생형 또는 변이체 FRT 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서, 변이체 FRT 부위는 야생형 또는 변이체 LoxP 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서, Lox71, Lox66, lox511, lox5171, lox2272로부터 선택된 변이체 Lox는 야생형 또는 변이체 FRT 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서, Lox71 부위는 FRT 부위 또는 변이체 FRT 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서, Lox66 부위는 FRT 부위 또는 변이체 FRT 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서 FRT1, FRT2, FRT3, FRT4, FRT5, FRT12, FRT13, FRT14, FRT545로부터 선택된 변이체 FRT는 야생형 FRT와 페어링된다. 특정 구현예에서 FRT1, FRT2, FRT3, FRT4, FRT5, FRT12, FRT13, FRT14, FRT545로부터 선택된 변이체 FRT는 야생형 LoxP와 페어링된다. 특정 구현예에서, 페어링된 재조합 부위의 선택은 세포성 게놈에 이식유전자 삽입의 효율을 25%, 50%, 75%, 또는 100% 이상만큼 증가시킨다.

[0060] 다양한 구현예에서, 페어링된 재조합효소 인식 부위의 한쪽 또는 양쪽은 돌연변이를 포함한다. 다양한 구현예에서, loxP를 위한 돌연변이는 lox71, lox75, lox44, loxJT15, loxJT12, loxJT510, lox66, lox76, lox43, loxJT22, loxJT17, loxKR3, loxBait, lox5171, lox2272, lox2722, m2, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 다양한 구현예에서, FRT를 위한 돌연변이는 FRT+10, FRT+11, FRT-10, FRT-11, F3, F5, F13, F14, F15, F5T2, F545, f2161, f2151, f2262, f61, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

[0061] 돌연변이는 더 나은 유전자도입을 허용할 수 있고, 그래서, 새로운 이식유전자 마우스는 생성될 필요가 없다. 더욱이, 조합적 실험은 2개 초과 상이한 공여자 플라스미드가 사용되는 경우 결과가 바로 수득되는 시간의 더 짧은 윈도우에서 적용될 수 있다. 이것은 유기체가 마우스보다 더 빠르게 발달하는 모델에서 또한 귀중하다.

[0062] 다양한 구현예에서, 시스템(들)에서 RNA는 siRNA, shRNA, sgrRNA, lncRNA 또는 miRNA이다. 다양한 구현예에서, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자는 질환 연관된 돌연변이를 포함한다. 다양한 구현예에서, 이식유전자 또는 RNA는 기능획득 (GOF) 유전자 돌연변이, 기능상실 (LOF) 유전자 돌연변이, 또는 양쪽을 포함한다. 다양한 구현예에서, 이식유전자 또는 RNA는 종양유전자, 종양 억제인자 유전자의 기능상실 (LOF) 돌연변이, 원-종양유전자의 기능획득 (GOF) 돌연변이, 위유전자, siRNA, shRNA, sgrRNA, lncRNA, miRNA, 후성 변형, 인간 질환과 연관된 비-코딩 유전적 또는 후성 이상, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0063] **공여자 벡터**

[0064] 본 발명의 다양한 구현예는, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 폴리아데닐화 신호 또는 전사 정지 요소; RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자; 및 페어링된 재조합효소 인식 부위를 포함하는 프로모터-없는 공여자 벡터를 제공한다. 특정 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 플라스미드, 바이러스성 벡터, 및 박테리아성 인공 염색체 (BAC)로 이루어지는 군으로부터 선택하였다.

[0065] 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 적어도 4개 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 상류에 2, 3, 4, 5 또는 6개 폴리아데닐화 신호에 포함한다.

[0066] 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 추가로 전사후 조절 요소를 포함한다. 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 추가로 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자로부터 하류에 폴리아데닐화 신호를 포함한다.

[0067] 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 추가로 스플라이스 수용자로 시작하는 개방 판독 프레임

(ORF)을 포함한다.

- [0068] 다양한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 추가로 형광성 리포터를 포함한다.
- [0069] 다양한 구현예에서, 바이러스성 벡터는 아데노-연관된 바이러스성 (AAV) 벡터이다. 다양한 구현예에서, AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, 또는 AAV9이다. 다양한 구현예에서 바이러스성 AAV 벡터는 하이브리드 AAV 벡터이고; 예를 들어, 여기서 캡시드는 선택된 세포 친화성을 표시하는 또 다른 혈청형에서 유래된다.
- [0070] 특정한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 PGK 폴리아데닐화 신호 (pA); 삼량체화된 SV40pA; RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자; loxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT); 토끼 베타-글로빈 pA; 및 우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)를 포함한다.
- [0071] 비-제한 예로서, 페어링된 재조합효소 인식 부위는 loxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)일 수 있고; 페어링된 재조합효소 인식 부위는 VloxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)일 수 있고; 페어링된 재조합효소 인식 부위는 SloxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT)일 수 있다. 추가 비-제한 예로서, 재조합효소는 PhiC31 재조합효소일 수 있다. PhiC31은 attB 및 attP 부위를 인식하고 attR 및 attL 부위를 창출한다. 또한, 추가 비-제한 예로서, 재조합효소는 Nigri, Panto, 또는 Vika일 수 있다.
- [0072] 다양한 양태에서 페어링된 재조합효소 인식 부위는 이식유전자 또는 유도성 이식유전자의 숙주 세포의 게놈에 통합의 효율을 증가시키기 위해 선택된다. 특정 구현예에서, 변이체 LoxP 부위는 야생형 또는 변이체 FRT 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서, 변이체 FRT 부위는 야생형 또는 변이체 LoxP 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서, Lox71, Lox66, lox511, lox5171, lox2272로부터 선택된 변이체 Lox는 야생형 또는 변이체 FRT 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서, Lox71 부위는 FRT 부위 또는 변이체 FRT 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서, Lox66 부위는 FRT 부위 또는 변이체 FRT 부위와 페어링된다. 특정 구현예에서 FRT1, FRT2, FRT3, FRT4, FRT5, FRT12, FRT13, FRT14, FRT545로부터 선택된 변이체 FRT는 야생형 FRT와 페어링된다. 특정 구현예에서 FRT1, FRT2, FRT3, FRT4, FRT5, FRT12, FRT13, FRT14, FRT545로부터 선택된 변이체 FRT는 야생형 LoxP와 페어링된다. 특정 구현예에서, 페어링된 재조합 부위의 선택은 세포성 게놈에 이식유전자 삽입의 효율을 25%, 50%, 75%, 또는 100% 이상만큼 증가시킨다.
- [0073] 다양한 구현예에서, 페어링된 재조합효소 인식 부위의 한쪽 또는 양쪽은 돌연변이를 포함한다. 다양한 구현예에서, loxP를 위한 돌연변이는 lox71, lox75, lox44, loxJT15, loxJT12, loxJT510, lox66, lox76, lox43, loxJT22, loxJT217, loxKR3, loxBait, lox5171, lox2272, lox2722, m2, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 다양한 구현예에서, FRT를 위한 돌연변이는 FRT+10, FRT+11, FRT-10, FRT-11, F3, F5, F13, F14, F15, F5T2, F545, f2161, f2151, f2262, f61, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 돌연변이는 더 나은 유전자도입을 허용할 수 있고, 그래서, 새로운 이식유전자 마우스는 생성될 필요가 없다. 더욱이 조합적 실험은 2개 초과 상이한 공여자 플라스미드가 사용되는 경우 결과가 즉시 수득되는 시간의 더 짧은 윈도우에서 적용될 수 있다. 이것은 유기체가 마우스보다 더 빠르게 발달하는 모델에서 또한 귀중하다.
- [0074] 다양한 구현예에서, 시스템(들)에서 RNA는 siRNA, shRNA, sgRNA, lncRNA 또는 miRNA이다. 다양한 구현예에서, RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자는 질환 연관된 돌연변이를 포함한다. 다양한 구현예에서, 이식유전자 또는 RNA는 기능획득 (GOF) 유전자 돌연변이, 기능상실 (LOF) 유전자 돌연변이, 또는 양쪽을 포함한다. 다양한 구현예에서, 이식유전자 또는 RNA는 종양유전자, 종양 억제인자 유전자의 기능상실 (LOF) 돌연변이, 원-종양유전자의 기능획득 (GOF) 돌연변이, 위유전자, siRNA, shRNA, sgRNA, lncRNA, miRNA, 후성 변형, 인간 질환과 연관된 비-코딩 유전적 또는 후성 이상, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0075] 특정한 구현예에서, 프로모터-없는 공여자 벡터는 PGK 폴리아데닐화 신호 (pA); 삼량체화된 SV40pA; RNA를 인코딩하는 핵산 또는 이식유전자; loxP 및 플립파아제 인식 표적 (FRT); 토끼 베타-글로빈 pA; 및 우드처크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE)를 포함한다.
- [0076] **방법**
- [0077] 다양한 구현예는, 본 발명의 시스템으로 포유동물 세포를 형질감염 또는 형질도입시키는 단계를 포함하는, 포유동물 세포의 유전적 조작 방법을 제공한다.
- [0078] 다양한 구현예에서, 포유동물 세포는 인간 세포이고 본 발명의 시스템은 AAVS1 좌위, H11, HPRT1, 또는 ROSA26을 표적하고, 본 방법은 *시험관내* 또는 *생체외* 방법이다.

- [0079] 다양한 구현예에서, 포유동물 세포는 마우스 세포이고 본 발명의 시스템은 ROSA26, Hipp11, Tigre, ColA1, 또는 Hprt를 표적한다. 이들 구현예에서, 본 방법은 시험관내, 생체내, 또는 생체외이다.
- [0080] **동물 모델**
- [0081] 본 발명의 다양한 구현예는, 이식유전자 또는 RNA가 종양유전자, 종양 억제인자 유전자의 기능상실 (LOF) 돌연변이, 원-종양유전자의 기능획득 (GOF) 돌연변이, 위유전자, siRNA, shRNA, sgRNA, lncRNA, miRNA, 후성 변형, 인간 질환과 연관된 비-코딩 유전적 또는 후성 이상, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 본 발명의 시스템을 포함하는 비-인간 동물을 포함한, 비-인간 동물 모델을 제공한다.
- [0082] 본 발명의 다양한 구현예는, 본 발명의 시스템이 비-인간 동물에게 투여되었고, 이식유전자 또는 RNA가 종양유전자, 종양 억제인자 유전자의 기능상실 (LOF) 돌연변이, 원-종양유전자의 기능획득 (GOF) 돌연변이, 위유전자, siRNA, shRNA, sgRNA, lncRNA, miRNA, 후성 변형, 인간 질환과 연관된 비-코딩 유전적 또는 후성 이상, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 비-인간 동물을 포함한, 비-인간 동물 모델을 제공한다.
- [0083] 다양한 구현예에서, 비-인간 동물 모델은 인간 대상체의 암의 개인화된 비-인간 동물 모델이고 이식유전자 또는 RNA는 인간 대상체의 암에 기반된다. 다양한 구현예에서, 비-인간 동물 모델은 인간 대상체의 질환 또는 병태의 개인화된 비-인간 동물 모델이고 이식유전자 또는 RNA는 인간 대상체의 질환 또는 병태에 기반된다. 인간 대상체의 질환, 병태, 또는 암"에 기반된"에 관하여 사용된 경우에 "에 기반된"은 인간 대상체의 질환, 병태 또는 암의 유전적 프로파일 이식유전자 또는 RNA 모델을 갖는 것을 지칭한다. 비-제한 예로서, 인간 대상체의 암에 기반된 이식유전자는 인간 대상체의 암의 원인인 것으로 믿어지는 기능획득 유전적 돌연변이인 유전자일 수 있다.
- [0084] 다양한 구현예에서, 비-인간 동물 모델은 기능획득 돌연변이 (GOF), 기능상실 돌연변이 (LOF), 또는 양쪽을 포함한다.
- [0085] **비-인간 동물 모델 또는 인간 세포의 생성 방법**
- [0086] 다양한 구현예는, 이식유전자 또는 RNA가 종양유전자, 종양 억제인자 유전자의 기능상실 (LOF) 돌연변이, 원-종양유전자의 기능획득 (GOF) 돌연변이, 위유전자, siRNA, shRNA, sgRNA, lncRNA, miRNA, 후성 변형, 인간 질환과 연관된 비-코딩 유전적 또는 후성 이상, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 본 발명의 시스템으로 비-인간 동물 모델을 형질감염 또는 형질도입시키는 단계를 포함하는, 본 발명의 비-인간 동물 모델의 생성 방법을 제공한다.
- [0087] 본 발명의 시스템은 상기 및 본원에 기재된 바와 같다.
- [0088] **약물 스크리닝 및 사정**
- [0089] 본 발명의 다양한 구현예는, 본 발명의 비-인간 동물 모델을 제공하는 단계; 약물 후보를 비-인간 동물 모델에 투여하는 단계; 및 비-인간 동물 모델에 관한 약물 후보의 효과를 사정하는 단계를 포함하는, 약물 후보의 효과의 사정 방법을 제공한다.
- [0090] 다양한 구현예에서, 본 방법은 추가로 약물 후보가 유의한 결과를 제공하는 경우 유의한 것으로 약물 후보를 식별하는 단계를 포함한다. 다양한 구현예에서, 본 방법은 추가로 약물 후보 그리고 약물 후보가 유의한 결과를 제공하지 않는 경우 비-유의한 것으로 식별하는 단계를 포함한다.
- [0091] **포유동물 세포**
- [0092] 본 발명의 다양한 구현예는 본원에 기재된 경우에 본 발명의 시스템을 포함하는 포유동물 세포를 제공한다. 다른 구현예는 본원에 기재된 경우에 본 발명의 프로모터-없는 공여자 벡터를 포함하는 포유동물 세포를 제공한다.
- [0093] 다양한 구현예에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 다양한 구현예에서, 포유동물은 다능성 세포이다. 다양한 구현예에서, 다능성 세포는 유도된 다능성 세포이다.
- [0094] 본 발명의 다양한 구현예는 계능성 통합된 이식유전자를 포함하는 포유동물 세포를 제공하고, 여기서 계능성 통합된 이식유전자는 신경영양 인자를 포함하고, AAVS1 좌위, H11 좌위, 또는 HPRT1 좌위를 포함하는 계능성 부위에 통합된다.
- [0095] 다양한 구현예에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 다양한 구현예에서, 인간 세포는 유도된 다능성 줄기 세포

이다.

[0096] 다양한 구현예에서, 신경영양 인자는 아교 세포주-유래된 신경영양 인자 (GDNF), 뉴트린, 성장/분화 인자 (GDF) 5, 중뇌 성상세포-유래된 신경영양 인자 (MANF), 대뇌 도파민작용성 신경영양 인자 (CDNF), 또는 이들의 조합을 포함한다. 다양한 구현예에서, 신경영양 인자는 GDNF이다.

[0097] 다양한 구현예에서, 신경영양 인자는 유도성 프로모터의 제어 하에 있다. 다양한 구현예에서, 유도성 프로모터는 테트라사이클린 유도성 프로모터이다. 다양한 구현예에서, 신경영양 인자 및 또는 유도성 프로모터는 재조합 효소 인식 부위, 전위가능한 요소의 탠덤 반복부, 또는 절연인자 서열 중 하나 이상에 의해 측정된다.

[0098] 사용 방법

[0099] 본 발명의 다양한 구현예는 본원에 기재된 경우에 본 발명의 포유동물 세포를 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행성 질환 또는 장애를 지닌 개체에게 유전자 산물의 전달 방법을 제공한다.

[0100] 다양한 구현예에서, 신경퇴행성 질환 또는 장애는 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 또는 알츠하이머병을 포함한다.

[0101] 다양한 구현예에서, 신경퇴행성 질환 또는 장애는 파킨슨병을 포함한다.

[0102] 다양한 구현예에서, 신경퇴행성 질환 또는 장애는 근위축성 측삭 경화증 (ALS)을 포함한다.

[0103] 본 발명의 다양한 구현예는 개체에게 본 발명의 포유동물 세포를 투여하는 단계를 포함하는 개체에서의 뇌의 수준에서 GDNF 단백질 수준의 증가 방법을 제공한다.

[0104] 실시예

[0105] 하기 실시예는 청구된 발명을 보다 잘 실례하기 위해 제공되고 본 발명의 범위 제한으로서 해석되지 않아야 한다. 구체적 물질이 언급되는 정도로, 단순히 실례의 목적이고 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다. 당업자는 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 본 발명의 능력을 행사하지 않으면서 동등한 수단 또는 반응물을 개발할 수 있다.

[0106] 실시예 1 - 실험적 절차

[0107] 모든 마우스는 Cedars-Sinai Institutional Animal Care and Use Committee에 따라 사용되었다. 배아 일 (E) 0.5는 질전의 날로서 확립되었다. 야생형 CD1 마우스는 Charles River Laboratories에 의해 제공되었다. Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J 및 Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-EGFP)Fsh/Mmjax 마우스 (JAX Mice)는 야생형 CD1 마우스 (Charles River) 또는 C57BL/6J 마우스로 육종되어 이형접합성 마우스를 생성하였다. E12.5와 E15.5 사이 숫컷 및 암컷 배아는 자궁내 전기천공에 사용되었고, 산후 일 (P) 0과 P21 사이 새끼는 산후 실험에 사용되었다. 임신한 어미는 단일 케이지에서 사육되었고 새끼는, 표준 12: 12 시간 명 / 암 주기에 기관 동물 시설에서, P21까지 그들의 모친과 사육되었다.

[0108] 플라스미드 클로닝

[0109] pDonor 플라스미드는 표준 제한 소화 기법 (Breunig 등, 2015, Soriano, 1999)과 조합으로 In-Fusion 클로닝 (Clontech) 또는 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB)를 사용하여, PGKneotpAlox2에서 유래되었다. 간단히, FRT 부위는 2개 올리고를 어닐링하고 삽입물을 PGKneot-pAlox2에 주입시킴으로써 창출되었다. 공여자 플라스미드의 하류 생성은, smFP-HA ORF (Addgene 59759)에 대하여 실시되었던 것처럼, 기존의 ORF를 제거하고 In-Fusion 또는 결찰을 사용하는 새로운 카세트를 첨가시킴으로써 실시되었다. PB-CAG-플라스미드는 이전에 기재되었고 In-Fusion, NEB 어셈블리, 및 결찰 전략의 조합을 사용하여 창출되었다 (Breunig 등, 2015, Breunig 등, 2012). In-Fusion 또는 어셈블리 반응에 사용된 프라이머 서열은 요청시 이용가능하다. PCR은 KAPA HiFi PCR 시약과 표준 프로토콜을 사용하여 실시되었다. 본래의 CMV Flp-2A-Cre 및 CMV Flp-IRES-Cre 재조합효소 발현 작제물은 시험관내 dRMCE의 맥락에서 이전에 검증되었다 (Anderson 등, 2012).

[0110] MADR + AAVS1 인간 세포주 생성

[0111] AAVS1 표적화 MADR 벡터는 AAVS1-표적화 벡터 AAVS1-Puro-PGK1_3xFLAG_Twin_Strep (Addgene 68375)에서 유래되었다. TagBFP2-V5-nls-P2A-puroR-Cag-LoxP- TdTomato-FRT는 이러한 AAVS1 벡터에 삽입되었고, 인간 세포주는 그것으로 형질감염되었고 푸로마이신내 선택되었다. MADR-SM_FP-myc (밝음) 및 MADR-TagBFP2-3flag WPRE는 Cag-Flpo-2A-Cre로 생성된 안정적 세포주에 형질감염되어 MADR 반응을 유도하였다.

[0112] **MADR 통합 이벤트의 PCR 분석**

[0113] KAPA HiFi PCR 시약은 마우스 MADR 라인에서 수집된 게놈성 DNA를 PCR하는데 사용되었다. 앰플리콘은 E-Gel 기구에서 운용되어 크기를 사정하였다.

[0114] **마우스 및 전기천공**

[0115] *Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J* 및 *Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-EGFP)Fsh/Mmjax* 마우스 (JAX Mice)는 야생형 CD1 (Charles River) 또는 C57BL/6J (JAX) 마우스와 육종되어 이형접합성 마우스를 생성하였다. 산후 측뇌실 EP는 이전에 기재된 대로 수행되었다 (Breunig 등, 2015). P1-3 새끼는 ~5 분 동안 빙상에 배치되었다. 모든 DNA 혼합물은, 달리 언급되지 않는 한, 0.5-1 μ g/ μ l의 Flp-Cre 발현 벡터, 공여자 플라스미드, hypBase, 또는 Tris-EDTA 완충액에 희석된 CAG-리포터 플라스미드를 함유하였다. 페스트 그린 염료는 혼합물에 첨가되었고 (10%v/v), 이는 측뇌실에 주사되었다. Platinum Tweezertrode는 ECM 830 System (Harvard Apparatus)에서 120V (50ms; 950 ms만큼 분리됨)의 5개 펄스를 전달하였다. SignaGel은 전도도를 증가시키기 위해 적용되었다. 마우스는 적외선등 하에 가온되었고 그들의 케이지로 복귀되었다.

[0116] **자궁내 전기천공.**

[0117] 자궁내 전기천공 실험은 표준 방법에 따라 수행되었다 (McKenna 등, 2011). TagBFP2-HRasG12V 및 Flp-Cre 플라스미드는 E14.5 RCE 마우스 배아에 EP되었다. 전기천공 후, 배아는 P15까지 생존하도록 허용되었고, 이 때 TagBFP2-HrasG12V (MADR 매개된 삽입), EGFP (비-MADR Cre-매개된 재조합) 및 Sox2 발현은 면역염색에 의해 분석되었다.

[0118] **MADR 형질도입에 관한 보충적 노트**

[0119] 우리의 실험작업에서, 우리는 생체내 전기천공, 시험관내 전기천공 (즉 뉴클레오펙션), 및 리포펙션을 성공적으로 이용하여 MADR을 유효화시킨다.

[0120] 생체내 전기천공은 플라스미드 DNA가 원형질막을 투과하고 유사분열을 겪고 있는 세포의 핵 공간으로 진입하도록 함으로써 작동하는 것으로 믿어진다. 그래서, 증식하는 개체군에 주로 특이적인 것으로 믿어진다. 하지만, 유사분열후 세포는 핵공 확장제를 DNA와 혼합시킴으로써 또한 표적화될 수 있다.

[0121] 우리가 MADR의 우리의 설명에서 보여주었듯이, 이러한 접근법은 발달 및 질환 연구를 위하여 단일-카피 이식유전자의 안정적 발현을 촉진시킨다. MADR 형질도입된 세포의 수는 MADR 공여자의 농도, FlpO 및 Cre 재조합효소의 농도, 및 표적된 개체군의 증식 속도에 의해 주로 지시된다. 구체적으로, 우리가 보여주었듯이, MADR 세포 대 Cre 재조합된 세포의 수는 공여자 플라스미드 대 재조합효소 플라스미드의 비를 가변시킴으로써 정의된 개체군에서 적정될 수 있다.

[0122] 하지만, 우리의 산후 전기천공에서 보여질 수 있듯이, 우리는 우리가 선택하였던 표준 조건 (100 ng/ μ l의 재조합효소: 1000 ng/ μ l의 공여자 플라스미드) 하에서, 패턴이 출현하고 이에 의해 MADR 형질도입이 세포의 초기 유사분열 활성화와 역으로 상관한다는 것을 주목한다. 구체적으로, 선조체는 용이하게 Cre 재조합되지만 더욱 드물게 MADR 형질도입된다. 반대로, 진정한 신경 줄기 세포로서 상대적으로 더욱 조용한, 방사성 아교 개체군은 MADR 세포의 주요 개체군을 구성한다. 명백히, 발달 비대칭 또는 대칭 분열의 결과인 것으로 최근에 보고된, 뇌실막 세포는 MADR에 의해 -아마도 이들이 전기천공에 의해 표적된 초기 세포 분열 후 플라스미드를 희석하지 않는다는 사실 때문에 용이하게 표적되는 경향이 있다. CNS의 세포 사이클은 발달에 따라 길어지고, 산후 세포는 그들의 배아 상대보다 비교적 더 조용하고 그래서 더 작은 초기 개체군은 산후 전기천공에 의해 전형적으로 형질도입된다. 그래서, 많은 수의 실질성 아교 또는 배아적으로-생성된 뉴런이 요구되면, 자궁내 전기천공은 국소 영역을 표적하여 수행될 수 있다 (즉, 도 4A-C).

[0123] **크기 고려 사항:**

[0124] 우리는 플라스미드 DNA의 표준 범위 (4Kb 내지 18Kb) 사이 공여자 플라스미드 크기에 기반된 MADR 효율에서 상당한 차이를 관찰하지 못했다. 리포펙션 3일 후에 시험관내 프록시 세포에 MADR 공여자의 시간-경과 이미지화를 사용하여 실험적으로 테스트하는 것은 생체내 관찰과 일치한다 (데이터 나타나지 않음). 플라스미드 혼합물은 개별 공여자 변이체의 동일한 물비에 기반되었다. 하지만, 세포 운명, 생존, 증식, 등에 관여된 신호전달 경로 변경하기는 유전적 리포터만 사용과 비교해서 전반적 MADR 세포 수에서 변화를 초래할 것 같다.

[0125] **시스-조절 요소:**

- [0126] 우리는 우리가 활용하는 마우스 라인에서 그 존재 때문에 강한 CAG 프로모터를 전형적으로 이용한다. 하지만, 이러한 프로모터의 강도를 약화시키는 몇 가지 방식이 있다:
- [0127] 1) 임의의 IKNM 마우스 대립유전자가 MADR로 표적될 수 있어서 이식유전자가 내인성 시스-조절 요소에 의해 조절될 수 있다.
- [0128] 2) 우리가 이식유전자 (Vcre, 및 Tet-On)의 이차 유도를 위한 2개 직교 수단을 입증하였다—이들 중 하나는 가역적이고 유도 제제 (Tet-On)의 투약량에 의해 조정될 수 있다. 게다가, 다른 기술 (예를 들면 이량체화 도메인 및 탈안정화 도메인)은 이식유전자 기능 또는 발현을 가변시키기 위해 또한 이용될 수 있다.
- [0129] 3) 전사물의 비-코딩 부분에서의 변화는, 비제한적으로 WPRE 제거, 스테퍼 서열, 및 miR-인식 서열을 포함하는, 이식유전자 발현에 관한 상당한 효과를 가질 수 있다. WPRE는 전사물 영속 및 단백질 발현에 관한 강력한 효과를 가져서 제거가 상류에 이식유전자의 발현을 감소시킬 것이다. 또한, 시스트론에서 요소들의 수를 특이적으로 증가시켜 더 긴 전사물을 창출할 수 있고, 이는 종종 감소된 전반적 발현을 초래한다. 최종적으로, 내인성 (또는 외인성) miR-인식 부위는 정밀한 세포 유형 (내인성)에서 발현을 튜닝하는데 사용될 수 있거나 동족 또는 약간 미스매칭된 표적화 서열을 지닌 miR-헤어핀은 발현을 약화시킬 수 있다.
- [0130] 4) 우리의 Akaluc 플라스미드로 나타난 대로 (도 8), 약화된 프로모터를 지닌 이차 시스트론은 MADR로 삽입될 수 있다.
- [0131] **주사 부위 염증:**
- [0132] 1) 당겨진 유리 모세관은 매우 미세한 직경-30G 주사기보다 훨씬 작은 직경을 갖는다. 우리는 여러 동물의 일련의 단면화를 수행하였고 임의의 바늘 자국을 식별할 수 없었다. 또한, 주사에 의해 유도된 출혈이 드물다. 그래서, 산후 전기천공은 최소로 침습적 기법 그리고 생체내 유전자 형질도입의 강력한 수단으로 간주된다.
- [0133] 2) 하나의 분명한 염려는 주사 부위에 외인성 DNA에 대한 가능한 미세아교세포성 또는 별아교세포성 반응이다. 하지만, 우리는 우리의 바늘 자국 분석으로부터 섹션에서 EP 후 날들 동안 (주사되지 않은) 대조군 뇌 반구에 비교해서 임의의 상당한 염증을 관찰하지 못했다 (데이터 나타나지 않음). 하지만, 바늘로 너무 깊이 들어가는 것은 플라스미드 혼합물로부터 수압성 트라우마를 초래할 수 있고, 이는 주변 뇌실 벽을 벗길 수 있다.
- [0134] 3) 종양-모델링 목적 경우에, 긴 전-종양 과정 (종종 몇 개월에 걸침)이 있고, 이는 임의의 조직-손상-관련된 염증 과정이 후퇴하는데 상당한 시간을 준다. 이것은 면역결핍성 마우스에 바이러스성-유도된 종양 또는 이식물보다 여전히 아마 틀림없이 더 좋다.
- [0135] 4) 자궁내 전기천공 (즉 도 4A-C)은 더 큰 상대적 크기를 지닌 뇌실로 그리고 더 미성숙한 면역 시스템을 지닌 배아로의 전달을 촉진시킴으로써 이러한 장애를 추가적으로 완화하기 위한 대안적 MADR 전달 접근법으로서 사용될 수 있다.
- [0136] **조직 제조**
- [0137] 마취 후, 마우스 뇌는 단리되었고 4°C에서 밤새 회전기/진탕기에서 4% 파라포름알데하이드에 고정되었다. 뇌는 4% 저-용점 아가로스 (Thermo Fisher)에 포매되었고 진동체 (Leica)에서 70 μ m로 절단되었다.
- [0138] **면역조직화학**
- [0139] 면역조직화학 (IHC)은 이전에 기재된 대로 표준 방법론을 사용하여 수행되었다 (Breunig 등, 2015). 아가로스 섹션은 사용 때까지 0.05% 아지드화나트륨을 지닌 Phosphate Buffered Saline (PBS)에서 저장되었다. 일차 항체에 관한 상세는 표 3에서 찾아질 수 있다. 모든 일차 항체는 5% 정상 당나귀 혈청을 지닌 PBS-0.03% Triton에서 사용되었다. 모든 이차 항체 (Jackson ImmunoResearch)는 1:1000으로 사용되었다. 더 짧은 지속기간 실험에서 뇌실 표적화를 위하여 패스트 그린 염료를 포함할 때 주의를 기울였다. 염료가 더 긴 생존 실험에서 신속히 희석하였어도, 초기 (0-2 일) 단일-카피 리포터 검출을 혼동하였고 이들 경우에 원적외선 파장에서 형광 때문에 생략되었다.
- [0140] **표백을 이용한 면역조직화학**
- [0141] 사전-표백된 면역조직화학 경우에, 70 μ m 조직 섹션은 실온에 물에서 각 15 분 동안 메탄올의 증가하는 농도 (20%, 40%, 60%, 80%, 100%)로 탈수되었고, 그 다음 4°C에 100% 메탄올내 5% H₂O₂로 밤새 처리되었다. 조직은 그 다음 물에서 각 15 분, 메탄올 (100%, 80%, 60%, 40%, 20%)을 사용하여 재탈수되었고, 그 다음 PBS로 세정

된 다음 정상 면역염색으로 진행되었다.

[0142] **세포 배양 및 뉴클레오펙션**

[0143] 3개 이형접합성 P0 *mTmG* 새끼 뇌는 연구에서 사용된 마우스 신경 줄기 세포주를 확립시키기 위해 해리되었다. 세포주는 이전에 기재된 대로 유지되었다 (Breunig 등, 2015). 세포는 비타민 A 없는 B-27 (Life Technologies 12587-010), GlutaMAX (Life Technologies 35050), 항생제-항진균제 (Life Technologies 15240), 인간 상피 성장 인자 (hEGF) (Sigma E9644), 헤파린 (Sigma H3393), 및 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF) (Millipore GF003)로 보충된 Neurobasal®-A Medium (Life Technologies 10888-022)을 함유하는 배지에서 성장되었다. 마우스 NSC 뉴클레오펙션은 제조업체의 권장사항에 따라 Nucleofector 2b 장치 및 Mouse Neural Stem Cell Kit (Lonza AG)를 사용하여 수행되었다. 뉴클레오펙션 혼합물은 10 ng/μl의 똑같은 농도로 플라스미드를 함유하였다.

[0144] **생 세포 이미지화**

[0145] PIP-Venus/mCherry-hGEM1/110을 발현시키는 N2A 프록시 세포는 96-웰 형식으로 플레이팅되었고 Incucyte S3 System (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI)을 사용하여 위상, 적색 및 녹색 형광 하에 20x 대물 렌즈로 이미지화되었다. 이미지는 Incucyte S3 Software를 사용하여 매 30 분 수집되었다.

[0146] 고-출력 약물 테스트하기 실험에서, 중앙 해리에서 생성된 세포주로부터 10,000개 세포 그리고 비-중앙 대조군 세포는 96 웰 플레이트에서 플레이팅되었다. 씨딩 24시간 후 각 약물의 적절한 농도 (Vacquinol-1(Sigma-Aldrich, SML1187)에 대하여 1μM 그리고 AKT 1/2 키나아제 억제제 (Sigma-Aldrich, A6730)에 대하여 0.5μM)는 배지에 첨가되었고 세포는 Incucyte S3 System을 사용하여 위상차로 92 시간 동안 이미지화되었다. 이미지는 Incucyte S3 Software를 사용하여 매 2 시간 수집되었다. 세포 증식 이미지 분석은 Incucyte S3 Software로 실시되었고 정규화된 결과는 Graphpad Prism 7로 제시되었고 분석되었다.

[0147] **이미지화 및 처리**

[0148] 모든 고정된 이미지는 Nikon A1R 도립 레이저 공초점 현미경으로 수집되었다. mNSC의 생 이미지는 EVOS 디지털 형광 도립 현미경에서 취득되었다. 전체 뇌 이미지 경우에, Nikon Elements의 자동화된 스티칭 기능이 사용되었다. ND2 파일은 그 다음 ImageJ에 유입되어 Z-프로젝션 이미지를 창출하였고, 이는 후속적으로 Adobe Photoshop CS6에서 편집되었다. 몇몇 회전된 이미지 (예를 들면 도 3F)에서, 회전은 조직 섹션의 완전히 외부에서 빈 영역에 무색 공간을 초래하였고 흑색 필이 첨가되었다. Adobe Illustrator CS6은 최종 모형 생산에 사용되었다.

[0149] **생체내 MADR 효율의 정량화**

[0150] 각 조건 경우에, 2마리 새끼는 pCAG-TagBFP2-nls, pDonor-smFP-HA, 및 Flp-2A-Cre로 EP되었다. 뇌는 EP 2일 후 채집되었고, 각 뇌로부터 2개 비-인접한 섹션은 HA-태그 항체 및 EGFP로 염색되었다. 각 섹션 경우에, ~25 BFP+ 세포는 무작위로 선택되었고, 그 중 BFP+ 세포 중 HA+ 및 EGFP+ 세포는 카운팅되었다. 비율은 각 그룹에 대하여 4개 섹션으로 평균화되었다.

[0151] **유세포분석**

[0152] 세포는 이전에 기재된 대로 수집되었다 (Breunig 등, 2015). 세포는 PBS에서 간단히 린스되었고, Accutase (Millipore)를 사용하여 효소적 해리에 의해 제거되었고, 3 분 동안 250g에 펠렛화되었고, 배지에서 재현탁되었다. FACS는 Cedars-Sinai Flow Cytometry Core에 Beckman Coulter MoFlo에서 실시되었다.

[0153] **웨스턴 블랏**

[0154] 세포 펠렛은 램리 완충액에서 재현탁되었고 5 분 동안 95℃에 비등되었다. 단백질 농도는 ThermoScientific NanoDrop 2000에서 측정되었다. SDS-PAGE 분리 및 니트로셀룰로오스 막으로 이동 후, 단백질은 표 3에서 열거된 항체를 사용하여 검출되었고, 0.1% PBS- Tween내 5% 밀크에 희석되었다. 모든 이차 항체 (Li-cor IRDye®)는 1:15000으로 사용되었다. 단백질은 Li-Cor Odyssey® CLX Imaging System을 사용하여 적외선 검출에 의해 시각화되었다.

[0155] **단일-세포 웨스턴 블랏**

[0156] mTmG mNSC는 T75 플라스크내 어느 한쪽 piggybac 또는 MADR TagBFP 플라스미드 6 μg 및 FlpO 2A Cre 6 μg으로 뉴클레오펙션되었다 (Lonza VPG-1004). 4일 후, 세포는 FACS를 통해서 분류되었고, 100,000-200,000 BFP+

세포는 Milo scWestern 칩 (ProteinSimple C300)에 씌워졌다. 각 칩은 Cy3에서 1:20으로 기니 피그 mKate (Kerafast EMU108) 그리고 647에서 1:20으로 토끼 히스톤 H3 (Cell Signaling 4499)에 대하여 염색되었다. 이미징은 Innoscan 710 마이크로어레이 스캐너를 사용하여 수행되었다.

[0157] **독시사이클린 및 푸로마이신 투여**

[0158] 독시사이클린 (Clontech 631311)은 100ng/ml의 최종 농도로 배양 배지에 첨가되었다. 푸로마이신 (Clontech 631305)은 1 µg/ml로 사용되었다.

[0159] **멀티-miR-E 녹다운 효율 정량화**

[0160] 우리는 F1Ex-기반된 이식유전자 발현, 구체적으로 Cre-매개된 역위 및 EGFP 카세트 (F1Ex-EGFP)의 활성화를 이전에 사용하였다. Nf1, Pten, 및 Trp53을 표적하는 우리의 멀티-miR-E 표적화를 테스트하기 위해, 우리는 다중 miR-E (F1Ex-멀티-miR-E)를 보유하는 CAG-구동된 F1Ex-기반된 작제물을 만들었다. 산후 mNSC 라인, EGFP 또는 F1Ex-멀티-miR-E 및 Cre-재조합효소 벡터로 형질감염된, CD1 새끼 뇌를 해리시킴으로써 획득되었다. 형광성 세포는 분류되었고 mRNA 추출에 적용되었고 Nf1, Pten, 및 Trp53에 대하여 qPCR 프로브를 사용하는 SYBR-기반된 Fluidigm BioMark 동적 배열에 적용되었다.

[0161] **조직 청소하기**

[0162] 전체 마운트 이미징화 경우에, iDisco 조직 청소하기 방법은 사용되었다 (Renier 등 2014). 고정된 샘플은 실온에 각 1 시간, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100% 메탄올/H₂O에서 점차적으로 탈수되었고, 그 다음 4℃에 밤새 100% 메탄올내 5% H₂O₂에서 밤새 표백된 다음, 점차적으로 재수화되었다 (실온에 각 1 시간, 80%, 60%, 40%, 20% 메탄올/H₂O, 그 다음 0.2% Triton X-100이 있는 PBS). 샘플은 그 다음 37℃에 2일 동안 0.2% Triton X-100, 20% DMSO, 및 0.3M 글리신이 있는 PBS에서 인큐베이션되어 조직을 투과화하였고, 그 다음 37℃에 2일 동안 0.2% Triton X-100, 10% DMSO, 및 6% 정상 당나귀 혈청이 있는 PBS에서 인큐베이션되어 염색을 위하여 조직을 차단시켰다. 샘플은 그 다음 5 일 동안 37℃에, 0.2% Triton 및 10 µg/ml 헤파린 (PTwH)이 있는 PBS에서 일차 항체로 인큐베이션된 다음, 실온에 각 1 시간, PTwH의 5회 세정, 더하기 실온에 1회 밤새 세정되었다. 샘플은 그 다음 5일 동안 37℃에, PTwH내 이차 항체에서 인큐베이션된 다음, 실온에 각 1 시간, PTwH의 5회 세정, 더하기 실온에 1회 밤새 세정되었다.

[0163] 염색 이후, 샘플은 실온에 각 1 시간, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 100% 메탄올/H₂O에서 점차적으로 재차 탈수되었고, 그 다음 4℃에 100% 메탄올에서 밤새 저장되었다. 샘플은 그 다음 실온에 3 시간 동안 메탄올내 66% 디클로로메탄 (DCM, Sigma 270997)의 용액에서 인큐베이션된 다음, 실온에 각 15 분, 100% DCM으로 2회 세정되었고, 그 다음 청소하기 및 이미징화를 위하여 디벤질 에테르 (DBE, Sigma 108014)에 직접적으로 배치되었다. 청소된 샘플은 암실에서 실온에 유리 컨테이너내 DBE에서 저장되었다. 샘플은 6mm WD 디핑 캡이 있는 2x/0.5 대물 렌즈 및 sCMOS 카메라 (Andor NEO 5.5)가 장착된 광 시트 현미경 (Ultramicroscope II, LaVision Biotec)을 사용하여 DBE에서 이미징화되었다.

[0164] 광 시트 데이터세트는 3D 시각화를 위하여 Imaris 9.1 (Bitplane)에 유입되었다. 인공물 및 형광성 잔해를 디지털로 제거하기 위해, 표면 툴은 원치 않는 형광의 표면 렌더링을 창출하는데 사용되었고, 표면 메뉴에서 '마스 크 올' 기능은 제거된 잔해가 있는 형광 채널을 창출하는데 사용되었다. 전체 샘플의 디지털 표면을 창출하기 위해, 부피-렌더링 툴은 '정상 음영'으로 세팅되었고 색상은 회색으로 세팅되었다. 3-D 데이터세트의 영화는 '애니메이션' 툴을 사용하여 생성되었다.

[0165] **확장 현미경검사**

[0166] 샘플은 Pro-ExM 프로토콜 (Tillberg 등 2015)에 따라 확장 현미경검사를 위하여 생성되었다. 간단히, 100 µm 섹션은 EGFP 및 HA-태그를 위하여 염색되었다. 확장 전, 샘플은 확장전 이미징화를 위한 공초점 현미경 (Nikon AIR)을 사용하여 물에서 이미징화되었다.

[0167] 샘플은 실온에 밤새, 10% DMSO가 있는 PBS에서 0.1 mg/ml 아크릴로일-X, SE ((6-((아크릴로일)아미노)헥산산, 숙신이미딜 에스테르; Thermo-Fisher)에 앵커링되었다. PBS (3 x 10 분)로 세정 후, 샘플은, 0.2% (w/w) 테트라-메틸에틸렌디아민 (TEMED), 0.2% (w/w) 과산화암모늄 (APS), 및 0.1% (w/w) 4-하이드록시-2,2,6,6-테트라메틸피페리딘-1-옥실(4-하이드록시-TEMPO)의 첨가 직후, 단량체 용액 (PBS, 2M NaCl, 8.625% (w/w) 아크릴산나트륨, 2.5% (w/w) 아크릴아미드, 0.15% (w/w) N,N-메틸렌비스아크릴아미드)에서 4℃에 30 분 동안 인큐베이션되

었다. 슬라이스는 그 다음 겔화를 위하여 37℃에 2 시간 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 후, 샘플은 소화 완충액 (50 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 M NaCl)에서 8 단위/ml로 희석된 Proteinase K (New England Biolabs)를 함유하는 소화 용액에서 진탕 없이 실온에 6-웰 플레이트에서 밤새 인큐베이션되었다. 소화 이후, 샘플은 실온에 세정 당 1 시간, 과량의 H₂O로 4 회 세정되었고, 그 다음 H₂O내 2% 저용융 아가로스에 서 안정화된 다음 이미지화되었다. 이미지는 40x 긴 WD 대물렌즈 (Nikon CFI Apo 40xw NIR)가 있는 공초점 현미 경 (Nikon A1R)을 사용하여 획득되었다.

[0168] **병리학**

[0169] 표백 후, 면역조직화학은 405 채널에서 EGFP에 대하여 염색하기 위해 수행되었다. 이차 항체에서 인큐베이션 후, 섹션은 실온에 2 분 동안 PBS내 50 μM Draq5 (Cell signaling 4084S)에서 인큐베이션된 다음, PBS (3 x 5 분) 세정되었다. 섹션은 그 다음 실온에 2 분 동안 80% 에탄올내 2% w/w Eosin Y (Sigma E4009)에서 인큐베이션된 다음, PBS (3 x 5 분)로 세정되었다. 마지막으로, 섹션은 3 분 동안 또 다른 Draq5 용액 (PBS내 50 μM)에 인큐베이션된 다음, PBS로 세정, 탑재, 및 이미지화되었다.

[0170] **생체내 dRMCE 효율 측정**

[0171] 각 조건 경우에, 새끼는 pDonor-smFP-Myc 및 Flpo-2A-Cre로 EP되었다. 뇌는 EP 2일 후 채집되었고, 각 뇌로부터 2개 비-인접한 섹션은 Myc-Tag 항체 및 EGFP로 염색되었다. 각 섹션 경우에, 세포는 Oculus Rift 시스템과 Syglass VR을 사용하여 삽입 (Myc 발현됨) 및 cre 절제 (EGFP만 발현됨)를 위하여 정량화되었다. 정량화는 섹션 당 카운팅된 총 세포의 백분율로서 표시된다. 분율은 각 그룹에 대하여 상이한 동물로부터 2개 섹션으로 평균화 되었다. 염료가 Alexa647과 동일한 파장에서 형광하는 것으로 밝혀졌기 때문에 패스트 그린은 이들 검정에서 생략되었다. 염료가 더 긴 생존 실험에서 신속히 희석하였어도, 초기 (0-2 일) 단일-카피 리포터 검출을 혼동시켰다.

[0172] **U6-sgRNA 단편의 PCR-생성**

[0173] 역 스캐폴드 및 순방향 프라이머 (IDT DNA)는 PCR 반응 및 후속 정제에서 조합되어 농축된 sgRNA를 만들었다 (Ran 등, 2013). 100ng의 각 단편은 EP를 위하여 플라스미드 DNA와 조합되었다. 우리는 종양 모델링을 위하여 이전에-검증된 표적 부위를 사용하였다 (Xue 등, 2014, Heckl 등, 2014) (표 3).

[0174] **췌관 종양 세포에서 InDel 돌연변이 시퀀싱**

[0175] 종양 세포의 순수한 개체군은 FACS에 의해 수득되었고 게놈성 DNA는 분리되었다 (Qiagen DNeasy). gRNA 표적 부위를 증폭하는 프라이머를 사용하여, 우리는 Nf1, Trp53, 및 Pten에 대하여 InDel 돌연변이를 함유한다고 예상된 영역을 PCR 증폭시켰다. PCR 증폭된 단편은 Thermo Fisher Zero Blunt TOPO 키트를 사용하여 토포 클로닝되었고 One Shot MAX Efficiency DH5-T1R 세포로 형질전환되었다.

[0176] **CRISPR 염기 편집의 확인**

[0177] 미성숙한 정지 코돈 염기 전환 경우에, EGFP+ 세포는 FACS에 의해 수득되었고, 게놈성 DNA는 분리되었다 (Qiagen DNeasy). sgRNA 표적 부위를 증폭하는 프라이머를 사용하여, 우리는 Nf1, Trp53, 및 Pten에 대하여 염기 전환을 계속한다고 예상된 영역을 PCR-증폭시켰다. 앰플리콘은 20ng/ul로 정규화되었고 AMPLICON-EZ 서비스 (Genewiz)에 시퀀싱을 위하여 보내졌다.

[0178] 각 유전자-프라이머 쌍을 위한 Fastq 파일은 STARlong, 및 디폴트 파라미터가 있는 bwa-mem을 사용하여 그 유전자 좌위를 함유하는 주문형 게놈 파일에 정렬되었고, 이들 모두는 유사한 결과를 제공하였다. BAM 파일은 시각화를 위하여 IGV에 업로딩되었다.

[0179] **Akaluc 생체내 생물발광 이미지화**

[0180] 스톡 아칼루민-HCL은 10mM로 dH₂O에 재현탁되었고 -80에 저장되었다. 분취량은 5mM의 최종 농도 및 10uL/g w/v 마우스의 최종 수량으로 dH₂O에 희석되었고, 이미지화에 앞서 IP 주사되었다. 마우스는 IACUC 프로토콜에 따라 이소플루오란으로 마취되었고, 1.5 FOV 및 60s 노출 속도로 IVIS Ilumina XRMS를 사용하여 이미지화되었다.

[0181] **조직 해리**

[0182] 마우스는 CO₂ 챔버에서 안락사되었고 뇌는 PBS에서 수집되었다. 즉시, EGFP+ 조직은 Revolve Hybrid Microscope

(Echo Labs, San Diego, CA) 하에 현미해부되었다. 종양의 크기에 의해 허용되었다면, 잔여 종양 조직이 있는 너의 일부 유해는 조직 분석을 위하여 4% PFA에서 고정되었다. 현미해부된 조직은 <1 mm 조각으로 기계적으로 해부되었고 Collagenase IV (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ), 및 DNase I (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ)로 추가로 소화되었다. 생성된 단일 세포 현탁액은 40mm 셀 스트레이너 (Stellar Scientific, Baltimore, MD)를 통해서 여과되었고 적혈구는 ACK 용해 완충액 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)으로 용해되었다. 단일 세포 현탁액은 3개 파트로 갈라졌다: 첫 번째, scRNAseq 또는 sc-ATACseq 실험 경우에, 단일 세포 샘플로부터 GFP+ 세포는 (10X 크롬에 대하여 1.5ml 튜브에) FACS 분류되었다. 이차 분획은 시험관내 세포주 확립에 사용되었다. 구체적으로, 세포는 페니실린-스트렙토마이신-암포테리신 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 비타민 A 없는 B-27 보충물 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), Glutamax (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), EGF (Shenandoah Biotechnology, Warwick, PA), FGF (Shenandoah Biotechnology, Warwick, PA), PDGF-AA (Shenandoah Biotechnology, Warwick, PA) 및 헤파린 (StemCell Technologies, Cambridge, MA)으로 보충된 신경기저 배지 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)에 재현탁되었고; CELLstart CTS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 처리된 T25 플라스크에서 배양되었다. 마지막으로, 단일 세포 현탁액의 마지막 세 번째는 80% 메탄올-PBS에 고정되었고 -80C에 저장되었다.

[0183] **ScRNA-seq 라이브러리 생성**

[0184] 단일-세포 RNA-seq 라이브러리는 Single Cell 3' v2 Reagent Kits User Guide (10x Genomics, Pleasanton, California) 당 제조되었다. 세포성 현탁액은 Chromium Controller 기기 (10X Genomics)에 로딩되어 단일-세포 Gel Bead-In-EMulsions (GEM)를 생성하였다. GEM-역 전사 (RT)는 Veriti 96-웰 온도 순환기 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)에서 수행되었다. RT 후, GEM은 수확되었고 cDNA는 증폭되었고, SPRIselect Reagent Kit (Beckman Coulter, Pasadena, CA)로 청소되었다. 지수화된 시퀀싱 라이브러리는 효소적 단편화, 말단-복구, A-테일링, 어댑터 결합, 결합 청소, 샘플 지수 PCR, 및 PCR 청소를 위한 Chromium Single-Cell 3' Library Kit를 사용하여 작제되었다. 바코딩된 시퀀싱 라이브러리는 KAPA Library Quantification Kit (KAPA Bio- systems, Wilmington, MA)를 사용하여 정량적 PCR에 의해 정량화되었다. 시퀀싱 라이브러리는 주문형 시퀀싱 세팅 (판독 1에 대하여 26bp 및 판독 2에 대하여 91bp)이 있는 NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA)에서 로딩되었다.

[0185] **ScRNA-seq 판독 정렬**

[0186] 역다중화된 미처리 판독은, 모든 단백질 코딩 및 긴 비-코딩 RNA 유전자를 함유하는, mm10 주석과 주문형 UCSC 마우스 참조를 사용한, 디폴트 파라미터가 있는 STAR (버전 2.5.1) (Dobin 등, 2013)를 사용하여 전사체에 정렬되었다. 모든 샘플에서 각 유전자에 대하여 발현 카운트는 붕괴되었고 Cell Ranger 소프트웨어 버전 2.0.0 (10X Genomics)을 사용하여 고유 분자 식별기 (UMI) 카운트에 정규화되었다. 결과는 세포 바코드가 행으로서, 유전자 정체가 열로서 있는 대형 디지털 발현 매트릭스이다.

[0187] 개체군의 역학의 2-D 프로젝션을 획득하기 위해, 주성분 분석 (PCA)은 최상위 5,000개의 가장 가변적 유전자의 정규화된 유전자-바코드 매트릭스에서 먼저 운용되어 R v3.4.2-4에서 Seurat 패키지 버전 2.1-3 (Butler 등, 2018)을 사용하여 차원의 수를 감소시켰다.

[0188] **sc-ATACseq에 대한 핵 단리**

[0189] GFP+ FACS 분류된 세포는 sc-ATACseq에 대한 제조 지침 (10x Genomics, Pleasanton, California)에 따라 처리되었다. 구체적으로, 분류된 세포는 40 mm 셀 스트레이너를 통해서 여과되었고, 펠렛화되었고 용해 완충액 (Tris-HCl 10mM, NaCl 10mM, MgCl₂ 3mM, Tween-20 0.1% (Bio-Rad, 1610781), Nonidet P40 대체물 0.1% (Sigma-Aldrich, 74385), 디지토닌 0.01% (Sigma-Aldrich, 300410) 및 Nuclease-free 물내 BSA 1%)의 1 부피에서 재현탁되었고, 세포는 최적 세포 용해까지 빙상에서 인큐베이션되었다. 그 다음, 용해 완충액은 세정 완충액 (Tris-HCl 10mM, NaCl 10mM, MgCl₂ 3mM BSA 1%, 뉴클레아제-없는 물내 Tween-20 0.1%)의 10 부피를 첨가시킴으로써 차단되었다. 단리된 핵은 펠렛화되었고 1x 핵 완충액 (10x Genomics, Pleasanton, California)에서 재현탁되었고, 마지막으로, 핵 농도는 혈구계수기로 계산되었고 sc-ATACseq 라이브러리 작제 프로토콜로 즉시 진행되었다.

[0190] **scATAC-seq 라이브러리 작제**

[0191] scATAC 시퀀싱 라이브러리는 제조업체의 프로토콜 (10X Genomics 1000110)에 따라 10X Genomics Chromium 플랫폼에서 제조되었다. 단리된 핵 현탁액은 희석되었고 그 다음 10,000개 세포의 표적된 핵 회수를 위하여 전치 혼

합으로 인큐베이션되었다. GEM은 그 다음 Chromium Chip E (10X Genomics 1000082)에서 포획되었다. GEM 인큐베이션 이후, 청소는 Dynabeads MyOne Silane 비드 (10X Genomics 2000048) 및 SPRiSelect 시약 (Beckman Coulter B23318)을 사용하여 수행되었다. 마지막으로, 라이브러리는 총 10 SI PCR 사이클 동안 증폭되었다.

[0192] **인간 단일-세포 RNA-seq 데이터 처리**

[0193] 3개 공공 처리된 데이터 (GSE70630, GSE89567, 및 GSE102130)는 그들의 각자 GEO 웹사이트로부터 취득되었다. GSE70630 및 GSE89567은 TPM 값으로 역-전환되었다. GSE102130은 K27M (GSE102130_K27M) 및 GBM (GSE102130_GBM) 데이터세트 (6 및 3 환자, 각각)로 분할되었다. 데이터세트에서 비-악성 미세아교세포 및 mOG를 식별하기 위해, 우리는 Scanpy (Wolf 등, 2018)에서 이행된 대로 PCA-tSNE 및 루벡 클러스터링을 사용하였다. t-테스트 및 윌콕슨에 의해 이중-체크된 경우에, 미세아교세포 (CSF1R, LAPTM5, CD74, TYROBP) 또는 mOG (MBP, MOG, PLP1)의 마커들을 함유하는 클러스터는 제거되었다. 각 데이터세트 경우에, 악성 종양 세포의 수는 원 저자에 의해 결정된 것과 밀접하게 매칭하였다 (GSE70630: 4044 대 4050, GSE89567: 5157 대 5097, GSE102130: 2270 대 2259). GSE102130_GBM은 임의의 미세아교세포 또는 mOG를 함유하지 않았다. Seurat에서 처리 경우에, GSE102130_K27M은 6개 샘플로 분할되었다. MADR 마우스 데이터세트를 포함하는, 모든 데이터세트는 10e5의 라이브러리 크기를 갖도록 정규화되었다. 종양 유형에 걸쳐서 비교 분석 경우에, 우리는 (Filbin 등, 2018)에 의해 정의된 대로 상대 발현을 사용하여 도 6K에서 히트맵을 만들었다.

[0194] **마우스 단일-세포 RNA-seq 데이터 처리**

[0195] 3개 10X UMI 카운트 매트릭스 (mK27M1, mK27M2, mK27M3)는 각 세포에 대하여 10e5의 라이브러리 크기를 갖도록 정규화되었다. 그 다음, 우리는 공공 데이터세트와 동일한 식으로 클러스터링하여 Scanpy (Wolf 등, 2018)에서 미세아교세포 및 mOG를 구별하였다. 10% 초과 미토콘드리아성 관독, 1000 미만 고유 관독, 또는 5000 초과 고유 관독을 가졌던 세포는 Seurat (2.3.3) (Butler 등, 2018)에서 여과되었다. 여과 후, mK27M1, mK27M2, 및 mK27M3, 각각에서 2761개, 562개, 및 3469개 세포가 있었다.

[0196] **Seurat 처리**

[0197] P1-4 유전자는 (Filbin 등, 2018)로부터 취득되었고 각 인간 및 마우스 데이터세트에서 공통 하위구조를 식별하기 위해 고도로 가변적인 유전자 논쟁 (유전자.용도)으로서 사용되었다. 세포는 CCA-UMAP ('umap'이 있는 RunMultiCCA 및 DimPlot)를 사용하여 클러스터링되었고, 클러스터-특이적 마커 유전자는 디폴트 논쟁으로 Seurat 기능 "find_all_markers"를 사용하여 식별되었다. 마우스 및 인간 CCA-UMAP을 병합시키기 위해, 마우스 유전자 이름은 Ensembl BioMart (www.ensembl.org/biomart)를 사용하여 그들의 이중상동 인간 상대로 전환되었다. 모듈 스코어링 경우에, 기능들 CellCycleScoring 및 AddModuleScore가 사용되었다. 4개 유전자 목록 (OC, AC, OPC, 및 Cycle)은 P1-4 유전자에 상응한다. 각 클러스터에 대하여 많아야 상위 50개 유전자를 이용한 DoHeatmap 기능은 히트맵을 만드는데 사용되었다.

[0198] **마우스 및 인간 데이터세트에 관한 SCENIC**

[0199] SCENIC (1.0.0-02)은 (Aibar 등, 2017)에서 기재된 대로 모든 디폴트 세팅으로 운용되었다. 우리는 각 종에 대하여 2개 디폴트 데이터베이스 (500bp-상류 및 tss-중심된-10kb)를 사용하였다. 각 세포에 대하여 10e5의 라이브러리 크기를 지닌 미처리 매트릭스 그리고 Seurat 처리로부터 메타데이터 데이터프레임은 SCENIC에 대하여 입력으로서 사용되었다. 히트맵 및 tSNE 플롯팅 경우에, 우리는 2진 레귤론 출력을 사용하였다. 패키지 구성요소 AUCell은 각 레귤론에 대하여 역치를 선택하는데 사용되었고 그 다음 각 세포에서 그들의 풍부화에 대하여 각 레귤론을 스코어링하였다 (Aibar 등, 2017). 스코어는 그 다음 2진화되었고 (온 대 오프), 출력은 이러한 2진 활성 매트릭스에 따라 클러스터링되었다 (Aibar 등, 2017).

[0200] **마우스 단일-세포 ATAC-seq 데이터 처리**

[0201] CellRanger는 개방 염색질 영역을 식별 및 주석하는데 그리고 샘플의 응집 및 세포의 초기 클러스터링 및 모티프 분석을 수행하는데 사용되었다. CellRanger 출력은 cisTopic 및 SnapATAC에 대하여 입력으로서 사용되었고 샘플은 클러스터, 토픽, 본체론, 유전자 접근가능성, 및 모티프를 주석하기 위하여 권장된 세팅 (Bravo Gonzalez-Blas 등, 2019, Fang 등, 2019)에 따라 처리되었다. Harmony 패키지 (Korsunsky 등, 2018)는 E18 데이터세트를 정렬하기 위해 SnapATAC와 공동으로 디폴트 세팅에 따라 사용되었다.

[0202] **ChIP-seq 제조**

[0203] 우리는 30 µg의 마우스 소아 뇌 종양 염색질 및 4 µg의 항체 (Active Motif, cat # 39155)를 사용하여

H3K27me3 ChIP 반응을 완료하였다. ChIP 반응은 또한 시퀀싱 데이터의 정규화를 위하여 초과리 염색질 스파이크를 함유하였다. 우리는 ChIP DNA의 작은 분획을 희석시켰고 유사한 검정에서 양호하게 작동되었던 양성 대조군 프라이머 쌍을 사용하여 qPCR을 수행하였다. H3K27me3 경우에, 활성 유전자 ACTB의 프로모터 영역에 표적된 프라이머 쌍은 양호한 음성 대조군의 역할을 한다.

[0204] **조직학적 분석**

[0205] Nikon Elements 및 ImageJ 소프트웨어는 이미지를 분석하는데 사용되었다. 모든 결과는, 달리 지시된 경우를 제외하고, 평균 $\pm$ SEM으로서 나타난다. 통계적 분석 경우에, 하기 전환이 사용되었다: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. "스튜던트 t-테스트"는 페어링되지 않은 테스트를 지칭한다.

[0206] **전사체적 분석**

[0207] 3개 10X UMI 카운트 매트릭스 (mK27M1, mK27M2, mK27M3)는 각 세포에 대하여 10^5 의 라이브러리 크기를 갖도록 정규화되었다. 그 다음, 우리는 공공 데이터세트와 동일한 식으로 클러스터링하여 Scanpy에서 미세아교세포 및 mOG를 구별하였다. 10% 초과 미토콘드리아성 판독, 1000 미만 고유 판독, 또는 5000 초과 고유 판독을 가졌던 세포는 Seurat (2.3.3)에서 여과되었다. 여과 후, mK27M1, mK27M2, 및 mK27M3, 각각에서 2761개, 562개, 및 3469개 세포가 있었다. 여과 후, mK27M1, mK27M2, 및 mK27M3, 각각에서 2761개, 562개, 및 3469개 세포가 있었다.

[0208] **ChIP-seq 분석**

[0209] ChIP-seq 판독은 bwa를 사용하여 마우스 참조 게놈 mm10에 정렬되었다. BigWig 트랙은 각 샘플에 대하여 생성되었다.

[0210] H3K27me3 클러스터링은 구축된 mm10 마우스 게놈을 지닌 각 샘플에 대하여 ngs.plot (버전 2.61) (Shen 등, 2014)을 사용하여 수행되었다. 7개 클러스터와 연관된 유전자의 목록은 Seurat에 유입되었고, 유전자의 각 클러스터에 대하여 발현은 Seurat AddModuleScore를 사용하여 계산되었다.

[0211] **염기 편집기 유전자형화**

[0212] EDITOR를 발현시키는 세포는 PCR 증폭에 적용되었다 (목록 프라이머). 각 유전자-프라이머 쌍에 대하여 Fastq 파일은 디폴트 파라미터와 STARlong 및 bwa-mem을 사용하여 그 유전자 좌위를 함유하는 주문형 게놈 파일로 정렬되었고, 이들의 양쪽은 유사한 결과를 제공하였다. BAM 파일은 시각화를 위하여 IGV에 업로딩되었다.

표 3.

시약 또는 공급원	공급처	식별자
항체		
닭 항-EGFP	Abcam	Cat# ab13970, RRID:AB_300798
염소 항-V5	Abcam	Cat# ab95038, RRID:AB_10676056
토끼 항-Sox9	Abcam	Cat# ab185230, RRID:AB_2715497
토끼 항-ALDH1L1	Abcam	Cat# ab56149, RRID:AB_879534
인간 항-C-Myc 에피토프 태그	Absolute Antibody	Cat# Ab00100-10.0
토끼 항-H3.3S31ph	Active Motif	Cat# 39637
닭 항-C-Myc 에피토프 태그	Aves	Cat# ET-MY100, RRID:AB_2313514
랫트 항-CD44	BD Biosciences	Cat# 550538, RRID:AB_39373
랫트 항-PDGFR α	BD Pharmingen	Cat# 558774, RRID:AB_397117
마우스 항-Foxj1	Invitrogen	Cat# # 14-9965-82 RRID: AB_1548835
토끼 항-AU1 에피토프 태그	Biolegend	Cat# 903101, RRID:AB_256502
양 항-p53	Calbiochem	Cat# PC35, RRID:AB_2240806
토끼 항-H3K27Me3	Cell Signaling	Cat# 9733, RRID:AB_2616029
양 항-V5	LSBio	Cat# LS-C136566, RRID: AB_10915392
랫트 항-GFAP	Invitrogen	Cat# 13-0300, RRID: AB_2532994
토끼 항-HA	Cell Signaling	Cat# 3724, RRID:AB_1549585
토끼 항-pRB1	Cell Signaling	Cat# 8516S, RRID:AB_11178658
토끼 항-Sox2	Cell Signaling	Cat# 3579, RRID:AB_2195767
토끼 항-Bmi1	Cell Signaling	Cat# 6964P, RRID:AB_10839408
토끼 항-H3K27Ac	Cell Signaling	Cat# 8173P, RRID:AB_10949887
마우스 항-TetR	Clontech	Cat# 631132
토끼 항-Dsred	Clontech	Cat# 632496, RRID:AB_10013483
마우스 항-V5	Invitrogen	Cat# R960-25, RRID:AB_2556564
토끼 항-mCherry	Kerafast	Cat# EMU-106
기니 피그 항-mKate2	Kerafast	Cat# EMU108
랫트 항-Tdtomato	Kerafast	Cat# EST203, RRID:AB_2732803
토끼 항-H3F3A	Lifespan Biosciences	Cat# LS-C148509-100, RRID:AB_11135921
토끼 항-H3F3A K27M	Millipore	Cat# ABE419, RRID:AB_2728728
토끼 항-NG2	Millipore	Cat# AB5320, RRID:AB_11213678
양 항-Dll1	R&D Systems	Cat# AF5026, RRID:AB_2092830
염소 항-Olig2	R&D Systems	Cat# AF2418, RRID:AB_2157554

[0213]

토끼 항-H3.3G34R	Revmab	Cat# 31-1120-00, RRID:AB_2716433
토끼 항-Atrx	Sigma	Cat# HPA001906, RRID:AB_1078249
마우스 항-Flag	Sigma Aldrich	Cat# F1804, RRID:AB_262044
기니 피그 항-GFAP	Synaptic Systems	Cat# 173 004, RRID:AB_10641162
박테리아성 및 바이러스 균주		
원 샷 MAX 효율 DH5-T1R 세포	Invitrogen	Cat# 12297016
클로닝에 대한 스텔라 화학적으로 유능한 세포	Clontech	Cat# 636766
화학물질, 펩타이드, 및 제조합 단백질		
Tris-EDTA 완충액	Sigma-Aldrich	Cat# E8008-100ML
페스트 그린 염료	Sigma Aldrich	Cat# F7258-25g
SignaGel 전극 젤	Medline Industries	Cat# PL11525CSZ
저-용점 아가로스	Fisher Bioreagents	Cat# bp1360-100
인간 포피 성장 인자	Sigma-Aldrich	Cat# E9644
헤파린	Sigma-Aldrich	Cat# H3393
염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF)	Millipore	Cat# GF003
독시사이클린	Clontech	Cat# 631311
푸로마이신	Clontech	Cat# 631305
메탄올	Sigma Aldrich	Cat# 179337
과산화수소 용액	Sigma Aldrich	Cat# H1009
Triton X-100	Sigma Aldrich	Cat# X-100-500ML
디메틸 술폭시드 (DMSO)	Sigma Aldrich	Cat# D2650-5X10ML
글리신	Sigma Aldrich	Cat# 410225-50g
정상 당나귀 혈청	Jackson ImmunoResearch	Cat# 017-000-121
디클로로메탄	Sigma Aldrich	Cat# 270997
디벤질 에테르	Sigma Aldrich	Cat# 108014
아크릴로일-X, SE, 6-((아크릴로일) 아미노)헥산산, 숙신이미딜 에스테르	Thermo-Fisher	Cat# A20770
NaCl	Sigma-Aldrich	Cat# S9888
아크릴산나트륨	Sigma-Aldrich	Cat# 408220
테트라메틸에틸렌디아민	Sigma-Aldrich	Cat# T9281
과황산암모늄	Sigma-Aldrich	Cat# A3678-25g
4-하이드록시-2,2,6,6- 테트라메틸피페리딘-1-옥실	EMD Millipore	Cat# 840130
프로테이나제 K	New England Biolabs	Cat# P8107S
Drqa5	Cell Signaling	Cat# 4084S

[0214]

에오신 Y	Sigma-Aldrich	Cat# E4009
콜라게나제 IV	Worthington Biochemical	Cat# LS004189
DNase I	Worthington Biochemical	Cat# LS002007
ACK 용해 완충액	Thermo Fisher Scientific	Cat# A1049201
신경기저 배지	Thermo Fisher Scientific	Cat# 21103049
페니실린-스트렙토마이신-암포테리신	Thermo Fisher Scientific	Cat# 15240096
비타민 A 없는 B-27 보충물	Thermo Fisher Scientific	Cat# A3353501
Glutamax	Thermo Fisher Scientific	Cat# 35050061
인간 EGF	Shenandoah Biotechnology	Cat# 100-26-500ug
인간 FGF (Shenandoah Biotechnology, Warwick, PA),	Shenandoah Biotechnology	Cat# 100-146-100ug
PDGF-AA (Shenandoah Biotechnology, Warwick, PA)	Shenandoah Biotechnology	Cat# 100-16-100ug
헤파린 용액 0.2%	StemCell Technologies	Cat# 07980
CELLstart	Thermo Fisher Scientific	Cat# A10142-01
아칼루민-HCL	Sigma Aldrich	Cat#: 808350
<i>상업적 검정</i>		
DNeasy	Qiagen	Cat# 69504
Zero Blunt TOPO 키트	Thermo Fisher	Cat# 450159
Chromium™ Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit v2	10X Genomics	Cat# 120237
SPRIselect Reagent Kit	Beckman Coulter	Cat# B23318
Chromium Single-Cell 3' Library Kit	10X Genomics	Cat# PN-120237
KAPA Library Quantification Kit	Roche	Cat# 07960140001
KAPA HiFi PCR 키트	Kapabiosystems	Cat# KR0368
In-Fusion 클로닝	Clontech	Cat# 638920
Vacquinol-1	Sigma-Aldrich	SML1187
AKT 1/2 키나아제 억제제	Sigma-Aldrich	A6730
Tween20	Bio-Rad	1610781
디지털닌	Sigma-Aldrich	300410
Nonidet P40 대체물	Sigma-Aldrich	74385
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs	Cat# E2621L
<i>기탁된 데이터</i>		

[0215]

마우스 원시 및 분석된 데이터	본원	GEO: GSE117154, GSE131675, GSE131672
인간 데이터	GEO 웹사이트	GEO: GSE70630, GSE89567, GSE102130
P50 및 E18 마우스 scATAC 데이터	10X Genomics	www.10xgenomics.com/resources/datasets/
실험적 모델: 세포주		
마우스 MADR 세포주: K27M-1	본원	N/A
마우스 MADR 세포주: K27M-2	본원	N/A
마우스 MADR 세포주: K27M-3	본원	N/A
인간: HEK293T	ATTC	Cat# CRL-3216
실험적 모델: 개체/균주		
마우스: CD1	Charles River Laboratories	균주 코드 022
마우스: C57BL/6J	The Jackson Laboratory	JAX: 000664
마우스: Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J	The Jackson Laboratory	JAX: 007676
마우스: Gt(ROSA)26Sortm1.1(CAG-EGFP)Fsh/Mmjax	The Jackson Laboratory	JAX: 32037
올리고뉴클레오타이드		
sgRNA 표적화 서열: Pten: gcCTCAGCCATTGCCTGTGTG	본원	서열번호:36
sgRNA 표적화 서열: Trp53: GCCTCGAGCTCCCTCTGAGCC	본원	서열번호:37
sgRNA 표적화 서열: Nfl: GCAGATGAGCCGCCACATCGA	본원	서열번호:38
sgRNA 표적화 서열 (BE): Pten: CCTcAGCCATTGCCTGTGTG	본원	서열번호:39
sgRNA 표적화 서열 (BE): Trp53: CTGAGCcAGGAGACATTTTC	본원	서열번호:40
sgRNA 표적화 서열 (BE): Nfl: TCCTcAGTCACACATGCCAG	본원	서열번호:41
재조합 DNA		
플라스미드: pDonor-TagBFP2-3XFlag (cyto) WPRE	본원	N/A
플라스미드: pCag TagBFP2-V5 Cyto PB	본원	N/A
플라스미드: pDonor rtTA-V10-AU1-P2a-푸로-WPRE TRE-SM_FP-HA	본원	N/A
플라스미드: pDonor rtTA-V10-AU1-P2a-푸로-WPRE TRE-SM_FP-Myc	본원	N/A
플라스미드: pDonor rtTA-V10-AU1-P2a-푸로-WPRE TRE-SM_FP-Flag	본원	N/A

[0216]

플라스미드: pDonor rtTA-V10-AU1-P2a- 푸로-WPRE TRE SM_TagBFP-V5 (약-형광성)	본원	N/A
플라스미드: pCag-FlpO-2A-Cre	본원	N/A
플라스미드: pGLAST-FlpO-2A-Cre	본원	N/A
플라스미드: pGFAP-FlpO-2A-Cre	본원	N/A
플라스미드: pCag-F5-FlpE-2A-Cre-F5	본원	N/A
플라스미드: CMV FlpO-2a-Cre	본원	N/A
플라스미드: pAAV-Efla-flpo-2a-cre-wpre	본원	N/A
플라스미드: pAAV-(반전됨; 프로모터없음) TagBFP2-3Flag cyto-wpre	본원	N/A
플라스미드: CMV Flp-Ires-Cre	본원	N/A
플라스미드: AAVS1_Tagbfp2-V5-nls-P2A-Puro_Cag LoxP myrTdtomato FRT	본원	N/A
플라스미드: AAVS1_Bactin-loxP-Tagbfp2-V5-nls- FRT	본원	N/A
플라스미드: AAVS1_Bactin-lox71-Tagbfp2-V5-nls- FRT	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-myc (밝음) WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-myc (밝음) WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-Flag (밝음) WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-Myc (어둡) WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-HA (어둡) WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-flag (어둡) WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-mScarlet-3XSpot WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-lox66-mScarlet-3XSpot WPRE-FRT	본원	N/A
플라스미드: pDonor-mScarlet-3XSpot WPRE-FRT-10	본원	N/A
플라스미드: pDonor-lox66-mScarlet-3XSpot WPRE-FRT-10	본원	N/A
플라스미드: pDonor-mScarlet-3XSpot WPRE-FRT-11	본원	N/A

[0217]

플라스미드: pDonor-lox66-mScarlet-3XSpot WPRE-FRT-11	본원	N/A
플라스미드: pDonor-EGFP WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-lox66 EGFP WPRE-FRT	본원	N/A
플라스미드: pDonor- EGFP WPRE-FRT-10	본원	N/A
플라스미드: pDonor-lox66- EGFP WPRE-FRT-10	본원	N/A
플라스미드: pDonor- EGFP WPRE-FRT-11	본원	N/A
플라스미드: pDonor-lox66- EGFP WPRE-FRT-11	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_TagBFP2-V5 (약-형광성) WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_TagBFP2-V5-(cyto)-2A-Vcre WPRE	본원	N/A
플라스미드: pCag FfEx Vlox SM_FP-myc (어둡) WPRE	본원	N/A
플라스미드: pCag TagBFP2-V5 Cypo PB triple miR-E shNfl.789:shTrp53.8914:shPten.1524 WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM-TagBFP2-V5-P2A-SpCas9 WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-mycBRIGTH-pTV1 FNLS-Cas9-BW WPRE	본원	N/A
pC0043-SpCas9 BbsI (Empty) crRNA 백분 (에피솜적)	본원	N/A
pC0043-SpCas9 sg.Trp53 (에피솜적; FNLS 염기 편집기와 사용을 위한)	본원	N/A
pC0043-SpCas9 sg.Nfl (에피솜적; FNLS 염기 편집기와 사용을 위한)	본원	N/A
pC0043-SpCas9 sg.Pten (에피솜적; FNLS 염기 편집기와 사용을 위한)	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-myc-P2A-Es-pCas9 WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-myc-P2A-Cas13b WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-myc-P2A-CasRX WPRE	본원	N/A
pU6 BsmBi Empty SpCas9- crRNA Cag	본원	N/A

[0218]

miRFP670-3X-HA WPRE PB		
pU6 BsmBi Empty CasRX- crRNA Cag miRFP670-3X-HA WPRE PB	본원	N/A
pU6 BsmBi Empty CasI3b- crRNA Cag miRFP670-3X-HA WPRE PB	본원	N/A
플라스미드: pDonorRCE TagBFP2- Hras G12V Wpre (RCE 공여자 상용성)	본원	N/A
플라스미드: pDonor TagBFP2-Hras G12V Wpre (mtmg 공여자 상용성)	본원	N/A
플라스미드: Ubi-EGFP-HRasG12V PB	Breunig 등 Cell Reports, 2015	10.1016/j.celrep.2015.06.012
플라스미드: pDonor- SM_FP_Myc_p2a_YAP1-MAM11D	본원	N/A
플라스미드: pDonor- SM_FP_Myc_p2a_c11orf95-RELA	본원	N/A
플라스미드: pDonor SM_FP_Myc_p2a_Kras G12A	본원	N/A
플라스미드: pDonor-H3F3A-K27M- EGFP pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53-V5 WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-H3F3A-G34R- EGFP pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53-V5 WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-H3F3A-WT- EGFP pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53-V5 WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP- mycBRIGHT- pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53 270h-P2ACO3-H3F3A K27M WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP- mycBRIGHT- pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53 270h-P2ACO3-H3F3A G34R WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP- mycBRIGHT- pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53 270h-P2ACO3-H3F3A WT WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP- mycBRIGHT- pTV1 Pdgfra D842V	본원	N/A

[0219]

COTv1 Trp53 270h-P2ACO3-H3F3A K27M WPRE::Efla-Akaluc(반전됨)		
플라스미드: pDonor-PIP-NLS-Venus-P2A-mCherry-hGEM1/110	본원	N/A
플라스미드: pDonor-PIP-NLS-Venus-P2A-mIRFP670-hGEM1/110	본원	N/A
플라스미드: pDonor-PIP-NLS-mIRFP709-P2A-mIRFP670-hGEM1/110 (NIR-FUCCI)	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-mycBRIGHT- pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53 270h-P2ACO3-H3F3A K27M WPRE::Efla-NIR-FUCCI (반전됨)	본원	N/A
플라스미드: pDonor-SM_FP-mycBRIGHT- pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53 270h-P2ACO3-H3F3A K27M WPRE::Efla-NIR-FUCCI* (*-hGEM C- 말단 NLS 돌연변이체; 반전됨)	본원	N/A
플라스미드: pDonor rtTA-V10-AU1-P2a-푸로-WPRE	본원	N/A
플라스미드: pDonor rtTA-V10-AU1-P2a-푸로-WPRE TRE-EGFP	본원	N/A
플라스미드: pDonor rtTA-V10-AU1-P2a-푸로-WPRE TRE-EGFP/mDII1	본원	N/A
플라스미드: pX330-이중 U6-p16-p19- cdkn2a-Chimeric_BB-CBh-eSpCas9(1.1)	본원	N/A
플라스미드: pX330-U6-sg.ATRX-Chimeric_BB-CBh-eSpCas9(1.1)	본원	N/A
플라스미드: pX330-U6-sg.AAVS1-Chimeric_BB-CBh-eSpCas9(1.1)	본원	N/A
플라스미드: AAVS1-TALENs	Gift: Conklin 및 Mandegar	(Mandegar 등, 2016)
플라스미드: T7 FlpO-2A-Cre	본원	N/A
플라스미드: MC-FlpO-2A-Cre (천계)	본원	N/A
미니서클: MC-FlpO-2A-Cre	본원	N/A
플라스미드: CMV Flp-2A-Cre	Gift: Y. Voznyanov	(Anderson 등, 2012)

[0220]

플라스미드: mT/mG	Addgene Plasmid #17787	(Muzumdar 등, 2007)
플라스미드: CAG LF mTFPI	Gift: I. Imayoshi	(Imayoshi 등, 2012)
소프트웨어 및 알고리즘		
Nikon's Confocal NIS-Elements Package	Nikon	www.microscope.healthcare.nikon.com/products/software
Imaris 9.1	Bitplane	imaris.oxinst.com/
ImageJ 소프트웨어	NIH	imagej.nih.gov/ij/
Syglass VR	IstoVisio	www.syglass.io/
STAR/STARlong (버전 2.5.1)	Dobin A 등 2012	github.com/alexdobin/STAR
Cell Ranger 소프트웨어 버전 2.0.0 (scRNA-seq) 및 3.0.2 (snATAC-seq)	10X Genomic	support.10xgenomics.com/single-cell-gene-expression/software/downloads/
Seurat	Butler 등 2018	satijalab.org/seurat/
Scanpy	Wolf FA 등 2017	scanpy.readthedocs.io/en/latest/
SCENIC (1.0.0-02)	Aibar S 등 2017	github.com/aertslab/SCENIC
cisTOPIC	Bravo 등 2019	github.com/aertslab/cisTopic
SnapATAC	Fang 등 2019	github.com/r3fang/SnapATAC
Harmony	Korsunsky 등 2019	github.com/immunogenomics/harmony
ngs.plot v2.61	Shen 등 2014	github.com/shenlab-sinai/ngsplot
IGV v2.5.0	Robinson 등 2011	software.broadinstitute.org/software/igv
bwa-mem	Li, H 등 2009	github.com/lh3/bwa

실시예 2 - 결과

MADR 전략 및 반응 검증

*mTmG*는 막 tdTomato를 구성적으로 발현시키고 Cre-매개된 재조합시 EGFP 발현을 스위칭하는 마우스 라인이다. *mTmG*에서 MADR을 유효화시키기 위해, 우리는 loxP 및 FRT 부위에 의해 축적된 *TagBFP2*를 인코딩하는 프로모터-없는 공여자 플라스미드를 창출하였다 (도 1A). 우리는, FRT 부위에 반복된 통합을 방지하는, Flp-매개된 통합에 불응성인, 최소의 34-bp FRT를 사용하였다. 게다가, 개방 판독 프레임 (ORF)은 PGK 및 삼량체화된 SV40 폴리 아데닐화 신호 (도 1A)에 의해 선행되어 통합되지 않은 에피솜 및 무작위로 통합된 전체-플라스미드로부터 의사 전사를 우회한다. ORF는, 발현을 증가시키는 우드치크 간염 바이러스 전사후 조절 요소 (WPRE), 그리고 토끼 베타-글로빈 pA가 뒤따른다 (도 1A). 우리는 *mTmG* 동형접합성 및 WT 마우스를 교배시켜 이형접합성 *Rosa26^{WT/mTmG}* 마우스 (*mTmG^{Het}*)를 생성하였고, 이로부터 이형접합성 마우스 신경 줄기 세포주 (mNSC)는 유래되었다. 우리는 그 다음 *TagBFP2* 또는 *TagBFP2-Hras^{G12V}* 공여자 (10 ng/μl) 및 Flp-Cre 발현 벡터 (Flp-Cre) (10 ng/μl)를 뉴클레오텍션시킴으로써 2개 MADR 라인을 만들었고, 이들 각각은 3개 유전적으로 명확하게 착색된 세포와 혼합되었다: tdTomato+, EGFP+, 및 TagBFP2+ (도 1B-C 및 8A). 뉴클레오텍션 1주 후, FACS 분석은 *TagBFP2*의 경우에 ~1%로 MADR 효율을 나타냈다. *Hras^{G12V}*는 상당히 빠르게 증식하였다 (도 8B). TagBFP2+ 세포의 약 5%는 어느 한 쪽 tdTomato 또는 EGFP를 유지하였다. 더 많은 세포는 tdTomato를 유지하였고, 이는 그 더 느린 분해 역학에 의해 설명될 수 있다 (도 8B-C). 분류된 세포 배양하기의 또 1주 후, 우리는 웨스턴 블랏에 의해 잔여 EGFP 또는 tdTomato 및 단일-대역 *Hras^{G12V}*의 부재를 확인하여, 재조합된 *Rosa26* 좌위가 항생제 선택 없이 응집물, 다클론성 개체군 수준에서 단일 정확하게-크기화된 폴리펩타이드를 발현시킨다는 것을 나타냈다 (도 8D). 세포당 기준으로 단백질 생산을 사정하기 위해, 우리는 piggybac-TagBFP2 및 이형접합성 TagBFP2+ MADR 세포를 운반하는 mNSC에서 TagBFP2 단백질 수준을 비교하였다. MADR 세포에서 TagBFP2의 강도는 조절한 분포를 가졌고, 반면에 piggyBac 세포는 10배 확장하는 넓은 동적 발현 범위를 가졌다 (도 1D-F).

단일-카피 삽입을 검증하기 위해, 우리는 푸로마이신 N-아세틸-트랜스퍼라제 (PAC)를 운반하는 공여자 플라스미드를 창출하였고 항생제 선택을 통해 이식유전자를 올바르게 발현시키는 세포를 풍부화시켰다. (도 8E, 제2열). 우리는 이들 세포에서 *Rosa26* 좌위에 올바른 재조합을 확인하였다 (도 8E-G). 선택된 세포에서, tdTomato 카세

트가 더 이상 dRMCE시 CAG-프로모터의 하류에 잔류하지 않아, PAC 세포가 알려지지 않은 염색체성 자리로부터 프로모터-없는 PAC ORF를 활동적으로 발현시키는 tdTomato+ 세포가 아님을 나타냈다 (도 8F, 제1-2열). 추가적으로, PCR 스크리닝은 세포들의 작은 서브세트에서 (EGFP 발현이 이들 개체군에서 검출되지 않았어도 [데이터 나타나지 않음]) EGFP 시스템의 계속된 존재를 드러내었고, 이는 Cre-매개된 통합을 가졌던 소수의 세포에서 일어날 수 있었지만 EGFP 카세트의 Flp- 매개된 절제는 아니었다 (도 8E, 제4열). 하지만, 이러한 EGFP 카세트는 몇몇의 폴리A 요소들에 의해 차단되었고 CAG 프로모터로부터 하류에 떨어져서 위치되었고, 이는 EGFP 발현을 완화시킨다 (도 8F, 제5열). 이것을 검증하기 위해, 우리는 TRE-응답성 EGFP 요소를 운반하는 또 다른 플라스미드를 사용하였다 (도 8G)). 이러한 플라스미드를 사용하고 푸로마이신-저항성 세포를 위하여 선택하여, 우리는 EGFP 형광 또는 웨스턴 블랏에 의한 발현, 그리고 독시사이클린 (Dox) 처리만으로 발생된 EGFP 발현을 관찰하지 못했다 (도 8H-J).

[0226] **동일한 유전적 배경을 지닌 다중 유도성 시험관내 시스템의 MADR-매개된 "원 샷" 생성**

[0227] 유전자 기능에 대한 검정은 시험관내 형질도입된 또는 형질감염된 세포주를 사용하여 종종 수행되지만, 일부 이식유전자의 구성적 발현은 돌연변이가 적합성을 감소시킨다면 안정한 세포주 생성을 막을 수 있다. 이것을 피하기 위해, 유도성 유전적 시스템, 예컨대 TRE는 세포주를 먼저 만들고 그 다음 관심의 유전자(들) 발현시킴을 시작하는데 이용될 수 있다. 단일-대립유전자 $mTmG^{Het}$ mNSC의 유용성을 전시하기 위해, 우리는 rtTA-V10 및 TRE-Bi 요소를 함유하는 MADR-상용성 벡터로 이들 세포를 뉴클레오펙션함으로써 유도성 세포주 생산을 위한 파이프라인을 확립시켰다 (도 8H). 이러한 무색 TRE-Bi-EGFP 세포주는 푸로마이신 선택으로 풍부화되었고 표준 시험관내 Dox 처리를 사용하여 확인되었다 (도 8I-J).

[0228] 이러한 시험관내 파이프라인은 더욱 동질성, 유도성 안정적 세포주를 제공함으로써 loxP 및 Frt를 운반하는 임의의 동물에서 유래된 다양한 일차 세포주에서 GOF 돌연변이의 결과를 심문하는데 유익하다. 이것에 대하여 원리 증명으로서, 그리고 TRE-Bi 요소의 3' 시스템이 원위 프로모터/인핸서 영역 때문에 산발적으로 발현되었는지를 결정하기 위해, 우리는 비-시스템성 TRE-Bi-D111/EGFP 공여자 벡터와, Notch 리간드, D111을 유도적으로 발현시키는 세포주를 생성하였다 (도 8K). 이러한 라인들은 Dox 없이 D111의 단지 미세한 생리학적 수준을 나타냈고, 반면에 양쪽 EGFP 및 D111은 Dox 처리로 모든 세포에 의해 유사한 수준으로 발현되었다 (도 8L-M). Notch 신호전달은 유전자-투약량 민감성인 많은 분자적 경로들 중 하나이고, MADR은 그러한 경로를 연구하기 위한 목적으로 할 수 있다.

[0229] $mTmG^{Het}$ mNSC로부터, 우리는 단일 뉴클레오펙션에서 4개 상이한 "스파게티 몬스터" 리포터 단백질 (SM-FP)을 지닌 별개의 세포주를 또한 생성하였다 (Viswanathan 등, 2015). 우리는, 다중-항원성 XFP를 지닌 MADR (MADR MAX)로 부르는 (도 1G), 이러한 파이프라인을 사용하여, 각 플라스미드의 1개 초과 카피가 세포 당 발현될 수 있었는지를 사정하였다. SM-FP는 항생제 선택 및 비례적 비율로 Dox 첨가 후 가상으로 모든 세포에서 발현되었다 (도 1H). 더욱이, 우리는 1개-이식유전자-대-1개- 세포 통합을 보여주는, 1개 초과 SM-FP를 발현시키는 임의의 세포를 관찰하지 못했다 (도 1I). 안정적, 유도성 세포주의 이러한 "원-샷" 생성은 그래서 항생제 선택 동안 차별적인 유전적 부동 야기 없이 공통 유전적 배경에서 다중 이식유전자의 멀티플렉스 분석을 가능하게 할 수 있다. 우리는 생체내 또는 라인을 형질감염시키기 어렵게 MADR 플라스미드를 테스트하는 것이 노동-집약적일 수 있다는 것을 유의할 것이고 그래서 우리는 시험관내 프로토타이핑에 대하여 상기 언급된 $mTmG$ HEK293 및 마우스 NSC 이외에 다양한 구성들의 마우스 N2a "프록시" 라인들의 숙주를 창출하였다 (도 8N-O).

[0230] **인간 세포주에서 MADR 반응**

[0231] MADR이 인간 세포에서 작동하는 지를 체크하기 위해, 우리는 MADR-상용성 수용체 부위를 조작하였고 (도 1J) TALEN을 사용하여, 우리는 AAVS1 좌위에 삽입된 이러한 카세트를 지닌 인간 HEK293T 세포주를 창출하였다. 여기에서, MADR 반응은 loxP 및 FRT 부위에 의해 축적된 CAG-구동된 tdTomato를 대체할 것이다 (도 1J). 인간 세포에서 MADR의 기능을 테스트하기 위해, 우리는 세포주를 SM-FP(밝음)-myc 공여자 및 대안적 TagBFP2-3XFlag 공여자로 형질감염시켰다. 면역형광성 분석은 절제를 통해 tdTomato를 상실하였던 세포주가 어느 한쪽 TagBFP2-3XFlag 또는 SM-FP(밝음)-myc 공여자 이식유전자를 발현시킨다는 것을 확인하였다 (도 1K-M). 이들 결과는 인간 세포를 관여시키는 연구에 MADR을 이식하는 능력을 논증한다.

[0232] **생체내 MADR 기능적 검증**

[0233] 생체내 MADR을 유효화시키기 위해, 우리는 산후 일 2 (P2) $mTmG^{Het}$ 새끼의 뇌실/뇌실하 구역 (VZ/SVZ)을 라이닝

하는 신경 줄기/전구 세포에 형광성 단백질 리포터 (TagBFP2 또는 막-태그된 SM_FP-myc) 및 Flp-Cre (0.5 μ g/ μ l 각각)를 함유하는 공여자 플라스미드를 전기천공하였다 (EP하였다) (도 2A). EP 2일 후, 우리는 일부 세포가 검출가능한 EGFP를 또한 발현시켰어도 VZ를 따라 TagBFP2+ 세포의 존재를 주목하였다 (도 9A). EP 7일 후에, 많은 VZ 방사성 아교세포 및 최근에-이주된 후구 뉴런이 SM_FP-myc 리포터를 발현시켰다.

[0234] 2 주까지, 분화된 선조체 및 후구 뉴런이 나타났다 (도 2B 및 9B-C). 이 시점에, 우리는 뇌실막-계통 세포의 형태학적 특징과 (즉 입방체형 형태로 다중-섬모화됨; 도 9B) VZ에서 지속적인 EGFP 발현을 지닌 일부 회귀 TagBFP2+ 세포를 알아내었다. 우리는 이들 이중- 양성 세포가 실제로 Foxj1⁺ 뇌실막 세포임을 확인하였고 (도 9C-G) MADR 리포터와 EGFP 사이 역 상관관계를 주목하였다. 이들 세포는 단백질 번역의 최소의 수준을 가질 수 있고 그래서 느린 단백질 역학을 일반적으로 가질 수 있어, 영속 EGFP 발현을 초래한다. 하지만, 대부분 TagBFP2+ 세포는 EP후 첫 몇일 후에 tdTomato 및 EGFP 발현이 부족하였다 (도 9B, 2H).

[0235] 생체내 재조합 효율에 관한 플라스미드 농도의 효과를 테스트하기 위해, 우리는 재조합된 세포의 고-감도 검출을 위한 Flp- Cre 플라스미드 및 SM_FPY-myc의 농도를 가변시켰다 (도 2C 및 도 9I). 우리는 증가하는 재조합효소 투약량이 증가하는 EGFP+ 세포로 이어졌고 반면 더 높은 공여자 플라스미드 농도가 유사한 효과를 갖는다는 것을 알아내었다 (도 2C 및 도 9I). 하지만, EGFP 및 삽입 공여자가 동일한 좌위에 대하여 경쟁중이었으므로, 제로-섬 효과가 있다. 추가로, EGFP의 영속성 때문에, 2-일째에 많은 세포들이 양쪽 이식유전자를 발현시켰다. 명백히, 이것은 이들 형광성 단백질의 반감기의 불가피한 결과인 것 같았고 리포터 붕괴가 9 일 동안에 추정되었던 *mTmG*에서 재조합후 짧은 생존 시점에 tdTomato와 EGFP 세포 사이 보여진 중첩과 유사하다.

[0236] 이식유전자 발현이 무작위로 통합된 또는 비-재조합된 에피솜으로부터의 발현 때문이었다는 가능성을 배제하기 위해, 우리는 일련의 대조군 EP를 수행하였다 (도 9J). 먼저, 고도로 농축된 *Hras*^{G12V} (~5 μ g/ μ l) 및 piggyBac (PB)-EGFP 리포터의 WT 새끼로의 EP는 Flp 또는 Cre 존재와 무관하게 비정상 성장, 과형성, 또는 종양형성 없음을 초래하였다 (도 9J; *Hras*^{G12V} 표현형의 MADR후 관찰된 표현형의 예에 대하여 아래 참고). 이밖에도, 우리는 반전된 loxP를 보유하는 *Hras*^{G12V}가 있는 EP된 *mTmG* 새끼를 사정하였고 임의의 청색 재조합된 세포 또는 면역염색에 의한 과형성을 검출하는데 실패하여, 생체내 MADR 재조합 반응의 특이성을 실례하였다 (도 9K). *Hras*^{G12V} 공여자 플라스미드 및 Cre 재조합효소 단독의 몇몇 독립적 EP는 EP 2주 후에 시험된 경우 종양 형성을 생산하는데 실패하여, Cre가 Flp-절제 없이 MADR 공여자의 현저한 안정적 통합을 유도할 수 없다는 것을 나타냈다 (데이터 나타나지 않음).

[0237] MADR이 많은 기존의 마우스와 상용성이어도, *mTmG*는 천연 tdTomato 때문에 적색 색상 채널 (예를 들면 도 2B)을 사용할 수 없음의 단점을 우리에게 제시하였다. 우리는 이러한 한계를 2가지 방법으로: >750 nm 파장 형광단을 지닌 5번째 레이저 채널을 이용함으로써 (도 9L) 또는 이제 이용가능한 적색 채널을 표백 및 면역염색시킴으로써 (도 9M-N) 해결하였다. 표백하기로, 우리는 *mTmG*^{het} 새끼에서 동시에 4개 SM-FP 벡터를 전기천공시킴으로써 생체내 세포 계통의 멀티플렉스 표지화를 테스트하였다 (도 2D). 이것은 2 주까지 뚜렷하게 착색된 후각 뉴런의 4개 그룹을 초래하여, 시험관내 관찰 (도 1H-I)과 유사한 1개-이식유전자-대-1개-세포 안정적 통합 (도 2E-F)을 확인하였다. 이들 실험은 MADR이 표적 좌위에 특이적으로 축매화된 잘- 알려진 생화학적 반응에 의존하는 신뢰할만한 방법임을 시사한다. MADR은 SM-FP-myc 및 EGFP 리포터의 탁월한 신호 특성과 조합된 증가된 세포 크기로 인해 별아교세포성 과정을 포함하는 미세 세포성 상세의 초 해상도형 상세를 가능하게 하는 확장 현미경검사 접근법에 이상적이다 (도 2G-L).

[0238] **삼차 재조합효소를 이용한 모자이크 분석 (MATR)**

[0239] MADR의 한가지 잠재적 제한은 2개 흔히 사용된 재조합효소, Flp 및 Cre의 그 활용이다. 그래서, 우리는 또 다른 이식유전자의 조건부 VCre-매개된 활성화 오버레이를 테스트하였다. 이것을 하기 위해, 우리는 TagBFP2-P2A의 하류에 VCre를 발현시키는 플라스미드를 창출하였다 (도 2M). 그 다음 우리는 TagBFP2-P2A-VCre 공여자 있거나 없이 재조합을 찾기 위해 SM-FP-myc-기반된 VCre F1Ex 리포터 (도 2M)를 이용하였다. 명백히, SM-FP-myc는 대안적 TagBFP2-3flag가 삽입된 경우 검출되지 않았지만 VCre-함유 공여자가 삽입된 경우 용이하게 발현되었다 (도 2N-O). 그래서, MADR 직교 재조합효소는 이차 조건부 요소의 활성화를 가능하게 할 수 있다.

[0240] **삼중 KD 대 KO 모델을 비교하기 위한 MADR**

[0241] MADR이 제공하는 안정적 계놈성 삽입 및 이식유전자 발현을 감안하여, 우리는 단일-카피 생체내 종양 모델을 생

성하기 위하여 MADR을 활용하려고 하였다. LOF 종양 억제인자 유전자 돌연변이 예컨대 Nf1, Pten, 및 Trp53은 신경교종 환자에서 가장 만연한 드라이버 유전자들 중 일부이다. 마우스 신경교종 모델은 이들 종양 억제인자 녹아웃이 고급 신경교종으로 이어진다는 것을 보여준다. 예를 들어, 이중 *Trp53/Nf1*-KO는 희소돌기아교세포 전구체의 전암성 과증식 (OPC)을 촉진시킨다. 우리는 이러한 접근법이 가격적으로 만들어질 수 있기 때문에 종양 억제인자에 대한 miR-E shRNA가 종양형성에 충분한지를 테스트하고 싶었다.

[0242] 먼저, 우리는 TagBFP2 이어서 Nf1, Pten, 및 Trp53에 표적된 3개 검증된 miR-E를 보유하는 공여자 작제물을 창출하였다 (도 3A). 우리는 이러한 멀티-miR-E 작제물을 테스트하였고, 비교가능한 그들의 표준 녹다운 효율인, 약 80%에 mRNA-수준 녹다운 효율을 관찰하였다 (도 3B). 우리는 생체내 TagBFP2+/Pdgfra+ OPC의 선택적 과성장을 관찰하였다. 명백히, Cre-절제만을 지닌 EGFP+ 개체군은 정상 세포의 더 작은, 혼합된 개체군을 산출하였다 (도 3C). 이들 재조합된 EGFP+ 세포는 내부 대조군 세포 개체군 역할을 할 수 있었다. 명백히, 우리는 EP 200일 후에 임의의 종양을 검출하지 못하여, Nf1, P53, 및/또는 Pten의 완전 절제가 고도의 침투성, 조기-발병 종양형성에 필요하다는 것을 나타내었다.

[0243] 이것을 추가로 테스트하기 위해, 우리는 이들 억제인자의 CRISPR/Cas9-기반된 녹아웃으로 스위칭하였다. CRISPR/Cas9는 EP를 사용하여 생체내 유전자 돌연변이하기에 대하여 고도로 효율적인 것으로 논증되었다. 에포솜적 플라스미드를 사용하여, 우리는 모든 Nf1, Trp53, 및 Pten에 대한 sgRNA가 GEMM, MADM, 및 자궁내 EP-기반된 CRISPR 모델과 일치하여 백질-연관된, 고급, Olig2⁺ 종양의 형성을 초래한다는 것을 관찰하였다 (도 10C-D). 트랜스포존-전달된 CRISPR/Cas9 연구의 결점은 트랜스포존-전달된 Cas9가 인텔을 촉매화시킬 수 있기 때문에 변형된 세포를 계통 추적하기 위한 확실한 방식의 부족이지만, 트랜스포존이 후속적으로 역 "호핑"하여, 표지화되지 않은 종양으로 이어질 수 있는 상당한 기회가 있다. 이러한 쟁점을 다루기 위해, 우리는 세포를 동시에 표지화하고 돌연변이시키기 위해 SM_BFP2-P2A-SpCas9 공여자 플라스미드를 창출하여, 생체내 돌연변이체 세포의 충실한 추적을 가능하게 하였다 (도 3D). Nf1 및 Trp53을 표적하기 위한 sgRNA는 5 개월까지 EP된 동물에서 말기 이환율을 유발하기에 충분하였고, 병리학적 분석은 다형성 교모세포종 (GBM)을 진단하였다. EP된 세포에서 성공적 표적화는 유전자형화에 의해 확인되었다 (도 3E).

[0244] 궁초점 이미지화는 종양이 주로 tdTomato-표지화된 개체군이 없고, 반면 혈관구조가 적색으로 있었다는 것을 논증하였다 (도 3F-F1, 10E). 작은 EGFP 개체군은 본래의 표적화 부위가 잔류한다고 예상된 곳 근처에서 관찰되었다 (도 3F, F2; 화살촉). CD44+/Olig2-음성 영역이 전신경부터 중간엽까지 제자리 종양 진화를 시사하는 본래 부위 근처에서 관찰되었어도 종양의 대부분은 Olig2+이었다 (도 3G-I; 화살촉; 3G2).

[0245] 이들 Cas9-기반된 LOF 방법을 보완하기 위해, 우리는 CRISPR/Cas 염기 편집기 (FNLS)를 MADR에 첨가하였고 (도 3J), 이는 sgRNA-표적 부위 근처 C-내지-T 돌연변이를 촉매화시킨다. 우리는 이들이 Nf1, Trp53, 및 Pten에서 미성숙한 정지 코돈을 창출하도록 설계된 SM_FP-myc 리포터, FNLS, 및 sgRNA를 도입하였다 (도 3K). GFP-분류된 MADR 세포의 앰플리콘 시퀀스는 염기 편집기가 미성숙한 정지 코돈을 유도할 수 있다는 것을 확인하였다 (도 10F). 2 개월 후에, 우리는 mir-E 및 Cas9 LOF 연구와 유사한 OPC의 극적인 확장을 주목하였다 (도 3L-M). 이들 KD 대 KO 연구의 모두는 동일한 마우스 라인 (*mTmG*)에서 실시되었고 조합된 계통 추적하기로 LOF 분석을 다중화하기 위한 MADR의 다양한 수단을 논증하였다. 게다가, 우리는 유전자 녹다운/녹아웃에 대하여 CRISPR/Cas 변이체를 위한 MADR 요소를 생성하였다 (도 10G).

[0246] **MADR에 의해 드러난 GOF 종양유전자 투약량 감도**

[0247] 우리는 RCE 리포터 마우스와 상용성인 *Hras*^{G12V}-기반된 MADR 공여자를 만들었고 E14 RCE-이형접합성 배아에서 자궁내 EP (IU-EP)를 수행하였다 (도 4A-B). 마우스 배아에서 PiggyBac-매개된 *Hras*^{G12V}-과대발현은 출생 후 15-20 일 이내에 고급 종양을 유도하는 것으로 나타났다 (Glasgow 등, 2014). 대조적으로, 우리는 MADR x RCE-het 동물이 P15에 시험된 경우 종양 성장을 관찰하지 못했다. 하지만, 우리는 TagBFP2-*Hras*^{G12V} 세포의 별아교세포성 계통으로의 현저한 세포-운명 스위치를 주목하였다 (도 4C, 11A). EGFP+ Cre-절제된 세포는 뉴런 및 아교의 혼합된 개체군으로 이루어졌다 (도 4C, 11A). 이것은 MADR이 다중카피-이식유전자 기반된 트랜스포존 모델에 동의하지 않는 중요한 경우이어서, 유전자 투약량에 의존하는 GOF 종양유전자의 결말을 강조한다. *mTmG* 및 *RCE* 라인 이외에, MADR은 고유한 시스-조절 서열 하에서 이식유전자 치환하기의 효과를 조사하기 위해 Ai14, R26-CAG-LF-mTFP1, Ribotag 라인 그리고 스플라이스 수용자를 사용하는 수천의 IKMC 마우스 라인을 포함하는, 이중 재조합 효소 부위를 보유하는 임의의 기성품 GEMM과 이용될 수 있다 (도 11B).

- [0248] 우리는, 산후 WT 새끼에서 EP된 경우 100% 침투성 신경교종을 초래하는, $Hras^{G12V}$ 에 기반된 PB-종양 모델을 이전에 연구하였다. MADR TagBFP2- $Hras^{G12V}$ 이식유전자가 $mTmG^{Het}$ 까지 산후에 전달된 경우, $Hras^{G12V}$ + 세포는 EGFP+ 개체군과 비교된 경우 유사하게 과대증식하였다 (도 11B-C). $Hras^{G12V}$ 투약량의 효과를 확실하게 시험하기 위해, 우리는 동형접합성 $mTmG$ 에서 $Hras^{G12V}$ 를 EP하였고, 여기에서 우리는 $Hras^{G12V} \times 1$ 또는 $Hras^{G12V} \times 2$ 세포를 분화시킬 수 있다고 예상하였다 (도 4D-E). 모든 마우스는 신경교종을 신속하게 발달시켰고 3-4 개월 이내에 말기 이환율에 도달하였다 (데이터 나타나지 않음).
- [0249] 흥미롭게, 동형접합성 $mTmG$ 마우스에서, 청색-단독 세포 ($Hras^{G12V} \times 2$)가 양쪽 청색 및 녹색을 발현시키는 세포 ($Hras^{G12V} \times 1$)보다 종양 횡단면의 더 큰 패치를 차지하였다 (도 4F-G). PB-EP를 사용하여, 우리는 더 밝은 EGFP-태깅된 $Hras^{G12V}$ 세포의 패치가 더 어두운 EGFP+ 세포보다 더 많이 인산화된 Rb1 (pRb1)을 발현시켰다는 것을 또한 관찰하였다 (도 11D). MADR에서, 카피 수가 명백한 경우, $Rosa26^{HrasG12V \times 2}$ 세포들의 대부분은 pRb1을 발현시키는 것으로 보였고, 반면에 더 적은 절반접합성 $Rosa26^{HrasG12V \times 1}$ 세포에서 발현되었다 (도 4G-H). MADR 모자이크는 세포들의 이들 2개 그룹을 유전적으로 구별할 수 있고 그들의 차이를 시험할 수 있고, 반면에 PB 종양 모델은 할 수 없고, 종양유전자의 카피 수-많은 체세포 이식유전자 방법에서 제어불가능한-가 생성된 종양의 프로파일을 상당히 변경시킬 있다는 것을 확인한다.
- [0250] **융합 단백질에 기반된 MADR 뇌실막세포종 모델**
- [0251] 많은 종양 드라이버는 융합 단백질이지만, 염색체 재배열을 모방하는 조건부 GEMM을 만드는 것은 어려울 수 있다. 예를 들어, 융합 단백질 드라이버 YAP1-MAML1D 및 C11orf95-RELA는 천막상 뇌실막세포종에서 반복적으로 보여지고, 우리는 이들을 발현시키기 위해 MADR 벡터를 만들었다 (도 4I). MADR-KrasG12A 종양 모델-신경교종의 유전적 드라이버에 비교해서, YAP1-MAML1D 및 C11orf95-RELA MADR 종양 세포는 현저히 상이한 개시 패턴을 보여주었다. KrasG12A 세포가 줄무늬체를 신속하게 침범하고 증식하였던 반면 (도 11E), YAP1-MAML1D 종양은 로제트형 구조로 박리하였고 주변 EGFP+ 대조군 세포에서 비-세포 자율 반응성 신경아교종을 유도하였다 (도 11F-G). C11orf95-RELA 세포는 혼합된 표현형을 표시하였고, 이에 의해 이들은 종종 VZ 벽을 따라 머물렀거나 복부 VZ 근처에 작은 클러스터를 형성하였다 (도 11H-I). 뇌실막세포종에서 빈번하게 보여지는 Cdkn2a의 동시 상실을 모방하기 위해, 우리는 $p16$ 및 $p19$ 에 대해 sgRNA를 지닌 Cas9를 사용하였다. YAP1-MAML1D $\times$ $p16/19$ -KO 동물은 대략 1.5 개월 이내에 말기 이환율에 도달하였다 (도 4J-K). 하지만, C11orf95-RELA $\times$ $p16/19$ -KO 종양은, 대략 3 개월로 말기 이환율에 도달하는, 더 오랜 생존을 보여주었다 (도 4K-L). 우리의 신경교종 모델 및 인간 신경교종의 침윤성 변연과 달리, 뇌실막세포종은 환자에서 보여진 밀어내는 변연과 비슷한 침범하는 세포 (도 11J-K)의 부족으로 정의된 변연을 나타냈다. 종합하면, 이러한 데이터는, 융합 단백질에 의해 구동된 것들을 포함하여, 다양한 종양 유형을 모델링하는 MADR의 능력을 논증하였다.
- [0252] **MADR를 이용하는 H3f3a G34R 및 K27M 소아 신경교종 드라이버의 직접 비교**
- [0253] 모든 인간 종양은, 어느 한쪽 승객이거나 암에 직접적으로 기여하는, 체세포 및 생식계열 돌연변이의 별개의 세트와 존재한다. 돌연변이를 고르고 선택하는 능력 그리고 돌연변이의 이들 세트를 비교하는 능력으로, MADR은 각 종양 아형에 고유한 약물 내성 및 생존에 중요한 암시로 미묘한 특이체질을 연구하기 위하여 맞춤형된 개인화된 종양 모델 플랫폼 역할을 할 수 있다. 원리 증명으로서, 우리는 H3F3A K27M 또는 G34R 돌연변이가 환자들의 50% 초과에서 관찰되지만, 다양한 다른 돌연변이와 공-발생하는 소아 GBM을 모델링하도록 선택하였다. 예를 들어, H3F3A 돌연변이는 재발성 양성-활성 Pdgfra (D842V), 및 양성-음성 Trp53 (R270H)과 종종 일치한다 이 문맥에서 MADR의 유용성을 논증하기 위해, 우리는 이들 드라이버 유전자의 차별적 효과를 연구하기 위해 G34R 또는 K27M에 대하여 미스센스 돌연변이에 의해서만 차이 나는 변이체로-동시 H3f3a, Pdgfra, 및 Trp53 돌연변이 모델링을 위하여 공여자 플라스미드를 만들었다 (도 5A).
- [0254] 먼저, 우리는 생체내 및 시험관내 면역조직화학에 의해 H3f3a, Pdgfra, 및 Trp53의 적절한 발현을 체크하였고 모든 단백질의 동시 발현을 주목하였다 (도 12A-B). 다음에, 우리는 산후 EP에 의해 이들 플라스미드를 한배새끼에 걸쳐 형제 새끼에 도입하였다. 양쪽 피질 및 선조 VZ에서 줄기/전구 세포를 형질감염시키기 위해, 전극은 보여진 대로 스위핑되었다 (도 5B-C). 첫 2-4 개월 동안, 양쪽 G34R 및 K27M 마우스에서 EGFP+ 세포의 확산 확장이 있었지만 종양은, MADM 신경교종 모델로 보여진 광대한 전종양 상과 유사한, 임상 병리학에 의해 식별가능하지 않았다 (도 12C).

- [0255] 어느 한쪽 K27M 또는 G34R/V 돌연변이를 보유하는 환자 종양은 상이한 전사체 뿐만 아니라 임상 속성을 나타낸다. 인간 K27M 신경교종은 중심선을 따라 클러스터링하고, 반면에 G34R는 대뇌 반구에서 발생한다. K27M 종양은 G34R/V보다 더 젊은 환자에서 나타난다. 겔보기에 그들의 초기 임상 발표와 일치하여, 일부 K27M+ 마우스는 P100까지 중심선 신경교종을 나타냈고, 이 때 G34R+는 확산 아교 과형성 및 매우 희귀한, 작은 종양을 표시하였다 (도 5D- E 및 데이터 나타나지 않음). P120에, K27M 종양은 피질하 구조에 주로 국소화하였지만 세포는 더 깊은 피질층에 몇 개의 세포가 있는 백질관에서 관찰될 수 있다 (도 5F). 대조적으로, G34R 종양은 뇌량 및 더 깊은 피질층에 국소화하여, 종종 환자에서 보이는 반구 국소화와 비슷한 패턴으로 중심선 (도 5G)을 가로질러 "나비" 신경교종을 형성하였다. 이것은 상기 언급된 선조 VZ의 표적화 (및 이들 세포들의 일부의 관찰가능한 과형성; 도 5G에서 황색 화살표)에도 불구하고 일어났다.
- [0256] 병리학적 속성은 높은 세포 밀도, 미세혈관성 증식, 및 후기 단계에서의 괴사를 포함하였다 (도 5H-J). 양쪽 K27M, 및 G34R 종양은 100% 침투성이었고 Pdgfra 및 Trp53 돌연변이를 함유하는 H3f3a WT 종양과 비교해서 가속화된 종료점을 보여주었지만 (도 5K), 그들의 환자 상대에 매칭하는 종양 "출현부위" (즉 중심선 대 피질)를 일관되게 나타냈다 (도 5L). 적절한 H3f3a 돌연변이의 발현을 규명하기 위해 우리는 교차 반응성 없이 각각의 돌연변이체 잔기에 대해 단클론성 항체를 이용하였다 (도 12D-G).
- [0257] 이들 세포들의 세포 자율 특성을 비교하기 위해 우리는 MADR의 고유한 특성을 활용하였고 이에 의해 각 대립유전자는 단 하나의 이식유전자 삽입을, 그리고 공-전달된 K27M 및 G34R 플라스미드를 1:1 비로 받을 수 있다 (도 5M-N). 일련의 섹션에서 상기 언급된 항-K27M 및 항-G34R 항체의 사용은 개별 종양에서 각자의 이식유전자들의 공-발현 (도 5O-P)을 확인하였다. 추가로, 동시 G34R 돌연변이체 세포를 허용하기 위해 비오틴-컨쥬게이션된 K27M 항체 및 토끼 혈청- 매개된 차단을 사용하여, 우리는 각 SM_FP-myc+ 세포가 단 하나의 H3f3a 돌연변이체 변이체를 발현시킨다는 것을 확인하였다 (도 12H). K27M 및 G34R 세포의 정량화는 K27M에서 매우 상당한 증가를 논증하여, 그들의 G34R 상대를 초과증식하는 그들의 능력을 나타냈다 (도 5Q). 이들 발견은 동일한 유전적 배경—또는 심지어 동물—이 주어진 K27 및 G34 잔기가 인간 표현형과 유사한 이들 신경교종 아형의 발병의 시간 및 자리를 변경할 수 있음을 나타낸다.
- [0258] 몇몇의 연구는 K27M 돌연변이가 H3K27 잔기에서 저메틸화를 초래한다는 것을 나타냈고, 우리는 H3K27me3 항체에 의한 K27M 돌연변이체 세포의 저메틸화를 확인하였다 (도 12I-J). 침윤성 종양 세포는 인간 K27M 종양에서 기재된 대로 신경주위 위성증을 나타냈고, 병치된 EGFP+ K27M 아교 및 뉴런은 고해상도에서 현저하게 상이한 H3K27me3 수준을 보여주었다 (도 12K). 저메틸화는 우리의 CRISPR/Cas9-기반된 Nf1/Trp53-KO 모델에서, 신경교종이 정상이거나 과메틸화되었기 때문에 종양 성장의 인공물이 아니었다 (도 12L). H3K27에서 아세틸화는 심하게 변경된 것으로 보이지 않았다 (도 12M-N).
- [0259] **MADR K27M은 인간 종양 이질성 및 발달적 위계를 제한한다**
- [0260] 면역조직화학적 분석은 종양 세포가, K27M 신경교종에서 풍부화되는 것으로 최근 식별된, Bmi1을 상향조절한다는 것을 논증하였다 (도 12O-P). 개체군으로서, K27M 세포는 아교 마커 예컨대 Aldh111—별아교세포성 계통의 정준 마커를 대략적으로 발현시켰다. Aldh111은 종양의 변연에서 가장 우세하게 EGFP+ 종양 세포와 공-국소화하였다 (도 12R). 이들 세포는, 반응성 별아교세포와 비슷한, 더 큰 크기를 갖는 경향이였다. 역으로, NG2-표지화된 EGFP+ 세포는, OPC와 유사한 형태로, 더 작은 경향이였다 (도 12S). 추가 비-침윤성 이미지화 및 종양 전구 역학의 관찰을 가능하게 하기 위해, 우리는 양쪽 비-침윤성 이미지화, 및 FUCCI를 이용한 세포 사이클 상 보고를 위하여 이차 구성적 시스템을 생성하였다 (도 12T-V). 추가로, MADR은 형광성 마커에 의해 정상 및 종양 개체군을 분리시키는데 자연적으로 적합하다 (도 12W). 우리는 이러한 속성을 사용하여 K27M 종양 세포에 선택적으로 독성인 것으로 밝혀진—Akt1/2 억제제 및 Vacuolinol-1—2개 이전에 식별된 키나아제 억제제의 것을 논증하였고; Akt1/2 억제제는 NPC 증식을 유사하게 억제시켰다 (도 12X). Vacuolinol-1이 NPC 배양 성장을 변경시키지 않지만 K27M 성장을 억제시킨다는 우리의 확인은 이들 종양의 맥락에서 이러한 화합물의 계속된 조사에 대한 증거를 제공한다.
- [0261] 아교 마커의 이러한 이질성은, 단일-세포 RNA 시퀀싱 (scRNA-seq)에 의해 상당한 정도의 종양내 이질성을 논증하였던, 인간 K27M 종양에서의 최근 발견과 표면상 유사하였다. 이러한 상사 인간 K27M 데이터의 이용가능성을 감안하여 우리는 그들의 인간 상대에 대해 MADR 모델 세포를 인증하고 scRNA-seq의 사용을 통해서 이질성에 대한 더 깊은 통찰력을 얻을 수 있는 고유한 기회를 얻었다.
- [0262] 우리는 3개 독립적 K27M 종양에서 EGFP+ 분류된 종양 세포를 비말-기반된 scRNA-seq에 적용하였다 (도 6A, 표 2). 카피-수 변동 (CNV) 분석은 인간 K27M 신경교종에서 관찰되는 대로 염색체 이상을 논증하였다 (도 13A). 시

컨싱, 정렬, 및 품질 관리 이후, 우리는 Seurat를 사용하여 마우스 K27M 세포를 클러스터링하였다. CCA-정렬을 위한 유전자 세트의 선택 경우에, 우리는 이러한 데이터셋으로서 인간 데이터셋에서 식별된 P1-4로 명명된 4개 프로그램을 사용하였고 연관된 분석은 그들의 인간 상대에 대해 단일-세포 해상도로 우리의 종양을 인증할 수 있는 고유한 기회를 나타냈다 (도 6B-C, 13B-D).

표 2 마우스 종양 샘플

샘플의 유형	프로토콜	영역	EP로부터 시간	창출된 세포주*	ChIP-Seq	pDonor 변이체
K27M-1	10X 3' scRNA-seq	전파	150 일	X	X	pDonor-H3F3A-K27M-EGFP pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53-V5 WPRE
K27M-2	10X 3' scRNA-seq	선조	106 일	X	X	pDonor-SM_FP-mycBRIGHT- pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53 270h-P2ACO3-H3F3A K27M WPRE
K27M-3	10X 3' scRNA-seq	선조	149 일		X	pDonor-H3F3A-K27M-EGFP pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53-V5 WPRE
K27M-4	10X snATACseq	전파	222 일†	X		pDonor-SM_FP-mycBRIGHT- pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53 270h-P2ACO3-H3F3A K27M WPRE
K27M-5	10X snATACseq	선조	251 일†			pDonor-SM_FP-mycBRIGHT- pTV1 Pdgfra D842V COTv1 Trp53 270h-P2ACO3-H3F3A K27M WPRE

*-추가적 GFP+ 세포의 병렬 처리로부터 창출된 세포주. 모든 10X scRNA- 또는 snATAC-시퀀싱은 해리된 뇌 조직으로부터 급성으로 실시되었다.

†-초기 EP된 개체군 크기는 이 그룹에서 전형적 결과와 비교해서 감소되어 증가된 종양 형성 기간을 초래하였다

[0263]

[0264]

"Cycle" 클러스터는, Top2a, mKi67, 및 Ccnb1을 포함하는, 증식의 마커를 발현시키는 세포로 이루어졌다 (도 6B-C; 도 13E). AC 및 OC 클러스터는 더욱 분화된 성상세포 및 희소돌기아교세포, 각각과 연관된 유전자를 발현시켰고 (도 6B-C; 13D), 반면, 인간 P4 클러스터에 기반된 "OPC"로 명명된, 가장 큰 클러스터는 Olig1을 포함하는 유전자를 발현시켰지만, 분화된 세포 계통에 분명히 해당하는 것으로 보이지 않았다 (도 6B-C; 13D). 인간 K27M에서 식별된 유전자 목록에 기반된 클러스터 스코어링은 AC에서 별아교세포성 마커의 풍부화 그리고 OC에서 희소돌기아교세포성 마커를 확인하였다 (도 6B-D).

[0265]

K27M 신경교종의 교차-종 분석을 실행하기 위해, 우리는 마우스 및 인간 K2M 종양으로부터 모든 세포로 Seurat 클러스터링을 반복하였고 (도 6E-G; 13F-I) 9개 조합된 단일-세포 데이터셋이 개별 마우스 및 인간 CCA 정렬에서 보이는 4개 클러스터를 계속해서 산출하는 것을 보았다 (도 6H-J). 조합된 9개 샘플 UMAP를 각각의 샘플로 분열시킴으로써, 우리는 각 샘플로부터 각 개별 클러스터에 세포의 비교적 유사한—균일하지는 않지만—기여를 주목하였다 (도 6J; 13I). 돌연변이의 우리의 특이적 조합은 환자 MUV10을 매칭시켰고, 이러한 환자는, 우리의 마우스 K27M 세포가 하였듯이, 다른 환자보다 더 적은 AC 세포를 함유하였다 (도 13M).

[0266]

우리는 CCA, 클러스터링, 및 UMAP 분석을 위하여 고도로-가변적-유전자 이용의 더욱 일반적인 관행으로 클러스터링을 또한 수행하였다. 이러한 접근법은 일부 거의 동일한 클러스터 (예를 들면 주기화 개체군)를 초래하였지만 다른 개체군의 서브-클러스터 (예를 들면 OPC)의 분열을 초래하였고, 이는 선택된 파라미터에 의해 가변하였다 (도 13N). 클러스터링의 이러한 가변성은 배치 효과, 환자-특이적 전사체 변경, 및 교차-종 비교와 연관된 과제로 인해 scRNA-seq에서 선천적 쟁점이다.

[0267]

우리는 우리의 3개 마우스 K27M 종양을 비교하는 히트맵을 플롯팅하기 위해 인간 K27M, GBM, IDH 성상세포종, IDH 희소돌기아교세포종에 걸쳐서 식별된 차별적으로 발현된 유전자를 또한 사용하였다. 우리의 MADR K27M 종양은 다른 신경교종 아형보다 인간 상대에 더욱 유사하였다 (도 6K). 추가로, 인간 K27M 세포는, 우리의 마우스 종양이 하였듯이, 주기화 세포들의 높은 분율을 특징으로 한다 (도 6L).

[0268] **MADR K27M 조절 네트워크 분석**

[0269] 우리는 MADR-기반된 K27M 마우스와 인간 K27M 신경교종 전사체 사이 전면적 매칭을, 특히 이들이 유사한 발달적 계층 및 주기화 세포의 과대표현을 보여준다는 점에서, 나타냈다. 우리가 아는 한, 우리의 K27M scRNA-seq 데이터세트는 마우스 종양 모델을 검증하기 위해 처음 창출된 것 중 하나이다. 그러므로, 우리는 데이터세트를 추가 분석에 적용하여 신규한 통찰을 얻었다. K27M 돌연변이는, 유사한 전사 인자(TF) 네트워크가 인간 및 마우스 종양의 기초가 되는지 여부에 초점을 맞추었던, 널리 퍼진 후성 교란을 초래한다.

[0270] SCENIC는 레굴론을 식별하기 위해 scRNA-seq 데이터세트에 랜덤-포레스트 회귀를 적용하는 방법이다 (레굴론은 TF 및 그 양으로 상관된 표적 유전자에 기반된 큐레이션된, 알려진 공-발현 모듈이다). 레굴론-기반된 분석의 이러한 유형은 그 전체론적 성격 때문에 강력하고, scRNA-seq를 혼동시킬 수 있는, 배치 및 환자-특이적 효과를 최소화한다 (도 14A-J).

[0271] SCENIC에서 마우스 및 인간 K27M 세포를 나란히 처리하기에서 유래된 tSNE-플롯에서, 세포는 그들의 세포 유형을 따라 클러스터링되어, 이들 세포 클러스터가 차별적 TF-네트워크를 갖는다는 것을 나타냈다 (도 7A-B). 우리는 양쪽 우리의 모델 및 인간 데이터에서 주기화 세포가 E2F 패밀리를 모듈 (E2F1, E2F7, E2F8), EZH2, MYBL1, 및 BRCA1의 풍부화를 보여준다는 것을 관찰하였다 (도 7A-D). 이들 TF는 세포 클러스터 중에서 상당한 차별적 발현이 없어서, 그들의 활성이 주로 전사적으로 조절되는 것을 나타낸다 (도 7E-F). EZH2는 K27M 돌연변이와 진단적으로 및 기능적으로 연관된다. MYBL1은, 그 기능적 중요성을 나타내는, 소아 신경교종에서 드라이버 유전자이다. E2F 구성원은, 특히 배아 기 동안, 동조한다고 알려진다. 유사분열 클러스터에서 이들 단백질의 극적으로 향상된 활성을 감안하여, 우리는 SCENIC 레굴론 세트에서 발견되지 않았을 추가의 세포-사이클 연관된 유전자 네트워크를 찾고자 하였다. GBM 및 K27M 소아 신경교종은 빈약하게 분화된 세포 부류를 특징으로 한다. NANOG, OCT4, SOX2, MYC2, 및 Embryonic Stem-발현된 (exp1) 유전자 세트 그리고 PRC2, SUZ12, EED, 및 H3K27-결합된 유전자 세트의 과소-발현은 이러한 빈약하게 분화된 상태를 나타내는 것으로 밝혀졌다 (도 7G-H). 양쪽 인간 및 마우스 데이터세트에서, 이러한 배아 줄기-시그니처는 주기화 세포 유형에서 가장 강한 것으로 보였다 (도 7G-H). 추가 증거로서, 우리는 3개 종양에서 Chip-seq를 수행하였고, 특이적으로 저메틸화되는 유전자를 식별하였고, 유전자의 이러한 하위그룹이 주기화 세포에서 고도로 발현되는 것을 알아내었다 (도 7G; 14K-M).

[0272] 차별적으로 허용가능한 게놈 영역 (DAR)의 시험을 통해서 기저하는 후성 상태를 시험하기 위해, 우리는 K27M 마우스 종양의 단일-핵 ATAC-seq를 수행하였고 정상 P50 및 E18 마우스 뇌에 이들을 비교하였다 (도 7I-L, 도 14N-W). P50 뇌가 양호하게-이격된, 정준 마커 유전자 클러스터를 나타낸 반면 도 7I, 도 14N-O); 양쪽 E18 뇌 (3개 독립적 데이터세트의 정렬; 도 7K; 도 14P-S) 및 종양 세포 (공-포획된 종양 미세아교세포가 아닌-별개의 클러스터를 생성)는 덜 양호하게-정의된 DAR을 나타냈다 (도 7L, 도 14T-W). 게다가, K27M 종양 클러스터의 경로 분석 (도 7M)은, SCENIC 성과와 일치하는 BRCA1-연관된 항목을 포함하는, 순수한 P50 정상세포 및 OPC 클러스터와 비교된 경우 명백히 변경되었다 (도 14Y).

[0273] 마지막으로, 이들 scATAC 샘플로부터 DAR의 정렬 그리고 상사 벌크 데이터세트는 Olig2, Sox9, 및 Sox10 같은 아교 계통-연관된 전사 인자가 P50 아교 계통과 비교된 경우 감소된 상대 접근가능성 그리고 Sox9 및 Sox10의 측면에서 상호 배타성을 나타내는 tSNE 성과를 추가로 뒷받침한다 (도 7N). K27M scRNA-seq 데이터는 Sox9 및 Sox10 mRNA가 각 종양 클러스터에서 그리고 종종 개별 세포에서 공-발현되었기 때문에 이와 일치하였고, 이는 정상 성체 뇌에서 극히 드물다. 하지만, 벌크 샘플에서 발견된 DAR은 scATAC 데이터세트에서 재현되었다 (즉 K27M 종양내 Cacng8 - 6.322 log2 비 K27M:NPCS 그리고 NPC에서 Hes5 - 3.248 log2 비 NPC:K27M 종양; 도 14N). 추가로, 공-포획된 미세아교세포는 강력한 DAR을 유지하여, 우세한 배치 효과에 반론하였다; 도 7N). 마지막으로, K27M 종양 세포는 암과 연관된 직전 유전자 모티프 그리고 공격적 종양에서 이전에 식별된 ES-연관된 TF의 다수에 대한 모티프의 우월 (도 14Z)을 나타냈다. 종합하면, K27M 온코히스톤은 원시 후성 상태를 생성시킴으로써 이들 종양의 활성적으로 주기화 서브세트에서 TF의 서브세트의 변경된 활성을 초래한다.

[0274] **실시예 3**

[0275] 우리는 2개 AAV 바이러스를 설계하였다. 1개는 FlpO-2A-Cre를 발현시키고 반면 다른 것은 비-발현된(반전된) TagBFP 리포터 유전자를 갖는다. TagBFP가 홀로 세포에 형질도입되는 경우, 발현되는 것으로 보이지 않는다. 하지만, FlpO-2A-Cre 바이러스의 존재 하에서, MADR 수용체 좌위를 지닌 세포는 tdTomato 및 EGFP 이식유전자의 발현을 상실하고 TagBFP를 발현하기 시작하는 것으로 보인다 (도 26).

[0276] 이것이 중대한 것은 MADR을 촉진하기 위한 증식의 필요성을 없애고 그래서 단일-카피 유전자도입으로 유사분열

후 세포 및 다른 조직을 표적화하는 것을 쉽게 하기 때문이다. 많은 유형의 질환 모델 또는 더욱 안전한 유전자 요법 용량화가 그래서 이루어질 수 있다.

실시예 4

우리는 AAVS1-pAct-GFPnls를 AAVS-pACT-loxP-TagBFP-V5-nls WPRE FRT로 변형시켰고 MADR-준비된 iPSC를 갖는다. 이러한 MADR 카세트의 기능은 HEK293T 세포에서 검증되었고 (도 27) 및 그래서, 우리는 유도된 다능성 줄기 세포 (iPSC) 및 하위계통에서 pDonor 이식유전자 요소를 교환할 수 있다.

실시예 5

우리는 양쪽 수용체 계능 및 MADR pDonors에서 loxP 및 FRT 부위를 변형시켰다. MADR의 기능은 HEK293T 세포에서 검증되었고 (도 15-27) 및 그래서, 우리는 변형된 loxP 및 FRT 부위를 사용하여 pDonor 이식유전자 요소를 교환할 수 있다.

실시예 6

우리는 재조합효소 발현 벡터에서 조직-특이적 프로모터를 사용하였다. 조직-특이적 재조합효소 벡터의 기능은 마우스 뇌에서 생체내 검증되었고 (도28), 그래서, 우리는 특이적 조직에 MADR을 지시할 수 있다.

본원에 개시된 서열

서열 번호	서열
1	atgaagttatgggatgtcgtggtctctgcctgggtgctgctccacaccgcgtccgcttcccgtgcccgccggaagaggcctc ccgaggcgcggccgaagaccgctccctcggccgcgcgcgccttcgcgtgagcagtgactcaaatatgccagagg attatcctgatcagttcgatgatgtcattttattcaagccaccattaaaagactgaaaaggtcaccagataaacaatggcagt gcttctagaagagagcgggaatcggcaggtgctgagctgccaacccagagaattccagaggaaaaggctggagaggccaga ggggcaaaaaccgggtgtgtcttaactgcaatacattaaatgtcactgacttgggtctgggctatgaaaccaaggaggaaact gatttttaggtactgcagcggctcttgcgatgcagctgagacaacgtacgacaaaattgaaaaacttatccagaaatagaaggc tggtgagtgcacaagtagggcagggcatgttgcagacccatgcgcttgcgatgacctgctgttttagatgataacctggtttacca tattctaagaagcattccgctaaaagggtgtggatgtatctga
2	MKLWDVVAVCLVLLHTASAFPLPAGKRPPEAPAEDRSLGRRRAPFALSSDSNMP EDYPDQFDDVMDFIQATIKRLKRPDKQMAVLPRRERNRQAAAAANPENSRGKG RRGQRGKNRGCVLTAIHLNVTDLGLGYETKEELIFRYCSGSCDAAETTYDKILK NLSRNRRLVSDKVGQACCRPIAFDDDLFLDDNLVYHILRKHSAKRCGCI

본 발명의 다양한 구현에는 상세한 설명에서 상기 기재된다. 이들 설명이 상기 구현예를 직접적으로 설명하는 동안, 당업자가 본원에 나타나고 기재된 특이적 구현예에 수정 및/또는 변동을 인지할 수 있다는 것이 이해된다. 본 설명의 범위 내에 해당하는 임의의 그러한 수정 또는 변동은 또한 거기에 포함되기 위한 것이다. 특별히 언급하지 않는 한, 명세서 및 청구항에서 단어 및 어구가 적용가능한 기술분야(들)에서 통상의 기술자에게 일반적이고 익숙한 의미로 주어져야 한다는 것이 본 발명자들의 의도이다.

본원의 출원 당시에 출원인에게 알려진 본 발명의 다양한 구현예의 상기 설명은 제시되었고 실례 및 설명의 목적을 위한 것이다. 본 설명은 완전한 것으로 의도되지 않고 본 발명을 개시된 정확한 형태로 제한하도록 의도되지 않으며 상기 교시에 비추어 많은 수정 및 변동이 가능하다. 기재된 구현예는 본 발명의 원리 그리고 그 실시 가능한 적용을 설명하는 역할을 하고 다른 당업자가 다양한 구현예에서 그리고 고려되는 특정한 용도에 적합하듯이 다양한 수정으로 본 발명을 활용할 수 있도록 하는 역할을 한다. 그러므로, 본 발명이 본 발명을 실시하기 위하여 개시된 특정한 구현예로 제한되지 않는 것이 의도된다.

본 발명의 특정한 구현예가 나타나고 기재되는 동안, 본원에 교시를 기반으로 하여, 변화 및 수정이 본 발명 및 그 더 넓은 양태에서 벗어남 없이 실시될 수 있고, 그러므로, 첨부된 청구항이 본 발명의 진정한 사상 및 범위 내에 있듯이 모든 그러한 변화 및 수정을 그들의 범위 내에서 포괄해야 하는 것이 당업자에게 분명할 것이다.

본원에 모든 간행물은 각 개별 간행물 또는 특허 출원이 참조로 편입되도록 구체적이고 개별적으로 표시된 것처

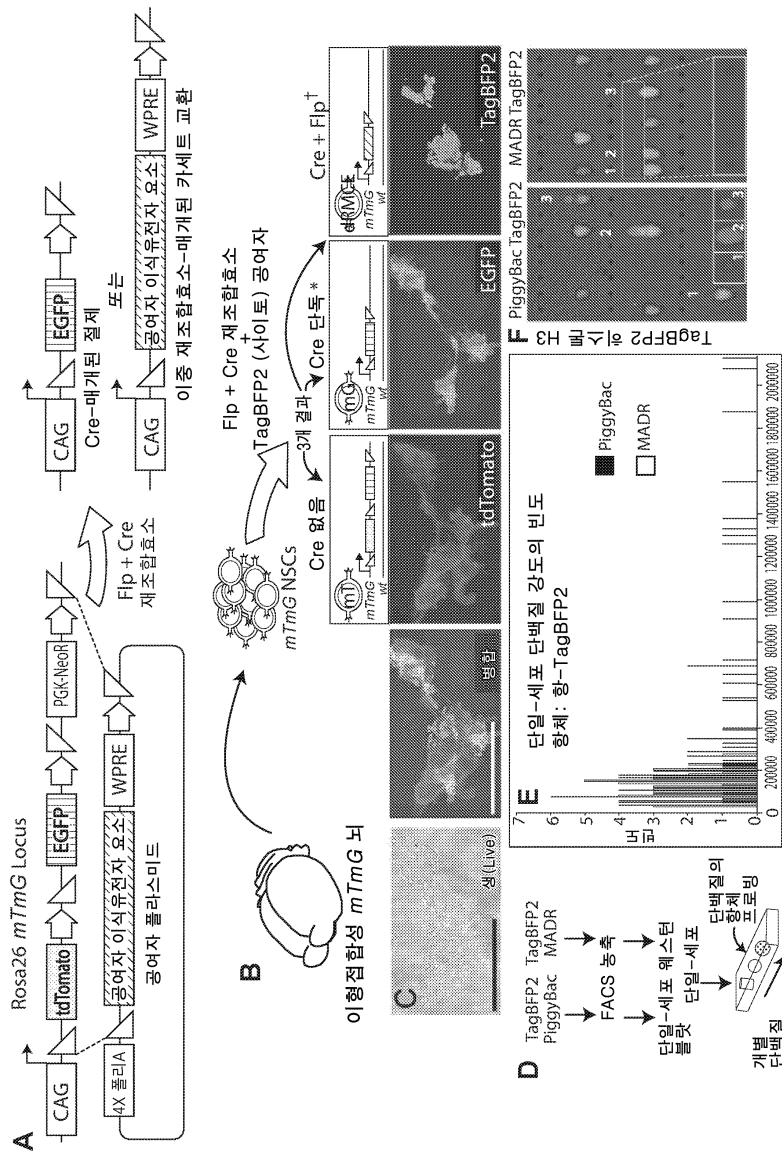
립 동일한 정도로 참조로 편집된다. 하기 설명은 본 발명을 이해하는데 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 본원에 제공된 정보의 임의의 것이 선행 기술이거나 현재 청구된 발명에 관련한다는 것, 또는 구체적으로 또는 묵시적으로 참조된 임의의 간행물이 선행 기술인 것은 인정하지 않는다.

[0289]

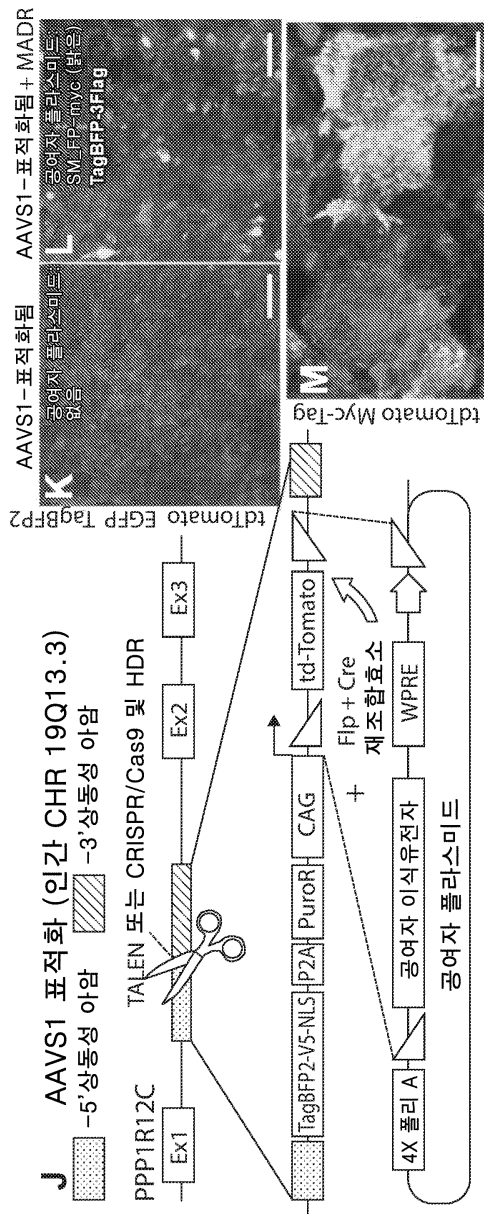
본원에 사용된 경우에 용어 "포함하는" 또는 "포함한다"는, 유용하든 아니든, 미특정된 요소의 포함에 아직 개방되지 않은, 구현예에 유용한, 이들의 조성물, 방법, 및 각각의 구성요소(들)에 관하여 사용된다. 일반적으로, 본원에 사용된 용어가 일반적으로 "개방" 용어로서 의도되는 것이 그 기술분야 내의 이들에 의해 이해될 것이다 (예를 들면, 용어 "포함한"은 "비제한적으로 포함한"으로서 해석되어야 하고, 용어 "갖는"은 "적어도 갖는"으로서 해석되어야 하고, 용어 "포함하다"는 "비제한적으로 포함하다"로서 해석되어야 한다, 등등). 개방-말단 용어 "포함하는"이, 용어 예컨대 포함한, 함유하는, 또는 갖는의 동의어로서, 본 발명을 설명하고 청구하기 위해 본원에 사용되어도, 본 발명, 또는 이들의 구현예는 대안적 용어 예컨대 "으로 이루어지는" 또는 "으로 본질적으로 이루어지는"을 사용하여 대안적으로 기재될 수 있다.

도면

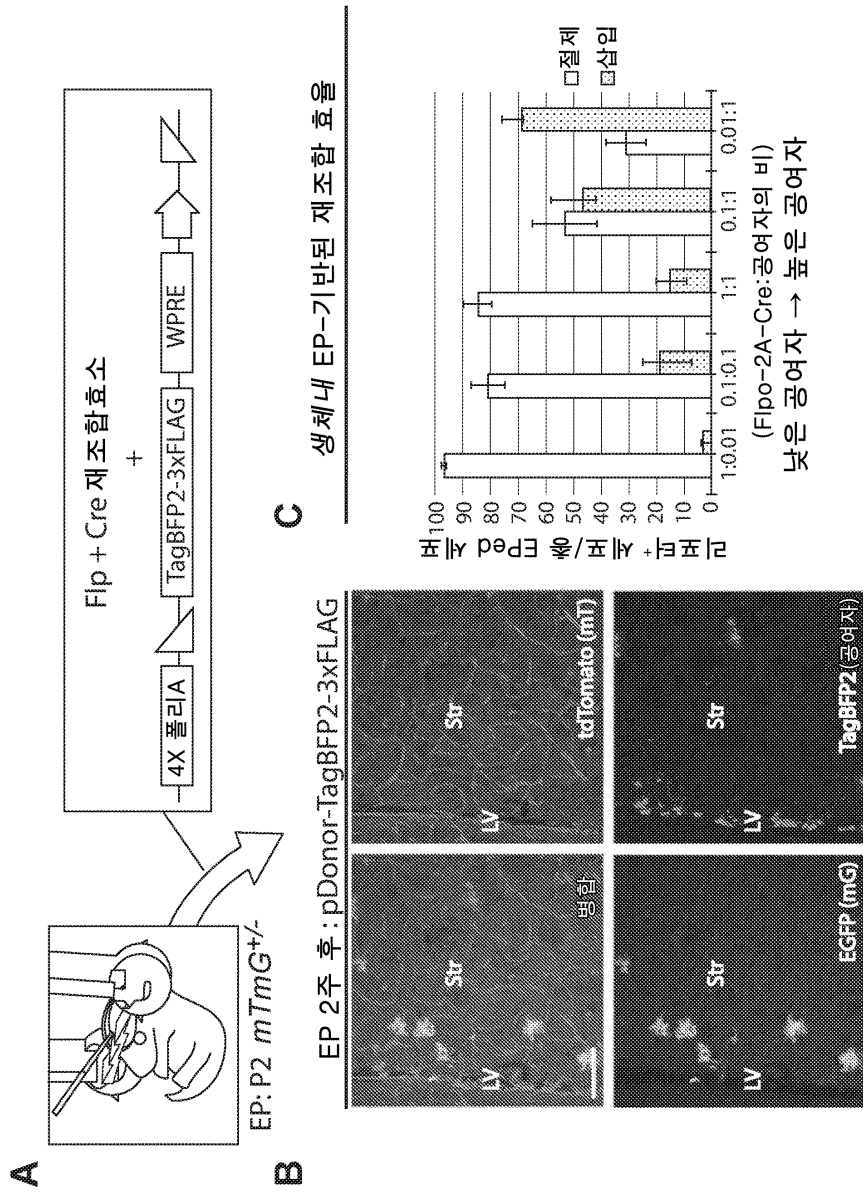
도면 1a



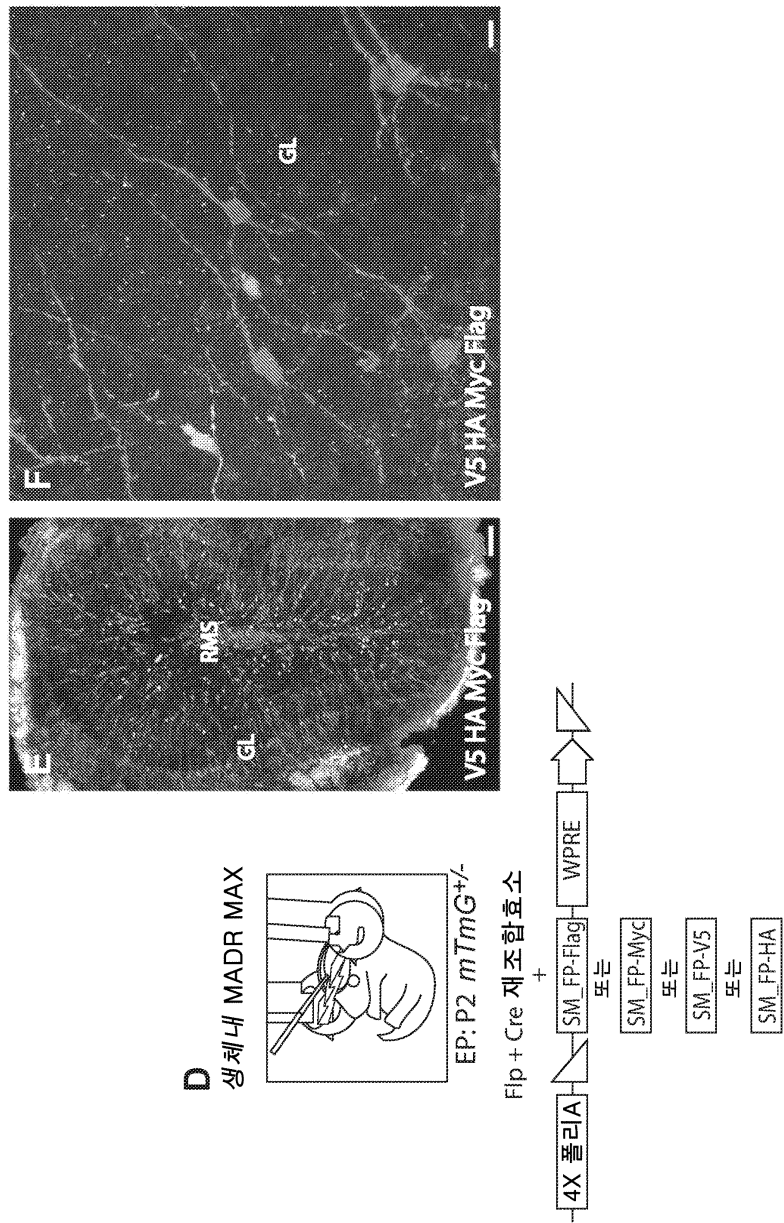
도면1c



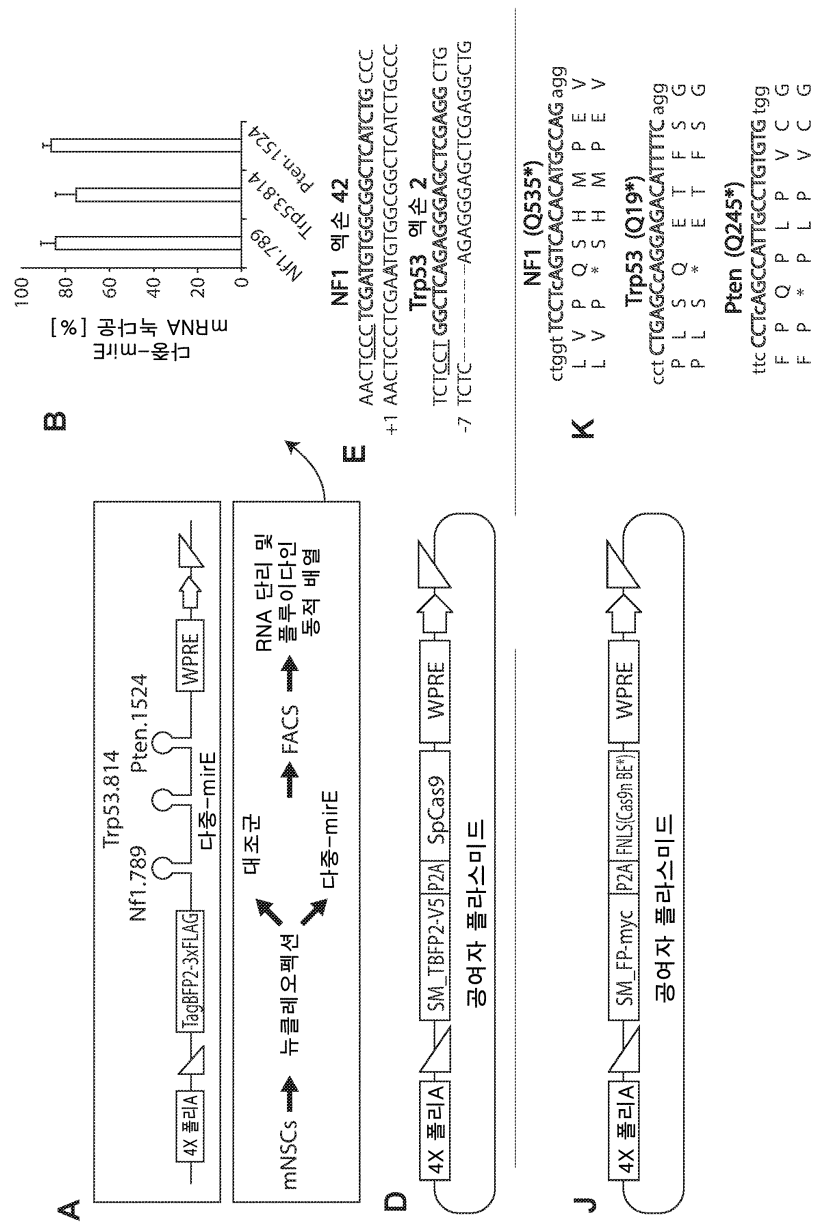
도면2a



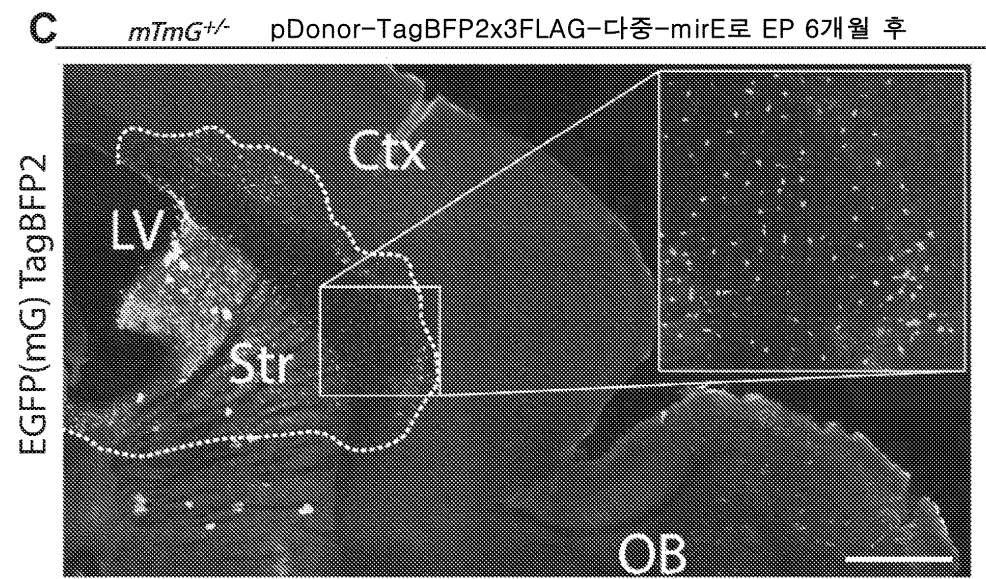
도면2b



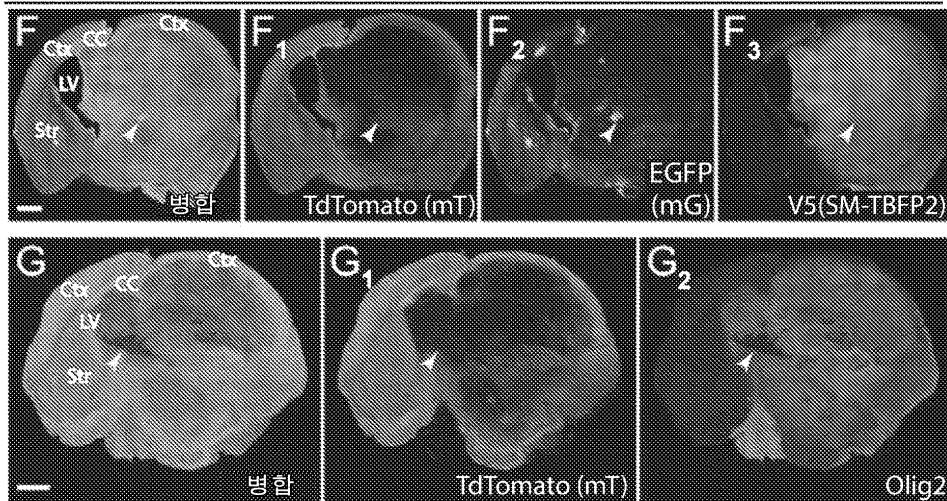
도면3a



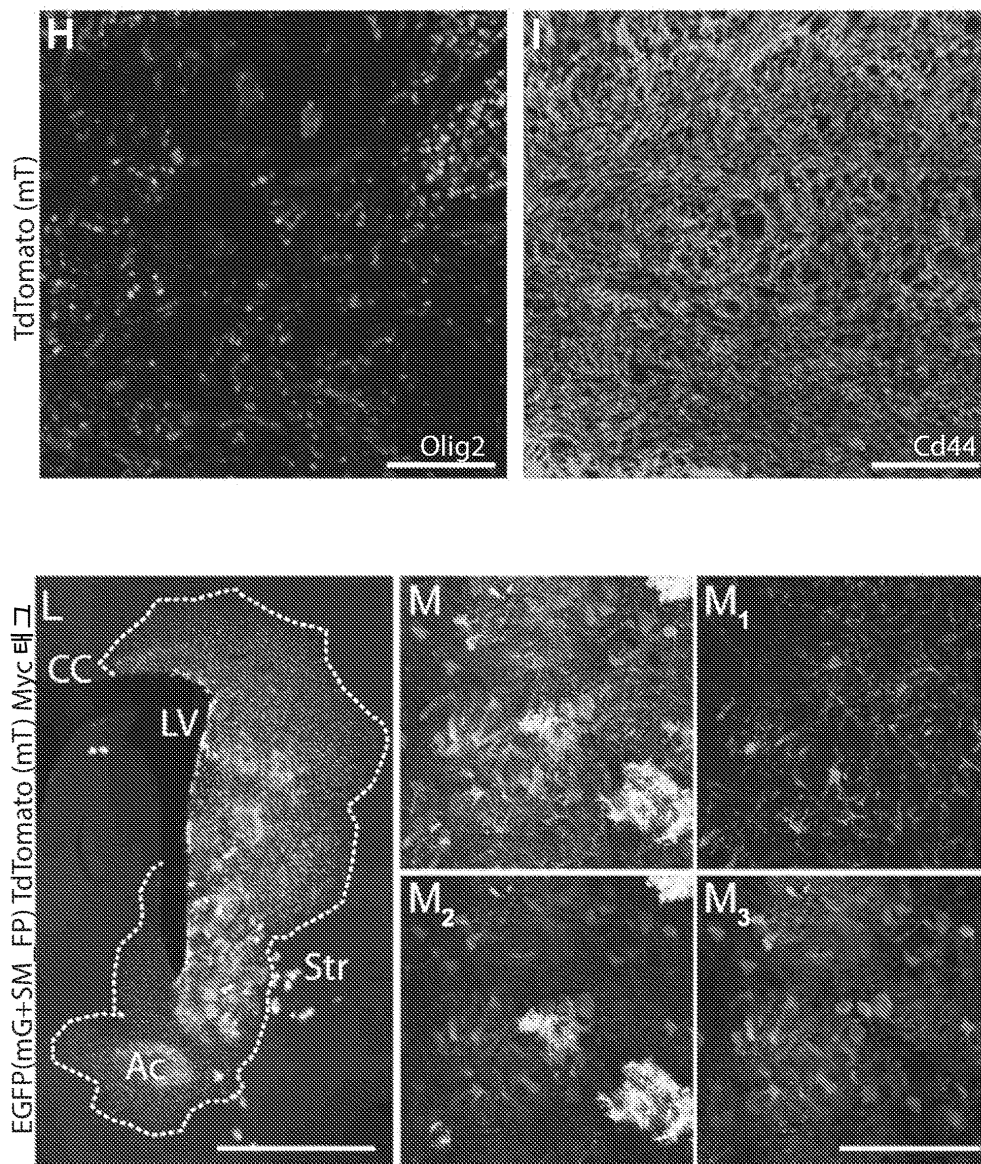
도면3b



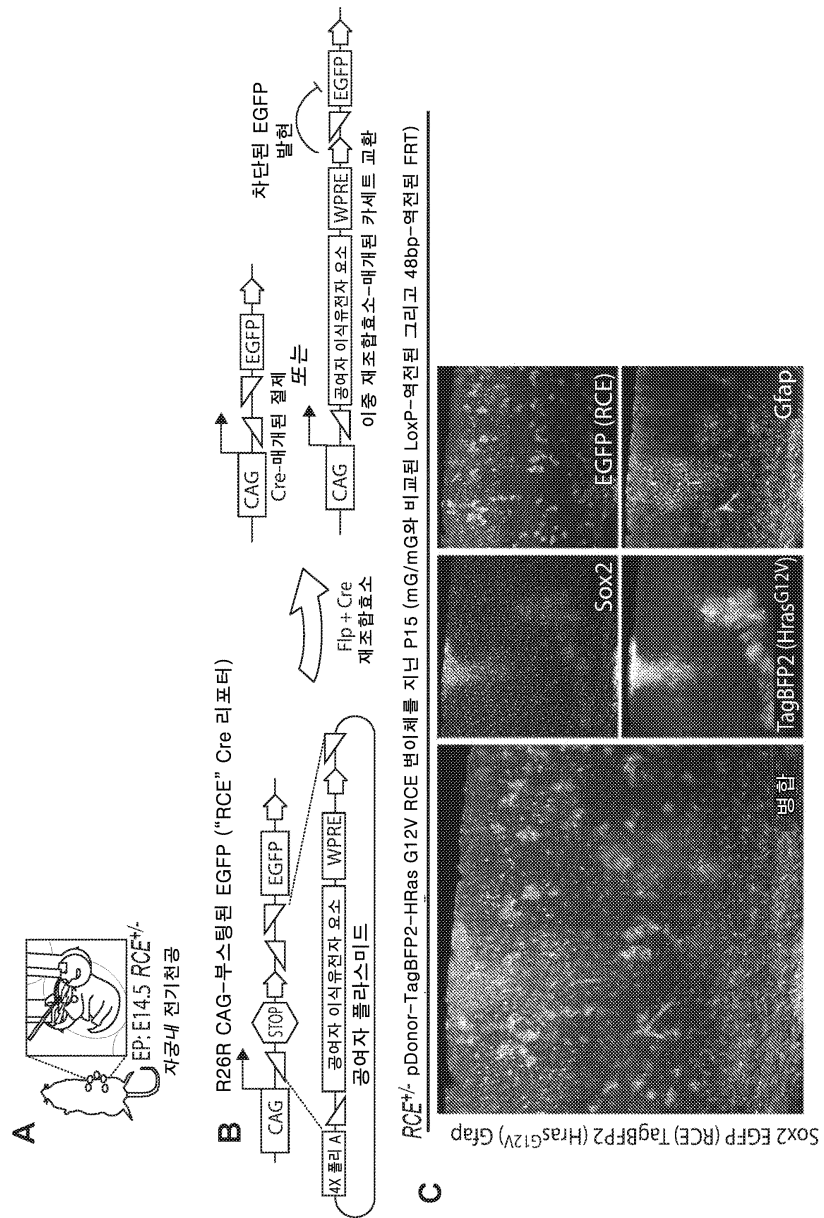
mTmG^{+/-} pDonor-SM_TBFP2-V5-2A-SpCas9+sgRNA로 EP 5개월 후



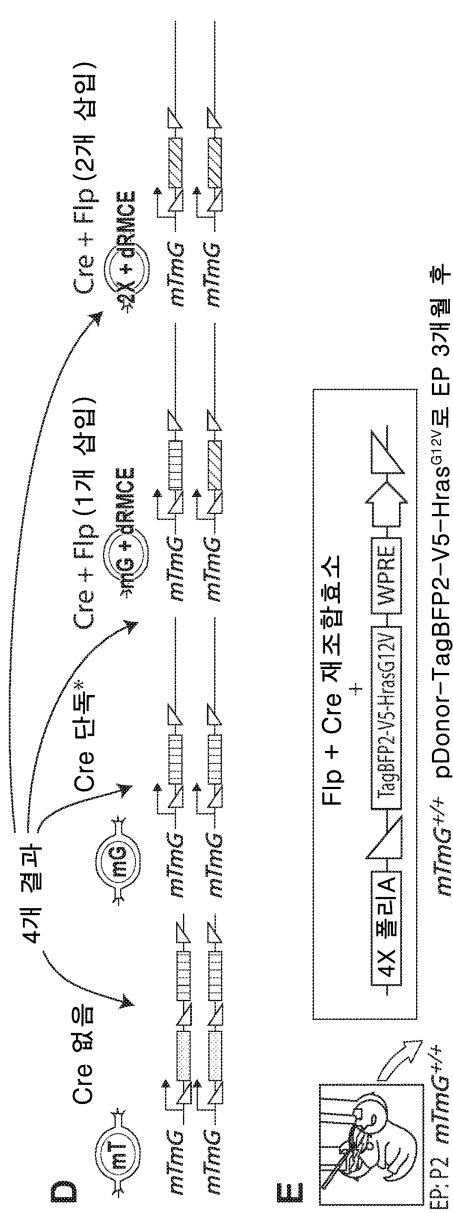
도면3c



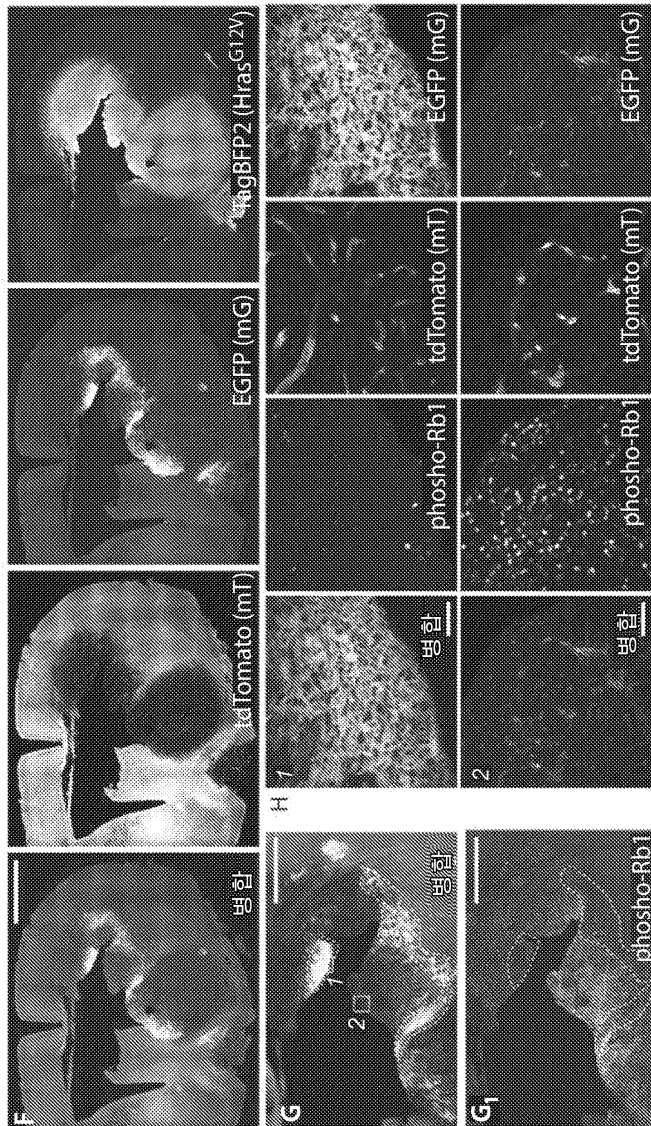
도면4a



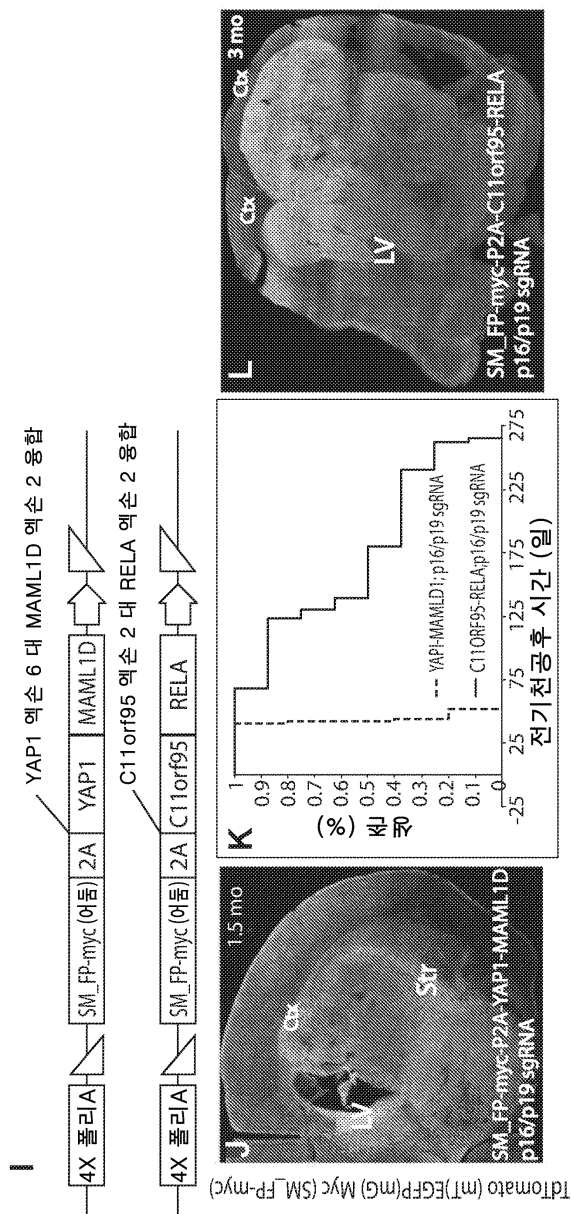
도면4b



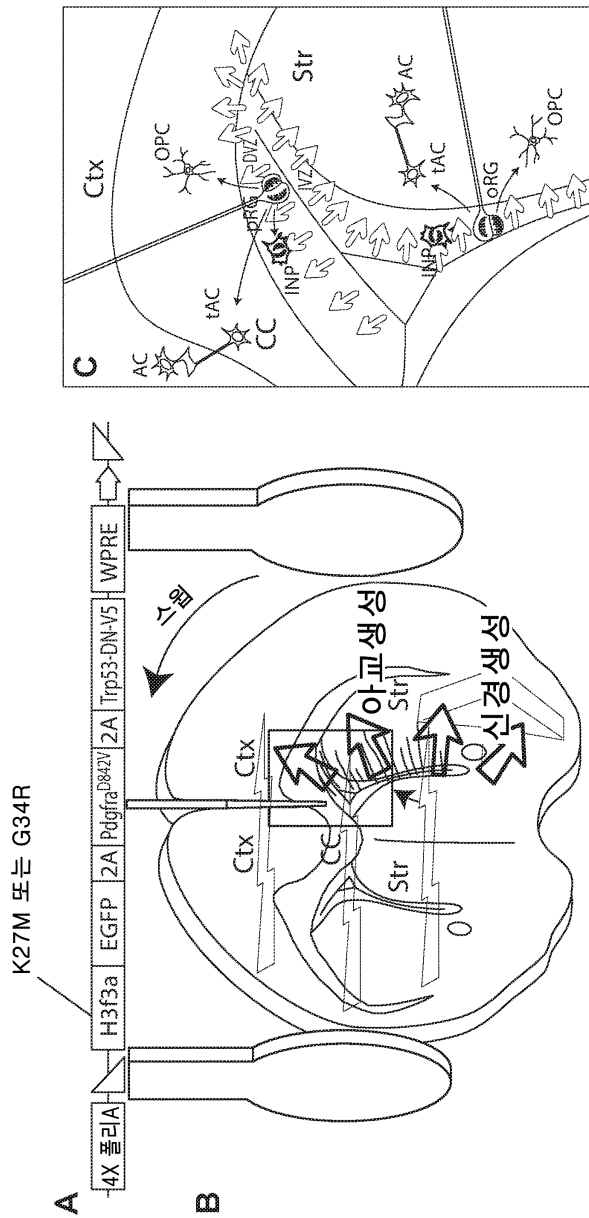
도면4c



도면4d

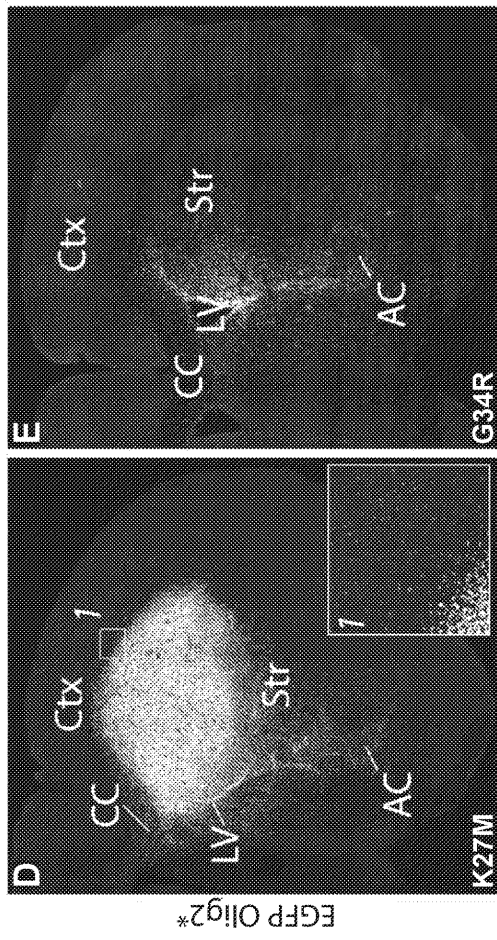


도면5a

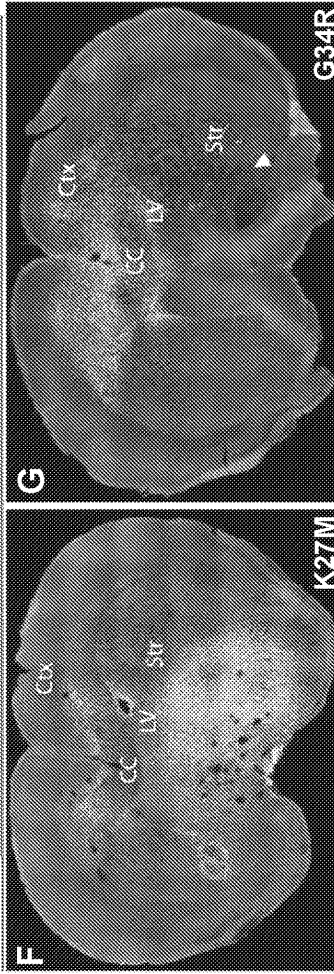


도면5b

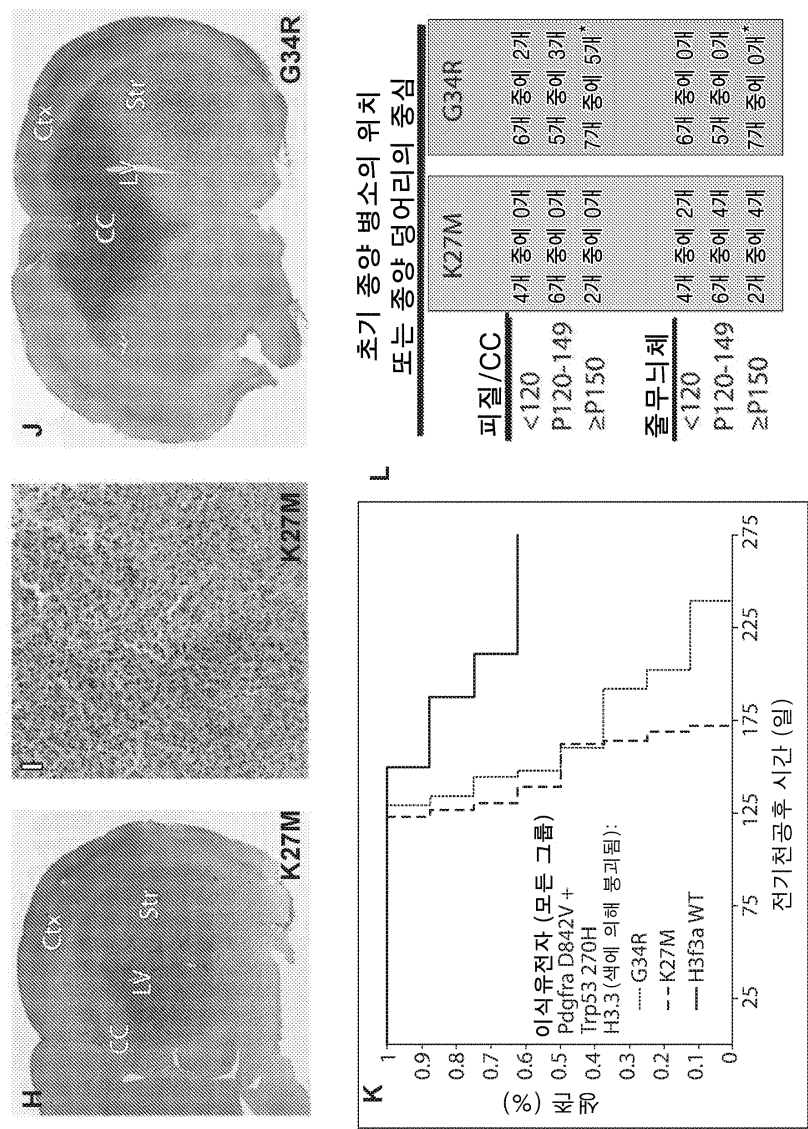
mTmG^{+/+} pDonor-H3f3a^(K27M 또는 G34R)-EGFP-2A-Pdgfra^{D842V-2a-Trp53^{R270H}}로 EP 100일 후



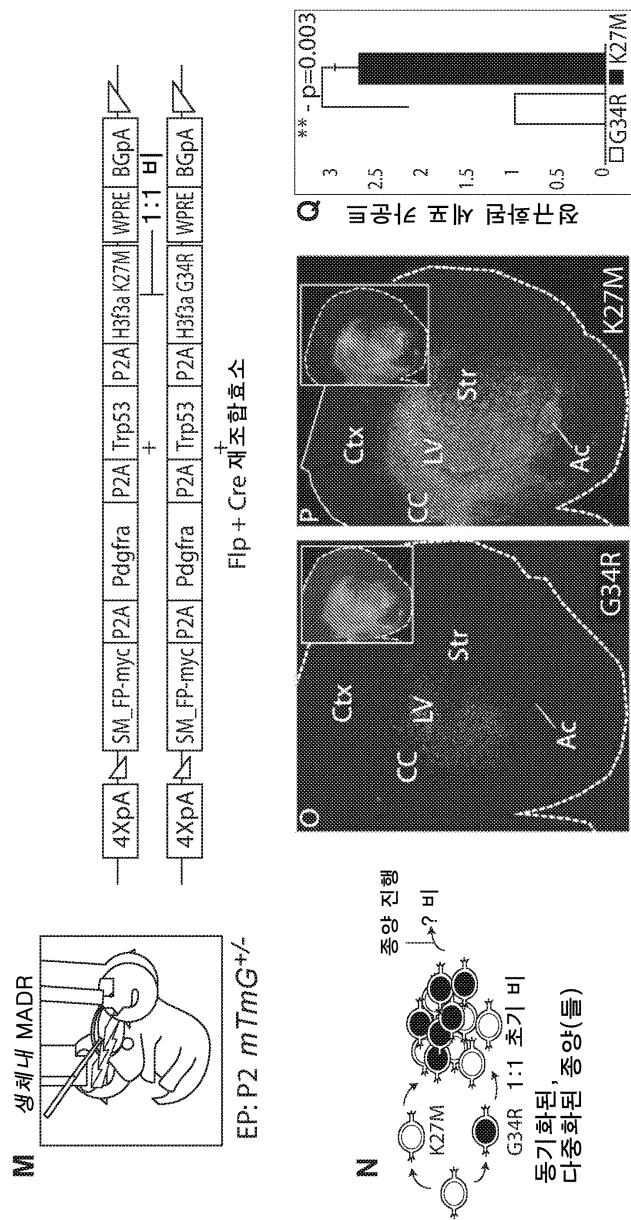
mTmG^{+/+} pDonor-H3f3a^(K27M 또는 G34R)-EGFP-2A-Pdgfra^{D842V-2a-Trp53^{R270H}}로 EP 120일 후



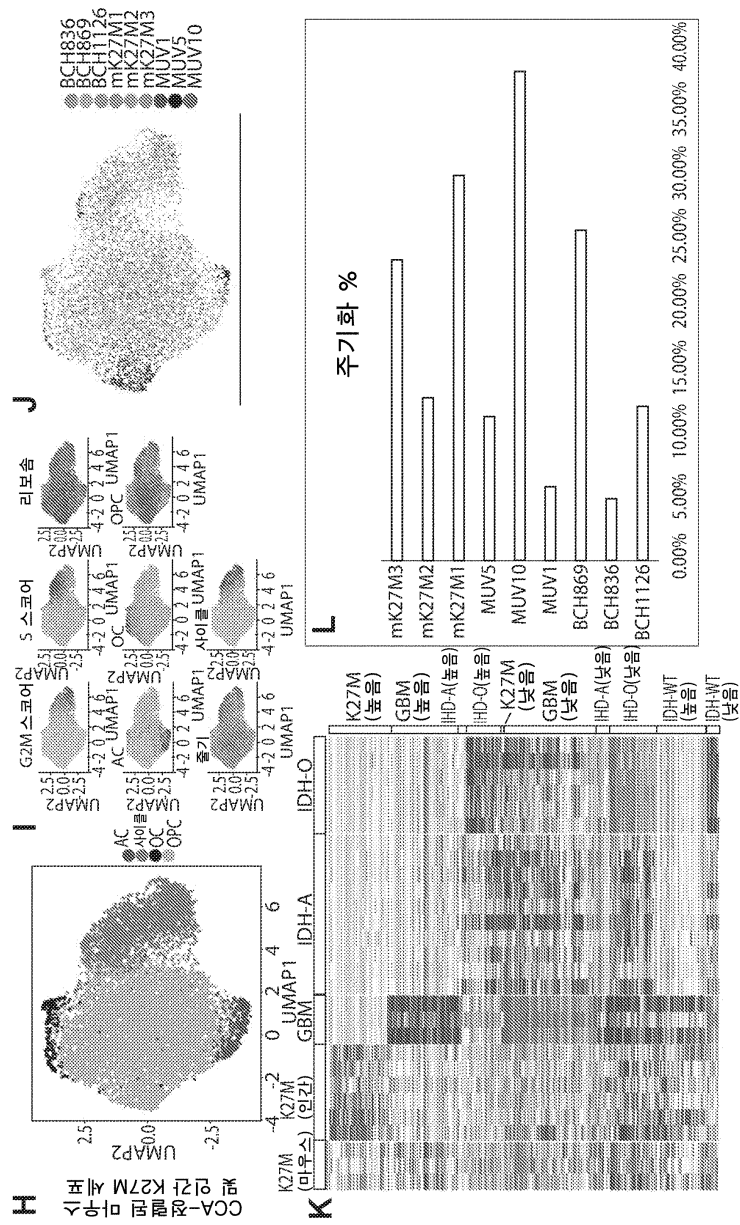
도면5c



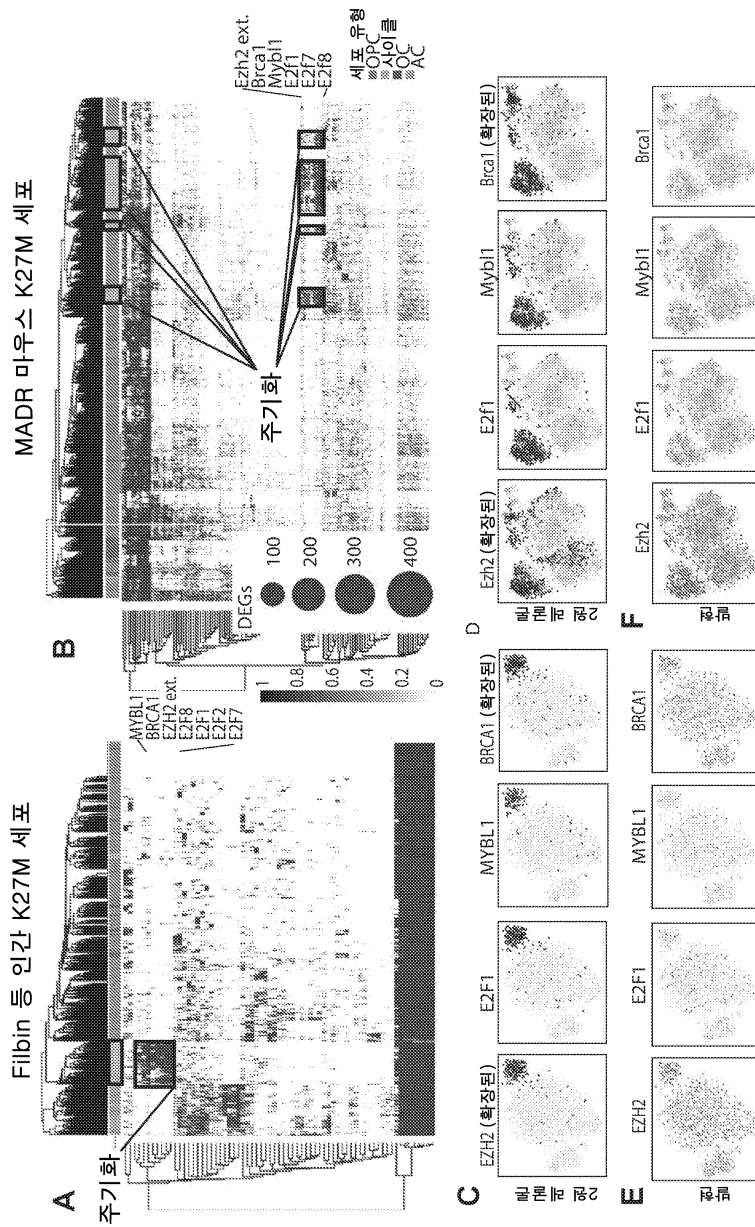
도면5d



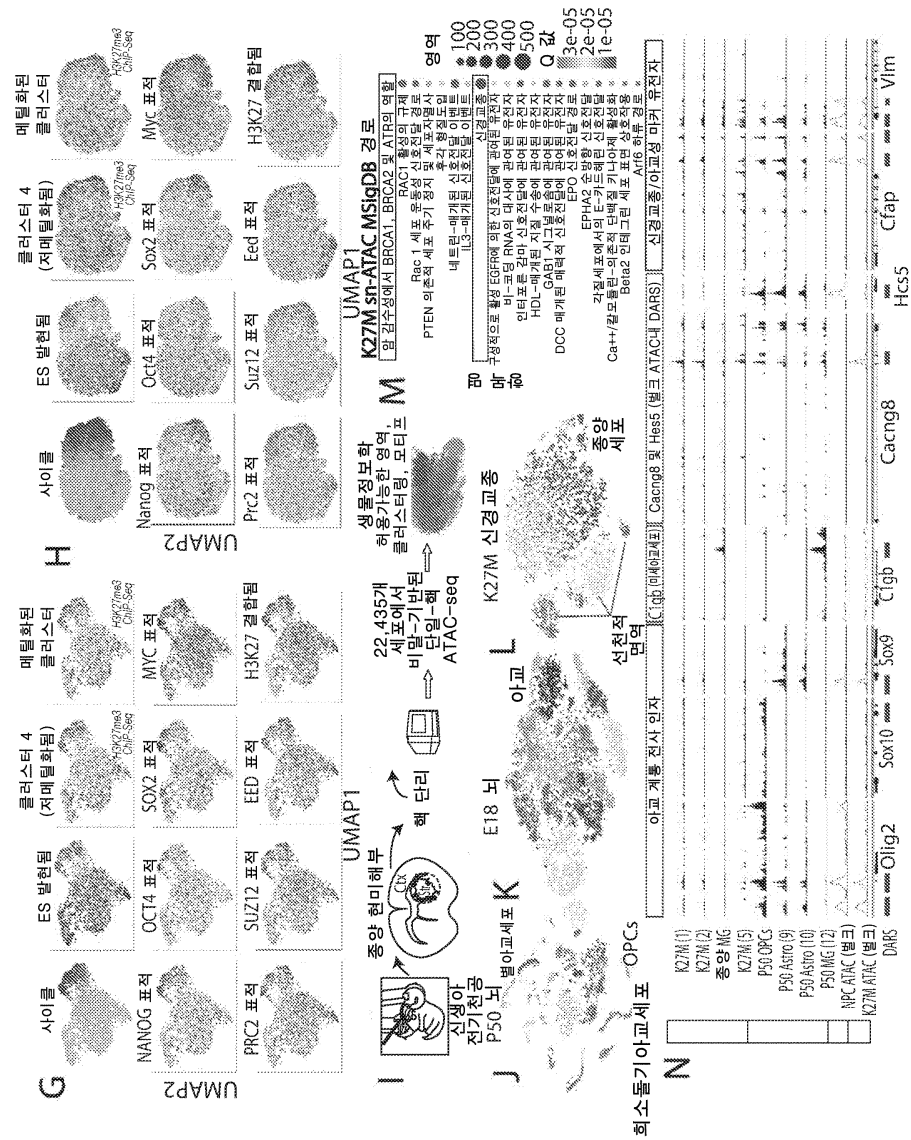
도면6b



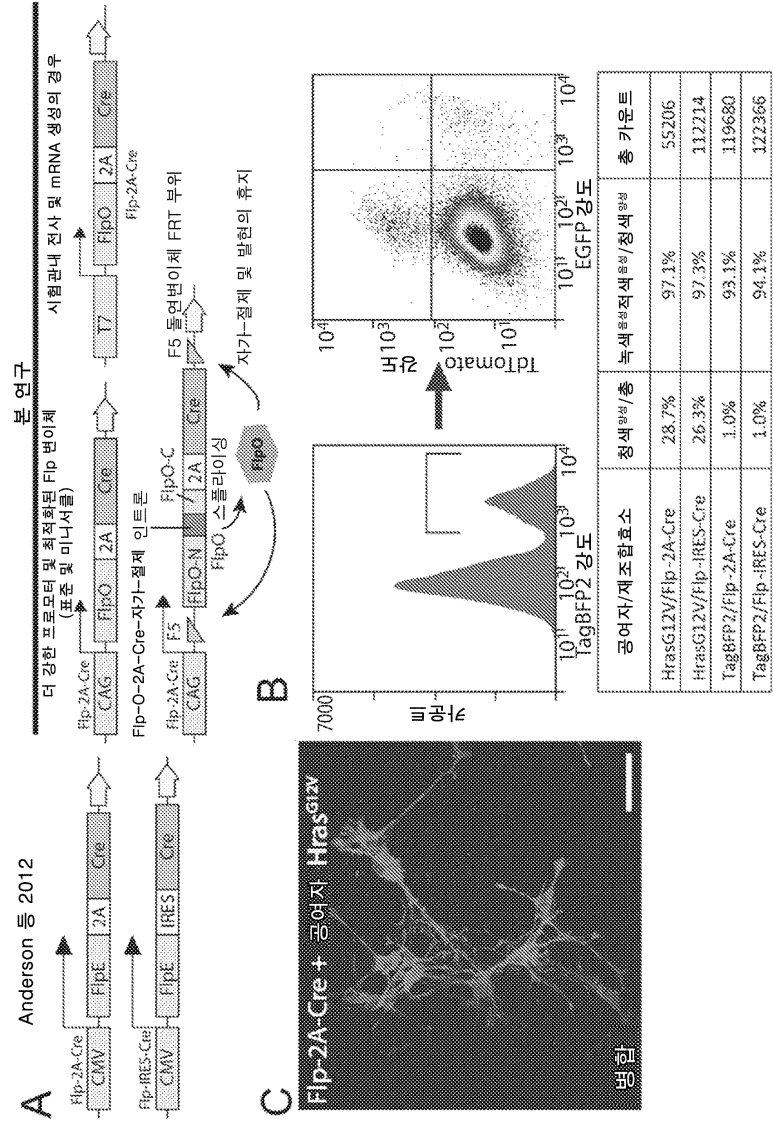
도면7a



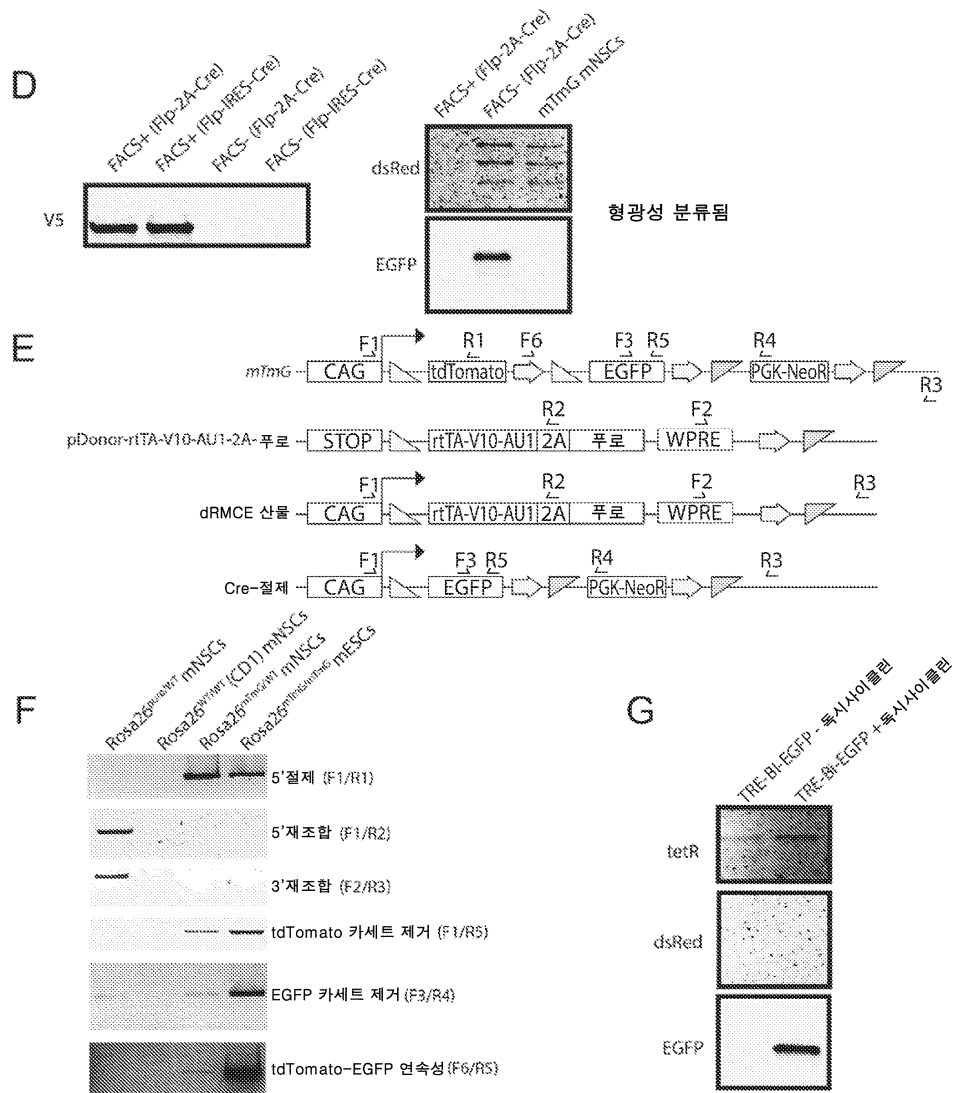
도면 7b



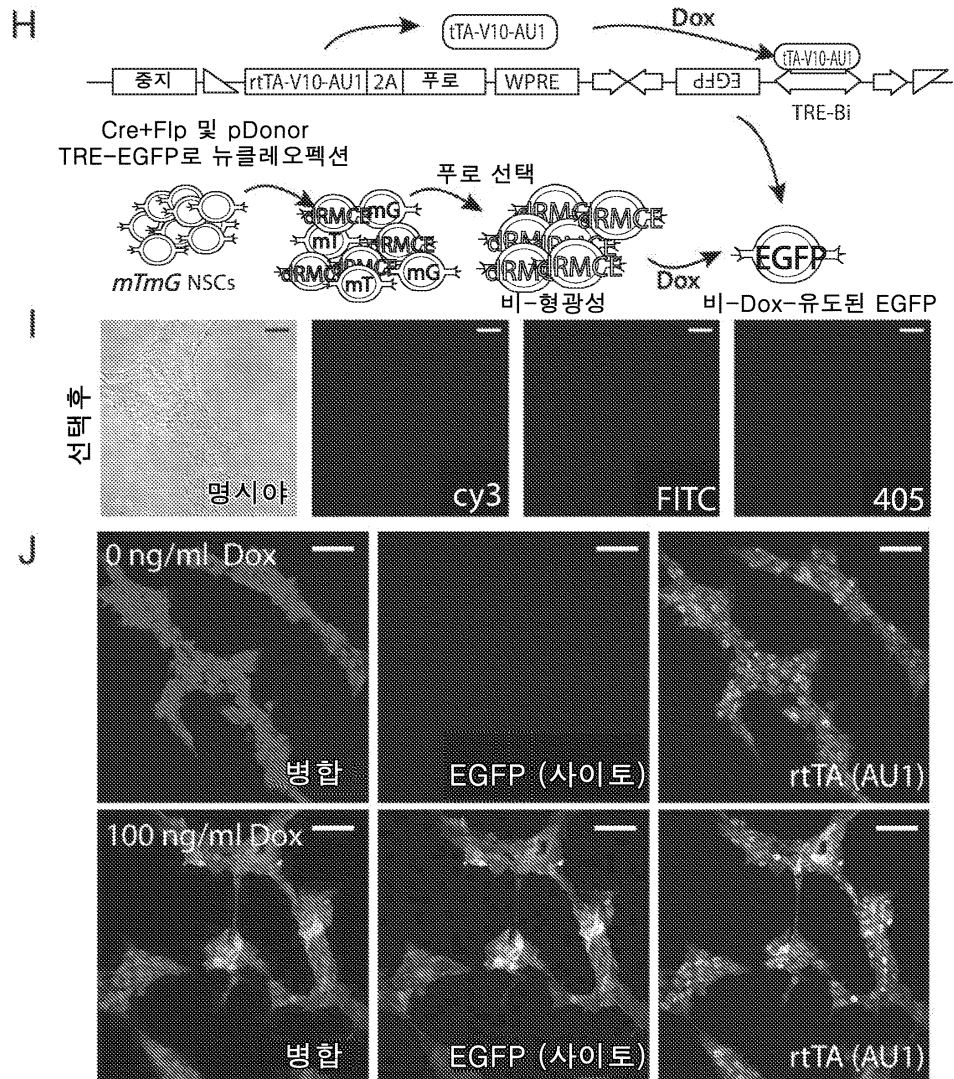
도면8a



도면 8b

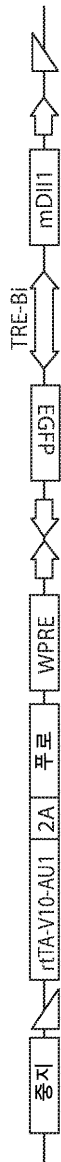


도면8c

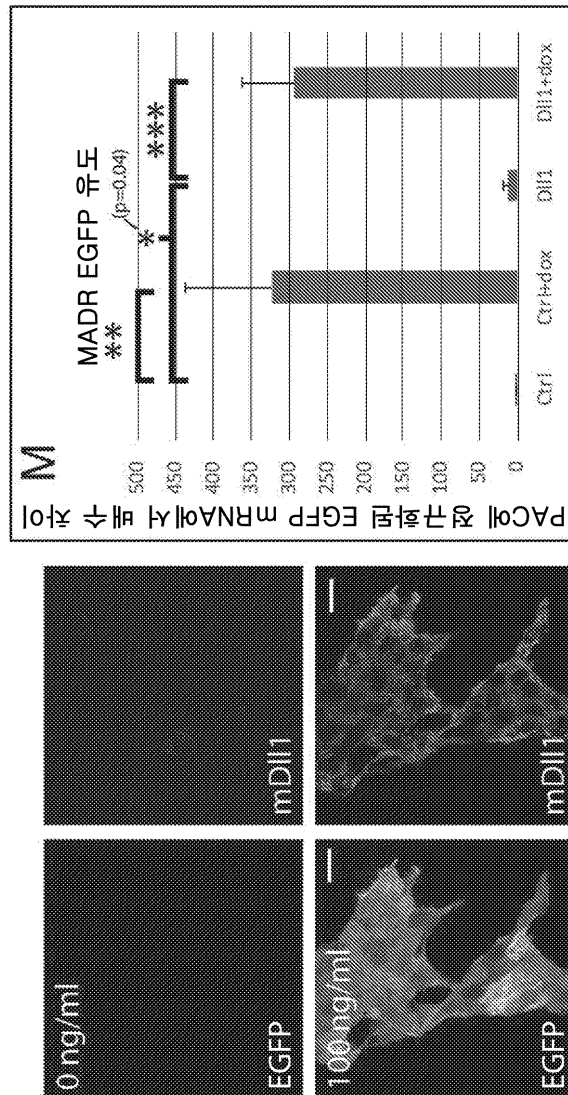


도면8d

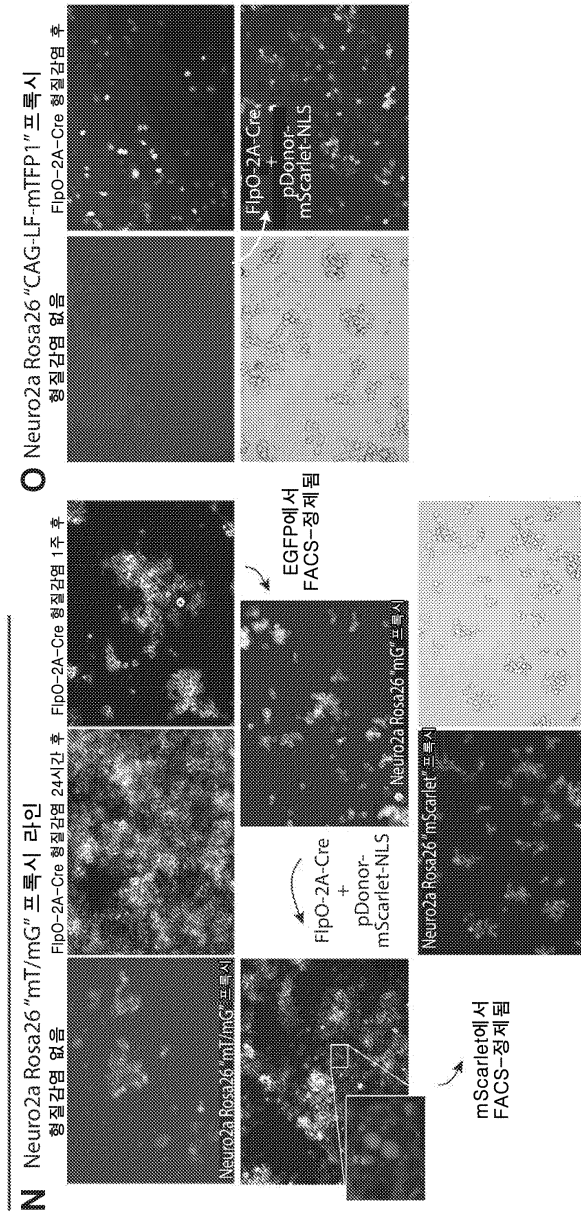
K



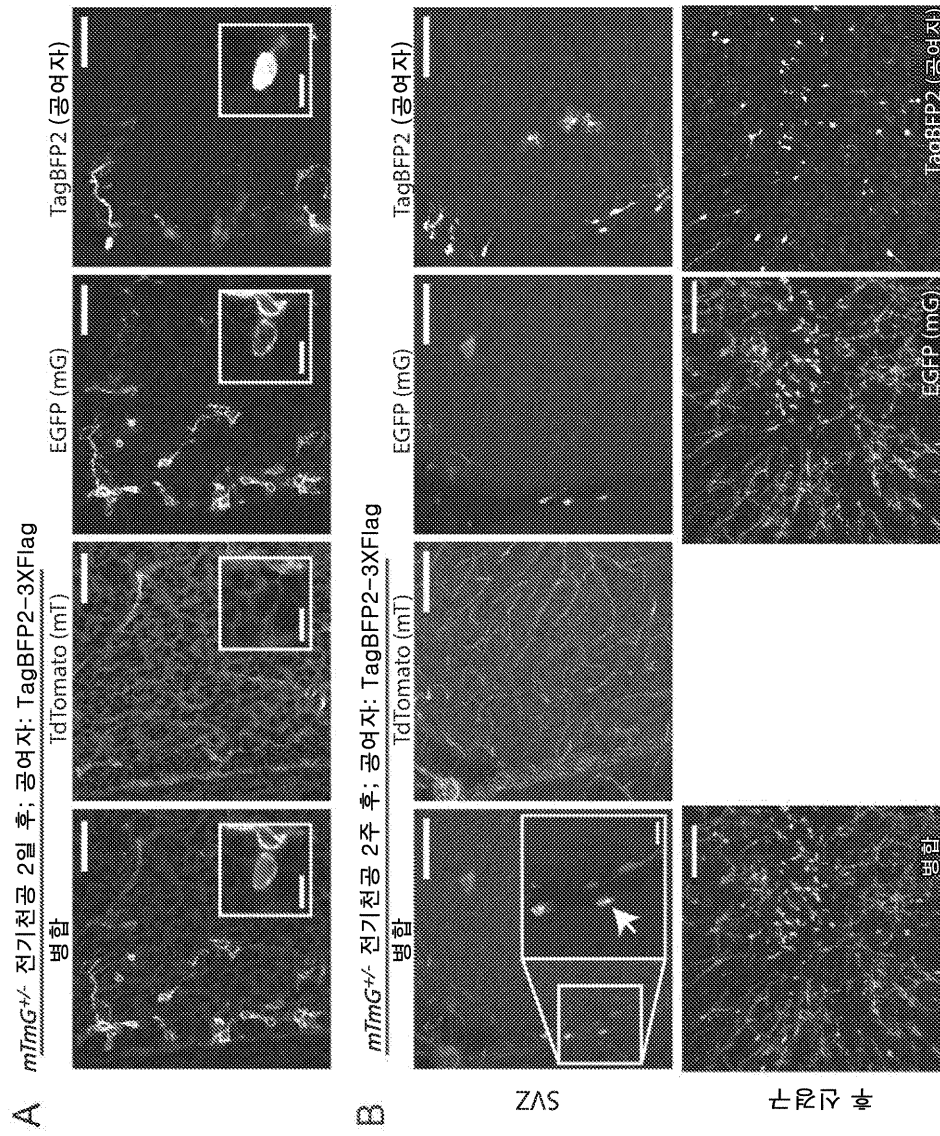
L



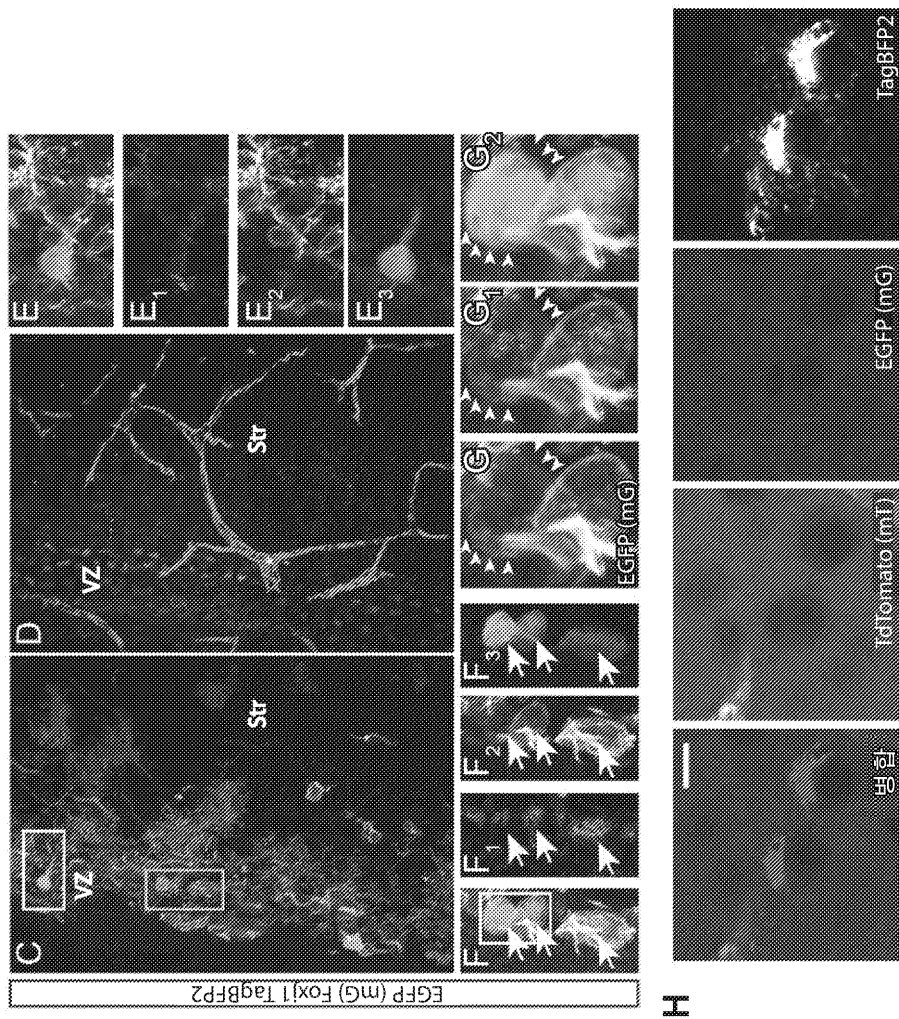
도면8e



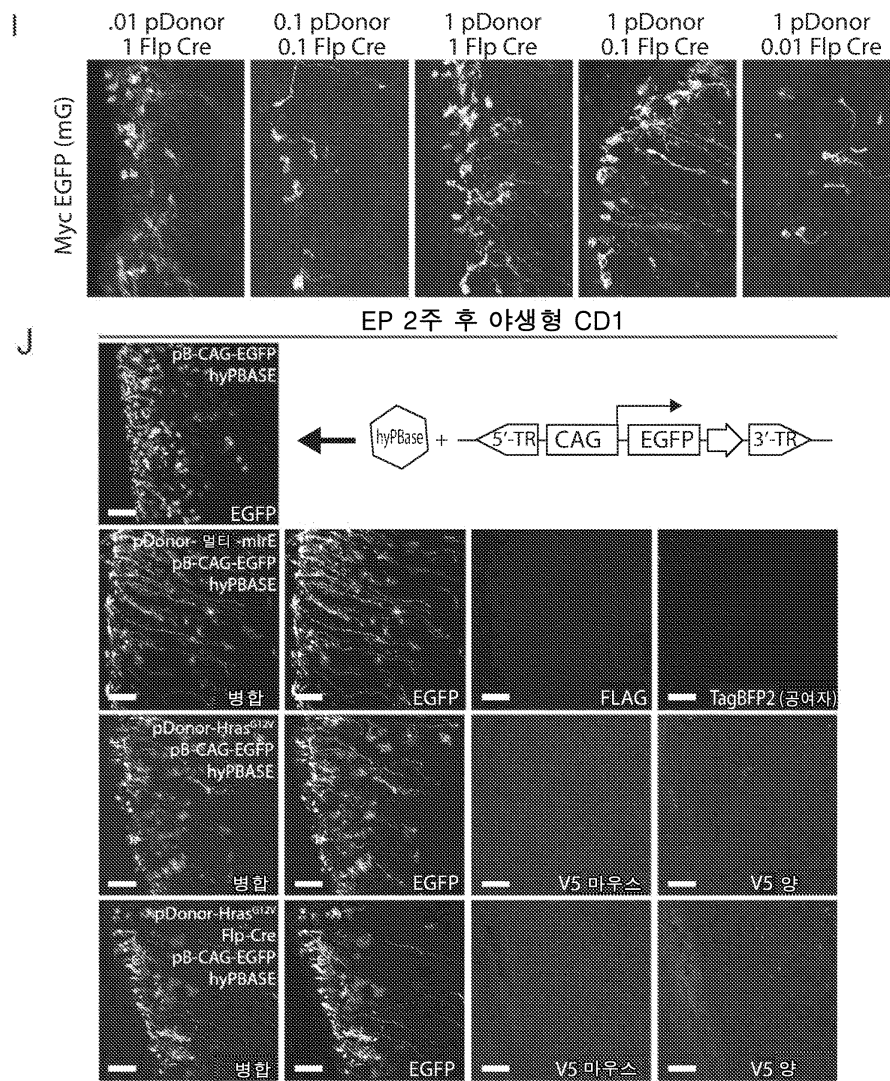
도면9a



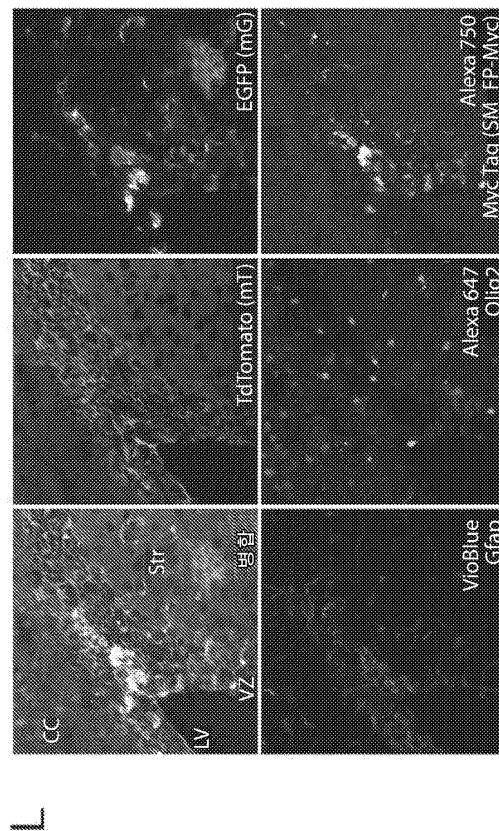
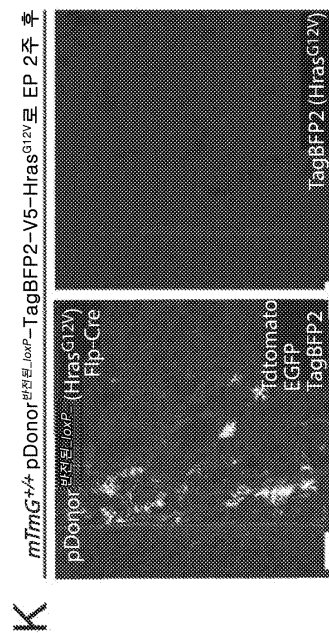
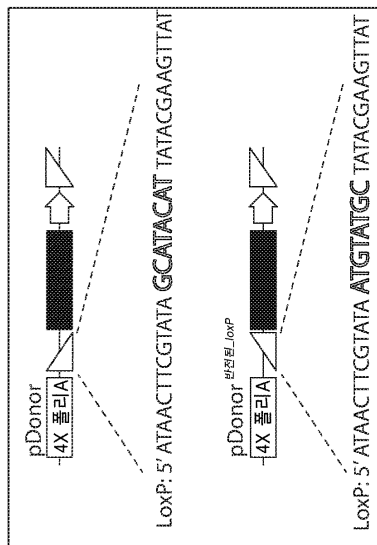
도면9b



도면9c

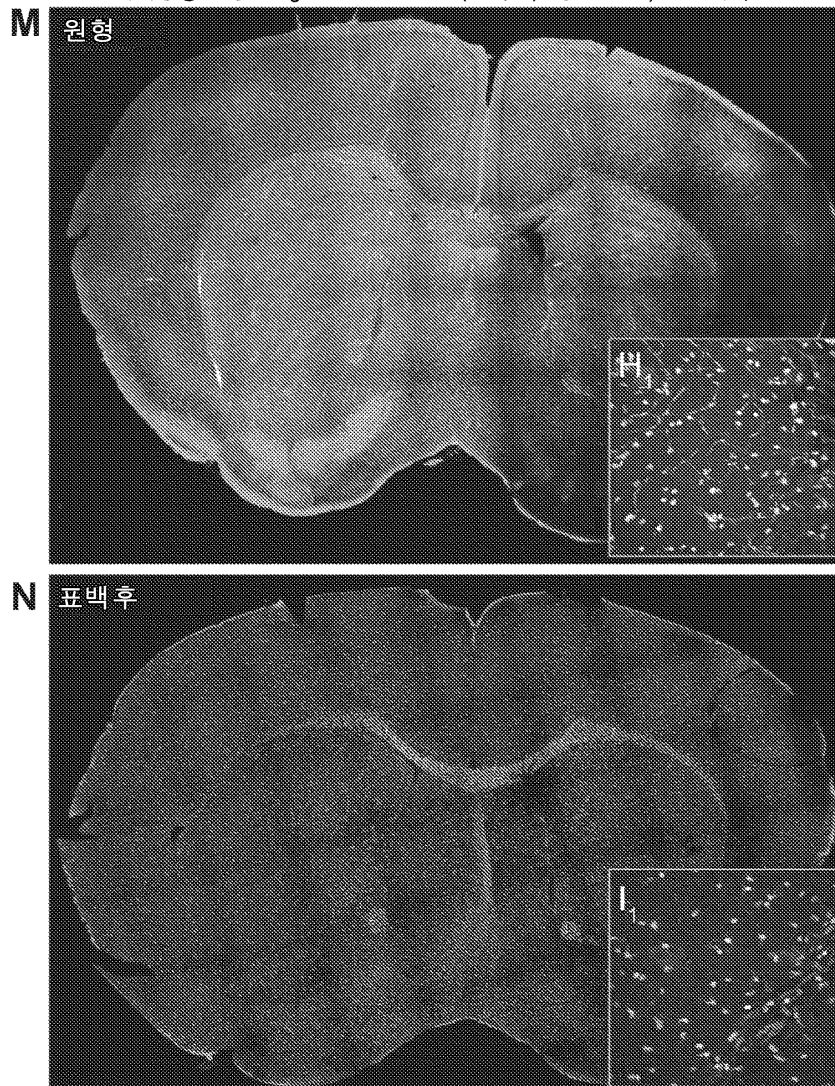


도면9d

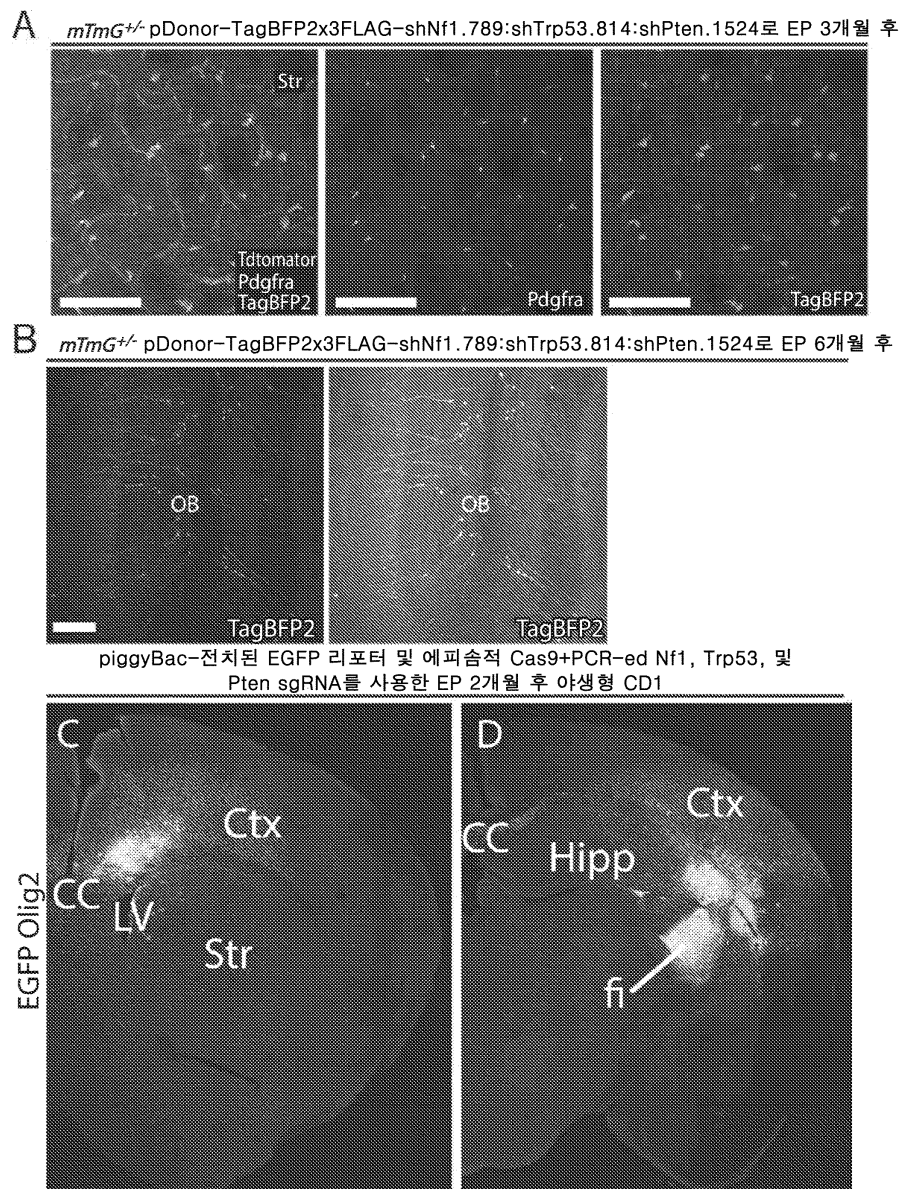


도면9e

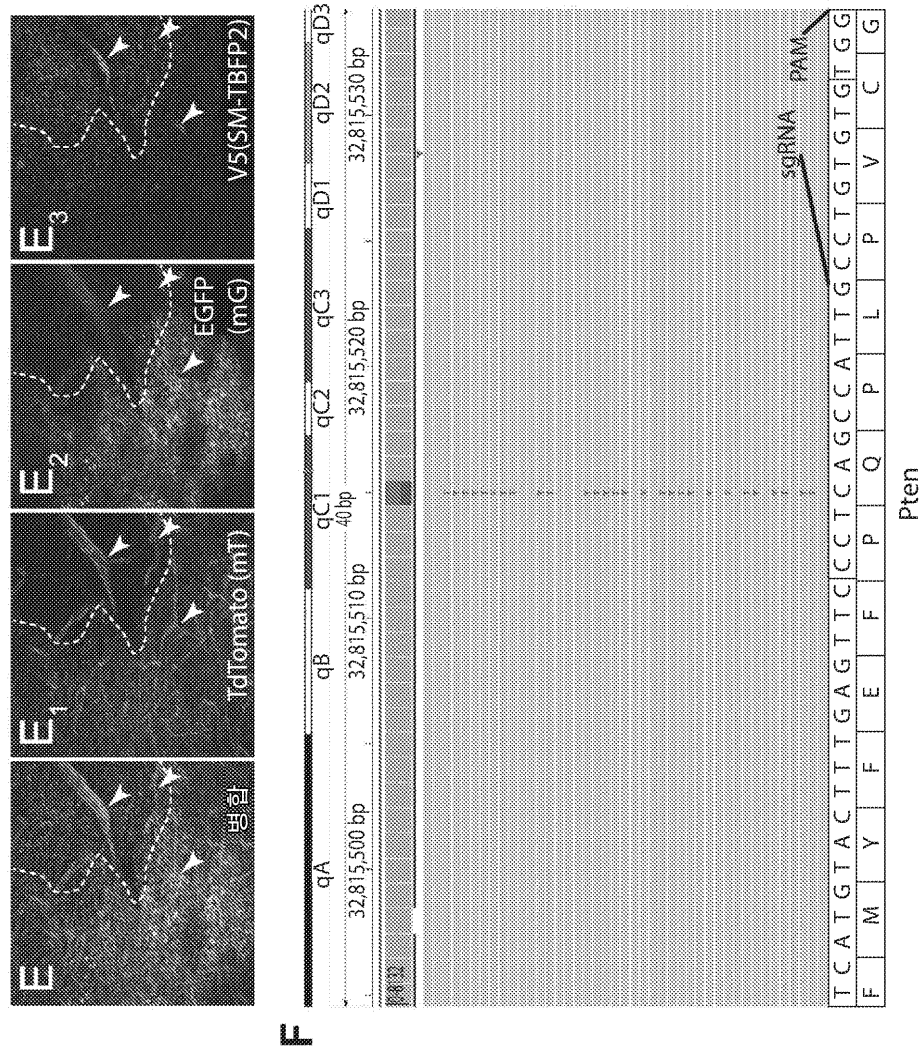
mT; TdTomato 자가형광 + 항-Pdgfra; Alex555 이차 mG;
EGFP 자가형광 + 항-Olig2;Alexa488 mG(단백질); 항-EGFP, 405 이차



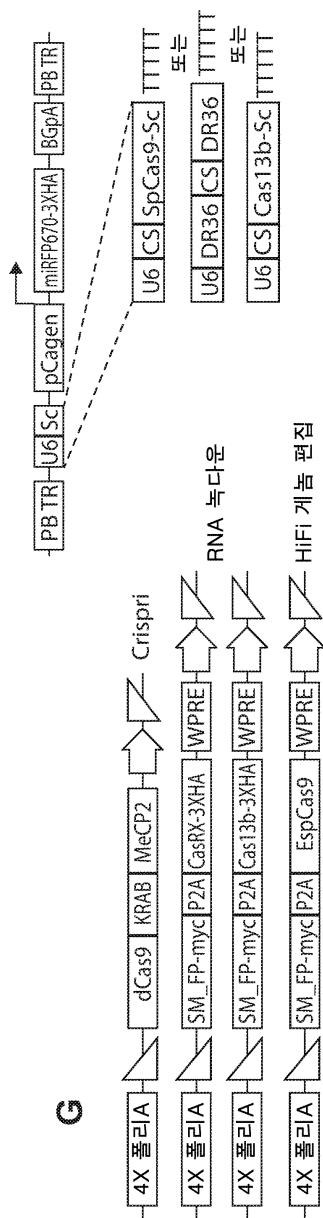
도면10a



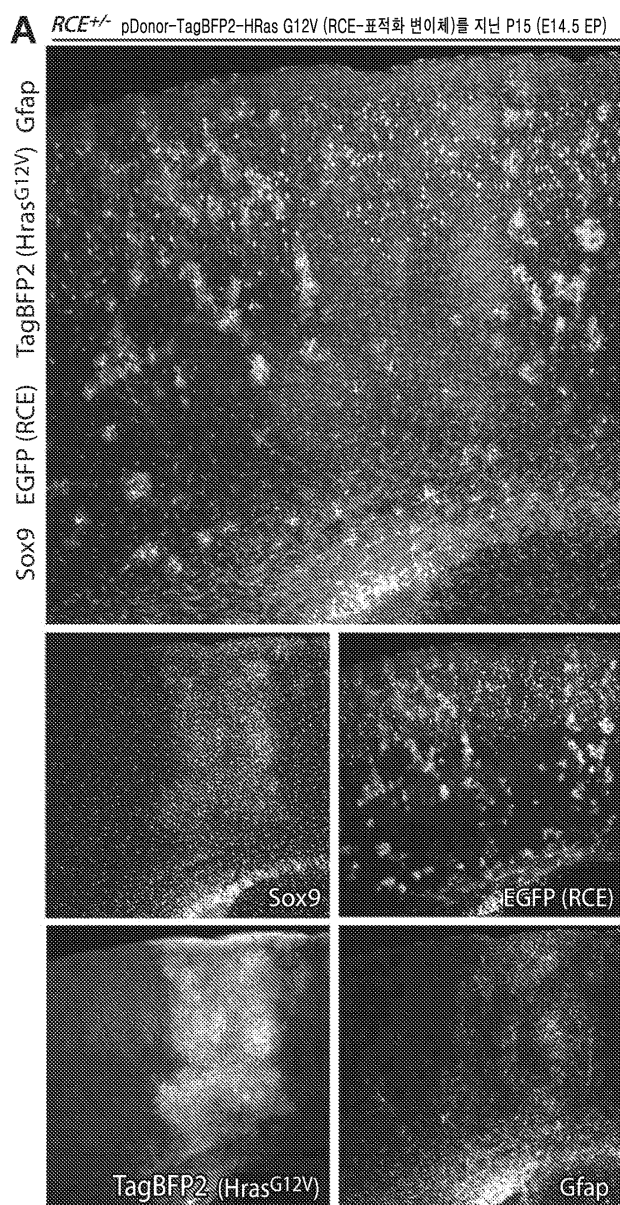
도면10b



도면 10c

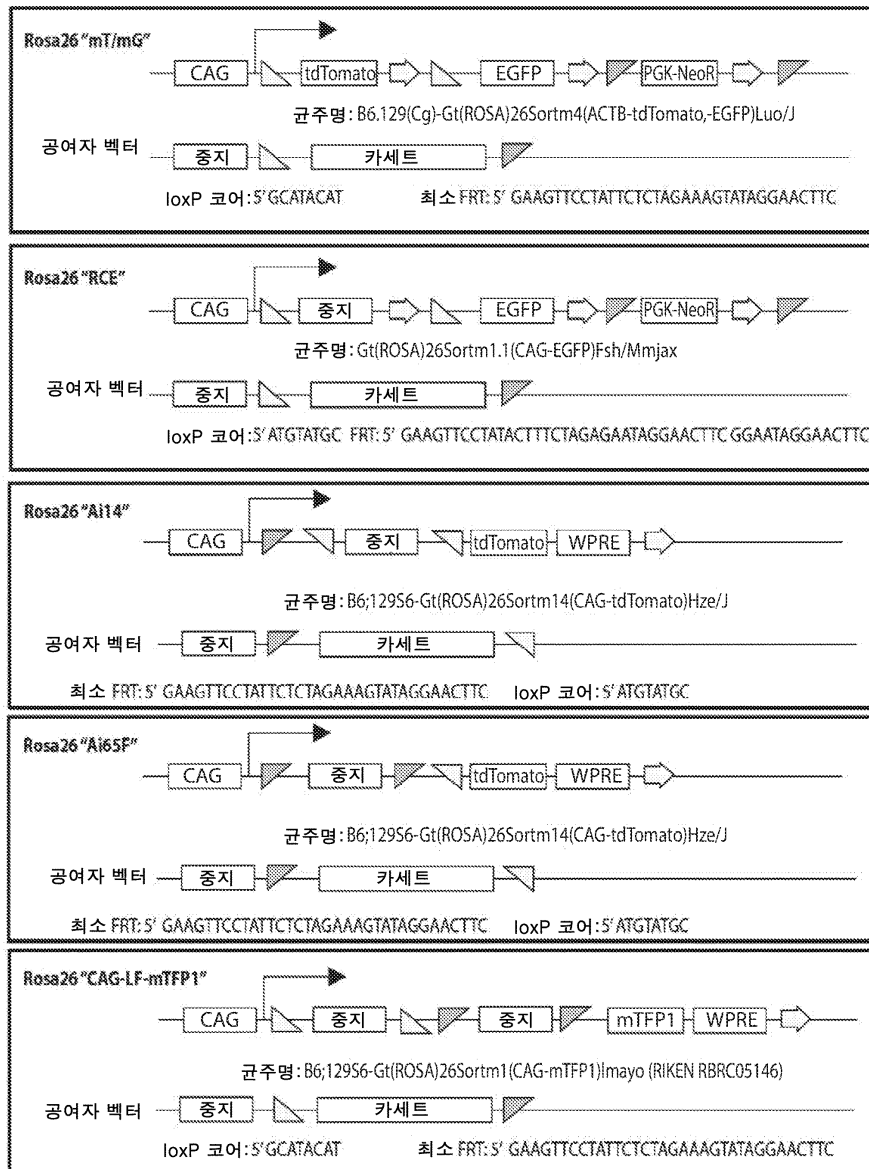


도면11a



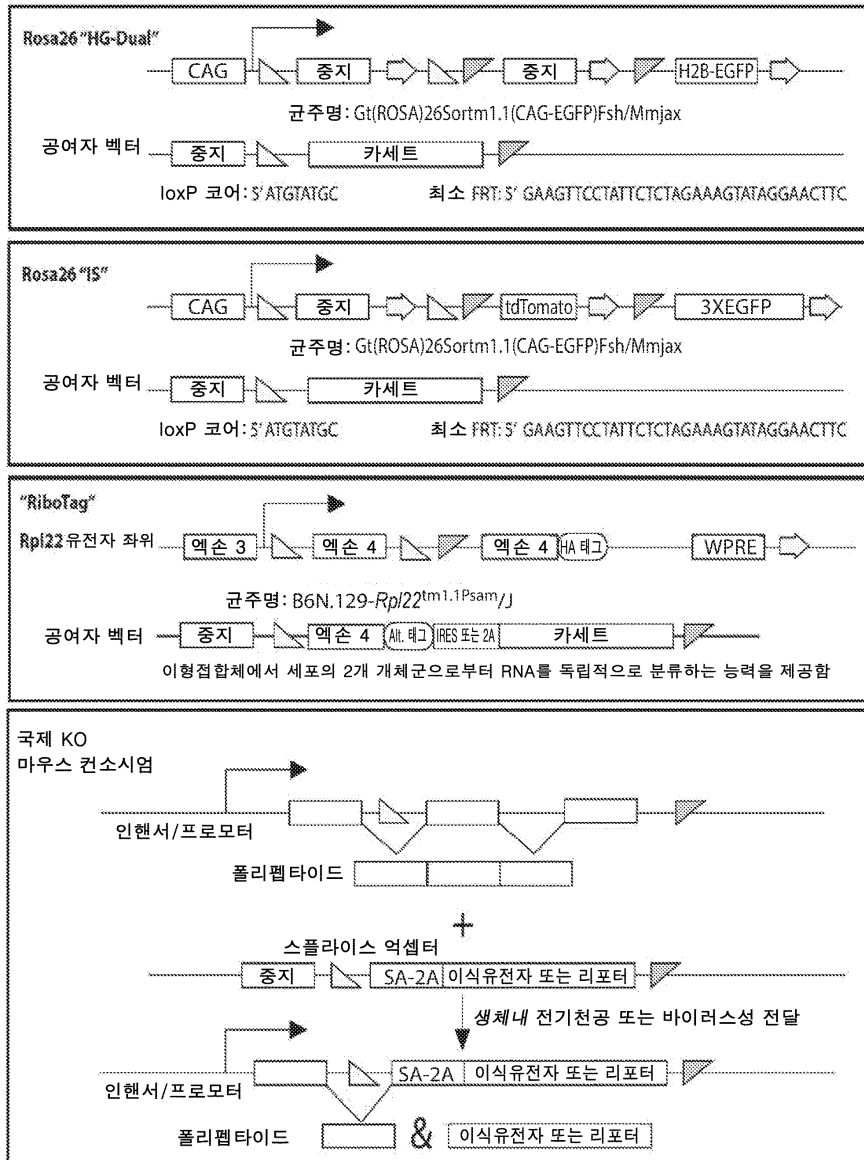
도면11b

B1

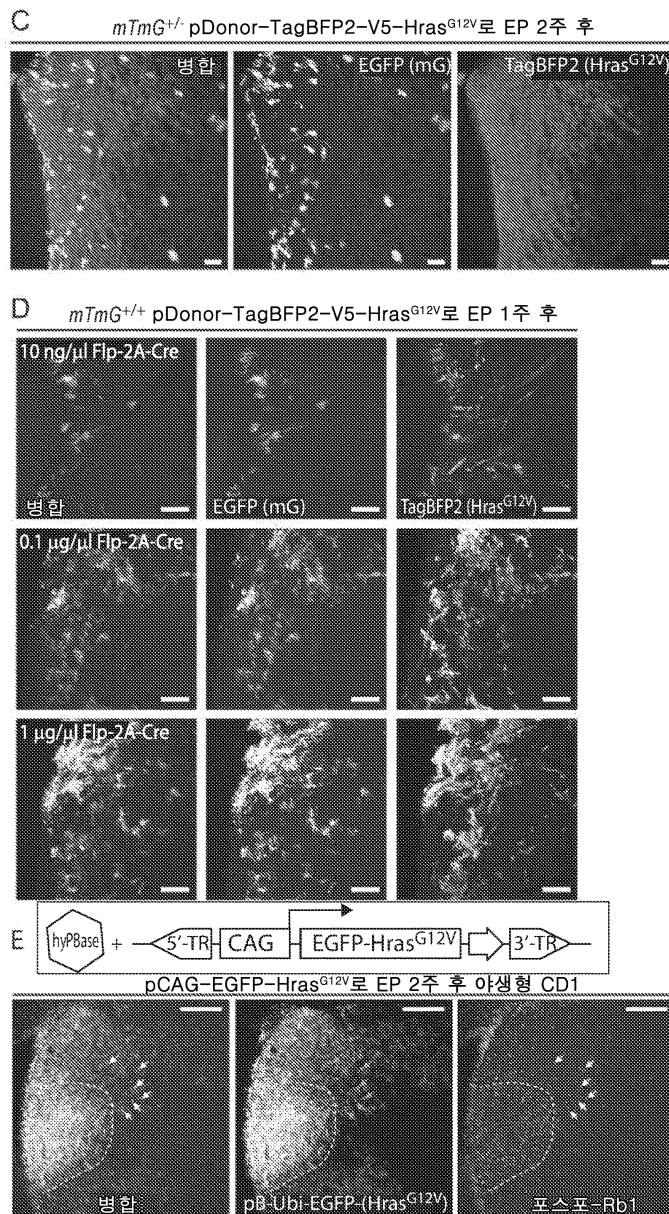


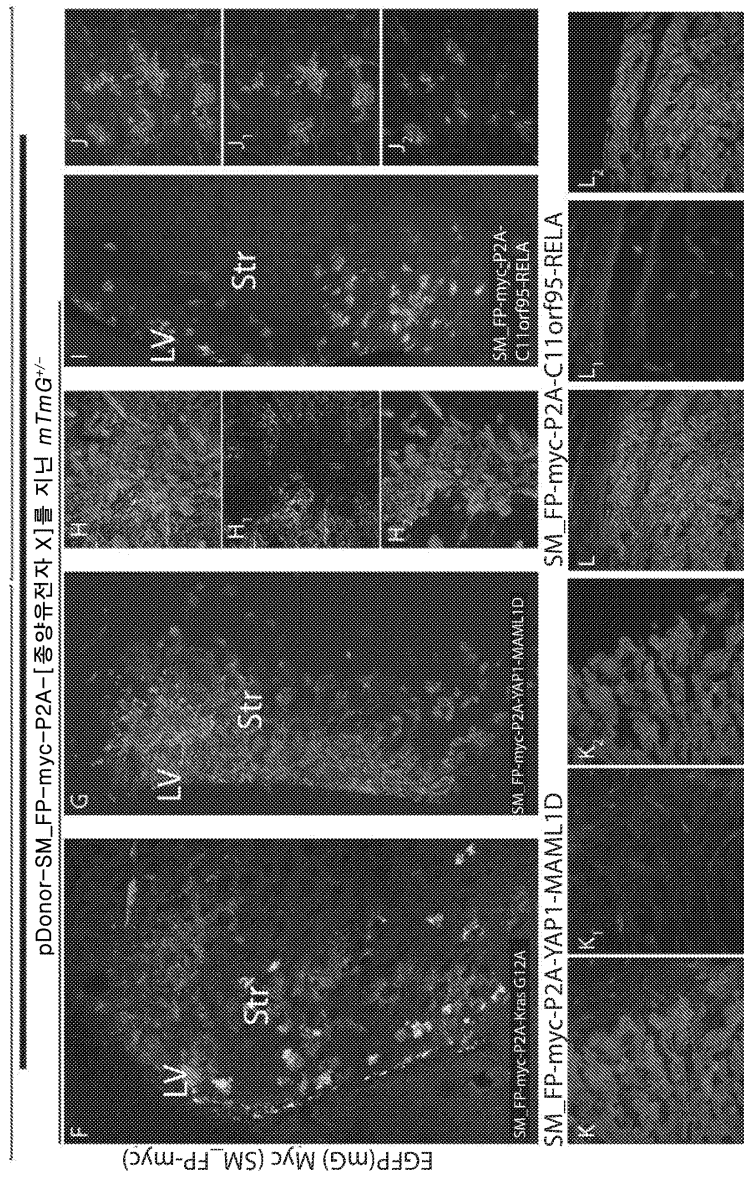
도면11c

B2

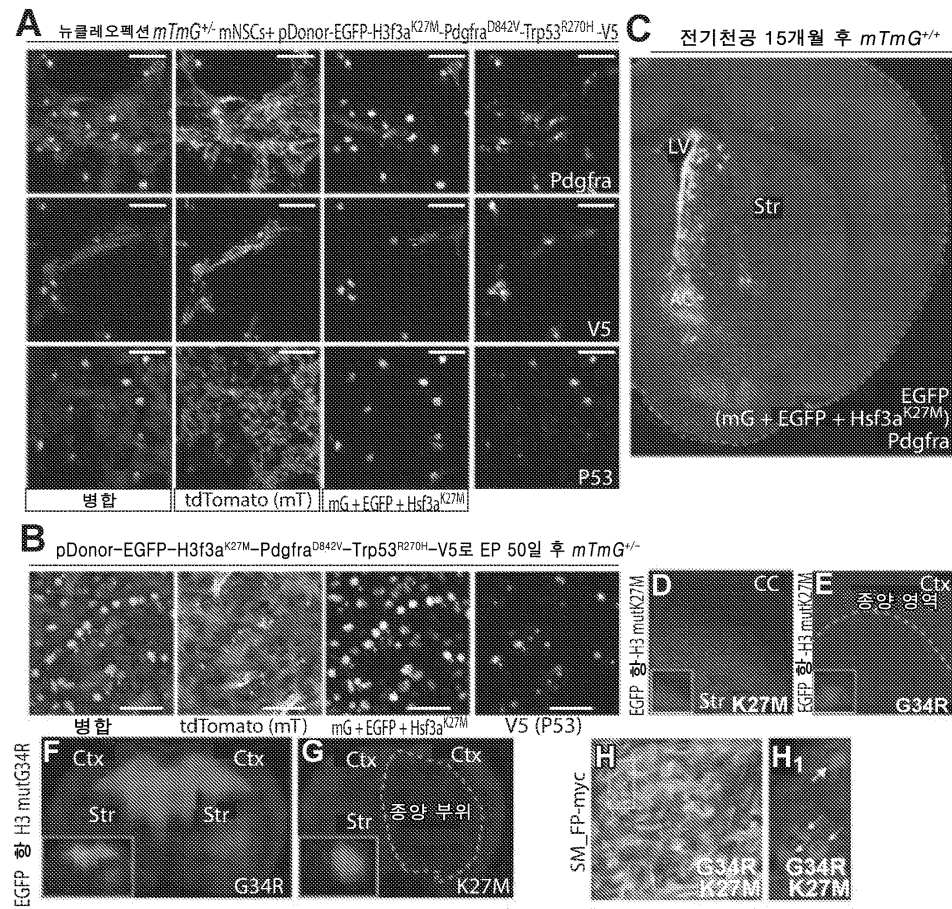


도면11d

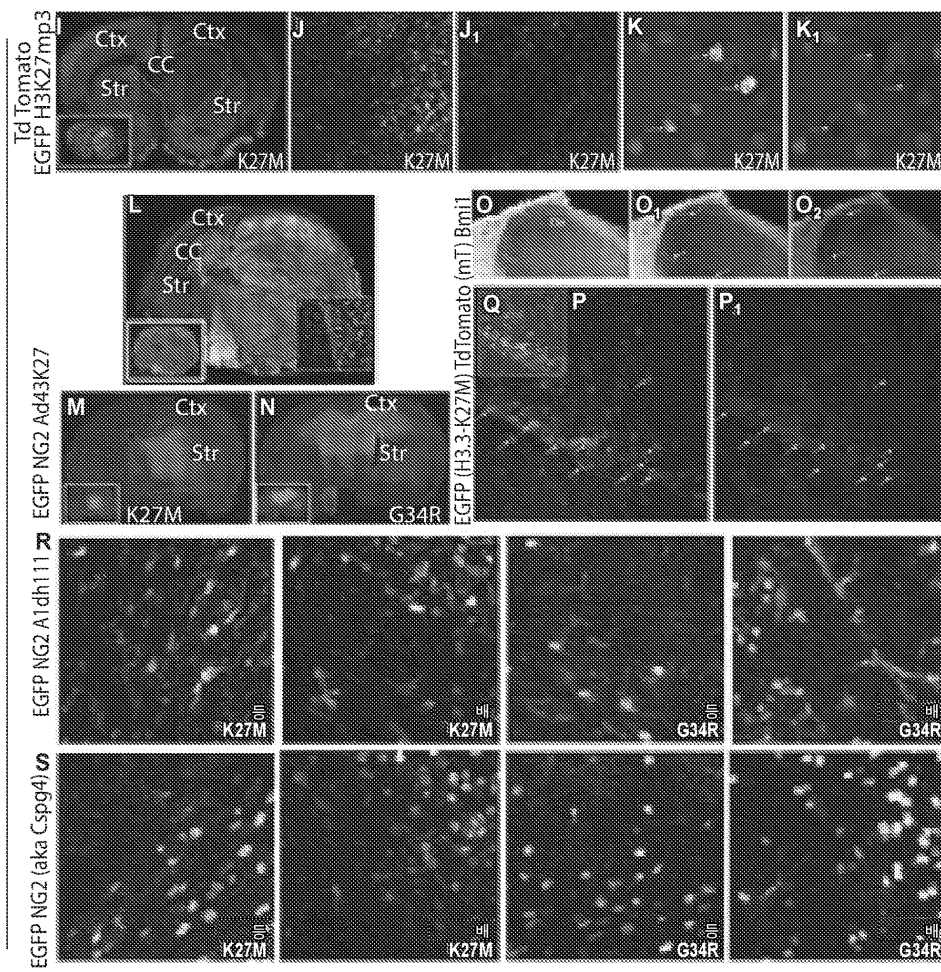




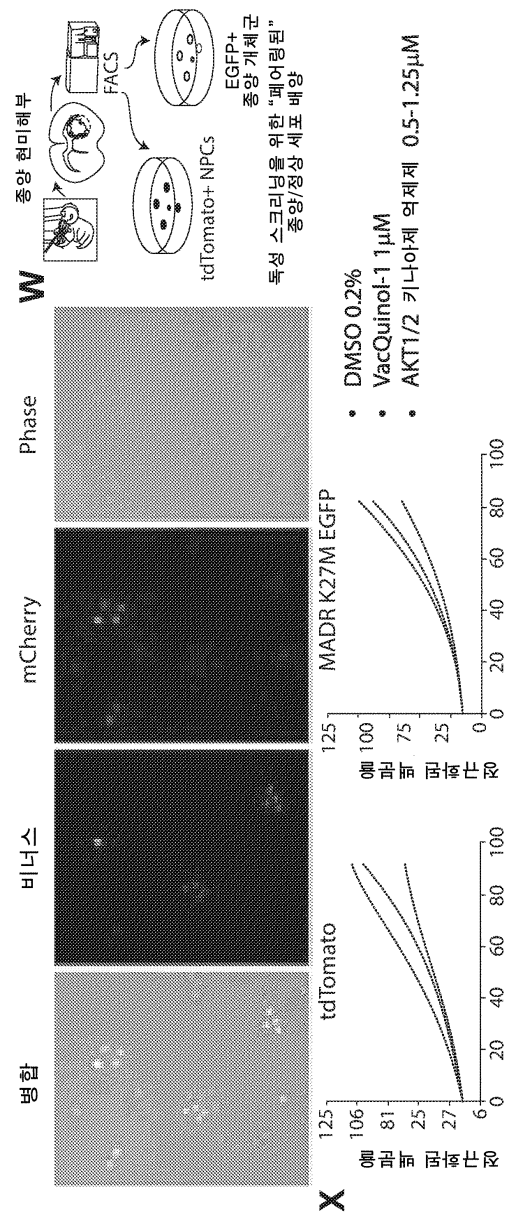
도면 12a



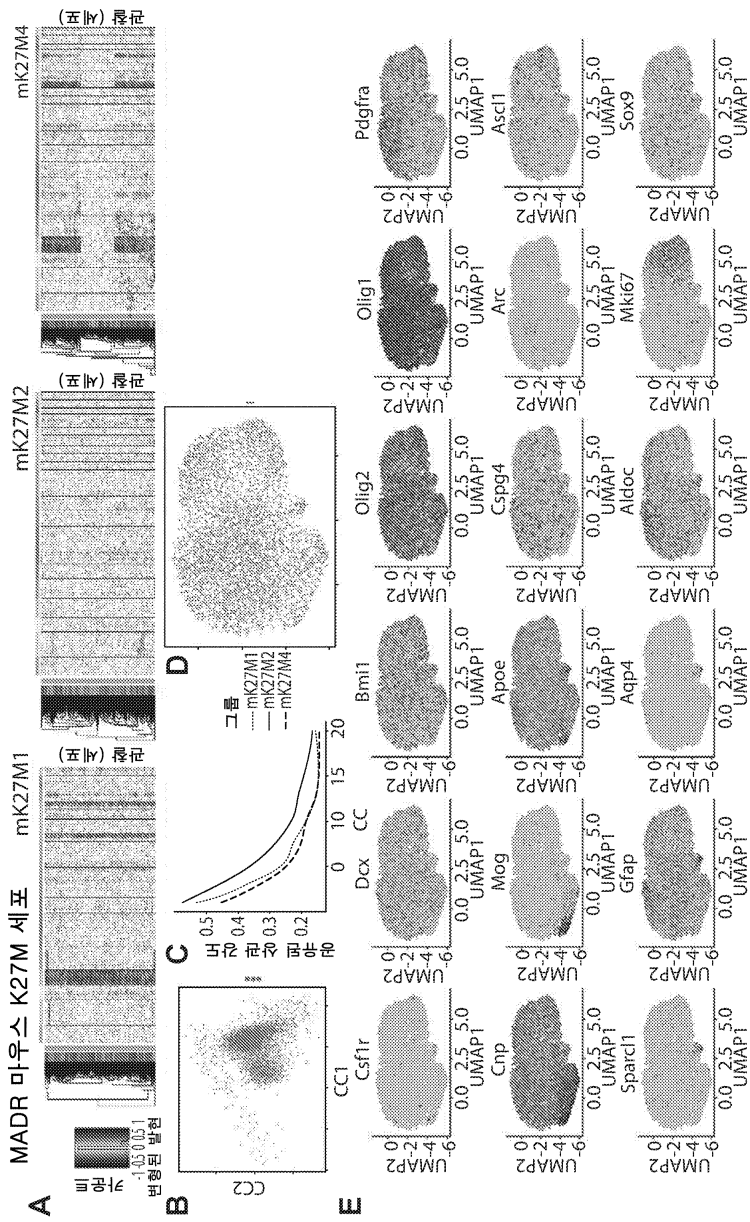
도면12b



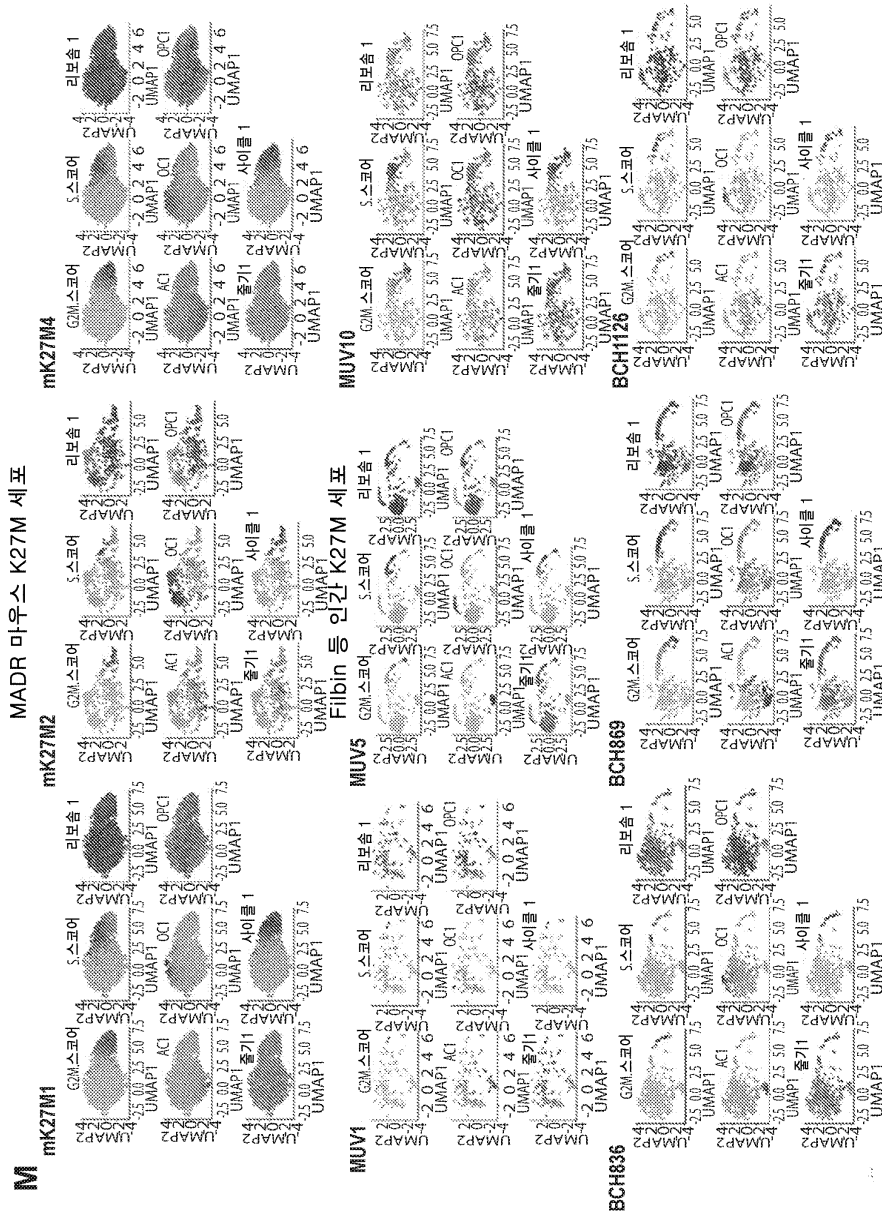
도면12d



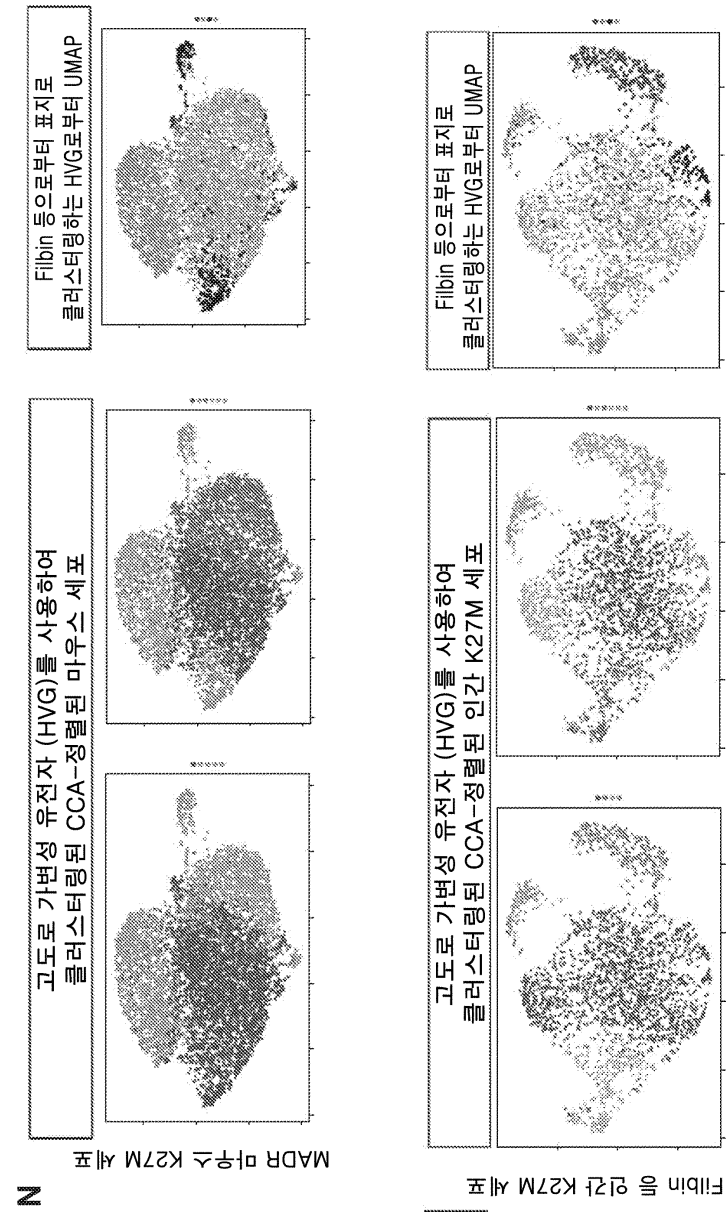
도면13a



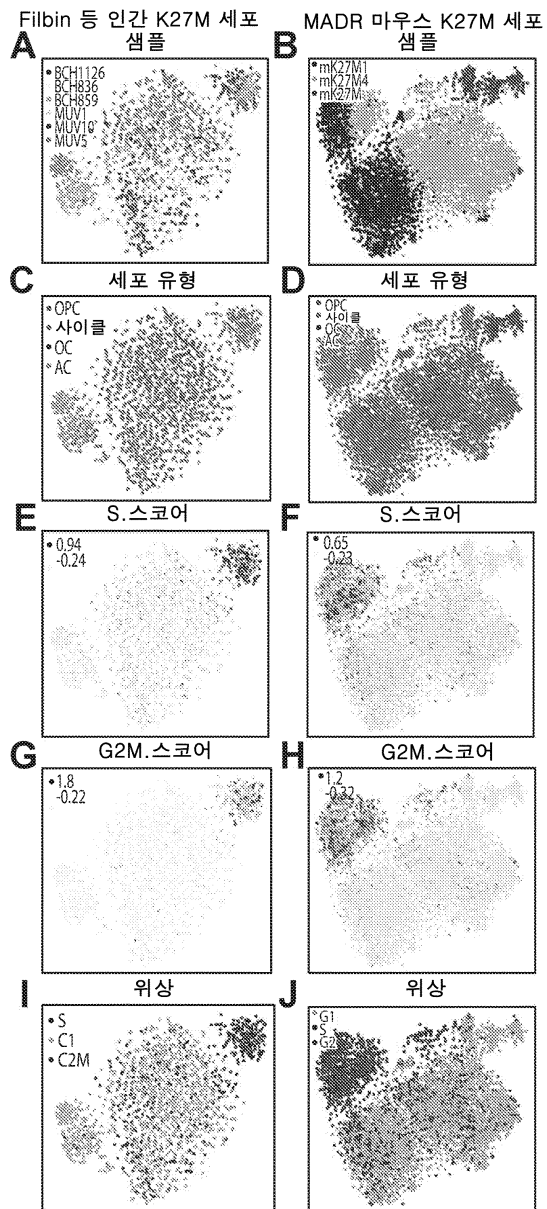
도면13c



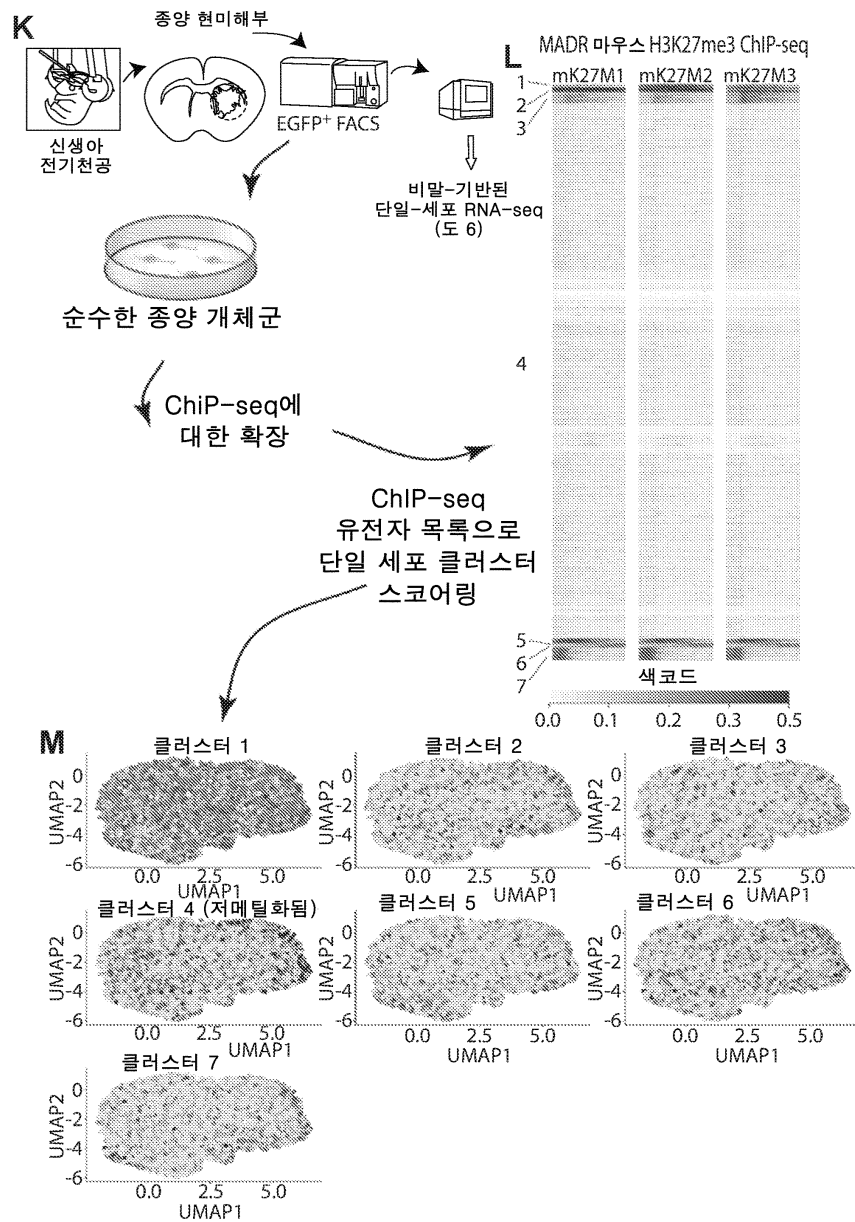
도면13d



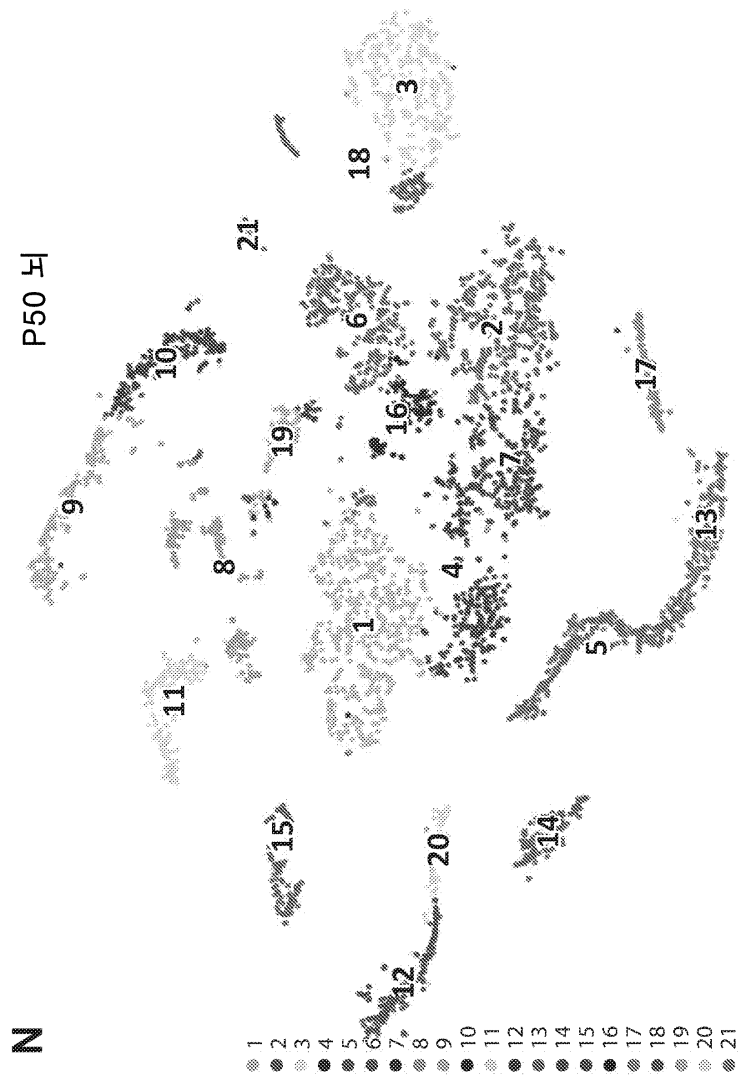
도면14a



도면14b

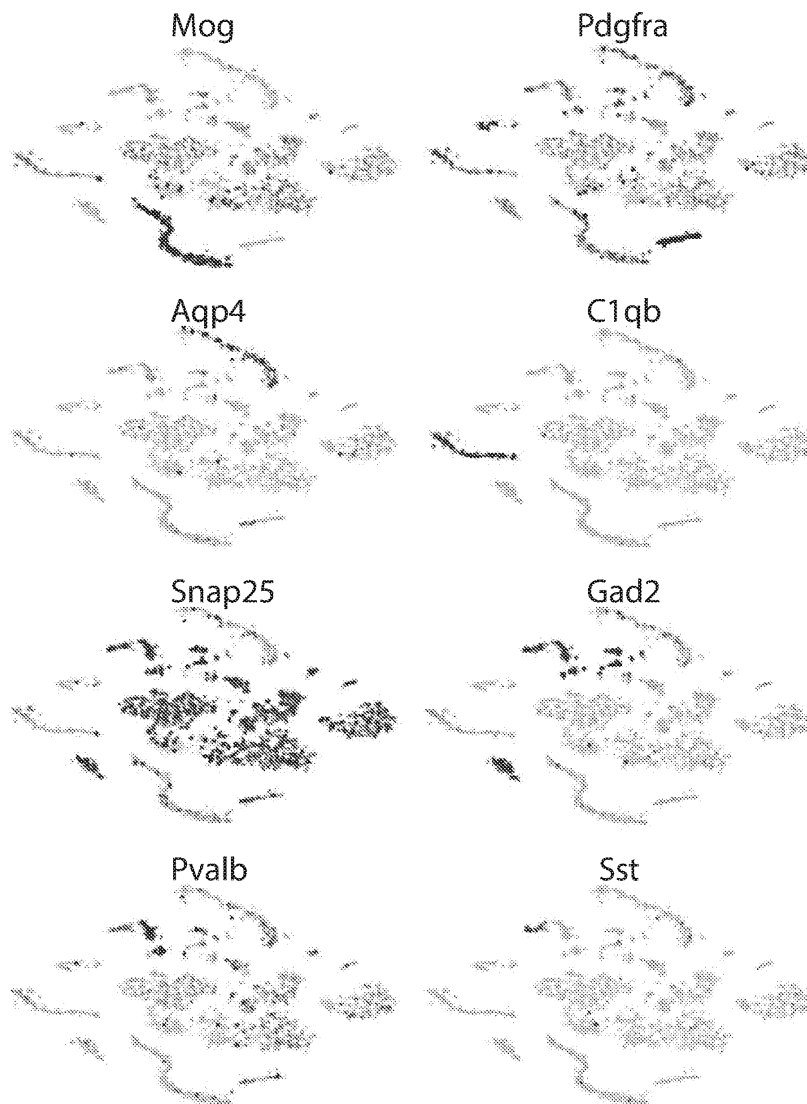


도면14c

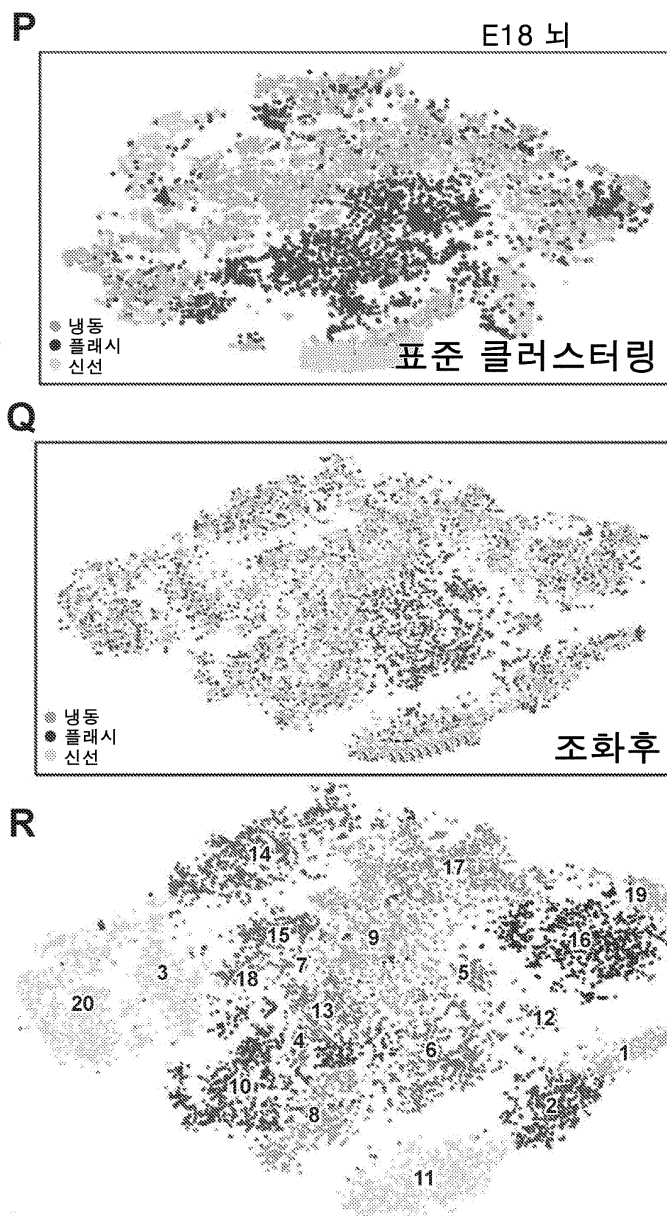


도면14d

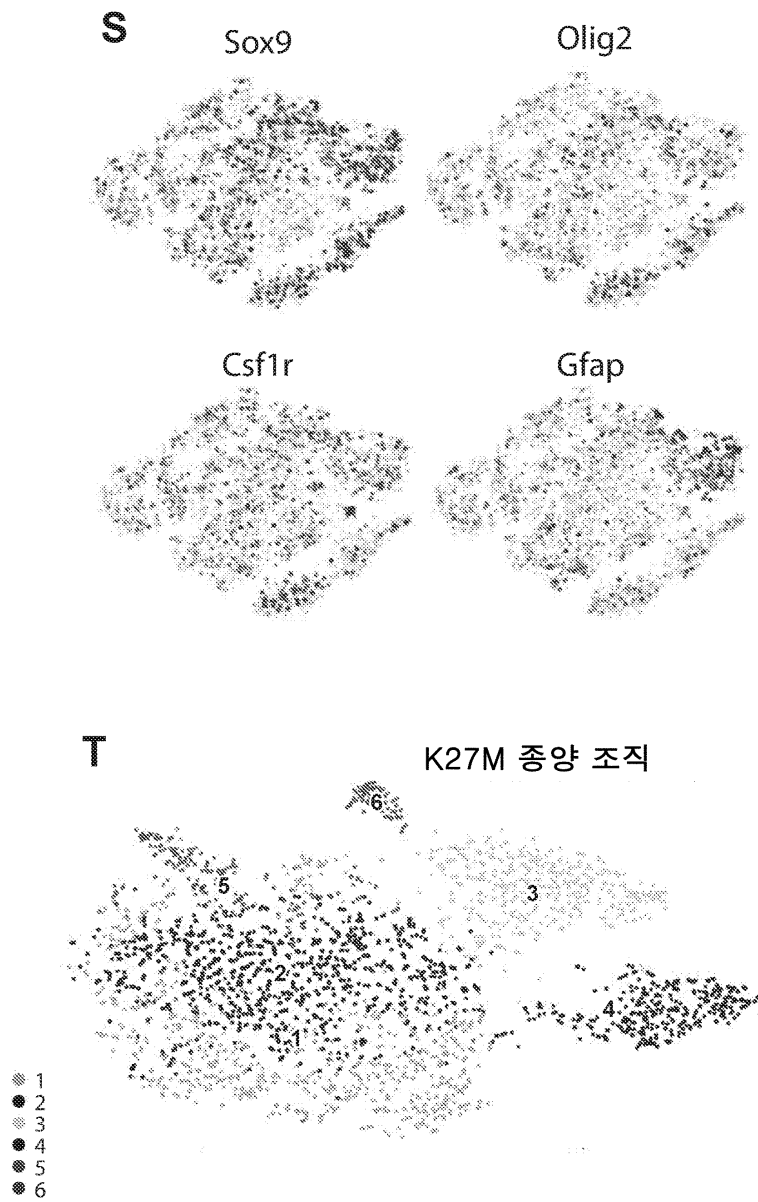
O



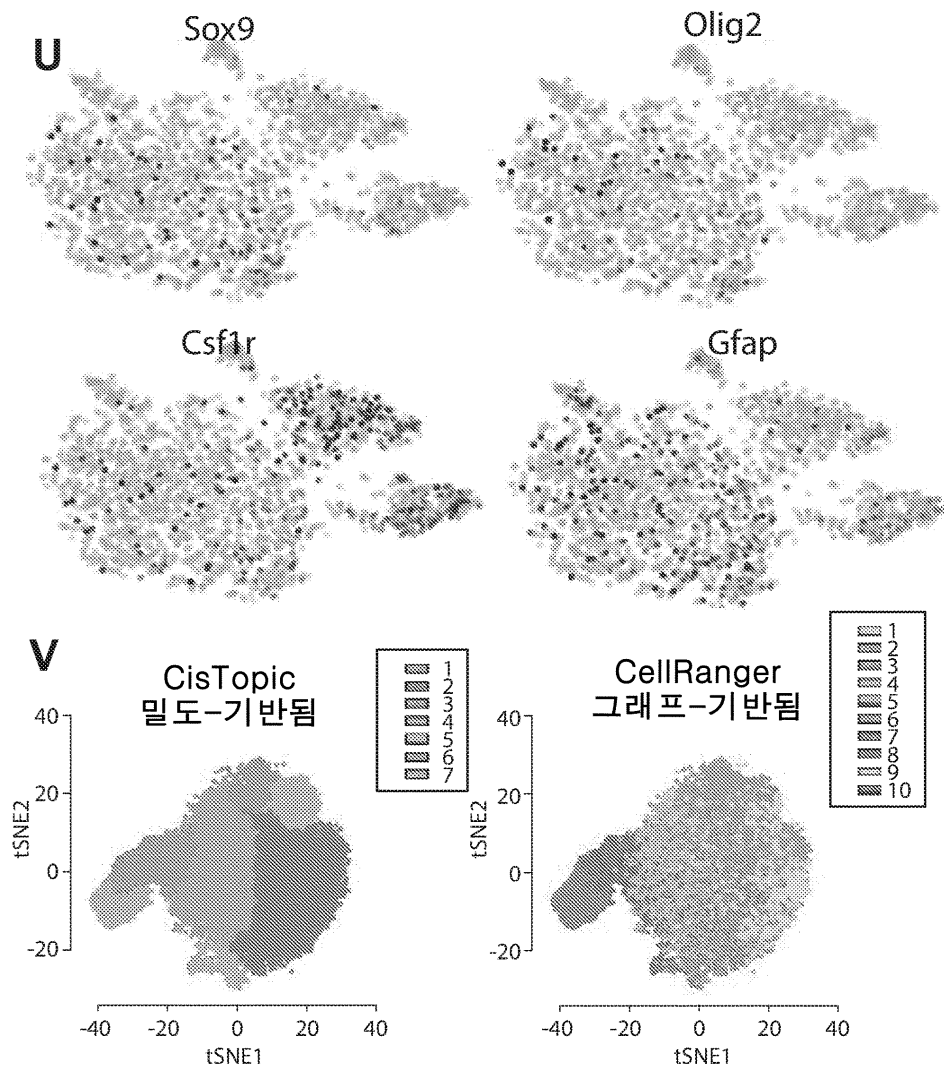
도면14e



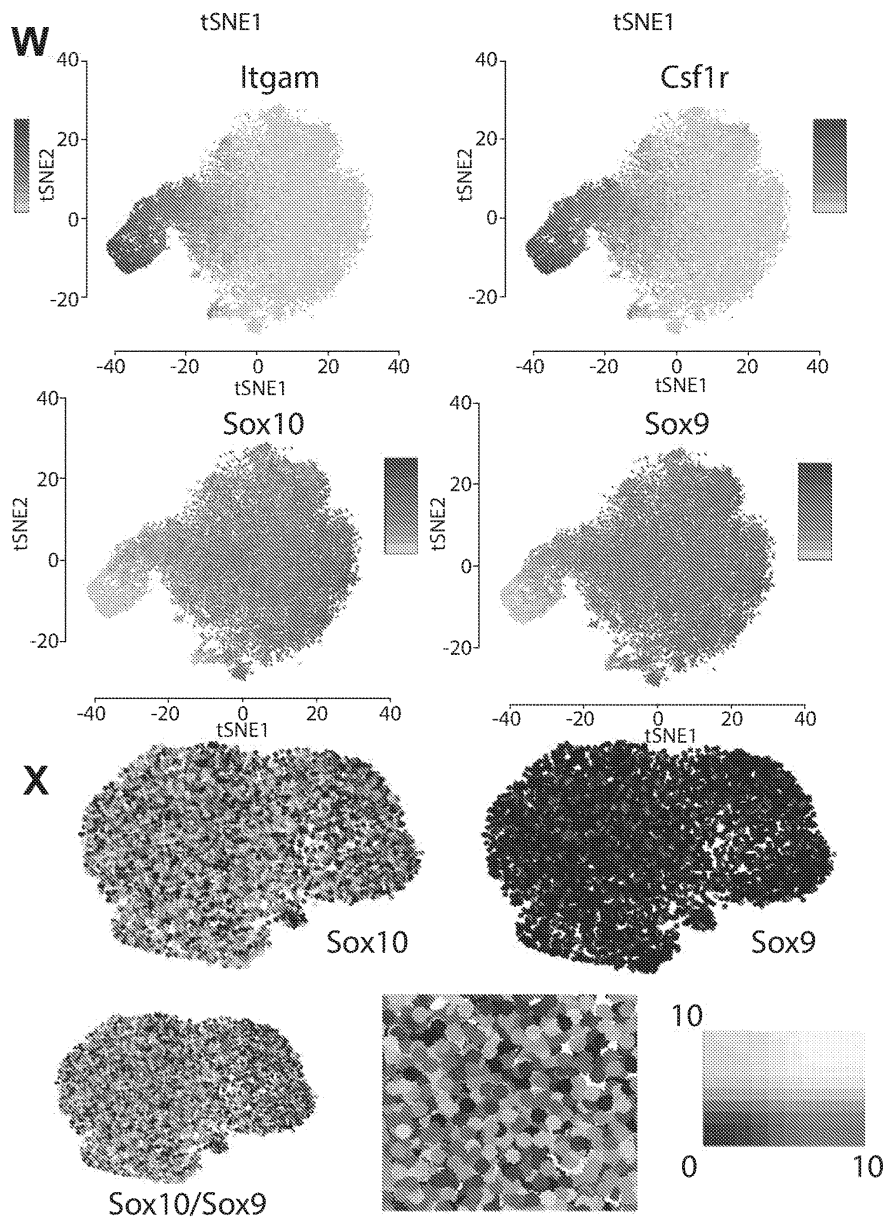
도면14f



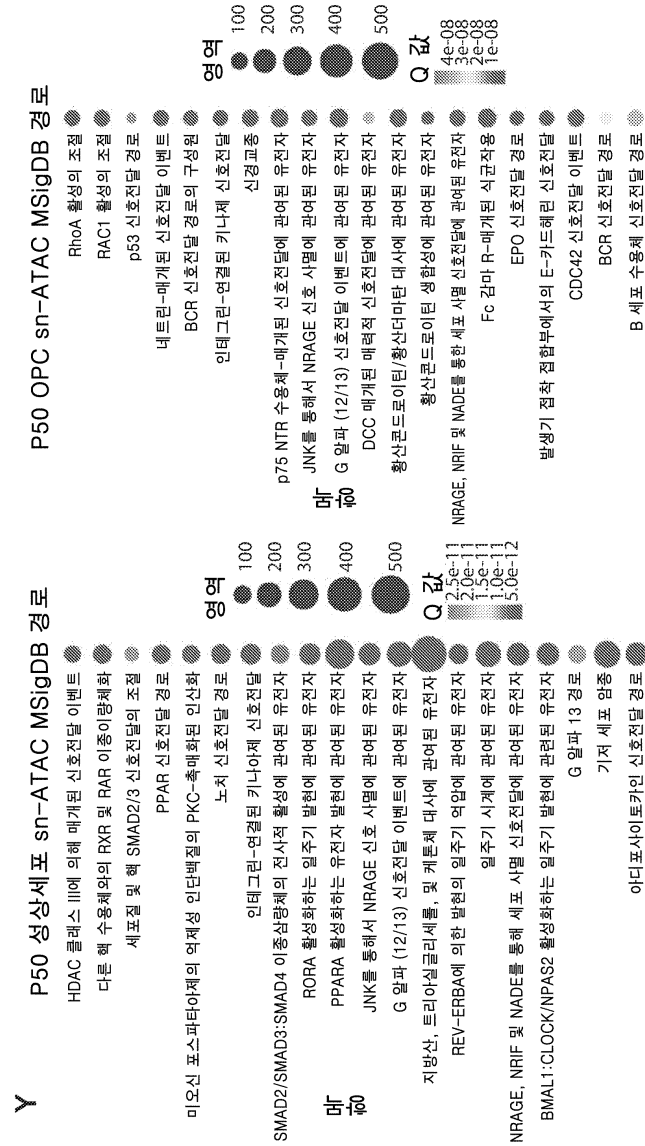
도면14g



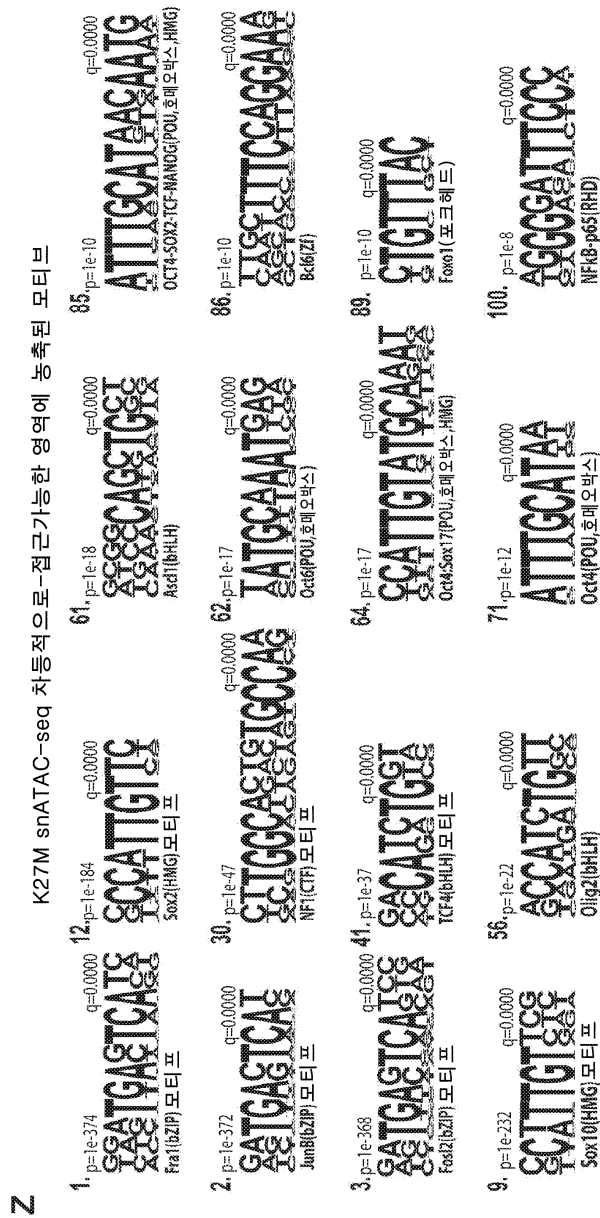
도면14h



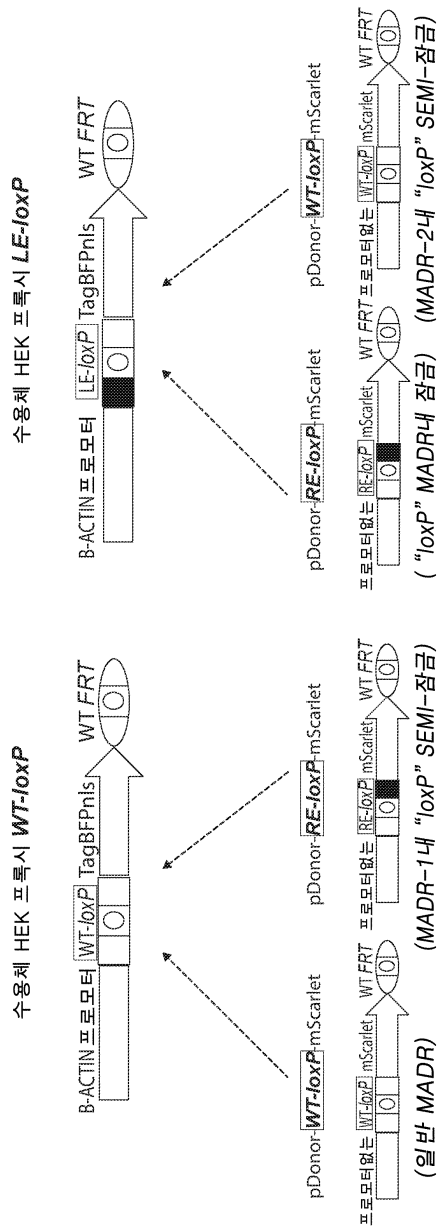
도면14i



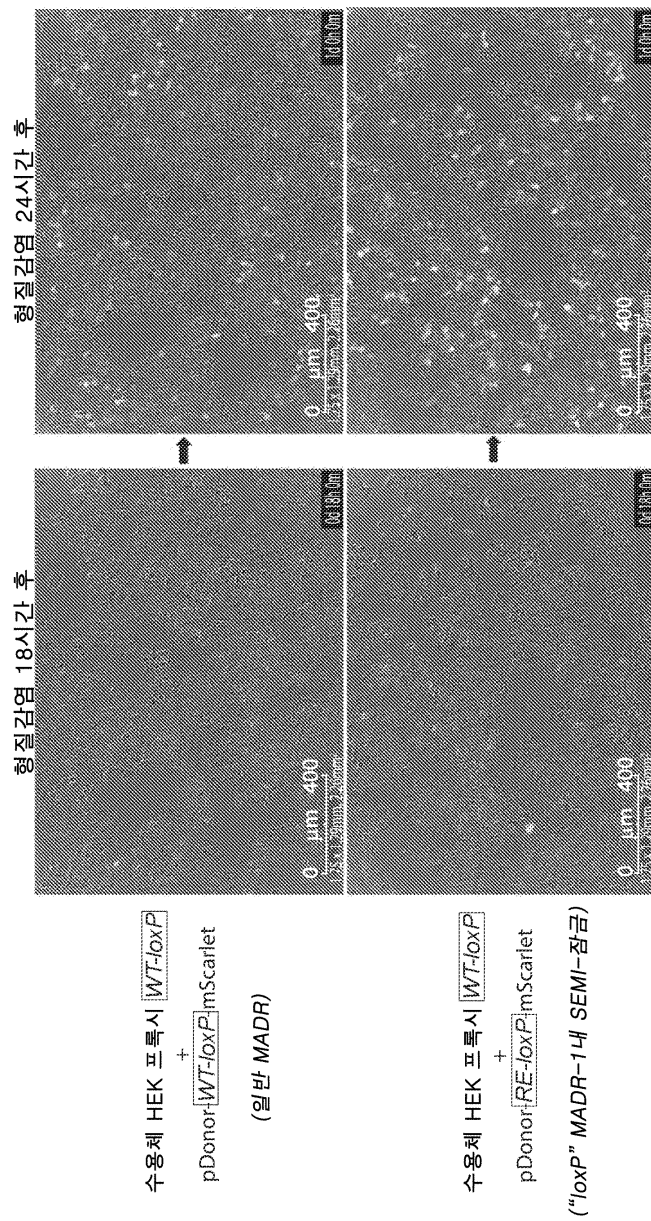
도면14j



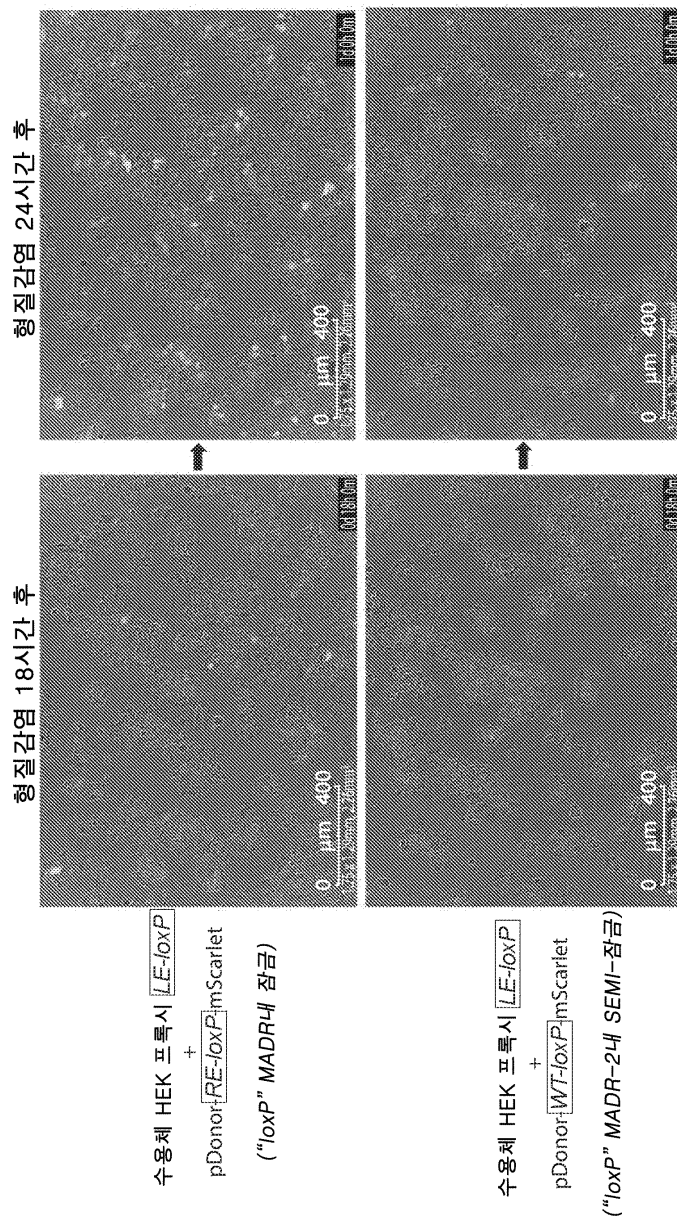
도면15



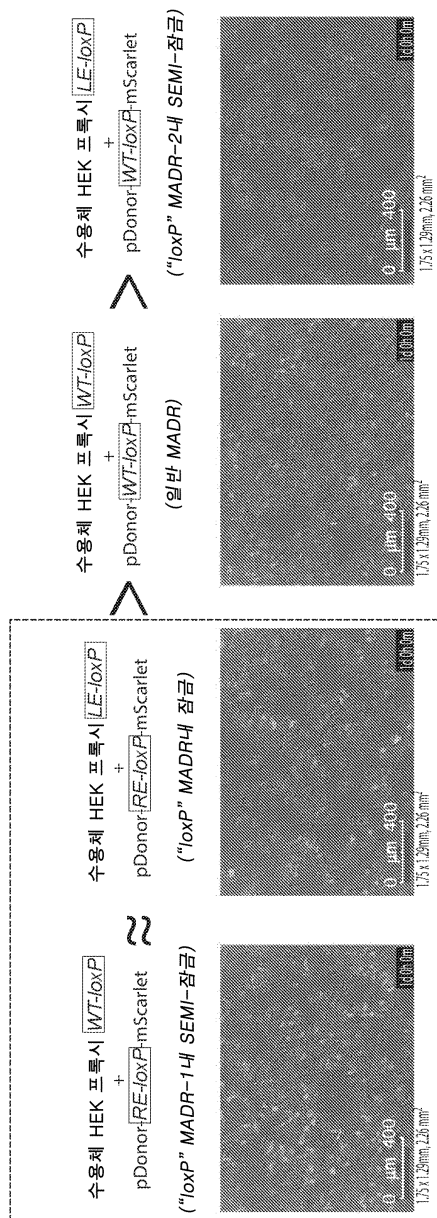
도면16



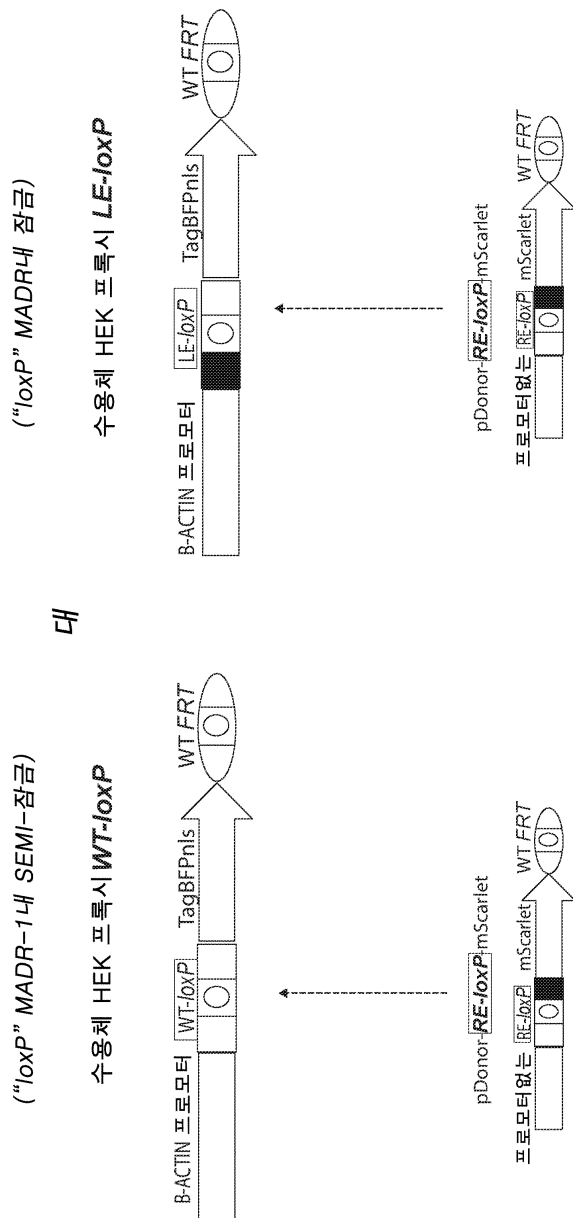
도면17



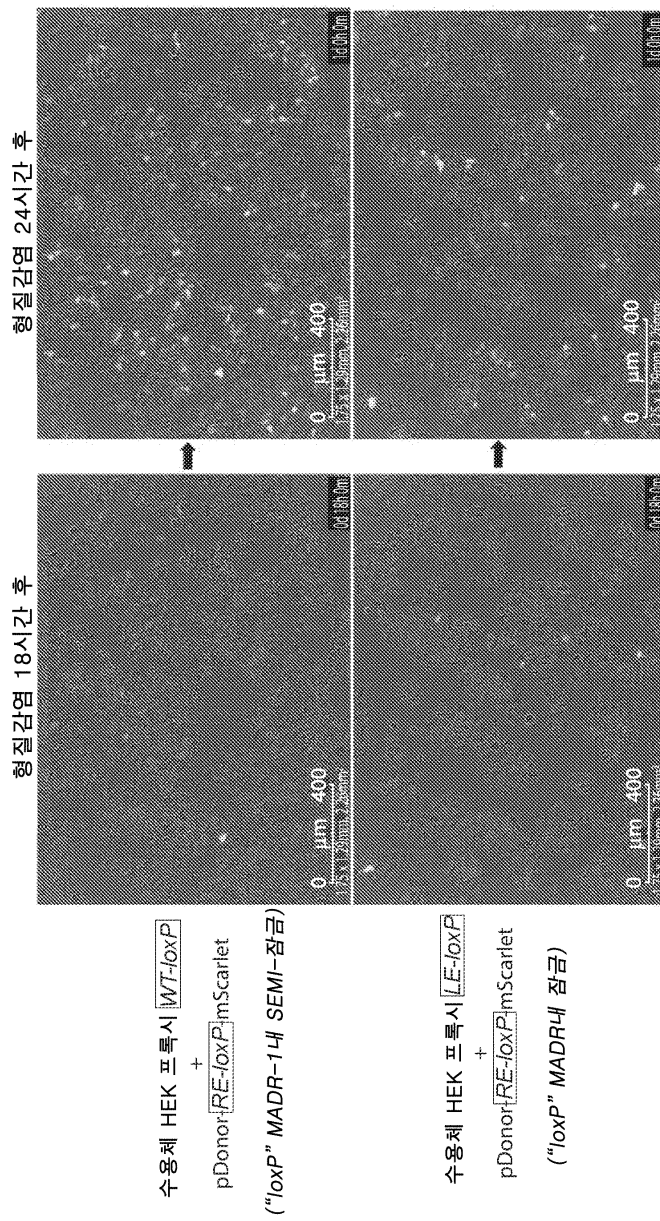
도면18



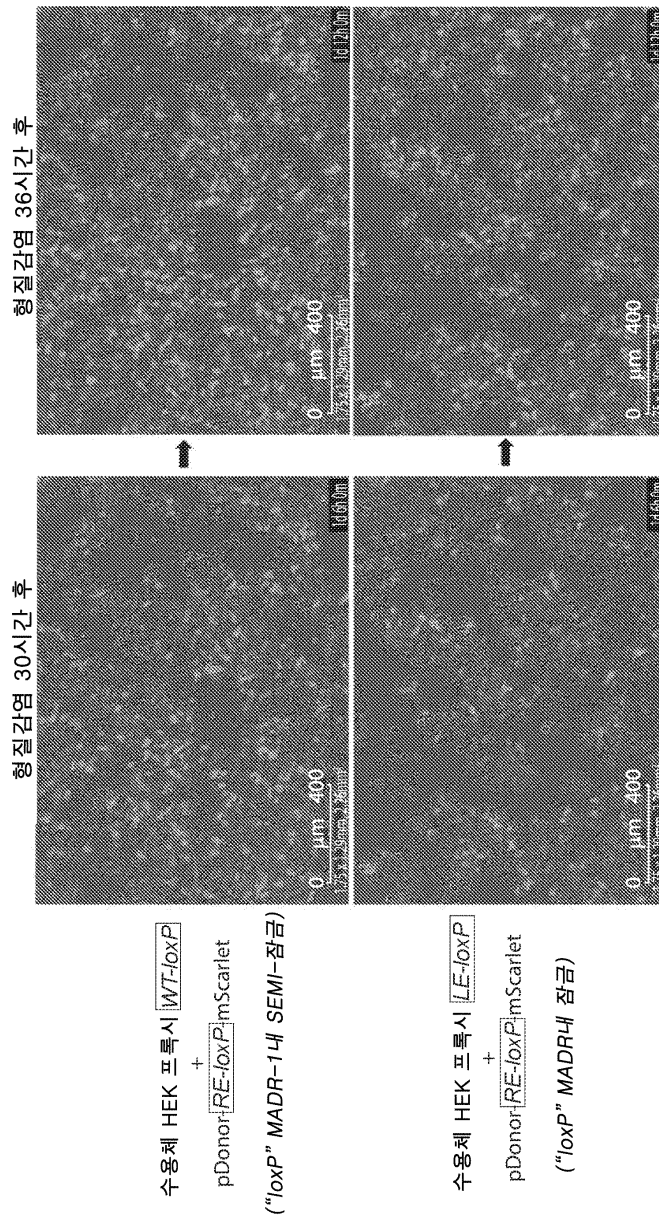
도면19



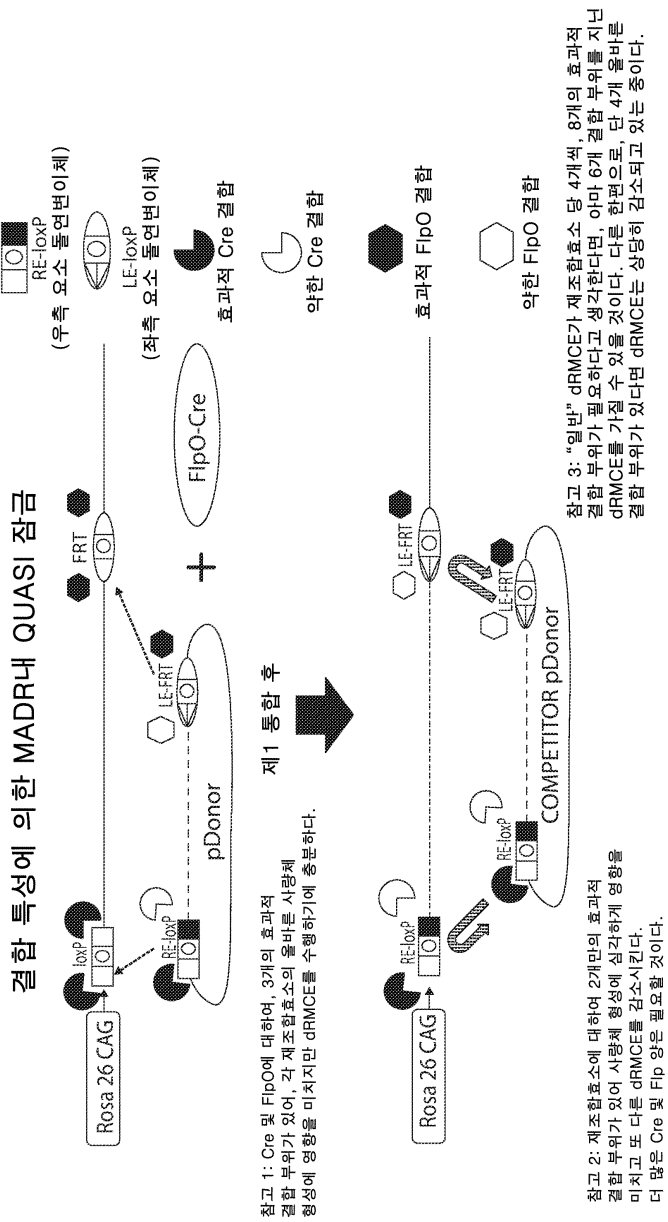
도면20a



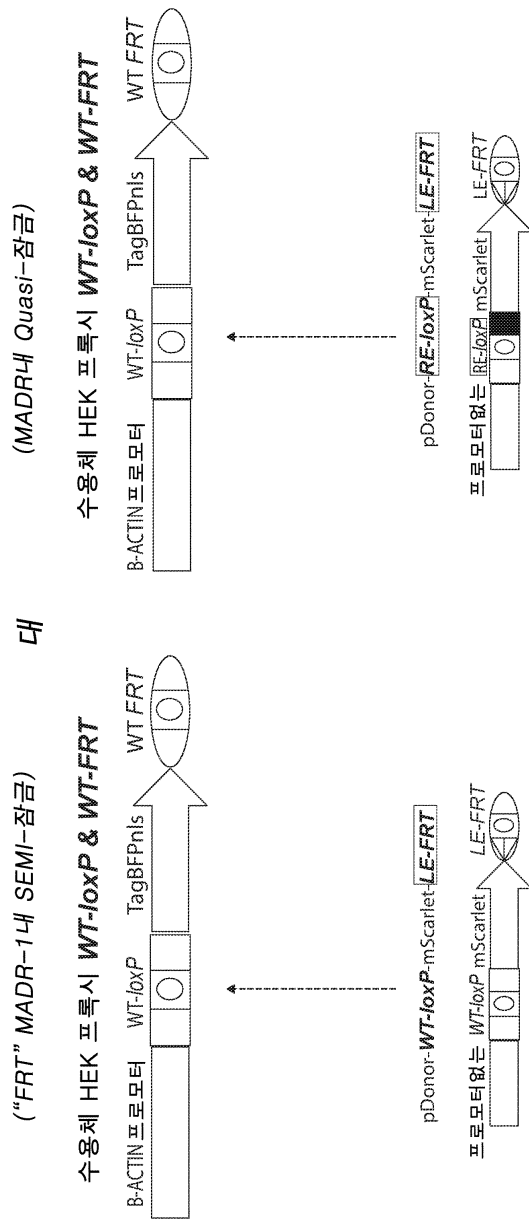
도면20b



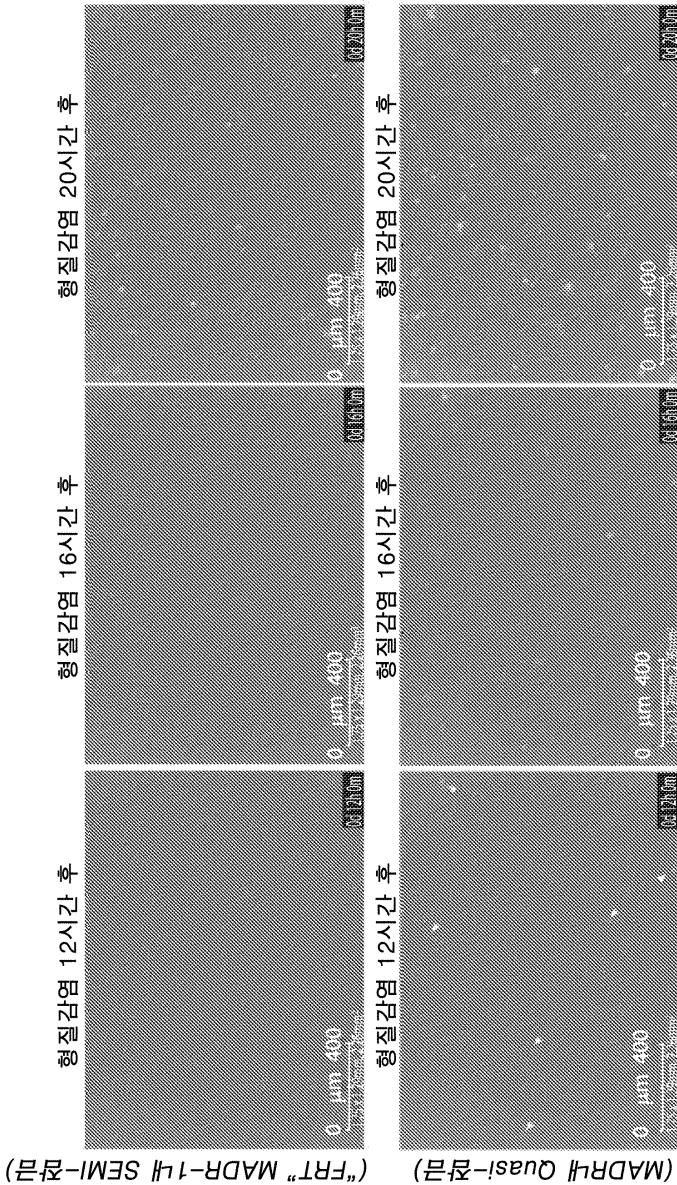
도면21



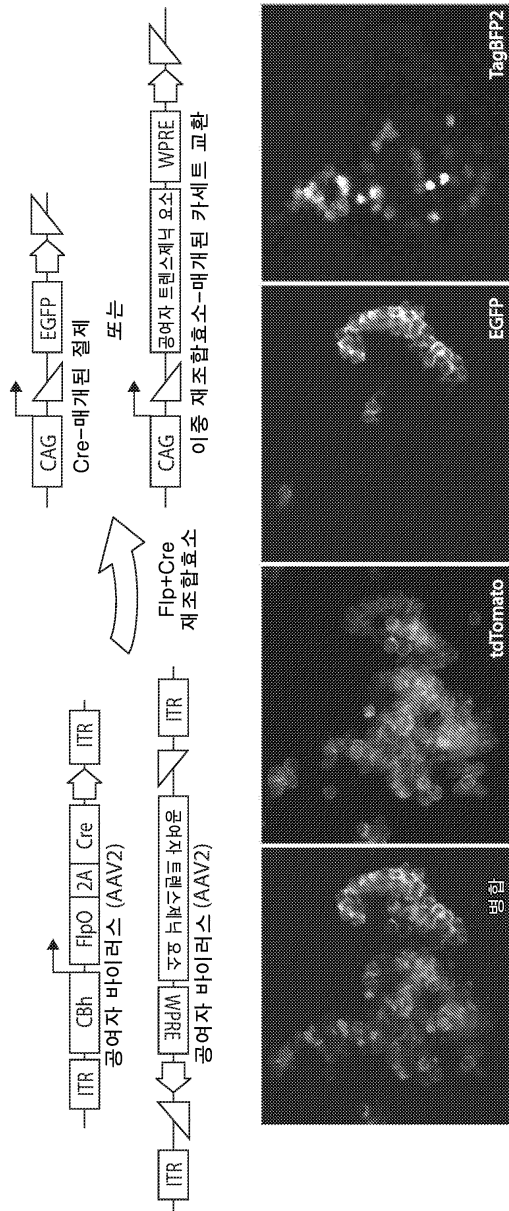
도면22



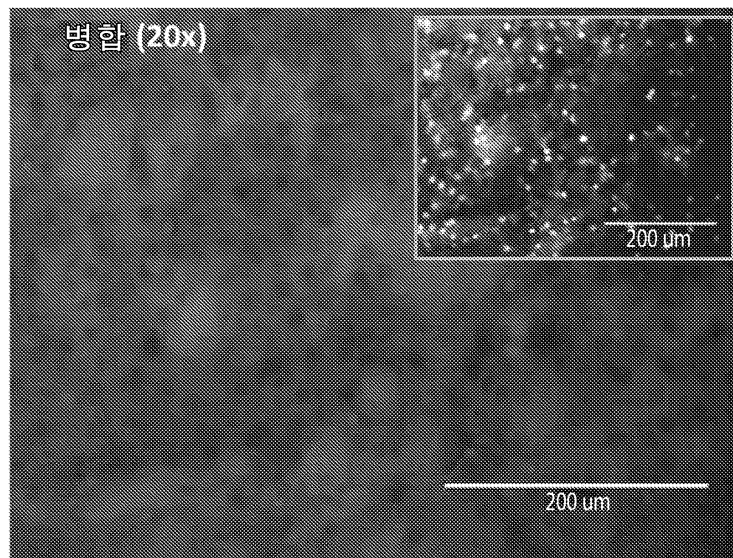
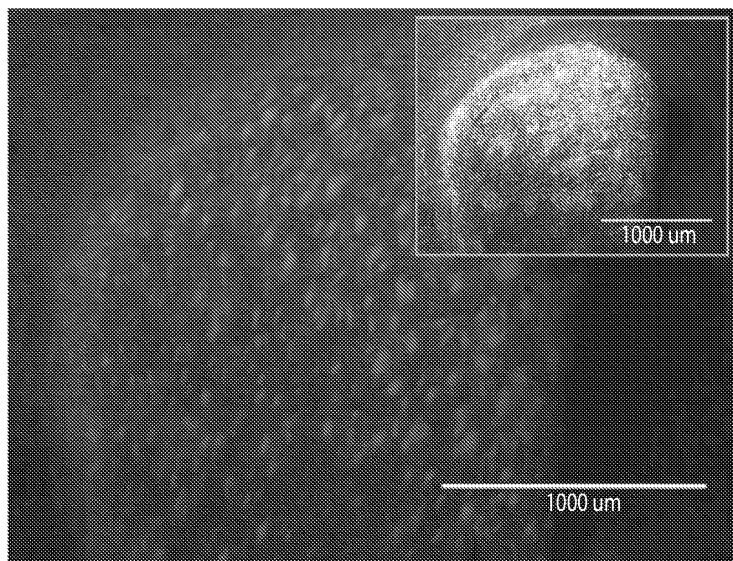
도면23



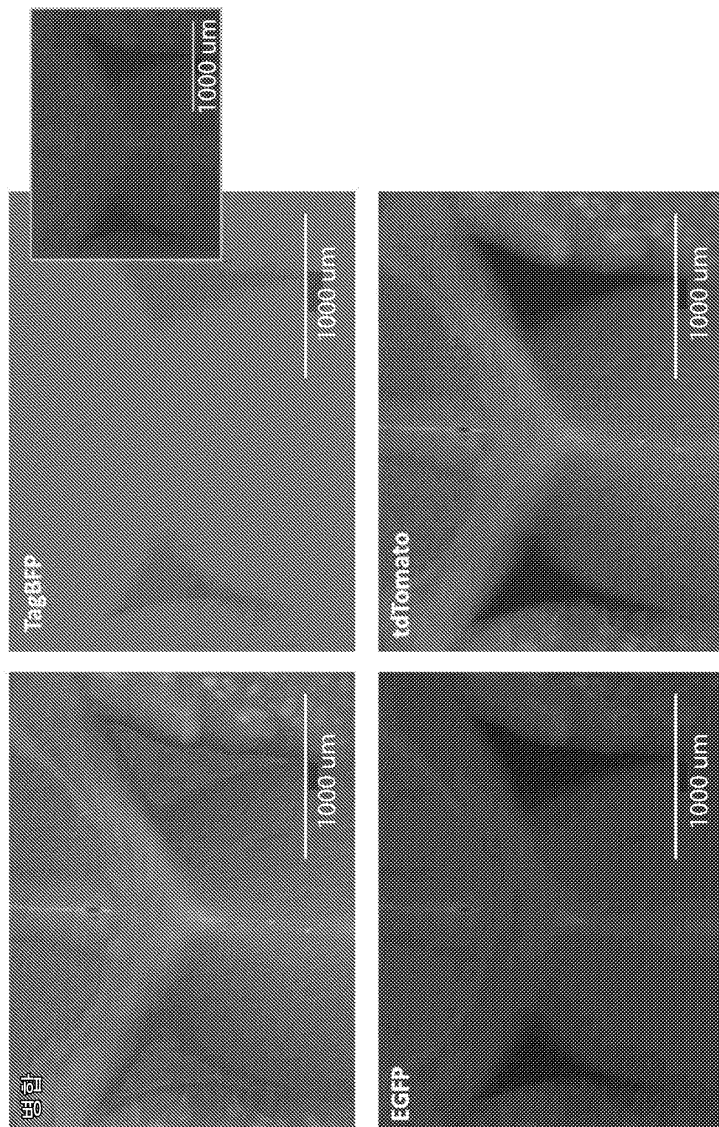
도면24



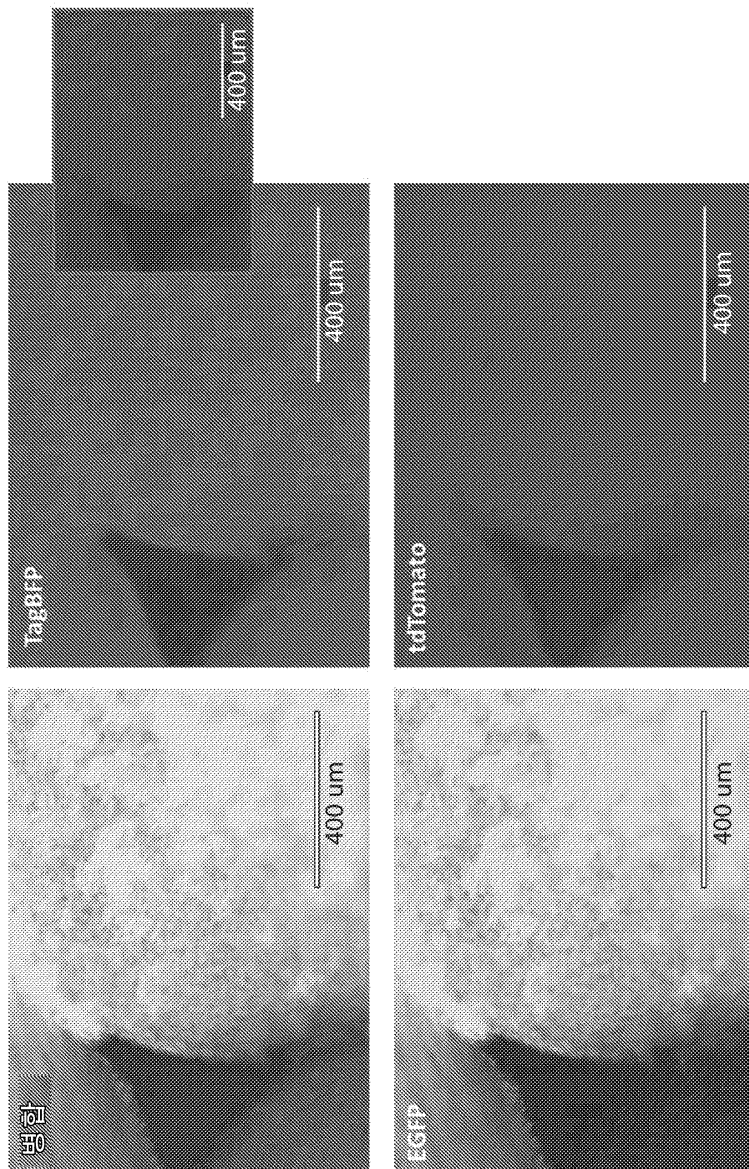
도면25



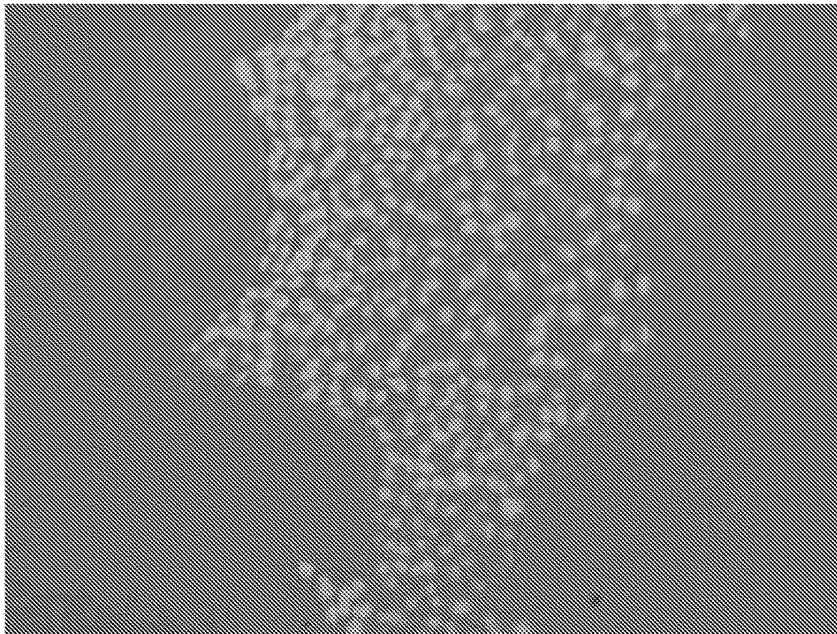
도면26



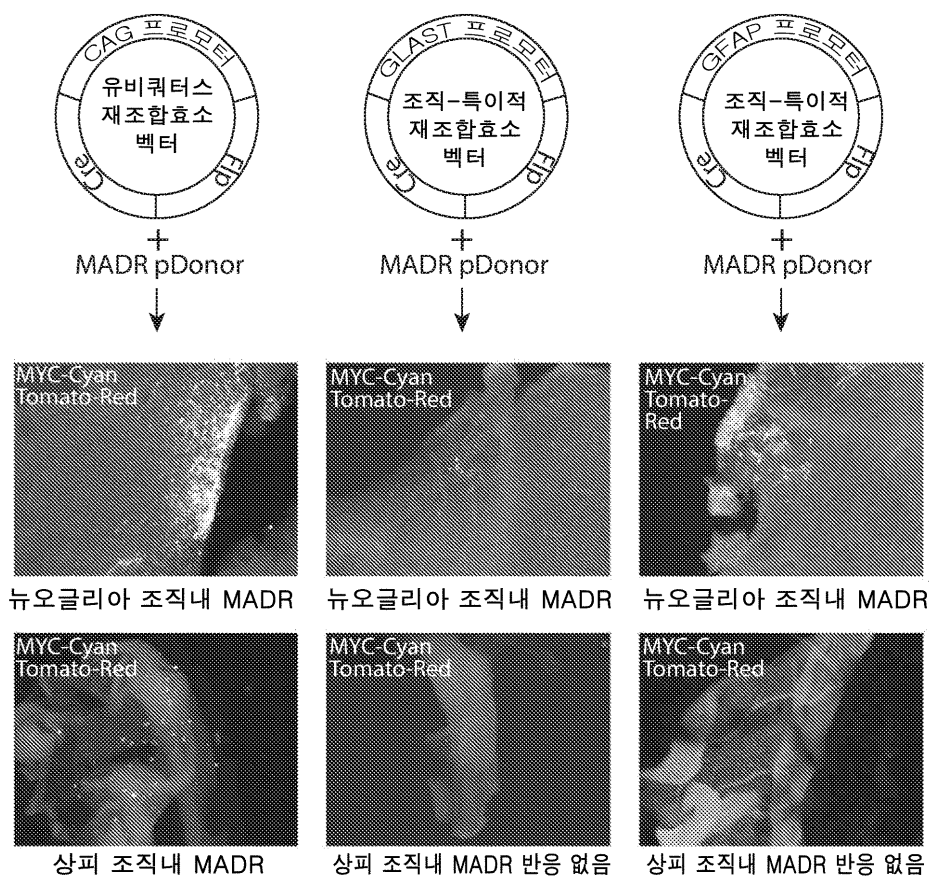
도면27



도면28



도면29



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER

BREUNIG, Joshua

DANIELPOUR, Moise

KIM, Gi Bum

AYALA-SARMIENTO, Alberto

YANG, Amy

<120> SYSTEMS AND METHODS FOR IN VIVO DUAL RECOMBINASE-MEDIATED
CASSETTE EXCHANGE (dRMCE) AND DISEASE MODELS THEREOF

<130> 065472-000508W010

<150> 62/862,576

<151> 2019-06-17

<160> 41

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 636

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 1

atgaagttat gggatgtcgt ggctgtctgc ctggtgctgc tccacaccgc gtccgccttc	60
ccgctgcccc cggtaagag gcctcccag gcgcccgcg aagaccgctc cctcgccgc	120
cgccgcgcgc cttcgcgt gagcagtac tcaaatatgc cagaggatta tctgatcag	180
ttcgaatgat tcatggattt tattcaagcc accattaaaa gactgaaaag gtcaccagat	240
aaacaaatgg cagtgtctcc tagaagagag cggaatcggc aggtctgcagc tgccaacca	300
gagaattcca gaggaagg tggagagc cagaggggca aaaaccgggg ttgtgtctta	360
actgcaatac atttaaatgt cactgacttg ggtctgggct atgaaaccaa ggaggaactg	420

atttttaggt actgcagcgg ctcttgcat gcagctgaga caacgtacga caaatattg	480
aaaaacttat ccagaaatag aaggctggtg agtgacaaag tagggcaggc atgttcaga	540
cccatgcct ttgatgatga cctgtcgttt ttgatgata acctggttta ccatattcta	600
agaaagcatt ccgctaaaag gtgtggatgt atctga	636

<210> 2

<211> 211

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 2

Met Lys Leu Trp Asp Val Val Ala Val Cys Leu Val Leu Leu His Thr
1 5 10 15

Ala Ser Ala Phe Pro Leu Pro Ala Gly Lys Arg Pro Pro Glu Ala Pro
20 25 30

Ala Glu Asp Arg Ser Leu Gly Arg Arg Arg Ala Pro Phe Ala Leu Ser
35 40 45

Ser Asp Ser Asn Met Pro Glu Asp Tyr Pro Asp Gln Phe Asp Asp Val
50 55 60

Met Asp Phe Ile Gln Ala Thr Ile Lys Arg Leu Lys Arg Ser Pro Asp
65 70 75 80

Lys Gln Met Ala Val Leu Pro Arg Arg Glu Arg Asn Arg Gln Ala Ala
85 90 95

Ala Ala Asn Pro Glu Asn Ser Arg Gly Lys Gly Arg Arg Gly Gln Arg
100 105 110

Gly Lys Asn Arg Gly Cys Val Leu Thr Ala Ile His Leu Asn Val Thr
115 120 125

Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu Leu Ile Phe Arg Tyr
130 135 140

Cys Ser Gly Ser Cys Asp Ala Ala Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu
145 150 155 160

Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg Arg Leu Val Ser Asp Lys Val Gly Gln
165 170 175

Ala Cys Cys Arg Pro Ile Ala Phe Asp Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp
180 185 190

Asp Asn Leu Val Tyr His Ile Leu Arg Lys His Ser Ala Lys Arg Cys
195 200 205

Gly Cys Ile
210

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 3
 aactccctcg atgtggcggc tcactctgcc 30
 <210> 4
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 4
 aactccctcg aatgtggcgg ctcactctgcc c 31
 <210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <400> 5
 tctcctggct cagagggagc tcgaggctg 29
 <210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic construct
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(11)
 <223> n is a, c, t, g or can be none
 <400> 6
 tctcnnnnnn nagagggagc tcgaggctg 29
 <210> 7
 <211> 28
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 7

ctggttcctc agtcacacat gccagagg

28

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 8

cctctgagcc aggagacatt ttcagg

26

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 9

ttccctcagc cattgcctgt gtgtgg

26

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 10

Leu Val Pro Gln Ser His Met Pro Glu Val

1

5

10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid, or none

<400> 11

Leu Val Pro Xaa Ser His Met Pro Glu Val

1 5 10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 12

Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Gly

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid, or none

<400> 13

Pro Leu Ser Xaa Glu Thr Phe Ser Gly

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 14

Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly

1 5

<210> 15

<211> 9

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid, or none

<400> 15

Phe Pro Xaa Pro Leu Pro Val Cys Gly

1 5

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 16

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 34

<210> 17

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 17

ataacttcgt ataagtatg ctatacgaag ttat 34

<210> 18

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 18

gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttc 34

<210> 19

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 19

gaagttccta tactttctag agaataggaa cttcggaata ggaacttc 48

<210> 20

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 20

ggatgagtca tc 12

<210> 21

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 21

gatgactcat 10

<210> 22

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 22

gatgagtcac cc 12

<210> 23

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 23

cctttgttcg 10

<210> 24

<211> 10

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 24	
cccatgtgtc	10
<210> 25	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 25	
cttggcactg tgccaa	16
<210> 26	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 26	
gacatctggt	10
<210> 27	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 27	
accatctgtt	10
<210> 28	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 28	
gcggcagctg ct	12

<210> 29	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 29	
tatgcaaatg ag	12
<210> 30	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 30	
ccattgtatg caaat	15
<210> 31	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 31	
atttgcataa	10
<210> 32	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 32	
atttgcataa caatg	15
<210> 33	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 33	

ttgctttcca ggaaa	15
<210> 34	
<211> 8	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 34	
ctgtttac	8
<210> 35	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 35	
aggggatttc cc	12
<210> 36	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 36	
gcctcagcca ttgcctgtgt g	21
<210> 37	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 37	
gcctcgagct ccctctgagc c	21
<210> 38	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> synthetic construct	
<400> 38	
gcagatgagc cgccacatcg a	21
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 39	
cctcagccat tgctgtgtg	20
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 40	
ctgagccagg agacatttc	20
<210> 41	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> synthetic construct	
<400> 41	
tcctcagtca cacatgccag	20