

# 희귀 질환 프리드리히 운동실조증의 혈액 바이오마커, 프라탁신-M 단백질 정량

## Agilent 6495 QQQ LC/MS 시스템 사용

### 저자

Nicolas Eskenazi,  
Teerapat Rojsajakul,  
Clementina Mesaros,  
Ian A. Blair  
Penn/CHOP 프리드리히  
운동실조증 우수 연구 센터 및  
펜실베이니아 대학교 Perelman  
의과대학 시스템 약리학 및 중개  
치료학과

Linfeng Wu  
Agilent Technologies, Inc.

### 개요

척수소뇌변성증의 일종인 프리드리히 운동실조증(FRDA)은 미토콘드리아 활성형(mature) 프라탁신(frataxin-M) 단백질 발현의 부족으로 인해 발생하는 유전병으로, 신경계를 점진적으로 손상시키고 운동 문제를 수반합니다. 프라탁신-M(81-210)은 미토콘드리아 프로세싱 펩티다제(MPP)에 의한 전장 프라탁신(1-210)의 2단계 단백질 가수분해 절단으로부터 생성됩니다. 프라탁신-M은 순환계로 분비되지 않기 때문에 혈장이나 혈청에서 분석할 수 없습니다. 그러나 프라탁신-M은 미토콘드리아를 가지고 있는 혈소판 및 인간 말초혈액 단핵 세포(PBMC) 등의 혈액 세포에 존재합니다.

면역침강법(IP) 및 안정 동위원소 희석 분석법론을 결합한 질량 분석법(MS)은 높은 정밀도와 정확도로 프라탁신-M을 정량할 수 있습니다. 이러한 정량의 경우, 주로 고분해능 MS와 나노 유속 액체 크로마토그래피(nanoflow LC)를 결합한 시스템이 사용되는데, 이는 시간이 많이 걸리고 나노 유속 LC/MS 시스템을 유지하기 위한 엄격한 품질 관리가 필요합니다. 표준 유속 LC와 단위 분해능 QQQ LC/MS(LC/TQ)를 결합한 시스템은 프라탁신-M과 같은 낮은 존재비의 단백질 정량에 일반적으로 사용되지 않지만, 표준 유속을 사용한 Agilent 6495 LC/TQ의 다중 반응 모니터링(MRM) 수집 모드에서 더 나은 프라탁신-M 정량 분석을 제공함을 입증합니다. 해당 시스템은 고분해능 궤도 트래핑 질량 분석기와 결합된 트랩-용출 나노 유속 LC/MS 시스템을 병렬 반응 모니터링(PRM) 수집 모드에서 사용할 때와 비교하여 개선된 감도, 정밀도, 정확도 및 기기 실행 속도를 제공합니다. 따라서 표준 유속 HPLC를 사용하는 6495 LC/TQ 플랫폼은 트랩-용출 나노 유속 LC/MS 시스템보다 혈액 시료의 고처리량 프라탁신-M 정량 분석에 더 적합합니다.

## 서론

FRDA는 희귀 질환으로 간주되지만 미국 인구에서 가장 흔한 유전성 운동 실조증입니다. 이 질환은 진행성이기 때문에 대부분의 환자가 발병 후 15.5 ± 7.4년(평균 연령 ±SD) 내에 휠체어에 의지하게 됩니다.<sup>1</sup> 그러나 주요 사망 원인은 심장 질환입니다.<sup>2</sup> NRF-2 활성화제 오마벨록솔론(omaveloxolone)이 안전하고 치료 용량에서 신경학적 기능을 개선하는 것으로 밝혀져 잠재적인 미래 치료 전략으로 제시되지만 현재까지는 FRDA에 대한 효과적인 치료법이 없는 상황입니다.<sup>3</sup> 대부분의 FRDA 사례에 대한 유전적 근거는 두 대립유전자(GAA1 및 GAA2)의 프라탁신(FXN) 유전자에서 첫 번째 인트론에 존재하는 3개 염기서열 GAA의 반복이 확장되어 있는 것인데, 이는 후생유전학적 전사 침묵 및 전장 프라탁신 단백질의 발현 감소를 유발합니다.<sup>4</sup> 소수의 FRDA 환자 (<3%)는 하나의 대립유전자에 점 또는 작은 돌연변이가 있고 다른 대립유전자에는 GAA 반복 확장이 있는 복합 이형 접합자입니다.<sup>5</sup> 일반적인 FRDA 사례에서 GAA1(가장 짧은 확장)의 길이는 질병의 심각도와 상관관계가 있고, GAA 확장이 길수록 조기에 발병하고 더 빠르게 진행합니다.<sup>6</sup>

인간 전장 프라탁신(동형 단백질 1, MW = 23,135 Da)은 N-말단 미토콘드리아 표적화 서열이 있는 210개 아미노산의 전구체 단백질로 발현됩니다(그림 1). 미토콘드리아 프로세싱 펩티다제(MPP)에 의한 2단계 단백질 가수분해 절단으로 미토콘드리아 프라탁신-M(81-210; MW = 14,268 Da)이 생성됩니다. 몇몇 증거에 따르면 프라탁신-M이 철-황 클러스터 조립, 철 저장, 헴 생합성, 호흡 사슬 및 산화 스트레스에 대한 세포 반응을 포함한 일련의 경로에서 기능적 구성 요소임을 강력하게 시사합니다.<sup>7-10</sup> 이와 대조적으로, 적혈구에서 발견되는 미토콘드리아와 프라탁신 동형 E(프라탁신-E) 단백질(76-210;

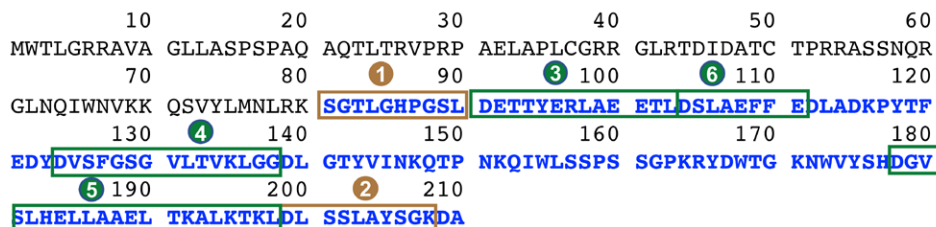


그림 1. 전장 프라탁신 및 프라탁신-M의 아미노산 서열(파란색으로 표시). Asp-N 분해 펩타이드 1 및 2(갈색 상자)는 정량에 사용되었고 펩타이드 3 ~ 5(녹색 상자)는 단백질 검출 확인에 사용되었음.

MW = 14,953 Da)은 미토콘드리아 표적 서열이 결여되어 있습니다. 이는 선택적 스플라이싱에 이어지는 번역 중 N-말단 아세틸화를 통해 발생합니다.<sup>11</sup> 그 발현은 DNA 과메틸화에 의해 FRDA에서 하향 조절됩니다.<sup>12</sup> 아직 프라탁신-E와 관련된 기능은 없습니다.

프라탁신은 순환계로 분비되지 않기 때문에 혈장이나 혈청에서 분석할 수 없습니다. 과거에는 그 수준 측정에 있어 FRDA 섬유아세포, 림프구, 생검용 근육 및 PBMC로부터 웨스턴 블롯 분석, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 또는 전기화학발광법이 일반적으로 이용되었습니다.<sup>13</sup> 프라탁신-E가 적혈구에서만 보인다는 사실의 발견으로 프라탁신을 혈소판이나 PBMC와 같은 개별 세포가 아닌 전혈 시료에서 분석할 수 있게 되었습니다.<sup>14</sup> 이 발견으로 프라탁신-M은 미토콘드리아가 있는 혈소판과 PBMC와 같은 혈액 세포에만 위치한다는 것이 밝혀졌습니다. 나아가, 안정 동위원소 희석법을 사용하는 질량 분석법(MS)은 높은 정밀도와 정확도로 프라탁신-M을 정량할 수 있습니다. 이러한 분석에는 주로 고분해능 MS와 나노 유속 액체 크로마토그래피 분리를 결합하여 사용하는데(나노 유속 LC/MS), 이는 시간 소모적이고 분석 기기를 유지하기 위해 엄격한 품질 관리와 전문 지식이 필요합니다.<sup>13</sup> 본 연구에서 설명한 것과 같은 질병 및 바이오마커 연구에서는

종종 통계적으로 신뢰할 수 있는 결과를 보장하기 위해 더 큰 규모의 시료 코호트 분석이 필요하므로, 처리량이 중요한 고려 사항으로 대두됩니다. 표준 유속 LC와 단위 분해능 QQQ 기기를 결합한 시스템(LC/TQ)은 특히 대규모 코호트 연구의 맥락에서 더욱 견고하고 보다 높은 처리량을 제공하도록 설계되었습니다.

표준 유속 6495 LC/TQ 기기가 프라탁신-M의 일상적인 정량에 있어 현재의 트랩-용출방식의 나노 유속 LC/MS 시스템보다 개선된 결과를 제공할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 시료를 두 시스템에서 실행했습니다. FRDA 피험자의 전혈 시료에 프라탁신-M의 안정 동위원소 유사체를 스파이킹한 다음 IP로 농축하고 Asp-N 프로테아제로 분해했습니다. 분해된 펩타이드를 두 종류의 LC/MS 기기에서 분석했습니다. 선형 표준 곡선 회귀직선의 상관 계수, 검출 한계(LOD) 및 정량 하한(LLOQ) 모두 6495 LC/TQ 시스템에서 더 나은 결과를 보여주었습니다. 이러한 결과는 포획-용출 기반의 나노 유속 LC/MS 시스템에 필요한 것보다 더 적은 온컬럼 시료 로딩으로 달성되었습니다. 또한 두 LC/MS 플랫폼에서 기기 실행 시간에 큰 차이가 있었습니다. 즉, 전체 개별 실행 시간이 6495 LC/TQ 시스템에서 11분, 나노 유속 LC/MS 시스템에서 105분이었습니다. 따라서 대조군 10명과 FRDA 피험자 30명의 혈액 시료에 대한 일반적인 분석 시료를 나노 유속

LC/MS 시스템에서 필요한 8일이 아닌 하루 안에 완료할 수 있었습니다. 이러한 데이터는 표준 유속 6495 LC/TQ 플랫폼이 혈액 시료에서 높은 처리량으로 프라탁신-M을 정량하는 목적에서 트랩-용출 나노 유속 LC/MS 시스템보다 더 적합함을 입증합니다.

## 실험

### 화학 및 재료

달리 명시되지 않는 한 모든 시약과 용매는 LC/MS 등급 품질이었습니다. [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-leucine은 Cambridge Isotope Laboratories(Andover, MA)에서 구입했습니다. 항프라탁신 항체(클론 1D9)는 LifeSpan Biosciences, Inc.(Seattle, WA)에서 구입했습니다. DMP(Dimethyl pimelimidate dihydrochloride), EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), cOmpete Mini EDTA-free EASYpack 프로테아제 억제제 카테일 정제, endoproteinase Asp-N Asp-N 시퀀싱 등급, DL-DTT(DL-dithiothreitol), 소 혈청 알부민(BSA), 인간 리소자임, 이미다졸, 글리세롤, PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 트리에탄올아민, 에탄올아민 및 M9 배지(M9 Minimal Salts, 5X 분말, 최소 미생물 성장 배지)는 MilliporeSigma(Billerica, MA)에서 구입했습니다. Ni-NTA 아가로스 수지는 Qiagen(Germantown, MD)에서 구입했습니다. HPLC 등급의 물과 아세트니트릴은 Burdick & Jackson(Muskegon, MI)에서 구입했습니다. 중탄산암모늄과 아세트산은 Fisher Scientific(Pittsburgh, PA)에서 구입했습니다. Protein G 자성 Dynabeads는 Life Technologies Corporation(Grand Island, NY)에서 구입했습니다.

### 전혈 시료

영향을 받지 않은 건강한 대조군 2명과 동형접합체 FRDA 피험자 38명으로부터 혈액 시료를 채취했습니다. 동시에 모두 필라델피아 어린이 병원에서 진행 중인 자연사(natural history) 연구에

등록되었습니다. 연구에 참여하는 각 기여자로부터 서면 동의를 얻었습니다. 피험자가 18세 미만인 경우 부모 또는 법적 보호자로부터 서면 동의를 얻었습니다. 해당 연구는 필라델피아 어린이 병원의 IRB(Institutional Review Board)의 승인을 받았습니다(IRB 프로토콜 # 01-002609). 정맥혈을 8.5mL 보라색 캡 Vacutainer EDTA 튜브에 채취하고 부드럽게 뒤집어 혼합했습니다. 모든 시료를 즉시 Eppendorf 튜브에 분주하고 분석할 때까지 -80°C에서 동결했습니다.

### 비표지 및 안정 동위원소 표지 프라탁신-M의 발현과 정제

비표지 및 안정 동위원소 표지(SILAC)된 활성형 프라탁신(Frataxin-M)의 발현은 이전에 설명한 바와 같이 *Escherichia coli* BL21 DE3에서 수행되었습니다.<sup>15</sup> 간략하게 설명하면, 인간 활성형 프라탁신(81-210)의 코딩 서열을 FXN cDNA 플라스미드(pTL1)로부터 증폭시킨 다음, pET21b 플라스미드로 클로닝하고 6x 히스티딘(His) 서열에 연결하였습니다. 6X 히스-태그(His-tag)와 융합된 프라탁신은 1mM MgSO<sub>4</sub>, 10μM CaCl<sub>2</sub>, 0.5% 포도당 및 100mg/L 암피실린을 포함한 M9 배지 내 *Escherichia coli* BL21 DE3에서 발현되었습니다. 비표지 프라탁신 발현의 경우, M9 배지에 0.025% leucine을 첨가했습니다. SILAC 표지 프라탁신 발현에는 M9 배지에 0.025% [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-leucine을 첨가했습니다. 세포 펠릿을 수집하고 100μg/mL 인간 리소자임을 포함한 용해 완충액(50mM Tris-HCl (pH 8.0), 500mM NaCl, 10mM 이미다졸, 10% 글리세롤, 2mM β-mercaptoethanol, 2x 프로테아제 억제제 혼합물, 1mM PMSF)에 용해했습니다. 용해물을 4°C에서 30분간 20,000 x g로 원심분리하고 상등액을 Ni-NTA 수지로 정제했습니다. 비표지 프라탁신-M 및 SILAC 표지 프라탁신-M의 순도는 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색에 의해 >95%인 것으로 확인되었습니다.

### IP 전 전혈 시료 전처리

모든 혈액 시료를 실온에서 해동하고 각 시료 500μL를 프로테아제 억제제 카테일을 포함한 750μL의 NP-40 용해 완충액(150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% Triton X-100, 0.5% NP-40, 1mM DTT, 1mM EDTA)과 혼합했습니다. 동일한 양의 SILAC 표지 프라탁신-M(20ng)을 내부 표준으로 각 시료(검량물질, QC 및 전혈)에 스파이킹했습니다. Sonic dismembrator(Fisher, Pittsburgh, PA)를 사용하여 강도 5에서 30 펄스 동안 얼음에서 프로브 초음파 처리로 시료를 용해한 다음 4°C에서 15분간 17,000g로 원심분리했습니다. 상등액을 펠릿에서 옮기고 면역침강(IP)을 위해 사전 제작된 DMP 가교 항프라탁신 단백질 G Dynabeads와 함께 배양했습니다.

### 면역침강(IP) 및 Asp-N 분해

마우스 단클론 항프라탁신 항체(4μg)는 이전에 설명한 대로 DMP를 통해 단백질 G 비드(0.5mg)와 가교 결합되었습니다.<sup>15</sup> 간략히 설명하면, 마우스 단클론 항프라탁신 항체를 먼저 단백질 G 자성 Dynabeads와 함께 밤새 4°C에서 배양하여 항체 결합 비드를 형성시켰습니다. mAb 결합 비드를 실온에서 1시간 동안 13mg/mL DMP 용액과 함께 배양하여 안정적으로 가교 결합된 항프라탁신 단백질 G 자성 Dynabeads를 생성했습니다. 가교된 단백질 G 비드는 4°C에서 1주일 동안 PBS에 보관할 수 있습니다. 처리된 전혈 시료(1.25mL)를 0.5mg 항프라탁신 단백질 G 자성 Dynabeads에 첨가하여 회전 교반 하에 4°C에서 밤새 IP를 수행했습니다. 비드를 0.02% Tween-20을 포함한 PBS로 3회 세척하고 프라탁신-M을 100μL의 용출 완충액(10% 아세트니트릴을 함유하는 100mM 아세트산 수용액)으로 용출시켰습니다. 용출액을 비활성 처리된 유리 인서트(Waters, Milford, MA)로 옮기고 진공 농축기(Jouan RC 10.22, Fisher, Pittsburgh, PA)에서 건조시켰습니다. 시료를 100ng Asp-N 함유 25mM 중탄산암모늄 수용액 50μL에 용해하고 LC/MS 분석 전 밤새 37°C에서 배양했습니다.

## LC/MS 분석

Agilent 1290 Infinity II LC 시스템을 결합한 6495 QQQ LC/MS 시스템을 사용하여 표준 유속 초고성능 액체 크로마토그래피-다중 반응 모니터링 질량 분석기(UHPLC-MRM/MS) 분석을 수행했습니다. 표 1에는 LC 조건이 자세히 나와 있습니다. 나노 유속 초고성능 액체 크로마토그래피-병렬 반응 모니터링 질량 분석기(UHPLC-PRM/MS) 분석의 경우 타사의 트랩-용출 나노 유속 LC 시스템-고분해능 궤도 트래핑 질량 분석기 조합을 사용하여 PRM 획득 모드로 수행되었습니다. 해당 UHPLC-PRM/MS 조건은 표 2에 나타냈습니다.

## 데이터 분석

데이터 분석은 Skyline(MacCoss Laboratory, University of Washington, Seattle, WA)을 사용하여 수행했습니다. 각 비표지/경(L) 펩타이드 대비 표지/중(H) 펩타이드에 대한 각 MRM 또는 PRM 전이의 피크 면적 비율을 Skyline 소프트웨어로 계산하여 절대 정량에 사용했습니다. 펩타이드 비율은 S<sup>81</sup>GTLGHPGSL<sup>90</sup> Asp-N 펩타이드의 y<sub>4</sub><sup>+</sup> 이온과 D<sup>198</sup>LSSLAYSGK<sup>208</sup>

Asp-N 펩타이드의 y<sub>8</sub><sup>+</sup> 이온에 대한 PRM 전이의 L/H 비율로 계산했습니다. 프락틴-M의 양은 각 펩타이드에 대한 표준 곡선으로부터 계산했습니다. 그런 다음 두 펩타이드에 대해 얻은 평균 농도로부터 프락틴-M 수준을 계산했습니다. 세 개의 또다른 펩타이드를 모니터링하여

프락틴-M이 존재함을 추가적으로 확인했습니다. Prism 9(GraphPad Software, LLC, macOS 버전 9.3.1용)의 선형 회귀 모델을 사용하여 GAA 반복과 프락틴 수준 사이의 상관관계 분석을 수행하였습니다.

표 1. UHPLC-MRM/MS 조건.

Agilent 1290 Infinity II LC 조건	
분석 컬럼	Agilent ZORBAX RRHD Rapid Resolution HD, 2.1 x 50mm, 1.8µm(품번 959757-902)
컬럼 온도	35°C
용매 A	물, 0.1% 포름산
용매 B	아세트오닐트릴, 0.1% 포름산
분석 LC 유속	0.4mL/min
그라디언트	5% B - 0분 10% B - 1.00분 24% B - 2.75분 36% B - 3.50분 95% B - 5.00분 95% B - 6.50분 5% B - 7.00분 5% B - 8.50분
주입량	2µL
주입기 온도	4°C
니들 세척	5초간 플러시
니들 세척 용매	30% 메탄올
Agilent 6495 LC/TQ 조건	
가스 온도	230°C
가스 유속	13L/min
이온 극성	양이온
Nebulizer	40psi
Sheath 가스 온도	300°C
Sheath 가스 유속	10L/min
캐필러리 전압	4,500V
노즐 전압	500V

## 결과 및 토의

### 시료 전처리

분석법 개발 과정에서 전혈 시료에 낮은 존재비로 존재하는 프라탁신-M 단백질을 분석하기 위해서는 자성 Dynabeads에 대한 항프라탁신 마우스 mAb의 공유 결합을 사용한 면역 침강법(IP)이 필요함을 확인했습니다. Dynabeads와의 결합은 존재비가 높은 단백질의 백그라운드 간섭을 최소화하는 역할을 했습니다. 또한 시료 농축 및 프로테아제 분해 과정에서 발생하는 편차로 인해, 표지된 펩타이드 내부 표준을 프로테아제 분해 단계 이후에 사용하는 것은 정확하고 정밀한 단백질 정량에 부적절합니다. 따라서, 경(L) 및 중(H) 안정 동위원소 표지 프라탁신-M 단백질을 각각 제조하고 정제했습니다. 중(H) 표지 프라탁신-M 단백질에서 중(H) leucine의 혼입은 >99.0%였습니다. 정제된 중(H) 표지 프라탁신-M 단백질은 내부 대조군으로서 IP 단계 전에 혈액 시료에 스파이킹했습니다. 전체 실험 워크플로를 그림 2에 나타냈습니다.

표 2. 나노 유속 UHPLC-PRM/MS 조건.

나노 유속 UHPLC 조건	
트랩 컬럼	Acclaim PepMap C18 카트리지, 0.3mm x 5mm, 100Å(Thermo Scientific)
분석 컬럼	C18 AQ 캐필러리 컬럼, 10µm pulled tip, 75µm x 25cm, 3µm 입자 크기(Columntip, New Haven, CT).
컬럼 온도	25°C
로딩 용매	0.1% 포름산 함유 물/아세트오니트릴(99.5:0.5; v/v)
용매 A	0.1% 포름산 함유 물/아세트오니트릴(99.5:0.5; v/v)
용매 B	0.1% 포름산 함유 아세트오니트릴/물(98.0:2.0, v/v)
트랩 컬럼 로드	4분간, 10µL/min
분석 LC 유속	400nL/min
그라디언트	2% B - 0분 2% B - 10분 35% B - 30분 60% B - 35분 98% B - 53분 80% B - 73분 2% B - 74분 2% B 100분
주입량	8µL
주입기 온도	4°C
니들 세척	5초
니들 세척 용매	10% 메탄올
궤도 트래핑 질량 분석기 조건	
스프레이 전압	2,500V
이온 전달 캐필러리 온도	275°C
이온 극성	양이온
S-렌즈 Rf 레벨	55
In-source CID	2.0eV
분해능	60,000
AGC 목표	2.00E+05
최대 IT	80ms

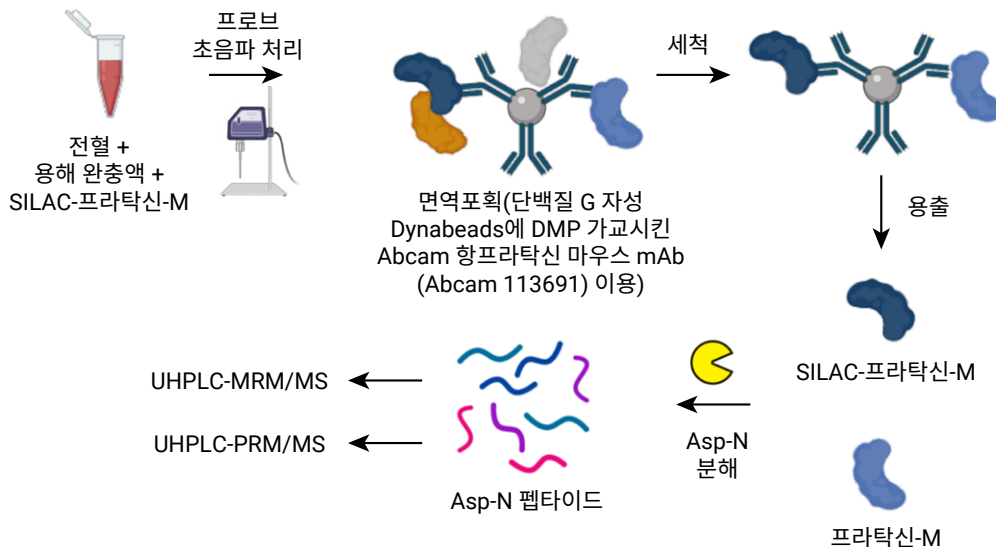


그림 2. 프라탁신-M 시료 전처리 및 LC/MS 분석을 위한 실험 워크플로의 개략도.

### MRM 대 PRM 전이

프라탁신-M 단백질의 모니터링된 펩타이드 서열, 해당 MRM 및 PRM 전이, 두 LC/MS 시스템의 펩타이드 용출 시간이 표 3에 나와 있습니다.

UHPLC-MRM/MS의 경우, 모이온과 생성 이온 모두에 명목질량이 사용되었습니다. 이와 대조적으로, UHPLC-PRM/MS의 경우 모이온에는 명목질량을 사용했지만 생성 이온에는 accurate mass가 사용되었습니다. 이론적으로는 단위 질량 LC/TQ 시스템이 고분해능 LC/MS 시스템에 비해 약간의 백그라운드 간섭이 있을 수 있지만 6495 LC/TQ의 혈액 프라탁신-M 분석에서는 이러한 문제가 관측되지 않았습니다. 따라서 초기 단백질 발견 및 분석법 개발 후 일상적인 분석을 위한 정량 정확도와 정밀도 측면에서 훨씬 더 빠른 UHPLC-MRM/MS 접근법의 가치를 평가했습니다.

### 펩타이드 분리

프라탁신-M 정량(SGTLGH $\underline{P}$ GS $\underline{L}$ ) 및 총 프라탁신 정량(DLSSLAYS $\underline{G}$ K)에 사용된 Asp-N-분해 펩타이드와 검출 확인을 위한 별도의 세 가지

펩타이드(DETTYERLAEETL, DGVSLHELLGAELTKALKTKL 및 DSLAEFFE)는 서로 잘 분리되었습니다.

분리에는 표준 유속 UHPLC-MRM/MS 및 나노 유속 UHPLC-PRM/MS 방법을 모두 사용했습니다(그림 3).

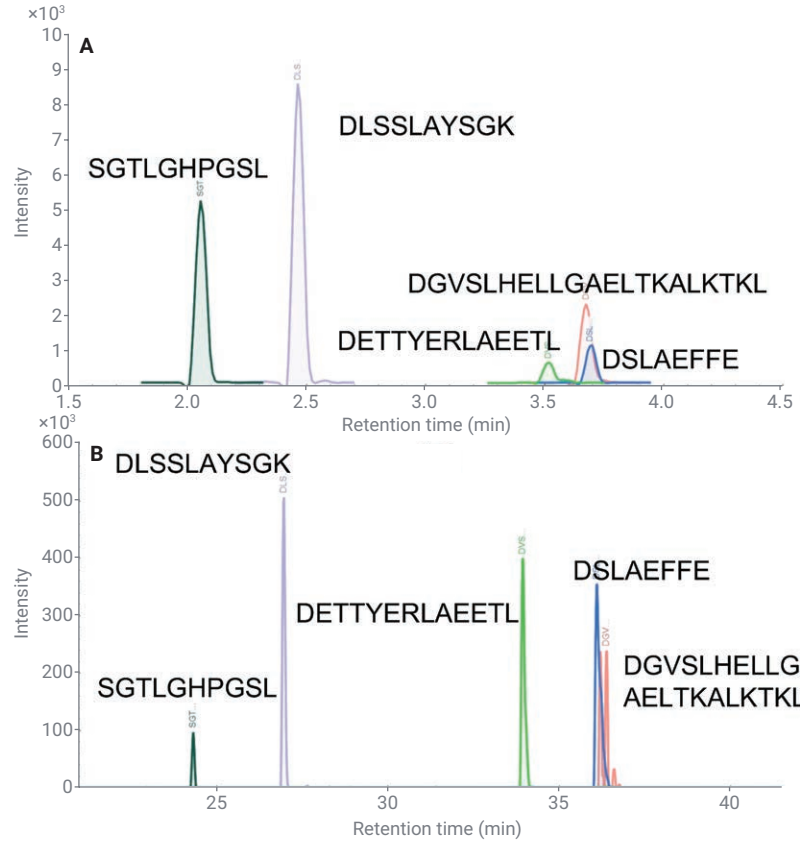


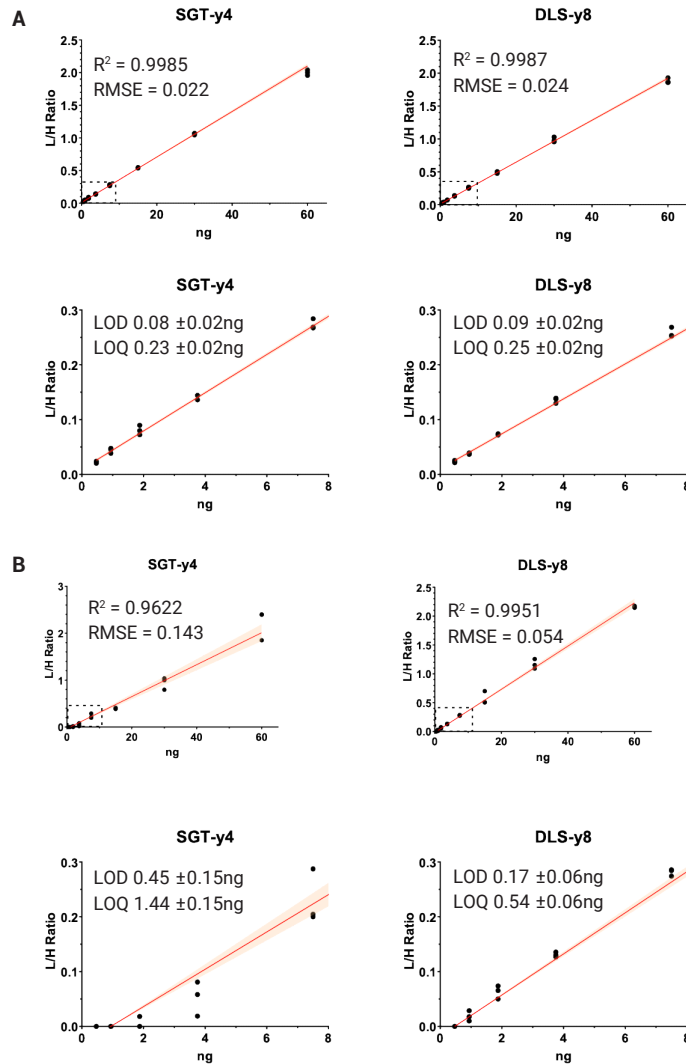
그림 3. 표적 펩타이드의 LC/MS 크로마토그램: S<sup>81</sup>SGTLGH $\underline{P}$ GS $\underline{L}$ <sup>90</sup> (펩타이드-1), D<sup>198</sup>DLSSLAYS $\underline{G}$ K<sup>208</sup> (펩타이드-2), D<sup>91</sup>DETTYERLAEETL<sup>103</sup> (펩타이드-3), D<sup>178</sup>DGVSLHELLGAELTKALKTKL<sup>198</sup> (펩타이드-4), D<sup>104</sup>DSLAEFFE<sup>111</sup> (펩타이드-5). (A) 표준 유속 UHPLC-MRM/MS. (B) 나노 유속 UHPLC-PRM/MS.

표 3. 프라탁신-M 분석을 위한 MRM/MS 및 PRM/MS 전이. 정량은 음영 처리된 항목의 펩타이드로 수행하였으며, MRM/MS의 경우 명목질량이 사용됨.  $\underline{L}$  = [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-leucine, L = light(경), H=heavy(중).

번호	시작	종료	펩타이드	L 또는 H	모이온	모이온 (m/z)	생성 이온 1	생성 이온 1 (m/z)	생성 이온 2	생성 이온 2 (m/z)	생성 이온 3	생성 이온 3 (m/z)	RT UHPLC (min)	RT Nano-UHPLC (min)
1	81	90	SGTLGH $\underline{P}$ GS $\underline{L}$	L	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	463.24	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	680.373	y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	567.289	y <sub>4</sub> <sup>+</sup>	373.208	2.02	24.05
1	81	97	SGT $\underline{L}$ GH $\underline{P}$ GS $\underline{L}$	H	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	469.26	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	692.413	y <sub>6</sub> <sup>+</sup>	573.309	y <sub>4</sub> <sup>+</sup>	379.229	2.02	24.05
2	198	208	DLSSLAYS $\underline{G}$ K	L	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	520.77	y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	812.415	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	725.383	y <sub>3</sub> <sup>+</sup>	291.166	2.44	26.85
2	198	208	D $\underline{L}$ SSLAYS $\underline{G}$ K	H	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	527.79	y <sub>8</sub> <sup>+</sup>	818.435	y <sub>7</sub> <sup>+</sup>	731.403	y <sub>3</sub> <sup>+</sup>	291.166	2.44	26.85
3	91	103	DETTYERLAEETL	L	MH <sub>3</sub> <sup>3+</sup>	523.91	b <sub>12</sub> <sup>**</sup>	719.820	b <sub>11</sub> <sup>**</sup>	669.296	b <sub>10</sub> <sup>**</sup>	604.775	3.26	32.25
3	91	103	DETTYER $\underline{L}$ AEET $\underline{L}$	H	MH <sub>3</sub> <sup>3+</sup>	527.93	b <sub>12</sub> <sup>**</sup>	722.830	b <sub>11</sub> <sup>**</sup>	672.307	b <sub>10</sub> <sup>**</sup>	607.785	3.26	32.25
4	178	198	DGVSLHELLAELTKALKTKL	L	MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup>	563.33	y <sub>12</sub> <sup>**</sup>	643.906	y <sub>11</sub> <sup>**</sup>	608.387	b <sub>2</sub> <sup>+</sup>	173.056	3.66	37.05
4	178	198	DGVSL $\underline{H}$ EL $\underline{L}$ LAELTKA $\underline{L}$ TK $\underline{L}$	H	MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup>	563.33	y <sub>12</sub> <sup>**</sup>	652.936	y <sub>11</sub> <sup>**</sup>	617.417	b <sub>2</sub> <sup>+</sup>	173.056	3.66	37.05
5	104	111	DSLAEFFE	L	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	479.21	b <sub>4</sub> <sup>+</sup>	387.187	b <sub>3</sub> <sup>+</sup>	316.150	y <sub>2</sub> <sup>+</sup>	295.129	3.68	36.05
5	104	111	DS $\underline{L}$ AEFFE	H	MH <sub>2</sub> <sup>2+</sup>	482.22	b <sub>4</sub> <sup>+</sup>	393.208	b <sub>3</sub> <sup>+</sup>	316.150	y <sub>2</sub> <sup>+</sup>	295.129	3.68	36.05

MS 신호는 두 시스템 모두 검출 및 정량에 적절했지만, PRM/MS 시스템(8 $\mu$ L, 표 2)보다 MRM/MS 시스템에서 시료가 더 적게 (2 $\mu$ L, 표 1) 주입되었습니다. 표준 곡선은 SGTLGHPGSL(MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> → y<sub>4</sub><sup>+</sup>) 및 DLSSLAYS GK(MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> → y<sub>8</sub><sup>+</sup>)에 대해 0.5~60ng 범위에서 선형이었습니다. 이 곡선은 표준 유속 UHPLC-MRM/MS 시스템에서 각각 0.9985 및 0.9985의 R<sup>2</sup>를 가졌습니다(그림 4A). 나노 유속 UHPLC-PRM/MS 시스템의 곡선은 각각 0.9622 및 0.9951의 R<sup>2</sup>를 가졌습니다(그림 4B). 6495 LC/TQ 시스템에서 얻은 표준 곡선은 나노 유속 UHPLC-PRM/MS 시스템에서 얻은 표준 곡선에 비해 더 우수한 정밀도와 정확도를 보여줍니다. 결과는 표준 유속 UHPLC-MRM/MS 시스템에서 두 펩타이드에 대해 더 나은 LOD 및 LOQ를 보여주었습니다(그림 4).

또한 실행 시간에 있어 큰 차이를 보였는데, 나노 유속 UHPLC에서는 38분이었지만 표준 유속 UHPLC 시스템에서는 4분 이내에 5개의 펩타이드가 모두 용출되었습니다(그림 3). 이러한 실행 시간을 전체 개별 실행 시간으로 변환하면 표준 유속 UHPLC 시스템의 경우 11분, 나노 유속 UHPLC 시스템에서 105분이었습니다(그림 5). 프라탁신-M에 대한 일반적인 분석에는 FRDA 피험자의 혈액 시료 30개와 표준물질 10개가 포함됩니다. 이러한 시료를 3회 반복 분석하는 데 걸린 시간은 나노 유속 UHPLC-PRM/MS 시스템에서 8일 18시간인데 비해 표준 유속 UHPLC-MRM/MS에서는 23시간이었습니다(그림 5). 표준 유속 UHPLC-MRM/MS를 사용했을 때 기기 실행 시간이 크게 줄어들고 정량 품질이 향상된 덕분에 실험실에서 여러 가지 다른 고처리량 프라탁신 연구를 수행할 수 있었습니다.<sup>11,12</sup>



**그림 4.** 펩타이드 SGTLGHPGSL.D (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> → y<sub>4</sub><sup>+</sup>) 및 L.DLSSLAYS GK.D (MH<sub>2</sub><sup>2+</sup> → y<sub>8</sub><sup>+</sup>)에 대한 검량선. (A) UHPLC-MRM/MS. (B) 나노 유속 UHPLC-PRM/MS. 항목별 상단 플롯에는 0~80ng 범위의 레벨에 대하여 상관계수(R<sup>2</sup>) 및 제곱근 평균제곱오차(RMSE)를 포함한 검량선이 나타나 있으며, 하단 플롯에는 0~8ng 범위의 낮은 레벨에 대한 검량선이 해당 LOD 및 LOQ와 함께 표시되어 있음.

## 건강한 대조군 및 FRDA 피험자 혈액 시료

두 명의 건강한 대조군에서 프라탁신-M의 혈중 수치는 각각 4.5 및 5.2ng/mL였으며 (그림 6), 이는 이전 연구에서 발견된 수치와 유사합니다. 이와 대조적으로, FRDA 피험자에서 발견된 혈중 프라탁신-M 수치는 0.3~3.8ng/mL 범위였습니다. FRDA 피험자 시료에서 발견된 가장 높은 농도는 평균 200 GAA 반복을 가진 피험자에서 나온 것으로, 이는 질병이 경증인 것과 일치했습니다. 가장 낮은 농도는 평균 1,000 GAA 반복을 가진 피험자에서 나온 것으로, 이는 질병이 가장 심각한 것과 일치했습니다. 흥미롭게도, 프라탁신-M 수치와 평균 GAA 반복 사이에 훌륭한 상관관계( $R^2 = 0.8547$ )가 있었습니다(그림 6). 이 상관관계는 나노 유속 UHPLC-PRM/MS를 사용하여 이전에 밝혔던 결과와 일치합니다.<sup>13</sup> Y축의 절편은 건강한 대조군의 혈액에서 발견된 평균 프라탁신-M 수치에 상응합니다.

## 결론

전혈 시료에서 프라탁신 프로테오폼을 농축하기 위해 공유결합된 항프라탁신 마우스 mAb를 사용하는 면역침강법(IP)을 개발했습니다. 안정 동위원소 표지 중 프라탁신-M 단백질을 내부 표준으로 IP 단계 전에 혈액 시료에 스파이킹했습니다. 그런 다음 모든 IP 시료를 Asp-N 프로테아제로 분해했습니다. 초기에는 나노 유속 UHPLC-PRM/MS 시스템을 표적 펩타이드 정량에 사용하였습니다. 그 후, Agilent 6495 LC/TQ 시스템을 사용하여 컬럼 내 시료 농축 없이 훨씬 더 빠른 표준 유속 UHPLC-MRM/MS 분석법을 개발했습니다. 이 응용 자료에서는 전혈 시료 내 프라탁신-M 단백질의 정량에 관한 두 LC/MS 시스템의 분석 성능을 비교하여

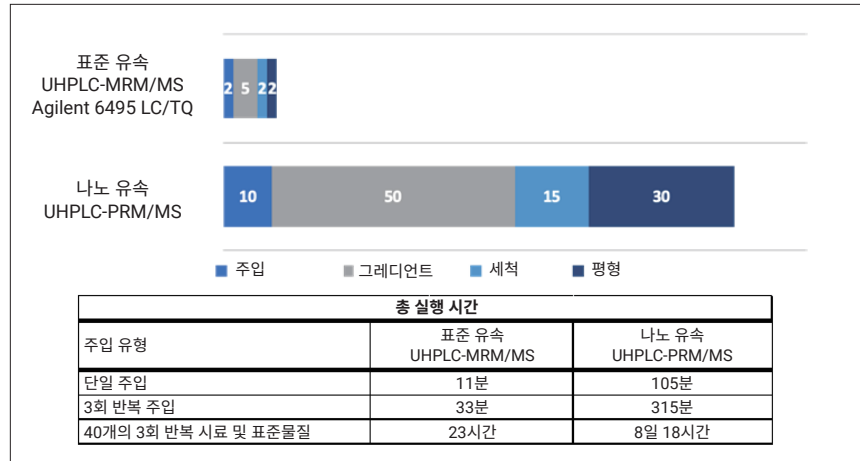


그림 5. 표준 유속 UHPLC-MRM/MS와 나노 유속 UHPLC-PRM/MS 분석법 간의 LC/MS 실행 시간 비교. 두 분석법 모두 세 번의 세척이 포함되었음(검량 후 및 시료 후 시작).

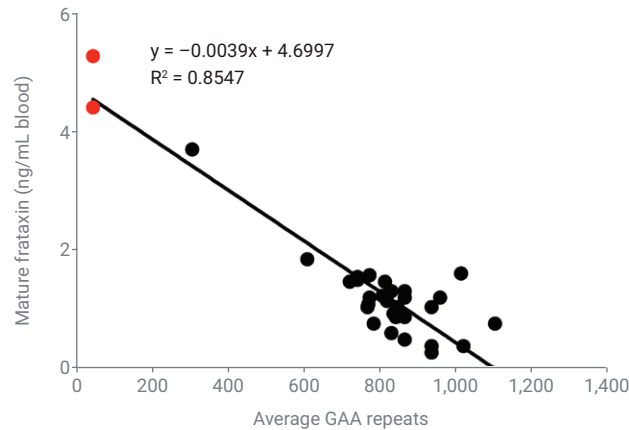


그림 6. Agilent 6495 LC/TQ 분석 결과를 바탕으로 혈액 시료의 인간 프라탁신-M 농도는 질병 피험자 유전자의 평균 GAA 반복과 높은 상관관계를 가졌음. 건강한 대조군은 빨간색으로 표시.

나타냈습니다. 6495 LC/TQ 시스템을 사용하면 분석이 훨씬 빠르고 선형성, 정밀도 및 정확도가 뛰어나 이전의 나노 유속 UHPLC-PRM/MS 분석법을 훨씬 더 빠른 표준 유속 UHPLC-MRM/MS 분석법으로 대체할 수 있었습니다.

## 참고 문헌

1. Evans-Galea, M. V. *et al.* Cell and Gene Therapy for Friedreich Ataxia: Progress to Date. *Hum. Gene Ther.* **2014**, *25*(8), 684–93. Epub 2014/04/23. doi: 10.1089/hum.2013.180. PubMed PMID: 24749505.
2. Pousset, F. *et al.* Durr A. A 22-Year Follow-up Study of Long-term Cardiac Outcome and Predictors of Survival in Friedreich Ataxia. *JAMA Neurol.* **2015**, *72*(11), 1334–41. Epub 2015/09/29. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.1855. PubMed PMID: 26414159.
3. Lynch, D. R. *et al.* Safety, Pharmacodynamics, and Potential Benefit of Omaveloxolone in Friedreich Ataxia. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2019**, *6*(1), 15–26. Epub 2019/01/19. doi: 10.1002/acn3.660. PubMed PMID: 30656180; PMCID: PMC6331199.
4. Santos, R. *et al.* Friedreich Ataxia: Molecular Mechanisms, Redox Considerations, and Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox. Signal* **2010**, *13*(5), 651–90. Epub 2010/02/17. doi: 10.1089/ars.2009.3015. PubMed PMID: 20156111; PMCID: PMC2924788.
5. Gellera, C. *et al.* Frataxin Gene Point Mutations in Italian Friedreich Ataxia Patients. *Neurogenetics* **2007**, *8*(4), 289–99. Epub 2007/08/19. doi: 10.1007/s10048-007-0101-5. PubMed PMID: 17703324.
6. Sacca, F. *et al.* A Combined Nucleic Acid and Protein Analysis in Friedreich Ataxia: Implications for Diagnosis, Pathogenesis and Clinical Trial Design. *PLoS One* **2011**, *6*(3), e17627. Epub 2011/03/18. doi: 10.1371/journal.pone.0017627. PubMed PMID: 21412413; PMCID: PMC3055871.
7. Rotig, A. *et al.* Aconitase and Mitochondrial Iron-Sulphur Protein Deficiency in Friedreich Ataxia. *Nat. Genet.* **1997**, *17*(2), 215–7. doi: 10.1038/ng1097-215. PubMed PMID: 9326946.
8. Delatycki, M. B.; Bidichandani, S. I. Friedreich Ataxia- Pathogenesis And Implications for Therapies. *Neurobiol Dis.* **2019**, *132*, 104606. Epub 20190905. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104606. PubMed PMID: 31494282.
9. Doni, D. *et al.* The Displacement of Frataxin from the Mitochondrial Cristae Correlates with Abnormal Respiratory Supercomplexes Formation and Bioenergetic Defects in Cells of Friedreich Ataxia Patients. *FASEB J.* **2021**, *35*(3), e21362. doi: 10.1096/fj.202000524RR. PubMed PMID: 33629768.
10. Monfort, B. *et al.* Recent Advances in the Elucidation of Frataxin Biochemical Function Open Novel Perspectives for the Treatment of Friedreich’s Ataxia. *Front Neurosci.* **2022**, *16*, 838335. Epub 20220302. doi: 10.3389/fnins.2022.838335. PubMed PMID: 35310092; PMCID: PMC8924461.
11. Guo, L. *et al.* Characterization of a New N-Terminally Acetylated Extra-Mitochondrial Isoform of Frataxin in Human Erythrocytes. *Sci. Rep.* **2018**, *8*(1), 17043. Epub 2018/11/20. doi: 10.1038/s41598-018-35346-y. PubMed PMID: 30451920; PMCID: PMC6242848.
12. Rodden, L. N. *et al.* DNA Methylation in Friedreich Ataxia Silences Expression of Frataxin Isoform E. *Sci. Rep.* **2022**, *12*(1), 5031. Epub 20220323. doi: 10.1038/s41598-022-09002-5. PubMed PMID: 35322126; PMCID: PMC8943190.
13. Wang, Q. *et al.* Simultaneous Quantification of Mitochondrial Mature Frataxin and Extra-Mitochondrial Frataxin Isoform E in Friedreich’s Ataxia Blood. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, 874768. Epub 20220428. doi: 10.3389/fnins.2022.874768. PubMed PMID: 35573317; PMCID: PMC9098139.
14. Blair, I. A. *et al.* The Current State of Biomarker Research for Friedreich’s Ataxia: a Report from the 2018 FARA Biomarker Meeting. *Future Sci. OA.* **2019**, *5*(6), FSO398. Epub 2019/07/10. doi: 10.2144/fsoa-2019-0026. PubMed PMID: 31285843; PMCID: PMC6609901.
15. Guo, L. *et al.* Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Analysis of Platelet Frataxin as a Protein Biomarker for the Rare Disease Friedreich’s Ataxia. *Anal. Chem.* **2018**, *90*(3), 2216–23. Epub 2017/12/23. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04590. PubMed PMID: 29272104; PMCID: PMC5817373.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

RA44930.5725

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2023  
2023년 1월 26일 한국에서 발행  
5994-5608KO

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)

