

Technical Note 2

WT-Ovation™ FFPE System

WT-Ovation™ FFPE System을 이용한 폐조직 FFPE 샘플과 신선동결 샘플의 발현 프로파일링 비교

서론

FFPE(formalin-fixed paraffin embedded) 조직으로부터 추출한 RNA를 이용하여 발현 분석하는 것은 힘들고 어려운 일이었다. 그 이유는 시료 처리 과정과 조직간의 cross-linking을 일으키는 고정과정 fixation, 이 조직들로부터 추출한 핵산의 분해와 같은 지극히 극단적인 조건들 때문이었다. WT-Ovation FFPE System은 심각하게 분해된 한정된 RNA를 증폭함으로써 이와 같은 조건들을 극복하였다. 이 시스템으로 인해 소중한 샘플의 전체적인 유전자 발현분석을 위한 기술적인 한계를 극복할 수 있게 되었으며, 보관하고 있는 대량의 FFPE 샘플과 그와 관련된 임상데이터를 활용할 수 있게 되었다.

FFPE에서 추출한 RNA를 이용해 유전자 발현의 가치를 평가할 때 가장 중요한 고려사항은 이 결과가 생물학적으로 중요한 정보인가를 판단하는 것이다. 이 질문에 대한 답을 위해서, 본 내용에서는 FFPE에서 추출한 RNA와 동일한 조직의 신선동결 샘플(fresh frozen sample)로부터 추출한 RNA의 발현양상을 비교하기 위하여, 폐암조직(human lung tumor)과 정상인접조직(normal adjacent tissue)을 FFPE와 신선동결 샘플(fresh frozen sample)로 만들어, 각각에서 추출한 RNA를 분석하였다.

재료 및 방법

RNA 샘플

암조직과 정상인접조직의 신선동결 샘플과 FFPE 샘플, 각각으로부터 Formapure Kit (Agencourt, Cat. #A33341) 또는 Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen, Cat. # 74106) 를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출하였다.

cDNA 증폭과 Array Hybridization

모든 증폭은 WT-Ovation FFPE System (Code 3400)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 진행하였다. 신선동결 샘플에서 추출한 RNA는 10 ng, FFPE에서 추출한 RNA는 50 ng을 초기샘플로 사용하였다. GeneChip array를 이용한 유전자 발현분석을 위한 샘플 준비는 FL-Ovation cDNA Biotin Module V2(Code 4200)를 이용하였으며, 증폭한 cDNA 5 µg를 사용하였다. 이 제품을 이용하여 fragmentation과 label한 cDNA를 HGU133A 2.0 Affymetrix GeneChip arrays에 적용시켰으며, streptavidin phycoerythrin 과 항체증폭(antibody amplification)으로 염색한 후 제조사의 프로토콜에 따라 스캔하였다. Array 결과는 Expression Console (Affymetrix), BioConductor 1.9 package와

Partek Genomics Suite를 이용하여 분석하였다. 경로(pathway)와 기능적인 분석은 Ingenuity Pathway Analysis software를 이용하였다.

데이터 분석

동결 조직 샘플은 3회 반복, FFPE 조직샘플은 4회 반복실험을 하였다. GeneChip array에서 RMA intensity value와 MAS5 PMA call을 얻었고, pair wise tumor-normal Student t-test와 관련된 p-value는 Bioconductor 1.9를 이용하여 결정하였다. 최소한 4개 Present call 중 3개, 3개 Present call 중 2개의 probe 세트를 present call overlap analysis에 포함시켰다. 유전자들은 FFPE 와 Frozen tissue 모두에서 암조직과 정상조직에서 서로 다른 발현을 나타냈다. 발현의 차이를 나타내는 유전자의 기준은 RMA value가 2배 혹은 그 이상 차이가 나고, pair wise t-test의 p-value가 0.001 이하인 것으로 하였다. 서로 다르게 발현된 유전자는 Ingenuity Pathway Analysis를 이용하여 분석하였다(그림 2).

결과

FFPE 조직에서 추출한 샘플을 이용한 array 결과는 표 1A에 나타났다. 각 샘플의 “present”라고 나타난 probe 세트의 퍼센트를 이용하여 감도를 평가하였다. FFPE 샘플의 present call 수가 신선동결 샘플의 수보다 적음에도 불구하고, 증폭분석은 매우 용이하여, 매우 광범위하게 많은 수의 유전자를 검출하면서 약 50% present mark에 가깝게 분석할 수 있었다. Array 재현성은 표 1B에 정리하였다.

A	Sample Type	N	Avg. SF (sd)	Avg. Bkgd (sd)	Avg. %P (sd)
	Frozen Normal	4	4.2 (0.6)	30.1 (0.6)	66.2 (1.1)
	Frozen Tumor	4	4.9 (1)	30.7 (1)	62.6 (2.8)
	FFPE Normal	4	12.2 (0.6)	29.6 (0.7)	49.9 (1.3)
	FFPE Tumor	4	13 (0.6)	29.5 (0.5)	48.0 (1)

B	Sample Type	Frozen N	Frozen T	FFPE N	FFPE T
	Frozen N	0.99			
	Frozen T	0.85	0.97		
	FFPE N	0.80	0.69	0.99	
	FFPE T	0.77	0.82	0.89	0.99

표 1. A. Affymetrix HG-U133A 2.0 array performance metrics. Listed are the number of arrays (N), Scaling Factor (SF), Background (Bkgd), and Percent of Present calls (%P) with standard deviation listed in parenthesis (sd) for each value. B shows the array average Pearson correlation matrix, demonstrating the high level of reproducibility between technical replicates.

FFPE 샘플의 present call probe 세트는 신선동결 샘플에서도 동일하게 검출되었지만, 신선동결 샘플에서 보다 많은 present call probe 세트가 검출되었다. FFPE 샘플에서 RNA 분해의 가능성과 신선동결 샘플에서 보다 많은 present call이 나타날 것이라는 것은 예상되었던 결과이다(그림 1).

FFPE 샘플에서 몇 개의 유전자 발현이 특이하게 관찰되었지만 전반적인 발현 패턴에는 영향을 주지 않았다.

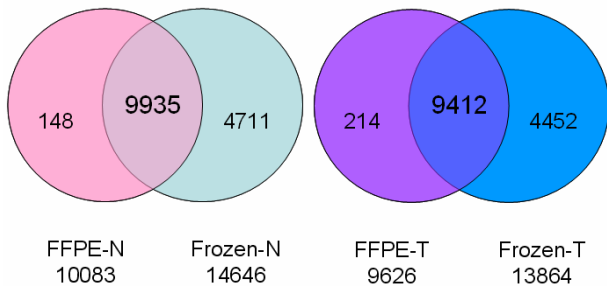


그림 1. Venn diagram of concordance of present calls between FFPE and Frozen-sample for both tumor (T) and normal (N) sample sets. Total number of present calls is on the bottom, the middle number in the circle overlap corresponds to concordant calls, and present calls unique to each subgroup are in the circles above its respective name.

그림 2에서는 Venn diagram으로 암조직과 정상조직 사이에 다르게 발현되는 유전자를 정리하였다. 신선동결 샘플에서 다르게 발현된 50% 이상의 유전자들은 FFPE 샘플에서도 동일하게 검출되었다. 결과 선별 기준은 p-value는 0.001 이하, differential expression value는 2배 이상으로 하였다. 이렇게 서로 다르게 발현된 유전자들을 확인하기 위해서 정상조직과 암조직에서 4회 반복으로 실험하였으며, 이 레벨은 거의 모두 일치하였다.

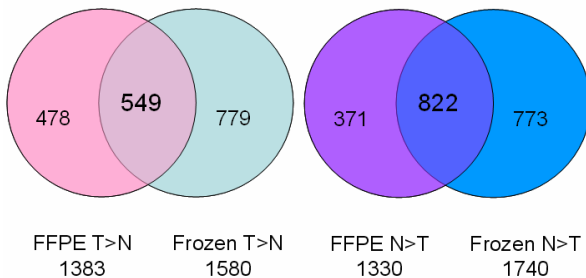


그림 2. Venn diagram of concordance of differentially expressed genes between FFPE and Frozen samples. Genes are called differentially expressed on Affymetrix HGU133A 2.0 between tumor and normal in the FFPE and Frozen samples if they meet the following criteria: 2x or greater RMA expression value difference and p-values lower than 0.001 from a pair wise t-test. There were only 4 "false positives" in the FFPE comparisons (1 in T>N, 3 in N>T).

기능적인 발현부분이 일치함을 확인하기 위해, 서로 다르게 발현된 유전자 세트를 Ingenuity Pathway Analysis를 이용하여 분석하였다. 각각의 pool은 개별적으로 분석되었다(FFPE T>N, FFPE N>T, 신선동결 샘플 N>T, 신선동결 샘플 T>N). Canonical pathway analysis 는 서로 다르게 발현되는 유전자에서 통계학적으로 대표되는 유전자를 이용하여 신선동결 샘플에서 11개의 pathway를 밝혀냈다. FFPE 샘플에서는 11개 pathway 중 9개 pathway를 통계학적으로 유사한 수준으로 밝혀냈다. 2개 pathway는 FFPE 샘플에서 낮은 수준으로 유일하게 검출되었으나, 통계학적으로는 신뢰도가 있었으며, 그 결과는 그림 3에 나타났다.

일반적으로 유전자를 그룹화할 때 많이 이용되는 생물학적 방법으로 분석했을때, 암조직에 비해 일반 조직에서 upregulated되는 상위 16개 cellular process (세포 내 과정)중 15개가 신선동결 샘플과 FFPE 샘플 모두에서 관찰되었다. 단 하나의 유전자 그룹이 FFPE 샘플에서 특이하게 검출되었으며, 그림 3B에 표시하였다.

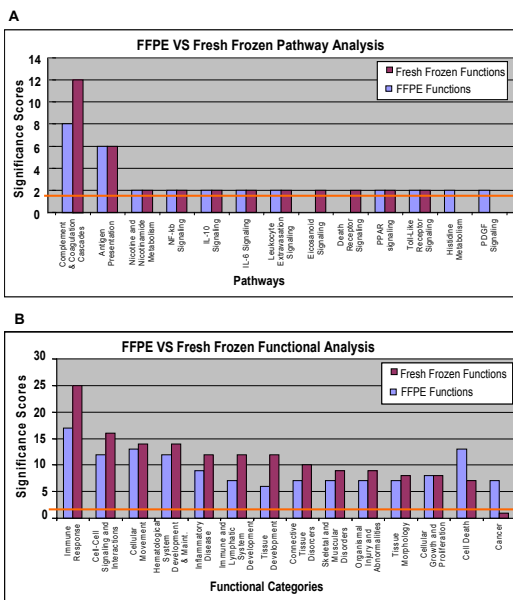


그림 3. Ingenuity pathway analysis of differentially regulated canonical pathways (A) and cellular functions (B) in tumor and normal tissues in Frozen and FFPE datasets. Pathways and cellular functions are listed along the X-axis. The Y-axis represents the $-\log(\text{significance score})$, which is defined by Ingenuity and depends on the number of genes (components) involved in the pathway/process and their relative weight in the process. The orange line represents the significance threshold. Nine of eleven canonical pathways represented in Fresh Frozen samples were detected in the FFPE samples.

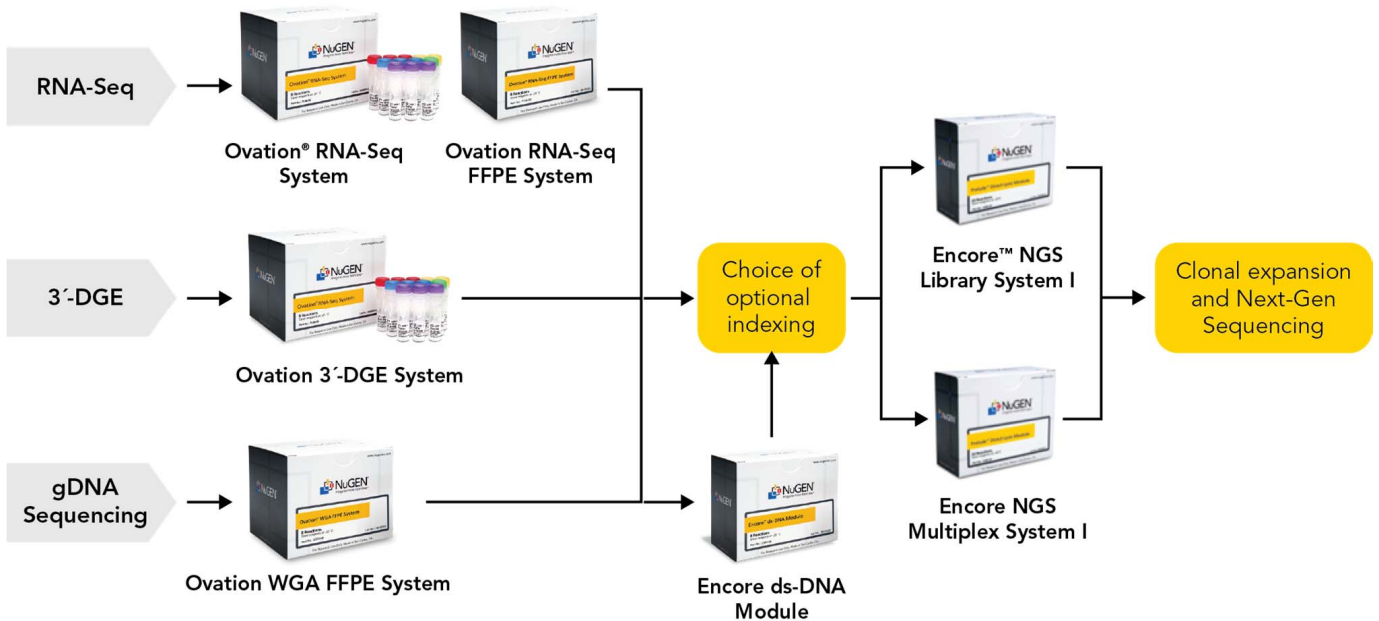
결론

WT-Ovation FFPE System을 FL-Ovation cDNA Biotin Module V2와 같이 사용하면 FFPE 조직에서 추출한 심각하게 깨진 RNA에서도 전반적인 유전자 발현 프로파일링과 microarray 분석이 가능하다. 본 고에서는 높은 품질의 신선동결 RNA를 사용한 것과 비교하여 FFPE 샘플로부터 만들어진 유전자 발현 정보의 가치를 확인하였다. FFPE RNA를 이용했을 때 민감도가 감소가 할 것을 예상했음에도 불구하고, FFPE 샘플과 신선동결 샘플을 이용한 differential expression 결과는 매우 일치했다. 매우 높은 유사성은 아래와 같다.

- Array상에서 관찰된 전사산물transcripts
- 서로 다르게 조절된다고 밝혀진 전사산물transcripts
- FFPE와 fresh frozen 샘플 결과를 비교했을 때 밝혀진 생명활동 (pathway & functions)

FFPE 조직시료와 같이 극한 조건의 RNA로부터도 발현 프로파일링이 가능하도록 기술이 개발된다면, 가지고 있는 FFPE 조직 시료로부터 얻은 유전자 발현 프로파일을 임상 결과와 연결시킬 수 있고, 이는 매우 가치있는 것이 될 것이다. WT-Ovation FFPE 제품은 임상관련 유전자의 발현 특징을 발굴하고 확인을 가능하게 하는 진보된 기술 중 하나이다.

NuGEN's Portfolio of NGS Products...



..to enable simple, fast, and scalable NGS workflows