

GeoMx, 유전자와 단백질의 Multiomics 분석을 한번에!

Multiomics 는 유전체, 전사체, 단백질체, 대사체 등 다양한 레벨에서 생성된 데이터를 통합적으로 분석하는 것을 말한다. 기존 기술에선 각각을 분석하여 그 결과를 정합하는 방식으로 분석을 진행하였다. 그러나 최근 기술들이 발전하면서 해당 결과를 한번에 얻을 수 있는 실험 방법들이 개발되고 있다. 그 중 Spatial genomics 분석은 현대 생명과학에서 혁명적인 발전을 이루고 있는 분야 중 하나로, 생물체 내에서 유전자 및 단백질 발현의 공간적 분포를 프로파일링하는 공간 생물학 플랫폼이다. 본 글에서는 Spatial Profiling 기술인 GeoMx® Digital Spatial Profiler system 의 여러 패널들을 소개하고 각 패널들을 이용한 연구들을 소개하고자 한다.

1. Spatial Profiling 분석 기술

Spatial Profiling 는 IHC, IF 와 같은 Spatial 정보와 유전정보를 동시에 얻을 수 있는 분석이다. 그 중 Spatial Transcriptome 분석은 조직에서 Whole Transcriptome 을 분석하여, 조직 또는 세포의 특정 영역에서 일어나는 생물학적 현상을 밝힐 수 있는 Spatial Profiler 이다. 이는 조직의 다양한 구조와 기능을 이해하는 데 적용될 뿐만 아니라, 질병의 병리생리학적 메커니즘을 탐구하는 데에도 상당한 잠재력을 가지고 있다. Spatial genomics 분석은 시간과 공간에 따른 유전자 및 단백질 발현의 변화를 추적하고 진화적 유용성을 탐구함으로써 생물체의 발전에 관한 새로운 통찰력을 제공한다. 이를 통해 생명체의 복잡한 조직 구조와 그 안에서의 유전자 및 단백질 발현을 동시에 분석하여 각 영역의 상호작용을 깊이 이해할 수 있게 하였다. [1]

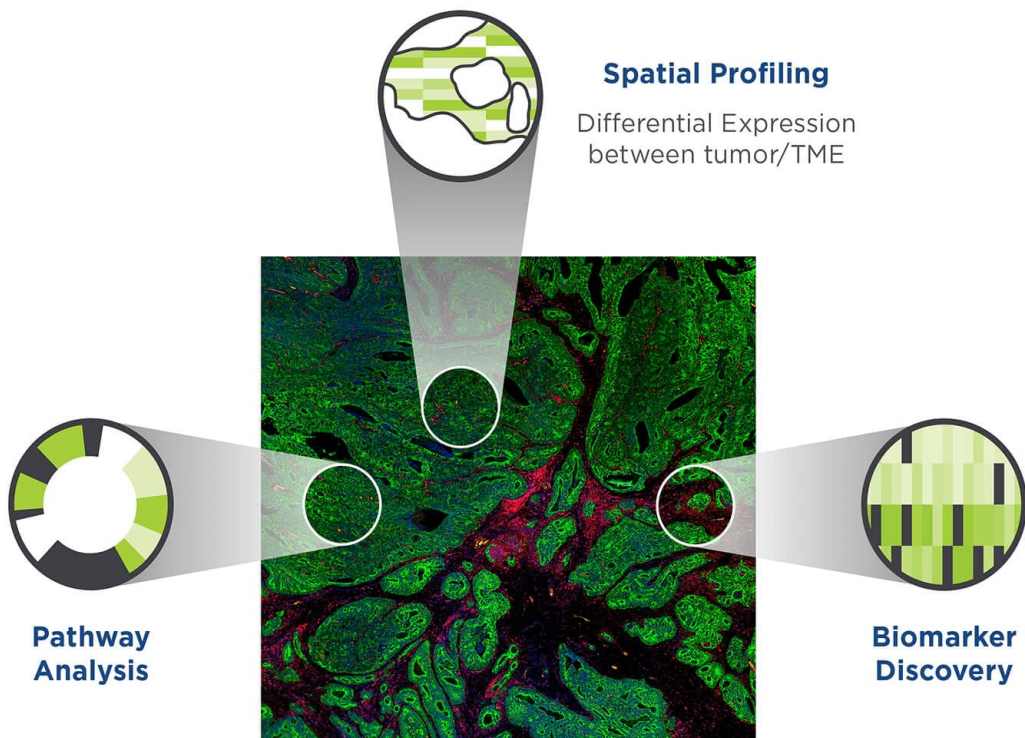


그림 1. The most flexible spatial solution- GeoMx® DSP

Nanostring 에서는 효율적인 Spatial genomics 분석을 위해 계속적으로 새로운 패널 제작을 제작하여 종양을 포함한 많은 연구분야에서 GeoMx 를 활용하고 있다. RNA 와 protein 에 Barcoding kit 를 제작하는 RNA Barcoding Service (RBS)와 Protein Barcoding Service (PBS) 서비스를 통해 커스터마이징이 가능하며, 레디메이드 패널은 전사체 프로파일링 분석용 6 개와 단백질 프로파일 분석용 3 개를 보유하고 있다. [7]

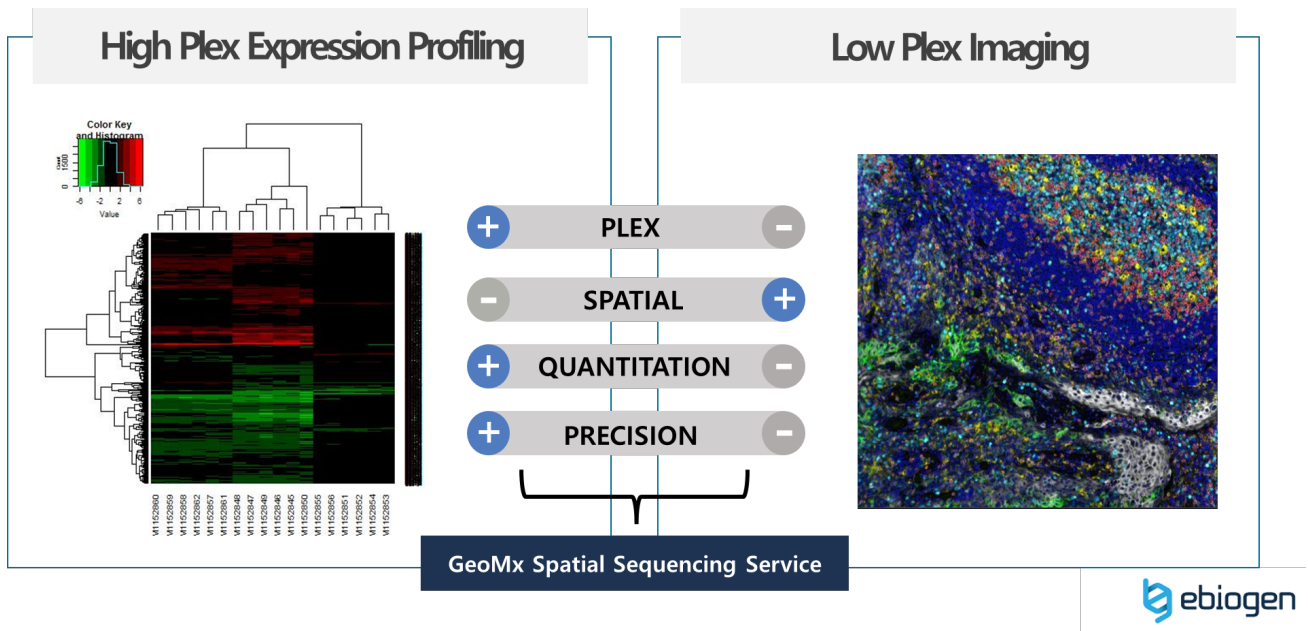


그림 2. “High Plex Expression Profiling”방법과 “Low Plex Imaging” 방법의 장단점을 보완한 “GeoMx Spatial Sequencing Service”

2. GeoMx Transcriptomics

GeoMx DSP System 은 조직 관심있는 위치에서 유전자 발현을 분석할 수 있어, 조직의 복잡한 구조와 기능을 이해하는 데 매우 유용하다. Spatial transcriptomics 는 다양한 분석과 패널을 활용하여 전사체 발현을 분석하여 이를 map 위에 표현할 수 있다. [2] 이 서비스는 해상도 높은 공간적 이미지와 높은 sequencing depth 를 분석하는 tool 인 GeoMx® Digital Spatial Profiler (DSP)를 제공하고 있다. GeoMx® Digital Spatial Profiler (DSP) 시스템은 조직 내 다양한 유전자 발현을 정확하고 다루기 쉬운 데이터 분석 도구로 연구자가 결과를 해석하고 시각화할 수 있다. GeoMx DSP 는 종양 면역학, 조직 분화, 신경과학 등 다양한 분야에서 응용될 수 있으며, 질병의 발생 및 진행 메커니즘을 이해하는 데 중요한 역할을 한다. 이러한 서비스는 연구 및 의학 분야에서의 유용성을 지속적으로 증명하고 있으며, 조직 내 유전자 발현의 공간적 동적을 탐구하는 데 있어 필수적인 도구로 인정받고 있다. [3] 이바이오젠에서는 WTA, CTA, IPA 패널을 서비스하고 있으며, 분석원리와 sample 준비방법은 이전에 자사에서 2021 년 6 월과 2022 년 6 월에 발행한 기술노트를 참고 바란다. [8,9]

Name	Info
Whole Transcriptome Atlas (WTA)	18,000 개(Human)/ 20,000 개(Mouse) 이상의 유전자에 대한 발현 분석가능 Human, mouse
Cancer Transcriptome Atlas (CTA)	1,800 개의 cancer 관련 유전자에 대한 발현 분석 Human
TCR Profiling Add-On	WTA, CTA 와 함께 사용하여 T Cell Receptor 까지 분석 가능 Human
Caine Cancer Atlas	Caine 의 cancer 와 면역에 연관된 RNA 1962 개와 400 개의 다양한 DNA 합성등에 연관된 RNA 의 발현 분석 Caine
Immune Pathways Panel	종양 면역 작용에 연관된 RNA 96 개를 Target 함. Human

Table 1. GeoMx transcriptome panel

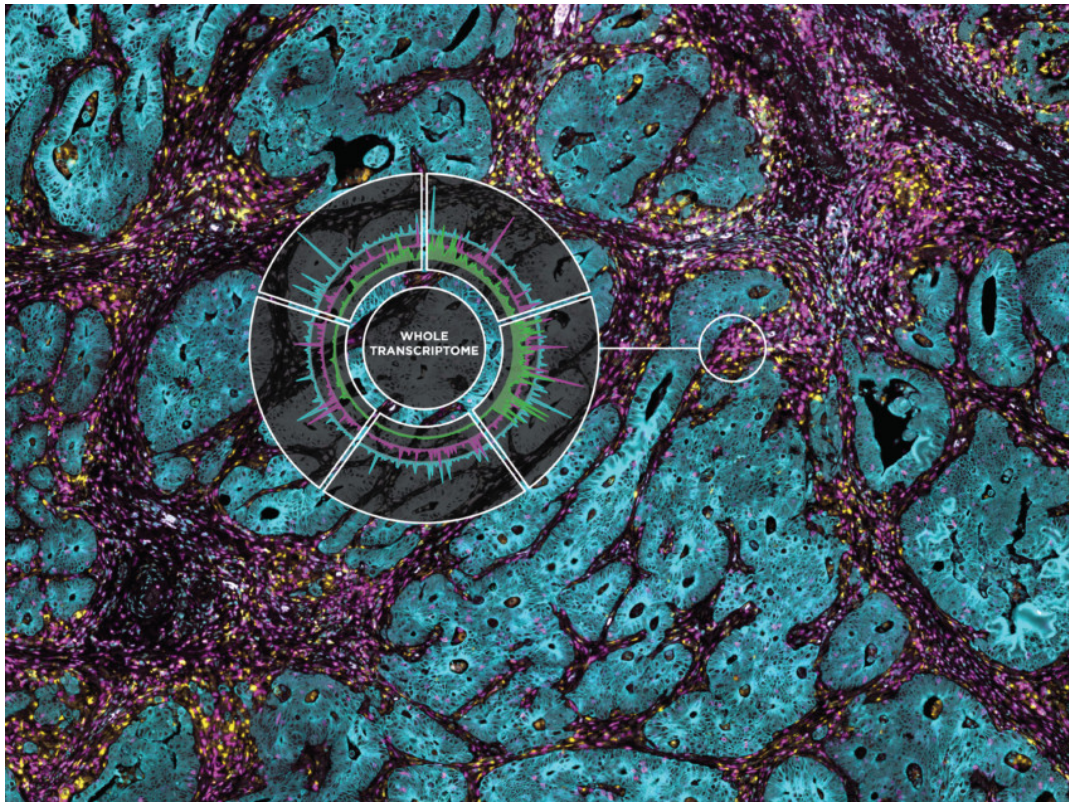


그림 3. GeoMx transcriptome 분석의 개념의 이미지

- WTA(Whole Transcriptome Atlas) 패널이 활용된 학술논문

이 논문에서는 생검으로 진단하기 힘든 삼중음성유방암(TNBC)를 진단하기 위한 마커연구에 WTA 패널을 활용하였다. 유방암은 일반적으로 프로그스테론 수용체(PR) 및 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2)의 발현값을 기준으로 진단한다. 그러나 TNBC 의 경우 해당 유전자들의 검사 결과에선 모두 음성을 보이거나 유방암에 걸린 케이스를 말한다. 해당 논문은 암세포와 암줄기세포(암으로 발전하기 전단계 세포)에서 과발현되는 것으로 알려진 Carbonic Anhydrase IX(CAIX)의 발현이 높은 군과 낮은 군으로 나누어 비교 분석하여 발현값의 차이를 보이는 유전자들을 선별하였다.

암조직을 tissue microarray(TMA)로 제작한 뒤 하여 PanCK 로 염색하여 면역세포 영역과 암조직 영역을 segmentation 하였고 암조직 영역과 면역세포 영역을 정상조직과 비교분석 하였다. (그림 4.) DEG 분석에서는 CAIX 발현이 높은 군과 낮은 군을 비교하여 분석했을 때 종양 영역에서 4 개의 상향 조절 유전자(CD68, HIF1A, pan-melanocyte, and VSIR)와 기질(stromal) 영역에서 9 개의 하향 조절 유전자(CD86, CD3E, MS4A1, BCL2, CCL5, NKG7, PTRC, CD27 및 FAS)를 확인했다. 단백질 level 에서 검증을 위해 4 개의 유전자를 선별하여 IHC 를 진행했다. 결과적으로 IHC 에서 종양 침투성 대식세포가 TNBC 의 진행과 종양 보호에 BCL2 및 림프구의 관여함 예측 수 있었다. 선별한 단백질 발현은 TNBC 의 다른 예후와 관련이 있었다. 종양의 높은 HIF-1α 및 CD68 발현값은 생존 저하와 관련이 있는 반면, 기질(stromal) 내의 높은 수준의 CD3 및 BCL2 발현값은 환자의 생존을 향상과 관련이 있었다. 또한, 고밀도 CD68은 종양 등지와 tumour Microenvironment(TME) 모두에서 별도로 생존기간을 예측했다. 테스트한 4 개의 마커 중 HIF-1α 와 CD68 발현값은 CAIX 발현값과 유의한 정도의 상관관계를 보인 반면, BCL2 발현값은 CAIX 발현값과 유의한 정도의 음의 상관관계를 보였다. [2]

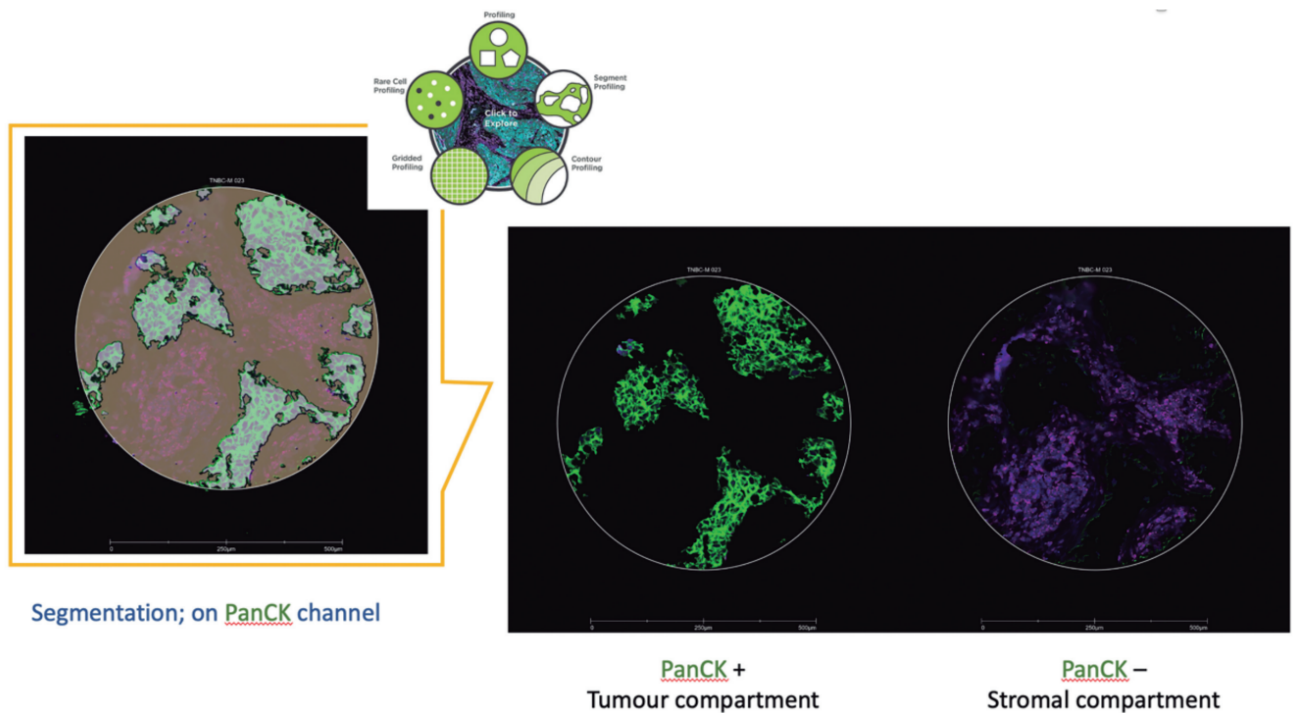


그림 4. The tissue morphology was delineated by the immunofluorescence detection of PanCK (epithelial cytokeratin, green), CD45+ (immune cells, magenta) proteins and SYTO13 (nuclei, blue) (B).

- CTA(Cancer Transcriptome Atlas) 패널이 활용된 학술논문

CTA 는 1800 여개의 cancer 관련 유전자의 발현 분석을 위한 패널이다. 다음은 CTA 로 소아암 조직검사관련 연구를 진행한 논문을 소개하고자 한다. 림프절 전이 (LNM) 예측에 대한 논쟁이 있는 소아 T1 CRC 의 네 가지 사례를 사용한 이 연구하여 Hagitt Line (HL)로부터의 거리에 따른 유전자 발현 변화를 분석하고 LNM 의 잠재적인 분자 위험 요소를 확인하는 것을 목표로 했다. 본 논문은 공간적으로 순차적인 분자 변화를 식별하기 위해 머리, HL, 근위 줄기 영역 (HL 에서 300-1000 μm), 원위 줄기 영역 (HL 에서 1500-2000 μm)을 포함한 영역을 ROI 로 선정하여 분석했다. 그 결과 대조군 선종과 비교하여 소아 T1 CRC 의 머리, 근위 줄기 및 원위 줄기 영역 사이에 전반적인 유전자 발현 변화를 보여주었다. 또한 LNM-음성 T1 CRC 와 비교하여, LNM-양성 T1 CRC 는 B2M, HLA-B 및 HLA-E 와 같은 면역 관련 경로에 관여하는 유전자의 발현이 근위 stem 영역에 비해 원위 stem 영역에서 유의하게 하향 조절됨을 보여주었다.

결과적으로 논문에선 면역 관련 경로와 관련된 유전자 발현 변화를 고려하여 HL 에서 최소 2000 μm 여유롭게 줄기의 위내시경 절제 크기를 제안하고 있다. 체구가 작은 소아들의 위험부담을 덜어주시기 위한 의미있는 연구였다. [10]

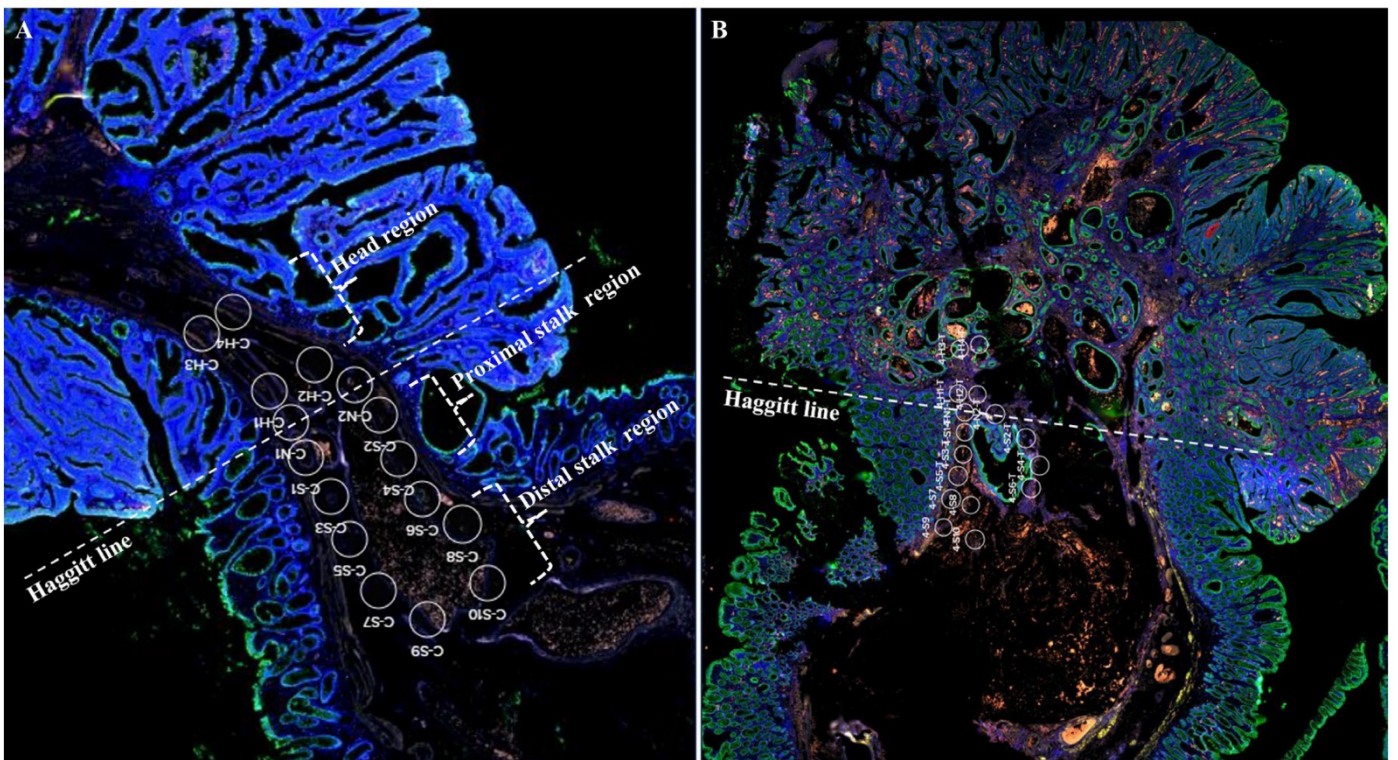


그림 5. Regions of interest (ROIs) were selected for molecular profiling analysis from the slides of a pedunculated tubular adenoma with low-grade dysplasia as a control (A) and pedunculated T1 colorectal cancers (B).

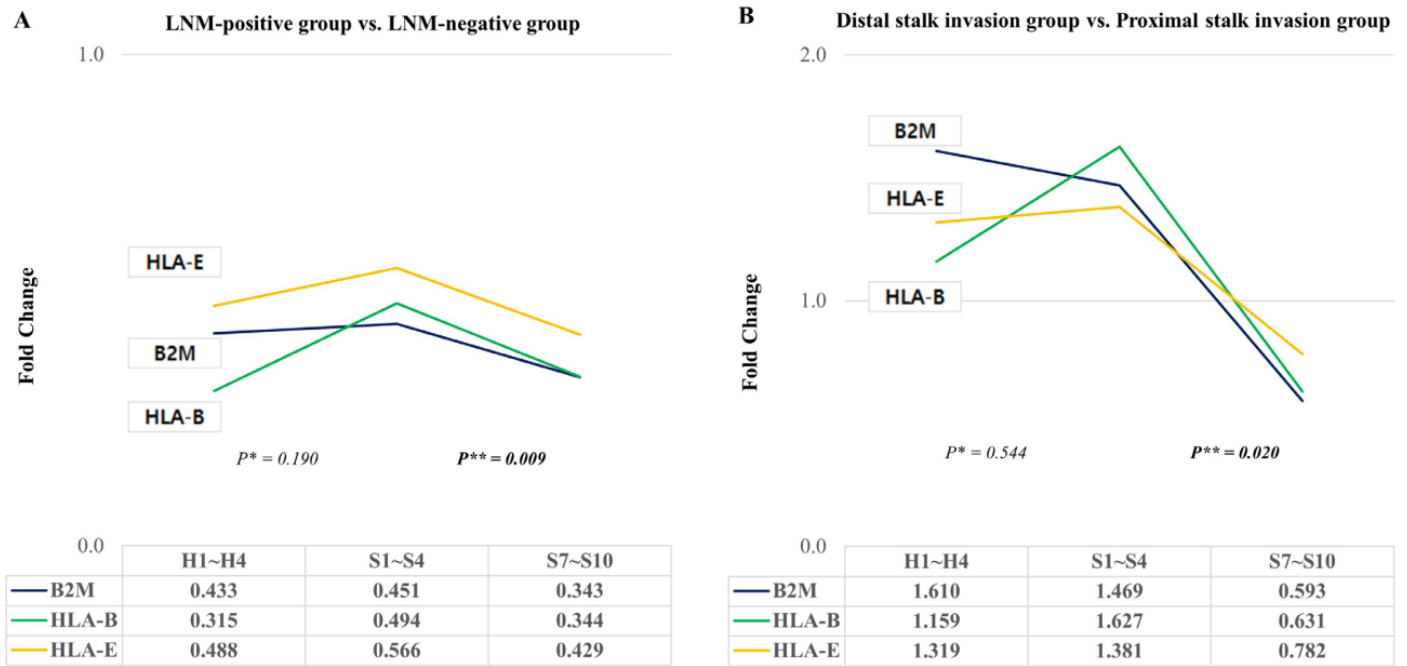


그림 6. HLA-E, B2M, and HLA-B 의 ROI(ROIs : H1-H4, S1-S4, S7-S10)에 따른 발현값의 변화량.

3. GeoMx Proteomics 분석

Spatial Proteomics 는 조직 내에서 단백질의 공간적 분포와 상호작용을 연구하는 기술이다. 이 기술은 조직 내 원하는 위치에서 단백질 발현을 분석하여 조직의 복잡한 구조와 기능을 이해하는 데 도움이 된다. GeoMx Spatial proteomics 서비스 역시 다양한 기술과 플랫폼을 제공하여 공간적 단백질 발현을 분석할 수 있다. 이 서비스는 단백질 분자의 위치 및 양을 분석하여, 단백질 간 상호작용을 및 조직 내 단백질 네트워크를 이해하는 데 활용되고 있다. Spatial proteomics 는 종양 생물학, 면역학, 조직 발달 등 다양한 분야에서 응용될 수 있으며, 질병의 발생 및 진행 메커니즘을 연구하는 데 중요한 역할을 한다.

Nanostring 사에서 제공하는 Spatial proteomics 의 여러 패널 중 이바리오젠에선 IO Proteome Atlas (IPA)를 서비스하고 있다. GeoMx IO Proteome Atlas (IPA)는 종합적인 면역학 연구를 위해 초고 다중 단백질체 데이터를 제공하기 위해 설계되었다. 패널에 사용된 항체는 Abcam 에서 IHC 및 기타 다양한 단일플렉스 방법을 통해 유효성을 검증했으며, 또한 NanoString 사에서 멀티플렉스로도 검증하였다. 멀티플렉스 검증은 FDA 승인을 받은 TMA 를 사용하여 완료되었으며, 이 TMA 는 29 개의 조직 유형을 대표하는 77 개의 정상 인간 코어와 26 개의 조직 유형을 대표하는 54 개의 인간 종양 코어로 이루어져 있다. 모든 패널 항체는 특이성과 감도를 확인하기 위해 90 개 이상의 인간 세포 라인을 대상으로 멀티플렉스로 검증되었다. [4]

Name	Info
Human IO Proteome Atlas	약 570 개 이상의 단백질 대한 발현 분석가능 Human
Immuno-Oncology Protein Panels	96 개의 immuno-oncology 관련 단백질 발현 분석 Human, mouse
Neuroscience Protein	96 개의 neuroscience 관련 단백질 발현 분석 Human, mouse

Table 2. GeoMx proteome panel

- **IPA(Immuno-Oncology Proteome Atlas) 패널이 활용된 학술논문**

이 논문은 여성이 가장 많이 걸리는 유방암의 진단 기준인 HER2 에 대해 소개한다. HER2 양성(HER2+) 유방암의 치료의 표준은 anti-HER2 기반으로한 neoadjuvant 화학 요법인데, 그 중 선호되는 요법은 TCHP(docetaxel, carboplatin, trastuzumab, pertuzumab)이다. 이러한 환자의 약 절반만이 병리학적으로 명확한 PCR 양성 반응을 보이고 있기 때문에 대체 치료 전략 개발을 위해 PCR 양성 또는 음성반응의 원인이 되는 생물학을 이해할 필요가 있었다. 이를 위해 GeoMx® Digital Spatial Profiling (DSP)의 IPA(Immuno-Oncology Proteome Atlas) 패널을 사용하여 초기 HER2+/ER 종양의 기질 및 종양 내 구획에 대한 단백질체학적 분석을 수행했다. **(그림 6)** 초기 HER2+(IHC3+)/ER- 종양의 종양 및 stroma niches 의 단백질 발현 양상을 분석했다. TCHP 에 반응하여 PCR 을 양성을 받은 4 개, 음성이 나온 군 4 개, 반응이 나오지 않은 4 개 샘플, 총 12 개의 샘플을 분석했다.

TCHP 에 대한 반응과 관련된 특징을 식별하고 치료 후 잔류 암 부담이 있는 샘플의 면역 미세환경을 평가하기 위해 선형 혼합 모델을 사용하여 단백질의 차별적 발현을 분석하였다. Immuno-oncology Proteome Atlas (IPA)는 단백질 풍부도의 공간 분포를 탐사할 수 있는 능력을 보여준다. 이 시험적 분석은 HER2+ 유방암에서 표준 치료 요법인 TCHP 에 대한 유리한 반응과 관련된 단백질 특징에 대한 기초적 통찰을 제공한다. 이러한 특징은 예후 또는 예측 지표를 제공하고 결과의 잠재적인 치료 대상을 식별할 수 있으며, 이는 neoadjuvant TCHP 의 혜택을 극대화하기 위해 활용될 수 있다. [11]

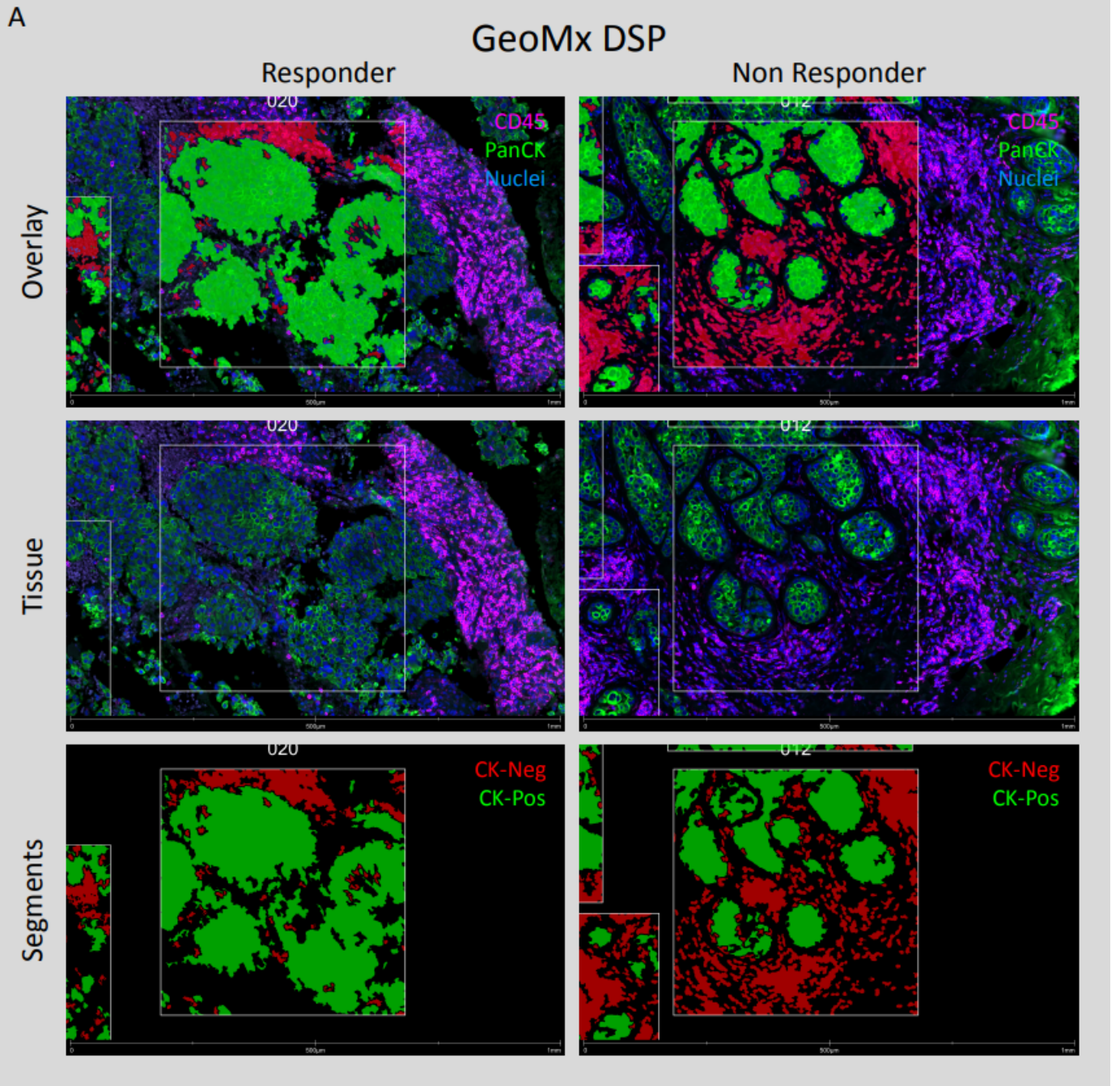


그림 6. A) GeoMx images with fluorescent morphology markers for CD45 (magenta), PanCK (green) and nuclei (blue). Samples were segmented on the GeoMx DSP for PanCK positive (green) and PanCK negative (red) areas of interest (AOI).

4. GeoMx Multiomics (Proteogenomics)

Spatial Multiomics 는 Spatial Proteomics 와 Spatial Transcriptomics 의 결합으로, 조직 내에서 단백질과 mRNA 의 동시 발현을 분석한다. 이는 두 가지 유형의 생물학적 정보를 동시에 얻을 수 있기 때문에 단독으로 사용되는 Spatial Proteomics 나 Spatial Transcriptomics 보다 더 많은 정보를 제공합니다. GeoMx 기기를 사용하는 GeoMx Multiomics 는 제공되는 IPA 패널을 WTA 혹은 패널과 함께 사용하여 transcriptomics 분석과 Proteomics 분석을 동시에 진행할 수 있게 해준다.

GeoMx 분석은 UV 에 분해되는 linker 를 가진 바코드를 회수하여 분석을 진행한다. 따라서 두가지 패널이 동시에 처리된 slide 에 선택된 ROI 에 UV 로 노출되어 인덱싱 바코드를 방출한 다음 Illumina Next-Generation Sequencer(NGS) 시스템에서 시퀀싱하고 계수하여 개별 RNA 와 단백질의 발현을 각각 ROI 로 매핑한다. **(그림 8)** 바코드 정보를 이용하여 발현값을 분석하기 때문에 IPA 와 WTA 패널을 동시에 분석할 수 있게 되는 것이다.[7]

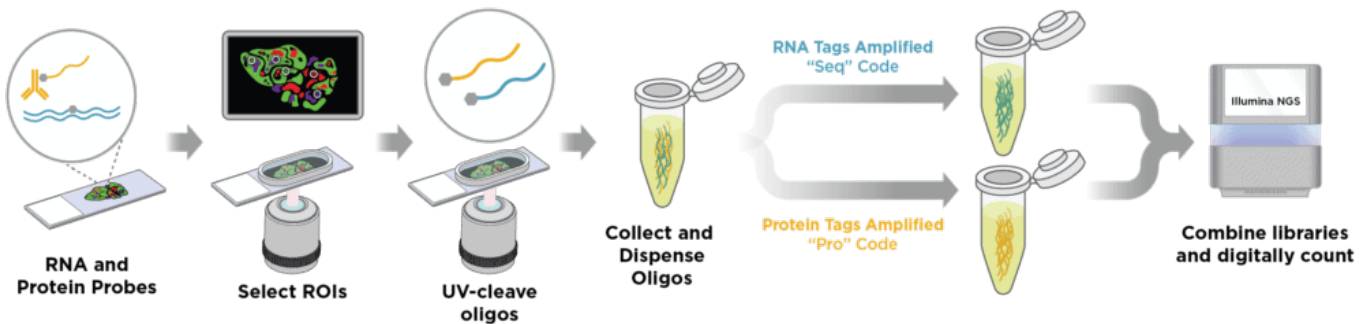


그림 8 Probe chemistry 를 사용한 GeoMx Multiomics 실험 과정

5. E-biogen's GeoMx Service info

이바이오젠은 2021 년도부터 국내연구자에게 GeoMx DSP Service 를 시작했다. Transcriptome 분석 패널인 WTA, CTA 서비스를 시작으로 최근에서 Protein 분석을 위한 IPA 패널도 서비스를 제공하고 있다. 서비스 관련 정보는 아래의 표에서 확인할 수 있다.

	GeoMx Spatial WTA Service	GeoMx Spatial CTA Service	GeoMx Spatial IPA Service
Species	Human, Mouse	Human	Human
Target	Human 18,000개, Mouse 23,000개	Human 1,800개	Human 580개
Data Yield	12AOI 기준, 100reads/um ²	12AOI 기준, 30reads/um ²	12AOI 기준, 200reads/um ²
Sample type	Tissue (FFPE, Tissue Microarray, Fresh frozen, Core needle biopsy)		
Sample size	14.1 X 35.1mm		
Turnaround time	3 weeks after ROI selection		

*WTA (Whole Transcriptome Atlas) / *CTA (Cancer Transcriptome Atlas)/ *IPA(Immuno-Oncology Proteome Atlas)

<참고문헌>

- Rosenbloom, Alyssa, et al. "120 Human immuno-oncology proteome atlas enables a holistic proteomic approach for spatial biology discovery in FFPE tissues." (2023).
- Church, Sarah E., et al. "Translational and clinical applications of the GeoMx digital spatial profiling platform." *Diagnostic Molecular Pathology*. Academic Press, 2024. 767-783.
- Janesick, Amanda, et al. "High resolution mapping of the tumor microenvironment using integrated single-cell, spatial and in situ analysis." *Nature Communications* 14.1 (2023): 8353.
- <https://nanostring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-protein-assays/io-proteome-atlas/>
- Shamis, Suad Ahmad Khalifa, et al. "Spatial transcriptomic analysis of tumour with high and low CAIX expression in TNBC tissue samples using GeoMx™ RNA assay." *Histology and Histopathology: Cellular and Molecular Biology* (2023).
- Frei, Nicola F., et al. "Feasibility Study Utilizing NanoString's Digital Spatial Profiling (DSP) Technology for Characterizing the Immune Microenvironment in Barrett's Esophagus Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues." *Cancers* 15.24 (2023): 5895.
- <https://nanostring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-dsp-overview/>
- https://www.e-biogen.com/board_tech.php?act=view&aid=1333&page=1
- https://www.e-biogen.com/board_tech.php?act=view&aid=888&page=1
- Kwon, Mi Jung, et al. "Potential Molecular Markers Related to Lymph Node Metastasis and Stalk Resection Margins in Pedunculated T1 Colorectal Cancers Using Digital Spatial Profiling: A Pilot Study with a Small Case Series." *International Journal of Molecular Sciences* 25.2 (2024): 1103.
- Chumsri, Saranya, et al. "207 The spatially-resolved proteomic atlas of the tumor immune architecture of HER2-positive breast cancer and response to neoadjuvant anti-HER2 therapy-based chemotherapy." (2023).
- Tanjak, Pariyada, et al. "The KRAS-mutant consensus molecular subtype 3 reveals an immunosuppressive tumor microenvironment in colorectal cancer." *Cancers* 15.4 (2023): 1098.