

Agilent VistaFlux를 이용한 연골육종 세포주의 ^{13}C -Glutamine 정성 flux 분석

응용 자료

저자

Hui Liu, Weige Qin, Hardik Shah,
Bhavapriya Vaitheesvaran,
Vladimir Yong, Justin R. Cross
Donald B., Catherine C. Marron
Cancer Metabolism Center,
Memorial Sloan Kettering Cancer
Center

Lucia Salamanca-Cardona,
Kayvan R. Keshari Department
of Radiology and Molecular
Pharmacology Program, Memorial
Sloan Kettering Cancer Center

개요

대사체 데이터의 해석은 대사 경로 흐름(flux) 상의 유의한 변화가 해당 대사체 존재비의 변화 없이도 발생할 수 있기 때문에, 이러한 동적 정보의 부족으로 종종 복잡해집니다. 안정 동위원소 추적(qualitative flux analysis, 정성 flux 분석)은 이 상황을 해결하는 데 도움이 되고 생물학적 시스템에 대한 깊은 이해를 가능하게 해줄 수 있는 엄청난 잠재력을 가지고 있습니다. 정성 flux 분석에서는 생물학적 시스템에 안정 동위원소 추적자(stable isotope tracer, 일반적으로 ^{13}C , ^{15}N 또는 ^2H 등을 포함하는)를 도입하여 다운스트림 대사체의 동위원소 패턴(동위원소체 분포, isotopologues distribution)을 변화시킵니다. 이 접근법은 안정 동위원소 추적자 도입이 잘 받아들여지는 세포 배양 모델에서 특히 유용하며, 결과적으로 나타나는 추적자 결합의 표지 패턴 분석과 동역학적 분석을 통해 효소 기능, 경로 의존성, 유전자 발현 또는 단백질 기능의 변화 효과 등에 대한 통찰을 제공합니다.

Agilent MassHunter VistaFlux 소프트웨어는 정성 flux 분석의 수행을 돋는 포괄적인 워크플로를 제공하고 고분해능 accurate mass TOF 및 Q-TOF LC/MS 데이터의 처리 및 시각화를 용이하게 하기 위해 설계되었습니다. 이 소프트웨어는 특징 추출(feature extraction), 동위원소 결합 및 동위원소체 존재비 분석, 자연 존재비 보정, 통계 분석 그리고 경로상의 데이터 시각화를 위한 도구를



Agilent Technologies

제공합니다.

본 응용 자료에서는 $^{13}\text{C}_5$ -glutamine ($\text{U}-^{13}\text{C}-\text{Gln}$) 추적자를 이용한 연골육종 세포주 내 정성 flux 분석에 대해 소개합니다. 데이터는 Agilent LC/TOF 시스템을 통해 수집하였으며, 데이터 분석과 해석에는 MassHunter VistaFlux를 이용하였습니다. 이 연구는 isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) 돌연변이가 TCA 회로 대사에 미치는 영향, 특히 돌연변이 IDH2 동형 (isoform)에 의해 glutamine이 2-hydroxyglutarate (2-HG) 생산으로 전환되는 과정에 대해 기술합니다.

소개

체세포 IDH(isocitrate dehydrogenase) 돌연변이는 최근에 신경교종, 급성 골수성 백혈병, 연골육종을 포함하는 다양한 고형 종양 및 혈액 종양에서 언급되고 있습니다. Isocitrate dehydrogenase 효소(IDH1/2)의 돌연변이는 효소 활성 부위에서 일어나며, 기능 획득(gain-of-function) 표현형을 부여함으로써 2-hydroxyglutarate (2-HG) 대사체를 생산하는 능력을 증가시킵니다. 최근 연구에서 배출 경로의 포화로 인해 IDH 돌연변이 세포 내에서 높은 농도로 축적된 2-HG가 다양한 종류의 α -ketoglutarate (α -KG) 의존성 dioxygenase의 경쟁적 억제제로 작용하는 것이 밝혀졌습니다(해당 α -KG 의존성 dioxygenase 효소에는 저산소 유도인자(HIFs)를 조절하는 DNA demethylases의 TET 계열, histone demethylases의 Jumonji C 계열, mRNA demethylases FTO와 ALKBH5 그리고 prolyl hydroxylase (PHD) 효소 등이 포함되어 있음)¹. 이러한 변화는 세포를 미분화 상태로 유지시키는 억제적인 염색질(chromatin) 환경 형성을 촉진합니다.

연골을 축적하는 연골세포에서 발생하는 육종의 일종인 연골육종은 IDH 돌연변이 발생빈도가 높습니다. 상용화된 연골육종 유도 세포주로 인해 연골육종은 IDH 돌연변이의 결과를 이해할 수 있는 유용한 모델 시스템으로 여겨집니다. 여기에서 중요한 부분은 돌연변이 효소에 의해 생성된 2-HG가 α -KG 및 TCA 회로를 통해 glutamine 으로부터 생성되었다는 것을 증명하기

위해 '정성 flux 분석'을 사용하였다는 것입니다.

실험

세포 배양 및 시약

사람 연골육종 CS-1 세포주²를 10% FBS, 25mM glucose, 4mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100ug/mL streptomycin을 포함한 DMEM 용액에 넣어 5% CO_2 , 37°C로 설정된 인큐베이터에 보관하였습니다. 대사 추적 실험에서는 표지 기간이 시작되기 전 well당 300,000개의 세포를 표준 6-well 배양 플레이트에서 2일간 배양하였습니다(각 타임 포인트별 3개의 well 준비). 추적자를 포함한 배지는 투석 처리된 10% FBS 및 4mM [$\text{U}-^{13}\text{C}$]-L-glutamine(Isotec 605-166, Sigma)을 첨가한 glutamine결여 DMEM이었습니다. 표지 기간이 시작되면 PBS로 세포를 1회 세척하고 추적자 포함 배지로 옮겨 각각 0.5시간, 1시간, 3시간, 8시간 동안 배양 후 수확하였습니다. 배지의 변화가 대사체 풀(pool)에도 변화를 가져올 수 있기 때문에, 대조 (미표지) 세포를 투석 처리된 10% FBS와 4mM L-glutamine(동위원소 농축 없음)을 포함한 DMEM으로 옮겨 8시간 동안 배양한 후 수확하였습니다. 이 대조 세포는 8시간 동안 배양한 $\text{U}-^{13}\text{C}-\text{Gln}$ 의 타임 포인트에 정확히 대응하기 위한 것입니다.

대사체 추출

세포 배지를 조심스럽게 흡입하여 well당 80% methanol 수용액(v/v) 1mL에서 세포를 추출하였습니다. 플레이트를 -80°C 에서 1시간 이상 배양하여 단백질을 침전시킨 후 굽어냈습니다. 추출물을 마이크로 원심분리 퓨브에 옮겨 4°C 에서 21,000xg로 15분간 원심분리시켜 정화한 후, 그 추출물을 깨끗한 퓨브로 옮겨 진공 농축기(Genevac)에서 완전히 건조될 때까지 증발시켰습니다.

참고로, 세포 배지의 변경과 PBS를 이용한 세척은 대사체 풀(pool)을 급격히 변화시킬 수 있기 때문에, 이러한 정성 flux 실험에서는 세포를 안정 동위원소 포함 배지에 옮기기 전에 PBS로만 세척하였습니다. 수확 단계에서는 세포 내 대사체 및 관련 표지 패턴의 수준을 최대한 보존하기 위해 추가 세척

없이 배지 흡입 후 추출 용매를 직접 첨가하였습니다. 그러나 이 과정대로 수행하는 경우 세포 추출물의 잔류 배지 오염도가 세포 수확 직후에 PBS 세척 과정을 거치는 경우보다 높기 때문에, 세포 배지에서 높은 농도로 존재하는 대사체의 결과 해석 시 반드시 주의를 기울여야 합니다.

LC/MS 분석

건조한 추출물을 120 μL 의 물에 재부유시킨 후 열음에서 20분간 배양하며 5분 간격으로 볼텍싱하였습니다. 그 후 추출물을 4°C 에서 21,000xg로 15분간 원심분리하여 모든 잔류 입자들을 제거하였습니다. 그 중 100 μL 의 추출물을 감소된 부피의 자동시료주입기 바이알에 옮기고 각 시료마다 10 μL 를 취하여 pooled QC 바이알을 만든 뒤 분석 시작 시 6회 반복 주입하였으며, 분석 과정 중에도 정기적으로 주입하여 크로마토그래피의 안정성을 확보하고자 하였습니다.

데이터는 아래와 같이 구성된 애질런트 LC/MS 시스템을 이용해 수집하였습니다.

- Agilent 6230 time-of-flight 질량분석기
- Agilent 1290 Infinity Binary UHPLC 펌프
- Agilent 1290 Infinity 항온 컬럼 장치
- Agilent 1290 Infinity HTS 자동시료주입기

기준 질량 용액 도입에는 100:1 유속 분배기(flow splitter)를 장착한 Agilent 1260 Infinity Isocratic 펌프를 사용하였습니다. LC를 이중 전자분무 (dual ESI) 이온화원을 장착한 MS에 연결하고, 4GHz의 고분해능 모드(1.5 spectra/초)를 이용한 음이온 모드에서 데이터를 수집하였습니다. 표 1은 분석법 설정을 나타냅니다.

이 분석법은 본 실험에서 연구하고자하는 대사체를 위해 설계되었습니다. TCA 회로는 역상 크로마토그래피에서 머무름이 거의 없는 유기산으로 구성되어 있기 때문에, 이온상 역상 크로마토그래피를 적용하였습니다. 표적 화합물을 최적으로 검출하기 위해 음이온 전기분무 이온화 모드를 선택하였습니다.

데이터 분석

Agilent MassHunter Pathways to PCDL 소프트웨어를 이용하여 BioCyc에서 얻은 tricarboxylic acid(TCA) 회로에 대한 애질런트 개인 복합물 데이터베이스 및 라이브러리(Personal Compound Database and Library, PCDL) 파일(.cdb)을 작성하였습니다. 또한 Agilent METLIN PCDL을 소스로 이용한 사용자 정의 PCDL에 lactate, pyruvate, aspartate, glutamate, oxidized glutathione, 및 2-HG를 추가하였습니다. 그 다음 Agilent PCDL Manager 소프트웨어에서 편집을 통해 해당 분석법으로 측정하지 않은 대사체를 제거하고 각 화합물에 머무름 시간을 추가한 후, PCDL 파일을 표적 리스트로 사용하여 Agilent MassHunter Profinder 소프트웨어에서 배치(batch) 동위원소체를 추출하였습니다(표 2). ^{13}C 의 자연 존재비 보정 후 Profinder 아카이브 파일(.PFA) 형식으로 Omix Premium에 내보냈습니다. 이 파일은 시료 그룹 정보, 화합물 ID 및 동위원소체 존재비를 포함합니다. 완전한 데이터 세트를 comma-separated value(.csv) 파일 형식으로 내보낼 수도 있습니다.

표 1. LC/MS 분석 파라미터

파라미터	값
LC 조건	
컬럼	Waters Cortecs C18+ 150mm × 2.1mm, 2.7 μm
이동상	A) 5 mM N,N-dimethyloctylamine in water, pH 5.5 B) 5 mM N,N-dimethyloctylamine in 90% methanol in water, pH 5.5
유량	0.4mL/분(0~8분), 그 후 0.6mL/분(8.1~10분)
그레디언트	0분에 10%B 8.0분에 100%B
정지 시간	10분
사후 시간	5분
컬럼 온도	30°C
주입량	15 μL
MS 조건	
이온화 모드	Dual ESI
이온화 극성	음이온
가스 온도	250°C
건조 가스	13L/분
분무기 압력	45psi
캐필러리 전압	3,500V
Octopole 1 RF 전압	600V
수집 범위	m/z 50~1,700
기준 질량	m/z 119.0363 및 980.01638

표 2. 동위원소체(isotopologue) 추출을 위한 표적 대사체 리스트

화합물	화학식	CAS	RT (분)
L-Glutamate	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	56-86-0	2.26
L-Aspartic acid	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	56-84-8	2.29
L-Lactic acid	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$	79-33-4	2.93
Glutathione, oxidized	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_2$	27025-41-8	4.84
Succinic acid	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	110-15-6	5.05
2-Hydroxyglutarate	$\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_5$	2889-31-8	5.11
Fumaric acid	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	110-17-8	5.13
L-Malic acid	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	97-67-6	5.13
Oxoglutaric acid (α -KG)	$\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5$	328-50-7	5.24
Guanosine diphosphate (GDP)	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}_2$	146-91-8	5.83
Adenosine diphosphate (ADP)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{10}\text{P}_2$	58-64-0	5.93
Aconitic acid	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$	499-12-7	6.1
<i>threo</i> -Isocitric acid(citric acid로부터 미분리)	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	6061-97-8	6.1
Citric acid (<i>threo</i> -isocitric acid로부터 미분리)	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	77-92-9	6.1
Guanosine triphosphate (GTP)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{P}_3$	86-01-1	6.57
Adenosine triphosphate (ATP)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3$	987-65-5	6.63

결과 및 토의

Profinder에서 동위원소체 추출 후, 결과를 검토하고 필요시 수동 편집하였습니다. 보다 일관성있는 결과를 위해 glutamate와 α -KG만 수동 조정이 필요하였습니다. Profinder 내의 동위원소체 화면은 안정 표지의 결합뿐만 아니라 시료 그룹 내의 반복 실험 재현성에 대해 유용한 통찰을 제공합니다. 이는 원시값(추가 보정 불포함) 또는 % 보정값(자연 동위원소 존재비에 대한 추가 보정 포함) 형식으로 확인 가능합니다. 그림 1은 2-HG에 대한 동위원소체 결과를 나타냅니다. 결과는 타임 포인트별로 그룹화된 자연 존재비 보정값으로 표시됩니다. 이 연구에서 타임 포인트는 생물학적 반복 시료에 걸쳐 탁월한 일관성을 나타내지만, 필요한 경우 이 단계에서 이상치(outlier) 시료를 배제할 수 있습니다. 데이터 초기 검토에서 시간이 지남에 따라 2-HG M+0은 감소하고 2-HG M+5가 상응하게 증가하는 것을 관찰할 수 있습니다. 이는 2-HG의 5개 탄소 모두가 U- ^{13}C -Gln 추적자에서 유래하고, 8시간 후 대부분의 2-HG 풀(pool)이 표지 되었으며, 따라서 이들 탄소가 글루타민에서 유래한 것임을 증명합니다.

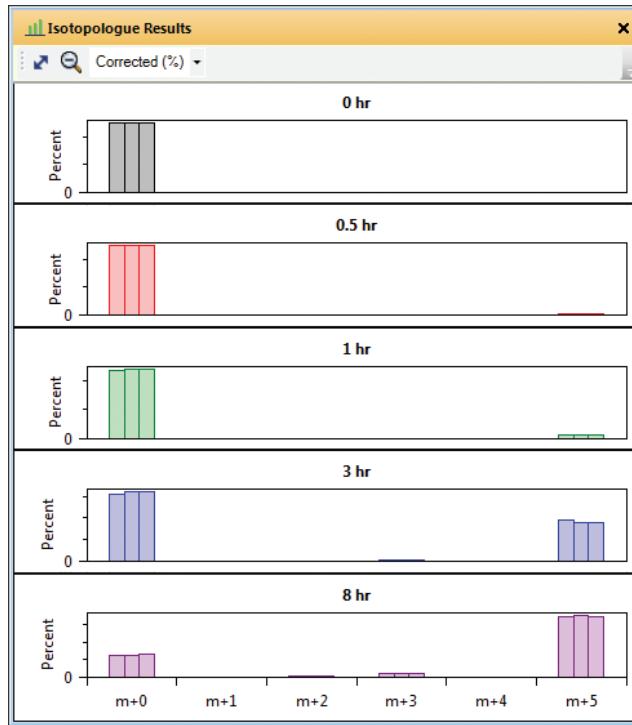


그림 1. Agilent MassHunter Profinder의 2-HG 동위원소체 화면

정성 flux 분석은 생물학적 경로의 전후 관계를 통해 안정 등위원소 표지 추적자의 거동을 이해하고자 할 때 가장 강력한 성능을 발휘합니다. Profinder의 결과를 경로의 전후 관계에서 시각화하기 위해, Omix Premium에서 사람 BioCyc 데이터베이스에 기반한 네트워크를 생성하였습니다. 표준 TCA 회로에 없는 추가 관심 대상 대사체 (lactate, pyruvate, oxidized glutathione, aspartate 및 glutamine)는 수동으로 네트워크에 추가하였습니다. ADP, GDP, ATP 및 GTP 등은 보편적으로 존재하는 대사체이며, 측정한 존재비는 총 세포

농도를 나타냅니다. 이러한 화합물들의 결합 과정을 모니터링하기 위해 대사체 노드(node)는 정보 시각화를 위한 동일한 옵션으로 특정 경로와 구분되어 표시됩니다. 네트워크 생성 후 Profinder 결과를 Omix Premium으로 불러왔습니다(그림 2). 이 응용 프로그램에서, 왼쪽의 Component View는 네트워크 내 모든 대사체 리스트를 나열하고, 메인 창에 네트워크를 표시하며, 하단의 Data Manager 창을 통해 불러온 Profinder 결과를 제어할 수 있습니다.

Omix Premium은 정성 flux 데이터의 시각화와 해석을 위해 특별히 설계된 그래픽 옵션을 제공하며, 이것은 대사체 노드의 속성 변경 및 관련 도표와 그래픽을 추가할 수 있는 기능을 포함하고 있습니다. 네트워크가 점차 복잡해짐에 따라 노드에 색상을 더해 대사체 존재비를 표시함으로써 실험을 빠르게 요약할 수 있습니다. 그림 2에서, 표시된 색상의 강도는 측정된 대사체 존재비를 나타냅니다(회색으로 채워진 대사체 노드는 이 실험에서 측정되지 않은 화합물을 의미).

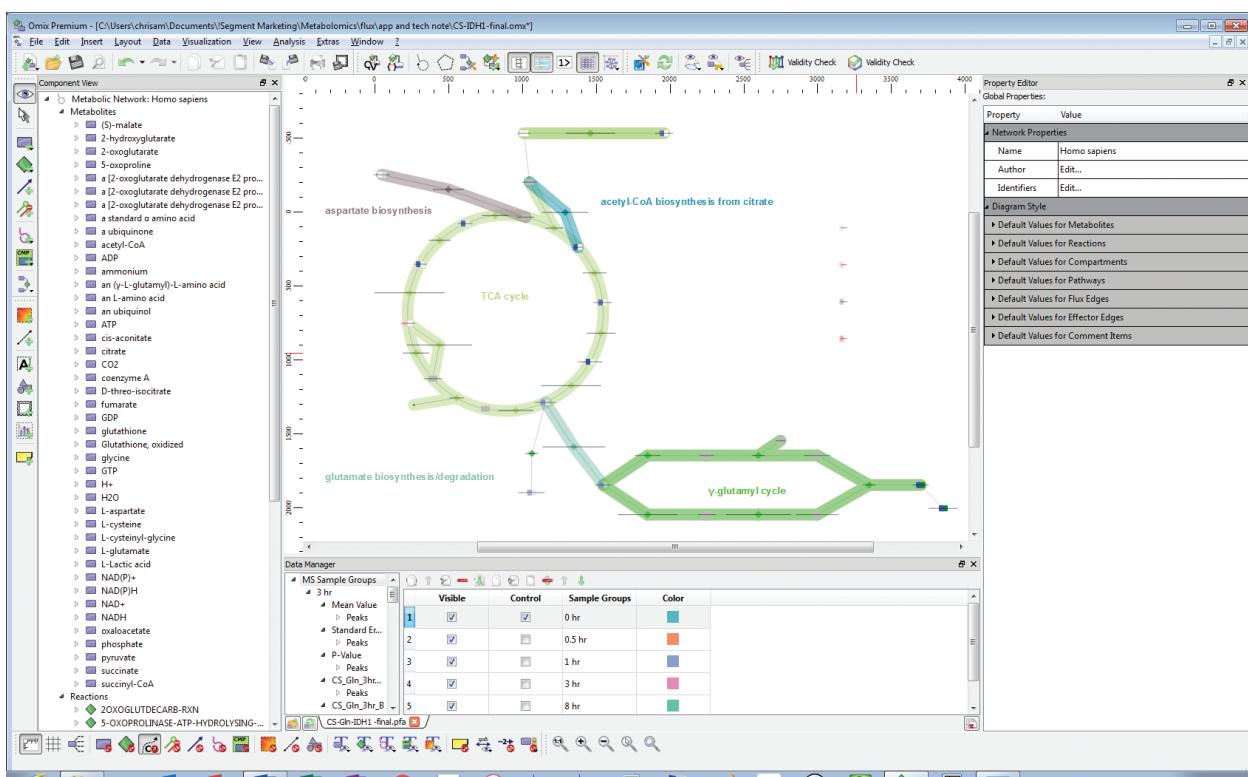


그림 2. Omix Premium 소프트웨어에 표시된 네트워크 및 (불러온)Agilent MassHunter Profinder 결과

대사체 노드의 색상 옵션은 3가지가 있으며, 이는 그림 3에서 2-HG를 예로 나타냈습니다. 노드의 색상 표기 기능을 통해 고농도 대사체의 존재를 표시하거나(그림 3A의 색상 강도), 안정 표지 결합의 발생을 표시할 수 있습니다(그림 3B). 그림 3C는 위의 두 가지 정보를 동시에 결합하여 보여주는 노드를 나타냅니다.

대사체 노드에 표시된 정보는, 대조군으로 지정된 시료 대비 최대 배율 변화(fold change)를 보이는 부분을 표시하도록 설계되었습니다. 경로 전체에 걸친 이상위 수준의 데이터 검토가 완료되면, 안정 동위원소 결합에 대한 더욱 자세한 검토가 가능합니다. 그림 4는 각 대사체 노드 옆쪽의 퀄트 도표 및 수평 막대 그래프로 표시될 수 있는 추가 정보를 나타냅니다. 이 도표는 동위원소체 존재비와 추적자 결합을 요약함과 동시에, 노드에 표시된 요약 정보를 상세하게 보여줍니다. 본 사례의 경우, 타임 포인트 결과는 퀄트 도표의 y축에, 동위원소체는 x축에 표시하였습니다. 채워진 색상의 강도는 추적자 결합의 상대 존재비를 나타냅니다. 막대 그래프는 총 추적자 결합을 총 대사체 존재비율(모든 검출된 동위원소체의 합)로 보여주는 대체 보기 화면을 제공합니다. 이 화면은 Profinder에서 데이터의 수동 점검 시 처음으로 관찰된 결과, 즉 $U-^{13}C\text{-Gln}$ 에 의한 3시간, 8시간 배양 후 추적자가 2-HG의 M+5 동위원소체로 유의한 표지 결합을 나타낸 결과를 확인하여, 결국 glutamine이 IDH2 돌연변이 CS-1 세포 내 2-HG 합성에 사용되는 주요 기질이라는 것을 증명합니다.

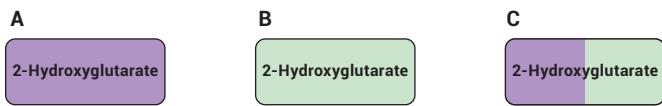


그림 3. 2-HG 노드 채우기. A) 검출된 타 대사체와 비교한 대사체의 상대적 존재비, B) 안정 표지 결합 퍼센트를 색상 그레이드언트로 표시, C) 왼쪽에는 존재비, 오른쪽에는 결합 퍼센트를 표시하는 분할 채우기

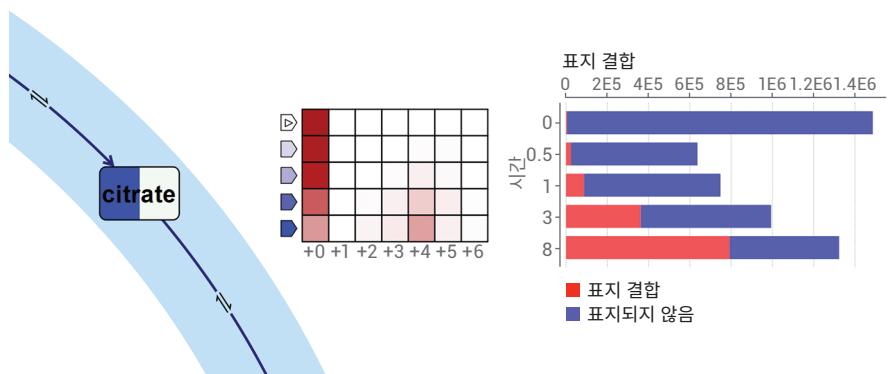


그림 4. CS-1 세포주 내 citrate에 결합된 $U-^{13}C\text{-Gln}$ 추적자에 대한 상세 정보

그림 5는 동위원소체 결합 관련 상세 정보를 검토하기 위한 또 다른 유용한 보기 화면을 나타냅니다. 이 도표는 서로 다른 그룹(타임 포인트)의 동위원소체 결과를 표시하며, 오류 막대로 반복 측정에서 관측된 표준 편차를 함께 나타냅니다. Profinder의 동위원소체 화면과 유사한 이 도표는 원시 데이터를 숫자로 나타낸 화면을 제공합니다. 이 oxidized glutathione 사례에서 도표를 통해 시간이 흐름에 따라 세포

glutathione 풀이 처음에는 하나의 Gln 유도 5-탄소 구성 단위로, 그 다음에는 두 개의 Gln 유도 5-탄소 구성 단위로 표지되는 것을 명확하게 관찰할 수 있습니다. 또한 채워진 노드는 oxidized glutathione이 높은 존재비를 가진 대사체라는 것을 나타나며, 따라서 유의한 비율의 총 세포 풀이 1개 및 그 이후 2개의 Gln 유도 하위 단위(subunit)와 결합하기 위해서는 시간이 소요됨을 알 수 있습니다.

대사체 노드는 ADP, GDP, ATP 및 GTP와 같은 화합물을 포함시켜 실험 과정 전반에서 세포 수준의 결합 또는 변화가 없었다는 것도 보여줄 수 있습니다 (그림 6). 이는 Gln이 8시간 이내에는 이 대사체들의 생합성 경로에 뚜렷한 기여를 하지 않는다는 것을 암시합니다. 그러나 di- 및 tri-phosphate nucleotide 풀의 상대 존재비에 대한 정보를 포함하는 것은 세포 건강 및 활성도 해석에 여전히 도움이 될 수 있습니다.

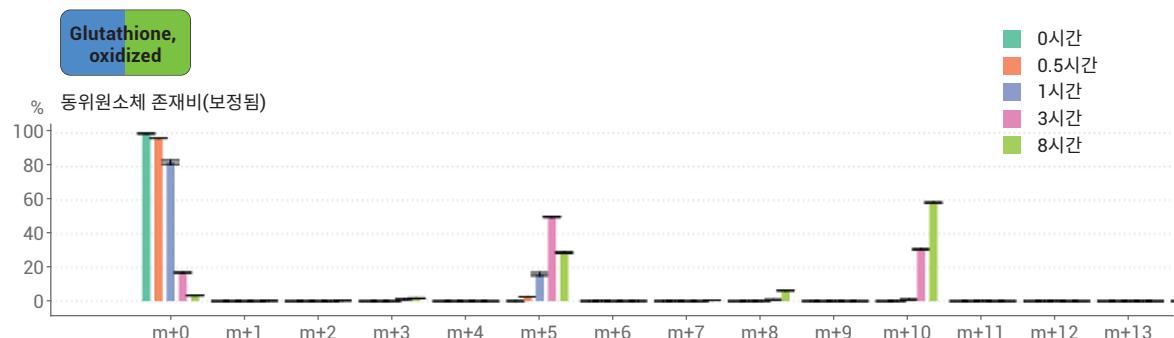


그림 5. 시간에 따른 glutamine 추적자 결합 과정을 보여주는 glutathione 동위원소체 존재비(막대 그래프로 표시)

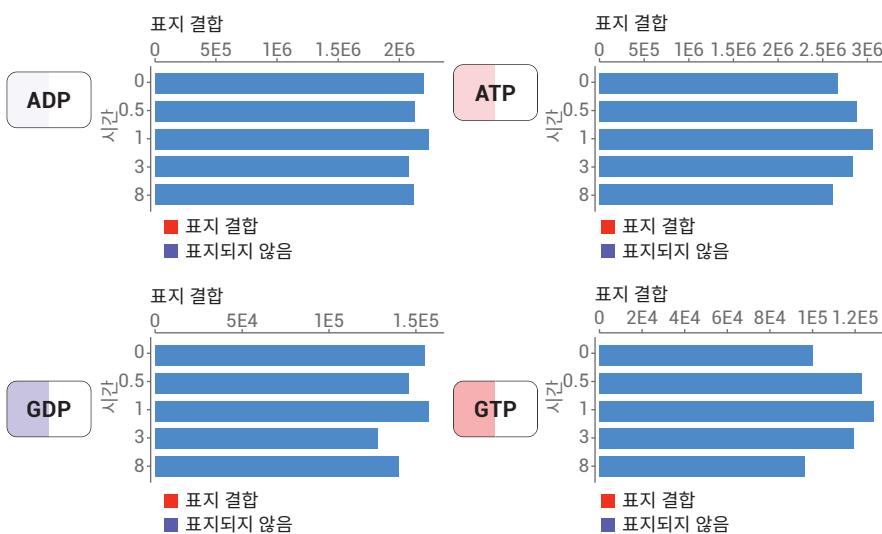


그림 6. 보편적 대사체 ADP, GDP, ATP, GTP의 전반적 흐름(flux) 표시

이 화면들을 조합하면 전체 네트워크에 걸친 동위원소체 분포와 표지 동역학 결과를 비교할 수 있게 됩니다(그림 7). 프리젠테이션 목적을 위해 대사체 노드 채우기 형식을 BioCyc에서 불러온 구조식으로 대체할 수 있습니다. 기본 통계 정보 역시 월트 도표에 겹쳐 표시할 수 있습니다. 그림 7은 대조군(0 타임 포인트 시료로 지정한)의 존재비에 대한 각 동위원소체의 Welch's t-검정 결과를 보여줍니다('•' 표시는 $p < 0.05$ 를 의미).

이러한 정성 flux 프로파일링 결과에 대한 검토를 통해 $U-^{13}\text{C}-\text{Gln}$ 추적자는 신속하게 glutamate(Glu)를 표지하며 이 과정은 2-HG 풀의 표지보다 다소 빠르다는 것을 명확하게 밝혀냈습니다. 이는 2-HG를 합성하기 위해 환원 반응을 완료하려는 돌연변이 IDH2 효소의 활성이 상대적으로 낫다는 것을 의미합니다. 또한 Glu, α -KG(미제공) 및 2-HG가 모두 $U-^{13}\text{C}-\text{Gln}$ 추적자로부터 유래한 5개의 ^{13}C 원자를 포함하고 있기 때문에 경로가 직접적일 가능성이 있다고 추론할 수 있습니다. 분석 결과는 TCA 회로 내

$U-^{13}\text{C}-\text{Gln}$ 의 산화(forward) 방향 진행으로 인해, succinate, fumarate, malate가 주로 M+4 동위원소체로 빠르게 표지되는 것을 보여줍니다. Oxaloacetate(OAA)는 대부분 세포 내에서 낮은 농도로 존재하며, LC/MS에 의한 추출과 분석 과정에서 재현성을 보이며 생존하기에는 지나치게 불안정합니다. 그러나 OAA 풀은 추적자에 의해 주로 M+4 동위원소체로 빠르게 표지 되는 L-aspartic acid(Asp)와 평형을 이룹니다.

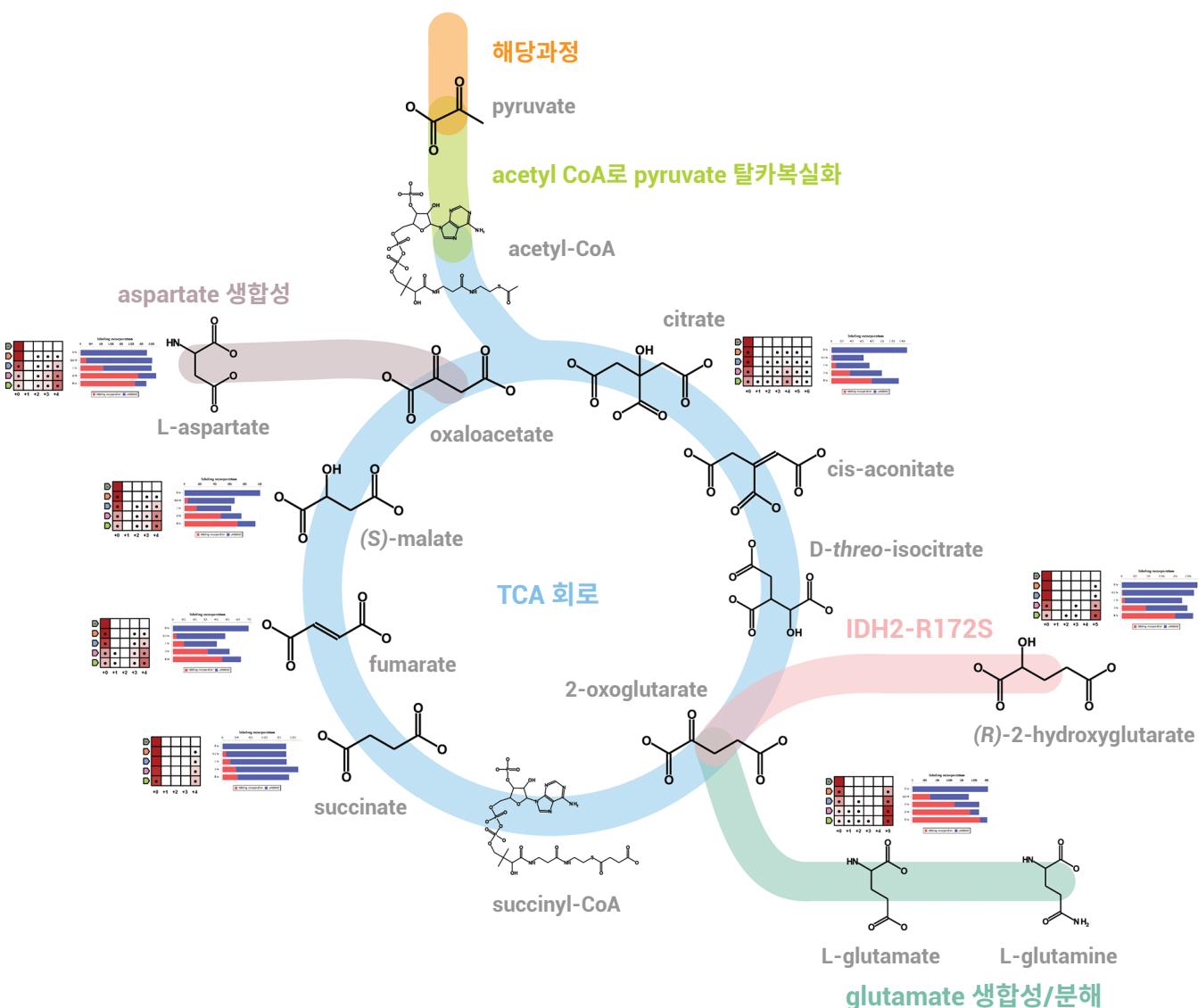


그림 7. $U-^{13}\text{C}-\text{Gln}$ 으로 표지된 2-HG 및 TCA 회로 대사체 요약

이후에, 2-HG, succinate, fumarate, malate 및 aspartate에서 M+3 표지가 나타나는데, 이것은 M+4로 표지된 OAA가 acetyl-CoA에서 유래한 2개의 비농축 탄소와 결합하여 citrate M+4를 합성한 결과입니다. 다운스트림 대사체에서 M+3 동위원소체가 발견되는 것은, 산화(forward) 방향으로 작용하는 wild type IDH 반응을 통해 탈카복실화(decarboxylation)가 일어났기 때문입니다. 또한, 역방향(reverse)으로 작용하는 wild type IDH 효소의 촉매 작용에 의해 환원성 카복실화(carboxylation)로 인해 citrate에서 M+5 표지가 존재한다는 증거도 있습니다. 그밖에, 8시간까지 다음과 같은 원인으로 인해 발생한 더욱 복잡한 표지 패턴이 관측되었습니다.

- TCA 회로의 추가 회전
- Succinate, fumarate, citrate의 대칭으로 인한 표지 패턴의 스크램블링
- 잠재적인 말산(malic) 효소 반응

이 패턴은 대안적인 안정 동위원소 추적자를 사용하거나 또는 특정 위치의 탄소를 표지한 Gln를 통해 추가로 연구할 수 있습니다. 최종적으로, 요약 화면을 통해 대사체 표지에 대한 상대적인 동역학을 평가할 수 있으며, 8시간의 표지 과정을 거친 Asp와 Glu 표지가 안정 상태로 접근하고 있음을 알 수 있습니다. 다른 대사체 풀이 대사적 안정 상태에 도달하기 위해서는 더욱 긴 타임 포인트가 필요할 것입니다.

결론

본 실험에서는 Agilent MassHunter VistaFlux 워크플로에서 U-¹³C-Gln를 대사 추적자로 사용해 CS-1 연골육종 세포에 대한 정성 flux 프로파일링을 수행하였습니다. 이 분석은 Gln 유도 α -KG를 2-HG로 변환시키는 IDH2 돌연변이 동형의 활성을 명확하게 증명합니다. 8시간의 배양을 거친 후, IDH 돌연변이가 있는 세포에서 2-HG 풀의 대부분이 M+5 동위원소체로 표지 되었습니다. IDH2 R172S 돌연변이 효소의 신형태적(neomorphic) 활성에 의해 유발된 이 2-HG 생산의 증가가 내인성 2-HG dehydrogenases를 억제하여 2-HG가 고농도로 축적되도록 하였습니다. 그 다음, 2-HG가 TET 계열 DNA demethylases 및 Jumonji C 계열 histone demethylases를 포함한 여러 α -KG 의존성 dioxygenase의 경쟁적 억제제로 작용하여 DNA hypermethylation 등 후성유전학적(epigenetic) 변화를 초래하며, 미분화 염색질 환경을 촉진합니다. 이 분석에서는 U-¹³C-Gln 추적자가 표준 TCA 회로 경로에 참여한 결과 또한 나타냅니다.

VistaFlux 워크플로는 수동 데이터 마이닝과 비교하여 동위원소체 추출과 정성 flux 프로파일링 데이터의 경로 시각화를 포함하는 안정 동위원소 추적 데이터 처리에 대한 포괄적이고 가속화된 자동화 프레임워크를 제공합니다.

참고문헌

1. Losman, J. A.; Kaelin, W. G. Jr. What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes Dev.* **2013**, 27(8), 836-52.
2. Susa, M.; et al. Alendronate inhibits growth of high-grade chondrosarcoma cells. *Anticancer Res.* **2009**, 29, 1879-1888.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 전단 용도로는 사용하실
수 없습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2016
2016년 4월 12일, 한국에서 발행
5991-6810KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies