

RNA-Seq 기술의 발달 (Bulk RNA-seq, Single cell RNA-seq and Spatial RNA-seq)

RNA Sequencing을 통해서 differential gene expression, slicing variant, Indel mutation, gene fusion과 같은 정보를 얻을 수 있다. Genomic을 연구하는 툴로 가장 활발히 진행되고 있는 것은 전통적인 bulk RNA-seq, single cell RNA-seq부터 최근에는 spatial RNA-seq으로 발전하고 있다. Bulk RNA-seq은 시료내의 세포의 평균값을 분석하는 것이라면, single cell RNA-seq은 시료 내의 세포 각각을 개략적으로 들여다보고 몇 종류의 다른 세포타입이 존재하는지 파악한 뒤 각각의 세포타입에 대한 평균값을 따로 분석한다. [1] Spatial RNA-seq은 조직의 공간적 정보와 함께 유전자 발현값을 분석 할 수 있다.

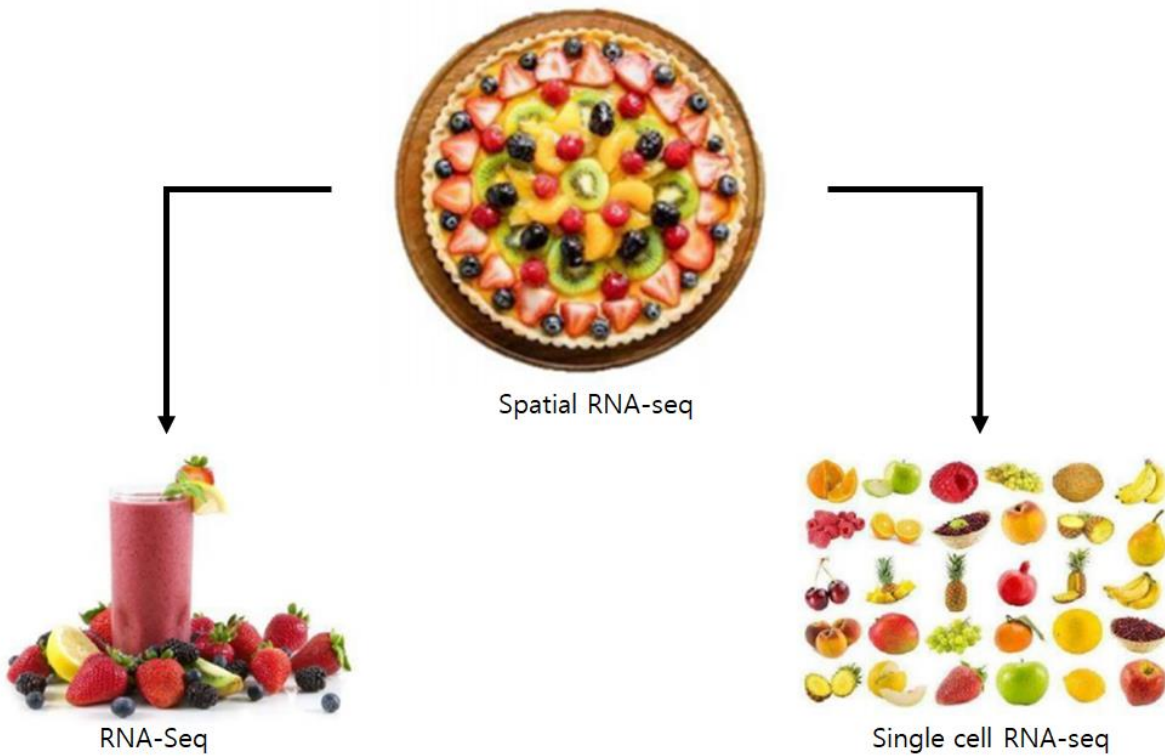


그림 1.

RNA-Seq (Bulk RNA-Seq)

RNA-Seq은 2000년대에 개발된 NGS (next generation sequencing)기술을 기반으로 수만개의 유전자를 동시에 측정하여 생물학을 이해하는데 널리 사용되는 기술 중 하나이다. Bulk RNA-seq은 라이브러리를 제작하는 방법에 따라서 크게 두가지 방법으로 나뉜다. 첫번째는 mRNA만을 이용하여 라이브러리를 제작하는 방법이고, 두번째는 total RNA에서 rRNA만을 제거하고 라이브러리를 제작하여 분석하는 방법이다.

mRNA를 분석하는 방법은 library 구성방법에 따라서 두가지로 나뉘는데, 가장 많이 사용되는 Quantseq 3' mRNA-seq이 있다. 이 방법은 mRNA의 DEG (Differentially expressed genes)분석에 초점을 맞춘 분석방법이다. 3'

UTR 부근의 mRNA를 짧게 library를 제작하여 SE75bp로 유전자의 발현분석을 목적으로 진행하는 실험 방법이다. 이 방법은 단순하고 비용이 저렴한 장점이 있다. 또 다른 방법은 total RNA에서 Poly-A selection을 통해서 mRNA만을 collecting하여 분석하는 방법이다. 앞서 설명한 Quatntseq 3'mRNA-seq과 비교했을때 추가적으로 alternative splicing, point mutations, novel transcripts, gene fusions 등을 분석 할 수 있다. Total RNA에서 rRNA만을 제거하고 분석하는 방법은 mRNA 뿐만 아니라 long non coding RNA까지 추가적으로 분석할 수 있다

Single Cell RNA-Seq

한 개의 세포에서 수천개의 유전자를 동시에 검출할 수 있는 single cell RNA-seq 기술은 생물학적 정보를 비약적으로 넓혀주었다. 기존의 한 개의 세포타입, 조직, 유전자에 집중하던 연구방식의 한계를 벗어나 세포타입별로 모든 정보를 한번에 획득하여 통합하여 분석하는 일이 가능해지고 있다.

단일세포를 분석하는 다양한 기술이 있지만, 그 중에서도 Droplet-based Microfluidics 방식이 가장 많이 활용되고 있다. Droplet-based Microfluidics 방식은 세포와 oligo-dT primer로 코팅된 bead가 각각 한 개씩 들어간 GEM을 만들어 그 안에서 poly(A) tail이 달린 mRNA를 붙잡는 방법이다[2,3] 이 방법을 기반으로 출시된 대표적인 플랫폼은 10X Genomics의 Chromium system이 있다.

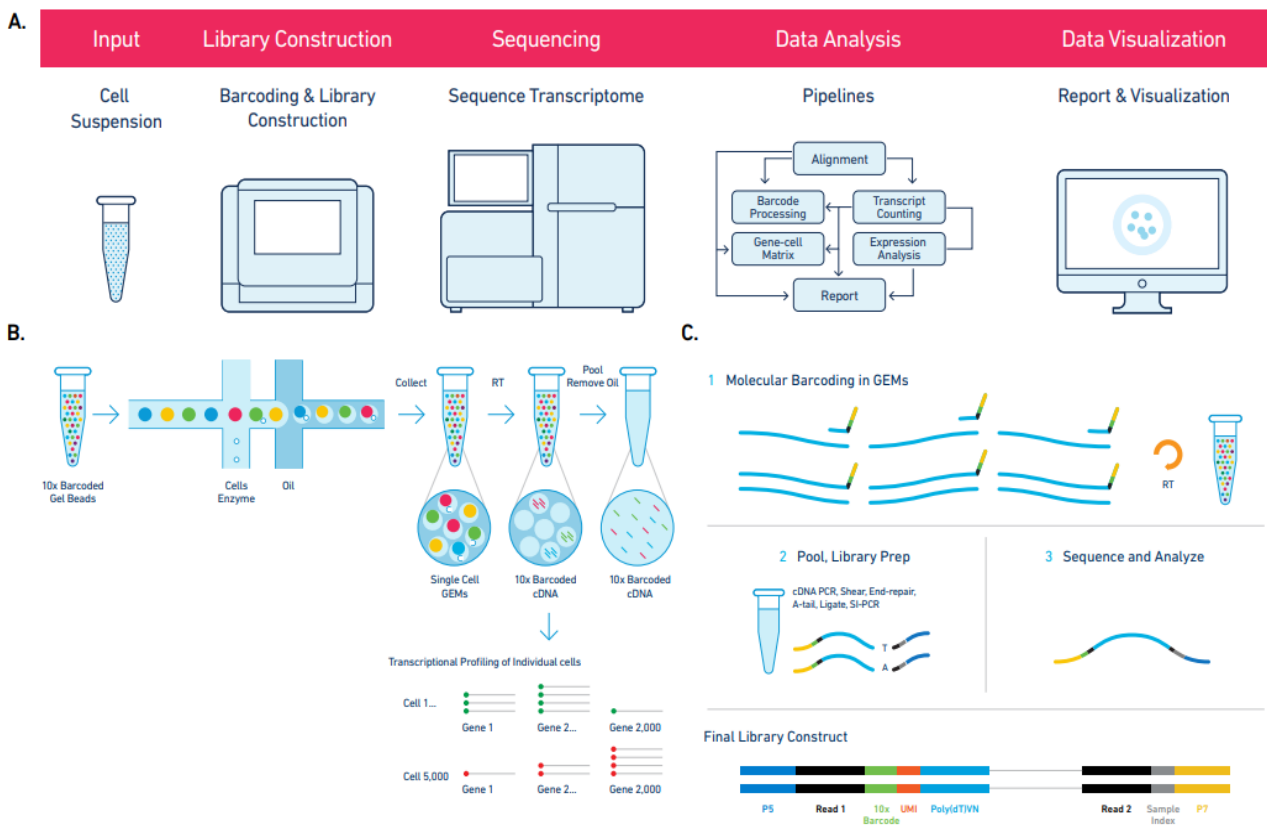


그림2. Chromium Single cell 3' Solution (a) Workflow schematic overview. (b) Formation of GEMs (c) v2 Single Cell Assay schematic overview. [4]

Spatial RNA-Seq

Spatial RNA-seq은 RNA-seq의 global transcriptional 분석과 in situ hybridization의 장점을 결합한 최신 기술이다. 특히 종양은 여러가지 cell type으로 복잡한 구조로 구성되어 있어 종양 연구를 위해서는 Spatial한 정보가 필요하다. 이러한 복잡한 종양의 공간구조를 풀면 종양세포의 communication이나 면역세포와의 관계, 약물 내성, 전이 등에 대해서 이해 할 수 있다. 종양유전자를 이해하고 효과적인 치료방법을 설계하기 위해서는 공간적 유전자 발현을 연구하는 것이 필수적이다.

상업화된 Spatial RNA-seq 기술은 현재 두가지가 있다. 10x Genomics 와 Nanostring의 플랫폼인데 여기에서는 Nanostring사의 GeoMx DSP system에 대해서 설명하고자 한다.

GeoMx Digital Spatial Profiler (DSP)는 2019년도에 출시되었으며, Nanostring사의 digital molecular barcode technology를 기반으로 타겟 상보적 시퀀스 probe와 unique DSP 바코드를 UV cleavage linker로 연결된 기술이다. 유리 슬라이드에 올려진 FFPE나 fresh한 조직에 barcode-labeled probe를 target mRNA에 hybridization 시킨다. 또한 fluorescent marker (fluorescently conjugated antibody)로 조직을 염색하여 "geography" 정보를 획득 할 수 있다. 그 후에는 조직에서 region of interest (ROI)를 선택하고, 선택한 부분에 UV를 조사하게 되는데 이 때, UV cleavage linker로 연결된 바코드가 release 되면 collection 하여 library를 제작하여 NGS 로 sequencing을 진행 한다.(그림3)

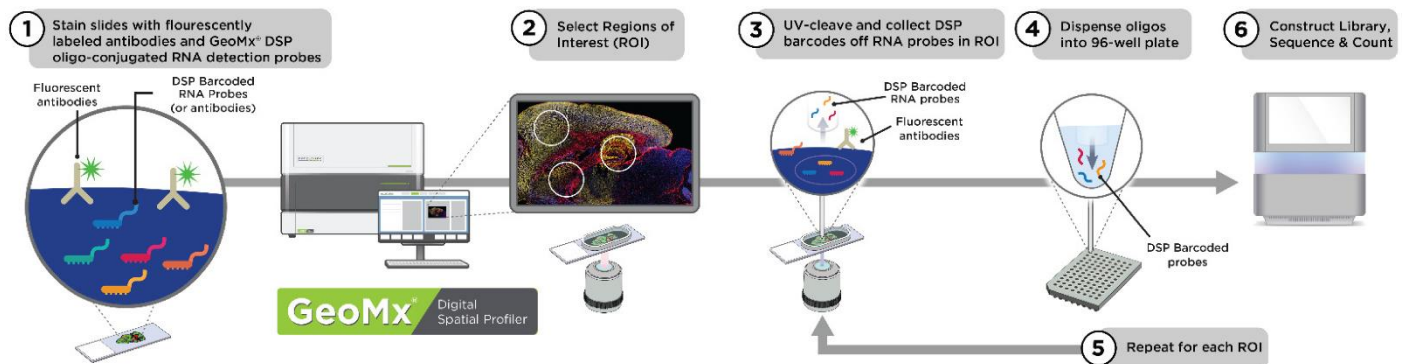


그림3. GeoMx workflow with NGS readout

Spatial RNA-seq은 cancer의 Tumor microenvironment를 연구하는데 유용한 ROI(region of interest) 선택 방법을 소개하고자 한다. 아래의 내용은 2020년 5월에 Nanostring사에서 발표된 WHITEPAPER의 내용으로 작성되었다.

GeoMX DSP System으로 CTA (Cancer transcriptome Atlas)패널을 이용하여 실험은 진행되었으며 샘플은 MSI CRC sample과 MSS CRC sample을 이용하였으며, AOI는 Segment, Contour, Rare cell 방법으로 선택하였다. (그림 4)

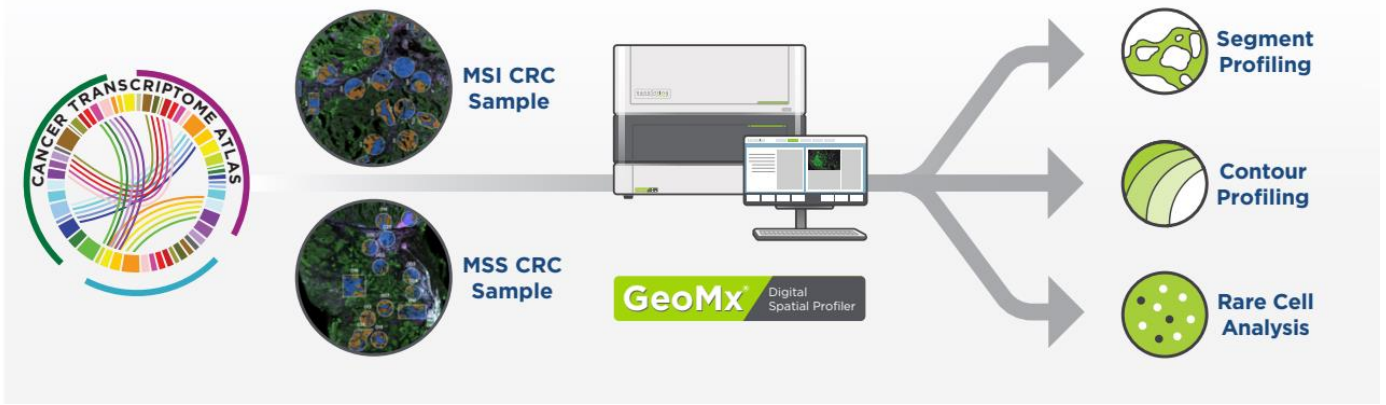


그림 4. Profiling Colorectal Cancer subtypes with CTA on GeoMx DSP

첫번째 방법은 Segmentation profiling이다(그림 5). 각각의 샘플에서 ROI (Region of interest)를 선택 한 후 PanCK positive (Tumor)와 PanCK negative (Tumor microenvironment)로 나누어서 분석하였다. Segmentation profiling 방법을 이용하면 Tumor와 Tumor와 인접한 Tumor microenvironment 연구가 가능하다.

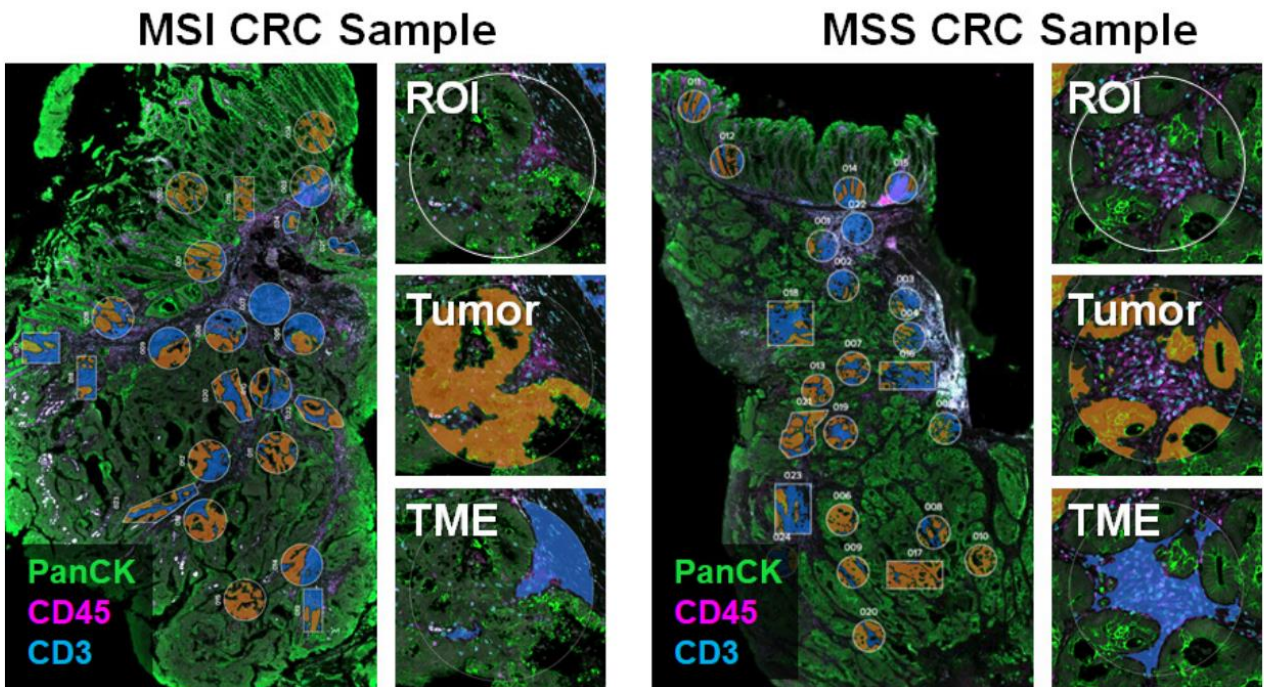


그림 5. Segmentation Strategy to profile MSI and MSS patient samples. Regions of interest shown on whole slide with example regions selected as well as UV illumination path for tumor (orange) or TME (blue) segments.

종양의 구조가 어떻게 변화하는지 잘 이해하기 위해서 invasive margin (IM)으로 분석하였다. Tumor와 microenvironment를 IF(Immunofluorescence)를 이용하여 경계선을 정의하고, tumor 방향과 반대 방향으로 5 um 간격으로 나눠서 각각의 샘플에 대해서 분석하였다. 그림 6에서 ROI selection 한 방법을 보여주고 있다.

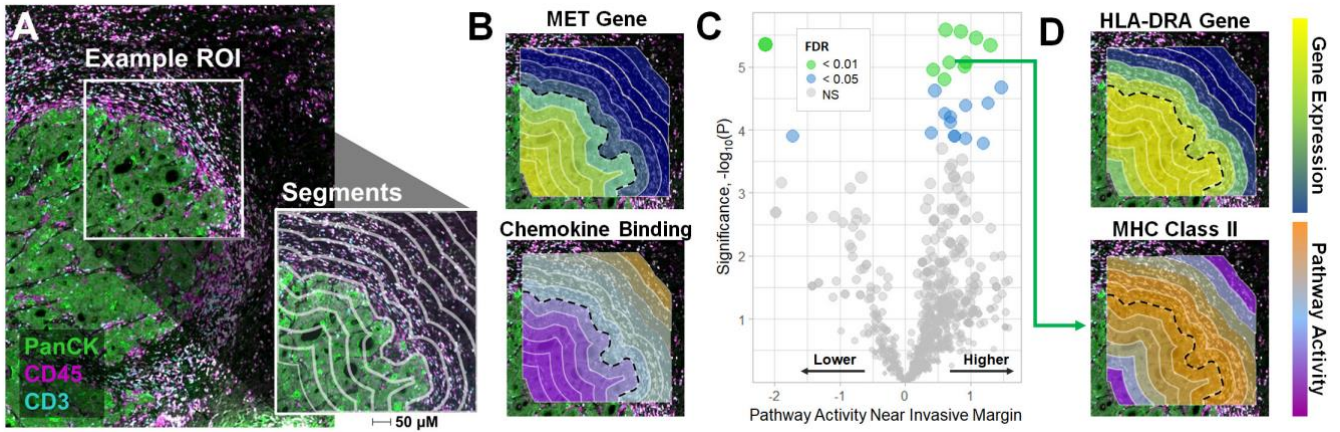


그림 6: Deep Exploration of Pathway Signaling Across the Tumor Invasive Margin. A) Invasive margin profiling segmentation strategy and illuminated regions collected B) Examples of genes and pathways associated with location across the invasive margin MET gene and Chemokine Binding pathway C) Volcano plot showing pathways associated with expression at the invasive margin (* FDR < 0.05, ** < 0.01) D) Examples of genes and pathways with highest expression at the invasive margin including HLA-DRA and MHC Class II Presentation

면역종양학 연구에서 주요한 부분은 종양안에서 특성 세포타입의 발현을 보는 것 이다. 여기에서는 종양안에서의 T-Cell을 연구했다. 그림7에서처럼 T-cell marker (CD3)을 이용하여 Stoma 영역 혹은 Tumor 영역에서 rare하게 발현되는 T-Cell과 T-Cell 주변 영역을 분석하였다.

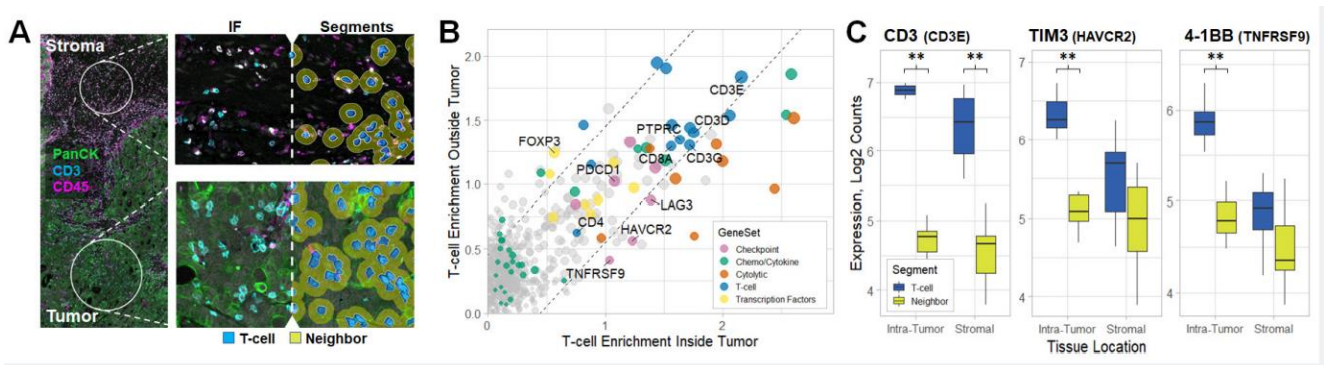


그림7. Expression of T-cell specific activation markers within the Tumor A) ROI selection strategy to study the impact of T-cell invasion into a CRC sample B) Expression of specific genes are shared amongst T-cells (within dashed lines) or enriched within specific compartments of the tumor C) Examples of marker expression for CD3E or HAVCR2 (TIM3).

이바이오젠에서는 다양한 RNA-seq 서비스를 제공하고 있다. Standard한 RNA-seq 부터 droplet based 방식의 10X Genomics의 Chromium 장비를 이용한 single cell RNA-seq를 수행하고 있으며, Nanostring사의 GeoMx DSP system을 이용하여 transcription와 Spatial한 분석이 가능한 GeoMX Spatial Transcriptome service도 진행하고 있다.

이바이오젠 홈페이지(www.e-biogen.com)를 방문하면 다양한 RNA-seq에 대한 정보를 확인 할 수 있다.

<참고문헌>

1. Single-cell RNA sequencing 기술동향. <http://www.ibric.org/myboard>. 2018, T28
2. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*_2015, 161(5), 1202-1214
3. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*_2015, 161(5), 1187-2101
4. 10X GENOMICS Website <https://www.10xgenomics.com/>
5. Presented at American Association of Cancer Research Conf., Atlanta, GA, March (2019)
6. The Cancer Transcriptome Atlas: Deep Spatial Characterization of the Colorectal Cancer Tumor Microenvironmen, MAY 2020