



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0051223
(43) 공개일자 2023년04월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) C12N 9/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 48/0058 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7008228
- (22) 출원일자(국제) 2021년08월11일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년03월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/IL2021/050982
- (87) 국제공개번호 WO 2022/034591
국제공개일자 2022년02월17일
- (30) 우선권주장
63/064,181 2020년08월11일 미국(US)
63/167,277 2021년03월29일 미국(US)

- (71) 출원인
이슈 리서치 디벨롭먼트 컴퍼니 오브 더 히브루
유니버시티 오브 예루살렘, 엘티디.
이스라엘, 9139002 예루살렘, 피.오.박스 39135
- (72) 발명자
아케일란, 라미
이스라엘 9154901 예루살렘 피오비 54950 살라 에
이 던 스트리트
레푸디, 스리니바스
이스라엘 9670403 예루살렘 과테말라 스트리트
5/52
- (74) 대리인
양영준, 김영

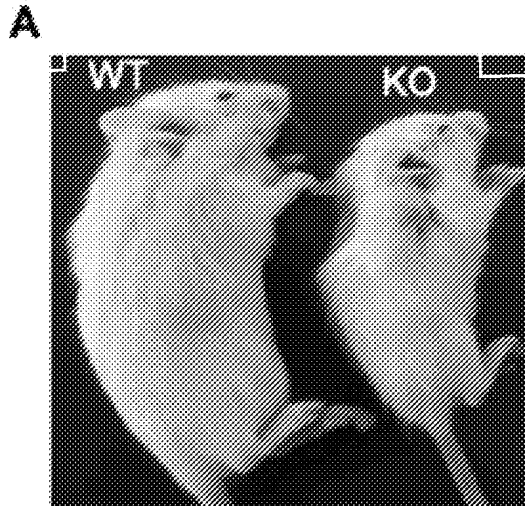
전체 청구항 수 : 총 48 항

(54) 발명의 명칭 **WVOX 연관 질병의 치료 방법**

(57) 요약

본 개시내용은 WW 도메인-함유 산화환원효소(WVOX)-연관 CNS 질병의 치료를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 다양한 구현양태에서, 본 발명은 대상체의 뇌에서 이중 WVOX 유전자를 발현시키는 것을 포함하고, 다양한 구현양태에서 WOREE 증후군 및 SCAR12와 같은 상태를 치료하거나 개선하기 위해 뉴런에서 이중 WVOX 유전자를 발현시키는 것을 포함한다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2830/008 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

WW 도메인-함유 산화환원효소(WWOX)-연관 CNS 질병을 치료하는 방법으로서, 뇌에서 WWOX의 발현을 초래하는 조절 요소의 제어 하에, 이러한 치료를 필요로 하는 환자의 뇌에 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 WWOX-연관 CNS 질병이 WWOX-관련 간질성 뇌병증(WOREE) 증후군; 척수소뇌 운동실조증, 상염색체 열성, 12(SCAR12), 알츠하이머병, 웨스트 증후군, 자폐증, 다발성 경화증 및 성 발달 장애(DSD)로부터 선택되는, 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 WWOX-연관 CNS 질병이 WOREE 증후군 또는 SCAR12인, 방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자가 WWOX의 복합 이형접합 돌연변이를 갖는, 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 요소가 뉴런에서 WWOX 유전자의 발현을 지시하는 프로모터인, 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 프로모터가 범용 프로모터인, 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 프로모터가 CMV 프로모터, E2F1 프로모터, 및 U1snRNA 프로모터 또는 이의 유도체인, 방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 조절 요소가 뉴런에서 특이적으로 발현되는 프로모터인, 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 프로모터가 시냅신 I 프로모터, CamKII 프로모터, MeCP2 프로모터, NSE 프로모터 및 Hb9 프로모터 또는 이들의 유도체로부터 선택되는, 방법.

청구항 10

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 프로모터가 신경아교세포에서 발현되지 않거나 더 낮은 수준으로 발현되는, 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 프로모터가 희소돌기아교세포 및/또는 성상세포에서 발현되지 않거나 더 낮은 수준으로 발현되는, 방법.

청구항 12

제 8항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 요소가 시냅신 I 프로모터 또는 이의 유도체인, 방법.

청구항 13

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 요소가 희소돌기아교세포에서 WWOX 유전자의 발현을 지시하는 프로모터인, 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 프로모터는 MBP 프로모터, PLP1 프로모터, 및 CNP 프로모터 또는 이들의 유도체로부터 선택되는, 방법.

청구항 15

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 요소가 정상세포에서 WWOX 유전자의 발현을 지시하는 프로모터인, 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 프로모터가 GFAP 프로모터 또는 S100b 프로모터, 또는 이들의 유도체인, 방법.

청구항 17

제 5항 내지 제 16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 프로모터가 하나 이상의 인헨서 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 18

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 WWOX 유전자가 mRNA 안정성을 향상시키는 비번역 서열을 포함하는, 방법.

청구항 19

제 1항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 WWOX 야생형 유전자가 하나 이상의 검출가능한 표지와 함께 전달되는, 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 검출가능한 표지가 코딩된 형광 단백질인, 방법.

청구항 21

제 1항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체가 중합체 나노입자, 무기 나노입자, 리포나노입자 또는 엑소좀을 사용하여 전달되는, 방법.

청구항 22

제 1항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체가 Cas 효소 또는 Cas 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 gRNA 또는 gRNA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 함께 전달되어, WWOX 야생형 유전자 또는 이의 일부의 삽입을 지시하는, 방법.

청구항 23

제 1항 내지 제 22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체가 바이러스 벡터에 의해 전달되는, 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 아테노-연관 바이러스(AAV) 전달 시스템인, 방법.

청구항 25

제 24항에 있어서, 상기 AAV 전달 시스템이 AAV9인, 방법.

청구항 26

제 1항 내지 제 25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 WWOX 야생형 유전자가 서열번호: 2의 아미노산 서열을 코딩하는, 방법.

청구항 27

제 26항에 있어서, 상기 WWOX 야생형 유전자가 하나 이상의 인트론을 포함하는, 방법.

청구항 28

제 26항에 있어서, 상기 WWOX 야생형 유전자가 cDNA인, 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서, 상기 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체가 조절 요소의 제어 하에 실질적으로 서열번호: 1 또는 3에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 30

제 1항 내지 제 29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 실질(parenchyma)로의 직접 주사, 뇌실내를 통한 뇌척수액으로의 주사, 및 경막내(수조 또는 요추) 경로로부터 선택되는 경로에 의한 것인, 방법.

청구항 31

제 1항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체가 소아 또는 신생아 환자인, 방법.

청구항 32

제 1항 내지 제 31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체가 성인 환자인, 방법.

청구항 33

제 31항 또는 제 32항에 있어서, 상기 환자가 성장 장애, 간질 에피소드, 인지 기능 장애, 사회적 기능 장애, 생식 능력 장애, 운동실조증, 망막병증, 정신 지체 및 소두증으로부터 선택되는 하나 이상의 증상을 나타내는, 방법.

청구항 34

제 1항 내지 제 33항 중 어느 한 항에 있어서, 투여 에피소드가 3회 이하인, 방법.

청구항 35

제 34항에 있어서, 투여 에피소드가 2회 이하인, 방법.

청구항 36

제 34항에 있어서, 투여 에피소드가 1회인, 방법.

청구항 37

WOREE 증후군 또는 SCAR12를 치료하는 방법으로서, 시냅신-1 프로모터의 제어 하에 이러한 치료를 필요로 하는 환자의 뇌에 WWOX 야생형 유전자를 포함하는 AAV9 유전자 전달 시스템을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

제 37항에 있어서, 상기 AAV9 전달 시스템이 실질적으로 서열번호: 1 또는 서열번호: 3에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 39

뉴런-특이적 프로모터의 발현 제어 하에 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체를 포함하는 발현 작제물.

청구항 40

제 39항에 있어서, 상기 프로모터가 시냅신 1 프로모터, CamKII 프로모터, MeCP2 프로모터, NSE 프로모터, 및 Hb9 프로모터, 또는 이들의 유도체로부터 선택되는, 발현 작제물.

청구항 41

제 40항에 있어서, 상기 프로모터가 시냅신 1 또는 이의 유도체인, 발현 작제물.

청구항 42

제 41항에 있어서, 실질적으로 서열번호: 1, 3, 4 또는 5에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 발현 작제물.

청구항 43

제 39항 내지 제 42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 작제물이 바이러스 벡터인, 발현 작제물.

청구항 44

제 43항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스(AAV)인, 발현 작제물.

청구항 45

제 44항에 있어서, 상기 AAV가 AAV9인, 발현 작제물.

청구항 46

제 39항 내지 제 45항 중 어느 한 항의 발현 작제물 및 뇌에 직접 주사하기에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 뇌에 직접 투여하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 47

WOREE 증후군 또는 SCAR12를 치료하는 방법으로서, 제 46항의 약제학적 조성물을 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 48

WOREE 또는 SCAR12의 치료에서 제 46항의 약제학적 조성물의 용도.

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

[0001] WW 도메인-함유 산화환원효소(WWOX)의 생식계열 돌연변이는 간질, 운동실조증 및 성 발달 장애(DSD) 환자에서 기록되었다. 보다 최근에는 진단된 알츠하이머병에 대한 유전적 메타-분석에서 WWOX 유전자를 새로운 위험 유전자좌로 식별했다. 몇 가지 증거는 WWOX 발현이 중추신경계(CNS)의 정상적인 발달과 기능에 필요하며 WWOX의 돌연변이가 오늘날 WWOX-연관 간질성 뇌병증(WOREE) 증후군으로 알려진 유아의 신경 장애를 초래한다는 것을 강력하게 시사한다.

[0002] WOREE에서는 상염색체 열성 WWOX 넌센스 돌연변이, 부분 및 완전 결손이 매우 심각한 질병과 연관되어 매우 이른 발병 사망을 초래한다. WWOX의 단일 돌연변이 대립유전자를 지닌 이형접합 부모는 표현형 증상을 나타내지 않는다. 이들 보유자가 성인 간질에 더 취약한지는 아직 알려지지 않았다. WOREE를 특징으로 하는 대부분의 환자는 WWOX의 복합 이형접합 돌연변이를 품고 있어 각 돌연변이를 개별적으로 표적으로 삼기가 어렵다. 더 가벼운 형태의 질병은 WWOX 미스센스 돌연변이와 연관이 있으며 척수소뇌성 운동실조증, 상염색체 열성, 12(SCAR1

2)라고 지칭된다. WWOX가 CNS의 항상성을 조절하는 메커니즘은 거의 알려져 있지 않다. WWOX가 간질 및 다른 형태의 신경병증을 길항하는 다른 주요 이펙터의 다운스트림인지 여부도 알려져 있지 않다.

[0003] 최근의 증거는 또한 WWOX의 미묘한 돌연변이를 자폐 스펙트럼 장애(ASD)와 연관시킨다. 덜 심각한 표현형과 IQ 수준이 WWOX를 ASD 후보 유전자로 정의하는 정상 범위에 근접한 특징이 있는 많은 ASD 영향을 받은 개체에서 중첩되는 WWOX 커피 수 변이체(CNV)가 보고되었다. WWOX의 유전된 CNV는 ASD에 대한 낮은 침투 위험 인자로 결정되었다. 또한 다발성 경화증 환자 샘플에 대한 대규모 분석에서 WWOX의 컷을 포함하여 200개 이상의 상염색체 감수성 변이체가 밝혀졌다. 따라서 WWOX의 섭동은 단일 신경 질병을 넘어 WWOX가 여러 신경 장애에서 중요한 역할을 함을 시사한다.

발명의 내용

[0004] 본 개시내용은 WWOX-연관 CNS 질병의 치료를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 다양한 구현양태에서, 본 발명은 대상체의 뇌에서 이중 WWOX 유전자를 발현하는 것을 포함하고, 다양한 구현양태에서 WOREE 증후군 및 SCAR12와 같은 상태를 치료하거나 개선하기 위해 뉴런에서 이중 WWOX 유전자를 발현하는 것을 포함한다.

[0005] 일부 구현양태에서, WWOX 유전자는 뉴런에서 WWOX 유전자의 발현을 지시하는 프로모터를 포함하는 하나 이상의 조절 요소를 포함한다. 예를 들어, 프로모터는 범용 프로모터 또는 뉴런-특이적 프로모터일 수 있다. 예시적인 뉴런-특이적 프로모터는 시냅신 I 프로모터이다. 다양한 구현양태에서, WWOX 유전자는 야생형 유전자 또는 기능적 유도체인 mRNA 안정성을 향상시키는 비번역 서열(예를 들어, 3'-UTR에서)을 포함한다.

[0006] 일부 구현양태에서, 치료될 개체는 소아 또는 신생아 환자(예를 들어, WOREE 또는 SCAR12를 갖는 환자)이다. 일부 구현양태에서, 초기 치료는 질병의 일부 임상적 매개변수의 징후를 예방한다. 일부 구현양태에서, 개체는 성인 환자(예를 들어, WOREE 또는 SCAR12를 갖는다)이고, 치료는 간질 에피소드와 같은 하나 이상의 임상 매개변수를 개선할 수 있다. 다양한 구현양태에서, 치료는 간질 에피소드의 빈도 및/또는 중증도를 실질적으로 감소시킨다.

[0007] 예를 들어, 일부 구현양태에서, 본 발명은 WOREE 증후군 또는 SCAR12의 치료 방법을 제공하며, 이 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 환자의 뇌에 시냅신 I 프로모터 제어 하에 WWOX 야생형 유전자를 포함하는 AAV9 유전자 전달 시스템을 투여하는 것을 포함한다. AAV9 전달 시스템은 실질적으로 서열번호: 1, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 및/또는 서열번호: 5에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0008] 다른 측면에서, 본 개시내용은 뉴런-특이적 프로모터의 발현 제어 하에 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체를 포함하는 발현 작제물을 제공한다. 예시적인 뉴런-특이적 프로모터는 시냅신 I 프로모터이다. 일부 구현양태에서, 뉴클레오티드 서열은 실질적으로 서열번호: 1, 3, 4, 및/또는 5에 제시된 바와 같은 서열을 포함한다. 다양한 구현양태에서, 발현 작제물은 아데노-연관 바이러스(AAV) 전달 시스템과 같은 바이러스 벡터이다. 일부 구현양태에서, 발현 작제물은 AAV9 전달 시스템이다.

[0009] 본 개시내용의 다른 측면 및 구현양태는 다음의 상세한 설명 및 구현양태로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1a-1m은 뇌 세포에서 무린 *Wwox*의 조건부 결실의 표현형을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) P18에서 *Wwox* null(KO) 및 야생형(WT) 마우스의 대표 이미지. (b) 시간의 함수로서 체중(그램, g) 증가를 보여주는 그래프. *Wwox* null에서 지연된 성장은 야생형에 비해 4일 이후부터 명백하다. 데이터 포인트는 마우스의 평균 체중을 나타낸다(WT, $n = 3$; KO, $n = 3$). 오차 막대는 \pm SEM을 나타낸다(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 스튜던트 t 테스트). (c) 카플란 마이어(Kaplan Meier) 생존 곡선은 3-4주령까지 *Wwox* null의 출생 후 치사율을 보여준다(WT, $n = 10$; KO, $n = 11$). ($P = 0.0023$, 로그-순위 Mantel-Cox 테스트). (d) 신경 줄기/전구 세포에서 *Wwox* 유전자의 조건부 결실은 대조군 마우스(N-대조군)와 비교하여 N-KO에서 전체적인 발달 지연을 나타낸다. P17에 표시된 이 마우스의 대표 이미지. (e) N-KO 마우스는 N-대조군에 상응하는 감소된 체중을 나타낸다. 데이터 포인트는 마우스의 평균 체중, 유전자형당 4마리 마우스를 나타낸다. 오차 막대는 \pm SEM을 나타낸다(** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 스튜던트 t 테스트). (f) N-대조군($n=12$)과 비교하여 N-KO($n=14$)에서 3-4주령까지 출생 후 치사율을 나타내는 카플란 마이어 생존 곡선. ($P = 0.0002$, 로그-순위 Mantel-Cox 테스트). (g-i) 다음을 나타내는 뉴런(S-KO)에서 *Wwox*의 조건부 절제가 있는 마우스(P17)의 대표 이미지 (g) 성장 지연 및 (h) 감소된 체중(데이터 포인트는 마우스의 평균 체중, 유전자형당 4마리의 마우스를 나타낸다) 오차 막대는 \pm SEM ** $P < 0.01$, *** $P <$

0.001, 스튜던트 t 테스트) 및 (i) 조기 사망(S-대조군 $n = 13$, S-KO $n = 15$)을 나타낸다. (P 값 0.0001, 로그-순위 Mantel-Cox 테스트). (j-1) 회소돌기아교세포(O-KO) 또는 정상세포(G-KO)에서 *Wox*의 조건부 절제는 O-KO 또는 G-KO 마우스에서 해당 대조군(G-대조군, O-대조군)과 비교하여 발달 지연(j 및 m, P17에 표시), 체중 감소(k 및 n) 및 출생 후 치사율(l 및 o)와 같은 표현형 이상을 유발하지 않는다(k 및 l에서, O-대조군 $n = 11$ 및 O-KO $n = 10$, P 값 1.0, 유의성 없음, 로그-순위 Mantel-Cox 테스트) (G-대조군 $n = 8$, G-KO $n = 9$ 마우스는 N 및 M에서 사용, P 값 1.0, 유의성 없음, 로그-순위 Mantel-Cox 테스트).

도 2a-f는 S-KO 신피질에서 신피질의 과흥분성을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) S-대조군, S-HT 및 S-KO의 생체 내 기록(P13-P17)은 이형접합체(S-HT, 파란색으로 표시) 및 S-대조군(검은색으로 표시)과 비교하여 S-KO(빨간색으로 표시)에서 폭발 활성을 나타낸다. (b) 분리된 신피질 절편 제제에서 자발적인 신피질 폭발을 나타내는 표면 신피질로부터의 시험관내 기록(P13-P17). 인셋(inset)은 S-KO 사례에서 하나의 폭발 이벤트의 확장된 트레이스를 보여준다. 전체 뇌의 인셋은 생체내 기록 전극의 위치를 보여준다. 자발적 활동 및 7 S-대조군, 14 S-HT 및 24 S-KO 동물로부터의 11 S-대조군, 23 S-HT 및 42 S-KO 절편에서 수득한 전기 자극 인공물을 갖는 데이터를 모두 포함하는 모든 데이터 평가 중에서, 0개의 S-대조군 절편은 폭발(0%)을 보였고, 3마리의 S-HT 동물의 4개의 절편은 폭발(약 20%)을 보였고, 20마리의 S-KO 동물의 36개의 절편은 폭발(약 84%)을 보였다. (c) 생체내 기록 및 시간-주파수 스펙트로그램의 두 번째 예. (d) 자극 인공물이 없는 데이터에서 얻은 S-대조군, S-HT 및 S-KO에 대한 생체내 및 시험관내 데이터 세트에 대한 전력 스펙트럼 분석. 회색 막대는 주파수별로 식별된 중요 영역을 나타낸다. 생체내 12-20 Hz는 S-HT에 비해 S-KO에서, S-대조군에 비해 S-KO에 대해 7-15 Hz에서 높은 전력을 나타낸다. 시험관내 3-13 Hz는 S-HT 및 S-대조군에 비해 S-KO의 상승된 전력을 보였다. 시험관내 데이터 z-점수는 320-400 Hz의 평균 및 표준 편차로 정규화되었다. 박스 플롯은 가로축에 주파수 대역이 표시된 정규화된 전력을 보여준다. 0-4.9 Hz 및 5-9 Hz의 경우, S-KO 전력은 S-대조군 단독과 비교하여 상당히 상승했다(생체내, S-대조군, $n = 5$ 대상체; S-KO, $n = 7$ 대상체; S-HT, $n = 7$ 대상체, * $P < 0.05$; 시험관내 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 스튜던트 t 테스트, S-대조군 및 S-HT와 비교한 S-KO; S-대조군, $n = 11$ 절편, 7 동물, S-HT, $n = 11$ 절편, 8 동물; S-KO, $n = 34$ 절편, 20 대상체). (e) 신피질의 층 II/III에서 기록되는 층 V의 전기 자극에 대한 반응. 화살표는 100 μ A 자극 강도에서 1차 피크 반응의 중지 및 시작을 나타내고 캐럿 기호는 2차 피크 반응의 중지 및 시작을 나타낸다. (f) 1차 및 2차 피크 반응의 진폭(1차 피크: * $P = 0.0127$. 2차 피크: ** $P = 0.008$, * $P = 0.0202$, 윌콕슨(Wilcoxon) 순위 합계 테스트 S-대조군 $n = 6$ 절편, 3 대상체, S-HT, $n = 8$ 절편, 5 대상체; S-KO, $n = 8$ 절편, 6 대상체).

도 3a-3e는 *Wox*의 뉴런 결실이 수초화 및 회소돌기아교세포 성숙을 손상시킨다는 것을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) 피질 영역의 3개의 동일한 섹션에서 CNP 및 MBP의 형광 합계 강도의 정량화는 S-대조군($n = 3$)에 비해 S-KO($n = 3$)에서 감소된 강도를 나타낸다. (b) 항-CNP 및 항-MBP로 면역염색된 뇌 섹션의 대표적인 이미지가 소뇌에서 나타난다. (c) CNP 및 MBP의 형광 강도 정량화는 S-대조군에 비해 S-KO에서 감소된 강도를 표시한다. (d) CC1 및 항-PDGFR α 에 대해 면역염색된 뇌 조직의 시상 섹션. P17에서 S-대조군과 비교하여 S-KO의 뇌량(흰색 점선으로 표시되고 확대 영역은 흰색 사각형으로 표시)에서 성숙한 회소돌기아교세포의 수가 감소한 것을 보여주는 이미지. (e) S-대조군과 비교하여 S-KO에서 CC1 양성 세포의 현저한 감소 및 PDGFR α 양성 세포의 수 증가를 나타내는 뇌량에서 CC1 및 PDGFR α 양성 세포의 정량화. 데이터 포인트는 S-대조군($n = 3$) 및 S-KO 마우스($n = 3$)의 3개의 독립적인 섹션에서 영역(0.5mm^2)에서 계수된 세포 수를 나타낸다. 오차 막대는 \pm SEM을 나타낸다(* $P \leq 0.01$, ** $P \leq 0.001$). 축척 막대 A) 50 μ m, B) 2 μ m 및 C) 50 μ m.

도 4a-4d는 *Wox*의 뉴런 결실이 수초화 및 축삭 전도도를 감소시킨다는 것을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) P17에서 S-대조군($n = 3$)과 비교하여 S-KO($n = 3$)의 시신경에서 더 적은 수의 수초화 축삭 및 더 많은 무수초화 축삭을 보여주는 뇌량의 중간 시상 섹션의 전자 현미경 사진(EM) 사진. (b) S-대조군 대 S-KO에서 뇌량의 수초화 축삭 및 시야당 시신경에서 무수초화 축삭의 수의 정량화. 그래프는 뇌량에서 수초화 축삭(S-대조군, $n = 2500$ 및 S-KO, $n = 1200$)과 시신경에서 무수초화 축삭(S-대조군 $n = 500$ 및 S-KO, $n = 3000$)을 FOV(시야)당 EM 이미지로 나타낸다. 오차 막대는 \pm SEM을 나타낸다(*** $P \leq 0.001$, 스튜던트 t 테스트). (c) S-대조군($n = 3$)과 비교하여 S-KO($n = 3$)에서 뇌량 및 시신경의 축삭의 미엘린 두께 감소를 나타내는 g-비율 분석. 뇌량(각 유전자형당 $n = 300$) 및 시신경(각 유전자형당 $n = 300$)의 전자현미경 이미지로부터 축삭 직경 및 미엘린 두께를 계산하였다(*** $P \leq 0.001$, 스튜던트 t 테스트). (d) 뇌량 자극으로부터 유발된 반응의 대표적인 예, (i) 자극기로부터 250 μ m의 수직 거리에서 기록. 인셋은 전극 및 자극의 배치를 보여준다. (N1 * $P = 0.0104$; N2 = 0.5737 Wilcoxon 순위 합계 테스트) (ii) 자극 시작부터 N1 및 N2까지의 지연 시간. (ii) N1 진폭과 N2 진폭의 비율. (N1/N2). (** $P = 0.0030$; 윌콕슨(Wilcoxon) 순위 합계 $n = 8$ 절편, 5 대상체, S-대조군, $n = 8$ 절편 6

대상체 S-KO).

도 5는 OPC 분화에서 WWOX의 비-세포 자율 기능을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. 계산된 사전-수초화, 수초화 및 분화된 희소돌기아교세포의 정량화(직경 14 mm이 커버된 면적). 결과는 두 개의 독립적인 실험(WT-DRGs+WT-OPCs, n = 4; KO-DRGs+WT-OPCs, n = 4)의 상자 플롯으로 표시된다. (**P < 0.01, n.s 유의미하지 않음). 축척 막대 A) 100 μm, D) 50 μm.

도 6a-6g는 WWOX-결핍 희소피질 회전타원체가 과흥분성 및 저수초화를 나타낸다는 것을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) 희소피질 회전타원체 절편 설정의 개략도. 전극은 로컬 필드 전위 기록(LFP)에 사용되는 반면 두 번째 전극은 전체-셀 패치 기록에 사용된다. 전극은 절편 가장자리로부터 150 μm에 위치해 있고 10-15 μm 떨어져 있다. (b) 15주차에 OS-WT 및 OS-WWOX-KO 오르가노이드에 대한 전체-세포 패치 클램프 기록에서 세포의 휴지막 전위(OS-WT n = 3, OS-WWOX-KO n = 4; OS-WT RMP = -52.1 ± 0.90 mV, OS-WWOX-KO RMP = -21.28 ± 6.91 mV). (*P < 0.01, 스튜던트 t 테스트). (c) 기준선 조건에서 15주차에 OS-WT 및 OS-WWOX-KO 오르가노이드의 평균 스펙트럼 전력(n = 9 절편, OS-WT의 경우 3 오르가노이드, n = 6 절편, OS-WWOX-KO의 경우 2 오르가노이드; OS-WT AUC = 0.0285 ± 0.0097, OS-WWOX-KO AUC = 0.0541 ± 0.0093. (*P < 0.05, 스튜던트 t 테스트). (d) 델타 및 세타 범위(0.5-7.9 Hz)에 대한 (c)에서 평균 스펙트럼 전력 곡선 아래의 면적. (*P < 0.05, 스튜던트 t 테스트). (e) CNP(OLs) 및 MBP(OLs)에 대해 염색된 30주 OS. 오른쪽의 이미지는 왼쪽 상자 영역의 확대이다. (OS-WT, n = 5; OS-WWOX-KO, n = 5). (f) 37주차 오르가노이드에서 OS-WWOX-KO(n = 3)에 비해 더 많은 수초화 축삭 OS-WT(n = 3)를 보여주는 대표적인 전자 현미경 이미지. 상자에 표시된 확대된 영역. (g) 막대 그래프는 OS-WT(n = 2) 및 OS-WWOX-KO(n = 3)에서 수초 및 무수초 축삭의 백분율을 나타낸다. 스케일 바 (e) 및 (f) 100 μm, (g) 40 μm 및 (h) 왼쪽 패널 500 nm 및 오른쪽 패널 200 nm.

도 7a-7f는 시냅신 I-양성 뉴런에서 WWOX의 복원이 *Wwox* null 마우스의 성장을 개선하고 수명을 연장함을 보여주는 연구 요약을 제공한다. (a) 인간 시냅신 I 프로모터 하에 묶인 *Wwox* 유전자를 함유하는 플라스미드 벡터 작제물의 예시. *Wwox* 유전자 서열 다음에 IRES 프로모터 및 EGFP 유전자 서열이 온다. (b) P17에서 *AAV9-hSynI-GFP* (대조군 바이러스) 또는 *AAV9-hSynI-mWwox-IRES-GFP* 바이러스로 주입된 야생형(WT), *Wwox* null의 물리적 외관. 지정된 날짜에 마우스의 체중(c) 및 혈당 수치(d)를 보여주는 그래프. 오차 막대는 ±SEM, 유전자형당 n=4마리 마우스를 나타낸다. (e) 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 그래프는 *AAV9-hSynI-GFP*(n=6)를 주사한 마우스 또는 비주사(n=10) 마우스에 비해 *AAV9-hSynI-mWwox*(n=18)를 주사한 *Wwox* 녹아웃 마우스의 연장된 수명을 나타낸다. (p 값 < 0.0001, 로그 순위 Mantel-Cox 테스트). (f) 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 그래프는 *AAV9-hSynI-GFP*(n=4) 또는 비주사(n=8) 마우스에 비해 *AAV9-hSynI-hWwox* (n=6) [중앙값 92 일]를 주사한 *Wwox* 녹아웃 마우스의 연장된 수명을 나타낸다(p 값 = 0.0001, 로그 순위 Mantel-Cox 테스트).

도 8a 및 8b는 WWOX의 뉴런 회복이 신피질에서 간질 활동을 감소시킨다는 것을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) P20-21일에 *AAV9-hSynI-mWwox* [KO+A-Wwox] 새끼로 처리된 WT, KO 및 KO에서 수행된 세포-부착 기록의 대표적인 트레이스. 트레이스는 자발적인 신피질 활동을 나타낸다(활동 전위가 표시). 패널은 0.5초 간격의 확대를 나타내는 인셋으로 12초 기록을 나타낸다. KO가 활동 전위의 폭발을 나타내는 대표적인 트레이스에서 KO 뇌의 명백한 과잉 활동이 관찰된다. 그래프는 WT 새끼(n=2)의 20개 뉴런, KO+A-Wwox 새끼(n=2)의 20개 뉴런 및 KO 새끼(n=2)의 30개 뉴런에 대한 평균을 보여준다(****p 값 < 0.0001, 스튜던트 t 테스트). (b) WT 및 KO+A-Wwox 성체 마우스(6개월)에서 수행된 세포-부착 기록의 대표적인 트레이스. 트레이스는 자발적인 신피질 활동(활동 전위)을 나타낸다. 패널은 0.5초 간격의 확대를 나타내는 인셋과 함께 12초 기록을 제공한다. 그래프는 WT 성체 마우스(n=3)의 60개 뉴런과 KO+A-Wwox 성체 마우스(n=3)의 60개 뉴런 이상의 평균을 보여준다. WT와 KO+A-Wwox 성체 마우스의 평균 발화율 사이에는 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

도 9a-9c는 뉴런에서의 WWOX 복원이 *Wwox* null에서 OPC 분화를 촉진함으로써 수초화를 개선함을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) 지시된 마우스(각 군에 대해 n=3)로부터 P17에서 항-MBP로 면역표지된 전체 뇌 시상색선의 이미지. 피질, 해마 및 소뇌의 MBP 염색이 제시된다(상단 패널에서 확대). (b) CC1 및 PDGFR α에 대해 면역염색된 뇌(P17) 조직의 시상색선. *AAV9-hSynI-GFP* 바이러스가 주입된 *Wwox* null과 비교하여 *AAV9-hSynI-mWwox*로 처리한 후 *Wwox* null의 뇌량에서 성숙한 희소돌기아교세포의 증가된 수를 보여주는 이미지. (c) 그래프는 각 유전자형에서 마우스당 3개의 유사한 뇌 시상색선에서 계수된 WT(n=3), KO(n=3) 및 KO+A-Wwox(n=3)의 뇌량(면적 0.5 mm²)에서 CC1 및 PDGFR α 양성 세포의 정량화를 나타낸다. 오차 막대는 ±SEM을 나타낸다. (*p 값 < 0.01, **p 값 < 0.001, ***p 값 < 0.0001). 스케일 바(a) 2 mm(상단 패널), 250 μm(중간 및 하단 패널), (b) 250 μm(상단 패널), 50 μm(중간 및 하단 패널).

도 10a-10e는 뉴런에서의 WWOX 복원이 *Wwox* null 마우스의 비정상적인 행동 표현형을 역전시킨다는 것을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) 8-10주에서 WT(암컷, n=7, 수컷 n=6) 및 *AAV/mWwox*-주입 KO 마우스(암컷 n=7, 수컷 n=5)의 트레이스 패턴(주변 및 중앙)을 보여주는 야외 테스트의 대표 이미지. (b) 및 (c) 그래프는 야외 트레이스에서 이동한 속도와 거리(cm)를 나타낸다. (d) WT 및 KO+AAV-Wwox 마우스(연령 8-10주)로부터 고가식 십자 미로 테스트의 마우스 트레이스 이미지. O.A.(열린 팔) C.O. (닫힌 팔)은 왼쪽 마우스 트레이스 이미지에 점선 흰색 상자로 표시된다. 그래프는 WT(암컷 n=7, 수컷 n=6) 및 KO+AAV-Wwox(암컷 n=7, 수컷 n=5)의 닫힌 팔 (i) 및 열린 팔(ii)의 시간(s)을 나타낸다. (e) 그래프는 다른 시험에서 회전막대(rotarod)에서 떨어지는 마우스(8-10주에 WT 및 구조된 마우스)의 지연 시간(들)을 나타낸다. 암컷(WT, n=7; KO+mWwox, n=5)과 수컷(WT, n=5; KO+mWwox, n=5)은 별도로 표시된다(***p 값 < 0.0001).

도 11a-11f는 WWOX 녹아웃 대뇌 오가노이드의 생성 및 특성화에 관한 연구의 요약을 제공한다. (a) WWOX 및 범-방사형 아교세포 마커 SOX2와 함께 심실 방사형 아교세포(vRG) 마커 CRYAB에 대해 염색된 10주 CO. 오른쪽 이미지는 박스 영역을 확대한 것이다. 파선은 심실 공간을 정의한다(WT: 3 배치에서 n = 8, KO: 3 배치에 n = 8). 축척 = 50 μ m(왼쪽), 25 μ m(오른쪽). (b) 심실-유사 구역(VZ), 심실하 구역(SVZ) 및 피질관(CP)을 구성하는 다양한 집단을 나타내는 마커의 정량화. NeuN은 성숙한 뉴런을 표시하고, TBR2는 중간 전구체(IP)를 표시하고, SOX2는 심실 방사형 아교세포(vRG)를 표시한다. 상자플롯은 1사분위수와 3사분위수를 나타내며 수염은 최소 및 최대 포인트를 나타내고 중앙 밴드는 중앙값을 나타낸다. 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트(WT: 3개 배치에서 n = 8, KO: 3개 배치에서 n = 8, W-AAV: 1개 배치에서 n = 4)와 일원 ANOVA를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. (c) 15주 CO에서 다양한 신경 마커의 발현 수준 평가를 위한 qPCR 분석: SOX2 및 PAX6(전구 세포), TUBB3 (범-뉴런), SLC17A6 및 SLC17A7(VGLUT2 및 VGLUT1; 글루타메이트성 뉴런), 및 GAD1 및 GAD2(GAD67 및 GAD65; GABAergic 뉴런). y축은 상대 발현 배수 변화를 나타낸다. 데이터는 평균 SEM으로 표시된다. 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트(WT: 1배치에서 n = 4, KO: 1배치에서 n = 4, W-AAV: 1배치에서 n = 4)와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. (d) 10주차 CO에서 글루타메이트성 뉴런 마커 VGLUT1 및 GABAergic 뉴런 마커 GAD67(GAD1)에 대한 면역형광(IF) 염색(WT: 3배치에서 n = 8, KO: 3배치에서 n = 8, W-AAV: n = 1 배치에서 4). 축척 = 100 μ m. 이미지의 정량화가 표시된다. VGLUT1 및 GAD67은 염색으로 덮인 표면적으로 정량화되었으며 각 이미지의 핵 수로 정규화되었다. 상자플롯은 1사분위수와 3사분위수를 나타내며 수염은 최소 및 최대 포인트를 나타내고 중앙 밴드는 중앙값을 나타낸다. 샘플이 정상적으로 분포되지 않았기 때문에 던(Dunn)의 다중 비교 테스트와 함께 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 테스트를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. ROUT 테스트를 사용하여 이상값을 제거했다(Q = 1%). 데이터 정보: n.s(유의하지 않음), *P \leq 0.05 및 ****P \leq 0.0001.

도 12a-12c는 WWOX-KO 대뇌 오가노이드가 과흥분성 및 간질형 활성을 나타냄을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. 7주 된 hESC-유래 대뇌 오가노이드(CO)의 샘플 기록. (a) 샘플 트레이스는 기준선 조건(왼쪽) 및 100 μ M 4-AP(오른쪽)의 존재에서 WT와 비교하여 증가된 활성을 나타내는 WWOX-KO CO와 함께 로컬 필드 전위의 눈에 띄는 차이를 보여준다. (b) 기준선 조건에서 7주차 WT 및 KO CO의 평균 스펙트럼 전력. 선은 0.25-1 Hz 주파수 범위를 표시한다. 양측 언페어드 웰치(Welch)의 t-테스트를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다(WT: n = 14 절편, 5 오르가노이드 및 3 배치, KO: n = 14 절편, 8 오르가노이드 및 3 배치). (c) 0.25-1 Hz 주파수 범위에 대한 (b)의 평균 스펙트럼 전력 곡선 아래 정규화된 면적. 평균 SEM으로 표시되는 데이터. 통계적 유의성은 양측 언페어드 웰치(Welch)의 t-테스트를 사용하여 결정되었다. 모든 막대의 숫자는 분석된 절편 및 오르가노이드(즉, 절편(오가노이드))의 수를 나타낸다. (d) 및 (e) WWOX의 코딩 서열은 렌티바이러스 형질도입(렌티-WWOX)을 사용하여 6주차 WWOX-KO CO에 다시 도입되었다. (d) 렌티바이러스 감염 후 WWOX-KO 오가노이드에서 상이한 집단에서 WWOX 발현을 나타내는 면역형광 염색. NT = 미처리. 축척 = 50 μ m. (e) 0.25-1 Hz 주파수 범위에 대해 기준선 조건에서 7주차에 WT 계통, 2 KO 계통 및 렌티-WWOX에 감염된 2 KO 계통의 평균 스펙트럼 전력 곡선 아래 정규화된 면적. 평균 SEM으로 표시되는 데이터. 모든 막대의 숫자는 분석된 절편 및 오르가노이드(즉, 절편(오가노이드))의 수를 나타낸다. 통계적 유의성은 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다. 데이터 정보: ***P \leq 0.001 및 ****P \leq 0.0001.

도 13a-13f는 WWOX-KO 대뇌 오가노이드가 손상된 정상세포형성 및 DNA 손상 반응을 나타냄을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) 15주 및 24주 CO는 정상 세포 및 방사형 아교세포 마커 GFAP 및 정상세포-특이적 마커 S100b(WT W15: 3개 배치에서 n = 9; KO W15: 3개 배치에서 n = 16; W-AAV W15: 1 배치에서 n = 4 오르가노이드; WT W24: 4 배치에서 n = 10; KO W24: 3 배치에서 n = 9; 및 W-AAV W24: 1 배치에서 n = 4)에 대해 염색되었다. 축척 = 100 μ m. (b) 15주차 CO의 정상세포 마커의 qPCR 분석. y축은 상대적인 발현 배수 변화

를 나타낸다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트(WT: 1배치에서 n = 4; KO: 1배치에서 n = 4; W-AAV: 1배치에서 n = 4)와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. (c) 24주째 CO의 정상세포 마커의 qPCR 분석. y축은 상대적인 발현 배수 변화를 나타낸다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트(WT: 2배치에서 n = 4; KO: 2배치에서 n = 3; W-AAV 1배치에서 n = 3)와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. (d) VZ 주변의 정상세포 마커에 대한 6주 CO의 IF 염색(WT: 2배치에서 n = 6; 및 KO: 2배치에서 n = 6). 축척 = 100 μm(왼쪽) 및 50 μm(오른쪽). € 생리학 조건에서 범-방사형 아교 세포 마커 SOX2와 함께 6주차 CO의 VZ에 있는 세포 핵의 DNA 손상 마커 cH2AX 및 53BP1에 대한 염색(WT: 3개의 개별 배치에서 n = 8; KO: 3개의 개별 배치에서 n = 12개 및 W-AAV: 1개 배치에서 n = 4). 축척 = 50 μm(왼쪽), 25 μm(오른쪽). (f) VZ의 가장 안쪽 층을 구성하는 세포의 핵에서 이 층의 총 핵 수로 정규화된 cH2AX(상단) 및 53BP1 병소(foci)(하단)의 정량화. 상자플롯은 1사분위수와 3사분위수를 나타내며 수염은 최소 및 최대 포인트를 나타내고 중앙 밴드는 중앙값을 나타낸다. 통계적 유의성은 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트(WT: 3배치에서 n = 8개 오르가노이드; KO: 3개 배치에서 n = 12개 오르가노이드; W-AAV: 1개 배치에서 n = 4)와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다. 데이터 정보: n.s(유의하지 않음), *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01 및 ****P ≤ 0.0001.

도 14a-14e는 대뇌 오가노이드 RNA 시퀀싱이 주요 분화 결함을 드러냄을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. 15주 CO의 RNA 시퀀싱(RNA-seq) 및 전사체 분석(WT: n = 2, KO: n = 4). (a) RNA-seq의 결과를 검증하는 선택된 Wnt 표적 유전자에 대한 qPCR 분석. y축은 상대 발현 배수 변화를 나타낸다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다. 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트(WT: 1배치에서 n = 4; KO: 1배치에서 n = 4; W-AAV: 1배치에서 n = 4)와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 통계적 유의성을 결정했다. (b) 16주차 CO는 세포질(c) 및 핵(N) 분획으로 세분화되었다. 실험은 총 2개의 WT 오가노이드와 4개의 KO 오가노이드(각 KO 계통당 2개)로 두 번 실행되었다. KAP-1은 핵을 표시하고 HSP90은 세포질을 표시한다. 하단의 숫자는 세포질 분획[b-C(N/C)]으로 정규화된 b-카테닌 밴드 강도의 핵 분획의 정량화이다. (c) TBR1, BCL11B(CTIP2), SATB2, POU3F2(BRN2), CUX1 및 RELN과 같이 가장 깊은 것부터 가장 표면적인 것까지 15주차 오가노이드에서 인간 피질의 6개 층의 마커 발현 수준을 보여주는 히트맵. (d) 깊은 층 피질 마커 CTIP2(BCL11B) 및 TBR1 및 표면층 마커 SATB2(WT: n = 3; KO: n = 4; 및 W-AAV: n = 4)의 감소된 수준을 검증하는 15주 CO의 IF 염색. 축척 = 50 μm. (e) 총 핵 수로 정규화된 G에서 보이는 피질 마커의 정량화. y축은 WT CO의 평균과 비교하여 배수 변화를 나타낸다. 상자플롯은 1사분위수와 3사분위수를 나타내며 수염은 최소 및 최대 포인트를 나타내고 중앙 밴드는 중앙값을 나타낸다. 통계적 유의성은 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트(WT: 3개 배치에서 n = 9, KO: 3개 배치에서 n = 16, WAAV: 1개 배치에서 n = 4 오르가노이드)와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다. 데이터 정보: *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001 및 ****P ≤ 0.0001.

도 15a-15e는 WWOX-관련 간질성 뇌병증 대뇌 오가노이드가 뉴런 이상을 반복한다는 것을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. WOREE 증후군 환자와 그의 건강한 부모로부터 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 분리하고 iPSC로 재프로그래밍한 후 CO로 분화시켰다. (a) 선조 마커 SOX2, 뉴런 마커 b3-튜불린 및 WWOX(WSM F1: 1개 배치에서 n = 2; WSM M2: 1개 배치에서 n = 2; WSM S2: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5 W-AAV3: 1개 배치에서 n = 2개; 및 WSM S5 W-AAV6: 1개 배치에서 n = 2)에서 염색된 10주차 WSM CO. 축척 = 50 μm. (b) WSM P, WSM S 및 WSM S W-AAV 7주 CO의 뉴런에서 기록된 자발적 스파이크의 대표적인 트레이스. 각 기록의 길이는 12초이고 확대는 0.5초이다(오른쪽 상자). (c) WSM P CO(4 오르가노이드)의 24개 뉴런, WSM S CO(3 오르가노이드)의 41개 뉴런, WSM S W-AAV 오르가노이드(3 오르가노이드)의 40개 뉴런에 대한 평균 발화율. 통계적 유의성은 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다. 막대는 평균 ± SEM을 나타낸다. (d) 10주차 WSM CO에서 GAD67 및 VGLUT1 면역염색(WSM F1: 1개 배치에서 n = 2; WSM M2: 1개 배치에서 n = 2; WSM S2: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5 W-AAV3: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5 W-AAV6: 1개 배치에서 n = 2). 축척 = 50 μm. (e) 도 15d에 나타난 데이터의 정량화. 통계적 유의성은 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다(WSM F1: 1개 배치에서 n = 2; WSM M2: 1개 배치에서 n = 2; WSM S2: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5: 1개 배치에서 n = 2개; WSM S5 W-AAV3: 1개 배치에서 n = 2개; WSM S5 W-AAV6: 1개 배치에서 n = 2개). 데이터 정보: ns(유의하지 않음), *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001 및 ****P ≤ 0.0001.

도 16a-16f는 WWOX-관련 간질성 뇌병증이 완전한 WWOX 손실과 유사한 분자 이상을 묘사함을 보여주는 연구의 요약을 제공한다. (a) 정상세포 마커 GFAP 및 S100b에 대해 염색된 15주차 WSM CO. (WSM F1: 1개 배치에서 n = 2; WSM M2: 1개 배치에서 n = 3; WSM S2: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5 W-AAV3: 1개 배치에서 n = 2 및 WSM S5 W-AAV6: 1개 배치에서 n = 2). 축척 = 50 μm. (b) WOREE- 유래 오가노이드에서 손

상된 DNA 손상 반응. SOX2는 VZ의 방사형 아교세포를 표시한다(WSM F1: 1개 배치에서 n = 4; WSM M2: 1개 배치에서 n = 4; WSM S2: 1개 배치에서 n = 4; WSM S5: 1개 배치에서 n = 4; WSM S5 W-AAV3: 1개 배치에서 n = 4; 및 WSM S5 W-AAV6: 1개 배치에서 n = 4). 축척 = 50 μm(왼쪽) 및 25 μm(오른쪽). (c) 6주차 WSM CO의 VZ에 있는 세포 핵에서 cH2AX(왼쪽) 및 53BP1(오른쪽)으로 표시된 DNA 손상 병소의 정량화. 상자플롯은 1사분위수와 3사분위수를 나타내며 수염은 최소 및 최대 포인트를 나타내고 중앙 밴드는 중앙값을 나타낸다. 통계적 유의성은 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다.(WSM F1: 1개 배치에서 n = 4; WSM M2: 1개 배치에서 n = 4; WSM S2: 1개 배치에서 n = 4; WSM S5: 1개 배치에서 n = 4; WSM S5 W-AAV3: 1개 배치에서 n = 4; WSM S5 W-AAV6: 1개 배치에서 n = 4) (d) 10주차 WSM CO에서 선택된 Wnt 표적 유전자에 대한 qPCR 분석. y축은 상대 표현 배수 변화를 나타낸다. 데이터는 평균 SEM으로 표시된다. 통계적 유의성은 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트와 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다(WSM P: 1개 배치에서 n = 6; WSM S: 1개 배치에서 n = 4; WSM S W-AAV: 1개 배치에서 n = 4). (e) 피질층의 마커 CTIP2 및 SATB2에 대해 염색된 15주차 WSM CO. (WSM F1: 1개 배치에서 n = 2; WSM M2: 1개 배치에서 n = 3; WSM S2: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5 W-AAV3: 1개 배치에서 n = 2; 및 WSM S5 W-AAV6: 1개 배치에서 n = 2). 축척 = 50 μm. (f) e에 제시된 염색의 정량화. 상자플롯은 1사분위수와 3사분위수를 나타내며 수염은 최소 및 최대 포인트를 나타내고 중앙 밴드는 중앙값을 나타낸다. 통계적 유의성은 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트와 함께 일원 ANOVA를 사용하여 결정되었다(WSM F1: 1개 배치에서 n = 2; WSM M2: 1개 배치에서 n = 3; WSM S2: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5 W-AAV3: 1개 배치에서 n = 2; WSM S5 W-AAV6: 1개 배치에서 n = 2). 데이터 정보: *P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001 및 ****P ≤ 0.0001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 개시내용은 WW 도메인-함유 산화환원효소(WWOX)-연관 CNS 질병의 치료를 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 다양한 구현양태에서, 본 발명은 대상체의 뇌에서 이중 WWOX 유전자를 발현하는 것을 포함하고, 다양한 구현양태에서 WOREE 증후군 및 SCAR12와 같은 상태를 치료하거나 개선하기 위해 뉴런에서 이중 WWOX 유전자를 발현하는 것을 포함한다.
- [0012] "WWOX-연관 CNS 질병"이라는 용어는 돌연변이된 WWOX 유전자 또는 비정상적인 WWOX 발현으로 인해 발생하거나 이와 연관된 질병을 의미한다. 돌연변이는 완전한 또는 부분적인 게놈 결실로 이어져 단백질 손실 또는 절단(닌센스 돌연변이) 또는 더 가벼운 조건에서 미스센스 돌연변이로 이어질 수 있다. 이러한 질병은 CNS에서 나타나는 질병이다. 이러한 질병의 예는 다음과 같다: WWOX-연관 간질성 뇌병증(WOREE) 증후군; 척수소뇌성 운동실조증, 상염색체 열성, 12(SCAR12), 다발성 경화증, 알츠하이머병, 웨스트 증후군, 자폐증, 성적 발달 장애(DSD).
- [0013] 특정 측면에서, 본 발명은 WWOX-연관 CNS 질병의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 뇌에서 WWOX의 발현을 초래하는 조절 요소(들)의 제어 하에 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체를 이러한 치료를 필요로 하는 환자의 뇌에 투여하는 것을 포함한다. 다양한 구현양태에서, WWOX-연관 CNS 질병은 WOREE 증후군, SCAR12, 알츠하이머병, 웨스트 증후군, 자폐증, 다발성 경화증 및 DSD로부터 선택된다.
- [0014] 일부 구현양태에서, WWOX-연관 CNS 질병은 WOREE 증후군 또는 SCAR12이다. 이러한 일부 구현양태에서, 환자는 WWOX의 복합 이형접합 돌연변이를 갖는다.
- [0015] 본 개시내용에서 "치료" 또는 "치료하는"이라는 용어는 질병과 관련된 적어도 하나의 임상적 매개변수를 개선하는 것을 말하며, 질병(또는 질병의 하나 이상의 임상 매개변수)이 발현되는 것을 예방하는 것을 추가로 포함한다. "치료" 또는 "치료하는"이라는 용어는 또한 생존, 성장, 간질 에피소드의 수 또는 빈도, 인지 기능, 사회적 기능(예를 들어, 자폐증), 생식력, 운동실조증, 망막병증, 정신지체 및 소두증과 같은 (치료되지 않은 대상체와 비교하여) 질병의 적어도 하나의 증상 또는 양상을 개선하는 것을 의미한다.
- [0016] 용어 "WWOX 야생형 유전자"는 서열번호: 1로 표시되는 WWOX 코딩 서열을 포함하거나 서열번호: 2의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 지칭한다. 용어 "WWOX 야생형 유전자"는 추가로 cDNA 서열(서열번호: 1로 표시)을 포함하거나, 하나 이상의 인트론을 갖는 유전자 서열을 포함한다. 예를 들어, 인트론이 있는 전체 유전자 서열은 NCBI 참조 서열: NC_000016.10으로 표시된다. 용어 "WWOX 야생형 유전자"는 질병 또는 WWOX의 기능 또는 발현의 상실과 연관되지 않은 인간 집단에서 자연적으로 발생하는 뉴클레오티드 다형성 또는 아미노산 변형(각각 서열번호: 1 또는 서열번호: 2와 관련하여)을 추가로 포함한다. 다양한 구현양태에서, WWOX 유전자는 WWOX 야생형 유전자의 기능적 등가물일 수 있으며, 즉 WWOX 유전자는 삽입, 결실 또는 치환으로부터 독립적으로 선택되며 WWOX 활성 또는 발현(예를 들어, 뉴런에서)에 상당한 영향을 미치지 않는 하나 이상의 아미노산 변형(예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 변형)을 코딩할 수 있다. 일반적으로, 기능성 유도체는 서열번호: 2의

아미노산 서열과 적어도 95% 서열 동일성, 또는 적어도 96% 서열 동일성, 또는 적어도 97% 서열 동일성, 또는 적어도 98% 서열 동일성, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 코딩할 것이다. WWOX 야생형 유전자는 프로모터 및 5'- 및 3'-비번역 영역을 포함하는 조절 요소를 추가로 포함할 수 있지만, 이러한 조절 요소는 자연 발생 WWOX 유전자에 제한되지 않으며, 대신에 원하는 수준의 mRNA 발현 또는 회전을, 및/또는 원하는 유전자 발현 세포-특이성을 달성하기 위해 선택될 수 있다. 일부 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자는 실질적인 비번역 영역을 포함하지 않으며, 즉 WWOX 코딩 서열로 본질적으로 구성되거나 구성될 수 있다. 본 발명의 구현양태에 따르면, WWOX 야생형 유전자는 적어도 이중 프로모터를 포함할 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "이중 프로모터"는 자연에서 제어하지 않는 코딩 서열의 발현을 제어하는 위치와 같은 비-천연 위치에 배치된 프로모터이다.

[0017] 일부 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 코딩한다. 일부 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자는 cDNA 서열이고, 일부 구현양태에서는 서열번호: 1 또는 서열번호: 3의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0018] 용어 "프로모터"는 WWOX 야생형 유전자의 전사와 같은 RNA의 발현을 제어할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 프로모터 서열은 유전자 발현을 제어하기 위한 적어도 근위 요소를 함유하고, 임의로 보다 원위의 업스트림 요소를 추가로 포함할 수 있으며, 후자의 요소는 종종 인헨서로 지칭된다. 따라서, "인헨서"는 프로모터 활성을 자극할 수 있는 DNA 서열이거나, 프로모터의 선천적 요소 또는 프로모터의 수준 또는 조직 특이성을 향상시키기 위해 삽입된 이중 요소이다. 프로모터는 천연 유전자로부터 전체적으로 유래될 수 있거나, 자연에서 발견되는 상이한 프로모터로부터 유래된 상이한 요소로 구성될 수 있거나, 심지어 합성 DNA 세그먼트를 포함할 수 있다. 또한 조절 서열의 정확한 경계가 완전히 정의되지 않을 수 있으므로, 일부 변이의 DNA 단편이 동일한 프로모터 활성을 가질 수 있음이 인식된다.

[0019] 일부 구현양태에서, 조절 요소는 뉴런에서 WWOX 유전자의 발현을 지시하는 프로모터를 포함한다. 예를 들어, 프로모터는 범용 프로모터일 수 있다. 범용 프로모터의 예는 CMV 프로모터, E2F1 프로모터 및 U1snRNA 프로모터 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현양태에서, 프로모터는 범용 프로모터이고, 작제물은 뉴런에 특이적으로 또는 선택적으로 전달된다. 일부 구현양태에서, 조절 요소는 뉴런에서 특이적으로 발현되는 프로모터(뉴런-특이적 프로모터)이다. 예시적인 뉴런-특이적 프로모터는 시냅신 I 프로모터, CamKII 프로모터, MeCP2 프로모터, NSE 프로모터, 및 Hb9 프로모터, 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현양태에서, 프로모터는 신경아교세포에서 발현되지 않거나 더 낮은 수준으로 발현된다. 일부 구현양태에서, 프로모터는 희소돌기아교세포 및/또는 성상세포에서 발현되지 않거나 더 낮은 수준으로 발현된다.

[0020] 일부 구현양태에서, 조절 요소는 뉴런-특이적 발현을 지시하기 위한 시냅신 I 프로모터, 또는 이의 기능적 유도체이다. 일부 구현양태에서, 프로모터는 예를 들어 GeneBank 수탁 번호 NM_006950(서열번호: 4)으로 표시되는 시냅신 I 프로모터이며, 이는 고도의 뉴런-특이적 및 장기간 전이유전자 발현을 부여한다. 시냅신 I 프로모터의 구조는 문헌에 기재되어 있다(Schloch 등, Neuron-specific Gene Expression of 시냅신 I, *J. Biol. Chem.* 271(6): 3317-3323 (1996)). 다양한 구현양태에서, 시냅신 I 프로모터는 뉴런-특이적 발현을 부여하는 NRSE/RE-1 서열을 포함하는(즉, 유지하는) 이의 기능적 유도체이다. 다양한 구현양태에서, 시냅신 I 프로모터는 서열번호: 4의 3' 말단의 적어도 약 250개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 300개 뉴클레오티드, 또는 적어도 약 350개 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 프로모터의 뉴런-특이적 또는 뉴런-선택적 발현이 유지되는 한, 시냅신 I 프로모터(또는 일부)는 약 20% 이하, 또는 약 10% 이하, 또는 약 5% 이하의 뉴클레오티드 변형을 가질 수 있다.

[0021] 일부 구현양태에서, 조절 요소의 제어 하에 있는 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체는 실질적으로 서열번호: 5에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0022] 다른 구현양태에서, 조절 요소는 희소돌기아교세포에서 WWOX 유전자의 발현을 지시하는 프로모터이다. 예시적인 프로모터는 MBP 프로모터, PLP1 프로모터 및 CNP 프로모터 또는 이들의 유도체를 포함한다. 일부 구현양태에서, 조절 요소는 성상세포에서 WWOX 유전자의 발현을 지시하는 프로모터이다. 예시적인 프로모터는 GFAP 프로모터 또는 S100b 프로모터, 또는 이들의 유도체를 포함한다.

[0023] 일부 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자 또는 프로모터는 시냅신 I 프로모터 또는 다른 뉴런-특이적 프로모터의 원위 부분을 포함할 수 있는 하나 이상의 인헨서 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현양태에서, 프로모터는 뉴런에서 발현 수준을 증가시키기 위해 하나 이상의 뉴런-특이적 또는 뉴런-선택적 인헨서를 포함한다(Charron G. 등, Multiple Neuron-specific Enhancers in the Gene Coding for the Human Neurofilament Light Chain. *J.*

Biol. Chem. 270(51):3064-30610 (1995)).

- [0024] 다양한 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자 또는 기능적 유도체는 mRNA 안정성을 향상시키는 비번역 서열(예를 들어, 3'-UTR)을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현양태에서 WWOX 야생형 유전자는 β -글로빈 mRNA 3'-UTR, 또는 mRNA 안정성을 부여하는 β -글로빈 mRNA 3'-UTR의 성분을 함유할 수 있다. 일부 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자는 뉴런에서 낮은 회전율을 나타내는 mRNA로부터의 3' 비번역 서열을 포함한다. 일부 구현양태에서, 전사된 WWOX 뉴클레오티드 서열은 안정성을 향상시킬 수 있는 하나 이상의 우드척 간염 전사 후 조절 요소(WPRE)를 포함한다. 일부 구현양태에서 WPRE는 WWOX 유전자의 3' UTR에 포함된다.
- [0025] 일부 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자는 GFP 또는 RFP와 같은 형광 단백질을 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 검출가능한 표지와 함께 전달되어 WWOX-함유 발현 작제물의 발현을 시각화할 수 있다.
- [0026] 일부 측면에서, WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체(또는 이의 단편)는 Cas 엔도뉴클레아제 효소 또는 Cas 엔도뉴클레아제 효소를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 가이드 RNA(gRNA) 또는 gRNA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 함께 전달되어 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 일부의 삽입을 지시하거나 향상시킨다. 일부 구현양태에서, WWOX-연관 CNS 질병은 WWOX에서 알려진 돌연변이를 특징으로 한다. 그러한 구현양태에서, 돌연변이된 영역에 상보적인 gRNA 또는 상기 gRNA를 코딩하는 DNA 서열은 Cas 엔도뉴클레아제와 함께 전달된다. 이들 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자는 Cas 엔도뉴클레아제 효소(예를 들어, Cas9)에 의해 절단되는 돌연변이된 서열을 대체하기 위한 WWOX 야생형 유전자의 단편일 수 있다.
- [0027] 예를 들어, 개체에서 WWOX 유전자의 정확한 돌연변이가 알려진 경우, 개체의 뇌에 Cas 엔도뉴클레아제(예를 들어, Cas9) 효소 및 돌연변이된 서열을 표적으로 하는 gRNA를 투여하여 개체를 치료하며, 돌연변이된 서열은 돌연변이된 영역을 절단함으로써 및/또는 돌연변이된 영역의 서열을 야생형 영역의 서열로 교체함으로써 야생형 형태로 되돌아가도록 편집될 수 있다. 일부 돌연변이의 경우, Cas 엔도뉴클레아제에 의한 돌연변이된 서열의 단순한 절단은 기능적인 WWOX 유전자를 생성할 것이다. 다른 돌연변이의 경우, 돌연변이된 서열을 절단할 뿐만 아니라 야생형 서열(WWOX 야생형 유전자의 단편)로 교체하는 것도 필요할 것이다. 그러한 경우에, 방법은 돌연변이된 서열을 대체하기 위해 WWOX 야생형 유전자의 단편에 상응하는 공여체 DNA 서열의 투여를 또한 포함할 것이다.
- [0028] 일부 구현양태에서, Cas 엔도뉴클레아제(예를 들어, Cas9)는 단백질로서 뇌 세포에 투여될 수 있거나 효소를 코딩하고 뇌 세포(예를 들어, 뉴런에서)에서 발현될 수 있는 폴리뉴클레오티드로서 투여될 수 있다. 일부 구현양태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 본원에 기재된 바와 같이 뉴런-특이적 프로모터(예를 들어, 시냅신 I 프로모터)를 통해 발현된다. 일부 구현양태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 mRNA로 전달되므로 형질주입된 세포에서 전사를 필요로 하지 않는다.
- [0029] Cas 엔도뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 사용되는 경우, WWOX 유전자에 대해 본원에 기재된 바와 같은 프로모터 및 전달 벡터가 사용될 수 있거나, AAV6 및 렌티바이러스 벡터와 같은 더 긴 폴리뉴클레오티드(Cas 엔도뉴클레아제-코딩 폴리뉴클레오티드 전달에 더 적합할 수 있다)를 전달할 수 있는 전달 벡터가 사용될 수 있다. Cas 엔도뉴클레아제가 단백질로서 전달되는 경우, 전달 입자, 리포솜 등이 뇌(예를 들어, 뉴런)로의 전달을 위해 사용될 수 있다.
- [0030] 마찬가지로, gRNA는 WWOX 유전자에 대해 본원에 기재된 전달 및 프로모터 시스템을 사용하여 RNA 분자 또는 gRNA를 코딩하는 DNA 분자로서 전달될 수 있다. 일부 구현양태에서, gRNA는 뉴런-특이적 프로모터를 통해 발현된다.
- [0031] 돌연변이된 DNA를 대체하기 위한 WWOX 폴리뉴클레오티드는 별도의 서열로 투여될 수 있거나 Cas 엔도뉴클레아제 및 gRNA를 코딩하는 서열을 함유하는 벡터의 일부로 전달될 수 있다. 그러한 경우에 공여체 DNA는, 예를 들어 Cas 엔도뉴클레아제의 도움으로 공여체를 평활 말단(blunt ends)으로 벡터 밖으로 절단할 수 있는 "공여체-특이적" 가이드 RNA의 두 번째 세트를 사용하여 벡터에서 절단될 수 있다.
- [0032] *S. 파이오케네스(pyogenes)* 및 *S. 써모필러스(thermophilus)* Cas9를 포함하여 다양한 종의 Cas 엔도뉴클레아제(예를 들어, Cas9) 분자가 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 다른 Cas 엔도뉴클레아제는 미국 특허 공개 번호 20160010076(이는 전체 내용에 참조로 포함된다)에 기재되어 있다. 본원에 기술된 작제물 및 방법은 Cas9 효소를 포함하는 임의의 Cas 엔도뉴클레아제 및 이들의 상응하는 gRNA 또는 호환가능한 다른 gRNA의 사용을 포함할 수 있다. 스트렙토코쿠스써모필러스(*Streptococcus thermophilus*) LMD-9 CRISPR1 시스템의 Cas9는 인간 세포에서 기능하는 것으로 나타났다(Cong 등, *Science* 339, 819 (2013)).

- [0033] 가이드 RNA는 일반적으로 두 가지 다른 시스템으로 나온다: Cas9에 의한 절단을 가이드하기 위해 함께 기능하는 별도의 crRNA 및 tracrRNA를 사용하는 시스템 1, 및 단일 시스템(단일 가이드 RNA 또는 sgRNA라고 지칭, Jinek 등, *Science* 2012; 337:816-821 참조)에서 두 개의 별도의 gRNA를 조합하는 키메라 crRNA-tracrRNA 하이브리드를 사용하는 시스템 2. tracrRNA는 다양하게 절단될 수 있으며 길이 범위는 별도의 시스템(시스템 1)과 키메라 gRNA 시스템(시스템 2) 모두에서 기능하는 것으로 나타났다.
- [0034] Cas 엔도뉴클레아제는 게놈 DNA 표적 부위의 상보적 가닥에 상보적인 5' 말단에서 17-20 nts를 보유하는, gRNA, 예를 들어 sgRNA 또는 tracrRNA/crRNA를 사용하여, 예를 들어 서열 NGG의 추가 근위 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)를 보유하는 특정 17-20 nt 게놈 표적으로 유도될 수 있다. 따라서, 구현양태는 일반적으로 트랜스-코딩된 tracrRNA, 예를 들어 문헌(in Mali 등, *Science* 2013 Feb. 15; 339(6121):823-6)에 기재된 바와 같은, 프로토스페이서 인접 모티프(PAM), 예를 들어 NGG, NAG 또는 NNGG의 바로 5'에 있는 표적 서열에 대한 상보적 가닥의 표적 서열, 예를 들어 25-17개, 임의로 20개 이하의 뉴클레오티드(nts), 예를 들어 20, 19, 18, 17 nt, 바람직하게는 17 또는 18 nt에 상보적인 5' 말단에서 서열을 갖는 단일 Cas9 가이드 RNA에 융합된 crRNA를 포함하는 단일 가이드 RNA를 사용할 수 있다. gRNA는 임의의 서열일 수 있는 X.N을 포함할 수 있으며, 여기서 N(RNA에서)은 리보핵산의 Cas9에 결합을 방해하지 않는 0-200, 예를 들어 0-100, 0-50 또는 0-20일 수 있다.
- [0035] 일부 구현양태에서, gRNA는 3' 말단에 하나 이상의 아데닌(A) 또는 우라실(U) 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현양태에서 gRNA는 RNA PolIII 전사를 종결시키기 위한 종결 신호로서 사용되는 하나 이상의 T의 임의의 존재의 결과로서 하나 이상의 U, 예를 들어 분자의 3' 말단에 1-8개 이상의 U를 포함한다.
- [0036] 일부 구현양태에서, gRNA는 표적의 효과를 최소화하기 위해 나머지 게놈의 임의의 서열과 상이한 적어도 3개 이상의 미스매치인 부위를 표적으로 한다. 잠금 핵산(LNA)과 같은 변형된 RNA 올리고뉴클레오티드는 변형된 올리고뉴클레오티드를 보다 바람직한(안정된) 형태로 고정함으로써 RNA-DNA 혼성화의 특이성을 증가시키는 것으로 입증되었다. 따라서, 본원에 개시된 gRNA는 하나 이상의 변형된 RNA 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 절단된 가이드 RNA 분자는 표적 서열에 상보적인 가이드 RNA의 영역 중 하나, 일부 또는 전부가 변형된, 예를 들어 잠금(2'-O-4'-C 메틸렌 브리지), 5'-메틸시티딘, 2'-O-메틸-슈도우리딘, 또는 리보스 포스페이트 백본이 폴리아미드 사슬(펩티드 핵산)로 대체된 것, 예를 들어 합성 리보핵산을 가질 수 있다.
- [0037] gRNA는 그 자체로 또는 발현 벡터로 제공될 수 있다. gRNA를 발현하기 위한 벡터는 gRNA의 발현을 유도하기 위한 RNA Pol III 프로모터, 예를 들어 H1, U6 또는 7SK 프로모터를 포함할 수 있다. 이러한 인간 프로모터는 플라스미드 형질주입 후 포유동물 세포에서 gRNA의 발현을 가능하게 한다. 대안적으로, 예를 들어 시험관내 전사를 위해 T7 프로모터가 사용될 수 있고, RNA는 시험관내에서 전사되고 정제될 수 있다. 짧은 RNA, 예를 들어 siRNA, shRNA 또는 기타 작은 RNA의 발현에 적합한 벡터를 사용할 수 있다.
- [0038] 서열(프로모터 및 유전자 및 임의로 추가 서열)의 전달은 CNS로의 직접 전달 또는 전신 전달에 의해 CNS로의 전달에 적합한 임의의 전달 시스템에 의해 수행될 수 있다. 다양한 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체는 바이러스 벡터, 중합체 나노입자, 무기 나노입자, 지질 나노입자 또는 엑소솜을 사용하여 전달된다. 일부 구현양태에서, WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체는 바이러스 벡터에 의해 전달된다. 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV) 전달 시스템일 수 있다. 일부 구현양태에서, AAV 전달 시스템은 다른 AAV 혈청형보다 혈액-뇌 장벽을 더 잘 통과하는 AAV9이다. 사용될 수 있는 추가 바이러스 전달 시스템에는 렌티 바이러스 및 단순 헤르페스 바이러스 전달 시스템이 포함된다.
- [0039] CNS에 대한 또 다른 적합한 전달 비히클은 전형적으로 200 nm 미만, 또는 약 150 nm 미만, 또는 약 100 nm 미만의 크기를 갖는 나노입자를 포함한다. 여기에는 지질-기반 나노입자, 중합체 나노입자, 덴드리머 및 무기 나노입자가 포함될 수 있으며, 이들 중 일부는 혈액 뇌 장벽(BBB)을 통과하도록 조정될 수 있다. 일부 구현양태에서, 전달 시스템은 BBB를 통한 나노입자 흡수를 향상시키기 위해 수송체 또는 수용체의 리간드를 사용함으로써 전달을 능동적으로 표적화한다. 이 접근법에 대한 바람직한 경로는 화물(예를 들어, 나노입자)이 뇌 EC의 정점과 기저측 표면 사이를 수송하는 수용체(또는 수송체)-매개 통과세포외배출이다. 예를 들어, 저밀도 지단백질은 리소솜 구획을 우회하고 뇌 측의 기저측 표면에서 방출하는 수용체-매개 과정에 의해 EC를 통해 통과세포외배출을 겪는다. 또한, BBB는 아미노산에 대한 수송체를 함유하고 있기 때문에, 전달을 위해 자연적으로 존재하는 아르기닌 수송체를 사용하는 것이 뇌로의 전달을 위한 하나의 접근법이다.
- [0040] 뇌 전달을 위한 또 다른 비히클은 세포에서 분비되는 작은 세포외 소포인 엑소솜이다. 다른 합성 나노입자에 비해 엑소솜의 주요 이점은 비-면역성 특성으로 길고 안정적인 순환을 유도한다.

- [0041] 일부 구현양태에서, 뇌로의 전달은 BBB를 일시적으로 열고 고농도의 전신 투여된 폴리뉴클레오티드가 뇌에 도달하도록 하는 화합물 또는 전기 자극을 사용한다. 그러한 화합물의 예는 세레포트(브래디키닌 유사체) 또는 레가데노손(아데노신 수용체 작용제)이다. 침투를 증가시키는 또 다른 방법은 약물이 BBB를 통과하도록 촉진하는 매력적인 기술인 초음파를 이용하는 것이다. 비침습적 기법인 미세기포-강화 진단 초음파(MEUS)는 약물이 BBB를 통과하도록 효과적으로 돕는다. 또 다른 접근법은 뉴런 활동을 자극하고 글루타메이트 방출을 증가시켜 BBB를 통한 전달을 촉진하는 경두개 자기 자극(TMS)이다(Review by Xiaowei Don, 2018; 8(6): 1481-149- 전체 내용이 참조로 여기에 포함된다).
- [0042] 원하는 전달 비히클의 투여 경로는 추가 조작 없이 전신 전달될 수 있고(본질적으로 BBB에 들어가는 입자 또는 바이러스 벡터 사용); 또는 BBB를 일시적으로 개방하는 다양한 조작(예를 들어, 미세기포-강화 진단 초음파(MEUS), 경두개 자기 자극(TMS))과 관련하여 전신적일 수 있다. 다른 구현양태에서, 전달은 비강 투여에 의한 것이다.
- [0043] 또 다른 구현양태에서, 뇌로의 전달은 뇌실내 경로를 통해 뇌척수액으로 전달된다. 또 다른 옵션은 뇌척수액(CSF)으로의 전달을 위한 대체 방법인 대조(cisterna magna) 주사 경로로의 전달이며, 이는 CNS 전체에 광범위하게 유전자 전달을 초래한다. 일부 구현양태에서, 투여는 실질로의 직접 주사 또는 뇌실내를 통한 뇌척수액으로의 주사 및 척수강내(수조 또는 요추) 경로에 의한 것이다.
- [0044] 일부 구현양태에서, 치료될 개체는 소아 또는 신생아 환자(예를 들어, WOREE 또는 SCAR12를 갖는 환자)이다. 일부 구현양태에서, 조기 치료는 성장 장애, 간질 에피소드, 인지 기능 장애 및 정신 지체와 같은 질병의 일부 임상적 매개변수의 징후를 예방한다. 일부 구현양태에서, 개체는 성인 환자(예를 들어, WOREE 또는 SCAR12를 갖는)이고, 치료는 간질 에피소드와 같은 하나 이상의 임상 매개변수를 개선할 수 있다. 다양한 구현양태에서, 개체 또는 환자는 성장 장애, 간질 에피소드, 인지 기능 장애, 사회적 기능 장애, 생식 능력 장애, 운동 실조증, 망막병증, 정신 지체 및 소두증으로부터 선택되는 하나 이상의 증상을 나타낸다. 다양한 구현양태에서, 치료는 WOREE 또는 SCAR12 환자에 대한 간질 에피소드의 빈도 및/또는 중증도를 실질적으로 감소시킨다.
- [0045] 다양한 구현양태에서, 개체에게 10, 9, 8, 7, 6, 5 또는 4회 이하의 투여 에피소드가 있다. 다양한 구현양태에서, 3회 이하의 투여 에피소드가 있다. 일부 구현양태에서, 2회 이하의 투여 에피소드가 있다. 예를 들어, 다양한 구현양태에서 하나의 투여 에피소드가 있다.
- [0046] 예를 들어, 일부 구현양태에서, 본 발명은 WOREE 증후군 또는 SCAR12의 치료 방법을 제공하며, 이 방법은 이러한 치료가 필요한 환자의 뇌에 시냅신 I 프로모터의 제어 하에 WWOX 야생형 유전자(즉, 서열번호: 2의 폴리펩티드를 코딩하는)를 포함하는 AAV9 유전자 전달 시스템을 투여하는 것을 포함한다. AAV9 전달 시스템은 실질적으로 서열번호: 1, 서열번호: 3, 서열번호: 4, 및/또는 서열번호: 5에 제시된 바와 같은 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.
- [0047] 다른 측면에서, 본 개시내용은 뉴런-특이적 프로모터의 발현 제어 하에 WWOX 야생형 유전자 또는 이의 기능적 유도체를 포함하는 발현 작제물을 제공한다. 예시적인 뉴런-특이적 프로모터는 시냅신 I 프로모터, CamKII 프로모터, MeCP2 프로모터, NSE 프로모터, 및 Hb9 프로모터, 또는 이들의 유도체를 포함한다. 다양한 구현양태에서, 프로모터는 이미 기재된 바와 같은 시냅신 I 또는 이의 유도체이다. 일부 구현양태에서, 뉴클레오티드 서열은 실질적으로 서열번호: 1, 3, 5 및/또는 5에 제시된 서열을 포함한다.
- [0048] 다양한 구현양태에서, 발현 작제물은 아데노-연관 바이러스(AAV) 전달 시스템과 같은 바이러스 벡터이다. 일부 구현양태에서, 발현 작제물은 AAV9 전달 시스템이다. 이러한 벡터에 대한 구체적인 예는 도 7a에 도시되어 있다.
- [0049] 일부 구현양태에서, 발현 작제물은 뇌에 투여하기 위한 약제학적 조성물에 포함된다. 조성물은 뇌 또는 CNS로의 직접 주사 또는 전신 투여를 포함하는 주사에 적합한 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 것이다.
- [0050] 또 다른 측면에서, 본 발명은 약제학적 조성물을 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하여, WOREE 증후군 또는 SCAR12를 치료하는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 WOREE 또는 SCAR12의 치료에서 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.
- [0051] 정의
- [0052] 본 출원을 더 완전하게 이해할 수 있도록 하기 위해 몇 가지 정의가 아래에 제시되어 있다. 이러한 정의는 문법적 등가물을 포함하는 것을 의미한다.

- [0053] "하나"라는 용어는 해당 엔티티 중 하나 이상을 의미한다. 즉, 복수 대상을 의미할 수 있다. 이와 같이, 용어 "하나", "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 또한, 부정관사 "하나"에 의한 "하나의 요소"에 대한 언급은 문맥상 분명히 하나의 요소만 존재한다고 요구하지 않는 한, 하나 이상의 요소가 존재할 가능성을 배제하지 않는다.
- [0054] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여 퍼센트 "동일성" 또는 "서열 동일성"이라는 용어는 비교 및 하기 기술된 서열 비교 알고리즘(예를 들어, BLASTP 및 BLASTN 또는 당업자에게 이용가능한 다른 알고리즘) 중 하나를 사용하여 또는 육안 검사에 의해 측정된 바와 같이 최대 일치율을 위해 정렬될 때, 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 특정 백분율을 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 의미한다.
- [0055] 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 용어 "약"은 연관된 값의 $\pm 10\%$ 를 의미한다.
- [0056] **실시예**
- [0057] 실시예 1: WOREE 증후군과 연관된 Wwox의 뉴런 결실은 간질 및 미엘린 결함을 유발한다.
- [0058] WW 도메인-함유 산화환원효소(WWOX) 유전자는 가장 활동적인 염색체 취약 부위 중 하나인 FRA16D^{1,2}를 포함하는 염색체 16q23.1-q23.2에 매핑된다. WWOX는 여러 유형의 암에서 단백질-단백질 상호작용 능력을 통해 문서화된 종양 억제 기능을 가진 46kDa 단백질을 코딩한다^{3,4}. 실제로 WWOX는 스캐폴드 단백질로 작용하여 파트너의 국소화, 안정성 및 기능을 조절한다.⁵ 몇 가지 증거는 WWOX 기능을 계놈 안정성, 세포 대사 및 세포골격 구성 유지와 연결한다.^{1,3,6,7} 놀랍게도 중추신경계(CNS) 세포에서 높은 수준의 WWOX가 관찰되며^{8,9}, 이는 CNS 생물학에서 WWOX의 중요한 역할을 시사한다. 그러나 CNS 발달 및 질병에서 WWOX의 정확한 역할은 알려져 있지 않다.
- [0059] 최근 몇 년 동안 WWOX 유전자의 생식계 열성 돌연변이(미스센스, 넌센스 및 부분/완전 결실)는 SCAR12(척수소뇌 운동실조증, 상염색체 열성-12, OMIM 614322) 및 WOREE 증후군(WWOX-연관 간질성 뇌병증)과 관련이 있었고, 후자는 초기 영아 간질성 뇌병증-28(EIEE28, OMIM 616211)으로도 알려져 있다.^{10,11} 이 질병의 중증도는 돌연변이 유형과 WWOX 발현에 미치는 영향에 크게 좌우되는 것으로 가정되었다. 예를 들어, 가장 심각한 표현형은 WWOX가 완전히 소실되어 난치성 발작과 출생 전 또는 출생 후 사망을 초래하는 WOREE 증후군을 보유하는 어린이에게서 관찰되었다.¹⁰ 대부분 WWOX의 미스센스 돌연변이로 인해 SCAR12를 가진 개체는 운동 실조증 및 간질을 포함하여 더 가벼운 표현형을 보였다.^{10,11} 최근, 고부정외과를 동반한 간질 경련을 특징으로 하는 웨스트 증후군^{12,13} 환자에서도 WWOX 돌연변이가 발견되었다. WWOX에서 돌연변이를 지닌 어린이의 뇌 자기 공명 영상(MRI)은 뇌량의 형성 부전, 진행성 대뇌 위축, 지연된 수초화 및 시신경 위축을 포함한 대부분의 경우에서 이상을 나타냈다.^{10,14-18} WWOX의 결함이 어떻게 이러한 신경학적 이상을 초래하는지는 대체로 알려지지 않았다.
- [0060] 무린 Wwox의 표적 결실 및 Lde 랫트의 자발적인 Wwox 돌연변이는 간질 발작, 성장 지연, 운동 실조증 및 출생 후 치사율을 포함하는 복잡한 인간 신경학적 표현형을 표현형모사했다.^{11,19-21} Wwox 모델과 인간 질병의 주요 세포 및 분자 역할자에 대해 더 자세히 밝히기 위해, 신경 줄기 및 전구체(*Nestin-Cre* 사용, N-KO), 성숙한 뉴런(*Synaspin I-Cre*; S-KO), 회소돌기아교세포(*Olig2-Cre*; O-KO) 또는 성상세포(*GFAP-Cre*; G-KO)에서 Wwox 결실을 포함하는 마우스 모델을 조건부로 생성했고, 이전에 설명한 Wwox-null 마우스와 함께 그들의 표현형 및 질병 메커니즘을 연구했다.^{19,20} 놀랍게도 신경 줄기 및 전구체(N-KO) 또는 신경 세포(S-KO 마우스)에서 Wwox를 삭제하면 3-4주까지 심각한 간질, 운동 실조증 및 조기 사망을 나타내며 Wwox-null 마우스에서 관찰된 표현형을 요약함이 밝혀졌다. S-KO 마우스의 분자 및 세포 변화를 특성화한 결과 WWOX의 비-세포 자율 기능으로 인해 현저한 저수초화 및 성숙한 회소돌기아교세포의 수의 감소가 밝혀졌다. 또한, 인간 배아 줄기 세포(hESC)에서 WWOX의 완전한 손실 및 인간 회소피질 회전타원체(OS)의 생성을 모델링하여 간질 및 저수초화에서 WWOX의 역할을 추가로 확인했다. 이러한 발견은 CNS 생물학에서 WWOX의 중심 역할과 WWOX-관련 신경 장애를 치료하는 치료 가능성을 강조한다.
- [0061] 재료 및 방법
- [0062] 세포 배양 및 플라스미드
- [0063] WiBR3 hES 세포는 FGF/KOSR 조건에서 조사된 DR4 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 피더 플레이트에서 5% CO₂ 조건으로 유지되었다: 15% 녹아웃 혈청 대체물(KOSR, Gibco; 10828-028), 1% 글루타맥스(GlutaMax)(Gibco; 35050-

038), 1% MEM 비-필수 아미노산(NEAA, Biological Industries; 01-340-1B), 1% 나트륨-피루베이트(Biological Industries; 03-042-1B), 1% 페니실린-스트렙토마이신(P/S, Biological Industries; 03-031-113) 및 8 ng/mL bFGF(Peprotech; 100-18B)이 보충된 DMEM-F12(Gibco; 21331-020 또는 Biological Industries; 01-170-1A). 배지는 매일 갈아주었으며 배양액은 트립신 유형 C(Biological Industries; 03-053-1B)로 트립신 처리하여 5-7일마다 계대했다. 트립신 처리 후 24-48시간 동안 hESCs를 Rho -연관 키나아제 억제제(ROCKi, Y27632로도 알려짐)(Cayman; 10005583)로 10 μ M 농도로 처리했다. hESC의 형질주입을 위해, 세포를 전기천공 24시간 전에 10 μ M ROCKi에서 배양하였다. 트립신 C 용액을 사용하여 세포를 분리하고 총 100 μ g DNA 작제물(pNTK-GFP와 1:5 비율로 혼합된 sgRNA 표적 엑손 1을 함유하는 px330 플라스미드)과 혼합된 PBS(Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 포함)에 재현탁하고 진 펄서 엑셀(Gene Pulser Xcell) 시스템(Bio-Rad; 250V, 500 μ F, 0.4 cm 큐벳)에서 전기천공되었다. 이어서 상기 언급된 조건에서 세포를 MEF 피더 층 상에 플레이팅하였다. 48시간 후, GFP-양성 세포를 분류하고 약 10일 후 집락 분리를 위해 MEF 피더 플레이트 상에 드문드문(10 cm 플레이트당 2,000개 세포) 플레이팅했다.

[0064] 마우스

[0065] Wwox null 마우스의 생성은 이전에 문서화되었으며¹⁹ 이 마우스는 FVB 배경에서 유지되었다. Wwox 게놈 유전자좌의 엑손 1에 플랭킹하는 두 개의 loxp 부위(Wwox^{fllox/fllox})가 있는 마우스는 이전에 문서화되었다²². 현재 연구에서, 이 마우스를 사용하여 CNS 세포에서 조건부로 WWOX 발현을 제거했다. 네스틴(Nestin)(원래 Jax 라인 스톡: 003771, B6.Cg-Tg(Nes-cre)1Kln/J)의 프로모터 하에 트랜스제닉 Cre 재조합효소를 보유하는 마우스는 히브리 대학-하다사 치과 의과 대학의 탈 버스틴-코헨(Tal Burstyn-Cohen) 박사의 관대한 선물이다. 시냅신(시냅신) I-Cre(스톡: 003966, B6.Cg-Tg(Syn1-cre)671Jxm/J), Olig2-Cre(스톡:025567, B6.129-Olig2^{tm1.1(cre)Wdr}/J) 및 GFAP-Cre(B6.Cg-Tg(Gfap-cre)77.6Mvs/2J) 마우스 계통은 미국 잭슨 연구소에서 구입하였다. 트랜스제닉 Cre 재조합효소를 보유하는 Wwox^{fllox/fllox} 마우스는 Wwox의 동형접합성 조건부 결실로 간주되고 N-KO(Wwox^{fllox/fllox}; Nestin-Cre⁺), S-KO(Wwox^{fllox/fllox}; 시냅신-Cre⁺), O-KO(Wwox^{fllox/fllox}; Olig2^{cre/+}) 및 G-KO(Wwox^{fllox/fllox}; Gfap-Cre⁺)로서 표현되었다. 모든 마우스는 꼬리/귀 DNA를 추출하여 특정 프라이머를 사용하여 PCR-유전자형을 결정했다. 모든 조건부 모델은 유전적 배경이 혼합된 C57BL6/J;129sv에서 유지되었다. 모든 조건부 모델은 Rosa26-loxp-STOP-tdTomato 리porter 대립유전자를 함유했다. 동물은 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있는 12시간-명/암 주기로 SPF 장치에서 유지되었다. 모든 동물 관련 실험은 히브리 대학 기관 동물 관리 사용 위원회(HU-IACUC)의 사전 승인에 따라 수행되었다.

[0066] DRG-OPC 공동-배양

[0067] DRG 뉴런과 OPC의 공동-배양 실험은 이전에 발표된 프로토콜²³에 따라 수행되었다. 간단히 말해서, DRG 뉴런은 E13.5에서 마우스 배아로부터 분리되었다. 배아는 유전자형이 결정되었고 DRG는 차가운 L-15 배지에서 수집되었다. 조직을 0.25% 트립신에서 해리하고 분쇄하고 원심분리하고 NB 배지(Neurobasal, B27 보충제, 0.5 mM L-글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신)에 재현탁했다. 사전-세척된 13 mm 직경의 유리 커버슬립을 4-웰 접시에 놓고, 해부 전에 매트릭셀(Matrigel)(RT에서 1시간)로, 이어서 폴리-D-라이신(RT에서 30분)으로 코팅했다. 세포를 NB 배지에 40,000개 세포/13 mm 커버슬립의 밀도로 플레이팅하고 37°C 및 5% CO₂의 가습 인큐베이터에서 유지했다. 배양물을 DIV2, 4 및 6에서 플루오로데옥시우리딘으로 처리하여 비-신경세포를 제거하였다. 세포 배지의 50%를 3일마다 교체하고 OPC를 DIV15에 첨가했다. OPC는 각각 P0-P2 마우스 새끼로부터 분리되었다. 피질을 얼음처럼 차가운 L-15 배지에서 분리하고 주사기(마우스 조직의 경우 19G에 이어 21G)를 사용하여 해리하고 분쇄하고 원심분리한 다음 PDL-코팅된 플라스크에서 신경아교 플레이팅 배지(10% 태아 소 혈청, 페니실린 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM)에 재현탁했다. 신경아교세포는 37°C, 5% CO₂의 가습 인큐베이터에서 유지되었고 세포 배지의 50%는 3일마다 교체되었다. DIV10에서 플라스크를 격렬하게 흔들어 OPC를 분리한 다음 배양 접시에 빠르게 부착하여 성장세포를 고갈시키거나(37°Cx3에서 10분), 정제된 OPC(200,000/커버슬립)를 DRG 뉴런 배양물에 시딩하고 공동-배양 배지(B27 및 N2 보충제 함유 DMEM, 5 mg/ml N-아세틸-시스테인, 5 mM 포스폴린, 페니실린-스트렙토마이신)에서 유지했다. 9-11일 동안 격일로 배지를 교체한 후 배양액을 고정하고 염색하여 분석하였다.

[0068] 희소피질 회전타원체 생성 및 배양

- [0069] 이전에 기술된²⁴ 바와 같이 hESC로부터 대뇌 오가노이드를 생성하였다. 간단히 말해서, 인간 WiBR3 세포는 유사 분열적으로 불활성화된 MEF에서 유지되었다. 프로토콜 시작 4-7일 전에 세포를 MEF-코팅된 60 mm 플레이트에 계 대하고 70-80% 컨플루언시(confluency)에 도달할 때까지 성장시켰다. 0일에 hESC 집락을 0.7 mg/ml 콜라게나제 D 용액(Sigma; 11088858001)을 사용하여 MEF에서 분리하고 2분 동안 트립신 유형 C를 사용하여 단일 세포 현탁 액으로 해리했다. 해리 후, 세포를 계수하고 20% KOSR, 1% 글루타맥스(GlutaMax), 1% NEAA, 1% P/S 및 100 μ M 2-머캅토에탄올(Sigma; M3148)이 보충된 DMEM/F12와 10 μ M 돌소모르핀(Dorsomorphin)(Sigma; P5499) 또는 100 nm LDN-193189(Axon medchem; Axon1509), 및 10 μ M SB-431542(Sigma; S4317) 및 10 μ M Rocki가 보충된 hESCs 배지에 현탁시키고, 0.22 μ m 필터를 통해 멸균시켰다. 배아체(EBs) 형성을 위해 10,000개의 세포를 초-저 부착 (ULA, ultra-low attachment) 96 v-웰 플레이트(S-Bio Prime; MS-9096VZ)의 각 웰에 시딩하였다. 돌소모르핀 /LDN-193189 및 SB-431542를 새로 첨가하여 6일까지 배지의 절반(웰당 약 100 μ l)을 흡인 및 교체하여 매일 EB 에 공급했다.
- [0070] 7-50일에 사용된 모든 배지는 신경기저(Neurobasal) 배지(Gibco; 21103049 또는 Biological Industries; 06-1055-110-1A), 2% B27 보충제(Gibco; 17504044), 1% 글루타맥스(GlutaMax), 1% P/S로 구성된 신경 배지(NM)를 기반으로 및 27일부터 0.22 μ m 필터를 통해 멸균된 1% 매트릭셀(Matrigel)(Corning; 356231)을 기반으로 했다. 7일째에 배지의 약 75%를 20 ng/ml FGF-2 및 20 ng/ml EGF(Peprotech; AF-100-15)로 보충된 NM으로 구성된 EB-확장(EBX) 배지로 교체했다. EBX 배지의 절반은 15일까지 매일 교체했고, 그 이후에는 배지의 절반을 격일로 교 체했다. 20일경에, 회전타원체는 96-웰 플레이트를 과도하게 성장시켰고, 따라서 24-웰 ULA(Corning; 3473)로 옮겼고, 26일까지 격일로 배지의 반을 교체했다. 27일에 회전타원체는 90 mm 멸균, 무처리 배양 접시 (Miniplast; 825-090-15-017)로 옮기고 배지를 20 ng/ml BDNF(Peprotech; 450-02) 및 20 ng/ml NT-3(Peprotech; 450-03)가 보충된 NM로 구성된 신경-분화배지(NDM)로 변경하였다. 41일째에 배지를 보충 없이 NM 으로 변경했다.
- [0071] 51일 이후부터 모든 배지는 1% B27 보충제, 1% 글루타맥스, 1% P/S 및 1% 매트릭셀이 보충된 신경기저 (Neurobasal) 배지를 포함하는 올리고 숙성 배지(OMM, Oligo Maturation Medium)을 기반으로 했으며 2일마다 절반의 배지를 교체했다. OPC 확장을 위해, 51일에 배지를 10 ng/ml PDGF-AA(R&D systems; 221-AA) 및 10 ng/ml IGF-1(R&D systems; 291-G1)이 보충된 OMM으로 구성된 OPC 확장 배지(OEM)로 변경했고, 2일마다 배지의 절반을 교체했다. 희소돌기아교세포 분화를 위해, OMM에 40 ng/ml T3(Sigma; T2877)를 보충하여 올리고 분화 배 지(ODM)를 구성했다. 마지막으로, 71일 이후부터 회전타원체는 OMM에서 배양되었으며, 2일마다 완전한 배지로 교체했다.
- [0072] 프로토콜 전반에 걸쳐 회전타원체는 37°C 및 5% CO₂의 정적 조건에서 배양되었고, 성장 인자 및 사이토카인은 배지 변경 전에 신선하게 첨가되었으며, 회전타원체는 적어도 30일마다 한 번씩 새로운 플레이트로 옮겨졌다. 달리 명시되지 않는 한 모든 분석을 위해 동일한 배지의 오가노이드를 사용했다.
- [0073] 면역형광
- [0074] 상이한 유전자형(P17-P18)의 마우스를 CO₂로 안락사시키고 2% PFA/PBS로 경심 관류시켰다. 해부된 뇌는 30분 동 안 얼음에 포스트 고정되었다. 면역형광을 위해 뇌를 4°C에서 밤새 30% 수크로스에서 인큐베이션한 다음 OCT에 임베딩하고 저온 유지 장치를 사용하여 절편화(12-14 μ m)했다. 시상면 색션을 PBS로 세척하고 0.5%의 트리톤 X-100을 함유하는 5% 염소 혈청으로 차단한 다음 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음 4°C에서 밤새 1차 항 체와 함께 인큐베이션했다. 그런 다음 색션을 PBS로 세척하고 알렉사(Alexa) 형광단으로 태그된 해당 2차 항체 와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음 PBS로 세척하고 봉입제(mounting medium)로 봉입했다.
- [0075] 희소피질 회전타원체 고정 및 면역염색은 이전에 설명한 대로 수행되었다²⁵. 간단히 말해서, 오가노이드를 PBS에 서 3회 세척한 다음 4% 얼음처럼 차가운 파라포름알데히드에서 45분 동안 고정을 위해 옮기고 차가운 PBS에서 3 회 세척하고 30% 슈크로스 용액에서 밤새 평형화에 의해 냉동 보호했다. 다음 날, 회전타원체를 OCT에 임베딩하 고 드라이아이스에서 급속 냉동하고 라이카(Leica) CM1950 저온 유지 장치로 10 μ m로 절단했다. 면역형광 염색 을 위해, 색션을 실온으로 가온하고 재수 화를 위해 PBS에서 세척하고 PBS 중 0.1% 트리톤 X(PBT)에서 투과한 다음 5% 정상 염소 혈청(NGS), PBT 중에서 0.5% BSA를 함유하는 차단 완충액에서 1 시간 동안 차단시켰다. 그런 다음 색션을 차단 용액에 희석된 1차 항체와 함께 밤새 4°C에서 인큐베이션했다. 그 다음날, 색션을 0.05% 트윈 -20을 함유하는 PBS(PBST)에서 진탕하면서 3회 세척하고 2차 항체와 함께 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. 슬라 이드를 흔들면서 PBST에서 4회 세척한 다음 면역형광 봉입제(DAKO; s3023)를 사용하여 봉입했다.

- [0076] 룩솔 패스트 블루(Luxol Fast Blue) 염색
- [0077] 룩솔 패스트 블루(Luxol Fast Blue)(LFB) 염색은 노바 울트라 룩솔 패스트 블루(Nova Ultra luxol fast blue) 염색 키트를 사용하여 이전에 발표된 프로토콜²³에 따라 수행되었다. 간략하게, 각 유전자형의 적어도 3마리 마우스의 파라핀 임베딩된 뇌 섹션(6 μm)을 탈납하고 95% 에탄올로 재수화한 후 섹션을 LFB 용액(95% 에탄올 / 0.5% 아세트산 중 0.1% LFB)에서 56°C에서 밤새 인큐베이션했다. 섹션을 95% 에탄올과 ddH₂O에 이어 0.05% 탄산리튬으로 30초 동안 세척한 다음 70% 에탄올로 회백질이 무색이고 백색질이 파란색으로 나타날 때까지 세척했다. 그런 다음 섹션을 ddH₂O로 헹구고 예열된 0.1% 크레실 바이올렛 아세테이트 용액으로 30-40초 동안 대비염색했다. 마지막으로 섹션을 ddH₂O로 헹구고 100% 에탄올과 자일렌으로 탈수하고 수지 매체로 봉입했다.
- [0078] 전자현미경
- [0079] 마우스를 마취시키고 4% PFA, 2.5% 글루타르알데히드 및 0.1 M 카코딜레이트 완충액을 함유하는 고정액으로 관류시켰다. 뇌를 분리하고 고정액에서 밤새 실온에서 인큐베이션하고 이전에 설명한 대로 처리했다.²⁶ 샘플은 각각 XF416 TVIP 카메라 또는 US4000 가탄(Gatan) 카메라가 장착된 FEI 테크나이(Tecnai) T12 투과 전자 현미경 또는 테크나이(Tecnai) F20 S/TEM을 사용하여 검사했다. 컴퓨터-지원 ImageJ 분석 소프트웨어를 사용하여 EM 현미경 사진을 분석했다. g-비율을 계산하기 위해, 뇌량 또는 시신경의 EM 이미지에서 수초 축삭(~600, 마우스당 100개의 축삭, 유전자형당 n = 3)을 내부 축삭 직경을 전체 축삭 직경으로 나누어 분석했다.
- [0080] 이미지 획득 및 분석
- [0081] LFB 염색된 섹션은 파노라마 디지털 슬라이드 스캐너(3DHISTECH)를 사용하여 이미지화되었다. 면역 염색 섹션은 파노라마 디지털 슬라이드 스캐너 또는 올림푸스 FV1000 공초점 레이저 스캐닝 현미경 또는 니콘 A1R+ 공초점 현미경을 사용하여 이미지화되었다. 피질 및 소뇌에서 CNP 및 MBP 염색의 형광 합 강도는 NIS 요소 소프트웨어를 사용하여 계산되었다. 획득한 이미지는 관련 현미경 소프트웨어 프로그램인 케이스뷰어(CaseViewer), F-10-ASW 뷰어, NIS 요소를 사용하여 처리된다. ImageJ 소프트웨어를 사용하여 이미지를 분석했다. 유전자형에 대해 맹검 상태에서 이미지를 분석했으며 처리에는 밝기와 대비의 전반적인 변화가 포함된다.
- [0082] 자발적인 발작 기록
- [0083] 동물 시설에서 마우스를 모니터링할 때 자발적인 발작을 겪는 마우스를 모바일 카메라를 사용하여 기록했다. 자발적인 발작 또는 비정상적인 활동(야생 달리기)이 *Wwox* 돌연변이 마우스에서 관찰되었다. 자발 발작의 지속 시간(초)을 계산하여 제시했다, n = 6.
- [0084] 전기생리학
- [0085] *시냅신-Cre* 재조합효소를 사용하여 뉴런에서 *Wwox*를 조건부로 결실시킨 마우스에서 전기생리학적 기록을 수행했다. S-대조군(*Wwox*^{+/+}; *시냅신-Cre*⁺), S-HT(*Wwox*^{+/flox}; *시냅신-Cre*⁺) 및 S-KO(*Wwox*^{flox/flox}; *시냅신-Cre*⁺) P13-P17의 수컷 또는 암컷 마우스를 캐나다 동물 관리 협의회(CCAC)에서 설명한 지침에 따라 이러한 실험을 위해 인도적으로 죽였다. 모든 수술 절차는 대학 건강 네트워크의 동물 관리 위원회의 지침에 따라 승인되고 수행되었다.
- [0086] 생체내 준비. 인산염-완충 식염수(PBS)에 용해된 케타민-자일라진(10 mg/kg 자일라진이 포함된 100 mg/kg 케타민)을 마우스에 복강내 주사했다. 페달 반사는 마취의 깊이를 결정하는 데 사용되었다. 마우스가 깊이 마취되면, 정위 프레임에 배치시켰다. 절개 부위의 두개골 바로 위에 국소 마취제(리도칸)를 주입한 다음, 짧은 시간(약 5분) 후에 피부를 제거하고 두개골을 노출시켰다. 드릴을 사용하여 두개골에 스코어링(score)한 다음 겸자 세트를 사용하여 껍질을 벗기고 피질 조직을 드러냈다. 벽이 얇은 유리 전극(직경 1.5, World Precision Instruments)을 수직 풀러를 사용하여 당겼다. 이들은 PBS로 채워졌다. 전극은 브레그마(bregma)의 후방 1.6-2 mm와 정중선의 측면 4 mm에 위치했다. 신피질 피질 하부 뇌 및 해마 활동을 기록하기 위해 전극을 각 깊이에서 3분 동안 여러 깊이에 배치했다.
- [0087] 시험관내 준비. 마우스를 펜토바르비탈(50 mg/kg)로 마취시켰다. 마취의 깊이는 페달 반사를 사용하여 테스트되었다. 마우스를 깊이 마취시킨 후 신속하게 목을 베고 뇌를 제거했다. 소뇌와 후각 구근을 제거하고 조직의 나머지 부분을 248 수크로스, 26 NaHCO₃, 10 글루코스, 2 KCl, 3 MgSO₄-7H₂O, 1.25NaH₂PO₄, 1CaCl₂-2H₂O를 함유하는(mM로) 얼음처럼 차가운 수크로스 용액의 플랫폼 위에 꼬리 쪽이 아래로 향하게 놓았다. 신피질은 라이카

1200 진동기(vibratome)를 사용하여 400-500 μm 두께(0.6 mm/s 속도, 1mm 진폭)로 관상 절개되었다. 그 후, 절편은 123 NaCl, 25 NaHCO₃, 10 글루코스, 3.5 KCl, 1.3 MgSO₄·7H₂O, 1.2 NaH₂PO₄, 1.5 CaCl₂·2H₂O, pH 7.3-7.4를 함유하는(mM 단위) 인공 뇌척수액(ACSF)에서 인큐베이션되었다. 절편을 34°C에서 30분 동안 유지한 후, 실험 전에 적어도 60분 동안 실온에서 제거했다. ACSF가 함유된 로컬 필드 de전위(LFP, Local Field Potential) 유리 전극(1.5 mm, World Precision Instruments)을 수직 폴러(Narishige, Japan PP-83)를 사용하여 당겨 신피질 층 II 및 III 또는 해마의 CA3 영역에 위치시켰다. 적절한 전극 배치를 위한 지침으로 올림푸스(Olympus) BX51 현미경(OLY-150IR 카메라-비디오 모니터 장치)을 사용했다. 네트워크 흥분성을 평가하기 위해, 층 II/III의 기록과 동일한 수직 열을 따라 배치된 양극성 동심원 텅스텐 전극을 사용하여 층 V 피질 또는 치상회 자극을 수행했다. 광전 자극 격리 장치에 연결된 GRASS S88 자극기를 사용하여 30초마다 다양한 강도로 0.1 ms 지속 시간의 전류 펄스를 적용했다. S-대조군, S-HT 및 S-KO 마우스(100 μA)에 대한 최대 정상 상태 반응의 진폭을 비교했다.

[0088] 전력 스펙트럼 분석

[0089] 먼저 최종 샘플링 주파수가 1000 Hz가 되도록 데이터를 데시메이트했다. 다음으로, 데이터는 60 Hz 및 해당 고조파에서 노치 필터링되었다. 스펙트럼 전력은 빠른 푸리에 변환과 MATLAB에서 1 Hz의 빈 크기를 사용하여 분석되었다. 각 동물에 대해 5초의 중첩으로 10초 창을 사용하여 300 μm 깊이에서 2.5분 동안 파워 스펙트럼을 평균화했다. 파워 스펙트럼은 모든 대상체의 평균으로 플롯되었다.

[0090] 회소피질 회전타원체의 전기생리학 기록

[0091] 지정된 시점의 오가노이드를 3% 저온 겔화 아가로스(약 36°C)에 임베딩하고 얼음 위에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 4°C에서 수크로스 용액(mM: 87 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.5 KCl, 25 글루코스, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 1.25 NaHPO₄, 75 수크로스)에서라이카 1200 진동기(vibratome)를 사용하여 400 μm 로 절편화하였다. 절편을 인공 뇌척수액(ACSF, mM: 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.5 KCl, 10 글루코스, 2.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂; pH 7.38, 300mOsm)에서 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음 실온에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 기록하는 동안, 절편는 기준선 조건에서 관류된 카르보겐(95% O₂, 5% CO₂)과 함께 37°C에서 동일한 ACSF에서 인큐베이션되었다. 로컬 필드 전위(LFP) 및 전체-셀 패치 클램프 기록은 보로실리케이트 모세관 유리에서 끌어온 전극을 사용하여 수행되었으며 각 절편의 외부 테두리에서 150 μm 깊이에 위치했다(도 6a 참조). LFP 전극은 ACSF로 채우고 패치 전극은 내부 용액으로 채웠다. 데이터는 25,000 Hz의 샘플링 속도에서 멀티클램프(MultiClamp) 소프트웨어를 사용하여 기록되었다. MATLAB 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석했다. 노이즈를 제거하기 위해 (1) 60 노치 필터(고조파 5개 포함)와 (2) 기록 설정에서 변동을 제거하기 위해 0.1Hz 고역-통과 IIR 필터를 사용하여 트레이스를 필터링했다.

[0092] 통계 분석

[0093] 모든 그래프 또는 통계 분석은 엑셀 또는 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 5를 사용하여 수행되었다. 실험 결과는 평균 \pm SEM으로 표시되었다. 통계적 유의성을 테스트하기 위해 양측 언페어드 스튜던트 t-테스트를 사용했다. 결과는 P<0.05일 때 유의한 것으로 간주하고, 그렇지 않으면 ns(유의성 없음)로 표시했다. 데이터 분석은 유전자형에 대해 맹검 상태에서 수행되었다.

[0094] 결과

[0095] 신경 줄기/전구 세포 또는 뉴런 세포에서 *Wwox*의 조건부 결실은 *Wwox* null 표현형을 재현한다.

[0096] *Wwox*-null 마우스는 멘델 비율로 태어나고 야생형 한배새끼와 구별할 수 없다.^{19,20} 생후 며칠 내에 마우스는 생후 3-4주에 굴복할 때까지 성장 지연과 발작의 징후를 보이기 시작한다(도 1a-c). 이러한 표현형은 주로 2-4세 사이에 사망하는 WOREE/EIEE28 환자에서 관찰되는 것과 매우 유사하다.¹⁰ CNS에서 WWOX의 정확한 기능을 더 잘 이해하기 위해, 다른 영역에서 배아 뇌 발달 동안 WWOX의 높은 발현을 고려하여 뇌의 조건부 마우스 모델을 생성했다.⁸ 이를 달성하기 위해, *Wwox*^{f1/f1} 마우스(*loxP* 부위 보유)²²를 래트 네스틴(*Nes*)²⁷의 프로모터 및 인핸서 하에서 *Cre* 재조합효소를 보유하는 트랜스제닉 마우스와 교배했고, 이는 배아 단계 E10.5에서 발현되고 N-KO 마우스를 생성하는 뮤린 뇌의 신경 줄기/전구 세포에서 WWOX 절제를 촉진한다. WWOX 절제는 면역형광법을 사용하여 N-KO 뇌에서 검증되었다. N-KO 마우스를 모니터링한 결과 *Wwox* null 마우스 표현형과 유사함이 드러났다. N-KO 마우스는 멘델 비율로 태어났고 생후 2-3일까지 전체 발달 지연(도 1d, e)이 P7에서 명백하게 나타나기 시작할 때까지 육안적 이상을 나타내지 않았다. 또한, N-KO 마우스는 *Wwox* null 마우스에서 관찰된 바와 같이 떨림/

발작 및 운동실조(뒷다리 걸쇠 테스트에서 조정 부족)를 보였다. 모든(100%) N-KO 마우스는 출생 후 4주령에 사망했다(도 1f). $Wwox(Wwox^{+/f1}$, 네스틴-*Cre*)의 하나의 온전한 대립유전자를 보유하는 마우스는 인간 개체의 이형접합 보유자에서 신경학적 증상의 부재에 따른 가시적인 비정상적인 표현형을 나타내지 않았다. 이러한 표현형은 CNS에서 WWOX의 중요한 역할을 나타내며 네스틴-양성 세포 및 그 자손에서의 이의 절제가 WWOX-설치류 모델 및 인간 환자에서 관찰되는 복잡한 표현형에 책임이 있음을 암시한다.

[0097] 네스틴 프로모터는 뉴런 및 신경아교세포 전구체에서 발현되기 때문에, 뉴런 및 신경아교세포에서 개별적으로 WWOX 절제의 효과를 해부했다. 먼저, E12.5에서 발현되고 특히 대부분의 분화된 뉴런에서 $Wwox$ 결실을 초래하는 시냅신 I 유전자²⁸의 프로모터 하에 *Cre* 재조합효소를 보유하는 트랜제닉 마우스 계통을 사용하여 뉴런 세포에서 $Wwox$ 를 조건부로 결실시켰다. 다른 세포가 아닌 뉴런의 특정 WWOX 절제는 대조군 마우스에 필적하는 S-KO 뇌 조직의 희소돌기아교세포(OL)(CC1로 염색)에서 온전한 WWOX 수준을 관찰함으로써 검증되었다. 뉴런 세포에서 WWOX의 조건부 절제에 대한 표현형 분석은 N-KO 및 $Wwox$ null 마우스를 표현형 분석하여 3-4주령까지 성장 지연(도 1g, h) 및 조기 사망(도 1I)을 나타냈다. S-KO 마우스는 또한 P9에서 시작하여 몇 초에서 몇 분까지 통제되지 않는 자발적 강직성-간대성 발작을 보였다(68.5 ± 13.4 초; P14-P18의 n = 6). 또한, 이들 마우스는 조정 및 운동실조 표현형의 결여를 나타냈다. $Wwox$ 의 온전한 대립유전자 하나를 보유하는 이형접합체($Wwox^{+/f1}$, 시냅신 *Cre*)는 어떠한 비정상적인 표현형도 나타내지 않았고 행동적으로 대조군 마우스와 구별할 수 없었다. S-KO 모델의 표현형은 WWOX가 뉴런에서 필수적인 역할을 하고 그 결핍이 극적인 신경학적 표현형으로 이어진다는 것을 강력하게 나타낸다.

[0098] 특정 뉴런 WWOX 기능을 확인하기 위해, 희소돌기아교세포(*Olig2-Cre^{+/-}* 사용)²⁹ 및 성상세포(*GFAP-Cre* 사용)³⁰에서 WWOX 발현 제거의 결과를 조사했으며 표현형 이상은 관찰되지 않았다(도 1j-o). 희소돌기아교세포 및 성상세포에서 WWOX의 조건부 결실 검증은 각각 CC1 및 GFAP에 대한 면역형광 염색에 의해 나타난다. 전체적으로, 이러한 발견은 WWOX가 성상세포, 희소돌기아교세포 및 뉴런에 의해 발현되지만, 뉴런에서의 기능이 동물 생존 및 CNS 항상성에 중요하다는 것을 나타낸다.

[0099] $Wwox$ 의 뉴런 결실은 간질 발작을 일으킨다

[0100] S-KO 뇌의 간질 활동을 특성화하기 위해, 대조군(S-대조군) 및 이형접합체(S-HT)와 함께 뇌에서 전기생리학 기록을 수행했다(도 2a-f). 이를 위해 마우스를 마취 상태에 놓고 감각 피질 위의 뇌 영역을 노출시키기 위해 개두술을 수행했다. 식염수를 함유하는 로컬 필드 전위(LFP) 전극을 사용하여 피질의 다양한 깊이에서 수동적으로 기록했다. 구체적으로, 신피질의 표면층에서 S-KO는 S-대조군에 존재하지 않는 큰 진폭 폭발 활동을 나타냈다(도 2a). 이러한 폭발은 피질하 구조에서는 관찰되지 않았으며, 이는 폭발 생성의 신피질 기원을 암시한다. 생체내에서 300 μ m 기록 깊이에서 활동의 추가 특성화는 2.06 mV(2.01-3.09 mV, 25번째 백분위수 및 75번째 백분위수)의 피크-대-최저 진폭과 함께 350 ms(206-472 ms, 25번째 및 75번째 백분위수)의 중앙 간질형 폭발 지속 시간을 보여주었고, 폭발 간 간격은 8.62초(6.25-21.27초, 25-75번째 백분위수)이다.

[0101] 이러한 폭발은 급성 신피질 뇌 절편에서 얻은 LFP 기록에서도 관찰되었으며(도 2b), 신피질이 이러한 비정상적인 폭발 방전의 생성자임을 보여준다. 전체적으로, 0% S-대조군 절편은 폭발을 보였고(7마리 동물에 걸쳐 n=11 절편 중 0), S-HT 동물로부터 절편의 17%는 폭발을 보였고(14마리 동물에 걸쳐 n=23 절편 중 4개), S-KO 동물로부터 절편의 86%는 폭발이 나타났다(24마리 동물에 걸쳐 n=42 절편 중 36개).

[0102] S-KO 마우스는 신피질 회로의 흥분성 증가로 인해 큰 진폭 활동을 보였다. 이것을 평가하기 위해, 자발적 필드 활동에 대한 전력 스펙트럼 분석을 수행하고(도 2c, d), 층 V에서 전기적으로 유발된 자극에 대한 신피질의 층 II/III 필드 반응을 기록했다(도 2e, f). 자발적인 활동이 있는 트레이스는 생체내 및 시험관내 모두에서 델타(<5Hz), 세타(5-9Hz), 알파(10-15Hz) 및 베타(15-30Hz) 리듬을 포함하는 넓은 주파수 대역 내에서 증가된 스펙트럼 전력을 보여주었다(도 2c, d). 또한 시험관내 전기생리학적으로 유발된 필드 반응은 S-대조군 및 S-HT와 비교하여 S-KO에서 더 컸다(도 2e, f). 더 큰 유발 반응과 증가된 스펙트럼 전력이 과흥분성에 대한 바이오마커이기 때문에, 이러한 결과는 S-KO 마우스의 향상된 신피질 흥분성을 입증했으며, 시험관내 데이터는 증가된 선천적 피질 과흥분성을 시사한다.

[0103] RNA-seq 및 단일 핵 RNA-seq(snRNA-seq)는 $Wwox$ 돌연변이 모델에서 수초화 및 세포 교체의 전사체 변화를 밝혀냈다.

[0104] WWOX의 뉴런 결실 시 관찰된 표현형의 기초가 되는 분자 변경을 해부하기 위해, P17에서 S-KO 및 S-대조군 마우

스의 전체 피질 및 해마에서 대량 RNA 시퀀싱(RNA-seq)을 수행했다. 이 분석은 희소돌기아교세포에 특이적인 몇 가지 알려진 유전자 및 성상세포의 활성화를 포함한 간질 손상 동안 유발된 유전자의 차등 발현을 강조하는 두 유전자형 사이에서 총 730개의 상향조절된 유전자와 579개의 하향 조절된 유전자(P 값 <0.01, 배수 변화 >1.5)를 밝혀냈다^{31,32}. 중요하게도, 유전자 온톨로지(Gene Ontology, GO) 용어 분석은 뉴런의 수초화 및 외피화와 관련된 유전자의 현저한 하향조절을 나타냈다. 유전자 집합 농축 분석(GSEA)은 또한 수초화와 관련된 유전자의 농축이 S-대조군 마우스와 비교하여 S-KO에서 하향조절된다는 것을 밝혔다. S-KO 마우스의 피질과 해마로부터의 RNA-seq 데이터를 S-대조군과 비교하여 심층 분석한 결과, 희소돌기아교세포(OLs)의 성숙(*Gjb1*, *Gjc2* 및 *Olig1*) 미엘린 발달, 유지 및 기능에 관여하는 유전자의 상당한 하향 조절이 나타났다.^{31,33-36} (*Ernm*, *Ugt8a*, *Plp1*, *Otud7b*, *Mal*, *Em11*, *Mobp*, *Hist1h2be*, *Cldn11*, *Mbp*, *Gal3st1*, *Fa2h*, *Gsn*, *Adamts4*, *Cnp*, *Mog*, *Oplalin*, *Enpp*, *Mag* 및 *Myrf*). 이들 연구 결과는 WWOX의 뉴런 절제가 수초화 과정에 영향을 미칠 수 있음을 암시했다.

[0105] 관찰된 분자 변화가 WWOX 기능과 직접 연결되어 있는지 여부를 테스트하고 결과를 추가로 검증하기 위해, *Wwox*-null 및 N-KO 모델의 전체 해마 조직에서 대량 RNA-seq를 수행하고 S-KO 모델과 비교했다. 세 가지 모델의 감독되지 않은 클러스터링 분석은 미엘린 연관-유전자 및 OL 발달, 성숙 및 수초화 과정에 관련된 유전자의 상당한 하향조절을 나타냈으며, 샘플을 Cre-재조합효소의 프로모터가 아닌 WWOX 상태에 따라 그룹화했다. 상위 25개 DEG는 실제로 *Cnp*, *Ugt8a*, *Plp1*, *Ernm*, *Otud7b*, *Mett17a1*, *Prr18*, *Adamts4*, *Klhd7a*, *Mobp*, *Cldn11* 및 *Mbp*를 포함한 수초화와 관련된 전사물의 하향조절을 보여주었다. GSEA 및 GO 용어 분석은 수초화, 뉴런의 외피화 및 축삭 외피화와 관련된 상당한 음의 FDR 값을 보여주었다.

[0106] WWOX의 신경 손실의 분자 효과를 더 분석하기 위해, S-KO 및 S-대조군 마우스의 해마에서 단일-핵 RNA-seq(snRNA-seq) 분석을 수행했다. 각 세포 유형 또는 아형에 특이적인 유전자 세트의 발현 수준에 기반하여 상이한 세포 집단 클러스터를 확인하였다³⁷⁻⁴¹. 균일 다양체 근사화 및 투영(UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection) 분석은 S-대조군과 비교하여 S-KO에서 성숙한 수초성 희소돌기아교세포 세포(15%), COP(committed oligodendrocyte progenitors)(68%)의 수가 감소하고 희소돌기아교세포 전구세포(OPC, 150%)의 수가 더 많은 것으로 나타났다. 종합적으로, 대량 RNA-seq 및 snRNA-seq 분석은 모두 WWOX의 뉴런 결실의 잠재적인 비-세포 자율 효과를 나타내는 희소돌기아교세포의 손상된 성숙을 밝혀냈다.

[0107] 뉴런 WWOX 절제는 저수초화, 희소돌기아교세포 성숙 감소 및 축삭 전도도 손상을 초래한다.

[0108] 다음으로 OL 특이적 유전자의 전사체의 변화가 S-KO 마우스 뇌와 다른 *Wwox* 돌연변이 모델의 수초화에 영향을 미치는지 조사했다. 이를 테스트하기 위해, P18에서 얻은 뇌의 시상면 섹션을 CNPase(CNP) 및 미엘린 염기성 단백질(MBP)과 같은 미엘린 마커에 대해 면역염색했다. 면역형광 분석은 연령-일치 S-대조군과 비교하여 S-KO 뇌 조직에서 저수초화를 나타내는 두 미엘린 마커의 두드러진 감소된 염색을 보여주었다. 감소된 미엘린 염색은 S-대조군과 비교하여 S-KO의 피질, 소뇌, 미상핵 조가비핵, 펌브리아 및 뇌궁을 포함하는 뇌의 다른 영역에서 관찰되었다. CNP 및 MBP 염색의 형광 강도의 정량화는 S-KO의 피질 및 소뇌에서 현저한 감소를 나타냈다(도 3a, c). 또한, P18 연령에서 S-KO 뇌의 룩슬 패스트 블루(LFB) 염색은 연령 일치 대조군과 비교하여 백질 트랙에서 저수초화를 보였다. 또한, OL 성숙 및 수초화 유전자의 발현 수준은 상응하는 대조군 조직과 비교하여 P18에서 피질의 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)에 의해 평가된 바와 같이 S-KO에서 감소하였다. 특히, *Pdgfra* 및 *Cspg4*와 같은 초기 OPC 마커 유전자는 약간 더 높았으며, 이는 OL의 성숙에 특정한 결함을 시사한다.

[0109] 다음으로, S-KO의 뇌 조직에서 저수초화와 연관된 세포 변화를 평가했다. CC1(성숙한 OL의 마커) 및 항-PDGFR α(OPC)를 사용한 면역염색은 연령 일치 대조군과 비교하여 CC1 양성 세포에서 2배 감소를 보였고 S-KO 뇌의 뇌량(도 3e)에서 훨씬 더 많은 OPC를 나타냈다. 또한, 성숙한 OL로의 OPC 전이를 테스트하기 위해 NG2 및 CC1에 대한 뇌 섹션을 면역염색하고 S-KO 조직의 뇌량 및 소뇌에서 이중 양성 세포의 수가 감소하여 OPC가 성숙한 OL로 분화되는 결함을 추가로 확인했다. 주목할 점은 CC1 및 절단된 카스파제 3에 대해 염색되었을 때 S-KO 조직에서 상당한 OL 세포 사멸이 관찰되지 않았다는 것이다. N-KO 뇌 조직 및 *Wwox* null의 뇌 조직에서 저수초화 및 OL 성숙 결함의 유사한 결과가 관찰되었다.

[0110] S-KO 마우스에서 관찰된 저수초화 표현형을 더 평가하기 위해, P17에서 뇌량과 시신경의 전자 현미경 검사를 수행했다. 전자현미경 이미지는 연령 일치 S-대조군과 비교하여 S-KO의 뇌량의 수초화 축삭 수의 실질적인 감소(약 3.5-4배) 및 시신경에서 무수 축삭의 상당히 더 큰 수(약 6배)를 보인다(도 4a). 뇌량에서 수초화축삭 수(S-대조군, 평균=180±40, S-KO, 평균=55±35) 및 시신경에서 무수초화 축삭 수(S-대조군, 평균=55±20, S-KO, 평균=270±60)는 시야(FOV)당 계산되며 도 4b에 표시된다. 또한, 수초화 축삭의 g-비율을 계산하고 연령 일치

대조군과 비교하여 S-KO 뇌량과 시신경에서 상당히 높은 비율을 관찰하여 미엘린 두께가 감소했음을 의미한다 (도 4c).

[0111] 관찰된 저수초화가 축삭 전도도를 지연시키고 기능적 결손을 유발^{42,43}할 수 있는지 여부를 테스트하기 위해, 뇌량을 자극하고 시험관내 절편 준비에서 신피질 층 V에서 기록했다. 손상된 수초화와 일치하는 대조군의 것(도 4d-i)과 비교하여 S-KO에서 신경 전도도의 상당한 지연 시간을 발견했다. 도 4d에서 볼 수 있듯이, N1과 N2의 진폭 비는 축삭 전파의 응답 지연 시간이 더 길고(도 4d-ii, iii) 유발 전위의 피크 진폭이 상당히 낮다.

[0112] 뉴런 WWOX는 OPC의 성숙 회소돌기아교 세포로의 분화를 촉진한다

[0113] 지금까지 결과는 성숙한 뉴런에서 WWOX의 절제가 OPC의 분화 장애로 인해 저수초화를 초래한다는 것을 의미한다. 뉴런 WWOX의 비-세포 자율 기능이 OPC의 성숙한 OL로의 분화를 시험관내에서 조절하는지 여부를 추가로 테스트하기 위해, WT 또는 *Wwox* null 마우스에서 분리된 후근 신경절(DRG) 뉴런이 있는 야생형 OPC 간의 공동 배양 검정을 수행했다. 놀랍게도, *Wwox* null DRG로 배양된 OPC는 WT-DRG에 시딩된 OPC에 비해 수초화 OL로의 분화가 현저히 감소한 것으로 나타났다(도 5). 흥미롭게도, 보상 효과를 암시하는 이러한 조건에서 사전-수초화 OL의 수가 증가하는 것을 관찰했다(도 5).

[0114] 이러한 결과는 회소돌기아교세포(O-KO)에서 *Wwox* 특이적 결실이 출생 후 초기에 수초화의 변화를 일으키는지 여부를 결정하도록 촉진했다. 이를 위해, P17에서 O-KO 및 대조군 한배새끼를 MBP 염색을 조사했으며 큰 변화를 발견하지 못했다. 전반적으로, 이러한 결과는 뉴런 WWOX 절제가 저수초화를 초래하며, 이는 OPC가 성숙한 회소돌기아교세포로 분화 장애를 일으킨 결과일 가능성이 있음을 나타낸다.

[0115] 인간 회소피질 회전타원체에서 WWOX 결실 모델링은 과흥분성 및 저수초화를 나타낸다.

[0116] 다음으로 배아 줄기 세포(hESC)에서 WWOX 손실을 모델링하고 회소피질 회전타원체(OS)로 알려진 인간 뇌 오가노이드를 생성하여 연구 결과의 인간 관련성을 평가하고자 했다. 이 회전타원체는 뇌의 세포 구조와 집단-간 상호작용을 모델링하고 인간에서 관찰되는 자연적인 수초화 과정을 모방하는 기능적 뉴런 및 아교세포로 구성된다. 인간 뉴런 활동 및 수초화에 대한 WWOX 손실의 영향을 연구하기 위해, CRISPR/Cas9 시스템을 활용하여 WiBR3 hESC 계통에서 *WWOX*를 녹아웃했다. WT(OS-WT) 및 WWOX-KO hESC(OS-WWOX-KO) 모두로부터의 OS는 최근 발표된 프로토콜²⁴에 따라 생성되었다.

[0117] OS의 기능적 특성을 특성화하기 위해, 15주 된 오가노이드 절편에서 전체-셀 패치 및 로컬 필드 전위 기록(LFP)을 수행했다(방법에서 설명한 대로). LFP 및 패치 전극은 필드 및 단일-셀 기록을 비교하기 위해 10-15 μ m 떨어져 배치되었다(도 6a). OS-WT 및 OS-WWOX-KO 계통 모두에서 패치된 세포의 휴식 막 전위(RMP)가 전형적인 성숙한 뉴런보다 덜 음성임을 발견했으며, 이는 이러한 세포가 여전히 발달 과정에 있음을 시사한다(도 6b). 프레 등(Pre 등)⁴⁴이 이전에 언급한 바와 같이, iPSC-유래된 뉴런의 RMP는 2D 배양에서 성장할 때 48일에서 55일 사이에 건강한 세포에서 -50mV에 도달하는 성숙 동안 더 음수가 된다. 상대적으로, 우리의 회전타원체는 105일(15주)경에 유사한 RMP를 보여주었다. -50 mV에 도달하는 데 걸리는 시간의 차이는 3D 회전타원체와 2D 배양 간의 발달 차이로 인한 것 같다. OS-WWOX-KO 세포는 WT보다 훨씬 더 탈분극된 RMP를 나타내어, OS-WWOX-KO의 발달 지연을 시사한다. LFP 기록에서, 저주파수 범위인 0.5-7.9 Hz에서 눈에 띄는 피크를 관찰했다. 진동 활동은 곡선 아래 면적으로 정량화되었으며(도 6c, d), 이는 관심 주파수에 비해 OS-WWOX-KO의 경우 훨씬 더 높았다. 샘플 기록 및 해당 시간-주파수 스펙트로그램에서 볼 수 있듯이 신호 특성의 차이도 관찰되었다. 전반적으로, 저-주파수 활동, 특히 OS-WT에는 없는 OS-WWOX-KO의 델타 및 세타 범위에서 증가가 있다. 증가된 저-주파수 활동은 일반적으로 발작과 같은 간질 활동⁴⁵에 기인하며 발달하는 회전타원체에서 OS-WWOX-KO 표현형의 초기 징후를 밝히고 인간 환자 및 *Wwox*-null 마우스 표현형의 데이터와 일치한다.

[0118] 회소돌기아교세포 상태를 평가하기 위해, 이전에 설명한 대로 회소돌기아교세포와 미엘린 발달 및 성숙에 대한 타임라인을 따랐다.²⁴ 먼저, 성숙한 OL이 관찰되는 첫 번째 시점인 OS 14주에 CC1 및 항-PDGFR α 에 대해 면역염색했다. 염색 결과 비슷한 비율의 OPC가 나타났지만, CC1⁺의 수는 OS-WT에 비해 OS-WWOX-KO에서 감소했다. 다음으로 미엘린 단백질 CNP 및 OPC 마커 NG2에 대한 염색에 의해 미엘린이 예상되는 첫 번째 시점인 20주에 OL 및 OPC를 검사했다. NG2⁺ 세포에서는 명백하지 않은 CNP⁺ 세포의 현저한 감소를 발견했으며, 이는 감소된 수의 OL 및 저수초화 둘 다 시사한다. 마지막으로, 콤팩트하고 성숙한 미엘린이 기술된 시점인 30주 OS를 조사했다.²⁴

OS-WT에서, WWOX 발현은 Tuj^+ 세포에서 두드러졌다. 이 단계에서 OS-WWOX-KO는 MBP 및 CNP 모두의 염색이 현저히 감소한 것으로 나타났으며(도 6e), 이는 전자 수준으로도 뒷받침되었다. 흥미롭게도, *SOX10* 및 *PDGFR α* 와 같은 OPC에 대한 초기 마커의 RNA 수준이 OS-WWOX-KO에서 약간 증가한다는 것을 발견했다. 또한, 전자 현미경 이미지는 37주에 조사했을 때 OS-WWOX-KO에 비해 OS-WT에서 더 많은 수초화 축삭을 나타냈다(도 6f, g). 전반적으로, 인간 모델에서의 이러한 발견은 두뇌의 WWOX 손실의 의미에 관한 마우스 데이터와 일치하며, 미엘린의 생리학 적 발달 및 간질의 병리학 적 발달에서 중요한 역할을 지원한다.

[0119] 논의

[0120] WWOX가 뇌의 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다는 몇 가지 증거가 있지만, CNS에서 WWOX의 정확한 세포 역할은 아직 밝혀지지 않았다. 현재 연구에서, 복잡한 표현형에 기인하는 WWOX의 이전에 알려지지 않은 세포 역할을 공개했다.

[0121] WWOX 발현은 CNS의 뉴런, 희소돌기아교세포 및 성상세포에서 발견된다.⁴⁶ *Wwox* null 마우스에서 결함에 기여하는 세포 유형을 확인하기 위해, 다른 신경 집단에서 유전자를 체계적으로 돌연변이시키기로 결정했다. 신경 줄기 세포 및 전구체 또는 성숙한 뉴런에서 WWOX의 조건부 결실은 성장 지연, 간질 발작, 운동 실조 및 조기 사망을 포함하는 *Wwox* null 표현형을 재현했다. WWOX 환자^{10,13-18}의 문서화된 EEG 기록과 일치하여, WWOX의 뉴런 결실이 신피질에서 과흥분성 및 자발적인 간질 활동과 관련이 있음을 발견했다.

[0122] WWOX의 뉴런 결실 분석에서 가장 눈에 띄는 발견 중 하나는 현저한 저수초화 표현형이다. 이 놀라운 표현형은 처음에 대형 RNA-seq 및 snRNA-seq를 사용하여 관찰되었으며 나중에는 풍부한 핵 전사체로 제한되었다. 이러한 관찰은 다른 조직 구획의 면역 형광 및 전자 현미경 사진을 사용하여 추가로 확인되었다. 전반적으로, 이러한 결과는 MRI 이미지에서 관찰된 대부분의 WOREE 어린이의 백질 트랙 및 얇은 뇌량에서 문서화된 지연된 수초화와 일치한다.^{10,13-18} 세포 수준에서, 이 수초화 결함이 성숙한 OL의 수가 감소된 결과임을 발견했다. 뉴런-특이적 *Wwox* 녹아웃 뇌에서 증가된 OPC 수를 감지했기 때문에, 이 감소는 분화 결함을 나타낼 가능성이 높다. 흥미롭게도, OPC의 OL로의 성숙 및 수초화 분화를 긍정적으로 조절하는 WWOX의 비-세포 자율 기능에 대한 시험관내 및 생체내 증거를 제시한다.

[0123] WWOX 기능이 주로 뉴런에 중요하다는 것을 추가로 검증하기 위해, 특히 희소돌기아교세포 또는 성상세포에서 *Wwox*를 제거했다. 흥미롭게도, 어느 세포 유형에서든 *Wwox* 결실은 이러한 표현형으로 이어지지 않았다. 함께 이러한 발견은 뉴런에서 WWOX의 비-세포 자율적 역할이 OPC의 희소돌기아교세포로의 분화에 어떤 식으로든 영향을 미친다는 것을 나타내지만, 다른 신경학적 장애에서 희소돌기아교세포 또는 성상세포에서 WWOX의 세포 자율 기능을 배제할 수는 없다. 전체적으로 본 발견은 CNS 생물학에서 뉴런 WWOX의 중요하고 새로운 역할을 강조한다.

[0124] 본 결과는 *Wwox* 돌연변이 마우스에서 뉴런의 과흥분성과 저수초화가 주요 결함임을 분명히 보여준다. 이 두 가지 표현형이 반드시 상호 배타적인 것은 아니다. 간질의 백질 영상화에 대한 최근 검토에서, 비정상적인 미엘린 함량과 연관된 신경학적 장애는 간질 발작에 대한 더 높은 감수성을 동반한다고 제안되었다.⁴⁷ 탈수초화 또는 저수초화는 실제로 난치성 소아 간질과 동물 간질 모델에서 흔히 발견되는 현상이다.⁴⁸ 저수초 또는 탈수초화가 국소 과흥분을 유발하는 이유는 아직 명확하지 않다. WWOX 결핍이 신경 활동의 불균형과 WOREE 증후군의 관찰된 복합 표현형으로 이어지는 수초화를 포함하여 CNS의 여러 기능에 영향을 미칠 수 있다고 믿는다.

[0125] OPC로부터 희소돌기아교세포의 분화는 CNS에서 다수의 내인성 및 외인성 요인에 의해 조율된다.⁴⁹⁻⁵¹ 증가하는 증거는 뉴런 활동 및 글루타메이트 신호가 발달 동안 OPC 이동, 증식, 분화 및 수초화를 촉진할 수 있음을 보여준다.^{52,53} 뉴런 WWOX가 뉴런 활동 또는 대체 메커니즘에 의해 희소돌기아교세포 분화에 영향을 미치는지 확인해야 한다. WWOX는 주요 단백질과의 물리적 상호 작용을 통해 Wnt/ β -카테닌⁵⁴⁻⁵⁶, TGF β /SMAD^{57,58} 및 DNA 손상 반응^{6,59}을 포함한 많은 신호 경로를 조절하는 것으로 밝혀졌고 WWOX 기능 상실이 이러한 중요한 경로를 탈조절하고 CNS 항상성에 영향을 미칠 수 있는지 여부는 아직 탐구해야 할 부분으로 남아있다.

[0126] 최근 몇 년 동안, 뇌 오가노이드는 인간 질병을 모델링할 수 있는 능력으로 인해 과학계에서 많은 관심을 받았다.⁶⁰⁻⁶⁴ 뇌 오가노이드에서 WWOX 결핍 모델링은 *Wwox* 돌연변이 마우스에서 관찰된 표현형 중 몇 가지를 요약했다. 이를 통해 저-주파수 범위에서 증가된 전력으로 나타나는 간질 활동을 모델링할 수 있었다. 이 범위

는 간질과 관련된 델타과 및 세타과에 해당한다.⁴⁵ 셀-패치(Cell-patch) 기록은 OS-WWOX-KO 뉴런에서 탈분극된 RMP를 나타냈으며 이는 지연된 발달을 암시하고 흥분 증가를 설명할 수 있다. 흥미롭게도, 뉴런 변화는 이르면 15주차에 관찰되었는데, 이 시점은 문헌에서 여전히 미엘린이 부족한 것으로 기술되었던 시점이었다. 이러한 데이터는 질병 발달에서 뉴런 WWOX 발현의 중요한 역할 개념을 뒷받침하는 과흥분성 조절에서 WWOX의 역할을 시사한다.

[0127] WWOX 결핍 뇌 오가노이드는 또한 *Wwox*-돌연변이 마우스에서 관찰된 저수초화 결함을 재현했다. 표현형은 진행성인 것으로 밝혀졌고, 결국 미엘린 염색이 명백히 감소하고 무수초화 축삭이 많아져 저수초화를 암시한다. 전반적으로, 이 시스템의 결과는 OL에서 WWOX의 기능과 인간의 수초화 기능을 추가로 지원한다.

[0128] 전체적으로 본 연구 결과는 뉴런 WWOX 결핍이 과흥분성과 수초화 결함을 초래한다는 것을 나타낸다.

[0129] 참조문헌

1. Abu-Remaileh M, Dodson EJ, Schueler-Furman O, Aqeilan RI. Pleiotropic Functions of Tumor Suppressor WWOX in Normal and Cancer Cells. *J Biol Chem*. Oct 23 2015;doi:10.1074/jbc.R115.676346
2. Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res*. Apr 15 2000;60(8):2140-5.
3. Aqeilan RI, Abu-Remaileh M, Abu-Odeh M. The common fragile site FRA16D gene product WWOX: roles in tumor suppression and genomic stability. *Cell Mol Life Sci*. Dec 2014;71(23):4589-99. doi:10.1007/s00018-014-1724-y
4. Gardenswartz A, Aqeilan RI. WW domain-containing oxidoreductase's role in myriad cancers: Clinical significance and future implications. *Experimental Biology and Medicine*. Mar 1 2014;239(3):253-63. doi:10.1177/1535370213519213
5. Salah Z, Aqeilan R, Huebner K. WWOX gene and gene product: tumor suppression through specific protein interactions. *Future oncology*. Feb 2010;6(2):249-59. doi:10.2217/fon.09.152
6. Abu-Odeh M, Hereema NA, Aqeilan RI. WWOX modulates the ATR-mediated DNA damage checkpoint response. *Oncotarget*. Jan 26 2016;7(4):4344-55. doi:10.18632/oncotarget.6571
7. Aldaz CM, Ferguson BW, Abba MC. WWOX at the crossroads of cancer, metabolic syndrome related traits and CNS pathologies. Review. *Biochimica et biophysica acta*. Jun 14 2014;doi:10.1016/j.bbcan.2014.06.001
8. Chen ST, Chuang JJ, Wang JP, Tsai MS, Li H, Chang NS. Expression of WW domain-containing oxidoreductase WOX1 in the developing murine nervous system. *Neuroscience*. 2004;124(4):831-9. doi:10.1016/j.neuroscience.2003.12.036
9. Nunez MI, Ludes-Meyers J, Aldaz CM. WWOX protein expression in normal human tissues. *J Mol Histol*. May 2006;37(3-4):115-25.
10. Piard J, Hawkes L, Milh M, et al. The phenotypic spectrum of WWOX-related disorders: 20 additional cases of WOREE syndrome and review of the literature. *Genet Med*. Jun 2019;21(6):1308-1318. doi:10.1038/s41436-018-0339-3

[0130]

11. Mallaret M, Synofzik M, Lee J, et al. The tumour suppressor gene WWOX is mutated in autosomal recessive cerebellar ataxia with epilepsy and mental retardation. *Brain*. Feb 2014;137(Pt 2):411-9. doi:10.1093/brain/awt338

awt338 [pii]

12. Kothur K, Holman K, Farnsworth E, et al. Diagnostic yield of targeted massively parallel sequencing in children with epileptic encephalopathy. *Seizure*. Jul 2018;59:132-140. doi:10.1016/j.seizure.2018.05.005

13. Shaukat Q, Hertecant J, El-Hattab AW, Ali BR, Suleiman J. West syndrome, developmental and epileptic encephalopathy, and severe CNS disorder associated with WWOX mutations. *Epileptic Disord*. Oct 1 2018;20(5):401-412. doi:10.1684/epd.2018.1005

14. Ehaideb SN, Al-Bu Ali MJ, Al-Obaid JJ, Aljassim KM, Alfadhel M. Novel Homozygous Mutation in the WWOX Gene Causes Seizures and Global Developmental Delay: Report and Review. *Transl Neurosci*. 2018;9:203-208. doi:10.1515/tnsci-2018-0029

15. Johannsen J, Kortum F, Rosenberger G, et al. A novel missense variant in the SDR domain of the WWOX gene leads to complete loss of WWOX protein with early-onset epileptic encephalopathy and severe developmental delay. *Neurogenetics*. Aug 2018;19(3):151-156. doi:10.1007/s10048-018-0549-5

16. Tarta-Arsene O, Barca D, Craiu D, Iliescu C. Practical clues for diagnosing WWOX encephalopathy. *Epileptic Disord*. Sep 1 2017;19(3):357-361. doi:10.1684/epd.2017.0924

17. Abdel-Salam G, Thoenes M, Afifi HH, Korber F, Swan D, Bolz HJ. The supposed tumor suppressor gene WWOX is mutated in an early lethal microcephaly syndrome with epilepsy, growth retardation and retinal degeneration. *Orphanet J Rare Dis*. 2014;9:12. doi:10.1186/1750-1172-9-12

1750-1172-9-12 [pii]

18. Mignot C, Lambert L, Pasquier L, et al. WWOX-related encephalopathies: delineation of the phenotypical spectrum and emerging genotype-phenotype correlation. *J Med Genet*. Jan 2015;52(1):61-70. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102748

jmedgenet-2014-102748 [pii]

[0131]

19. Aqeilan RI, Trapasso F, Hussain S, et al. Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. March 6, 2007;104(10):3949-3954.
20. Aqeilan RI, Hassan MQ, de Bruin A, et al. The WWOX tumor suppressor is essential for post-natal survival and normal bone metabolism. *J Biol Chem*. Aug 1 2008;283(31):21629-39.
21. Suzuki H, Katayama K, Takenaka M, Amakasu K, Saito K, Suzuki K. A spontaneous mutation of the Wwox gene and audiogenic seizures in rats with lethal dwarfism and epilepsy. *Genes, brain, and behavior*. May 20 2009;doi:GBB502 [pii] 10.1111/j.1601-183X.2009.00502.x
22. Abdeen SK, Del Mare S, Hussain S, et al. Conditional inactivation of the mouse Wwox tumor suppressor gene recapitulates the null phenotype. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't. *Journal of cellular physiology*. Jul 2013;228(7):1377-82. doi:10.1002/jcp.24308
23. Elazar N, Vainshtein A, Golan N, et al. Axoglial Adhesion by Cadm4 Regulates CNS Myelination. *Neuron*. Jan 16 2019;101(2):224-231 e5. doi:10.1016/j.neuron.2018.11.032
24. Madhavan M, Nevin ZS, Shick HE, et al. Induction of myelinating oligodendrocytes in human cortical spheroids. *Nat Methods*. Sep 2018;15(9):700-706. doi:10.1038/s41592-018-0081-4
25. Mansour AA, Goncalves JT, Bloyd CW, et al. An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol*. Jun 2018;36(5):432-441. doi:10.1038/nbt.4127
26. Yang HJ, Vainshtein A, Maik-Rachline G, Peles E. G protein-coupled receptor 37 is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Nat Commun*. Mar 10 2016;7:10884. doi:10.1038/ncomms10884
27. Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, et al. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet*. Sep 1999;23(1):99-103. doi:10.1038/12703

[0132]

28. Zhu Y, Romero MI, Ghosh P, et al. Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. *Genes & development*. Apr 1 2001;15(7):859-76. doi:10.1101/gad.862101
29. Lu QR, Sun T, Zhu Z, et al. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell*. Apr 5 2002;109(1):75-86. doi:10.1016/s0092-8674(02)00678-5
30. Gregorian C, Nakashima J, Le Belle J, et al. Pten deletion in adult neural stem/progenitor cells enhances constitutive neurogenesis. *J Neurosci*. Feb 11 2009;29(6):1874-86. doi:10.1523/JNEUROSCI.3095-08.2009
31. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*. Jan 2 2008;28(1):264-78. doi:10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008
32. Hansen KF, Sakamoto K, Pelz C, Impey S, Obrietan K. Profiling status epilepticus-induced changes in hippocampal RNA expression using high-throughput RNA sequencing. *Sci Rep*. Nov 6 2014;4:6930. doi:10.1038/srep06930
33. Vejar S, Oyarzun JE, Retamal MA, Ortiz FC, Orellana JA. Connexin and Pannexin-Based Channels in Oligodendrocytes: Implications in Brain Health and Disease. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:3. doi:10.3389/fncel.2019.00003
34. Dugas JC, Tai YC, Speed TP, Ngai J, Barres BA. Functional genomic analysis of oligodendrocyte differentiation. *J Neurosci*. Oct 25 2006;26(43):10967-83. doi:10.1523/JNEUROSCI.2572-06.2006
35. Rosenberg SS, Powell BL, Chan JR. Receiving mixed signals: uncoupling oligodendrocyte differentiation and myelination. *Cell Mol Life Sci*. Dec 2007;64(23):3059-68. doi:10.1007/s00018-007-7265-x
36. Emery B, Agalliu D, Cahoy JD, et al. Myelin gene regulatory factor is a critical transcriptional regulator required for CNS myelination. *Cell*. Jul 10 2009;138(1):172-85. doi:10.1016/j.cell.2009.04.031
37. Habib N, Li Y, Heidenreich M, et al. Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons. *Science*. Aug 26 2016;353(6302):925-8. doi:10.1126/science.aad7038

[0133]

38. Habib N, Avraham-Davidi I, Basu A, et al. Massively parallel single-nucleus RNA-seq with DroNc-seq. *Nat Methods*. Oct 2017;14(10):955-958. doi:10.1038/nmeth.4407
39. Zeisel A, Munoz-Manchado AB, Codeluppi S, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*. Mar 6 2015;347(6226):1138-42. doi:10.1126/science.aaa1934
40. Marques S, Zeisel A, Codeluppi S, et al. Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science*. Jun 10 2016;352(6291):1326-1329. doi:10.1126/science.aaf6463
41. Artegiani B, Lyubimova A, Muraro M, van Es JH, van Oudenaarden A, Clevers H. A Single-Cell RNA Sequencing Study Reveals Cellular and Molecular Dynamics of the Hippocampal Neurogenic Niche. *Cell Rep*. Dec 12 2017;21(11):3271-3284. doi:10.1016/j.celrep.2017.11.050
42. Barak B, Zhang Z, Liu Y, et al. Neuronal deletion of Gtf2i, associated with Williams syndrome, causes behavioral and myelin alterations rescuable by a remyelinating drug. *Nat Neurosci*. May 2019;22(5):700-708. doi:10.1038/s41593-019-0380-9
43. Cicciarelli J, Terasaki PI. DR phenotype matching and transfusion in patients treated with cyclosporine. *Transplant Proc*. Dec 1988;20(6):1082-3.
44. Pre D, Nestor MW, Sproul AA, et al. A time course analysis of the electrophysiological properties of neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *PLoS One*. 2014;9(7):e103418. doi:10.1371/journal.pone.0103418
45. Clemens B. Pathological theta oscillations in idiopathic generalised epilepsy. *Clin Neurophysiol*. Jun 2004;115(6):1436-41. doi:10.1016/j.clinph.2004.01.018
46. Tochigi Y, Takamatsu Y, Nakane J, Nakai R, Katayama K, Suzuki H. Loss of Wwox Causes Defective Development of Cerebral Cortex with Hypomyelination in a Rat Model of Lethal Dwarfism with Epilepsy. *Int J Mol Sci*. Jul 23 2019;20(14)doi:10.3390/ijms20143596
47. Drenthen GS, Backes WH, Aldenkamp AP, Vermeulen RJ, Klinkenberg S, Jansen JFA. On the merits of non-invasive myelin imaging in epilepsy, a literature

[0134]

- review. *J Neurosci Methods*. May 15 2020;338:108687. doi:10.1016/j.jneumeth.2020.108687
48. Gibson EM, Geraghty AC, Monje M. Bad wrap: Myelin and myelin plasticity in health and disease. *Dev Neurobiol*. Feb 2018;78(2):123-135. doi:10.1002/dneu.22541
49. Zuchero JB, Barres BA. Intrinsic and extrinsic control of oligodendrocyte development. *Curr Opin Neurobiol*. Dec 2013;23(6):914-20. doi:10.1016/j.conb.2013.06.005
50. Simons M, Trajkovic K. Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci*. Nov 1 2006;119(Pt 21):4381-9. doi:10.1242/jcs.03242
51. Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science*. Nov 5 2010;330(6005):779-82. doi:10.1126/science.1190927
52. Barres BA, Raff MC. Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature*. Jan 21 1993;361(6409):258-60. doi:10.1038/361258a0
53. Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P, Jahr CE. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature*. May 11 2000;405(6783):187-91. doi:10.1038/35012083
54. Bouteille N, Driouch K, Hage PE, et al. Inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein. *Oncogene*. May 25 2009;doi:onc2009120 [pii] 10.1038/onc.2009.120
55. Abu-Odeh M, Bar-Mag T, Huang H, et al. Characterizing WW Domain Interactions of Tumor Suppressor WWOX Reveals Its Association with Multiprotein Networks. *The Journal of biological chemistry*. Mar 28 2014;289(13):8865-80. doi:10.1074/jbc.M113.506790
56. Wang HY, Juo LI, Lin YT, et al. WW domain-containing oxidoreductase promotes neuronal differentiation via negative regulation of glycogen synthase kinase 3beta. *Cell death and differentiation*. Jun 2012;19(6):1049-59. doi:10.1038/cdd.2011.188

[0135]

57. Khawaled S, Nigita G, Distefano R, et al. Pleiotropic tumor suppressor functions of WWOX antagonize metastasis. *Signal Transduct Target Ther.* Apr 17 2020;5(1):43. doi:10.1038/s41392-020-0136-8
58. Ferguson BW, Gao X, Zelazowski MJ, et al. The cancer gene WWOX behaves as an inhibitor of SMAD3 transcriptional activity via direct binding. Meta-Analysis Research Support, N.I.H., Extramural. *BMC cancer.* 2013;13:593. doi:10.1186/1471-2407-13-593
59. Abu-Odeh M, Salah Z, Herbel C, Hofmann TG, Aqeilan RI. WWOX, the common fragile site FRA16D gene product, regulates ATM activation and the DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 4 2014;111(44):E4716-25. doi:10.1073/pnas.1409252111
60. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science.* Jul 18 2014;345(6194):1247125. doi:10.1126/science.1247125
61. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature.* Sep 19 2013;501(7467):373-9. doi:10.1038/nature12517
62. Sidhaye J, Knoblich JA. Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease. *Cell Death Differ.* Jun 1 2020;doi:10.1038/s41418-020-0566-4
63. Aqeilan RI. Engineering organoids: a promising platform to understand biology and treat diseases. *Cell Death Differ.* Jan 2021;28(1):1-4. doi:10.1038/s41418-020-00680-0
64. Steinberg DJ, Saleem A, Repudi SR, et al. Modeling Genetic Epileptic Encephalopathies using Brain Organoids. *bioRxiv.* 2020:2020.08.23.263236. doi:10.1101/2020.08.23.263236

[0136]

[0137]

실시예 2: 신생아 뉴런 WWOX 유전자 치료는 *Wwox null* 표현형을 구제한다.

[0138]

최근 몇 년 동안, 중추 신경계(CNS)의 항상성 조절에 WWOX 기능을 연결하는 증거가 제안되었다.^{9,10} WWOX 유전자의 생식계열 열성 돌연변이(미스센스, 넌센스 및 부분/완전 결실)는 두 가지 주요 표현형, 즉 SCAR12(척수소뇌 운동실조증, 상열색체 열성-12, OMIM 614322) 및 WOREE 증후군(WWOX-관련 간질성 뇌병증)과 관련이 있는 것으로 밝혀졌고, 후자는 발달 및 간질성 뇌병증-28(DEE28, OMIM 616211)로도 알려져 있다.⁹ WOREE는 조기 미성숙 정지 코돈 또는 WWOX의 완전한 소실을 보유하는 어린이에게서 관찰되는 복잡하고 파괴적인 신경 장애이다.¹¹ WOREE의 임상 스펙트럼에는 심한 발달 지연, 다양한 발작 증상(강직성, 간대성, 강직성-간대성, 근간대성, 영아 경련 및 부재)을 동반한 중증 간질의 조기-발병이 포함된다. 영향을 받은 환자의 대부분은 눈을 마주치지 않고 앉거나 말하거나 걸을 수 없다.⁹ WOREE 증후군은 현재의 항경련제에 반응하지 않으므로, WOREE 증후군이 있는 어린이를 돕기 위한 대체 치료법을 개발하는 것이 시급하다. 주로 WWOX의 미스센스 돌연변이로 인해 SCAR12가 있는 어린이는 운동 실조증과 간질을 포함한 더 가벼운 표현형을 나타낸다.¹² SCAR12의 간질은 항경련제로 치료할 수 있지만, 어린이는 여전히 운동 실조증을 나타내고 지적 장애가 있다. 또한, WWOX 돌연변이는 고부정뇌파를 동반한 간질 경련이 특징인 웨스트 증후군 환자에게서 기록되었다.¹³ WWOX 유전자 돌연변이를 지닌 어린이의 뇌는 자기 공명영상(MRI)으로 평가한 결과 비정상적인 것으로 밝혀졌다. 뇌량의 저형성, 진행성 대뇌 위축, 수초화 지연 및 시신경 위축과 같은 뇌 이상이 대부분의 경우에 보고되었다. WWOX의 돌연변이 또는 WWOX 기능의 상실이 어떻게 이러한 CNS-연관 이상을 유발할 수 있는지는 거의 알려져 있지 않다.

[0139]

인간 WWOX(hWWOX)와 뮤린 *Wwox(mWwox)* 사이에는 현저한 유사성이 있다. 사실, 인간 WWOX 단백질 서열은 뮤린

Wwox 단백질 서열과 93% 동일하고 95% 유사하다. 놀랍게도, 설치류 모델(마우스 및 래트)에서 *Wwox* 기능의 표적 손실은 심각한 간질 발작, 성장 지연, 운동 실조 및 조기 사망을 포함하는 복합 인간 신경학적 표현형을 나타낸다.^{12,14,15} *Wwox null* 마우스는 손상된 뼈 대사 및 스테로이드생성과 연관된 표현형도 나타낸다.^{16,17} 본 개시내용의 실시예 1은 신경 줄기 세포 및 전구체(N-KO) 또는 뉴런 세포(S-KO 마우스)에서 무린 *Wwox*의 조건부 절제가 심각한 간질, 운동실조 및 3-4주에서 조기 사망을 야기함을 보여주며, *Wwox-null* 마우스에서 관찰된 표현형을 요약한다. 이러한 결과는 뉴런 기능에서 WWOX의 중요한 역할을 강조하고 *Wwox null* 마우스의 뉴런 구획에서 WWOX 발현을 복원하면 관찰된 표현형을 역전시킬 수 있는지 여부를 테스트하도록 자극했다. 이를 위해, 아테노-연관 바이러스(AAV) 벡터를 사용하여 WWOX 발현을 복원했다. m*Wwox* 또는 hWWOX 열린 해독물을 보유하고 인간 뉴런 시냅신 I 프로모터에 의해 구동되는 AAV 벡터가 *Wwox null* 표현형을 역전시킬 수 있음을 입증했다. AAV9-시냅신 I-WWOX의 단일 뇌실내(ICV) 주사는 *Wwox null* 마우스의 성장 지연, 간질 발작, 운동실조 및 조기 사망을 구제했다. 또한, WWOX 복원은 수초화를 개선하고 *Wwox null* 마우스의 비정상적인 행동 변화를 역전시켰다. 전반적으로, 이러한 놀라운 결과는 WWOX 유전자 요법이 WOREE 및 SCAR12를 가진 어린이에게 유망한 치료 방법이 될 수 있음을 나타낸다.

[0140] 결과

[0141] 뉴런 WWOX의 복원은 *Wwox null* 돌연변이 마우스의 성장 지연 및 출생 후 치사율을 구제한다

[0142] 실시예 1에서, 뉴런에서의 WWOX의 조건부 절제가 성장 지연, 자발적인 간질 발작, 운동실조 및 3-4주에서의 조기 사망을 포함하는 *Wwox null* 마우스를 표현형모사함을 보여준다. 이러한 결과는 WWOX가 CNS의 항상성을 조절하는 핵심 뉴런 유전자임을 의미한다. 이러한 놀라운 발견에 힘입어 *Wwox-null* 마우스에서 WWOX의 뉴런-특이적인 발현이 이들 마우스 및 연관 표현형의 치사율을 구제할 수 있는지 여부를 다루고 싶었다. 무린 *Wwox(mWwox)* 또는 인간 WWOX(hWWOX), 인간 시냅신-I(hSynI) 프로모터에 의해 구동되는 cDNA(도 8a)를 발현하기 위해 아테노-연관 바이러스(AAV) 벡터를 설계하고 이를 AAV9 혈청형으로 패키징했으며, 이는 높은 CNS 향성을 가지며 CNS-기반 유전자 치료 시험에 사용되었다.^{22,24} *IRES-EGFP* 서열은 *Wwox/WWOX* 서열의 다운스트림에 클로닝되어 발현 추적 가능하게 한다. AAV9-hSynI-m*Wwox*-IRES-EGFP(AAV9-hSynI-m*Wwox*)의 성공적인 전달은 시냅신-I-양성 비분열/성숙 뉴런에서 온전한 WWOX 단백질의 발현으로 이어져야 한다. 대조군으로, AAV9-hSynI-EGFP를 사용했다. WWOX 및 GFP의 발현은 일차 *Wwox-null* 후근 신경절(DRGs) 뉴런을 시험관내에서 바이러스 입자로 감염시킴으로써 초기에 검증되었다.

[0143] 그런 다음 생체 내에서 AAV의 발현과 기능을 평가했다. AAV9-hSynI-m*Wwox* 또는 AAV9-hSynI-EGFP의 바이러스 입자(2×10^{10} /반구)를 출생 시(P0) *Wwox null* 마우스의 뇌실내 영역에 주입하여 뇌 전체에 걸쳐 뉴런의 광범위한 형질도입을 달성했다.^{25,26} 회소돌기아교세포(CC1-양성 세포)가 아닌 뉴런의 전이유전자의 성공적인 발현은 항-NeuN 및 항-WWOX 항체를 사용한 면역형광에 의해 검증되었다.

[0144] 처리된 마우스의 모니터링은 AAV9-hSynI-m*Wwox*를 주입한 마우스가 정상적으로 성장하고(도 7b), 점진적으로 체중이 증가하고(도 7c) 6-8주령까지 야생형과 구별할 수 없음을 보여주었다. AAV9-hSynI-EGFP-주입된 마우스는 *Wwox null* 마우스와 유사한 표현형을 나타냈다(도 7c). *Wwox null* 및 AAV9-hSynI-EGFP-주입된 마우스는 2주째부터 사망할 때까지 저혈당 상태인 반면, AAV9-hSynI-m*Wwox*-주입된 마우스는 야생형 마우스와 비교했을 때 정상적인 혈당 수치를 보였다(도 7d). 놀랍게도, 구제된 모든 마우스는 *Wwox null* 또는 AAV9-hSynI-EGFP-주입된 *Wwox null* 마우스와 비교하여 중앙 생존 기간이 240일로 더 오래 살았다(p 값 < 0.0001)(도 7e). m*Wwox*를 hWWOX cDNA로 교체했을 때도 유사한 성과와 결과가 얻어졌지만, 지금까지 최대 100일 동안 이 마우스를 추적했다(도 7f). 특히, 구제된 마우스는 활동적이었고 수컷과 암컷 모두 번식력이 있었다. *Wwox null* 마우스는 이전에 고회 레이디(Leydig) 세포가 부족한 것으로 나타났기 때문에¹⁶, 다음으로 WWOX 뉴런 복원이 이 표현형을 구제하고 실제로 P17 AAV9-hSynI-m*Wwox*-처리된 마우스에서 손상되지 않은 레이디(Leydig) 세포를 발견하는지 확인했다. 뼈 성장 결함은 또한 이전에 *Wwox* 돌연변이 마우스에서 문서화되었으므로^{17,27-30}, 구제된 마우스의 뼈를 검사하고 피질 뼈가 WT 마우스와 비슷한 크기와 두께임을 관찰했다. 이러한 결과는 WWOX의 뉴런 복원이 *Wwox null* 마우스의 비정상적인 표현형을 구제하기에 충분할 수 있음을 의미한다.

[0145] WWOX의 뉴런 복원은 *Wwox null* 마우스의 과흥분성을 감소시킨다.

[0146] *Wwox null* 돌연변이는 자발적 재발성 발작을 나타낸다.^{12,14,18,31} 구제된 마우스에서 자발적인 발작이 관찰되지 않

왔기 때문에, 다음으로 셀-부착 전기생리학 기록을 수행하여 P21-22 야생형(WT), *Wwox* null(KO) 및 AAV9-hSynI-mWwox-주입된 *Wwox* null 마우스(KO+AAV9-*Wwox*)의 뇌에서 간질 활동을 결정했다. 예상대로, KO 새끼는 심각한 과잉행동을 보였다. 활동 전위의 자발적 발화를 갖는 대표적인 트레이스가 도 8a에 나와 있다. 명확한 과흥분성은 대표적인 트레이스(WT, KO+AAV9-*Wwox* 및 KO)에서 확인할 수 있다. KO 두뇌의 활동은 일반적으로 활동 전위의 폭발을 초래했으며 전반적으로 발화율이 급격히 증가했다. 20 WT, 20 KO+AAV-*Wwox* 및 30 KO 기록된 뉴런에 대한 평균 발화율은 WT 새끼에 비해 KO 새끼에서 약 6배 더 높았다($p=2.6e-7$). KO+AAV-*Wwox*와 WT 새끼 사이에 평균 발화율의 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

[0147] KO 마우스가 4주 이내에 사망했기 때문에, 성체 KO 마우스에서 생체내 기록을 수행할 수 없었다. 따라서 성체 WT 및 KO+AAV9-*Wwox* 마우스에서만 셀 부착 생체내 기록을 수행했다(도 8b). WT 및 KO+AAV9-mWwox에 대한 대표적인 트레이스가 표시되고 60 WT 및 60 KO+AAV9-mWwox 뉴런에 대한 평균 발화율이 표시된다(도 8b). 성체 WT와 KO+AAV9-mWwox 대뇌 피질 뉴런의 발화율에는 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 AAV9-hSynI-mWwox가 WWOX 손실로 인한 간질 발작을 예방할 수 있음을 나타낸다.

[0148] WWOX의 뉴런 복원은 OPC 분화를 촉진하여 *Wwox* null 마우스에서 수초화를 향상시킨다.

[0149] 실시예 1은 WWOX 손실과 저수초화를 연관시켰다. 사실, 뉴런 WWOX 결제는 희소돌기아교세포 전구세포(OPC)의 분화를 손상시키는 비-세포 자율 기능을 초래하는 것으로 나타났다. 따라서, 다음으로 AAV를 사용하여 WWOX의 뉴런 복원이 *Wwox* null 마우스에서 저수초화 표현형을 구제할 수 있는지 여부를 테스트했다. 항-MBP 항체를 사용한 P17 시상 뇌 조직의 면역형광 분석은 대조군 바이러스를 주사한 *Wwox* null 마우스와 비교하여 구제된 AAV9-hSynI-mWwox 처리된-마우스 뇌의 모든 부분(피질, 해마 및 소뇌)에서 개선된 수초화를 나타냈다(도 9a). 또한, 이 개선된 수초화가 뉴런 WWOX의 비-세포 자율 기능에 의해 OPC의 성숙한 희소돌기아교세포로의 분화 증가와 관련이 있는지 여부를 테스트했다. 예상한 바와 같이, 뉴런에서 AAV9-매개 WWOX 발현은 CC1(성숙한 희소돌기아교세포에 대한 마커) 및 항-PDGFR α (OPC에 대한 마커)로 면역염색에 의해 평가된 바와 같이 OPC의 성숙한 희소돌기아교세포로의 분화를 증가시켰다(도 9b). 뇌량에서 CC1 및 OPC의 정량화는 P17에 대조군 바이러스를 주사한 KO 마우스와 비교하여 구제된 마우스에서 성숙한 희소돌기아교세포의 수가 상당히 증가함을 보여주었다(도 9c).

[0150] WWOX의 뉴런 복원 후 개선된 수초화의 발견을 추가로 검증하기 위해, P17 및 성체 마우스에서 뇌량에 대한 전자현미경(EM) 분석을 수행했다. 놀랍게도, AAV9-hSynI-mWwox를 사용한 WWOX의 뉴런 복원은 뇌량의 P17에서 KO에 비해 수초화 축삭의 수를 증가시켰다. 또한, 계산된 g-비율은 대조군 KO 마우스와 비교하여 뉴런 WWOX 복원 시 미엘린 두께가 증가했음을 나타낸다. 또한 성체(6개월) 구제된 마우스의 뇌량과 시신경의 EM 이미지에서 수초화가 개선된 것으로 나타났다. P17 및 6개월에서 KO+AAV-*Wwox* 및 WT 뇌량의 미엘린 두께를 비교할 때 g-비율에서 약간의 차이를 관찰했다.

[0151] WWOX 뉴런 복원은 불안을 감소시키고 운동 기능을 향상시킨다.

[0152] 다음으로 뉴런에서 WWOX를 복원한 후 *Wwox* null 마우스의 행동 변화를 조사했다. 안타깝게도 *Wwox* null 마우스의 열악한 상태와 조기 사망으로 인해 행동을 평가할 수 없었다. 구제된 마우스에서 불안과 운동 조절을 검사하기 위해, 야외, 고가식 십자 미로(EPM) 및 회전막대 테스트를 수행했다(도 10a-e). 놀랍게도, 8-10주에 구제된 마우스(수컷 및 암컷)의 야외에서 야생형에서 보이는 유사한 추적 패턴을 관찰했으며, 이는 WWOX 복원이 *Wwox* null 마우스의 불안을 감소시킨다는 것을 나타낸다. 또한 야외 트랙에서 이동한 속도와 총 거리는 WT 마우스와 매우 유사했다(도 10b, c). 또한, 구제된 암컷 및 수컷 마우스는 EPM에서 거의 정상적인 행동을 보였다(도 10d). 구제된 마우스의 운동 조절을 확인하기 위해 회전막대 테스트를 수행했다. 결과는 구제된 마우스가 학습 능력을 나타내는 시험 3에서 WT 생쥐와 유사한 운동 조절을 가지고 있음을 보여주었다. 전체적으로, 이러한 결과는 *Wwox* null 마우스에서 뉴런 WWOX 재-발현이 활동 및 정상적인 행동을 회복함을 시사한다.

[0153] 논의

[0154] 이 실시예에서 뉴런에서 WWOX를 복원하고 이 복원의 치료 가능성을 평가하는 것을 목표로 했다. 이 연구에서, *Wwox*-null 마우스 모델에서 복잡한 신경병증을 치료하기 위해 성숙한 뉴런에 WWOX의 표적 유전자 전달을 위해 AAV9 벡터를 활용했다. 뉴런 프로모터 시냅신-I 하에 mWwox 또는 hWWOX cDNA를 신생 *Wwox* null 마우스의 뇌에 주입했고 이 치료가 WWOX 결핍의 표현형을 역전시킬 수 있음을 보여주었다.

[0155] CNS 항상성 조절에서 WWOX의 역할은 WWOX 유전자의 핵심 기능으로 부상하고 있다. WWOX의 결핍은 많은 신경학적 장애와 관련이 있다.^{9,10} 특히 흥미로운 것은 WOREE 증후군으로, 중앙 생존 기간이 1-4년인 조기 사망을 유발하

는 파괴적이고 복잡한 신경계 질병이다.^{9,10} WOREE 어린이는 현재의 항간질제(AED)에 반응하지 않으므로 새로운 치료 전략을 개발하기 위해 의료 및 과학계에 도전하고 있다. AAV9-WWOX를 WOREE 증후군 환자의 뇌에 전달하는 것이 이러한 환자에게 도움이 될 새로운 유전자 치료법이 될 수 있다고 믿는다.

[0156] *Wwox* null 마우스의 뇌에 AAV9-SynI-WWOX를 전달한 효과는 놀라웠다. 첫째, WWOX 뉴런 전달은 자발적인 발작 및 운동 실조 없이 마우스의 정상적인 성장과 생존을 회복했다. 또한, WWOX의 뉴런 복원이 셀-부착 기록에서 과흥분성을 감소시킨다는 것을 보여주었다. 두 번째로, 뉴런 WWOX 복원은 뇌의 모든 영역의 수초화를 개선하여 OPC 성숙에 대한 WWOX 뉴런 비-세포 자율 기능의 이전 관찰을 추가로 확인했다(실시예 1). 참고로, 수초화 과정을 조절하는 희소돌기아교세포-특이적인 WWOX 기능에 기인할 수 있는 구제된 마우스와 WT 마우스 사이에는 여전히 약간의 차이가 있다. 셋째, WWOX 복원은 구제된 마우스의 전반적인 행동을 개선했다. 이러한 발견은 자체증^{9-11,33,34} 및 아마도 다른 행동-연관 장애를 조절하는 WWOX의 제안된 역할이 WWOX의 적절한 뉴런 기능에 의해 주도된다는 것을 시사할 수 있다.

[0157] 뉴런 WWOX 전달의 또 다른 흥미로운 결과는 *Wwox* null 마우스에서 WWOX 결핍과 관련된 저혈당증의 가역성이다.^{35,36} 이러한 결과는 글루코스 대사 및 기타 대사 기능의 CNS 조절에서 WWOX의 중심 역할과 일치한다.³⁷⁻⁴⁰ 흥미롭게도, 골격근에서 *Wwox*의 표적 결실은 글루코스 항상성 장애를 초래했으며⁴¹ 이 효과는 WWOX의 세포-자율 기능과 연결되었다.

[0158] 또 다른 특이한 관찰은 구제된 마우스는 또한 번식력이 있었고 번식할 수 있었다는 것이다. *Wwox* null 마우스가 손상된 스테로이드생성을 나타내는 것으로 나타났음을 감안할 때^{16,29,42}, 현재 발견은 CNS에서 WWOX의 기능이 조직 수준 기능을 중첩하고 있음을 의미한다. 전체적으로, 이러한 발견은 WWOX가 기관 수준과 유기체 수준 모두에서 다면적 기능을 가질 수 있음을 시사한다.

[0159] WWOX는 모든 뇌 영역에서 도처에 존재하는 식으로 발현된다.^{10,43,44} 현재 관찰은 성상세포 및 희소돌기아교세포와 같은 다른 뇌 세포 유형에서 WWOX 발현이 필요하지 않다는 것을 의미하지 않는다. 희소돌기아교세포 병리와 WWOX 기능을 연결하는 증거가 나타나기 시작했지만⁴⁵⁻⁴⁹, 희소돌기아교세포에서 WWOX의 세포-자율 기능에 대해서는 알려진 바가 적다. 뉴런에서 WWOX 발현이 희소돌기아교세포 성숙을 조절하고 성상교세포증을 길항한다⁵⁰는 사실은 심층 분석이 필요한 CNS 생리학 및 병리생리학에서 WWOX의 복잡한 기능을 암시한다.

[0160] WWOX 유전자는 처음에 추정되는 종양 억제자로 클로닝되었다.^{51,52} 실제로 다양한 동물 모델(¹⁵에서 검토)에 대한 수많은 연구 작업과 인간 암 환자에 대한 관찰^{1,27,39,53-57}에서 WWOX를 종양 억제자로 제안했다. WWOX의 복원이 뇌로 제한된다는 점을 감안할 때, WWOX 발현이 부족한 다른 조직이 종양 발달에 더 취약할 것이라고 가정했다. 주목할 점은 조사한 AAV9-hSynI-mWwox로 치료한 제한된 수의 성체 *Wwox*-null 마우스(6-8개월령, n=6)에서 총체적인 종양 형성을 감지하지 못했다는 것이다. 동물 모델에서 종양 형성을 촉진하기 위해 여러 조직에서 Wwox 체세포 제거가 필요하다는 점을 고려하면 이것은 놀라운 일이 아니다.^{28,39,58,59}

[0161] *Wwox* null 마우스의 제한된 수명과 열악한 조건으로 인해 수명 초기에 이 마우스를 치료해야 했다(P0). 그럼에도 불구하고, 출생 후 *Wwox*-null 마우스를 치료하려는 시도는 앞으로 탐색되어야 한다. 현재 연구 결과는 AAV 벡터를 사용하는 신생 마우스의 WWOX 복원이 WWOX 결핍과 관련된 표현형을 역전시킬 수 있음을 나타낸다. 이 개념-증명이 치명적이고 종종 불응성인 WOREE 증후군으로 고통받는 어린이에 대한 가능한 유전자 치료 임상 시험의 토대를 마련할 것이라고 생각한다.

[0162] 재료 및 방법

[0163] 플라스미드 벡터

[0164] 무린 *Wwox* 또는 인간 WWOX cDNA는 pAAV에서 인간 시냅신 I의 프로모터 하에 클로닝되었고 이 벡터는 AAV9 혈청형(Vector Biolabs, Philadelphia, USA)으로 패키징되었다. 맞춤형 AAV9-hSynI-mWwox-IRES-EGFP, AAV9-hSynI-hWWOX-2A-EGFP 및 AAV9-hSynI-EGFP 바이러스 입자는 벡터 바이오랩(Vector Biolabs) 또는 예루살렘 히브리 대학의 벡터 핵심 시설(Vector Core Facility)에서 입수하였다.

[0165] 마우스

- [0166] *Wwox* null^(-/-) 마우스(KO)의 생성은 이전에 보고되었으며¹⁶ 이 마우스는 FVB 배경에서 유지되었다. 이형접합체^(+/-) 마우스는 *Wwox* null 마우스를 얻기 위한 번식에 사용되었다. 동물은 음식과 물에 자유롭게 접근할 수 있는 12 시간 명/암 주기로 SPF 장치에서 유지되었다. 모든 동물-관련 실험은 히브리 대학-기관 동물 관리 사용 위원회 (HU-IACUC)의 사전 승인에 따라 수행되었다.
- [0167] PO *Wwox* null 마우스에 AAV 입자의 뇌실내(ICV) 주입
- [0168] 공개된 프로토콜²⁵에 따라 AAV9-hSynI-mWwox-IRES-EGFP(AAV9-WWOX) 또는 AAV9-hSynI-EGFP(AAV9-GFP)를 *Wwox* null 마우스에 자유형 두개내 주사했다. 간단히 말해서, 신생이 태어난 후, *Wwox* null 마우스를 식별하기 위해 PCR 유전자형을 검사했다. *Wwox* null 신생을 건조된 평평하며 차가운 표면에 놓아 마취시켰다. 마취된 새끼의 머리를 70% 에탄올에 적신 면봉으로 부드럽게 닦았다. 분배된 액체의 가시화를 가능하게 하기 위해 트리판 블루 0.1%를 바이러스에 첨가하였다. 주사 부위는 람다 봉합선에서 각 눈까지 거리의 2/5 지점에 위치했다. 주사기 (바이러스가 미리 로드됨)를 두개골 표면에 수직으로 잡고 바늘을 약 3mm 깊이로 삽입했다. 약 1 μ l(2×10^{10} GC/반구) 바이러스를 33G 베벨 바늘(World Precision Instruments)이 있는 나노필(NanoFil) 주사기를 사용하여 분배했다. 다른 반구도 같은 방식으로 주입되었다. 주입된 새끼는 깨어날 때까지 온열 패드 위에 올려놓은 다음 어미 우리로 옮겼다. 표현형을 평가하기 위해 각각의 주사된 마우스를 성장, 이동성, 발작, 운동실조 및 일반적인 상태에 대해 주의 깊게 모니터링했다.
- [0169] 체중 및 혈당 수치
- [0170] 도면에 표시된 대로 마우스의 체중을 정기적으로 측정했다. 혈당을 모니터링하기 위해 마우스 꼬리 끝을 가위로 찢고 아큐-체크 혈당측정기(Accu-Check glucometer)(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하여 소량의 혈액을 채취(mg/dL)하였다.
- [0171] 면역형광
- [0172] 상이한 유전자형 및 처리 군(P17-P18)의 마우스를 CO₂로 안락사시키고 2% PFA/PBS로 경심장 관류시켰다. 해부된 뇌는 30분 동안 얼음에 후고정된 후 4°C에서 밤새 30% 수크로스에서 밤새 인큐베이션되었다. 그런 다음 OCT에 임베딩하고 저온 유지 장치를 사용하여 절단(12-14 μ m)했다. 시상면 섹션을 PBS로 세척하고 0.5% 트리톤 X-100을 함유한 5% 염소 혈청으로 차단한 다음 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음 4°C에서 밤새 일차 항체와 함께 인큐베이션했다. 그런 다음 섹션을 PBS로 세척하고 알렉사(Alexa) 형광단으로 태그된 해당 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한 다음 PBS로 세척하고 봉입제로 봉입했다.
- [0173] 전기생리학 수술 절차
- [0174] 케타민/메토프미딘(i.p; 100 및 83 mg/kg, 각각)을 사용하여 마우스를 마취시켰다. 마취의 효과는 발가락 핀치 반사의 부재로 확인되었다. 보충 용량은 전기 생리학 절차 동안 마취를 유지하기 위해 초기 용량의 1/4로 약 1시간마다 투여되었다. 모든 수술 및 실험 동안 발열 패드(37°C)를 사용하여 체온을 유지하였다. 두개골을 노출시키기 위해 피부를 제거했다. 맞춤형 금속 핀을 치과용 시멘트를 사용하여 두개골에 부착하고 맞춤형 스테이지에 연결했다. 생검 핀치(Miltex, PA)를 사용하여 두개골에 작은 구멍(직경 3 mm 개두술)을 만들었다.
- [0175] 셀 부착된 기록
- [0176] 블라인드 패치-클램프 기록으로 셀-부착 기록을 얻었다. 수직 2단계 폴러(PC-12, Narishige, EastMeadow, NY)에서 필라멘트형, 얇은 벽, 보로실리케이트 유리(외경, 1.5 mm, 내경, 0.86 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Germany)에서 전극(약 7M Ω)을 당겼다. 전극을 다음을 함유하는 내부 용액으로 채웠다: 140 mM K-글루코네이트, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM Na₂-포스포크레아틴 및 0.5 mM EGTA, KOH로 pH 7.25로 조정. 전극은 45도 각도로 삽입되었고 깊이는 300 μ m에 도달했다. 전극 위치는 브레그마 후방 1.6-2 mm 및 정중선 측면 4 mm에 위치한 뇌 표면을 대상으로 했다. 전극을 배치하는 동안 피펫 저항이 10-200 M Ω 으로 증가하면 대부분의 경우 활동 전위(스파이크)가 나타난다. 단일 스파이크의 감지가 기록을 시작하는 기준이었다. 모든 기록은 전류 클램프 모드(Multiclamp 700B, Molecular Devices)에서 세포내 증폭기로 획득하고 10 kHz(CED Micro 1401-3, Cambridge Electronic Design Limited)에서 획득하고 고역 통과 필터로 필터링했다. 평균 발화율의 계산을 위해, 기록된 각 셀에 대해 4분 기록 기간 동안의 발화율을 계산하였다. 기록된 군 간의 통계적 유의성을 평가하기 위해 2-샘플 t-테스트를 사용했다.

[0177] 전자현미경

[0178] 마우스를 마취시키고 0.1 M 나트륨 카코딜레이트 완충액, pH 7.3에 2% 파라포름알데히드 및 2.5% 글루타르알데히드(EM 등급)를 함유하는 고정액으로 관류시켰다. 뇌를 분리하고 실온에서 2시간 동안 동일한 고정액에서 인큐베이션한 다음 처리될 때까지 4°C에 보관했다. 채취한 조직(뇌량, 시신경)을 나트륨 카코딜레이트로 4회 세척하고 1% 사산화오스뮴, 1.5% 나트륨 카코딜레이트 중 칼륨 페리시아니드로 1시간 동안 후고정하고 동일한 완충액으로 4회 세척하였다. 그런 다음, 조직 샘플을 일련의 등급별 에탄올 용액(30, 50, 70, 80, 90, 95%)으로 각 10분 동안 탈수한 다음 100% 에탄올로 각 20분 동안 세 번 탈수한 다음 프로필렌 옥사이드를 두 번 교체했다. 그런 다음 조직 샘플에 일련의 에폭시 수지(25, 50, 75, 100%)를 각각 24시간 동안 침투시키고 60°C 오븐에서 48시간 동안 중합했다. 블록을 울트라마이크로톰(Ultracut E, Riechert-Jung)으로 절단하고 80 nm의 섹션을 얻어 우라닐 아세테이트와 납 시트레이트로 염색했다. 섹션은 조엘(Jeol) JEM 1400 Plus 투과전자현미경을 이용하여 관찰하였고 사진은 가탄 오리우스(Gatan Orius) CCD 카메라를 이용하여 촬영하였다. 컴퓨터 지원 ImageJ 분석 소프트웨어를 사용하여 EM 현미경 사진을 분석했다. g-비율을 계산하기 위해 뇌량의 EM 이미지에서 수초화 축삭(약 300, 마우스당 100개의 축삭, 유전자형당 n = 3)을 내부 축삭 직경을 전체 축삭 직경으로 나누어 분석했다.

[0179] 야외 테스트

[0180] 야외 테스트는 이전에 발표된 프로토콜에 따라 수행되었다.⁶⁰ 간단히 말해서, 마우스를 50 x 50 x 33cm 경기장의 모서리에 놓고 6분 동안 자유롭게 탐색할 수 있도록 했다. 경기장 중앙은 경기장 중앙에 있는 25 x 25 cm 정사각형으로 정의되었다. 중앙과 경기장 둘레에서 보낸 속도와 시간을 측정했다. 야외에서 테스트된 마우스는 추적 소프트웨어(Ethovision 12)가 있는 컴퓨터에 연결된 비디오 카메라를 사용하여 기록되었다.

[0181] 고가식 십자 미로 테스트

[0182] 테스트 장치는 16 cm 테두리로 둘러싸인 두 개의 닫힌 팔에 수직이고 서로 가로질러 1cm 높이 테두리로 둘러싸인 두 개의 열린 팔(30 x 5 cm)로 구성되어 있으며 모두 바닥에서 75 cm 높이에 있다. 마우스를 미로에 넣고 5분 동안 탐색하도록 허용했다. 열린 팔과 닫힌 팔 모두에서 방문 기간이 기록되었다.⁶⁰

[0183] 회전막대 테스트

[0184] 각 동물은 회전 속도가 분당 5회(rpm)에서 40 rpm으로 99초 동안 증가한 회전 막대 위에 놓였다. 각 동물에 대한 테스트는 20분 간격으로 3회 시험으로 이루어졌다. 장치에서 떨어지는 시간(지연 시간)은 각 동물에 대한 각 시도에 대해 기록되었다. 실험 시작 후 240초까지 동물이 장치에서 떨어지지 않으면 실험을 종료했다.⁶¹

[0185] 이미지 획득 및 분석

[0186] 면역 염색된 섹션은 파노라마 디지털 슬라이드 스캐너 또는 올림푸스 FV1000 공초점 레이저 스캐닝 현미경 또는 니콘 A1R+ 공초점 현미경을 사용하여 이미지화되었다. 획득한 이미지는 각각 케이스뷰어(CaseViewer), F-10-ASW 뷰어 및 NIS 요소와 같은 관련 현미경 소프트웨어 프로그램을 사용하여 처리되었다. ImageJ 소프트웨어를 사용하여 이미지를 분석했다. 유전자형에 대해 맹검 상태에서 이미지를 분석했으며 처리에는 밝기와 대비의 전반적인 변화가 포함되었다.

[0187] 통계 분석

[0188] 모든 그래프 및 통계 분석은 엑셀 또는 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 5를 사용하여 수행되었다. 실험 결과는 평균 ± SEM으로 표시되었다. 통계적 유의성을 테스트하기 위해 양측 언페어드 스튜던츠 t-테스트를 사용했다. 결과는 p<0.05일 때 유의한 것으로 간주하고, 그렇지 않으면 ns(유의성 없음)로 표시했다. 데이터 분석은 유전자형에 대해 맹검 상태에서 수행되었다. 샘플 크기와 p 값은 도면 범례에 표시된다.

[0189] 참조문헌

1. Aldaz, C.M., Ferguson, B.W., and Abba, M.C. (2014). WWOX at the crossroads of cancer, metabolic syndrome related traits and CNS pathologies. *Biochimica et biophysica acta* 1846, 188-200. 10.1016/j.bbcan.2014.06.001S0304-419X(14)00050-X [pii].
2. Del Mare, S., Salah, Z., and Aqeilan, R.I. (2009). WWOX: its genomics, partners, and functions. *J Cell Biochem* 108, 737-745. 10.1002/jcb.22298.
3. Salah, Z., Alian, A., and Aqeilan, R.I. (2012). WW domain-containing proteins: retrospectives and the future. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 17, 331-348.
4. Salah, Z., Aqeilan, R., and Huebner, K. (2010). WWOX gene and gene product: tumor suppression through specific protein interactions. *Future oncology* 6, 249-259. 10.2217/fon.09.152.
5. Chang, N.S., Hsu, L.J., Lin, Y.S., Lai, F.J., and Sheu, H.M. (2007). WW domain-containing oxidoreductase: a candidate tumor suppressor. *Trends Mol Med* 13, 12-22.

[0190]

6. Abu-Remaileh, M., Dodson, E.J., Schueler-Furman, O., and Aqeilan, R.I. (2015). Pleiotropic Functions of Tumor Suppressor WWOX in Normal and Cancer Cells. *J Biol Chem*. 10.1074/jbc.R115.676346.
7. Aqeilan, R.I., Abu-Remaileh, M., and Abu-Odeh, M. (2014). The common fragile site FRA16D gene product WWOX: roles in tumor suppression and genomic stability. *Cell Mol Life Sci* 71, 4589-4599. 10.1007/s00018-014-1724-y.
8. Hazan, I., Hofmann, T.G., and Aqeilan, R.I. (2016). Tumor Suppressor Genes within Common Fragile Sites Are Active Players in the DNA Damage Response. *PLoS Genet* 12, e1006436. 10.1371/journal.pgen.1006436.
9. Banne, E., Abudiab, B., Abu-Swai, S., Repudi, S.R., Steinberg, D.J., Shatleh, D., Alshammery, S., Lisowski, L., Gold, W., Carlen, P.L., and Aqeilan, R.I. (2021). Neurological Disorders Associated with WWOX Germline Mutations—A Comprehensive Overview. *Cells* 10, 824.
10. Aldaz, C.M., and Hussain, T. (2020). WWOX Loss of Function in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders. *Int J Mol Sci* 21. 10.3390/ijms21238922.
11. Piard, J., Hawkes, L., Milh, M., Villard, L., Borgatti, R., Romaniello, R., Fradin, M., Capri, Y., Heron, D., Nougues, M.C., Nava, C., et al. (2019). The phenotypic spectrum of WWOX-related disorders: 20 additional cases of WOREE syndrome and review of the literature. *Genet Med* 21, 1308-1318. 10.1038/s41436-018-0339-3.
12. Mallaret, M., Synofzik, M., Lee, J., Sagum, C.A., Mahajnah, M., Sharkia, R., Drouot, N., Renaud, M., Klein, F.A., Anheim, M., Tranchant, C., et al. (2014). The tumour suppressor gene WWOX is mutated in autosomal recessive cerebellar ataxia with epilepsy and mental retardation. *Brain* 137, 411-419. 10.1093/brain/awt338awt338 [pii].
13. Shaukat, Q., Hertecant, J., El-Hattab, A.W., Ali, B.R., and Suleiman, J. (2018). West syndrome, developmental and epileptic encephalopathy, and severe CNS disorder associated with WWOX mutations. *Epileptic Disord* 20, 401-412. 10.1684/epd.2018.1005.
14. Suzuki, H., Katayama, K., Takenaka, M., Amakasu, K., Saito, K., and Suzuki, K. (2009). A spontaneous mutation of the Wwox gene and audiogenic seizures in rats with

[0191]

lethal dwarfism and epilepsy. *Genes, brain, and behavior* 8, 650-660. 10.1111/j.1601-183X.2009.00502.xGGB502 [pii].

15. Tanna, M., and Aqeilan, R.I. (2018). Modeling WWOX Loss of Function in vivo: What Have We Learned? *Front Oncol* 8, 420. 10.3389/fonc.2018.00420.

16. Aqeilan, R.I., Hagan, J.P., de Bruin, A., Rawahneh, M., Salah, Z., Gaudio, E., Siddiqui, H., Volinia, S., Alder, H., Lian, J.B., Stein, G.S., et al. (2009). Targeted ablation of the WW domain-containing oxidoreductase tumor suppressor leads to impaired steroidogenesis. *Endocrinology* 150, 1530-1535. en.2008-1087 [pii]10.1210/en.2008-1087.

17. Aqeilan, R.I., Hassan, M.Q., de Bruin, A., Hagan, J.P., Volinia, S., Palumbo, T., Hussain, S., Lee, S.H., Gaur, T., Stein, G.S., Lian, J.B., et al. (2008). The WWOX tumor suppressor is essential for post-natal survival and normal bone metabolism. *J Biol Chem* 283, 21629-21639.

18. Repudi, S.R., Steinberg, D.J., Elazar, N., Breton, V.L., Aquilino, M.S., Saleem, A., Abu-Swai, S., Vainshtein, A., Eshed-Eisenbach, Y., Vijayaragavan, B., Behar, O., et al. (2021). Neuronal deletion of Wwox, associated with WOREE syndrome, causes epilepsy and myelin defects. *Brain* In press.

19. Sun, S., and Schaffer, D.V. (2018). Engineered viral vectors for functional interrogation, deconvolution, and manipulation of neural circuits. *Curr Opin Neurobiol* 50, 163-170. 10.1016/j.conb.2017.12.011.

20. Aguti, S., Malerba, A., and Zhou, H. (2018). The progress of AAV-mediated gene therapy in neuromuscular disorders. *Expert Opin Biol Ther* 18, 681-693. 10.1080/14712598.2018.1479739.

21. Pierce, E.A., and Bennett, J. (2015). The Status of RPE65 Gene Therapy Trials: Safety and Efficacy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5, a017285. 10.1101/cshperspect.a017285.

22. Wang, D., Tai, P.W.L., and Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov* 18, 358-378. 10.1038/s41573-019-0012-9.

23. Nakai, H., Yant, S.R., Storm, T.A., Fuess, S., Meuse, L., and Kay, M.A. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily

[0192]

responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* 75, 6969-6976. 10.1128/JVI.75.15.6969-6976.2001.

24. Balakrishnan, B., and Jayandharan, G.R. (2014). Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther* 14, 86-100. 10.2174/1566523214666140302193709.

25. Kim, J.Y., Grunke, S.D., Levites, Y., Golde, T.E., and Jankowsky, J.L. (2014). Intracerebroventricular viral injection of the neonatal mouse brain for persistent and widespread neuronal transduction. *J Vis Exp*, 51863. 10.3791/51863.

26. Gholizadeh, S., Tharmalingam, S., Macaldaz, M.E., and Hampson, D.R. (2013). Transduction of the central nervous system after intracerebroventricular injection of adeno-associated viral vectors in neonatal and juvenile mice. *Hum Gene Ther Methods* 24, 205-213. 10.1089/hgtb.2013.076.

27. Kurek, K.C., Del Mare, S., Salah, Z., Abdeen, S., Sadiq, H., Lee, S.H., Gaudio, E., Zanesi, N., Jones, K.B., DeYoung, B., Amir, G., et al. (2010). Frequent attenuation of the WWOX tumor suppressor in osteosarcoma is associated with increased tumorigenicity and aberrant RUNX2 expression. *Cancer Res* 70, 5577-5586. 0008-5472.CAN-09-4602 [pii]10.1158/0008-5472.CAN-09-4602.

28. Del Mare, S., Husanic, H., Iancu, O., Abu-Odeh, M., Evangelou, K., Lovat, F., Volinia, S., Gordon, J., Amir, G., Stein, J., Stein, G.S., et al. (2016). WWOX and p53 Dysregulation Synergize to Drive the Development of Osteosarcoma. *Cancer Res* 76, 6107-6117. 10.1158/0008-5472.CAN-16-0621.

29. Ludes-Meyers, J.H., Kil, H., Parker-Thornburg, J., Kusewitt, D.F., Bedford, M.T., and Aldaz, C.M. (2009). Generation and characterization of mice carrying a conditional allele of the Wwox tumor suppressor gene. *PLoS One* 4, e7775. 10.1371/journal.pone.0007775.

30. Abdeen, S.K., Del Mare, S., Hussain, S., Abu-Remaileh, M., Salah, Z., Hagan, J., Rawahneh, M., Pu, X.A., Russell, S., Stein, J.L., Stein, G.S., et al. (2013). Conditional inactivation of the mouse Wwox tumor suppressor gene recapitulates the null phenotype. *Journal of cellular physiology* 228, 1377-1382. 10.1002/jcp.24308.

31. Cheng, Y.Y., Chou, Y.T., Lai, F.J., Jan, M.S., Chang, T.H., Jou, I.M., Chen, P.S., Lo, J.Y., Huang, S.S., Chang, N.S., Liou, Y.T., et al. (2020). Wwox deficiency leads to

[0193]

neurodevelopmental and degenerative neuropathies and glycogen synthase kinase 3beta-mediated epileptic seizure activity in mice. *Acta Neuropathol Commun* 8, 6. 10.1186/s40478-020-0883-3.

32. Pattali, R., Mou, Y., and Li, X.J. (2019). AAV9 Vector: a Novel modality in gene therapy for spinal muscular atrophy. *Gene Ther* 26, 287-295. 10.1038/s41434-019-0085-4.

33. Peter, B., Dinu, V., Liu, L., Huentelman, M., Naymik, M., Lancaster, H., Vose, C., and Schrauwen, I. (2019). Exome Sequencing of Two Siblings with Sporadic Autism Spectrum Disorder and Severe Speech Sound Disorder Suggests Pleiotropic and Complex Effects. *Behav Genet* 49, 399-414. 10.1007/s10519-019-09957-8.

34. Mignot, C., Lambert, L., Pasquier, L., Bienvenu, T., Delahaye-Duriez, A., Keren, B., Lefranc, J., Saunier, A., Allou, L., Roth, V., Valduga, M., et al. (2015). WWOX-related encephalopathies: delineation of the phenotypical spectrum and emerging genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 52, 61-70. 10.1136/jmedgenet-2014-102748jmedgenet-2014-102748 [pii].

35. Abu-Remaileh, M., Seewaldt, V.L., and Aqeilan, R.I. (2014). WWOX loss inactivates aerobic glycolysis. *Molecular and cellular oncology*.

36. Abu-Remaileh, M., and Aqeilan, R.I. (2014). Tumor suppressor WWOX regulates glucose metabolism via HIF1alpha modulation. *Cell death and differentiation* 21, 1805-1814. 10.1038/cdd.2014.95.

37. Iatan, I., Choi, H.Y., Ruel, I., Reddy, M.V., Kil, H., Lee, J., Abu Odeh, M., Salah, Z., Abu-Remaileh, M., Weissglas-Volkov, D., Nikkola, E., et al. (2014). The WWOX Gene Modulates HDL and Lipid Metabolism. *Circulation. Cardiovascular genetics*. 10.1161/CIRCGENETICS.113.000248.

38. Lee, J.C., Weissglas-Volkov, D., Kyttala, M., Dastani, Z., Cantor, R.M., Sobel, E.M., Plaisier, C.L., Engert, J.C., van Greevenbroek, M.M., Kane, J.P., Malloy, M.J., et al. (2008). WW-domain-containing oxidoreductase is associated with low plasma HDL-C levels. *Am J Hum Genet* 83, 180-192. S0002-9297(08)00399-6 [pii]10.1016/j.ajhg.2008.07.002.

[0194]

39. Abu-Remaileh, M., Khalaileh, A., Pikarsky, E., and Aqeilan, R.I. (2018). WWOX controls hepatic HIF1alpha to suppress hepatocyte proliferation and neoplasia. *Cell Death Dis* 9, 511. 10.1038/s41419-018-0510-4.
40. Abu-Remaileh, M., and Aqeilan, R.I. (2015). The tumor suppressor WW domain-containing oxidoreductase modulates cell metabolism. *Exp Biol Med (Maywood)* 240, 345-350. 10.1177/1535370214561956.
41. Abu-Remaileh, M., Abu-Remaileh, M., Akkawi, R., Knani, I., Udi, S., Pacold, M.E., Tam, J., and Aqeilan, R.I. (2019). WWOX somatic ablation in skeletal muscles alters glucose metabolism. *Mol Metab* 22, 132-140. 10.1016/j.molmet.2019.01.010.
42. Saluda-Gorgul, A., Seta, K., Nowakowska, M., and Bednarek, A.K. (2011). WWOX oxidoreductase--substrate and enzymatic characterization. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences* 66, 73-82.
43. Chen, S.T., Chuang, J.I., Wang, J.P., Tsai, M.S., Li, H., and Chang, N.S. (2004). Expression of WW domain-containing oxidoreductase WOX1 in the developing murine nervous system. *Neuroscience* 124, 831-839. 10.1016/j.neuroscience.2003.12.036.
44. Chiang, M.F., Chen, S.T., Lo, C.P., Sze, C.I., Chang, N.S., and Chen, Y.J. (2013). Expression of WW domain-containing oxidoreductase WOX1 in human nervous system tumors. *Anal Cell Pathol (Amst)* 36, 133-147. 10.3233/ACP-140087.
45. Jakel, S., Agirre, E., Mendanha Falcao, A., van Bruggen, D., Lee, K.W., Knuesel, I., Malhotra, D., Ffrench-Constant, C., Williams, A., and Castelo-Branco, G. (2019). Altered human oligodendrocyte heterogeneity in multiple sclerosis. *Nature* 566, 543-547. 10.1038/s41586-019-0903-2.
46. International Multiple Sclerosis Genetics, C., Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., et al. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45, 1353-1360. 10.1038/ng.2770.
47. Ziliotto, N., Marchetti, G., Scapoli, C., Bovolenta, M., Meneghetti, S., Benazzo, A., Lunghi, B., Balestra, D., Laino, L.A., Bozzini, N., Guidi, I., et al. (2019). C6orf10 Low-Frequency and Rare Variants in Italian Multiple Sclerosis Patients. *Front Genet* 10, 573. 10.3389/fgene.2019.00573.

[0195]

48. International Multiple Sclerosis Genetics, C. (2019). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 365. 10.1126/science.aav7188.
49. Matsushita, T., Madireddy, L., Sprenger, T., Khankhanian, P., Magon, S., Naegelin, Y., Caverzasi, E., Lindberg, R.L., Kappos, L., Hauser, S.L., Oksenberg, J.R., et al. (2015). Genetic associations with brain cortical thickness in multiple sclerosis. *Genes, brain, and behavior* 14, 217-227. 10.1111/gbb.12190.
50. Hussain, T., Kil, H., Hattiangady, B., Lee, J., Kodali, M., Shuai, B., Attaluri, S., Takata, Y., Shen, J., Abba, M.C., Shetty, A.K., et al. (2019). Wwox deletion leads to reduced GABA-ergic inhibitory interneuron numbers and activation of microglia and astrocytes in mouse hippocampus. *Neurobiol Dis* 121, 163-176. 10.1016/j.nbd.2018.09.026.
51. Bednarek, A.K., Laflin, K.J., Daniel, R.L., Liao, Q., Hawkins, K.A., and Aldaz, C.M. (2000). WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* 60, 2140-2145.
52. Ried, K., Finnis, M., Hobson, L., Mangelsdorf, M., Dayan, S., Nancarrow, J.K., Woollatt, E., Kremmidiotis, G., Gardner, A., Venter, D., Baker, E., et al. (2000). Common chromosomal fragile site FRA16D sequence: identification of the FOR gene spanning FRA16D and homozygous deletions and translocation breakpoints in cancer cells. *Hum Mol Genet* 9, 1651-1663.
53. Abdeen, S.K., and Aqeilan, R.I. (2019). Decoding the link between WWOX and p53 in aggressive breast cancer. *Cell Cycle* 18, 1177-1186. 10.1080/15384101.2019.1616998.
54. Khawaled, S., Nigita, G., Distefano, R., Oster, S., Suh, S.S., Smith, Y., Khalaileh, A., Peng, Y., Croce, C.M., Geiger, T., Seewaldt, V.L., et al. (2020). Pleiotropic tumor suppressor functions of WWOX antagonize metastasis. *Signal Transduct Target Ther* 5, 43. 10.1038/s41392-020-0136-8.
55. Khawaled, S., Suh, S.S., Abdeen, S.K., Monin, J., Distefano, R., Nigita, G., Croce, C.M., and Aqeilan, R.I. (2019). WWOX Inhibits Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer Cells via Modulation of miRNAs. *Cancer Res* 79, 1784-1798. 10.1158/0008-5472.CAN-18-0614.

[0196]

56. Gardenswartz, A., and Aqeilan, R.I. (2014). WW domain-containing oxidoreductase's role in myriad cancers: Clinical significance and future implications. *Experimental Biology and Medicine* 239, 253-263. 10.1177/1535370213519213.

57. Baryla, I., Styczen-Binkowska, E., and Bednarek, A.K. (2015). Alteration of WWOX in human cancer: a clinical view. *Exp Biol Med (Maywood)* 240, 305-314. 10.1177/1535370214561953.

58. Abdeen, S.K., Salah, Z., Khawaled, S., and Aqeilan, R.I. (2013). Characterization of WWOX inactivation in murine mammary gland development. *Journal of cellular physiology* 228, 1391-1396. 10.1002/jcp.24310.

59. Ferguson, B.W., Gao, X., Kil, H., Lee, J., Benavides, F., Abba, M.C., and Aldaz, C.M. (2012). Conditional Wwox deletion in mouse mammary gland by means of two Cre recombinase approaches. *PLoS one* 7, e36618. 10.1371/journal.pone.0036618.

60. Wolf, G., Lifschytz, T., Ben-Ari, H., Tatarsky, P., Merzel, T.K., Lotan, A., and Lerer, B. (2018). Effect of chronic unpredictable stress on mice with developmental under-expression of the Ah1 gene: behavioral manifestations and neurobiological correlates. *Transl Psychiatry* 8, 124. 10.1038/s41398-018-0171-1.

61. Greenbaum, L., Lifschytz, T., Zozulinsky, P., Broner, E.C., Slonimsky, A., Kohn, Y., and Lerer, B. (2012). Alteration in RGS2 expression level is associated with changes in haloperidol induced extrapyramidal features in a mutant mouse model. *Eur Neuropsychopharmacol* 22, 379-386. 10.1016/j.euroneuro.2011.09.006.

[0197]

[0198]

실시예 3: 뇌 오가노이드를 이용한 유전성 간질성 뇌병증 모델링

[0199]

도입

[0200]

간질은 재발성 발작의 발달에 대한 만성 소인을 특징으로 하는 신경 장애이다(Fisher 등, 2014; Aaberg 등, 2017). 간질은 전 세계적으로 약 5천만 명에게 영향을 미치며 소아에서 가장 빈번한 만성 신경 질병으로 간주된다(Aaberg 등, 2017; Blumcke 등, 2017). 생후 초기 발작의 약 40%는 이전에 초기 유아 간질 뇌병증(EIEE)으로 알려진 발달 및 간질 뇌병증(DEE)에 의해 설명된다(Howell 등, 2021). 이들은 난치성 간질 활동 및 손상된 대뇌 및 인지 기능을 특징으로 하는 발달 중인 뇌의 병리이다(Lado 등, 2013; Shao & Stafstrom, 2016; Nashabat 등, 2019; Howell 등, 2021). 여러 유전자가 DEE를 유발하는 것과 관련이 있다(McTague 등, 2016). 최근 몇 년 동안, WWOX 유전자의 상염색체 열성 돌연변이는 DEE의 발병기전에서의 역할에 대해 점점 더 인식되고 있다(Piard 등, 2018; Nashabat 등, 2019). 염색체 취약 부위 FRA16D에 걸쳐 있는 중앙 억제자 WWOX는 뇌에서 높게 발현되어 중추신경계(CNS) 항상성에 중요한 역할을 한다(Abu-Remaileh 등, 2015). 2014년에, WWOX는 상염색체 열성 척수소뇌 실조증-12(SCAR12)(Gribaa 등, 2007; Mallaret 등, 2014) 및 WWOX-관련 간질성 뇌병증(WOREE 증후군, DEE28이라고도 함)(Abdel-Salam 등, 2014; Ben-Salem 등, 2015; Mignot 등, 2015)에 연루되었다. 두 장애 모두 발작, 지적 장애, 성장 지연 및 경직을 포함한 다양한 신경학적 증상과 관련이 있지만, 중증도, 발병 및 기저의 돌연변이 유형에 따라 다르다. WOREE 증후군은 더 공격적인 것으로 간주되며 이르면 1.5개월에 나타나고 더 극단적인 유전적 변화와 연관된다(Banne 등, 2021). 이 관찰은 두 증후군이 연속체로 간주될 수 있음을 의미할 수 있다. 발작과 함께 WOREE 증후군 환자는 전반적인 발달 지연, 진행성 소두증, 특정 CNS 구성 요소의 위축 및 조기 사망을 나타낼 수 있다. 그러나 WOREE 증후군의 표현형 스펙트럼은 광범위하며 환자마다 증상이 다르다. 예를 들어 일부 환자에서 소두증이 보이지만 다른 많은 환자는 이 상태를 나타내지 않는다(Piard 등, 2018).

[0201]

설치류에서 WWOX 기능 손실의 모델링이 포유류 뇌에서 WWOX의 역할에 대해 약간의 희망을 주지만(Aqeilan 등, 2007, 2008; Suzuki 등, 2009; Mallaret 등, 2014; Tanna & Aqeilan, 2018; Tochigi 등, 2019), 특정 환자의 유전적 배경과 뇌 발달은 마우스에서 모델링할 수 없고, 고유하며 환자-유래 유도 만능 줄기 세포(iPSCs)에 유지된다. WWOX 돌연변이가 있는 환자를 포함하여 DEE 뇌 샘플의 가용성의 이해가능한 부족을 우회하기 위한 노력

의 일환으로, 인간 PSC에서 WOREE 및 SCAR12 증후군이 있는 환자에서 볼 수 있는 유전적 변화를 요약하기 위해 게놈 편집 및 재프로그래밍 기술을 활용했다. 그런 다음 뇌의 공간 조직 및 세포 유형 형성의 많은 부분을 요약하고 시험관내에서 뉴런 기능을 갖는 뇌 오가노이드, 3D 뉴런 배양을 생성했다(Amin & Pasca, 2018; Sidhaye & Knoblich, 2020). 이를 통해 2D 세포 배양보다 생체내 인간 생리학을 더 잘 나타내는 시스템에서 CNS 및 복잡한 회로의 발달 및 성숙의 특징을 모델링할 수 있었다. 이 플랫폼을 사용하여 신경 세포 집단, 피질 형성 및 전기 활동의 심각한 결함을 식별하고 가능한 구제 전략을 테스트했다. 이 접근 방식은 CNS의 WWOX 생리학 및 병리생리학에 대한 더 깊은 이해로 이어져 보다 적절한 치료법을 개발하기 위한 토대를 마련하고 다른 인간 간질 질병을 모델링하기 위해 인간 뇌 오가노이드를 사용하는 개념을 지원한다.

[0202] 결과

[0203] WWOX 녹아웃 대뇌 오가노이드의 생성 및 특성화

[0204] DEE의 병인을 밝히기 위해, 뇌 오가노이드를 사용하여 WOREE 증후군을 프로토타입 모델로 연구했다. 제어된 유전적 배경에서 인간 두뇌의 발달에서 WWOX의 역할은 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 WiBR3 hESC 계통의 WWOX 녹아웃(KO) 클론을 생성하여 조사되었다(Abdeen 등, 2018). 면역블롯 분석을 사용하여 이들 계통에서 WWOX 발현을 평가했다. 검증 과정에서 일관되게 감지할 수 없는 WWOX 단백질 수준을 보인 두 개의 클론, 즉 WWOX-KO 계통 1B(WKO-1B, 여기서 KO1) 및 WKO-A2(여기서 KO2)를 선택했다. 이들 클론은 각각 핵형 분석 및 기형중 감정을 사용하여 유전적 안정성 및 만능성에 대해 평가되었다. 생어(Sanger) 시퀀싱은 엑손 1에서 WWOX의 편집을 확인했다. 또한 WWOX의 세포-자율 기능을 확인하기 위해, WWOX cDNA를 WWOX-KO1 hESC 계통의 내인성 AAVS 유전자좌로 복원하고 표현형의 가역성을 조사했다. KO1-AAV4 계통은 검증 과정에서 강력하고 안정적인 WWOX 발현을 위해 CO를 생성하기 위해 선택되었으며 여기서부터 W-AAV라고 지칭한다. 이들 계통은 배양 기간 전체에 걸쳐 형태 및 증식 면에서 부모 세포주(WiBR3 WT)와 실질적으로 구별할 수 없었다.

[0205] WWOX의 고갈이 3D 맥락에서 대뇌 발달에 미치는 영향을 조사하기 위해 확립된 프로토콜을 사용하여 hESC를 대뇌 오가노이드(CO)로 분화시켰다(Lancaster 등, 2013; Lancaster & Knoblich, 2014). 모든 유전자형의 CO는 모든 단계에서 비슷한 총체적 형태와 발달을 보였다. 다음으로, 오가노이드에서 발견되는 두 가지 주요 개체군, 뉴런 전구 세포 및 뉴런의 마커로 공동 염색하여 서로 다른 시점에서 발달 중인 뇌에서 WWOX의 발현 패턴을 조사했다. 10주차에, WWOX 발현은 SOX2⁺ 세포로 구성된 뇌실-유사 영역(VZ)에 특이적으로 국한되었으며, 이는 주변 세포가 아닌 뇌의 전구체인 방사형 신경아교세포(RG)에 해당한다. 이 발견은 마우스 피질 발달의 초기 단계에서 제한된 WWOX 발현을 보여주는 이전 연구와 일치한다(Chen 등, 2004). VZ에서 WWOX-발현 세포의 정체성을 확인하기 위해, 심실 방사형 신경아교세포(vRG)에서 특이적으로 발현되는 크리스탈린 알파 B(CRYAB)를 공동염색하여(Pollen 등, 2015) 이들 세포에서 WWOX 발현을 확인하였다(도 11b). 또한 VZ 구조가 소실된 24주와 같은 후기 시점에서도 WWOX 발현은 주로 SOX2⁺ 세포에서 발견된다. 중요한 것은 WWOX 발현이 WWOX-KO 계통에서 생성된 CO에서 관찰되지 않았지만, SOX2 및 뉴런-특이적 클래스 III β -튜불린(TUBB3 또는 TUJ1)과 같은 다른 마커의 유사한 수준의 발현이 관찰되었다(도 11b). 흥미롭게도, WWOX 발현이 인간 유비쿼틴 프로모터(UBP)에 의해 구동되는 W-AAV CO는 예상대로 VZ에서 높은 WWOX 수준을 나타내었지만, 다른 세포 집단도 두드러진 WWOX 발현을 보였다.

[0206] 다음으로, 일부 환자에서 관찰된 소두증 표현형을 해결하기 위해, 배양 기간 동안 오가노이드의 직경을 측정했는데 큰 차이가 없었다. 이로 인해 조직학적 대뇌 구조의 발달을 조사하게 되었다. WT 오가노이드에서, SOX2⁺ 세포로 구성된 VZ는 중간 전구체(IP; TBR2⁺ 세포, EOEMS라고도 함)로 둘러싸여 뇌실하 영역(SVZ)의 존재를 표시한다. 이 층 외부에는 주로 뉴런(NeuN⁺ 세포)으로 구성된 피질판(CP)이 있다. 10주차 CO에서 VZ 및 주변 구조의 구성 또는 형성에 눈에 띄는 차이가 관찰되지 않았으며(도 11c), 이는 이러한 집단의 유사한 비율을 시사한다. 이것은 또한 전구체 마커(SOX2 및 PAX6) 및 뉴런 마커 TUBB3(도 11c)의 RNA 발현 수준을 측정함으로써 뒷받침되었다. 이 놀라운 관찰로 인해 CO에서 발견되는 두 가지 주요 뉴런 하위 집단인 글루타메이트성(glutamatergic) (소포성 글루타메이트 수송체 1, VGLUT1로 표시됨) 및 GABA성(GABAergic) 뉴런(글루탐산 탈카복실라아제 67, GAD67로 표시됨)을 추가로 조사하게 되었다. 면역염색은 VGLUT1 발현이 유사하게 유지되었지만, WT와 비교하여 KO CO에서 GAD67의 발현이 현저하게 증가한 것으로 나타났다. 대조적으로, WWOX 복원(W-AAV)은 이러한 불균형을 상당히 역전시켰다(도 11d). SLC17A6 (VGLUT2), SLC17A7 (VGLUT1), GAD1 (GAD67) 및 GAD2 (GAD65)의 RNA 수준은 동일한 경향을 따랐다.

- [0207] 이러한 결과는 인간 배아 발달 동안, WWOX 발현이 VZ의 정점 층의 세포로 제한되고 WWOX 고갈이 VZ-SVZ-CP 구조에 영향을 미치지 않았지만 글루타메이트성 및 GABAergic 뉴런 사이의 균형을 방해했음을 시사한다.
- [0208] WWOX-고갈된 대뇌 오가노이드는 과흥분성과 간질 활성을 나타냈다
- [0209] 대뇌 오가노이드는 이전에 전기생리학적 기능성을 보여준 뉴런을 생성한다(Trujillo 등, 2019). WWOX-KO CO의 기능적 특성을 특성화하기 위해, 7주 CO 절편에서 로컬 필드 전위 기록(LFP)을 수행했다. 전극은 절편 준비에 의해 잠재적으로 손상될 수 있는 영역을 피하기 위해 절편 가장자리에서 150 μm 떨어진 곳에 위치했다(데이터는 표시되지 않음). WT 및 KO CO의 샘플 트레이스는 기준선 조건 하에서 두 계통 사이의 눈에 띄는 차이를 나타내었다(도 12a, 왼쪽). 필드 기록의 평균 스펙트럼 전력은 0.25-1 Hz에서 KO CO의 전력이 전반적으로 증가했으며 일반적으로 느린 파장 진동(SWO, < 1Hz)(도 12b)으로 표시되었고 30-79.9 Hz 고주파수 범위에서 감소했다. 진동 전력(OP)은 기준선 조건 하에서 WT 계통보다 상당히 더 높은 곡선 아래 영역으로 정량화되었다(도 12c). 시간이 지남에 따라 KO 계통의 OP는 크게 감소한 반면, WT 계통의 OP는 그대로 유지되어 KO 계통의 발달 지연을 시사했다.
- [0210] KO 계통의 과흥분성을 추가로 측정하기 위해, 발작 유도에 일반적으로 사용되는 경련제인 100 μM 4-AP를 기록 중에 절편에 적용했다. 4-AP는 WT 및 KO 계통 모두에 대한 LFP 기록의 변화를 보여주었지만(도 12a, 오른쪽), KO 계통은 현저하게 증가된 활동을 나타냈으며, 이는 WT 트레이스에는 없었다. 스펙트럼 전력에 대한 4-AP의 효과는 첨가한 지 5분 후에 분명해졌다. 4-AP가 있는 상태에서 WT 및 KO 계통 모두에 대한 샘플 트레이스의 교차-주파수 커플링은 이전에 발작 하위상태를 특성화하고 분류하는 데 사용된 속성인 δ : HFO 주파수 쌍의 증가를 나타냈다(Guirgis 등, 2013). 중요하게도, WWOX cDNA를 함유하는 렌티바이러스의 형질도입은 평균 전력 스펙트럼 밀도와 관련하여 KO 계통의 회복을 가져왔다(도 12d 및 e).
- [0211] WWOX-고갈된 대뇌 오가노이드는 손상된 정상세포생성 및 DNA 손상 반응을 나타냈다
- [0212] 뇌에서 흥분성 활동과 억제성 활동 사이의 불균형이 발작의 주요 메커니즘이라는 것이 널리 받아들여지고 있지만, 이것이 반드시 뉴런이 관련된 유일한 집단이라는 것을 의미하지는 않다. 간질 환자의 뇌 샘플이 염증, 정상 세포 활성화 및 신경아교종의 징후를 보인다는 것은 잘 알려져 있으며(Cohen-Gadol 등, 2004; Thom, 2009), 일부 경우에서 유일한 조직병리학적 소견일 수 있다(Blumcke 등, 2017). 이 현상이 급성 손상의 결과인지 발작의 원인인지는 여전히 논쟁의 여지가 있다(Vezzani 등, 2011; Robel 등, 2015; Rossini 등, 2017; Patel 등, 2019). 또한 최근 연구에서는 Wwox-null 마우스의 뇌에서 정상교세포증을 입증했다(Hussain 등, 2019).
- [0213] 이를 해결하기 위해, 면역형광 염색을 사용하여 15주 및 24주 CO에서 정상아교세포 마커인 신경교 섬유성 산성 단백질(GFAP) 및 S100 칼슘-결합 단백질 B(S100 β)를 시각화했다(도 13a-c). 이것은 시간이 지남에 따라 진행되고 W-AAV CO에서 부분적으로 역전된 WWOX-KO CO에서 정상세포의 현저한 증가를 나타냈다. 이는 20주 CO의 면역블롯 분석에 의해 추가로 뒷받침되었다. GFAP는 또한 15주차에 풍부하지만 24주차에는 감소하는 RG(Middeldorp 등, 2010)를 표시하여, 초기 단계에서 잠음의 원인이 될 수 있다는 점에 주목할 만하다.
- [0214] 정상세포는 뇌에 있는 두 가지 별개의 세포 집단, 즉 신경발생에서 정상세포발생으로 전환하는 RG 세포 또는 정상세포 전구 세포(APC)에서 발생한다(Zhang 등, 2016; Blair 등, 2018). 정상세포 마커의 이러한 차이를 추적하기 위해, 6주 및 10주 된 CO를 비교했다. WT 오가노이드에서 정상세포 마커가 검출되지 않는 6주차 CO에서 VZ에서 S100 β 의 상당한 발현이 관찰되었음을 발견했다(도 13d). 10주차에, WT와 KO 오가노이드 모두에서 S100 β 의 발현을 관찰했지만, 세포 증식 마커 Ki67로 공동 염색을 수행했을 때 유사한 아교세포 증식을 암시하는 이중-양성 세포에서 유의미한 차이를 감지하지 못했다. SOX2⁺ 핵과 함께 Ki67⁺ 핵의 정량화는 WWOX-KO와 비교하여 WT에서 SOX2의 비율이 온전하게 유지되었지만(WT에서 18.5%, 95% CI = 14.2-22.81; KO에서 19.5%, 95% CI = 15.29-22.81), 증식 세포의 비율(WT에서 9.5%, 95% CI = 6.63-12.35; KO에서 4.9%, 95% CI = 2.76-7.13) 및 Ki67⁺/SOX2⁺ 이중-양성 세포의 비율이 감소했다(WT에서 51.83%, 95% CI = 41.18-62.48; KO에서 27.09%, 95% CI = 14.1-40.1). 이러한 결과는 WWOX 손실 시 SOX2⁺ 세포의 전체 증식이 감소하지만, VZ 외부의 총 RG 양은 영향을 받지 않아 정상세포의 출처에 대한 의문을 제기한다는 것을 의미한다.
- [0215] KO CO에서 vRG의 이러한 독특한 행동은 WWOX가 직접 관여하는 것으로 알려진 신호 경로인 생리학적 DNA 손상 반응(DDR)을 조사하여 이의 기능을 자세히 살펴보도록 했다(Abu-Odeh 등, 2014b; Abu-odeh 등, 2016). 이를 위해, DNA 이중-가닥 파손에 대한 대리 마커인 γ H2AX 및 53BP1에 대해 염색했다. VZ의 가장 안쪽 층에 있는 SOX2⁺ 세포의 핵에서 γ H2AX 및 53BP1 병소의 현저한 축적을 발견했으며, 각각 WWOX-KO에서 평균 1.5 병소/핵

[95% CI =1.33-1.74] 및 1.2 병소/핵[95% CI = 1-1.38]이었다. 이는 연령 일치 WT CO에서 0.78 γ H2AX 병소/핵 [95% CI = 0.55-1.02] 및 0.62 53BP1 병소/핵 및, 연령 일치 W-AAV CO에서 0.58 병소/핵[95% CI = 0.38-0.77] 및 0.56 병소/핵 [95% CI = 0.37-0.76]과 비교된다(도 13e 및 f). 이러한 결과는 DDR 신호에서 WWOX의 직접적인 역할과 일치한다(Aqeilan 등, 2014; Hazan 등, 2016). 중요한 것은 W-AAV CO가 향상된 DDR을 제공한다는 것이다. 흥미롭게도, VZ의 고도로 증식하는 세포에서 더 많은 수의 γ H2AX 병소가 발견되었으며, 이는 Ki67과의 공동 염색에 의해 관찰되었고 - 11.9%[95% CI = 8-15%]와 비교하여 SOX2⁺ 세포의 18.6%가 KO CO에서 이중-양성이었다[95% CI = 15-22%]. 이로 인해 손상된 세포의 지속적인 증식이 감소된 아포토시스를 동반할 수 있으며, 이는 관문 억제 손실을 나타낼 수 있다고 추측하게 되었다. 이 가설은 VZ에서 절단된 카스파제-3에 대한 염색으로 해결되었으며, 이는 WWOX-KO에서 이들 세포의 아포토시스 감소를 나타냈고 W-AAV CO에서 구제되었다.

[0216] 결론적으로, WWOX-KO CO는 향상된 분화 RG로 인해 정상세포 수의 점진적인 증가와 신경 전구 세포의 DNA 손상 증가를 나타낸다.

[0217] WWOX-고갈된 대뇌 오가노이드의 RNA-시퀀싱은 주요 분화 결함을 드러냈다

[0218] 분자 프로필을 조사하기 위해 15주 WT 및 KO CO에서 전체-전사체 RNA 시퀀싱(RNA-seq) 분석을 수행했다. 뇌 오가노이드의 알려진 이질성에도 불구하고, 주요 성분 분석(PCA)은 샘플을 두 개의 별개의 클러스터로 분리했다. 분석 결과 15,370개의 차별적으로 발현된 유전자가 밝혀졌으며, 그 중 1,246개의 유전자가 WWOX-KO CO에서 상향 조절되었고 1.2보다 큰 배수 변화(FC > 1.2)와 유의미한 P-값(P < 0.01)이 모두 나타났으며, 1,021개의 유전자가 하향조절되었다(FC < 1/1.2, P < 0.01). 상향조절된 상위 100개 유전자 중에서, GABA성(GABAergic) 뉴런(*GAD1*, *GRM7*, *LHX5*) 및 성장세포(*AGT*, *S100A1*, *GJA1*, *OTX2*)와 같은 신경 집단 및 칼슘 신호(*HRC*, *GRIN2A*, *ERBB3*, *P2RX3*, *HTR2C*, *PDGFRA*) 및 축삭 유도(*GATA3*, *DRGX*, *ATOX1*, *NTN1*, *SHH*, *RELN*, *OTX2*, *SLIT3*, *GBX2*, *LHX5*)와 관련된 유전자를 발견하였다. 하향조절된 상위 100개 유전자에는 GABA 수용체(*GABRB3*, *GABRB2*), 자가포식(*IFI16*, *MDM2*, *RB1*, *PLAT*, *RB1CC1*) 및 mTOR 경로(*EIF4EBP1*, *PIK3CA*, *RB1CC1*)와 관련된 유전자가 있었다.

[0219] 차별적으로 발현된 상위 3,000개 유전자의 유전자 집합 농축 분석(GSEA) 및 유전자 온톨로지(GO) 농축 분석은 무엇보다도 ATP 합성-커플링된 전자 수송 및 산화적 인산화와 관련된 과정의 억제를 밝혀냈으며, 이 모든 것은 마우스 모델에서 WWOX의 기능과 이전에 보고된 것과 일치한다(Abu-Remaileh & Aqeilan, 2014, 2015; Abu-Remaileh 등, 2018). 이전에 보고된 감소된 관문 억제와 일치하는 세포 주기의 음성 조절과 관련된 유전자의 하향조절이 관찰되었다(Abu-Odeh 등, 2014b; Abu-odeh 등, 2016). 한편, 지역화, 뉴런의 운명 결정 및 특성화, 축 특성화(복부-등 및 전-후방), 해당작용 및 포도당신생합성과 관련된 경로에서 현저한 농축이 나타났으며, 이 중 일부는 과거 연구에서도 뒷받침된다(Wang 등, 2012, Abu-Remaileh & Aqeilan, 2014). 예상할 수 있듯이 상향조절된 유전자는 Wnt 경로(예를 들어, *WNT1*, *WNT2B*, *WNT3*, *WNT3A*, *WNT5A*, *WNT8B*, *LEF1*, *AXIN2*, *GBX2*, *ROR2*, *LRP4*, *NKD1*, *IRX3*, *CDH1*) 및 Shh 경로(예를 들어, *SHH*, *GLI1*, *LRP2*, *PTCH1*, *HHIP*, *PAX1*, *PAX2*)와 같은 발달 경로와 관련이 있었다.

[0220] WWOX는 이전에 Wnt 신호전달 경로에 연루되었으므로(Bouteille 등, 2009; Wang 등, 2012; Abu-Odeh 등, 2014a; Cheng 등, 2020; Khawaled 등, 2020), 본 CO 모델에서 이것을 추가 탐색을 시작했다. 먼저 RNA-seq 데이터를 사용하여 표준 표적(예를 들어, *Axin2*, *TCF7L2*, *LEF1*, *TCF7L1*), 뇌-특이적 표적(*IRX3*, *ITGA9*, *GATA2*, *FRAS1*, *SP5*) 및 수용체(*ROR2*, *FZD2*, *FZD10*, *FZD1*)의 WNT 신호전달 경로(예를 들어, *WNT1*, *WNT3*, *WNT5A*, *WNT8B*)의 다른 구성원의 발현을 검사했다. 다음으로 qPCR을 사용하여 이들 유전자 중 일부를 확인했다(도 14a). 또한 *WNT3*, *WNT3A*, *WNT1* 및 *ROR2*를 포함하여 W-AAV CO에서 일부 Wnt-관련 유전자의 하향조절을 관찰했다(도 14a). 또한, Wnt 활성화를 증명하기 위해, 표준 Wnt 경로의 특징인 핵으로의 β -카테닌 전위를 시연했다. 이를 위해, 16주차 CO를 세포질 및 핵 분획으로 세분화하고 면역블로팅하였다(도 14b). WWOX-KO CO의 핵에서 정규화된 β -카테닌 강도가 약 1.7배 증가한 것을 발견했으며, 이는 WWOX 손실 후 Wnt 경로 활성화의 개념을 뒷받침한다. 이것은 또한 6-24주에 여러 Wnt-관련 유전자(*WNT3*, *AXIN2*, *LEF1* 및 *TCF7*)의 운동학적 발현을 조사하여 뒷받침되었으며, 이는 WT CO의 점진적인 감소와 비교하여 KO CO에서 만성 Wnt 활성화를 나타냈다.

[0221] 최근 증거에 따르면 발달 중 전뇌 오가노이드에서 Wnt가 활성화되면 뉴런 특성화 및 피질층 형성이 중단된다(Qian 등, 2020). 이것이 WWOX-KO CO에서 발생하는지 여부를 확인하기 위해, RNA-seq 데이터에서 피질층 마커(Qian 등, 2016)의 발현 수준을 조사했다. 흥미롭게도, 6개 층 모두에서 변화가 관찰되었으며, 층 I-IV(*TBR1*, *BCL11B*, *SATB2*, *POU3F2*로 표시)는 감소된 발현을 나타내고 표면층 V-VI(*CUX1* 및 *RELN*으로 표시)는 현저한 증가를 나타내었다. 이 패턴은 qPCR로도 확인되었다. 흥미롭게도, 면역형광 염색을 사용하여 단백질 수준을 조사했을 때, WWOX-KO CO에서 *TBR1*⁺, *CTIP2*⁺(*BCL11B*) 및 *SATB2*⁺ 뉴런이 혼합되어 손상된 발현 패턴 및 계층화도 관찰

했다(도 17d 및 e). 이 결합은 진행성이었고 24주차에 악화되었다. 놀랍게도m 이소성 WWOX 발현의 효과를 조사할 때, 덜 명확한 표현형이 관찰되었다; WWOX-KO CO와 비교하여 W-AAV CO에서 CTIP2⁺ 세포 및 SATB2⁺ 세포 수가 회복되고 계층화가 개선되었지만 RNA 수준은 부분적으로만 회복되었다. 대조적으로, WWOX-KO에서 상향조절된 표면층 마커 CUX1 및 RELN의 발현은 상위층 마커 POU3F2(BRN2)와 함께 W-AAV에서 감소되었다. 중요한 것은 CO에서 등쪽 및 복부 유전자의 발현을 조사할 때, 높은 RNA 관독 수에 의해 평가된 바와 같이 오가노이드가 등쪽 정체 성임을 관찰했다. 주목할 점은 이러한 마커의 발현에서 WT와 KO 사이에 통계적으로 유의미한 차이가 관찰되지 않았다는 것이다.

[0222] 전반적으로, RNA-seq는 WWOX-KO CO에서 손상된 공간 패턴, 축 형성 및 피질 층 형성을 나타냈으며, 이는 세포 경로의 중단 및 Wnt 신호전달의 활성화와 관련이 있다. WWOX의 재도입은 이러한 변화를 어느 정도 방지하여 유전자 치료에 대한 가능성을 더욱 뒷받침한다.

[0223] 환자-유래 WWOX-관련 발달 및 간질성 뇌병증의 뇌 오가노이드

[0224] CRISPR-편집 세포를 사용한 질병 모델링이 널리 사용되는 도구이지만, 비평가들은 인간 환자의 전체 유전적 배경을 모델링하지 않는다는 이유로 이에 반대한다. 따라서 심각도가 다른 WWOX-관련 질병을 앓고 있는 두 가족로부터 기증된 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 세포프로그래밍했다: 첫 번째 가족은 동형접합 환자에서 WOREE 증후군(Dee28) 표현형을 초래하는 c.517-2A>G 스플라이스 부위 돌연변이(Weisz-Hubshman 등, 2019)를 가지고 있다(WSM 가족이라고 지칭); 두 번째 가족은 동형접합 환자에서 SCAR12 표현형을 초래하는 c.1114G>C(G372R) 돌연변이(Mallaret 등, 2014)를 가지고 있다(WPM 가족이라고 지칭). 모든 iPSC 계통은 프라이밍된 hPSC 및 자가-재생 능력에 대해 정상적인 형태를 보였고 다능성 마커의 발현에 대해 평가되었다.

[0225] 그런 다음 WSM 가족의 건강한 이형접합체 부모(WSM F1이라고 하는 아버지, WSM M2라고 하는 어머니, 총체적으로 WSM P라고 지칭) 및 아픈 동형접합 아들(WSM S2 및 S5 계통, 총칭하여 WSM S라고 지칭)로부터 분리된 iPSC에서 CO를 생성하는 작업을 진행했다. 또한 W-AAV CO에 대해 기재된 구체 접근 방식을 사용하고 WWOX를 WSM S5 계통(WSM S5 W-AAV3 및 W-AAV6, 통칭하여 WSM S W-AAV라고 지칭)에 다시 도입했다. 그런 다음 이들 오가노이드를 뉴런 분화 및 VZ 형성에 대해 검증하였다(도 15a). hESC-유래 CO와 유사하게 WWOX는 주로 WSM F1 및 WSM M2의 VZ에서 발현되었다. $\beta 3$ -튜불린⁺-양성 세포와 SOX2⁺-양성 세포의 수는 비슷했지만, WSM S CO는 검출가능한 수준의 WWOX를 나타내지 않았고, WSM S W-AAV CO는 WWOX를 전체적으로 발현했다.

[0226] 다음으로 WSM S CO의 뉴런 흥분성을 평가하기 위해, WSM P CO의 24개 뉴런 및 WSM S W-AAV 오가노이드의 40개 뉴런과 함께 41개의 WSM S CO 뉴런에서 셀-부착 기록을 수행했다. WSM S, WSM P 및 WSM S W-AAV CO에서 활동 전위의 자발적 발화를 갖는 샘플 트레이스는 동일한 조건에서 기록된 세 군 간에 눈에 띄는 차이를 나타냈다. WSM S CO는 WSM P 및 WSM S W-AAV 오가노이드와 비교하여 활동 전위의 폭발 및 전반적으로 증가된 뉴런 활동을 입증했다(도 15b). WSM S CO의 뉴런은 WSM P($P < 0.0001$) 및 WSM S W-AAV($P < 0.0001$) CO의 뉴런과 비교하여 발화율에서 급격한 증가(약 4배)를 보였다(도 15c). WSM P와 WSM S W-AAV CO의 뉴런의 발화율 사이에는 유의한 차이가 없었다($P = 0.7681$). 중요한 것은 WSM F1 계통의 CO를 WSM M2 계통과 비교할 때 유의한 차이가 관찰되지 않았다는 것이다($P = 0.0952$). 전반적으로, 본 결과는 부모와 비교하여 WOREE 증후군 환자에서 유래된 7주 된 오가노이드에서 뉴런의 과흥분성을 보여준다.

[0227] 다른 연구 본 결과와 일관되게, 10주차 WSM S CO는 WSM F1 및 WSM M2와 비교하여 GAD67의 증가된 발현을 나타냈으며, 표현형은 WSM S W-AAV CO에서 역전되었다(도 15d 및 e). VGLUT1의 발현은 다른 계통 간에 변경되지 않았다. 다음으로 성상세포 마커의 발현을 평가하고 연령-일치 대조군과 비교하여 WSM S에서 GFAP 및 S100 β 의 증가된 발현을 발견했다(도 16a). WSM S CO의 vRG에서 DDR 결합도 명백했다(도 16b 및 c). Wnt 경로의 상태는 또한 qPCR을 사용하여 평가되었으며, 연령-일치된 WSM P 및 WSM S W-AAV와 비교하여 10주차 WSM S CO에서 활성화를 시사하는 발견이 있었다(도 16d). 마지막으로, 면역형광법을 사용하여 피질 적층을 평가하고 WSM S CO에서 피질 마커 CTIP2⁺ 및 SATB2⁺의 감소된 발현을 발견했다(도 16e 및 f).

[0228] 표현형의 주요 부분이 CO의 피질 영역에서 관찰되었고 피질에서 WWOX에 대한 입증된 역할이 주어졌기 때문에, 피질-특이적 프로토콜을 사용하고 전뇌 오가노이드(FO)를 생성하기로 결정했다(Qian 등, 2016, 2018). 첫째, 재현성을 검증하기 위해, WSM F1 및 WSM S5에서 FO를 생성하고 WSM CO에 대해 유사한 표현형을 찾았다.

[0229] 다음으로 이의 환자가 온화한 표현형을 갖는 WPM SCAR12 계열이 WOREE 증후군의 우리의 CO 및 FO와 유사한 표현형을 나타내는지 연구하고자 했다. 건강한 이형접합 아버지와 어머니(WPM F2 및 WPM M3) 및 이들의 영향을 받은

동형접합 딸과 아들(WPM D1 및 WPM S1)로부터 FO를 생성했다. 예상대로, FO는 $\beta 3$ -튜불린 및 SOX2의 형태, 성장 및 발현 측면에서 구분할 수 없었고, WPM F2 및 WPM M3의 VZ에서는 WWOX가 검출되었지만, WPM D1 및 S1에서는 신호가 거의 관찰되지 않았으며 iPSC에서 WWOX 수준과 일치했다. 등쪽 전뇌 정체성은 PAX6에 대한 염색을 통해 확인되었다. 놀랍게도, 뉴런 마커의 전사체 발현 수준은 글루타메이트성 및 GABA성(GABAergic) 뉴런 사이의 비율에서 명확한 차이를 나타내지 않았다. 유전자형이 유사한 계통의 FO 간에 약간의 차이가 있었지만, 건강한 iPSC 계통(WPM F2 및 WPM M3)과 질병-보유 계통(WPM D1 및 WPM S1) 사이의 비슷한 수준의 피질층 마커 발현은 정상적인 뉴런 및 피질 발달의 개념을 뒷받침했다. 흥미롭게도, Wnt 유전자의 RNA 수준은 Wnt 경로 활성화를 암시하는 패턴을 보여주었고, 이는 경미한 질병의 병인에 대한 역할에 대한 의문을 제기한다. 또한 성상세포 수준에 대한 면역염색 및 qPCR 분석은 유의미한 차이를 나타내지 않았다. 마지막으로, FO의 VZ에서 DDR 신호를 분석한 결과 건강한 SCAR12 개체과 아픈 SCAR12 개체 간의 DNA 손상 병소 축적의 주요 차이점을 관찰하지 못했다. 전체적으로, 이 데이터는 SCAR12와 WOREE 증후군-유래 오가노이드 사이의 다른 발달 결과를 시사한다.

[0230] 논의

[0231] DEE는 기저의 분자 병리가 알려지지 않은 중증 신경 증후군 군이다(Howell 등, 2021). 인간 샘플에 대한 접근성 부족과 함께 현재의 의학적 치료가 부족한 것은 놀라운 일이 아니다. 본 연구는 조직-관련 맥락에서 인간 난치성 DEE를 모델링하기 위해 중증 WOREE 증후군에서 WWOX의 역할과 함께 발달 생물학의 주요 기술 발전을 활용하기 시작했다. 전기 생리학학 함께 유전자 조작 및 재프로그래밍을 활용하여, WWOX CRISPR-편집 및 환자-유래 뇌 오가노이드 모두에서 과흥분성을 관찰하여 간질 활동을 성공적으로 입증했다. 그런 다음 질병 병리생리학에 대한 가능한 메커니즘을 강조하는 세포 및 분자 변화를 추가로 조사했다. 첫째, 뉴런 집단은 양적으로는 대체로 손상되지 않았지만 GABA성(GABAergic) 마커가 현저하게 증가한 것을 발견했다. 이러한 발견은 RNA-seq에 의해 관찰되는 GABA 수용체 성분의 감소를 고려할 때 더욱 놀라운 것이다. 이것은 이러한 오가노이드에서 관찰되는 증가된 전기 활동을 지원하는 정상적이고 균형잡힌 뉴런 네트워크의 발달이 중단되었음을 나타낼 수 있다. 발달 과정에서 GABA성(GABAergic) 시냅스가 탈분극 효과를 갖는다는 몇 가지 증거가 있음을 주목해야 한다(Obata 등, 1978; Ben-Ari 등, 2007; Murata & Colonnese, 2020). 발달 간질의 발작 역학은 탈분극 GABA 반응에 의존하는 것으로 알려져 있고, 특히 세포 내 염화물의 축적으로 인해 탈분극 염화물 역전 전위가 생겨 GABA_A 수용체 활성화 시 과분극 대신 흥분성이 증가한다(Khalilov 등, 2005; Ben-Ari 등, 2007). WWOX-고갈된 CO 및 WSM FO에서 증가된 평균 스펙트럼 전력의 증거 및 WWOX를 함유하는 렌티바이러스의 존재 하에서의 회복은 탈분극 GABA가 발작 감수성에 중요한 역할을 한다는 생각을 더욱 강화한다. 이러한 발견은 미성숙 뉴런에 대한 일반적인 환경적 요법의 효능 부족에 대한 새로운 시각을 제시하며(Khalilov 등, 2005; Murata & Colonnese, 2020), WWOX-고갈된 CO를 흥분성 GABA성(GABAergic) 반응을 표적으로 하는 새로운 요법을 테스트하고 연구하는 데 유용한 모델로 만든다. SWO의 증가는 이전에 발작 주기의 다양한 단계, 시작, 발작 전체 및 종료와 관련이 있었다(Bragin & Engel, 2008). 이전 연구는 또한 SWO가 피질의 흥분성을 조절하고(Vanhatalo 등, 2004) 발작 전 기간 동안 발작-개시 영역을 국소화할 수 있음을 입증했다(Miller 등, 2007). 또한 느린 파동은 만삭아와 조산아에서 EEG 발작 활동의 특징으로 확인되었다(Patrizi 등, 2003). 발작 발생 중 SWO의 메커니즘은 잘 알려져 있지 않다. 그러나 몇 가지 가설은 세포외 칼륨의 증가, pH의 변화, 아교세포 기능장애 및/또는 혈액-뇌 장벽 기능을 제한한다(Bragin & Engel, 2008). 메커니즘을 탐색하는 것은 본원의 범위를 벗어나지만 향후 탐색할 흥미로운 방향이다.

[0232] 한편, 도 12a-c는 베타(12-30 Hz) 및 감마(>30 Hz) 진동과 같은 더 높은 주파수 활동의 감소를 보여준다. 더 높은 주파수 활동, 특히 감마 진동은 특정 병소 영역에서 발작이 시작되기 전에 증가하는 것으로 알려져 있고 간질발생의 가능한 결정 요인으로 연구되었지만(Medvedev 등, 2011), 본 데이터는 WWOX-관련 발작에 대해 이를 지원하지 않는다. 이에 대한 한 가지 가능한 설명은 7주 된 CO의 성숙도이다. 감마 진동은 기능적 연결성과 연관되며 뇌 구조 내외의 신경망을 통합한다(Kheiri 등, 2013; Ahnaou 등, 2017). 이러한 고주파수 범위에서 낮은 전력은 WWOX-KO 오가노이드의 지연된 발달 및 저하된 기능적 연결성으로 인한 것일 수 있다. 12주 WSM FO에서 흥미로운 관찰은 WSM S5 FO의 활동이 고주파수 범위에서 향상되었다는 것이다. 이러한 대조는 연령, 발달 프로토콜 또는 감지된 간질 활동에 대한 기저의 메커니즘으로 인한 것일 수 있다. 특히 기저 메커니즘은 심층 단일-세포 분석과 표적 채널 차단제 및 약물 사용을 통해 추가 조사가 필요하다.

[0233] 둘째, 뇌 오가노이드에서 관찰되는 다른 집단을 면밀히 조사하여 성상세포 마커의 증가를 발견한 반면, 높은 수준의 WWOX를 발현하는 RG 집단은 정상적인 비율을 유지하는 것으로 보였다. 이 패턴은 초기에 감지되었으며 APC가 아닌 vRG에서 비롯된 것으로 나타났다. 가능한 설명은 WWOX-고갈된 오가노이드에서 관찰되는 손상된 DDR 신호이다; ESC-유래 및 일차 뉴런 신경 줄기 세포(NSC)에 대한 이전 연구에서는 핵 또는 미토콘드리아 DNA에 DNA 손상 병소가 축적되면 NSC가 성상세포 분화로 이동하는 것으로 나타났다(Wang 등, 2011; Schneider 등, 2013).

CNS에서, 생리적 DNA 절단은 복제 스트레스(주로 전구 세포 분열에서), 반응성 산소 종(ROS)의 축적으로 인한 산화 및 대사 스트레스, 및 심지어 뉴런 활동(발달 과정 및 학습의 일부)에 의해 형성될 수 있다(Suberbielle 등, 2013; Madabhushi 등, 2014; Madabhushi 등, 2015). 이러한 파손의 수리 장애는 CNS 병리 및 신경변성 생성과 관련이 있다(Suberbielle 등, 2013; Madabhushi 등, 2014; Shanbhag 등, 2019). 본 연구 결과는 vRG에서 WWOX의 항상성 역할을 제안하며, 여기서 WWOX는 생리학적 조건에서 적절한 DDR 신호를 유지하고 손상된 분화와 관련된 DNA 손상의 축적을 방지한다. DDR 분석을 위해 vRG에 초점을 맞추기로 선택했지만 WWOX를 높게 발현하기 때문에, 본 데이터에 따르면 이러한 파손이 vRG에 특별히 축적되어 자손에서 지속될 수 있음을 시사하지 않는다.

[0234] 기능적 시냅스 및 복잡한 신경망 역학을 발달시키는 뇌 오가노이드의 능력이 집중적인 연구를 통해 빠르게 확립되고 있지만(Trujillo 등, 2019; Sidhaye & Knoblich, 2020), 간질 활동을 모델링하는 능력은 최근에야 연구되고 있다(사전인쇄: Samarasinghe 등, 2019; Sun 등, 2019). Sun 등(2019)은 UBE3A-KO hESC를 사용하여 엔젤만(Angelman) 증후군을 모델링하기 위해 뇌 오가노이드를 활용했으며, 2D 및 마우스 모델에서 관찰된 파인 활성화 뉴런 발화, 비정상적인 네트워크 동기화 및 기저 채널병증을 요약했다(Sun 등, 2019). 사마라싱헤 등(Samarasinghe 등(2019))은 오가노이드 융합 방법을 활용하고 레트 증후군 환자의 iPSC에서 억제성 인터뉴런이 풍부한 오가노이드를 생성했다. 질병-보유 오가노이드에서, 그들은 과흥분성에 대한 민감성, 미세회로 클러스터의 감소, 반복적인 간질 스파이크 및 변경된 주파수 진동을 관찰했으며, 이는 기능장애 억제 뉴런으로 거슬러 올라간다(사전 인쇄: Samarasinghe 등, 2019). 또한, 이 모델은 돌연변이된 오가노이드를 발프로산(VPA) 또는 TP53 억제제인 피피트린- α (PFT)로 처리하는 치료 옵션을 테스트하는 데 사용되었으며, 비히클 처리에 비해 뉴런 활동이 개선되었으며 VPA보다는 PFT를 사용한 결과가 더 우수했다. 선구적이긴 하지만, 이 연구는 질병-모델링 오가노이드에서 보이는 전기생리학적 변화에 초점을 맞췄다. 기계론적 연구(Blumcke 등, 2017)를 지지하기 위한 간질 환자의 총 신경조직학적 변화의 부족을 고려하여, 본 연구는 간질의 분자 연구를 위한 뇌 오가노이드의 활용을 강화하고자 했다. 이 목적은 대량 RNA-seq 분석에 의해 강조되었으며 결합이 있는 지역 정체성 획득, 피질층 파괴 및 Wnt 신호 활성화를 보여준다. 후자는 발작-유도된 뇌 결과의 조절자로서 Wnt 신호전달 경로의 의도된 역할에 비추어 특히 관심이 있으며, 따라서 치료 표적이 될 수 있다(Yang 등, 2016; Qu 등, 2017; Hodges & Lugo, 2018). 앞서 언급한 피질 이상적층(dyslamination)은 약물-내성 간질의 병인에서 잘 알려진 역할을 하는 피질 이형성증(dysplasia)을 연상시킨다(Tassi 등, 2002; Fauser 등, 2006; Kobow 등, 2019).

[0235] 본 연구 결과와 일치하게, WOREE 증후군을 앓고 있는 태아의 뇌 조직학을 조사한 최근 연구는 자발적인 WWOX 돌연변이가 있는 레트 모델에서도 검증된 표현형인, 피질의 분자층 내 외부 과립층의 비정상적인 이동을 보고했다(Iacomino 등, 2020). 이 관찰은 shRNA를 사용하여 WWOX를 침묵시킨 후 인간 뉴런 전구 세포(hNPC)에 대해 코스라 등(Kosla 등(2019))이 수행한 전사체의 분석에 의해 추가로 뒷받침된다. 이 연구는 WWOX를 녹다운하면 hNPC가 WT hNPC에 존재하는 신경 능선 분화 및 이동 및 세포-세포 접착과 관련된 유전자의 강화를 잃게 된다는 것을 발견했다. 저자는 또한 감소된 미토콘드리아 산화환원 전위, 성장 표면에 대한 세포 부착력 향상, MMP2 및 MMP9 발현 감소를 보고했다. 아야코미노 등(Iacomino 등(2020))은 뉴런 이동 및 분화와 관련된 유전자에 초점을 맞춰 이 전사체 데이터를 재분석했으며, 미세소관 단백질 및 키네신 계열 단백질과 같은 일부 신경 이동-관련 유전자의 발현 감소를 발견했다. 특히, 피질 층형성은 WWOX가 결합 파트너를 통해 연루된 경로인 Wnt 경로(Qian 등, 2020)의 상태에 의해 영향을 받는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, WWOX는 흐트러진(Disheveled) 단백질 Dvl1 및 Dvl2에 결합하는 것으로 밝혀졌으며, 후자는 WWOX에 의해 억제되어 Wnt 경로를 약화시킨다(Boutelle 등, 2009; Abu-Odeh 등, 2014a). 본 연구는 Wnt 활성화와 이전에 설명된 현상인 DNA 손상 사이의 가능한 크로스토크를 더욱 강조한다(Elyada 등, 2011). 이것은 이전에 설명한 WWOX의 다면발현성 기능(Abu-Remaih 등, 2015)과 매우 일치하며 RNA-seq에서 볼 수 있는 세포 주기 및 MDM2 수준의 감소된 음성 조절과도 일치한다. KO CO의 VZ에 있는 Ki67⁺ 세포에서 DNA 파손의 축적을 발견했으며, 이는 Wnt 활성화로 설명될 수 있으며 증식을 촉진하고 복제 스트레스 가능성이 있다.

[0236] 뇌 오가노이드의 질병 모델링 외에도, WWOX를 hESCs 계층에 다시 도입함으로써 나타나는 표현형을 구제하려고 시도했다. 이로 인해 CO 및 부분 구제에서 보이는 모든 세포 집단에서 WWOX의 초생리학적 발현이 발생했다. 이러한 결과는 표현형을 교정하고 가능하면 치료 개입을 위한 수단으로서 WWOX의 성공적인 재도입에 대한 개념 증명을 제공한다. 그러나 본 연구 결과는 WOREE 증후군 환자의 성공적인 유전 치료 접근법을 위해 집단-표적 전달 최적화 및 발현 수준 미세 조정의 중요성을 시사한다.

[0237] 마지막으로, WOREE 증후군(WSM)과 비교적 경미한 표현형인 SCAR12(WPM)를 앓고 있는 환자로부터 FO를 생성했다. 본 연구 결과는 두가지 뇌 오가노이드 배양 프로토콜(CO 및 FO)이 유사한 결과를 초래하여 WWOX 결핍의 표현형

을 확인하고 그것이 피질에서 유래한다는 것을 나타낸다. 흥미롭게도 SCAR12 계열을 모델링할 때, WOREE 오가노이드에서와 동일한 발달 이상을 관찰하지 못했다. SCAR12 FO는 전뇌 뉴런 집단 발달, 성상세포 발달 및 DDR 신호전달에서 매우 약한 차이를 보였다. 이는 증후군 간에 나타나는 차이를 모델링하는 시스템의 기능을 강화하고 희귀 SCAR12 증후군과 WWOX의 다면발현성 기능에 대한 면밀한 조사의 필요성을 지적한다(Abu-Remaih 등, 2015; Banne 등, 2021). 다른 가족의 건강한 이형접합 부모에서 WWOX 발현에 현저한 차이가 있지만, 영향을 받은 동형접합 환자에서 관찰된 수준에는 매우 작은 차이가 있다는 것은 주목할 만하다. 이러한 결과는 질병 중증도가 총 발현 수준이 아니라 WWOX의 기능적 수준과 상관관계가 있는지에 대한 의문을 제기한다.

[0238] 전반적으로, 본 데이터는 소아기 간질성 뇌병증을 모델링하는 뇌 오가노이드의 능력을 입증하는 동시에 WWOX의 생식계열 돌연변이 환자에게서 나타나는 병리학적 변화와 치료 개발을 위한 가능한 접근 방식을 설명한다.

[0239] 재료 및 방법

[0240] 세포 배양 및 플라스미드

[0241] WiBR3 hES 세포주 및 생성된 iPS 세포주는 FGF/KOSR 조건에서 조사된 DR4 마우스 배아 섬유아세포(MEF) 영양 층에서 5% CO₂ 조건으로 유지되었다: 15% 녹아웃 혈청 대체물(KOSR, Gibco; 10828-028), 1% 글루타맥스 (GlutaMAX)(Gibco; 35050-038), 1% MEM 비필수 아미노산(NEAA, Biological Industries; 01-340-1B), 1% 나트륨 피루베이트(Biological Industries; 03-042-1B), 1% 페니실린-스트렙토마이신(Biological Industries; 03-031-113) 및 8 ng/ml bFGF(PeproTech; 100-18B)로 보충된 DMEM/F12(Gibco; 21331-020 또는 Biological Industries; 01-170-1A). 배지를 매일 교체하고 배양액을 수동으로 또는 트립신 유형 C(Biological Industries, 03-053-1B)으로 트립신화하여 5-7일마다 계대했다. Rho-연관 키나아제 억제제(ROCKi, Y27632로도 알려짐)(Cayman; 10005583)를 10 μM 농도에서 계대 후 처음 24-48시간 동안 첨가했다.

[0242] hESC의 형질주입을 위해, 세포를 전기천공 24시간 전에 10 μM ROCKi에서 배양하였다. 트립신 C 용액을 사용하여 세포를 분리하고 총 100 μg DNA 작제물과 혼합된 PBS(Ca²⁺ 및 Mg²⁺ 포함)에 재현탁하고 진 펄서(Gene Pulser) Xcell 시스템(Bio-Rad; 250 V, 500 μF, 0.4 cm 큐벳)에서 전기천공했다. 이어서 ROCKi가 보충된 FGF/KOSR 배지에서 MEF 영양 층 상에 세포를 플레이팅하였다. WWOX-KO의 경우, 엑손 1을 표적으로 하는 sgRNA를 함유하는 px330 플라스미드를 pNTK-GFP와 1:5 비율로 공동 전기천공하고, 48시간 후에 GFP-양성 세포를 분류한 다음 집락 분리를 위한 MEF 영양 플레이트에서 약 10일 후 드물게 플레이팅했다(10 cm 플레이트당 2,000개 세포). WWOX 재도입을 위해, WWOX 코딩 서열을 보유하도록 클로닝된 pAAVS-2aNeo-UBp-IRES-GFP 플라스미드를 AAVS1 유전자좌를 표적으로 하는 px330과 함께 전기천공하고(Guernet 등, 2016), GFP에 대해 분류하고, 집락 분리를 위해 0.5 μg/ml 푸로마이신으로 선별하였다. 유전자 편집은 웨스턴 블롯을 통해 검증되었다. sgRNA 서열은 표 EV3에 기록되어 있다.

[0243] RNA 또는 단백질 분리를 위해, hPSC를 위에 표시된 대로 매트릭셀(Matrigel) 코팅 플레이트(Corning; 356231)에 계대하고 뉴트리스템(NutriStem) hPSC XF 배지(Biological Industries; 05-100-1A)에서 배양했다.

[0244] 대뇌 오르가노이드 생성, 배양 및 렌티바이러스 감염

[0245] 대뇌 오가노이드는 이전에 설명한 대로 hESC에서 생성되었으며(Lancaster 등, 2013; Lancaster & Knoblich, 2014; Bagley 등, 2017; Lancaster 등, 2018) 다음과 같은 변경 사항이 있다:

[0246] 인간 WiBR3 세포 및 WSM iPSC는 유사분열적으로 비활성화된 MEF에서 유지되었다. 프로토콜 시작 4-7일 전에, 세포를 MEF 또는 매트릭셀(Matrigel)(Corning; FAL356231)로 코팅된 60 mm 플레이트에 계대하고 70-80% 컨플루언스에 도달할 때까지 성장시켰다. 0일에, hESC 집락을 0.7 mg/ml 콜라게나제 D 용액(Sigma; 1108858001)을 사용하여 MEF에서 분리하고 트립신 유형 C로 2분간 신속하게 처리하여 단일 세포 현탁액으로 분리했다. 매트릭셀(Matrigel)에서 배양된 세포의 경우, 콜라게나제 D 치료를 건너뛰고, 세포를 트립신 유형 C로 즉시 해리시켰으며 이 시점부터 프로토콜의 다른 변경은 없었다. 경험적으로만 관찰되었지만 최종 결과에는 큰 차이가 없었다; 그러나 MEF-배양 hPSC는 신경 유도의 성공률이 더 나은 것으로 보였으므로 우선적으로 사용되었다.

[0247] 해리 후, 세포를 계수하고 DMEM/F12-보충된 20% KOSR, 3% USDA-인증 hESC-품질 FBS(Biological Industries), 1% 글루타맥스(GlutaMAX), 1% NEAA, 100 μM 2-메르캅토에탄올(Sigma; M3148), 4 ng/ml bFGF 및 10 μM Rocki 로 구성된 hESC 배지에 현탁시켰다. 배아체(EB) 형성을 위해, 9,000개의 세포를 초저부착 V-바닥 96-웰 플레이트(S-Bio Prime; MS-9096VZ)의 각 웰에 시딩했다. EB는 추가 5일 동안 격일로 공급되었으며, 첫 번째 변경 시 신선한 bFGF와 ROCKi가 첨가되었다. 6일째에 배지를 DMEM/F12, 1% N2 보충제(Gibco; 17502048), 1% 글루타맥스

(GlutaMAX), 1% MEM-NEAA 및 1 µg/ml 헤파린 용액(Sigma; H3149)으로 구성된 신경 유도(NI) 배지로 교체했다 (Bagley 등, 2017). NI 배지는 신경상피가 형성될 때까지(보통 11-12일) 격일로 교체되었으며, 품질 관리는 표시된 대로 수행되었으며(Lacaster & Knoblich, 2014; Bagley 등, 2017), 잘 발달된 EB가 매트리지겔(Matrigel) 액적에 임베딩되었다(Lacaster & Knoblich, 2014; Bagley 등, 2017). 액적을 DMEM/F12 및 신경-기저 배지(Neuro-basal Medium)(Gibco; 21103049 또는 Biological Industries; 06-1055110-1A), 0.5% N2 보충제, 비타민 A가 없는 1% B27 보충제(Gibco; 12587010), 1% 글루타맥스(GlutaMAX), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 0.5% NEAA, 50 µM 2-메르캅토에탄올, 2.5 µg/ml 인간 재조합 인슐린(Biological Industries; 41-975-100) 및 3 µM CHIR-99021(Axon Medchem; 1386)의 1:1 혼합물로 구성된 대뇌 분화 배지(CDM, Cerebral Differentiation Medium)를 갖는 90-mm 멸균, 미처리 배양 접시(Miniplast; 825-090-15-017)로 옮겼다. 배지는 격일로 교체되었다. 16일부터, B27 보충제는 비타민 A가 함유된 B27 보충제(Gibco, 17504044)로 변경되고, CHIR-99021이 없고, 400 µM 비타민 C(Sigma, A4403) 및 12.5 mM HEPES 완충액(Biological Industries, 03-025-1B)을 함유하는, CDM과 유사하게 구성된 대뇌 성숙 배지(CMM, Cerebral Maturation Medium)(Lacaster 등, 2018)에서 37°C 및 5% CO₂의 오비탈 셰이커에서 오가노이드를 배양했다. 배지는 2-4일마다 교체되었다. 6주부터, 1% 매트리지겔(Matrigel)을 배지에 첨가했다. 오염 가능성을 줄이기 위해, 30일마다 오가노이드를 신선한 멸균 플레이트로 옮겼다. 설명된 모든 배지는 0.22-µm 필터를 통해 여과되었으며 사용 전까지 4°C에서 보관되었다. 달리 명시되지 않는 한 모든 분석에서 동일한 배치의 오가노이드를 사용했다.

[0248] WWOX의 렌티바이러스 형질도입은 이전에 발표된 대로 수행되었다(Deverman 등, 2016; Khawaled 등, 2019). 간단히 말해, WWOX를 운반하는 바이러스는 pDEST12.2TM 대상 벡터(Gateway Cloning Technology)에서 생성되었다. 초원심분리 후, 역가는 293T 세포를 감염시켜 경험적으로 결정하였다. 배양 35일째에 개별 CO를 1:100의 바이러스-함유 배지 및 5 µg/ml 폴리브렌(Merck; TR-1003-6)을 갖는 CMM을 함유하는 에펜도르프(Eppendorf) 튜브로 옮기고 밤새 인큐베이션했다. 다음날, 오가노이드를 신선한 배지로 진탕 배양에 다시 넣었다.

[0249] 체세포의 재프로그래밍

[0250] WOREE 및 SCAR12 증후군에 걸린 가족의 혈액 샘플은 카플란 메디컬센터 헬싱키 위원회(Kaplan Medical Center Helsinki Committee)의 승인 하에 연구 목적으로만 기증되었으며, 모든 대상체로부터 정보에 입각한 동의를 얻었으며 모든 실험은 헬싱키 및 보건 복지부 벨몬트 보고서의 WMA 선언에 명시된 원칙을 준수했다.

[0251] PBMC에서 직접 iPSC를 유도하는 것은 제조업체의 지침에 따라 야마나카 인자(Yamanaka factor) 및 센다이(Sendai) 바이러스 CytoTune-iPS 2.0 키트로 감염시켜 수행했다. 간단히 말해서, PBMC의 혈액 샘플을 피콜(Ficoll) 구배로 분리하고 스템프로(StemPro)-34 영양보충제(Gibco; 10639-011), 100 ng/ml 인간 SCF(PeproTech; 300-07), 100 ng/ml 인간 FLT-3 리간드(R&D Systems; 308-FKE), 20 ng/ml 인간 IL-3(PeproTech; 200-03) 및 10 ng/ml 인간 IL-6(PeproTech; 200-06)이 보충된 StemPro-34TM 배지(Gibco; 10639-011)로 배양하였다. 24시간 후, 배지의 절반을 교체하였다. 프로토콜의 0일째인 추가 24시간 후, 세포를 6-웰 플레이트로 옮기고, 재프로그래밍 바이러스 혼합물을 첨가하고, 플레이트를 실온에서 30분 동안 1,000xg에서 원심분리하였다. 세포를 재현탁하고 인큐베이터에 밤새 다시 넣었다. 다음날, 남아있는 바이러스를 제거하기 위해, 세포를 원심분리 세척하고 완전히 보충된 스템프로(StemPro)-34 배지에 재현탁하고, 2일째 여분의 배지를 첨가하였다. 3일째, 세포를 10 cm MEF-코팅된 플레이트로 옮기고, 배지의 절반을 사이토카인이 없는 완전한 스템프로(StemPro)-34로 교체하고 절반의 배지를 격일로 교체했다. 7일까지, 재프로그래밍의 다른 단계에 있는 세포가 보였고, 재프로그래밍-관련 아포토시스를 방지하기 위해 배지를 10 µM ROCKi가 보충된 mTeSR로 점진적으로 변경했다. 16일째에, 정상적인 형태 및 성장 속도를 갖는 집락을 선택하고, 확장하고, 다능성 마커의 발현에 대해 검증하고, WWOX 돌연변이에 대해 시퀀싱하였다.

[0252] 전뇌 오가노이드 생성 및 배양

[0253] 전뇌 오가노이드는 이전에 설명한 대로 iPSC에서 생성되었으며(Qian 등, 2016, 2018), 변경 사항은 아래와 같다:

[0254] iPSC 세포는 유사분열적으로 비활성화된 MEF에서 유지되었다. 프로토콜 시작 4-7일 전에 세포를 MEF-코팅된 60 mm 플레이트에 계대하고 최대 70-80% 컨플루언스까지 배양했다. 0일에, iPSC 집락을 분리, 해리 및 CO와 동일하게 계수하고 DMEM/F12, 20% KOSR, 1% 글루타맥스(GlutaMax), 1% MEM-NEAA, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 100 µM 2-메르캅토에탄올을 함유하는 hPSC 배지에 재현탁시켰다. 웰당 9,000개의 세포를 V-바닥 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 1일째, 배지를 2 µM A83(Axon Medchem; 1421) 및 100 nM LDN-193189(Axon Medchem; 1527)가 새로

보충된 hPSC 배지인 신경외배엽 배지(Neuroectoderm Medium, NEM)로 변경하고 격일로 교체했다. 5일과 6일에, 배지의 절반을 흡인하고 DMEM/F12, 1% N2 보충제, 1% 글루타맥스(GlutaMax), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1% NEAA, 10 µg/ml 헤파린, 1 µM CHIR-99021(Axon Medchem, 1386) 및 1 µM SB-431542(Sigma, S4317)로 구성된 신경 유도 배지(NIM)로 교체했다. 7일째에 표시된 대로 품질 관리 및 매트릭셀(Matrigel) 임베딩을 수행하고 (Qian 등, 2018), 격일로 배지를 교체하면서 NIM에서 EB를 계속 배양했다. 14일에, 매트릭셀(Matrigel) 제거가 수행되었고(Qian 등, 2018), 배지는 DMEM/F12, 1% N2 보충제, 비타민 A를 갖는 1% B27, 1% NEAA, 1% 글루타맥스(GlutaMax), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 50 µM 2-메르캅토에탄올 및 2.5 µg/ml 인슐린으로 구성된 전뇌 분화 배지(Forebrain Differentiation Medium, FDM)으로 변경하고, 37°C 및 5% CO₂에서 오비탈 셰이커로 옮겼다. 배지는 2-3일마다 교체했다. 71일째에, 배지를 신경기저 배지, 비타민 A가 포함된 1% B27 보충제, 1% 글루타맥스(GlutaMax), 1% 페니실린/스트렙토마이신, 50 µM 2-메르캅토에탄올, 200 µM 비타민 C, 20 ng/ml 인간 재조합 BDNF(Pepro-Tech; 450-02), 20 ng/ml 인간 재조합 GDNF(PeproTech; 450-10), 1 µM 디부틸릴-cAMP(Sigma; D0627) 및 1 ng/mL TGF-β1(PeproTech; 100-21C)를 함유하는 전뇌 성숙 배지(FMM)로 변경했다. 배지는 2-3일마다 교체했다.

[0255] 면역형광

[0256] 오가노이드 고정 및 면역염색은 이전에 설명한 대로 수행되었다(Mansour 등, 2018). 간략하게, 오가노이드를 PBS에서 3회 세척한 다음, 4% 얼음처럼 차가운 파라포름알데히드에서 45분 동안 고정을 위해 옮겼고, 차가운 PBS에서 3회 세척하고, 30% 수크로스 용액에서 밤새 평형화하여 동결 보호했다. 다음날, 오가노이드를 OCT에 임베딩하고 드라이아이스에서 급속 냉동하고 라이카(Leica) CM1950 저온 유지 장치로 10 µm로 절단했다.

[0257] 면역형광 염색을 위해, 섹션을 실온으로 가온하고 재수화를 위해 PBS로 세척하고 PBS 중 0.1 % 트리톤 X-100(PBT)으로 투과시킨 다음 5% 정상 염소 혈청(NGS) 및 PBT 중 0.5% BSA를 함유하는 차단 완충액에서 1 시간 동안 차단했다. 그런 다음 섹션을 차단 용액에 희석된 1차 항체와 함께 밤새 4°C에서 인큐베이션했다. 다음날, 섹션을 0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS(PBST)에서 진탕하면서 3회 세척하고 2차 항체 및 차단 완충액에 희석된 퀵스트(Hoechst) 33258 용액과 함께 실온에서 1.5시간 동안 인큐베이션하였다. 절편을 진탕하면서 PBST에서 4회 세척하고 커버슬립을 면역형광 봉입제(Immunofluorescence Mounting Medium)(Dako; s3023)을 사용하여 봉입했다. 섹션은 올림푸스 FLUOVIEW FV1000 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 이미지화되었으며 관련 올림푸스 FLUOVIEW 소프트웨어를 사용하여 처리되었다. γH2AX-양성 핵은 NIH ImageJ를 사용하여 수동으로 계산하고 나중에 설명하는 대로 통계적으로 분석했다.

[0258] 전기생리학적 기록

[0259] 오가노이드를 3% 저온 겔화 아가로스(약 36°C)에 임베딩하고 얼음 위에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 4°C에서 수크로스 용액(mM: 87 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.5 KCl, 25 글루코스, 0.5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 1.25 NaHPO₄ 및 75 수크로스)에서 라이카 1200S 진동마이크로톰(Vibratome)을 사용하여 400 µm로 절편화했다. 절편을 인공 뇌척수액(ACSF, mM: 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.5 KCl, 10 글루코스, 2.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, pH 7.38, 및 300 mOsm)에서 30분 동안 37°C에서 인큐베이션한 후 RT에서 1시간 동안 인큐베이션했다. 기록하는 동안, 절편은 기준선 조건에서 관류된 카보겐(95% O₂, 5% CO₂)과 함께 37°C에서 동일한 ACSF에서 인큐베이션되었다. 로컬 필드 전위(LFP) 및 전체-셀 패치-클램프 기록은 보로실리케이트 모세관 유리에서 가져온 전극을 사용하여 수행되었으며 각 절편의 외부 테두리에서 150 µm 깊이에 위치했다. LFP 전극은 ACSF로 채우고 패치 전극은 내부 용액으로 채웠다. 데이터는 25,000 Hz의 샘플링 속도에서 멀티클램프(MultiClamp) 소프트웨어를 사용하여 기록되었다. MATLAB 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석했다. 노이즈를 제거하기 위해 (i) 60 노치 필터(고조파 5개 포함) 및 (ii) 기록 설정에서 변동을 제거하기 위해 0.1 Hz 고역 통과 IIR 필터를 사용하여 트레이스를 필터링했다. 그런 다음 추세가 제거된 기능(해밍 창 사용)을 사용하여 신호의 큰 변동을 제거하고 정규화된 스펙트럼 전력을 빠른 푸리에 변환을 사용하여 계산했다. 전력 스펙트럼 밀도 플롯의 곡선 아래 면적은 특정 주파수 범위에 대해 비닝된 주파수의 합을 취하여 계산되었다.

[0260] 셀-부착 기록

[0261] 블라인드 패치-클램프 기록으로 셀-부착 기록을 얻었다. 오가노이드의 뉴런 집단에서 자발적인 뉴런 활동을 기록했다. 수직 2단계 폴러(PC-12, Narishige)의 필라멘트형, 얇은 벽, 보로실리케이트 유리(외경, 1.5 mm, 내경, 0.86 mm, Hilgenberg GmbH)에서 전극(약 7 MOhm)을 뽑았다. 전극은 다음을 함유하는 내부 용액으로 채워지고 (mM): 140 K-글루코네이트, 10 KCl, 10 HEPES, 10 Na₂-포스포크레아틴 및 0.5 EGTA, KOH로 pH 7.25로 조정되었

다.

- [0262] 전극은 오가노이드 표면에 45°로 삽입되었다. 기록하는 동안, 오가노이드는 35°C에서 매트릭셀(Matrigel) 없이 CMM에 보관되었다. 피펫 저항이 10-200 MOhm으로 증가하면 대부분의 경우 스파이크가 나타났다. 단일 스파이크의 감지가 기록을 시작하는 기준이었다. 모든 기록은 전류-클램프 모드(MultiClamp 700B, Molecular Devices)에서 세포내 증폭기로 획득하고 10 kHz의 샘플링 속도(CED Micro 1401-3, Cambridge Electronic Design Limited)에서 획득하고 필드 전위를 제거하고 뉴런 스파이크를 유지하기 위해 고역 통과 필터로 필터링했다.
- [0263] 셀-부착 기록의 데이터 분석은 MATLAB(The MathWorks)에서 사용자 정의 작성된 코드로 수행되었다. 셀-부착 모드에서 기록된 스파이크는 임계값을 적용하여 원시 전압 트레이스에서 추출되었다(스�파이크의 임계값은 배경 노이즈 레벨의 피크보다 훨씬 위에 위치했다). 평균 발화율을 계산하기 위해, 기록된 각 세포에 대해 4분 기록 기간 동안의 발화율을 계산하였다.
- [0264] 면역블롯 분석 및 세포내(subcellular) 분별
- [0265] 전체 단백질의 경우, 프로테아제 및 포스파타제 억제제가 보충된 50 mM 트리스(pH 7.5), 150 mM NaCl, 10% 글리세롤 및 0.5% 노니데트(Nonidet) P-40(NP-40)을 함유하는 용해 완충액에서 오가노이드를 균질화했다. 세포질 분획의 분리를 위해, 오가노이드를 1 mmol/l DTT 및 프로테아제 및 포스파타제 억제제가 보충된 저장성 용해 완충액[10 mmol/l HEPES(pH 7.9), 10 mmol/l KCl, 0.1 mmol/l EDTA]에서 분쇄하였다. 세포를 얼음 위에서 15분 동안 팽윤시킨 후, 0.5% NP-40을 첨가하고, 세포를 와류에 의해 용해시켰다. 원심분리 후, 세포질 분획을 수집하였다. 그 후, 남은 펠릿을 1 mmol/l DTT가 보충된 고정성 핵 추출 완충액[20 mmol/l HEPES(pH 7.9), 0.42 mol/l KCl, 1 mmol/l EDTA]에서 4°C에서 진탕하면서 15분 동안 인큐베이션하여 핵 분획을 얻었다. 샘플을 원심분리하고 액상을 수집했다.
- [0266] 웨스턴 블로팅은 각 샘플에 40-50 µg의 단백질을 사용하여 표준 조건에서 수행되었다. 블롯은 바이오-래드(Bio-Rad)의 이미지 랩(Image Lab) 소프트웨어에서 실험당 2-3회 반복 및 정량화되었다.
- [0267] RNA 추출, 역전사-PCR 및 qPCR
- [0268] 총 RNA는 페놀/클로로포름-기반 방법에 대해 제조업체에서 설명한 대로 바이오-트리(Bio-Tri) 시약(Biolab; 9010233100)을 사용하여 분리했다. qScript cDNA 합성 키트(QuantaBio; 95047)를 사용하여 cDNA를 합성하기 위해 0.5-1 µg의 RNA를 사용했다. qRT-PCR은 파워 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(Applied Biosystems, AB4367659)를 사용하여 수행되었다. 모든 측정은 삼중으로 수행되었으며 HPRT 또는 UBC 수준으로 표준화되었다.
- [0269] 라이브러리 준비 및 RNA 시퀀싱
- [0270] 라이브러리 준비 및 RNA 시퀀싱은 표준 절차에 따라 히브리 대학의 핵심 연구 시설에 있는 게놈 응용 연구소에서 수행했다. 간단히 말해서, RNA 스크린테이프 키트(ScreenTape Kit)(Agilent Technologies; 5067-5576), D1000 스크린테이프 키트(Agilent Technologies; 5067-5582), Qubit(r) RNA HS 검정 키트(Invitrogen; Q32852) 및 Qubit(r) DNA 검정 키트(Invitrogen; 32854)을 사용하여 품질을 평가했다.
- [0271] mRNA 라이브러리 준비를 위해, 샘플당 1 µg의 RNA를 mRNA 캡처 비드가 포함된 KAPA 가닥 mRNA-Seq 키트(Kapa Biosystems, KK8421)를 사용하여 처리했다. 라이브러리는 20 µl의 용출 완충액에서 용출하고 10 mM로 조정 한 후, 각 샘플에서 10 µl(50%)를 수집하여 하나의 튜브에 풀링했다. 멀티플렉스 샘플 풀(PhiX 1.5%를 포함하는 1.5 pM)을 NextSeq 500/550 고출력 v2 키트(75주기) 카트리지(Illumina, FC-404-1005)에 로드하고 NextSeq 500 시스템 기계(Illumina)에 75주기 및 단일-읽기 시퀀싱 조건으로 로드했다.
- [0272] 라이브러리 품질 관리를 위해, Fastq 파일을 *FastQC*(버전 0.11.8)로 테스트하고 잔여 어댑터, 저품질 베이스(Q = 20) 및 읽기 길이(20 베이스)에 대해 트리밍했다. 트리밍은 *trim galore*(ver.0.6.1)로 수행되었다. 관독 횟수는 샘플당 약 30-50 M로 높았고 필터링 후 무시할 정도로 감소했다. 전사체 매핑은 매핑-기반 모드에서 *salmon*(ver.1.2.1)로 수행되었으며, 매핑 모드 확인 및 gc-바이어스 보정을 모두 켜다. 정렬 전에, 25의 kmer 크기를 사용하여 HS GRCh38 CDNA 릴리스 99(Nov 2019)를 기반으로 살몬(salmon) 색인이 생성되었다. 살몬 매핑은 원시 전사체 수와 TPM 수를 모두 보고한다. 생성된 매핑 비율은 80%에서 90% 사이로 높다. 총 8개의 CO 샘플이 시퀀싱되었다(4개의 WT CO 및 4개의 KO CO). 하나의 WT 샘플이 예비 품질 관리에 실패했다(낮은 관독 횟수 및 낮은 전사체 매핑 속도). 다른 샘플(WWOX-KO도 WT도 아님)과 균집하지 않은 또 다른 WT 샘플은 PCA 및 덴드로그램 분석 모두에서 분명했다. 이 두 샘플은 추가 분석에서 추출되었으며 추가 분석에 사용되는 총 6개의 샘플을 제공한다. 차별적으로 발현된 유전자 결정(KO 대 WT)을 위해, 원시 전사체 수는 6개 샘플 모두에서 최소

전체 수 10에 대해 필터링되었으며 *DESeq2*(ver.1.28.1)로 분석하기 위해 R 패키지 *tximport*(ver.1.16.1)로 가져왔다. 계수는 *DESeq2*에 의해 정규화되었고, 차별적으로 발현된 유전자는 알파를 0.01로 설정하여 필터링되었다. *apeglm*(ver.1.10.0)을 기반으로 평균-기반 배수 변화 및 축소-기반 배수 변화를 계산했다.

[0273] 도 16a 및 c에 도시된 히트맵의 준비를 위해, 차등적으로 발현된 유전자의 목록을 상향조절(WWOX-KO 발현이 WT 발현보다 높았다) 및 하향 조절된 하위목록으로 분리하였다. 각 하위목록은 배수 변화 값으로 정렬되었으며 각 하위목록에서 상위 100개의 유전자가 선택되었다. 선택된 각 유전자에 대해 log2-정규화 계수를 스케일링하고 R 패키지 *gplots*(ver.3.0.3)의 히트맵.2를 사용하여 히트맵으로 제시했다.

[0274] 도 14f에 나타난 히트맵의 경우, 6개의 피질층 유전자 마커 각각에 대한 log2-표준화 계수를 스케일링하고 R 패키지 *gplots*로부터의 히트맵.2를 사용하여 히트맵 형태로 제시하였다. 유전자 세트 강화 분석은 브로드 인스티튜트(Broad Institute) *GSEA* 소프트웨어(ver.4.0.3)로 수행되었다. 입력에는 배수 변화의 log2로 순위가 매겨진 15,348개의 유전자가 포함되었다. GO 세트는 브로드 인스티튜트(Broad Institute) 세트 c5.all.v7.0이다. 허용되는 세트는 유전자가 적어도 15개 및 500개 이하인 세트이다. 유전자 세트는 GO 생물학적 과정이다. 이 분석에서 허용되는 세트는 유전자가 적어도 10개 및 500개 이하인 세트이다. 처음 두 구성 요소의 PCA 플롯을 계산하고 기본 R 함수로 플롯했다. 계산은 슈도 계수 1을 첨가하는 log2-변환 및 log2-정규화 계수를 기반으로 한다.

[0275] 통계

[0276] 실험 결과는 평균 ± SEM 또는 1사분위수와 3사분위수, 최소값과 최대값, 중앙값을 나타내는 상자플롯으로 표현되었다. 첫째, 윌크 샤피로(Wilk-Shapiro) 테스트를 사용하여 정규성을 결정했다: 정규 분포 샘플의 경우, 웰치(Welch) 보정을 사용한 양측 언페어드 스튜던트 t-테스트를 사용하여 테스트 샘플과 대조 샘플의 값을 비교했다. 비정규 분포 샘플의 경우, 비모수 맨-휘트니(Mann-Whitney) 테스트가 사용되었다. 두 개 이상의 샘플 간의 비교를 위해, 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트로 다중 비교를 수정하여 일원 ANOVA를 사용했다. 정상적으로 분포되지 않은 샘플의 경우 던(Dunn)의 다중 비교 테스트와 함께 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis) 테스트를 사용했다. 동역학 실험의 경우, 동일한 SD를 가정하지 않고 홀름시닥(Holm-Sidak) 방법을 사용하여 여러 t-테스트에 대해 분석을 수정했다. 통계적으로 유의한 결과에 대한 P-값 컷오프는 다음과 같다: n.s(유의하지 않음), * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ 및 **** $P \leq 0.0001$. 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 8을 사용하여 통계 분석 및 시각적 데이터 표시를 수행했다. 이 연구에서는 무작위화 또는 맹검을 적용하지 않았다. 실험은 각 유전자형에 대해 적어도 2개의 hPSC 계통을 사용하여 여러 생물학적 복제물에서 수행되었다(WiBR3 WT 계통 제외). 달리 명시되지 않는 한, 실험은 오가노이드의 여러 배치에서 수행되었다.

[0277] 참조문헌

Aaberg KM, Gunnes N, Bakken IJ, Lund Søråas C, Berntsen A, Magnus P, Lossius MI, Stoltenberg C, Chin R, Surén P (2017) Incidence and prevalence of childhood epilepsy: a nationwide cohort study. *Pediatrics* 139: 1-9

[0278] .

Abdeen SK, Ben-David U, Shweiki A, Maly B, Aqeilan RI (2018) Somatic loss of WWOX is associated with TP53 perturbation in basal-like breast cancer. *Cell Death Dis* 9 <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0896-z>

Abdel-Salam G, Thoenes M, Afifi HH, Körber F, Swan D, Bolz H (2014) The supposed tumor suppressor gene WWOX is mutated in an early lethal microcephaly syndrome with epilepsy, growth retardation and retinal degeneration. *Orphanet J Rare Dis* 9: 12–18

Abu-Odeh M, Bar-Mag T, Huang H, Kim T, Salah Z, Abdeen SK, Sudol M, Reichmann D, Sidhu S, Kim PM *et al* (2014a) Characterizing WW domain interactions of tumor suppressor WWOX reveals its association with multiprotein networks. *J Biol Chem* 289: 8865–8880

Abu-odeh M, Hereema NA, Aqeilan RI (2016) WWOX modulates the ATR-mediated DNA damage checkpoint response. *Oncotarget* 7: 4344–4355

Abu-Odeh M, Salah Z, Herbel C, Hofmann TG, Aqeilan RI (2014b) WWOX, the common fragile site FRA16D gene product, regulates ATM activation and the DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E4716–E4725

Abu-Remaileh M, Aqeilan RI (2014) Tumor suppressor WWOX regulates glucose metabolism via HIF1 α modulation. *Cell Death Differ* 21: 1805–1814

Abu-Remaileh M, Aqeilan RI (2015) The tumor suppressor WW domain-containing oxidoreductase modulates cell metabolism. *Exp Biol Med* 240: 345–350

Abu-Remaileh M, Joy-Dodson E, Schueler-Furman O, Aqeilan RI (2015) Pleiotropic functions of tumor suppressor WWOX in normal and cancer cells. *J Biol Chem* 290: 30728–30735

Abu-Remaileh M, Khalailah A, Pikarsky E, Aqeilan RI (2018) WWOX controls hepatic HIF1 α to suppress hepatocyte proliferation and neoplasia article. *Cell Death Dis* 9 <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0510-4>

Ahnaou A, Huysmans H, Van De Casteele T, Drinkenburg WHIM (2017) Cortical high gamma network oscillations and connectivity: a translational index for antipsychotics to normalize aberrant neurophysiological activity. *Transl Psychiatry* 7: 1285

Amin ND, Paşca SP (2018) Building models of brain disorders with three-dimensional organoids. *Neuron* 100: 389–405

[0279]

- Aqeilan RI, Abu-Remaileh M, Abu-Odeh M (2014) The common fragile site FRA16D gene product WWOX: roles in tumor suppression and genomic stability. *Cell Mol Life Sci* 71: 4589–4599
- Aqeilan RI, Hassan MQ, de Bruin A, Hagan JP, Volinia S, Palumbo T, Hussain S, Lee S-H, Gaur T, Stein GS *et al* (2008) The WWOX tumor suppressor is essential for postnatal survival and normal bone metabolism. *J Biol Chem* 283: 21629–21639
- Aqeilan RI, Trapasso F, Hussain S, Costinean S, Marshall D, Pekarsky Y, Hagan JP, Zanesi N, Kaou M, Stein GS *et al* (2007) Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 3949–3954
- Bagley JA, Reumann D, Bian S, Lévi-Strauss J, Knoblich JA (2017) Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nat Methods* 14: 743–751
- Banne E, Abudiab B, Abu-Swai S, Repudi SR, Steinberg DJ, Shatleh D, Alshammery S, Lisowski L, Gold W, Carlen PL *et al* (2021) Neurological disorders associated with WWOX germline mutations—a comprehensive overview. *Cells* 10: 824
- Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87: 1215–1284
- Ben-Salem S, Al-Shamsi AM, John A, Ali BR, Al-Gazali L (2015) A novel whole exon deletion in WWOX gene causes early epilepsy, intellectual disability and optic atrophy. *J Mol Neurosci* 56: 17–23
- Blair JD, Hockemeyer D, Bateup HS (2018) Genetically engineered human cortical spheroid models of tuberous sclerosis. *Nat Med* 24: 1568–1578
- Blumcke I, Spreafico R, Haaker G, Coras R, Kobow K, Bien CG, Pfäfflin M, Elger C, Widman G, Schramm J *et al* (2017) Histopathological findings in brain tissue obtained during epilepsy surgery. *N Engl J Med* 377: 1648–1656
- Bouteille N, Driouch K, El HP, Sin S, Formstecher E, Camonis J, Lidereau R, Lallemand F (2009) Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein. *Oncogene* 28: 2569–2580
- Bragin A, Engel J (2008) Slow waves associated with seizure activity. In *Computational neuroscience in epilepsy*, Soltesz I, Staley K (eds), pp 440–453. San Diego: Elsevier

[0280]

- Chen S, Chuang J, Wang J, Tsai M, Li H, Chang N (2004) Expression of WW domain-containing oxidoreductase WOX1 in the developing murine nervous system. *Neuroscience* 124: 831–839
- Cheng Y-Y, Chou Y-T, Lai F-J, Jan M-S, Chang T-H, Jou I-M, Chen P-S, Lo J-Y, Huang S-S, Chang N-S *et al* (2020) Wwox deficiency leads to neurodevelopmental and degenerative neuropathies and glycogen synthase kinase 3 β -mediated epileptic seizure activity in mice. *Acta Neuropathol Commun* 8: 6
- Cohen-Gadol AA, Pan JW, Kim JH, Spencer DD, Hetherington HH (2004) Mesial temporal lobe epilepsy: a proton magnetic resonance spectroscopy study and a histopathological analysis. *J Neurosurg* 101: 613–620
- Deverman BE, Pravdo PL, Simpson BP, Kumar SR, Chan KY, Banerjee A, Wu W-L, Yang B, Huber N, Pasca SP *et al* (2016) Cre-dependent selection yields AAV variants for widespread gene transfer to the adult brain. *Nat Biotechnol* 34: 204–209
- Elyada E, Pribluda A, Goldstein RE, Morgenstern Y, Brachya G, Cojocaru G, Snir-Alkalay I, Burstain I, Haffner-Krausz R, Jung S *et al* (2011) CK1 α ablation highlights a critical role for p53 in invasiveness control. *Nature* 470: 409–413
- Fauser S, Huppertz HJ, Bast T, Strobl K, Pantazis G, Altenmueller DM, Feil B, Rona S, Kurth C, Rating D *et al* (2006) Clinical characteristics in focal cortical dysplasia: a retrospective evaluation in a series of 120 patients. *Brain* 129: 1907–1916
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French JA, Glynn M *et al* (2014) ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55: 475–482
- Gribaa M, Salih M, Anheim M, Lagier-Tourenne C, H'mida D, Drouot N, Mohamed A, Elmalik S, Kabiraj M, Al-Rayess M *et al* (2007) A new form of childhood onset, autosomal recessive spinocerebellar ataxia and epilepsy is localized at 16q21-q23. *Brain* 130: 1921–1928
- Guernet A, Mungamuri S, Cartier D, Sachidanandam R, Jayaprakash A, Adriouch S, Vezaïn M, Charbonnier F, Rohkin G, Coutant S *et al* (2016) CRISPR-barcoding for intratumor genetic heterogeneity modeling and functional analysis of oncogenic driver mutations. *Mol Cell* 63: 526–538

[0281]

- Guirgis M, Chinvarun Y, Carlen PL, Bardakjian BL (2013) The role of delta-modulated high frequency oscillations in seizure state classification. In *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS* pp 6595–6598
- Hazan I, Hofmann TG, Aqeilan RI (2016) Tumor suppressor genes within common fragile sites are active players in the DNA damage response. *PLoS Genet* 12: 1–19
- Hodges SL, Lugo JN (2018) Wnt/ β -catenin signaling as a potential target for novel epilepsy therapies. *Epilepsy Res* 146: 9–16
- Howell KB, Freeman JL, Mackay MT, Fahey MC, Archer J, Berkovic SF, Chan E, Dabscheck G, Eggers S, Hayman M *et al* (2021) The severe epilepsy syndromes of infancy: a population-based study. *Epilepsia* 62: 358–370
- Hussain T, Kil H, Hattiangady B, Lee J, Kodali M, Shuai B, Attaluri S, Takata Y, Shen J, Abba MC *et al* (2019) Wwox deletion leads to reduced GABA-ergic inhibitory interneuron numbers and activation of microglia and astrocytes in mouse hippocampus. *Neurobiol Dis* 121: 163–176
- Iacomino M, Baldassari S, Tochigi Y, Kořla K, Buffelli F, Torella A, Severino M, Paladini D, Mandarà L, Riva A *et al* (2020) Loss of Wwox perturbs neuronal migration and impairs early cortical development. *Front Neurosci* 14 <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00644>
- Khalilov I, Le Van QM, Gozlan H, Ben-Ari Y (2005) Epileptogenic actions of GABA and fast oscillations in the developing hippocampus. *Neuron* 48: 787–796
- Khawaled S, Nigita G, Distefano R, Oster S, Suh S-S, Smith Y, Khalaileh A, Peng Y, Croce CM, Geiger T *et al* (2020) Pleiotropic tumor suppressor functions of WWOX antagonize metastasis. *Signal Transduct Target Ther* 5: 1–10
- Khawaled S, Suh SS, Abdeen SK, Monin J, Distefano R, Nigita G, Croce CM, Aqeilan RI (2019) WWOX inhibits metastasis of triple-negative breast cancer cells via modulation of miRNAs. *Cancer Res* 79: 1784–1798
- Kheiri F, Bragin A, Engel J (2013) Functional connectivity between brain areas estimated by analysis of gamma waves. *J Neurosci Methods* 214: 184–191

[0282]

- Kobow K, Ziemann M, Kaipananickal H, Khurana I, Mühlebner A, Feucht M, Hainfellner JA, Czech T, Aronica E, Pieper T *et al* (2019) Genomic DNA methylation distinguishes subtypes of human focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 60: 1091–1103
- Kośła K, Pluciennik E, Styczeń-Binkowska E, Nowakowska M, Orzechowska M, Bednarek AK (2019) The WWOX gene influences cellular pathways in the neuronal differentiation of human neural progenitor cells. *Front Cell Neurosci* 13: 391
- Lado FA, Rubboli G, Capovilla P, Avanzini G, Moshé SL (2013) Pathophysiology of epileptic encephalopathies. *Epilepsia* 54: 6–13
- Lancaster MA, Corsini NS, Wolfinger S, Gustafson EH, Phillips AW, Burkard TR, Otani T, Livesey FJ, Knoblich JA (2018) Guided self-organization and cortical plate formation in human brain organoids. *Nat Biotechnol* 35: 659–666
- Lancaster MA, Knoblich JA (2014) Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 9: 2329–2340
- Lancaster MA, Renner M, Martin C, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501: 373–379
- Madabhushi R, Gao F, Pfenning A, Pan L, Yamakawa S, Seo J, Rueda R, Phan TX, Yamakawa H, Pao P-C *et al* (2015) Activity-induced DNA breaks govern the expression of neuronal early-response genes. *Cell* 161: 1592–1605
- Madabhushi R, Pan L, Tsai L-H (2014) DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron* 83: 266–282
- Mallaret M, Synofzik M, Lee J, Sagum CA, Mahajnah M, Sharkia R, Drouot N, Renaud M, Klein FAC, Anheim M *et al* (2014) The tumour suppressor gene WWOX is mutated in autosomal recessive cerebellar ataxia with epilepsy and mental retardation. *Brain* 137: 411–419
- Mansour AA, Gonçalves JT, Bloyd CW, Li H, Fernandes S, Quang D, Johnston S, Parylak SL, Jin X, Gage FH (2018) An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nat Biotechnol* 36: 432–441
- McTague A, Howell KB, Cross JH, Kurian MA, Scheffer IE (2016) The genetic landscape of the epileptic encephalopathies of infancy and childhood. *Lancet Neurol* 15: 304–316

[0283]

- Medvedev AV, Murro AM, Meador KJ (2011) Abnormal interictal gamma activity may manifest a seizure onset zone in temporal lobe epilepsy. *Int J Neural Syst* 21: 103–114
- Middeldorp J, Boer K, Sluijs JA, De FL, Encha-razavi F, Vescovi AL, Swaab DF, Aronica E, Hol EM (2010) GFAPdelta in radial glia and subventricular zone progenitors in the developing human cortex. *Development* 321: 313–321
- Mignot C, Lambert L, Pasquier L, Bienvenu T, Delahaye-Duriez A, Keren B, Lefranc J, Saunier A, Allou L, Roth V *et al* (2015) WWOX-related encephalopathies: delineation of the phenotypical spectrum and emerging genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 52: 61–70
- Miller JW, Kim W, Holmes MD, Vanhatalo S (2007) Ictal localization by source analysis of infraslow activity in DC-coupled scalp EEG recordings. *NeuroImage* 35: 583–597
- Murata Y, Colonnese MT (2020) GABAergic interneurons excite neonatal hippocampus in vivo. *Sci Adv* 6: eaba1430
- Nashabat M, Al Qahtani XS, Almakdub S, Altwaijri W, Ba-Armah DM, Hundallah K, Al Hashem A, Al Tala S, Maddirevula S, Alkuraya FS *et al* (2019) The landscape of early infantile epileptic encephalopathy in a consanguineous population. *Seizure* 69: 154–172
- Obata K, Oide M, Tanaka H (1978) Excitatory and inhibitory actions of GABA and glycine on embryonic chick spinal neurons in culture. *Brain Res* 144: 179–184
- Patel DC, Tewari BP, Chaunsali L, Sontheimer H (2019) Neuron–glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nat Rev Neurosci* 20: 282–297
- Patrizi S, Holmes GL, Orzalesi M, Allemand F (2003) Neonatal seizures: characteristics of EEG ictal activity in preterm and full-term infants. *Brain Dev* 25: 427–437
- Piard J, Hawkes L, Milh M, Villard L, Borgatti R, Romaniello R, Fradin M, Capri Y, Héron D, Nougues M-C *et al* (2018) The phenotypic spectrum of WWOX-related disorders: 20 additional cases of WOREE syndrome and review of the literature. *Genet Med* 21: 1308–1318
- Pollen A, Nowakowski T, Chen J, Retallack H, Sandoval-Espinosa C, Nicholas C, Shuga J, Liu S, Oldham M, Diaz A *et al* (2015) Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell* 163: 55–67

[0284]

Qian X, Jacob F, Song MM, Nguyen HN, Song H, Ming GL (2018) Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. *Nat Protoc* 13: 565–580

Qian X, Nguyen H, Song M, Hadiono C, Ogden S, Hammack C, Yao B, Hamersky G, Jacob F, Zhong C *et al* (2016) Brain-region-specific organoids using mini-bioreactors for modeling ZIKV exposure. *Cell* 165: 1238–1254

Qian X, Su Y, Adam CD, Deutschmann AU, Pather SR, Goldberg EM, Su K, Li S, Lu L, Jacob F *et al* (2020) Sliced human cortical organoids for modeling distinct cortical layer formation. *Cell Stem Cell* 26: 766–781.e9

Qu Z, Su F, Qi X, Sun J, Wang H, Qiao Z, Zhao H, Zhu Y (2017) Wnt/ β -catenin signalling pathway mediated aberrant hippocampal neurogenesis in kainic acid-induced epilepsy. *Cell Biochem Funct* 35: 472–476

Repudi S, Steinberg DJ, Elazar N, Breton VL, Aquilino MS, Saleem A, Abu-Swai S, Vainshtein A, Eshed-Eisenbach Y, Vijayaragavan B *et al* (2021) Neuronal deletion of Wwox, associated with WOREE syndrome, causes epilepsy and myelin defects. *Brain* awab174

Robel S, Buckingham SC, Boni JL, Campbell SL, Danbolt NC, Riedemann T, Sutor B, Sontheimer H (2015) Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. *J Neurosci* 35: 3330–3345

Rossini L, Garbelli R, Gnatkovsky V, Didato G, Villani F, Spreafico R, Deleo F, Lo Russo G, Tringali G, Gozzo F *et al* (2017) Seizure activity per se does not induce tissue damage markers in human neocortical focal epilepsy. *Ann Neurol* 82: 331–341

Samarasinghe RA, Miranda OA, Mitchell S, Ferando I, Watanabe M, Buth JE, Kurdian A, Golshani P, Plath K, Lowry WE *et al* (2019) Identification of neural oscillations and epileptiform changes in human brain organoids. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/820183> [PREPRINT]

Schneider L, Pellegatta S, Favaro R, Pisati F, Roncaglia P, Testa G, Nicolis SK, Finocchiaro G, D’Adda Di Fagagna F (2013) DNA damage in mammalian neural stem cells leads to astrocytic differentiation mediated by BMP2 signaling through JAK-STAT. *Stem Cell Rep* 1: 123–138

[0285]

- Shanbhag NM, Evans MD, Mao W, Nana AL, Seeley WW, Adame A, Rissman RA, Masliah E, Mucke L (2019) Early neuronal accumulation of DNA double strand breaks in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 7: 1 – 18
- Shao L, Stafstrom CE (2016) Pediatric epileptic encephalopathies: pathophysiology and animal models. *Semin Pediatr Neurol* 23: 98–107
- Sidhaye J, Knoblich JA (2020) Brain organoids: an ensemble of bioassays to investigate human neurodevelopment and disease. *Cell Death Differ* 28: 52–67
- Suberbielle E, Sanchez PE, Kravitz AV, Wang X, Ho K, Eilertson K, Devidze N, Kreitzer AC, Mucke L (2013) Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β . *Nat Neurosci* 16: 613–621
- Sun AX, Yuan Q, Fukuda M, Yu W, Yan H, Lim GGY, Nai MH, D'Agostino GA, Tran H-D, Itahana Y *et al* (2019) Potassium channel dysfunction in human neuronal models of Angelman syndrome. *Science* 366: 1486–1492
- Suzuki H, Katayama K, Takenaka M, Amakasu K, Saito K, Suzuki K (2009) A spontaneous mutation of the *Wwox* gene and audiogenic seizures in rats with lethal dwarfism and epilepsy. *Genes, Brain Behav* 8: 650–660
- Tanna M, Aqeilan RI (2018) Modeling WWOX loss of function in vivo: what have we learned? *Front Oncol* 8 <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00420>
- Tassi L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Lo Russo G, Mai R, Cardinale F, Cossu M, Ferrario A, Galli C *et al* (2002) Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *Brain* 125: 1719–1732
- Thom M (2009) Hippocampal sclerosis: progress since sommer. *Brain Pathol* 19: 565–572
- Tochigi Y, Takamatsu Y, Nakane J, Nakai R, Katayama K, Suzuki H (2019) Loss of *Wwox* causes defective development of cerebral cortex with hypomyelination in a rat model of lethal dwarfism with epilepsy. *Int J Mol Sci* 20: 3596
- Trujillo CA, Gao R, Negraes PD, Gu J, Buchanan J, Preissl S, Wang A, Wu W, Haddad GG, Chaim IA *et al* (2019) Complex oscillatory waves emerging from cortical organoids model early human brain network development. *Cell Stem Cell* 25: 558–569.e7

Vanhatalo S, Palva JM, Holmes MD, Miller JW, Voipio J, Kaila K (2004) Infralow oscillations modulate excitability and interictal epileptic activity in the human cortex during sleep. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5053–5057

Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ (2011) The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 7: 31–40

Wang H-Y, Juo L-I, Lin Y-T, Hsiao M, Lin J-T, Tsai C-H, Tzeng Y-H, Chuang Y-C, Chang N-S, Yang C-N *et al* (2012) WW domain-containing oxidoreductase promotes neuronal differentiation via negative regulation of glycogen synthase kinase 3B. *Cell Death Differ* 19: 1049–1059

Wang W, Esbensen Y, Kunke D, Suganthan R, Rachek L, Bjørås M, Eide L (2011) Mitochondrial DNA damage level determines neural stem cell differentiation fate. *J Neurosci* 31: 9746–9751

Weisz-Hubshman M, Meirson H, Michaelson-Cohen R, Beeri R, Tzur S, Bormans C, Modai S, Shomron N, Shilon Y, Banne E *et al* (2019) Novel WWOX deleterious variants cause early infantile epileptic encephalopathy, severe developmental delay and dysmorphism among Yemenite Jews. *Eur J Paediatr Neurol* 23: 418–426

Yang J, Zhang X, Wu Y, Zhao Bo, Liu X, Pan Y, Liu Y, Ding Y, Qiu M, Wang Y-Z *et al* (2016) Wnt/β-catenin signaling mediates the seizure-facilitating effect of postischemic reactive astrocytes after pentylentetrazole-kindling. *Glia* 64: 1083–1091

Zhang Y, Sloan S, Clarke L, Caneda C, Plaza C, Blumenthal P, Vogel H, Steinberg G, Edwards M, Li G *et al* (2016) Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse. *Neuron* 89: 37–53

[0287]

[0288] 서열

[0289] 서열번호: 1: 인간 WWOX cDNA(코딩) 서열(NCBI 참조 서열 NM_016373.4)

```

atggc agcgcctgcgc tacgcggggc tggacgacac ggacagtgag gacgagctgc
ctccgggctg ggaggagaga accaccaagg acggctgggt ttactacgcc aatcacaccg
aggagaagac tcagtgggaa catccaaaaa ctggaaaaag aaaacgagtg gcaggagatt
tgccatacgg atgggaacaa gaaactgatg agaacggaca agtgtttttt gttgaccata
taaataaaa aaccacctac ttggacccea gactggcgtt tactgtggat gataatccga
ccaagccaac caccggcaa agatacgcg gcagcaccac tgccatggaa attctccagg
gccgggattt cactggcaaa gtggttgtgg tcaactggagc taattcagga atagggttcg
aaaccgcca gtcctttgccc ctccatggtg cacatgtgat ctggcctgc aggaacatgg
caagggcgag tgaagcagtg tcacgcattt tagaagaatg gcataaagcc aaggtagaag
caatgaccct ggacctogct ctgctccgta gcgtgcagca ttttgcgtaa gcattcaagg
ccaagaatgt gcctcttcat gtgcttgtgt gcaacgcagc aacttttct ctaccctgga
gtctcaccaa agatggcctg gagaccacct ttcaagtga tcatctgggg cacttctacc
ttgtccagct cctccaggat gttttgtgccc gctcagctcc tgcccgtgctc attgtggtct
cctcagagtc ccatcgattt acagatatta acgactcctt gggaaaactg gacttcagtc
gcctctctcc aacaaaaaac gactattggg cgatgctggc ttataacagg tccaagctct
gcaacatcct cttctccaac gagctgcacc gtcgctctc cccacgcggg gtccagtcga
acgcagtgca tccctggaat atgatgtact ccaacattca tcgcagctgg tgggtgtaca
caetgctgtt taccttggcg aggcctttca ccaagtcctc gcaacagggg gctgccaaca
ccgtgtactg tgctgctgct ccagaactgg agggctctggg agggatgtac ttcaacaact
gctgcccctg catgccctca ccagaagctc agagcgaaga gacggcccgg acctgtggg
cgctcagcga gaggctgac caagaacggc ttggcagcca gtcgggctaa
    
```

[0290]

[0291] 서열번호: 2: 인간 WWOX 아미노산 서열

MAALRYAGLDDTDSEDELPPGWEERTTKDGVVYANHTEETQWEHPKTGKRKRIVAGDLPYGWEQETDEN
GQVFFVDHINKRTTYLDPRLAFTVDDNPTKPTTRQRYDGSTTAMEILQGRDFTGKVVVVTGANSIGFET
AKSFALGHGAHVILACRNMARASEAVSRILEEWHKAKVEAMTLDLALLRSVQHFAEAFKAKNVP LHLVLCN
AATFALPWSLTKDGLLETTFQVNLHGFYLVQLQDVLCRSAPARVIVVSSESHRTDINDSLGKLDPSRL
SPTKNDYWAMLAYNRSKLCLNIFLSNELHRRLSPRGVT SNAVHPGNMYSNIHRSWWVYTLFLTLARPFTK
SMQQAATTVYCAAVPELEGLGMYFNCCRCMPSP EAQSEETARTLWALSERLIQERLGSQSG

[0292]

[0293] 서열 번호: 3: 인간 WWOX cDNA(전체)

GCAGTGCGCAGGCGTGAGCGGTGCGGGCCCGACGCGCGGGGTCTCGTGTGGAGCGGGAGTGAG
TTCTTGAGCGAGTGGACCCGGCAGCGGGCGATAGGGGGCCAGGTGCCCTCCACAGTCAGCCATG
GCAGCGCTGCGCTACGCGGGGCTGGACGACACGGACAGTGAGGACGAGCTGCCCTCCGGGCTGGG
AGGAGAGAACCACCAAGGACGGCTGGGTTTACTACGCCAATCACACCGAGGAGAAGACTCAGTG
GGAACATCCAAAACCTGGAAAAGAAAACGAGTGGCAGGAGATTGCCATACGGATGGGAACAA
GAAACTGATGAGAACGGACAAGTGT TTTTGTGACCATATAAATAAAGAACCACCTACTTGG
ACCCAAGACTGGCGTTTACTGTGGATGATAATCCGACCAAGCCAACCACCGGCAAAGATACGA
CGGCAGCACCACTGCCATGGAAATCTCCAGGGCCGGGATTTCACTGGCAAAGTGGTTGTGGTC
ACTGGAGCTAATTCAGGAATAGGGTTCGAAACCGCCAAGTCTTTTGCCTCCATGGTGCACATG
TGATCTTGGCCTGCAGGAACATGGCAAGGGCGAGTGAAGCAGTGTACGCATTTTAGAAGAATG
GCATAAAGCCAAGGTAGAAGCAATGACCTGGACCTCGCTCTGCTCCGTAGCGTGCAGCATTTT

[0294]

GCTGAAGCATTCAAGGCCAAGAATGTGCCTCTTCATGTGCTTGTGTGCAACGCAGCAACTTTTG
CTCTACCTGGAGTCTCACCAAGATGGCCTGGAGACCACCTTTCAAGTGAATCATCTGGGGCA
CTTCTACCTTGTCCAGCTCCTCCAGGATGTTTTGTGCCGCTCAGCTCCTGCCCGTGTCTATGTG
GTCTCCTCAGAGTCCCATCGATTTACAGATATTAACGACTCCTTGGGAAAACCTGGACTTCAGTC
GCCTCTCTCCAAACAAAACGACTATTGGGCGATGTGGCTTATAACAGGTCCAAGCTCTGCAA
CATCTCTTCTCCAACGAGCTGCACCGTCCGCTCTCCCCACGCGGGGTCAAGTGAACGCAGTG
CATCTGGAAATATGATGACTCCAACATTCATCGCAGCTGGTGGGTGTACACACTGCTGTTTA
CCTTGGCGAGGCTTTACCAAGTCCATGCAACAGGGAGCTGCCACCACCGTGTACTGTGCTGC
TGTCCCAGAACTGGAGGCTGGGAGGGATGACTTCAACAACCTGCTGCCGCTGCATGCCCTCA
CCAGAAGCTCAGAGCGAAGAGACGGCCCGGACCCTGTGGCGCTCAGCGAGAGGCTGATCCAAG
AACGGCTTGGCAGCCAGTCCGGCTAAGTGGAGCTCAGAGCGGATGGGCACACACCCCGCCTG
TGTGTGTCCCTCAGCAAGTGCAGGGCTGGGCCCTTCCAAATGTCCCTCCAACACAGATCC
GCAAGAGTAAAGGAAATAGGACAGTACAACAGAGTAAAAATCTAAGTACCAATGGGAAGC
AGGGAATCTCGGGGTAAGTATCACTTTTTCTGGGCTGGGCTAGGCATAGGTCTCTTTGCTTT
CTGGTGGTGGCCTGTTTGAAGTAAAAACCTGCTTGGTGTGTAGGTTCCGTATCTCCCTGGAGA
AGCACCAGCAATCTCTTTTACTGTTATAGAATAGCTGAGGTCCCTCGTCCCATCCAG
CTACCACCACGGCCACCCTGCAGCCGGGGCTGGCCTTCTCCTACTTAGGGAAGAAAAGCAA
GTGTTCACTGCTCCTTGTGTCATGATCCAGGAGATAATTGTTTTCATTCCTTGACCAAGACT
GAGCCAGCTTAGCAACTGTGGGGAGACAAATCTCAGAACCCTGTCCAGCCAGTGAAGATGAC
AGTGACACCCAGGGAGTAGAATACGCAGAACTACCAGGTGGCAAAGTACTTGTTCATAGACTC
CTTTGCTAATGCTATGCAAAAATCTTTAGAGATTATAACAAATTTTCAAAATCATTCTTAG
ATACCTTGAAGGCGAGGAAGGAAGCGTATATACTTAAGAATACACAGGATATTTTGGGGGCA
GAGAATAAAACGTTAGTTAATCCCTTTGTCTGTCAATCACAGTCTCAGTTCCTTTGCTTTCACA
TTGTACTTAAACCTCTGCTGTGCCATCCTATGCTTAATAAAAAGAACATGCTGAATATC
A

[0295]

[0296] 서열번호: 4: 인간 시냅신 I 프로모터의 서열

ac tacaaccga gtatctgcag agggccctgc gtatgagtgc
aagtgggttt taggaccagg atgaggcggg gtgggggtgc ctacctgacg
accgaccctg acccactyga caagcaccga accccattc cccaaattgc
gcatccccta tcagagaggg ggaggggaaa caggatgcgg cgaggcgcgt
gcgcaactgcc agcttcagca ccgcggacag tgcttcgcc ccgcctggc
ggcgcgcgcc accgcccct cagcaactgaa ggcgcgctga cgtcaactgc
cggtccccg caaactcccc ttcccggcca ccttggctgc gtcgcgcgcg
ccgcccggcc agccggaccg caccacgcga ggcgcgagat aggggggcac
gggcccgaac atctgcgctg cggcgccggc gactcagcgc tgctcagtc
tgcggtgggc agcggaggag tcgtgtcgtg cctgagagcg cagctgtgct
cctgggcacc gcgcagtcg ccccgcgggc tcctggccag accacccta
ggaccccctg cccaagtcg cagccttega

[0297]

[0298] 서열번호: 5: 시냅신 1/ WWOX cDNA 작제물(굵은 글꼴 - 최소 SynI 프로모터; 밑줄 - 인간 WWOX cDNA; 일반 글꼴 - AAV9 벡터)

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGC
GACCTTTGGTTCGCCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATC
ACTAGGGGTTCTGCGGCAATTCAGTCGATAAATAACGGTCCCTAAGGTAGCGATTTAAATAC
CGCTCTCTTAAGGTAGCCCCGGGACCGCTCAATTTACTACAAACCGAGTATCTGCAGAGGGCC
CTGCGTATGAGTGCAGTGGTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCCTACCTGACC
ACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAAACCCCAATTCCCAAAATTGCGCATCCCTATCAG

[0299]

AGAGGGGGAGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCTGCGCACTGCCAGCTTACGACCCGCGGAC
AGTGCCTTCGCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACG
TCACTCGCCGGTCCCCGCCAAATCCCTTCCCGGCCACCTTGGTTCGCGTCCGCGCCGCGCCG
GCCAGCCGGACCGCACACCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTG
CGGCGCCGGGCACTCAGCGTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCTGTGTCGCTG
AGAGCGCACTGTGCTCCTGGGCACCGCGCAGTCCGCCCCGCGGCTCCTGGCCAGACCACCC
TAGGACCCCTGCCCCAAGTCGCAGCCTTCGAGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGGCC
GCTGCGGCCCTCGAGCAAGCTGGCTAGTTAAGCTATCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT
TAAAGGAACCAATTCAGTCGAGAATTCGTCGACTGGATCCGGTACCGAGGAGATCTGCCGCGGC
GATCGCCGCACTGCGCAGGCGTGGCGGTCGAGCGGTTCGGGCCCCGACGCGCGCGGCTCTGCTTTGAGCGG
GAGTGAGTTCCTGAGCGAGTGGACCCGGCAGCGGGCGATAGGGGGGCCAGGTGCCTCCACAGTC
AGCCATGGCAGGCTGCGCTACGCGGGGCTGGACGACACGGACAGTGAGGACGAGCTGCCTCCG
GGCTGGGAGGAGAAACCAAGGACGGCTGGGTTTACTACGCCAATCACACCGAGGAGAAGA
CTCAGTGGGAACATCTCAAAAACCTGGAAAAAGAAAACGAGTGGCAGGAGATTTGCCATACGGATG
GGAAACAAGAACTGATGAGAACGGACAAGTGT'TTTTGTGACCATATAAATAAAAGAACCACC
TACTTGGACCCAAAGACTGGCGTTTACTGTGGATGATAATCCGACCAAGCCAACCACCCGCGAAA
GATACGACGGCAGCACCCTGCCATGGAATTTCCAGGGCCGGGATTTCACTGGCAAAGTGGT
TGTGGTCACTGGAGCTAATTCAGGAATAGGGTTTCGAAAACCGCCAAGTCTTTGCCCTCCATGGT
GCACATGTGATCTTGGCTGCAGGAACATGGCAAGGGCGAGTGAAGCAGTGTACGCATTTTAG
AAGAAATGGCATAAAGCCAAAGGTAGAAGCAATGACCCTGGACCTCGCTCTGCTCCGTAGCGTGCA
GCATTTTGTGTAAGCATTCAAGGCCAAGAAATGTGCCTTTCATGTGCTGTGTGCAACGCAGCA
ACTTTTGTCTACCCTGGAGCTCACCAAAGATGGCCTGGAGACCCTTTCAGTGAATCATC
TGGGGCACTTCTACCTTGTCCAGCTCCTCCAGGATGTTTGTGCGCTCAGCTCCTGCCCGTGT
CATTTGTGCTCCTCAGAGTCCCATCGATTTACAGATATAACGACTCCTTGGGAAAACCTGGAC
TTCAGTCCCTCTCTCAACAAAAACGACTATGGGGCGATGCTGGCTTATAACAGGTCCAAGC
TCTGCAACATCCTCTTCTCCAGGCTGCACCCCTCGCTCTCCCCACGCGGGGTCACGTCGAA
CGCAGTGCATCCTGGAAATATGATGTACTCCAACATTCATCGCAGCTGGTGGGTGTACACACTG
CTGTTTACCTTGGCGAGGCTTTTACCAGTCCATGCAACAGGGAGCTGCCACCACCGTACT
GTGCTGTGTCCCAGAACTGGAGGGTCTGGGAGGGATGACTTCAACAACCTGCTGCCGCTGCAT
GCCCTCACAGAACTCAGAGCGAAGAGACGGCCCGGACCCCTGTTGGCGCTCAGCGAGAGGCTG
ATCCAAGAACGGCTTGGCAGCCAGTCCGGCTAAGTGGAGCTCAGAGCGGATGGGCACACACACC
CGCCCTGTGTGTCCCCTCACGCAAGTCCAGGGCTGGGCCCTTCCAAATGTCCCTCCAACA
CAGATCCGCAAGAGTAAAGGAAATAAGAGCAGTCAACAAGAGTGAATAAATCTTAAGTACCAAT
GGGAAGCAGGGAATTCCTGGGTTAAGTATCACTTTTCTGGGGCTGGGCTAGGCATAGGCTCT
TTGCTTTCTGGTGGTGGCTGTTTGAAGTAAAAACCTGCTTGGTGTGTAGGTTCCGTATCTCC
CTGGAGAAGCACCAGCAATTCTCTTTCTTTACTGTTATAGAATAGCCTGAGGTCCCCTCGTCC
CATCCAGTACCACCACGGCCACCCTGCAGCCGGGGCTGGCCCTTCTCCTACTTAGGGAAAGAA
AAAGCAAGTGTCACTGCTCCTTCTGCTGCTGATCCAGGAGATAATGTTTCATTCATCCTGAC
CAAGACTGAGCCAGCTTAGCAACTGCTGGGAGACAAATCTCAGAACCTTGTCCCAGCCAGTGA
GGATGACAGTGCACCCAGAGGGAGTAGAATACGCAGAACTACCAGGTGGCAAAGTACTTGTCA
TAGACTCCTTTGCTAATGCTATGCAAAAAATCTTTAGAGATTATAACAAATTTTCAAATCAT
TCCCTTAGATACCTTGAAGGCGAGGAAGGAGCGTATATACTTAAGAATACACAGGATATTTTG
GGGGCAGAGAATAAACGTTAGTTAATCCCTTTGCTGTCAATCACAGTCTCAGTCTCTCTTGC
TTTACATTTGACTTAAACCTCCTGCTGTGCTCGCATCCTATGCTTAATAAAGAACATGCTT
GAATATCATTTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG
TTGTTTGGCCCTCCCCGTCCTTCCCTTACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTTCCTA
ATAAAATGAGGAAATTCATCGCATGCTGCTGAGTAGGTGCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTG
GGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTTGGGAAGACAAATAGCAGGCATGCTGGGGATCGGGTGGCT
CTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACAGATCCTCTCTTAAGGTAGCATCGAGATTTAAATTAGG
GATAACAGGGTAATGGCGCGGGCCGAGGAACCCCTAGTGTAGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTG
CGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAGGTCCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGG
CGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGCGCTGATGCGGTATTTTCTCCT
TACGCATCTGTGGGTATTTACACCCGCTACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCG
GCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCTGACCGCTACACTTGCAGGCGCTT
AGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAA

[0300]

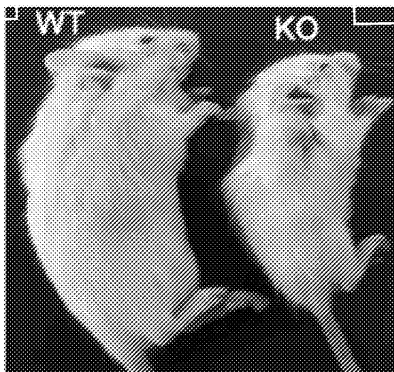
GCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAA
AACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTT
GACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCCT
ATCTCGGGCTATCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATG
AGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGCAATTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTG
CACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCC
GCTGACCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGTGTGACCGTCT
CCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCCGTCATCACCGAAAACGGCGGAGACGAAAGGGCCT
CGTGATACGCCCTATTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGC
ACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGT
ATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAG
TATCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTGCGGCATTTTTGCCTTCCTGTTTTTGCT
CACCCGAAAACCGTGGTAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACA
TCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAAGACGTTTTCCAAT
GATGAGACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAG
CAACTCGGTCGGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCACTCACAGAAA
CGCATCTTACGGATGGCATGACGCGAATTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATA
CACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGAC
AACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA
ACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAATATTAACCTGG
CGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCA
GGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGT
TATCTACACGACGGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGT
CGCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATT
TAAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAA
AATCCCTTAAACGTGAGTTTTCGTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT
TCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAACTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAG
CGGTGGTTTTGTTGCGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAG
AGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAATCT
GTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA
AGTCGTGCTTACC GGTTGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCGGCTG
AACGGGGGTTCGTGCCACACGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTA
CAGCGTGAAGCTATGAGAAAGGCCACCGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA
TAGTCTGTGCGGTTTTGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGG
CGGAGCCTATGGAAAAACCCAGCAACGCGCCCTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGGCCTT
TTGCTCACATGT

[0301]

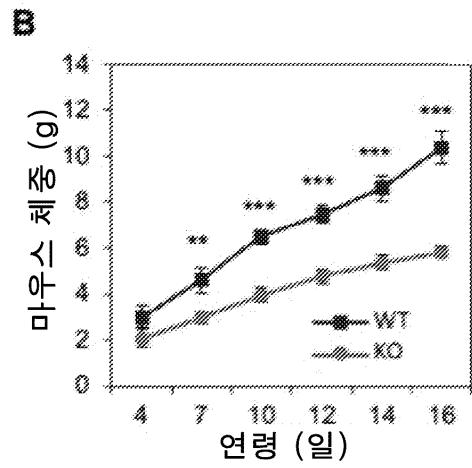
도면

도면 1a

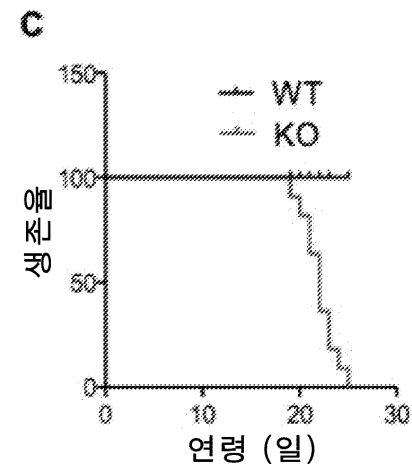
A



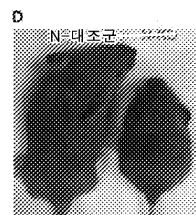
도면1b



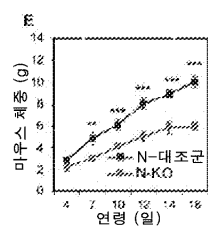
도면1c



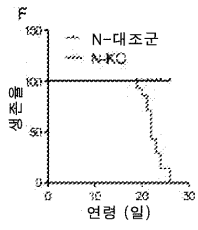
도면1d



도면1e



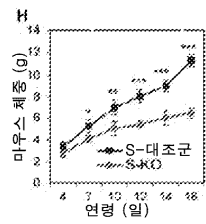
도면1f



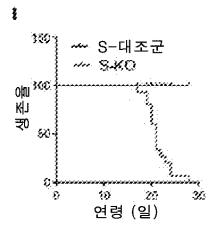
도면1g



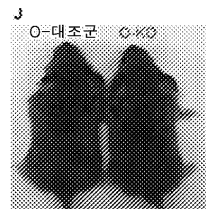
도면1h



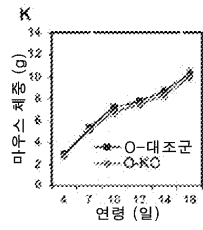
도면1i



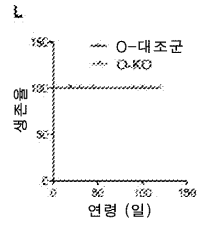
도면1j



도면1k



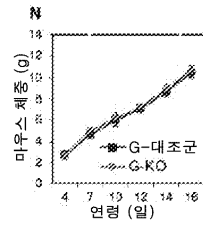
도면1l



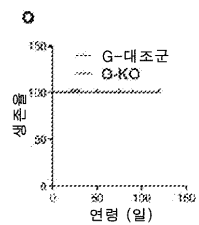
도면1m



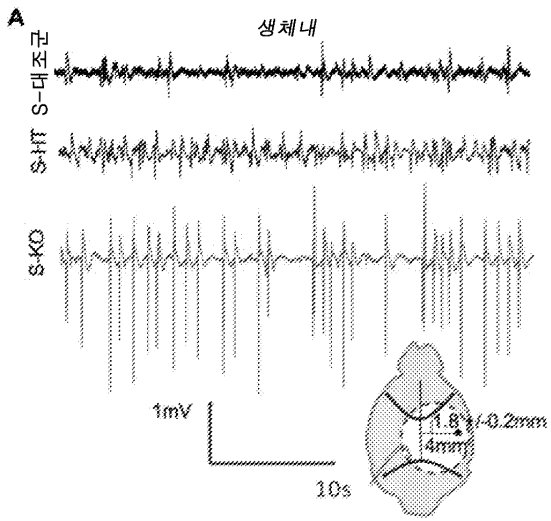
도면1n



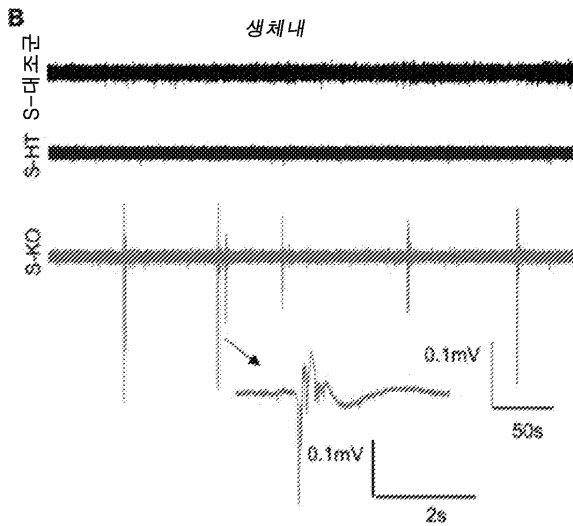
도면1o



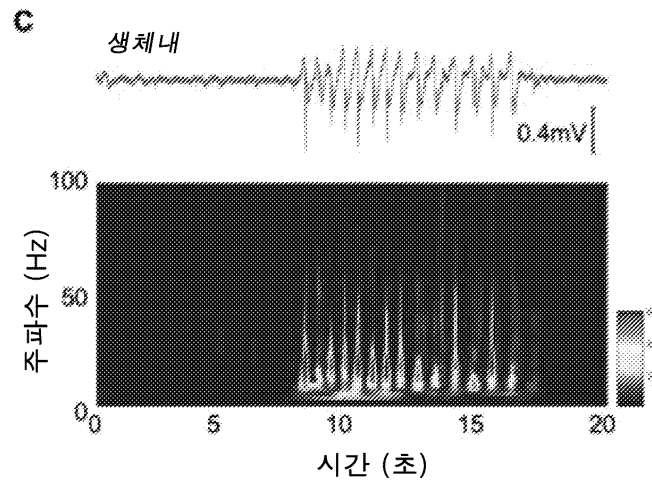
도면2a



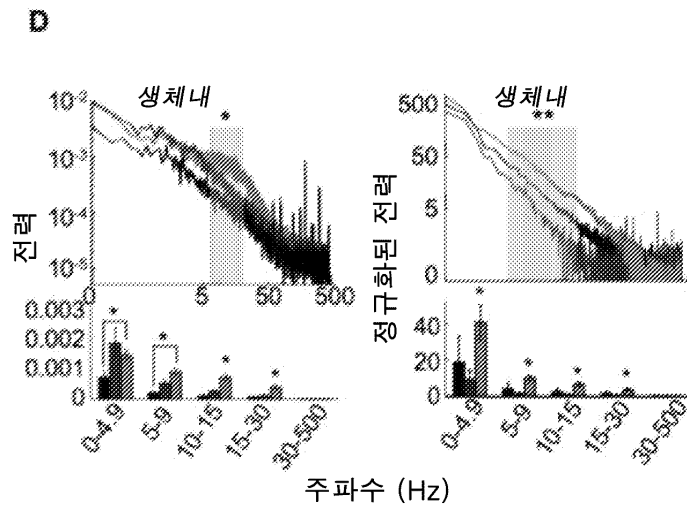
도면2b



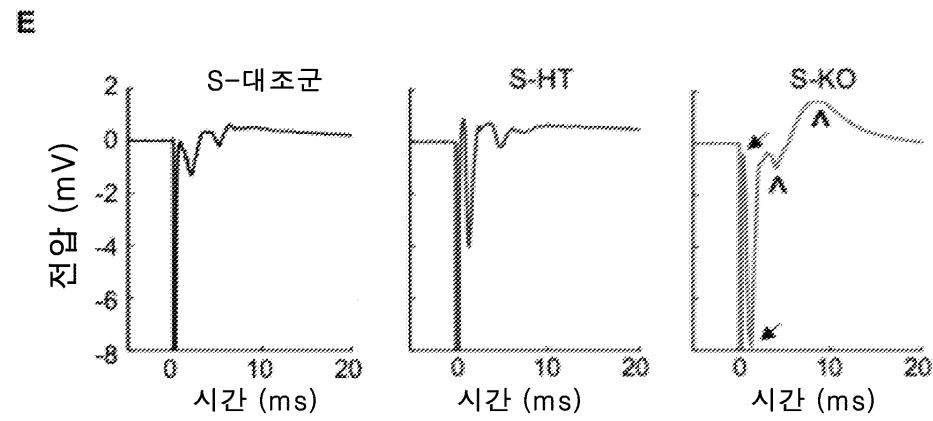
도면2c



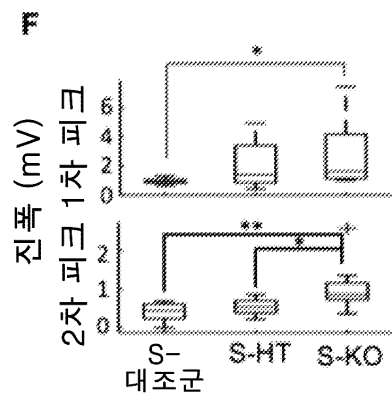
도면2d



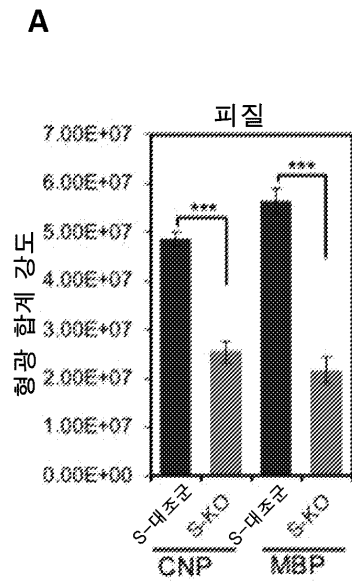
도면2e



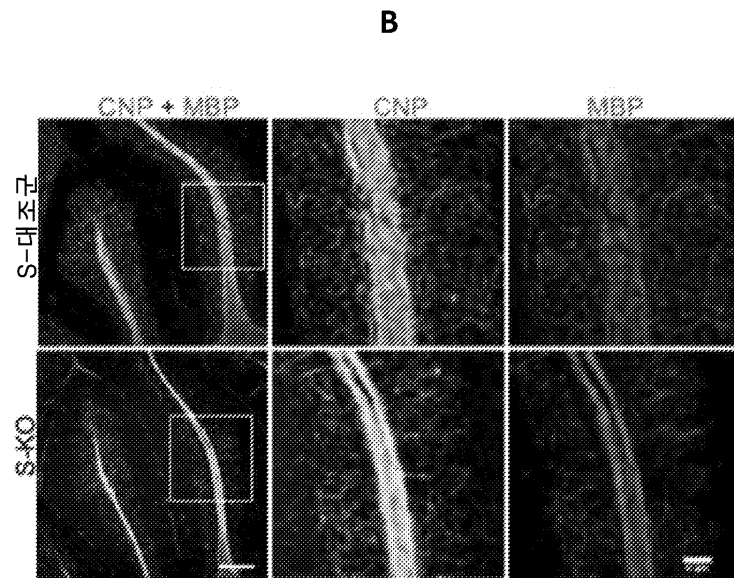
도면2f



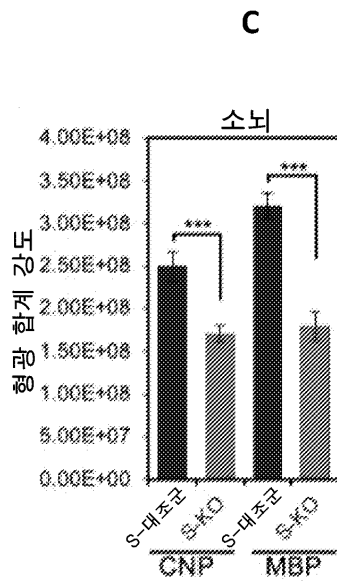
도면3a



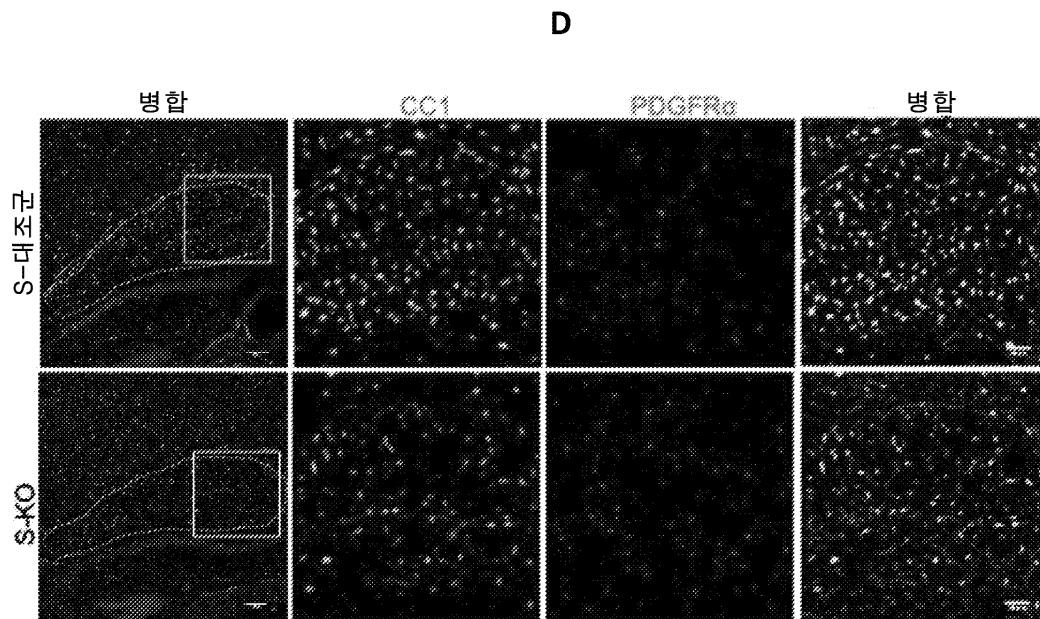
도면3b



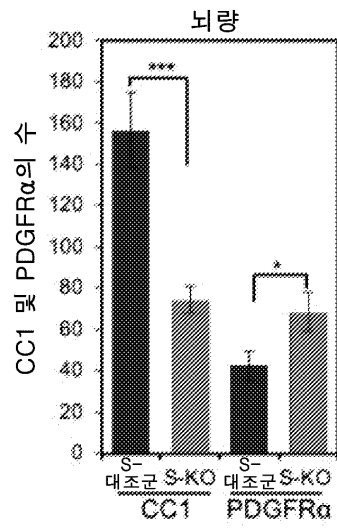
도면3c



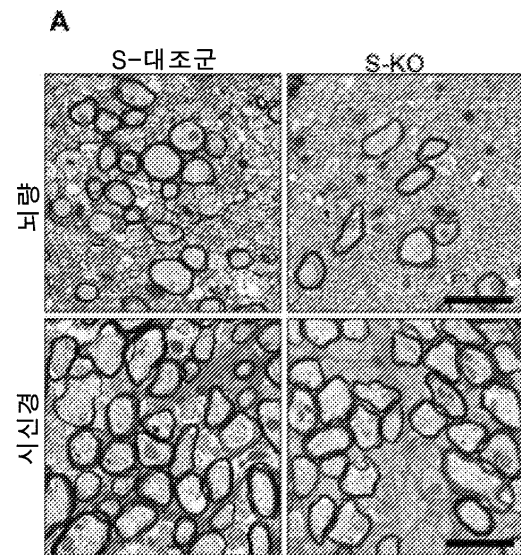
도면3d



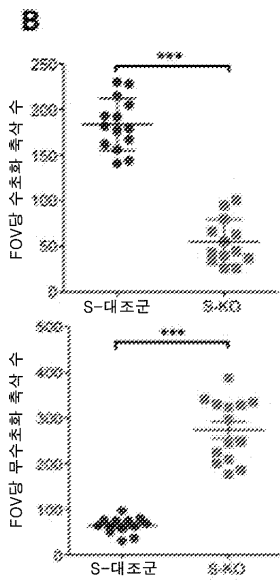
도면3e



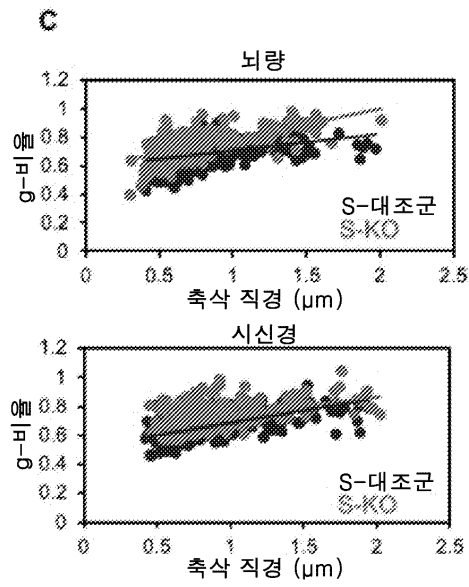
도면4a



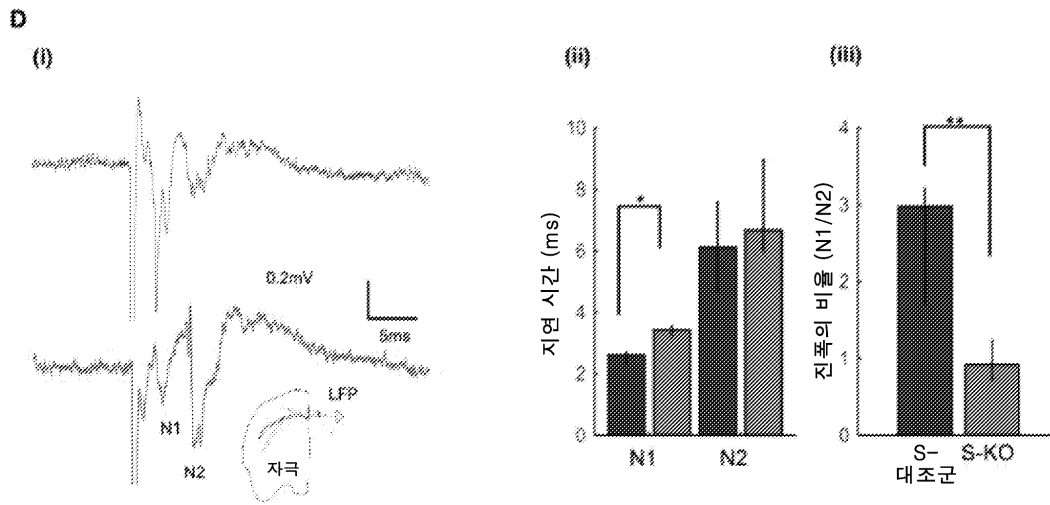
도면4b



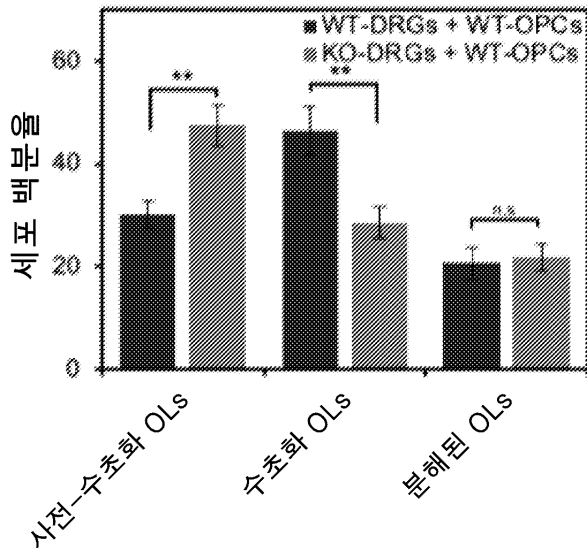
도면4c



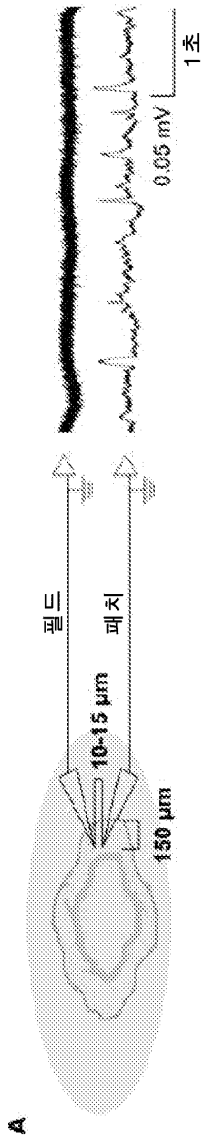
도면4d



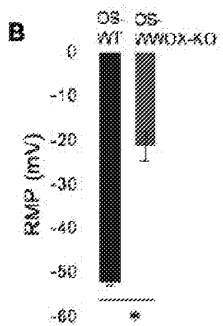
도면5



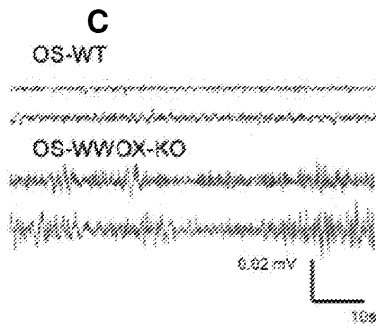
도면6a



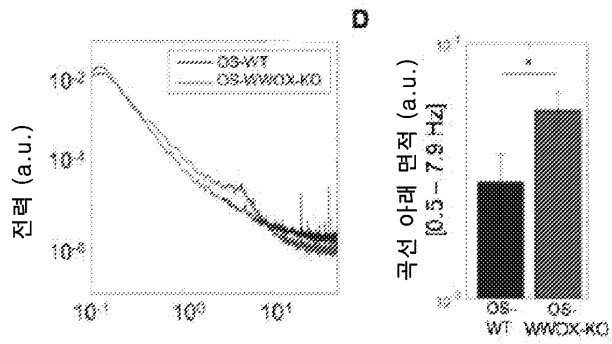
도면6b



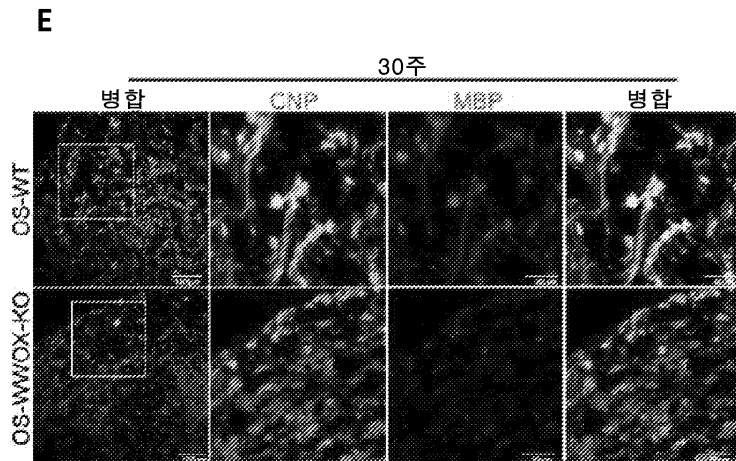
도면6c



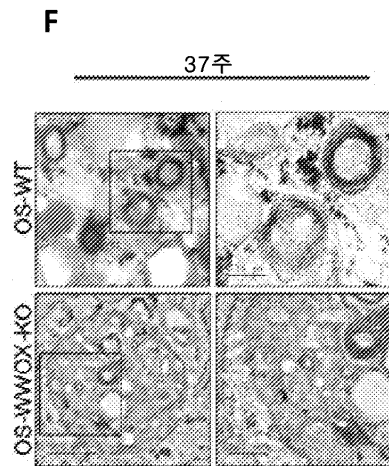
도면6d



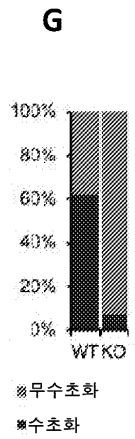
도면6e



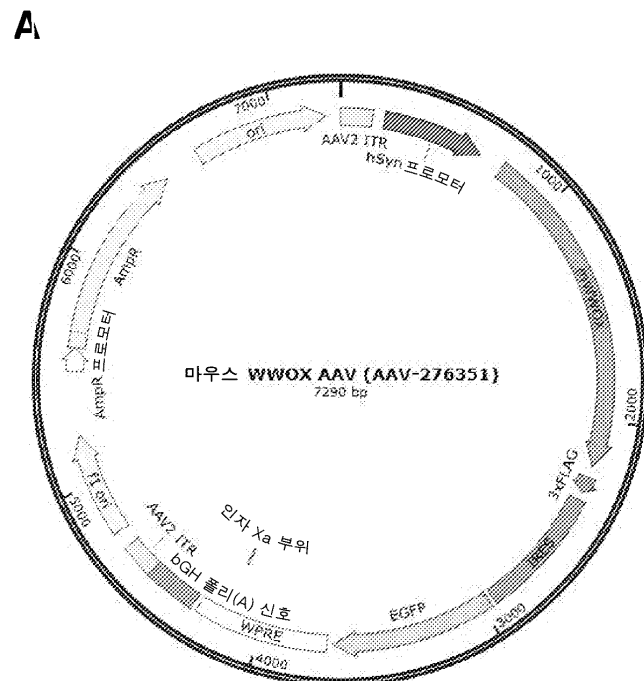
도면6f



도면6g



도면7a



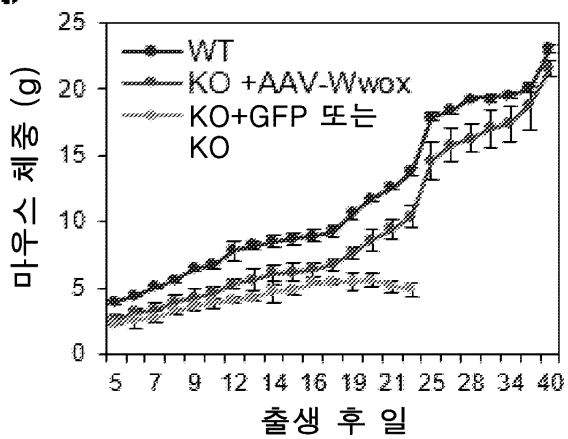
도면7b

B



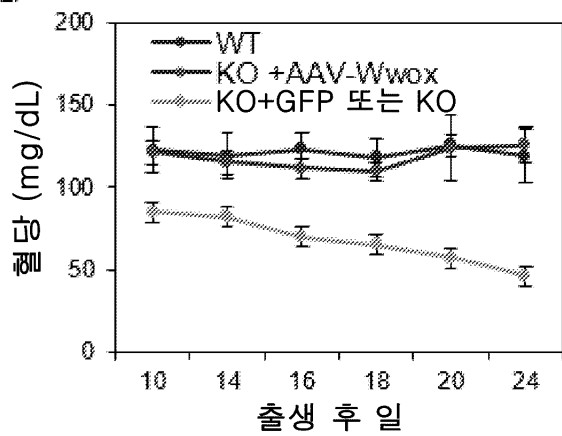
도면7c

C



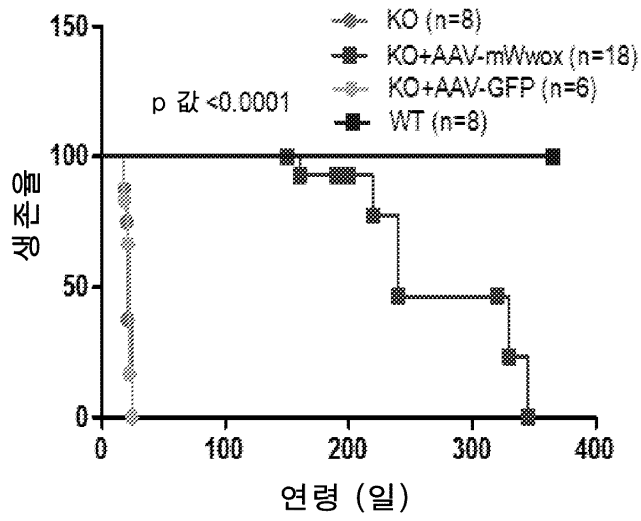
도면7d

D



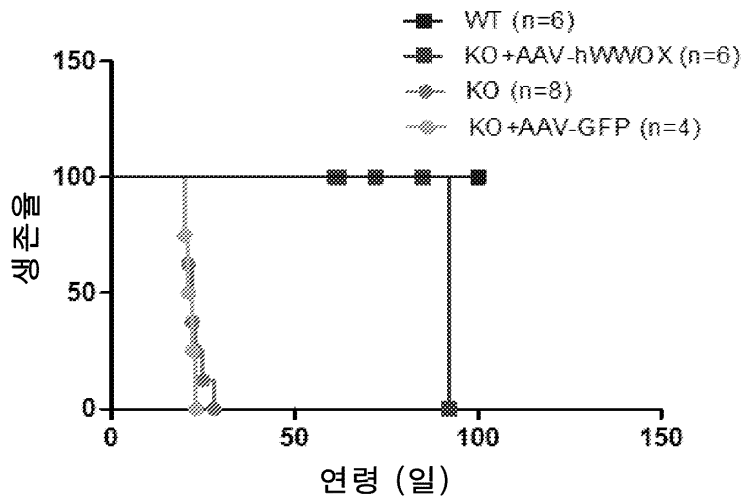
도면7e

E: AAV-mWwox를 주입한 KO 마우스의 생존

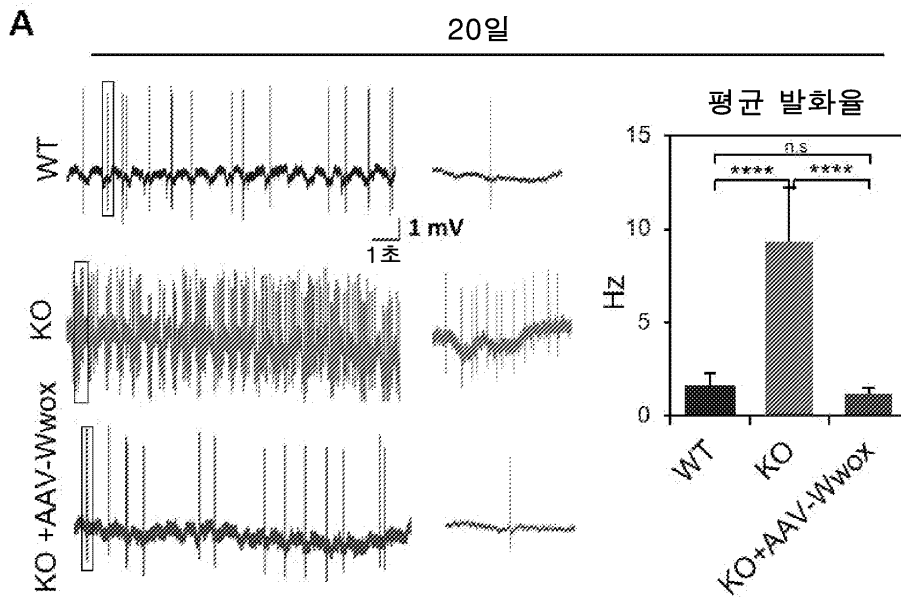


도면7f

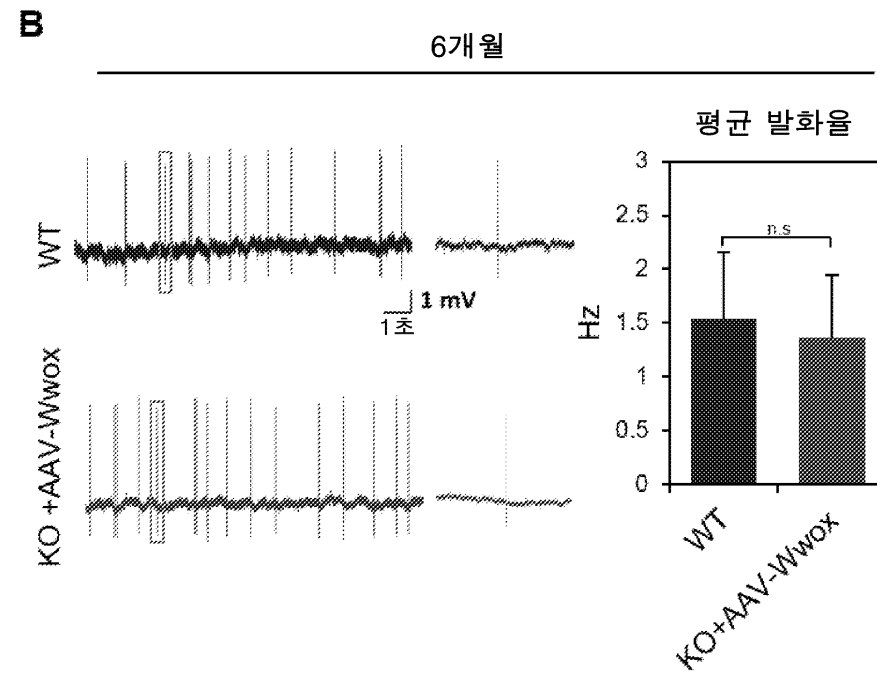
F: AAV-hWwox를 주입한 KO 마우스의 생존



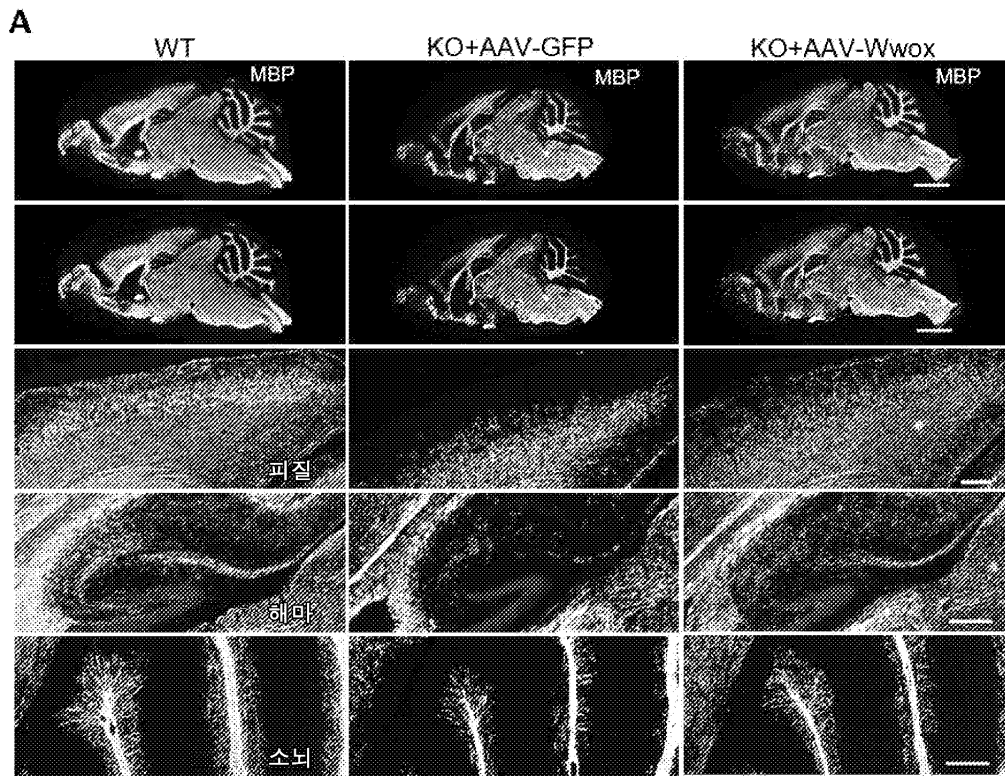
도면8a



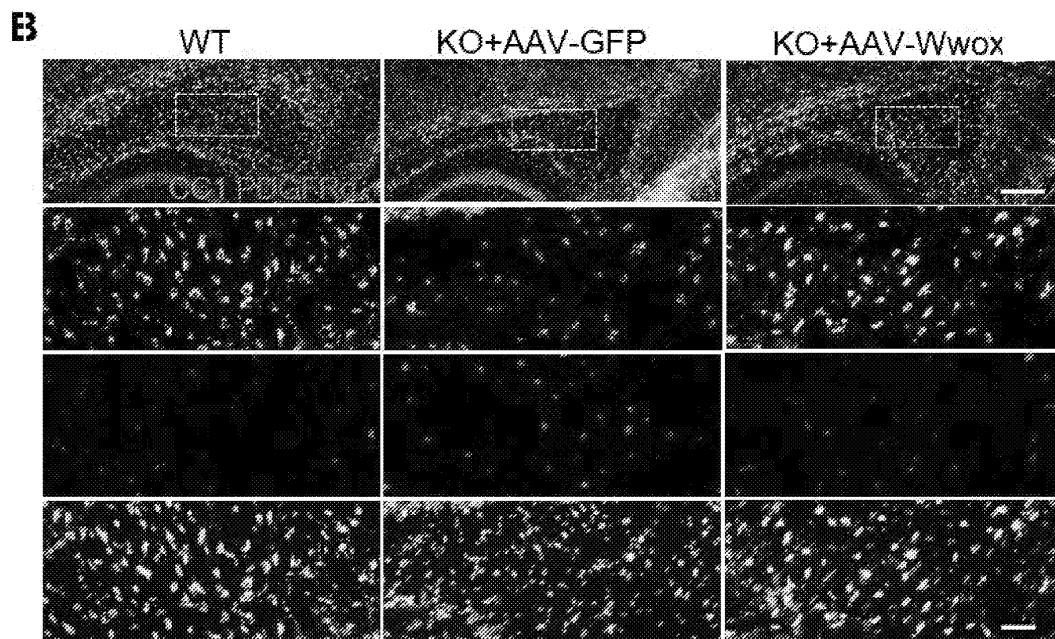
도면8b



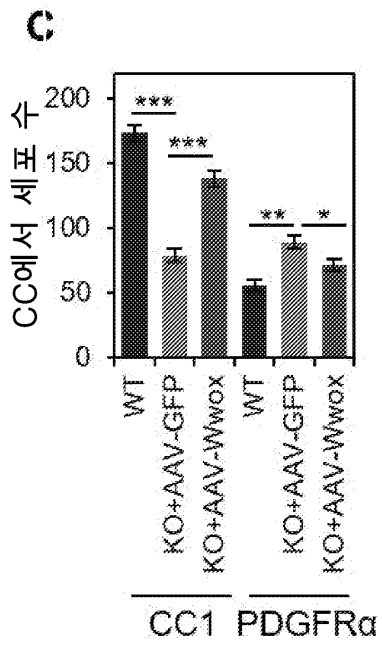
도면9a



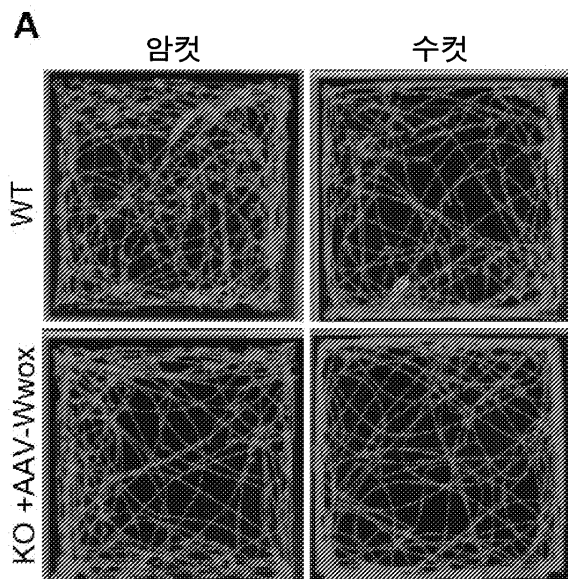
도면9b



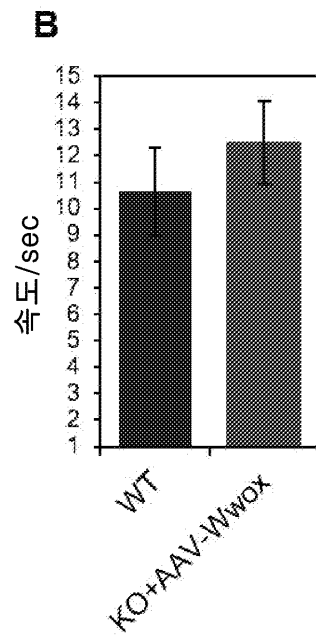
도면9c



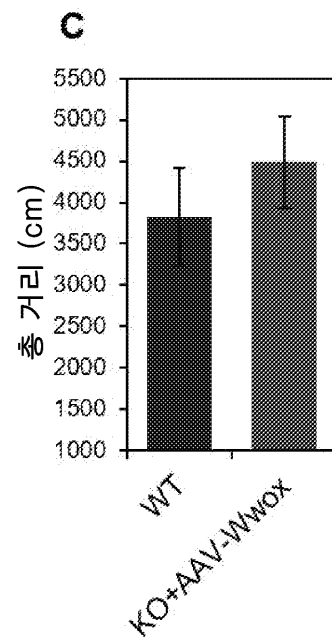
도면10a



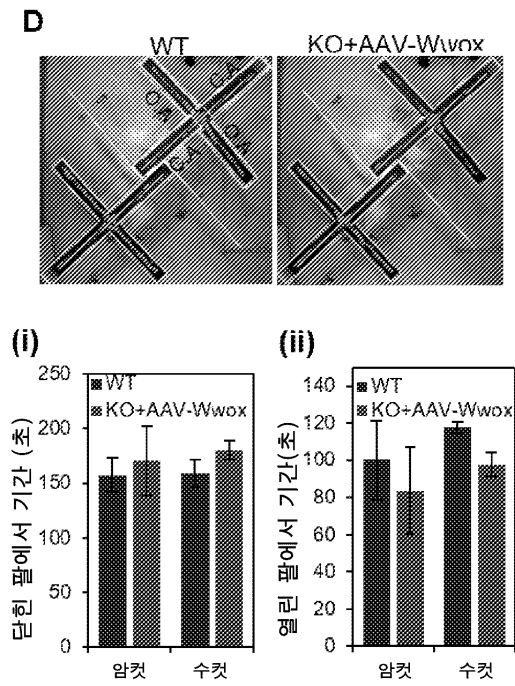
도면10b



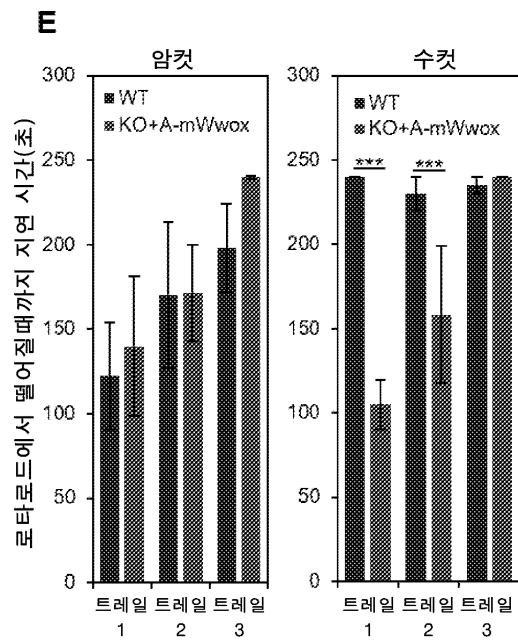
도면10c



도면10d

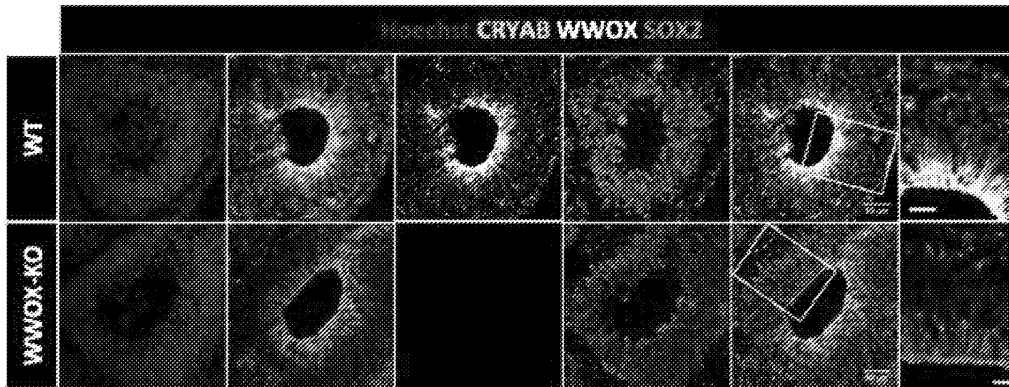


도면10e



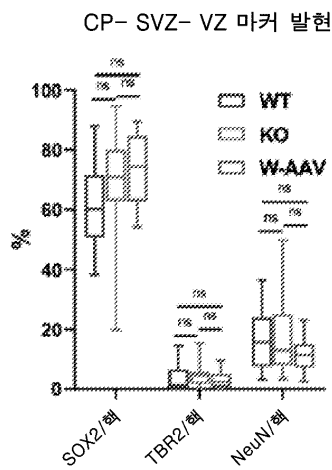
도면11a

A



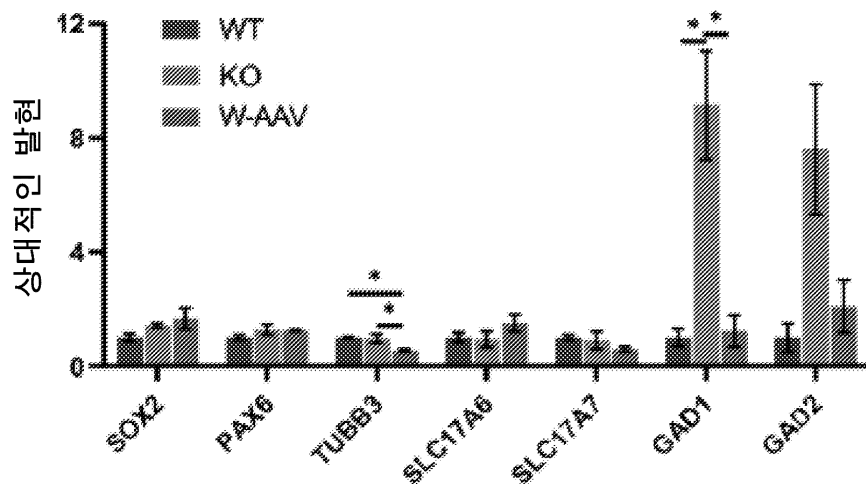
도면11b

B

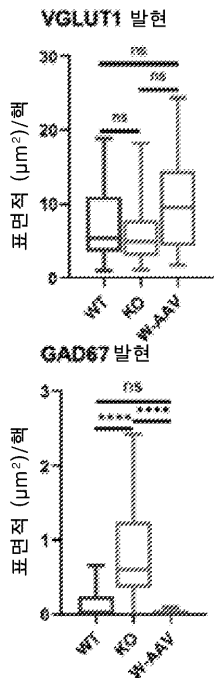


도면11c

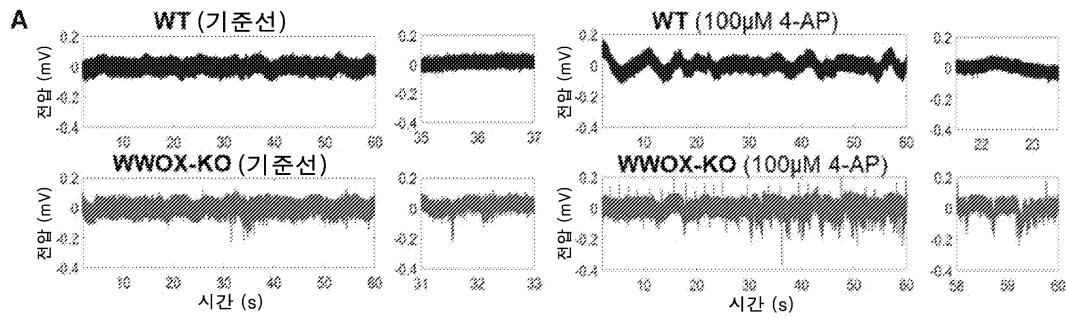
신경 마커 qPCR
대뇌 오가노이드 15주



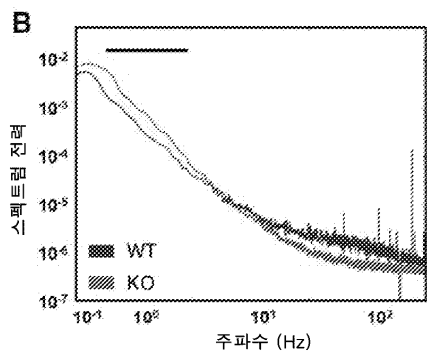
도면11d



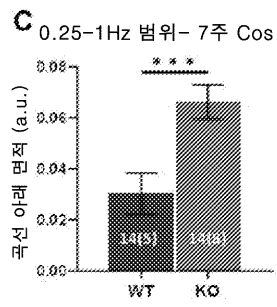
도면12a



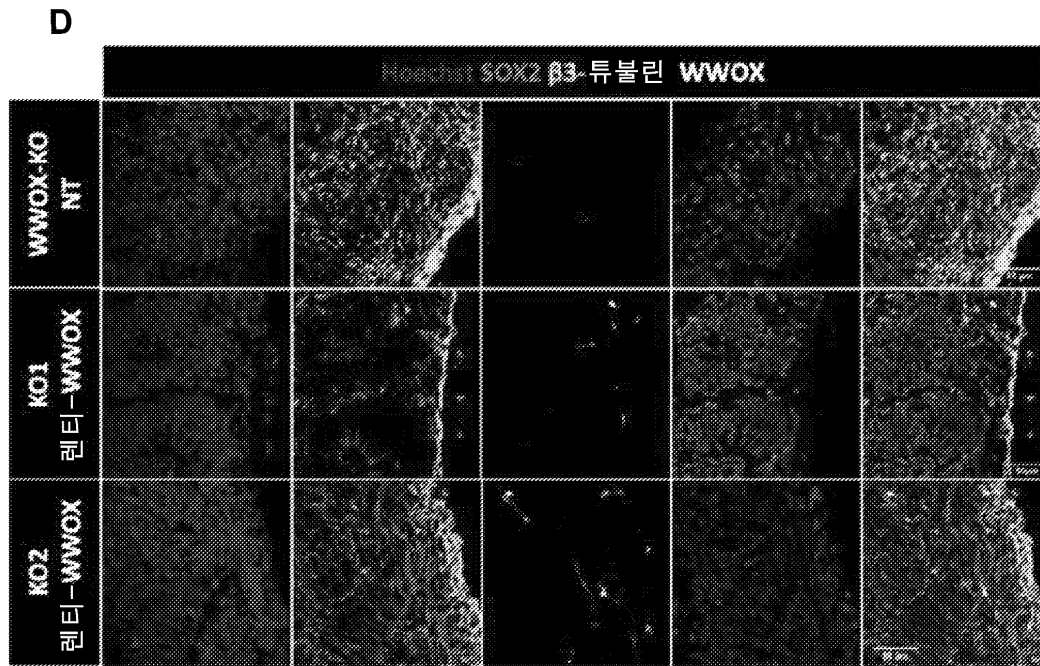
도면12b



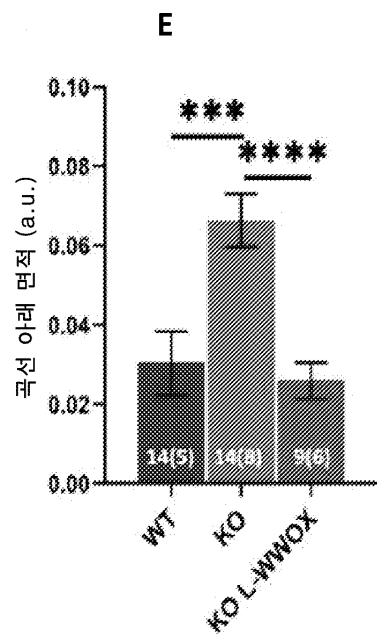
도면12c



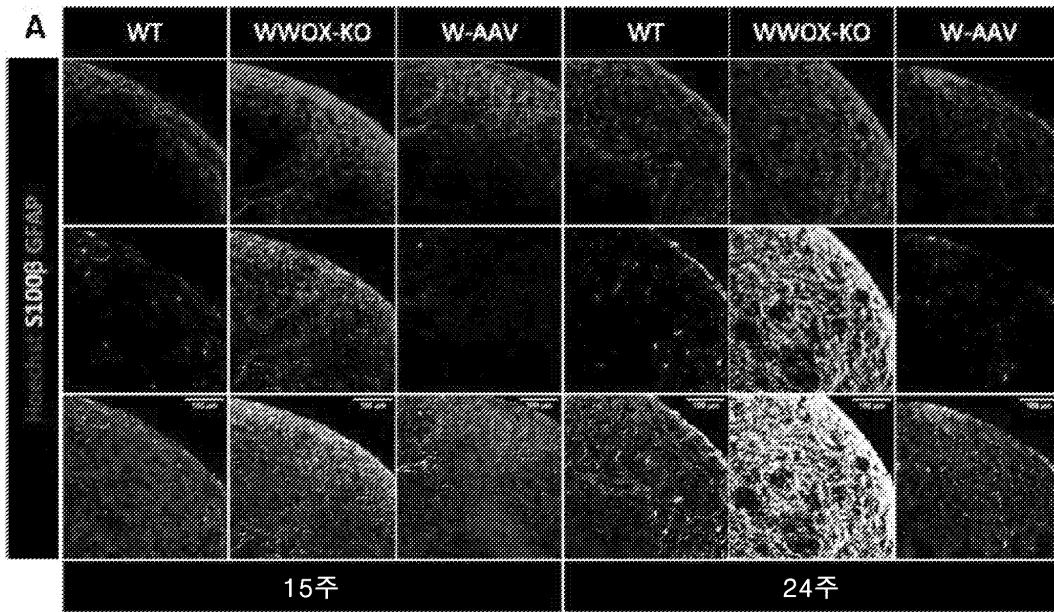
도면12d



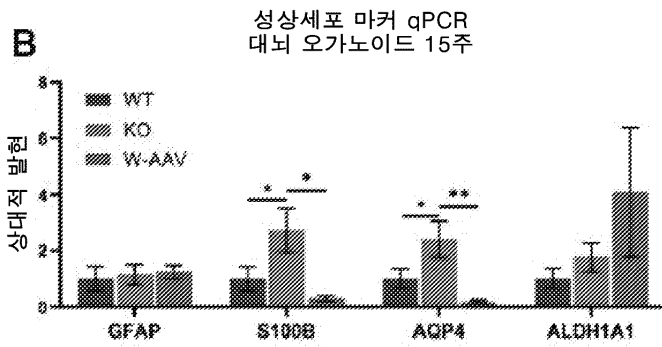
도면12e



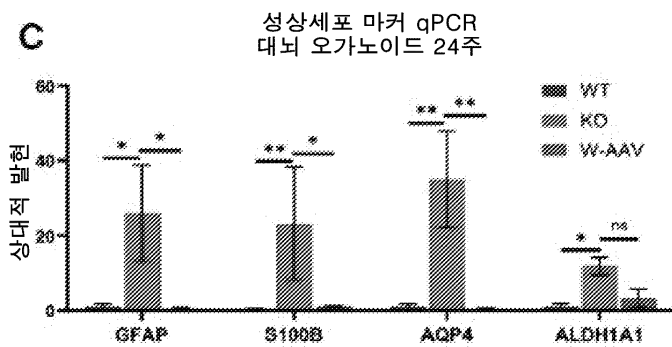
도면13a



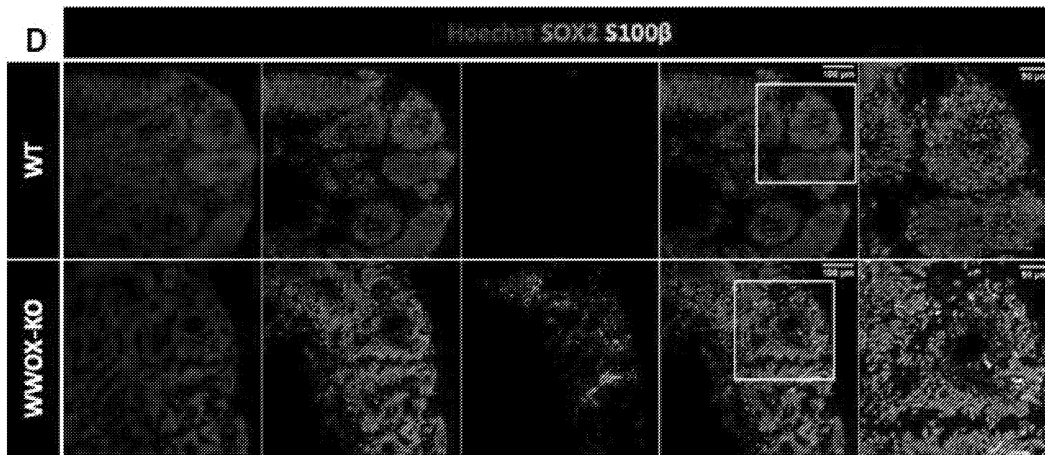
도면13b



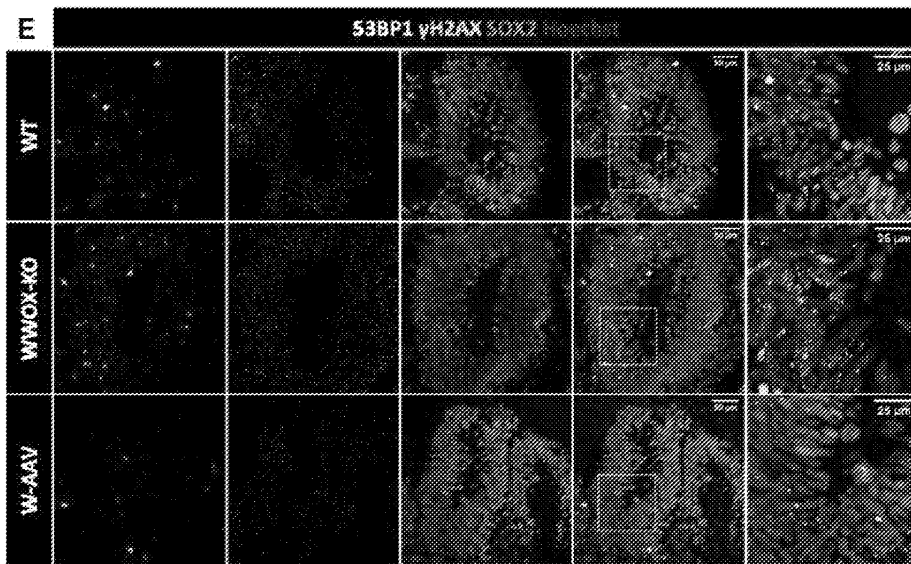
도면13c



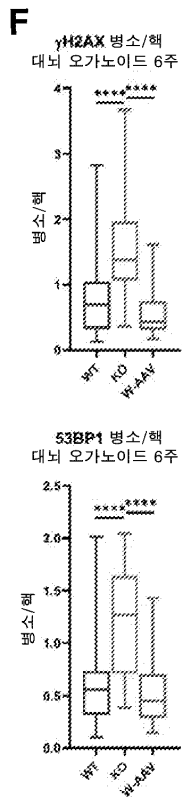
도면13d



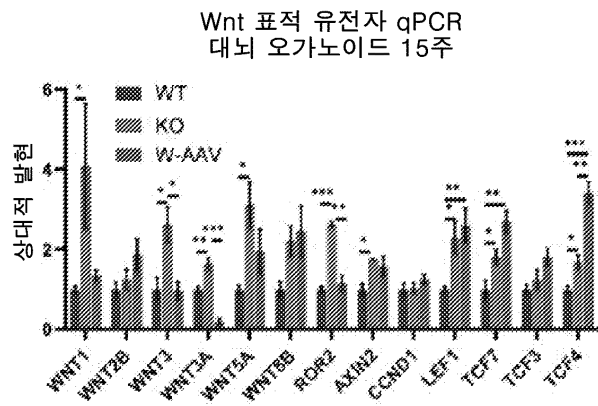
도면13e



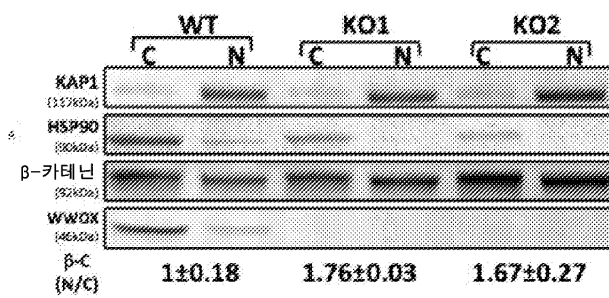
도면13f



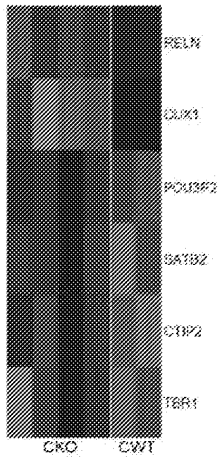
도면14a



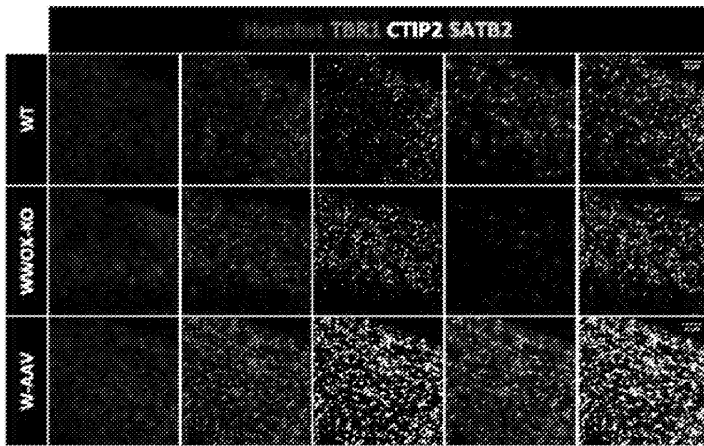
도면14b



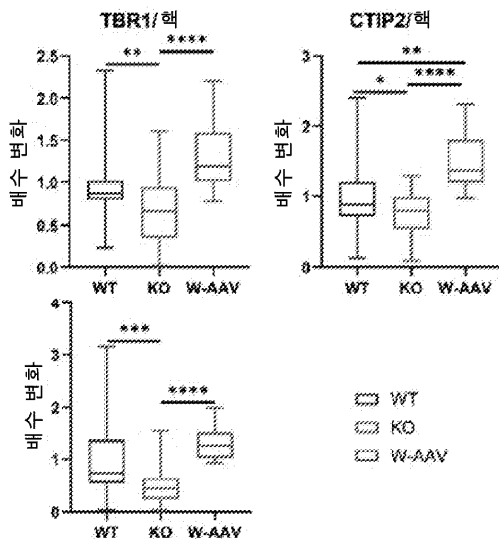
도면14c



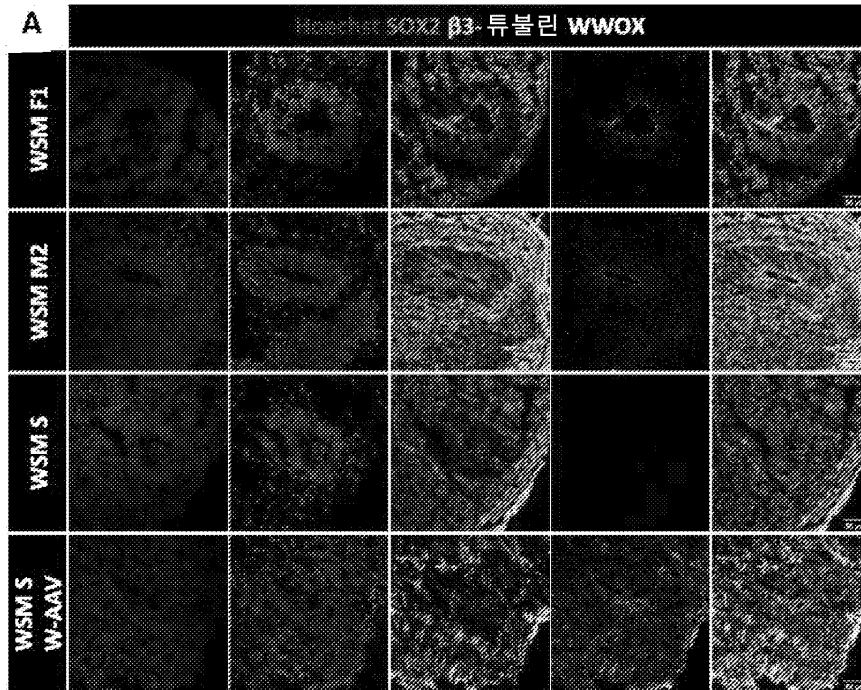
도면14d



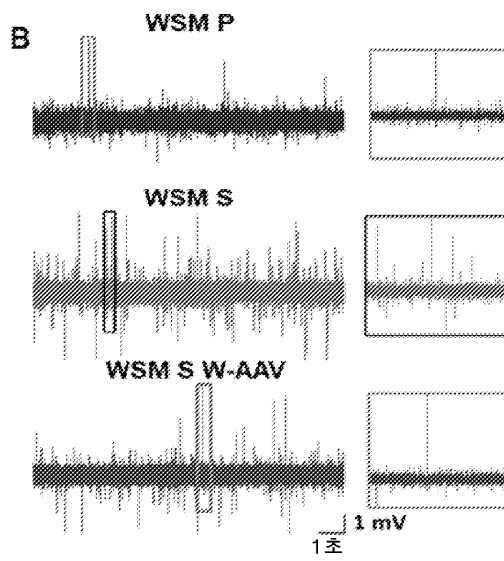
도면14e



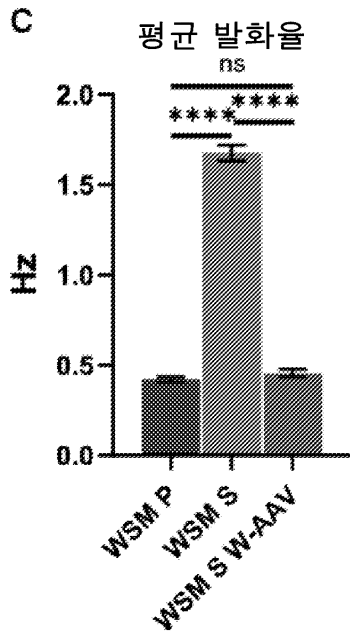
도면15a



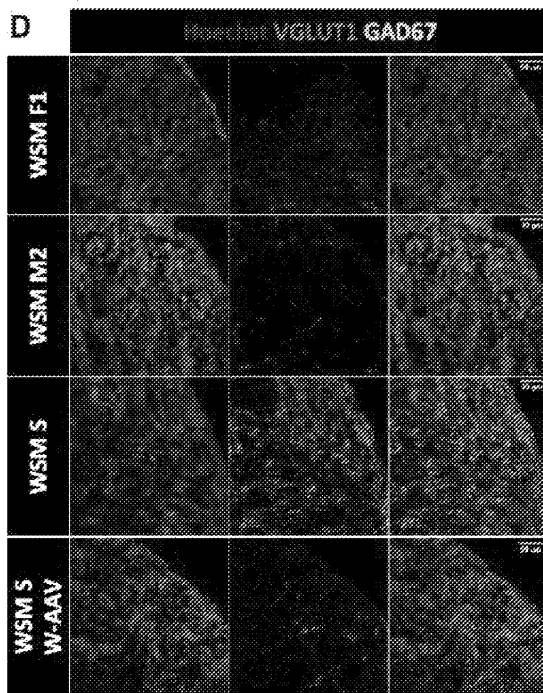
도면15b



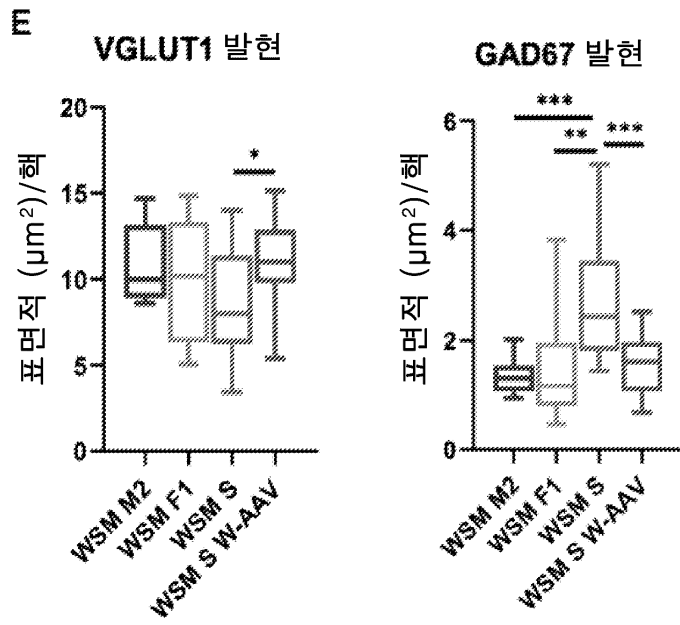
도면15c



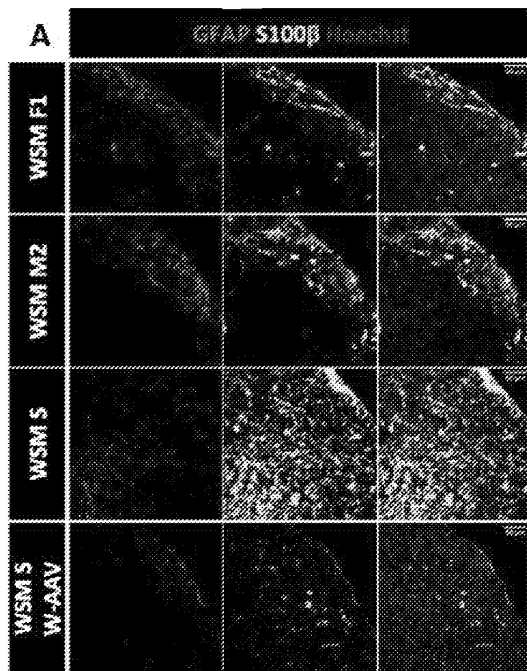
도면15d



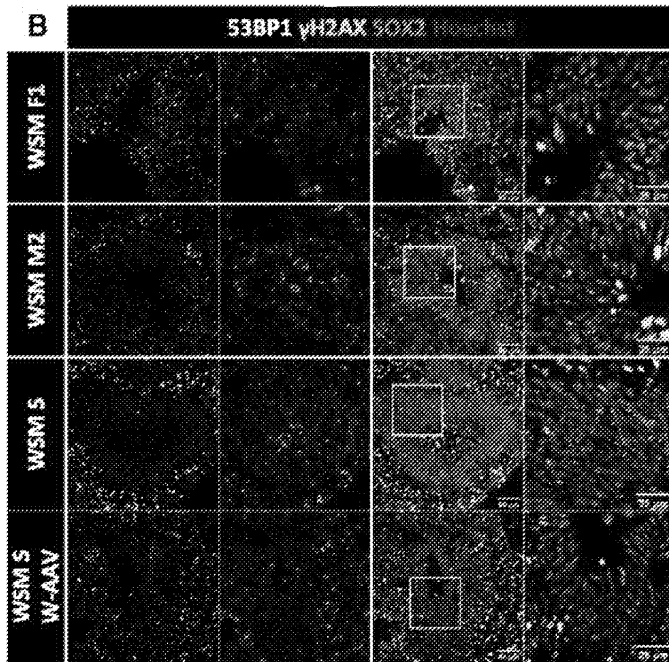
도면15e



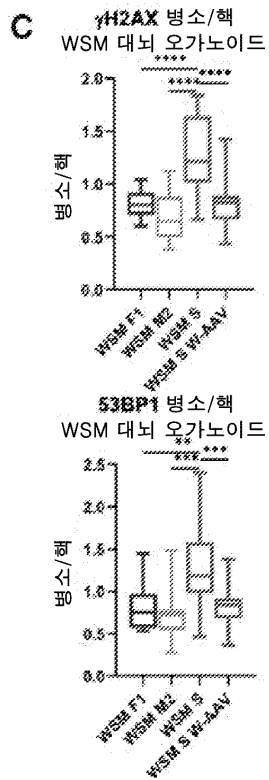
도면16a



도면16b



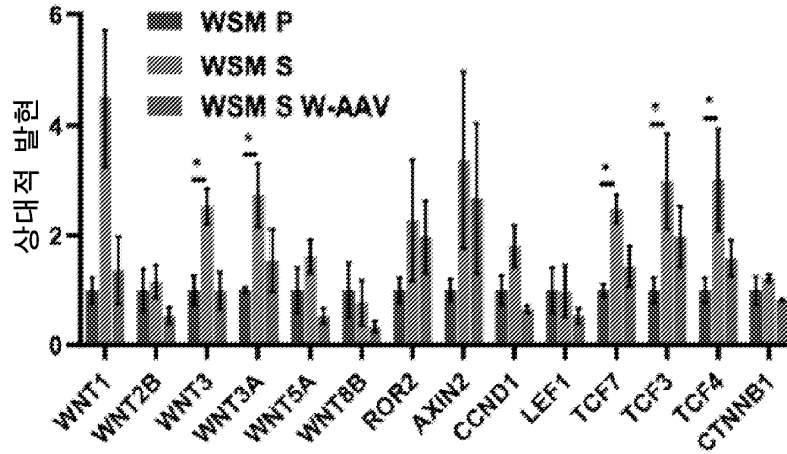
도면16c



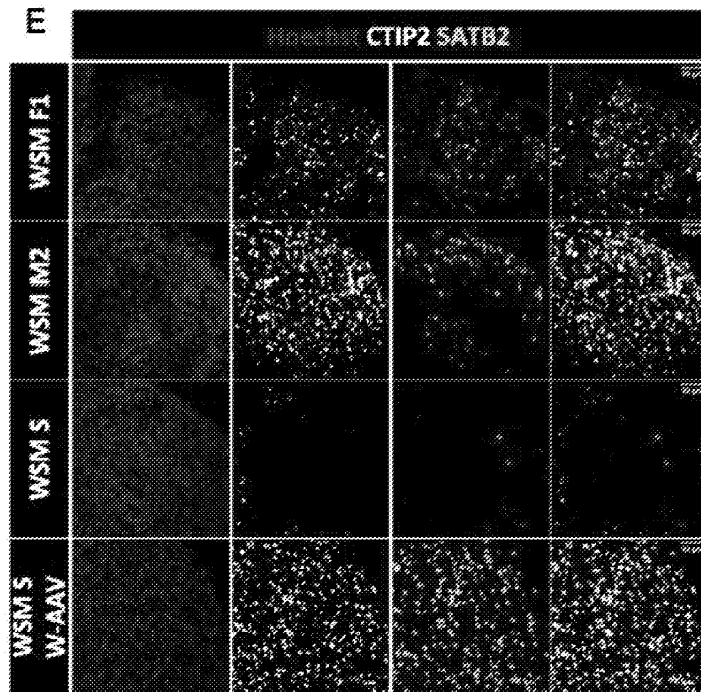
도면16d

D

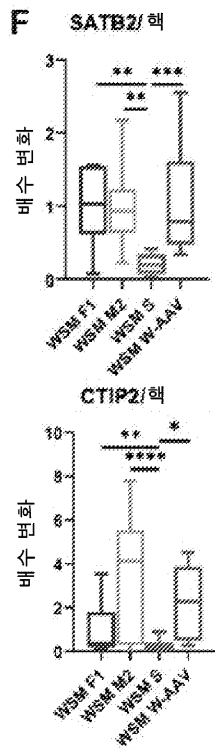
Wnt 표적 유전자 qPCR
WSM 대뇌 오가노이드 10주



도면16e



도면16f



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Yissum Research Development Company of the Hebrew
University of Jerusalem Ltd.
Aqeilan, Rami
Repudi, Srinivas

<120> METHOD FOR THE TREATMENT OF WWOX ASSOCIATED DISEASES

<130> 70-078 PCT

<150> US 63/064,181

<151> 2020-08-11

<150> US 63/167,277

<151> 2021-03-29

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1245

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggcagcgc tgcgctacgc ggggctggac gacacggaca gtgaggacga gctgcctccg 60

ggctgggagg agagaaccac caaggacggc tgggtttact acgccaatca caccgaggag 120

aagactcagt gggaacatcc aaaaactgga aaaagaaaac gagtggcagg agatttgcca 180

tacggatggg aacaagaaac tgatgagaac ggacaagtgt tttttgttga ccatataaat 240

aaaagaacca cctacttggg cccaagactg gcgtttactg tggatgataa tccgaccaag 300

ccaaccacc ggcaagata cgacggcagc accactgcca tggaaattct ccagggccgg 360

gatttcactg gcaaagtggg tgtggtcact ggagctaatt caggaatagg gttcgaacc 420

gccaaagtctt ttgccctcca tgggtcacat gtgatcttgg cctgcaggaa catggcaagg 480

gcgagtgaag cagtgtcacg ctttttagaa gaatggcata aagccaaggt agaagcaatg 540

accctggacc tcgctctgct ccgtagcgtg cagcattttg ctgaagcatt caaggccaag 600

aatgtgcctc ttcattgtct tgtgtgcaac gcagcaactt ttgctctacc ctggagtctc 660

accaaagatg gcttggagac cactttcaa gtgaatcacc tggggcactt ctacctgtc 720

cagctcctcc aggatgtttt gtgccgctca gctcctgcc gtgtcattgt ggtctcctca 780

gagtccacc gatttacaga tattaacgac tccttgggaa aactggactt cagtcgctc 840

tctccaacaa aaaacgacta ttgggcgatg ctggcttata acaggtccaa gctctgcaac 900

atcctcttct ccaacgagct gcaccgtgc ctctccccc gcggggtcac gtcgaacgca 960

gtgcatcctg gaaatatgat gtactccaac attcatcgca gctggtgggt gtacacactg 1020

ctgtttacct tggcagagcc ttccaccaag tccatgcaac agggagctgc caccaccgtg 1080

tactgtgctg ctgtcccaga actggagggt ctgggagga tgtacttcaa caactgctgc 1140

cgctgcatgc cctcaccaga agctcagagc gaagagacgg cccggaccct gtgggcgctc 1200

agcgagaggg tgatccaaga acggcttggc agccagtcgg gctaa 1245

<210> 2

<211> 414

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Leu Arg Tyr Ala Gly Leu Asp Asp Thr Asp Ser Glu Asp
 1 5 10 15

Glu Leu Pro Pro Gly Trp Glu Glu Arg Thr Thr Lys Asp Gly Trp Val
 20 25 30

Tyr Tyr Ala Asn His Thr Glu Glu Lys Thr Gln Trp Glu His Pro Lys
 35 40 45
 Thr Gly Lys Arg Lys Arg Val Ala Gly Asp Leu Pro Tyr Gly Trp Glu
 50 55 60

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

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

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

 Val Val Ser Ser Glu Ser His Arg Phe Thr Asp Ile Asn Asp Ser Leu
 260 265 270
 Gly Lys Leu Asp Phe Ser Arg Leu Ser Pro Thr Lys Asn Asp Tyr Trp

aaaccgcaa gtcttttgcc ctccatgggtg cacatgtgat cttggcctgc aggaacatgg 600

 caagggcgag tgaagcagtg tcacgcattt tagaagaatg gcataaagcc aaggtagaag 660
 caatgacctt ggacctcgct ctgctccgta gcgtgcagca ttttgctgaa gcattcaagg 720
 ccaagaatgt gcctcttcat gtgcttgtgt gcaacgcagc aacttttgct ctaccctgga 780
 gtctcaccaa agatggcctg gagaccacct ttcaagtga tcatctgggg cacttctacc 840
 ttgtccagct ctccaggat gttttgtgcc gctcagctcc tgcccgtgtc attgtggtct 900
 cctcagagtc ccatcgattt acagatatta acgactcctt gggaaaactg gacttcagtc 960
 gcctctctcc aacaaaaaac gactattggg cgatgctggc ttataacagg tccaagctct 1020

 gcaacatcct ctctccaac gagctgcacc gtcgcctctc cccacgcggg gtcacgtcga 1080
 acgcagtga tcttggaat atgatgtact ccaacattca tcgcagctgg tgggtgtaca 1140
 cactgtgttt taccttggcg aggctttca ccaagtccat gcaacaggga gctgccacca 1200
 ccgtgtactg tgctgctgtc ccagaactgg agggctctggg agggatgtac ttcaacaact 1260
 gctgccgctg catgccctca ccagaagctc agagcgaaga gacggccccg accctgtggg 1320
 cgctcagga gaggctgac caagaacggc ttggcagcca gtcgggctaa gtggagctca 1380
 gagcggatgg gcacacacac ccgcctgtg tgtgtccct cacgcaagt ccagggtgg 1440

 gcccttcca aatgtccctc caacacagat ccgcaagagt aaaggaaata agagcagtca 1500
 caacagagtg aaaaatctta agtaccatg ggaagcaggg aattcctggg gtaaagtatc 1560
 acttttctgg ggctgggcta ggcataggct tctttgcttt ctgggtgggg cctgtttgaa 1620
 agtaaaaacc tcttgggtgt gtaggttccg tatctccctg gagaagcacc agcaattctc 1680
 tttcttttac tgitatagaa tagcctgagg tcccctctc ccatccagct accaccacgg 1740
 ccaccactgc agccgggggc tggccttctc ctacttaggg aagaaaaagc aagtgttcac 1800
 tgctccttgc tgcattgac caggagataa ttgtttcatt catctgacc aagactgagc 1860

 cagcttagca actgctgggg agacaaatct cagaacctt tcccagccag tgaggatgac 1920
 agtgacacc agagggagta gaatacgcag aactaccagg tggcaaagta ctgtcatag 1980
 actcctttgc taatgctatg caaaaaattc tttagagatt ataacaaatt tttcaatca 2040
 ttccttagat acctgaaag gcaggaaggg aagcgtatat acttaagaat acacaggata 2100
 ttttgggggg cagagaataa aacgttagtt aatcccttg tctgtcaatc acagtctcag 2160
 ttctcttgc ttacattgt acttaaacct cctgctgtgc ctcgcatcct atgcttaata 2220
 aaagaacatg cttgaatac a 2241

<210> 4

<211> 572

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

actacaaacc gagtatctgc agagggccct gcgtatgagt gcaagtgggt tttaggacca 60

ggatgaggcg gggtaggggt gcctacctga cgaccgaccc cgaccactg gacaagcacc 120

caacccccat tccccaaatt gcgcatcccc tatcagagag ggggagggga aacaggatgc 180

ggcgaggcgc gtgcgactg ccagcttcag caccgaggac agtgccttcg cccccgctg 240

gcggcgcgcg ccaccgccc ctcagcactg aaggcgcgct gacgtcactc gccggtcccc 300

cgaaactcc cttccccgc caccttggtc ggtccgcgc cgccgccggc ccagccggac 360

cgaccacgc gaggcgcgag ataggggggc acgggcgcga ccatctgcgc tgcggcgccg 420

gcgactcagc gctgcctcag tctcggtgg gcagcggagg agtcgtgtcg tgcctgagag 480

cgcagctgtg ctctgggca ccgcgagtc ccccccgcg gctcctggcc agaccacccc 540

taggaccccc tgccccagt cgcagccttc ga 572

<210> 5

<211> 6284

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgctc 60

gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc tgcggcaatt cagtcgataa ctataacggt cctaaggtag 180

cgatttaaat acgcgctctc ttaagtagc cccgggacgc gtcaattgac taciaaccga 240

gtatctgcag agggccctgc gtatgagtgc aagtgggttt taggaccagg atgaggcggg 300

gtgggggtgc ctacctgacg accgaccccc acccactgga caagcaccca accccattc 360

cccaaattgc gcatccccta tcagagaggg ggaggggaaa caggatgcgg cgaggcgcgt 420

gcgactgcc agcttcagca ccgcgacag tgccttcgcc cccgctggc ggcgcgcgcc 480

accgccgct cagcactgaa ggcgcgctga cgtcactgc cggcccccg caaactcccc 540

ttcccggcca ctttggtcgc gtccgcgccg ccgccggccc agccggaccg caccacgca 600

ggcgcgagat aggggggcac gggcgcgacc atctgcgctg cggcggcgc gactcagcgc 660

tgctcagtc tgcggtgggc agcggaggag tcgtgtcgtg cctgagagcg cagctgtgct 720

cctgggcacc gcgcagtcgc ccccccgggc tctggccag accacccta ggaccctg 780
 ccccaagtcg cagccttcga gctagcgttt aaacttaagc ttggtaccgg ccgctgcggc 840
 cctcgagcaa gctggctagt taagctatca acaagtttgt acaaaaaagc aggctttaa 900
 ggaaccaatt cagtcgagaa ttcgtcgact ggatccggta ccgaggagat ctgccgccg 960

 gatcgccga gtgcgcaggc gtgagcggtc gggccccgac gcgcgagggt ctgcttggga 1020
 gcgggagtgga gttcctgagc gaggggacc ggccagcgggc gatagggggg ccaggctcct 1080
 ccacagtcag ccatggcagc gctgcgctac gcggggctgg acgacacgga cagtgaggac 1140
 gagctgcctc cgggctggga ggagagaacc accaaggacg gctgggttta ctacccaat 1200
 cacaccgagg agaagactca gtgggaacat ccaaaaactg gaaaaagaaa acgagtggca 1260
 ggagatttgc cataccgatg ggaacaagaa actgatgaga acggacaagt gtttttgtt 1320
 gaccataaa ataaaagaac cacctacttg gacccaagac tggcgtttac tgtggatgat 1380

 aatccgacca agccaaccac ccggcaaaga tacgacggca gcaccactgc catggaatt 1440
 ctccagggcc gggatttcac tggcaaagtg gttgtgtca ctggagctaa ttcaggaata 1500
 gggttcgaaa ccgccaagtc ttttgcctc catggtgcac atgtgatctt ggcctgcagg 1560
 aacatggcaa gggcgagtg agcagtgca cgcattttag aagaatggca taaagccaag 1620
 gtagaagcaa tgacctgga cctcgtctg ctccgtagcg tgcagcattt tgctgaagca 1680
 ttcaaggcca agaattgtcc tcttcatgtg ctgtgtgca acgcagcaac ttttgcctc 1740
 ccctggagtc tcaccaaaga tggcctggag accaccttc aagtgaatca tctggggcac 1800

 ttctacctg tcagctcct ccaggatgtt ttgtgccgt cagctcctgc ccgtgtcatt 1860
 gtggtctcct cagagtccca tcgatttaca gatattaacg actccttggg aaaactggac 1920
 ttcagtcgc tctctcaac aaaaaacgac tattggcgga tgctggctta taacaggtcc 1980
 aagctctgca acatcctctt ctccaacgag ctgcaccgtc gcctctcccc acgccccgctc 2040
 acgtcgaacg cagtgcattc tggaaatag atgtactcca acattcatcg cagctggtgg 2100
 gtgtacacac tgctgtttac cttggcgagg cctttacca agtccatgca acagggagct 2160
 gccaccaccg tgiactgtgc tgctgtccca gaactggagg gtctgggagg gatgtacttc 2220

 aacaactgct gccgctgcat gccctacca gaagctcaga gcgaagagac ggccccgacc 2280
 ctgtggggcg tcagcgagag gctgatccaa gaacggcttg gcagccagtc cggctaagtg 2340
 gagctcagag cggatgggca cacacaccg ccctgtgtgt gtccctcac gcaagtcca 2400
 gggctgggccc ctttcaaat gtccttcaa cacagatccg caagagtaa gaaaataaga 2460
 gcagtcacaa cagagtgaat aatcttaagt accaatggga agcagggaat tctggggta 2520
 aagtatcact tttctggggc tgggctagc ataggtctct ttgctttctg gtggtgcct 2580

gtttgaaagt aaaaacctgc ttgggtgta ggttccgtat ctcctggag aagcaccagc 2640

 aattctcttt ctttactgt tatagaatag cctgaggtcc cctcgtcca tccagctacc 2700
 accacggcca ccaactgcagc cgggggctgg ctttctcta cttaggaag aaaaagcaag 2760
 tgttactgc tccttgctgc attgatccag gagataattg tttcattcat cctgaccaag 2820
 actgagccag cttagcaact gctggggaga caaatctcag aacctgtcc cagccagtga 2880
 ggatgacagt gacaccaga gggagtagaa tacgcagaac taccaggtgg caaagtactt 2940
 gtcatagact ctttgctaa tgctatgcaa aaaattcttt agagattata acaaattttt 3000
 caaatcattc cttagatacc ttgaaaggca ggaagggaag cgtatatact taagaataca 3060

 caggatattt tggggggcag agaataaac gttagttaat cccittgtct gtcaatcaca 3120
 gtctcagttc tcttgcttc acattgtact taaacctcct gctgtgcctc gcacacctatg 3180
 cttataaaaa gaacatgctt gaatatcatt gaggtttaac ccgctgatca gcctcgactg 3240
 tgccctctag ttgccagcca tctgtgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg 3300
 aaggtgccac tccactgtc ctttctaata aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 3360
 gtaggtgtca tctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 3420
 aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa 3480

 ccagatctc tcttaaggta gcacgagat ttaaatagg gataacagg taatggcgcg 3540
 ggccgcagga acccctagt atggagtgg cactcctc tctgcgcgt cgctcgtca 3600
 ctgagcccg gcgacaaag gtcgccgac gcccggtt tgcccggcg gcctcagtga 3660
 gcgagcgagc gcgcagctgc ctgcaggggc gcctgatgcg gtattttctc cttacgcatc 3720
 tgtgcggtat ttacaccgc atactcaaa gcaacatag tacgcgcct gtagcggcgc 3780
 attaagcgc gcgggtgtg tggttacgc cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct 3840
 agcgcgcgt ctttctgtt tcttccttc ctttctgccc acgttcgcgc getttcccg 3900

 tcaagctcta aatcgggggc tcctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga 3960
 ccccaaaaaa cttgatttgg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt 4020
 ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg 4080
 aacaacactc aaccctatct cgggctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc 4140
 ggctatttgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaacaaaat 4200
 attaacgttt acaattttat ggtgcactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt 4260
 aagccagccc cgacaccgc caacaccgc tgacgcgcc tgacgggctt gtctgtccc 4320

ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggagc tgcatgtgtc agaggttttc 4380
 accgtcatca ccgaaacgcg cgagacgaaa gggcctcgtg atacgcctat ttttataggt 4440
 taatgtcatg ataataatgg tttcttagac gtcaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg 4500
 cggaaccctt atttgtttat ttttctaaat acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca 4560
 ataacctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt 4620
 ccgtgtcgcc cttattccct tttttcgggc attttgctt cctgtttttg ctcaccaga 4680
 aacgctgggt aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga 4740

 actggatctc aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat 4800
 gatgagcact tttaaagtcc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca 4860
 agagcaactc ggtcgcgcga tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt 4920
 cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac 4980
 catgagtgat aacactgcgg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct 5040
 aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga 5100
 gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac 5160

 aacgttgccg aactattaa ctggcgaact acttactcta gttcccggc aacaattaat 5220
 agactggatg gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc tccggctgg 5280
 ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggtg tcattgcagc 5340
 actggggcca gatggaagc cctcccgtat cgtagtatc tacacgacgg ggagttaggc 5400
 aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg 5460
 gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta 5520
 atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgacaaaa tccttaacg 5580

 tgagttttcg ttccactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 5640
 tccttttttt ctgcgcgtaa tctgtgtctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcgg 5700
 ggtttgtttg ccgatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaaactg gcttcagcag 5760
 agcgcagata ccaataactg tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa 5820
 ctctgtagca ccgctacat acctcgtctt gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag 5880
 tggcgataag tcgtgtctta ccgggttga ctcaagacga tagttaccgg ataagggcga 5940
 gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 6000

 cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttccc aaggagagaaa 6060
 ggccgacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc 6120
 agggggaaac gcctggatc tttatagtc tgctcgggtt cgccacctct gacttgagcg 6180

tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gacccatgg aaaaacgcca gcaacgcggc 6240
cttttacgg ttctggcct ttgctggcc tttgctcac atgt 6284