

생체에너지 측정과 LC/MS 오믹스를 결합하여 약물 치료에 대한 세포 및 분자 반응 조명



저자

Mark Sartain,
Genevieve Van de Bittner,
Natalia Romero, James Pyke,
Yoonseok Kam,
Maria Apostolidi 및
Dustin Chang
Agilent Technologies, Inc.

개요

여러가지 대사 세포 분석 기술을 결합하면 단일 분석 기술로는 밝혀낼 수 없는 새로운 생물학적 통찰력을 발견할 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 세포 수준에서의 Agilent Seahorse XF 생체에너지 분석을 분자 수준에서의 Agilent Revident Q-TOF LC/MS 대사체 및 지질체 분석과 결합하여 약물 처리된 암세포의 대사 적응을 조사했습니다. 티로신 키나제 억제제를 처리한 백혈병 세포는 미토콘드리아 기능이 감소하고 대사 경로 사용이 변화되었습니다. 미토콘드리아 기능, 대사체학 및 지질체학에 대한 통찰력을 결합한 것만으로 새로운 생물학적 가설을 발견했습니다. 즉, 처리된 백혈병 세포는 감소된 미토콘드리아 기능을 극복하기 위해 아나플레로시스를 상향 조절했으나, 두 억제제 중 하나에만 반응했습니다. 이러한 다중 기술을 결합한 세포-분자 워크플로는 약물 화합물의 대사 작용 메커니즘과 오프타겟 효과를 밝혀내는 데 사용할 수 있습니다.

소개

암세포는 대사 재프로그래밍을 통해 구성 요소와 에너지 대사체의 생산을 변화시킵니다.¹ 암세포 내에서 재프로그래밍된 대사 경로와 추정 치료제에 대한 대사 경로 반응을 식별하면 새로운 치료 표적이나 복합 치료법을 개발하는 데 효과적인 결과를 기대할 수 있습니다. 이를 위해 상호 보완적인 기술을 결합하면 암세포의 약물 유도 대사 경로 조절에 대한 더욱 깊은 통찰력을 얻을 수 있는 시너지 효과를 얻을 수 있습니다.

특히, Agilent Seahorse XF Pro 분석기를 이용한 분석으로 산소 소비율(OCR)과 세포의 산성화율(ECAR)을 측정하여 대사 플럭스(flux)에 대한 세포 수준의 모니터링이 가능합니다. ECAR 및 OCR 데이터를 통해 관찰된 해당작용 및 호흡 속도는 살아있는 세포의 기능에 대한 통찰력을 제공합니다. 해당작용 및 미토콘드리아 대사 경로는 활성화, 증식, 분화, 세포 사멸 및 질병 진행을 포함한 다양한 세포 과정에서 중요한 역할을 하기 때문입니다. 한편, LC/MS 기반 오믹스와 정성적 플럭스(flux) 분석은 대사체의 존재비나 동위원소 표지 결합 정도를 측정하여 대사 경로 변화를 분자적 수준에서 모니터링할 수 있습니다.

이 응용 자료는 광범위한 애질런트 하드웨어, 소프트웨어 및 어세이 키트의 광범위한 포트폴리오를 포괄적인 워크플로(그림 1)에 결합하여 티로신 키나제 억제제 계열에서 두 가지 항암제로 추정되는 약물의 대사 경로 효과를 연구합니다. 이전 응용 자료²에서 이 두 가지 억제제를 선택했습니다. 이 응용 자료에서는 80개 화합물로 구성된 티로신 키나제 억제제 라이브러리를 Agilent Seahorse XF Real-Time ATP 생성률 어세이를 통해 스크리닝하여 억제제가 해당작용 및 미토콘드리아 ATP 생성률에 미치는 급성 효과를 평가했습니다.

선택된 티로신 키나제 억제제의 대사적 영향에 대한 추정 메커니즘을 파악하기 위해 장시간 배양 후 Seahorse XF Real-Time ATP 생성률 어세이를 반복하였고, 양성자 누출과 예비 호흡량(SRC)을 분석하여 약물 처리 세포 특성 분석을 확장했습니다. 이 두 가지 측정값은 Agilent Seahorse XF Mito Stress Test에서 제공됩니다. 이와 별도로, Agilent Bravo 대사체학 시료 전처리 플랫폼에서 자동화된 시료 전처리로 이루어지는 대사체학 및 지질체학 LC/MS 분석을 통해 선택된 티로신 키나제 억제제가 분자 대사에 미치는 영향을 평가했습니다.³ 세포 추출물은 발견 워크플로에서 Agilent Revident LC/Q-TOF 및 MassHunter Explorer 소프트웨어로 분석했고, LC/MS 분석은 대사 경로 교란을 식별하는 데 사용했습니다.

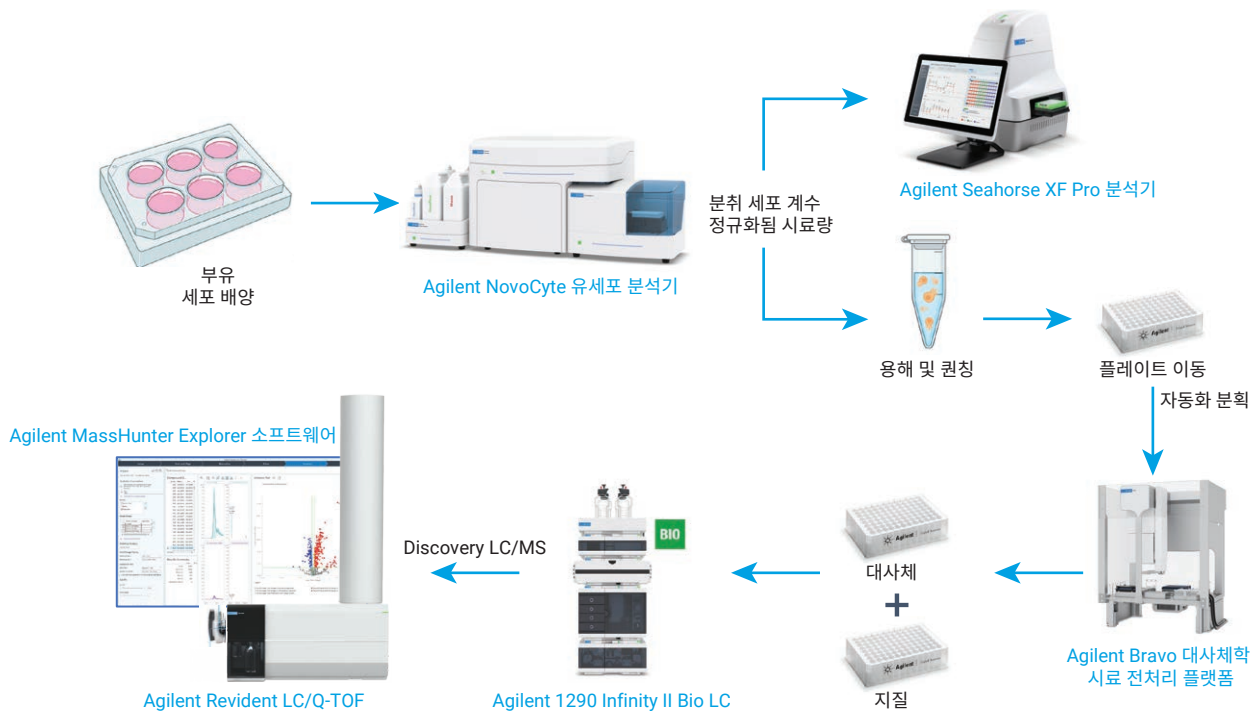


그림 1. 세포 배양부터 Seahorse XF까지, 그리고 세포 배양부터 자동 시료 전처리, Q-TOF LC/MS 분석에 이르기까지의 워크플로 개요입니다. 이 응용 자료에서 조명한 주요 기술은 파란색으로 표시되어 있습니다. 이 이미지의 세포 배양 플레이트와 마이크로튜브 부분은 BioRender.com을 통해 만들어졌습니다.

실험

재료

THP-1 세포주는 American Type Culture Collection에서 얻었고, 0.05mM 2-mercaptoethanol(Life Technologies)이 보충된 완전한 Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 배지에서 배양했습니다. 의약품 화합물 AG-879(99% HPLC 등급) 및 SU1498($\geq 98\%$ HPLC 등급)과 화합물 운반체 DMSO(평균 여과)는 MilliporeSigma에서 구입했습니다.

시료 전처리 용매 및 화학물질

LC/MS 등급 메탄올(MeOH), NMR 등급 trifluoroethanol (TFE), $\geq 99.5\%$ GC 등급 dichloromethane, 고순도($> 99.5\%$) 에탄올, LC 등급 또는 99.9% 순도 부탄올, LC/MS 등급 아세토니트릴(ACN).

LC/MS 이동상 용매 및 화학물질

포름산 암모늄과 아세트산 암모늄은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, US)에서 구입했습니다. MeOH(LC/MS용 하이퍼그레이드, LiChrosolv), ACN(LC/MS용 하이퍼그레이드, LiChrosolv) 및 2-propanol(LC/MS용 하이퍼그레이드, LiChrosolv)은 Supelco(Bellefonte, PA, U.S.)에서 구입했습니다. 시료 전처리 및 LC/MS 분석을 위한 초순수는 LC-Pak Polisher와 0.22 μ m point-of-use 멤브레인 필터 카트리지가(MilliporeSigma)가 장착된 Milli-Q Integral 시스템을 사용하여 준비했습니다.

기기

Agilent NovoSampler Q 시스템(제품 번호 2010201)과 결합된 **Agilent NovoCyte Advanteon 유세포 분석기**(3개 레이저). Agilent NovoCyte Quanteon 및 Penteon 유세포 분석기는 NovoSampler Q 시스템과 함께 사용하면 이 워크플로에 적합합니다. 이 응용 자료의 데이터는 NovoSampler Q 시스템과 함께 NovoCyte Quanteon 유세포 분석기를 사용하여 수집했습니다. 유세포 분석기와 함께 사용되는 액세서리 및 소모품은 다음과 같습니다.

- Agilent NovoCyte 품질 관리 및 검량 입자(제품 번호 8000004)
- Agilent NovoCyte 대형 유체 카트 (제품 번호 2010117AA)

다음 소모품을 갖춘 Agilent **Seahorse XF Pro 분석기**(제품 번호 S7855A):

- Agilent Seahorse XF Real-Time ATP 생성률 어세이 (제품 번호 103592-100)
- Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test 키트 (제품 번호 103015-100)
- Agilent Seahorse XFe96/XF Pro PDL FluxPak Mini (제품 번호 103798-100)

Agilent **Bravo 대사체학 시료 전처리 플랫폼**(제품 번호 G5589AA), 다음의 프로토콜을 포함:

- Supplementary Dual Metabolite + Lipid Cell Sample Preparation Vworks 프로토콜(자세한 내용은 Agilent 자동화 워크플로 전문가에게 문의)

Agilent **1290 Infinity II Bio LC 시스템**, 다음으로 구성:

- Agilent 1290 Infinity II Bio 고속 펌프(제품 번호 G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II Bio 멀티샘플러, 온도 조절 장치 포함 (제품 번호 G7137A)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(제품 번호 G7116B), Agilent InfinityLab Quick Change 2-포지션/10포트 Bio 밸브, 1,300bar(제품 번호 G5641A) 장착

Dual Agilent Jet Stream technology 소스를 포함한 Agilent **Revident LC/Q-TOF**(제품 번호 G6575A)도 사용되었습니다.

소프트웨어

LC/Q-TOF용 Agilent **MassHunter Acquisition 소프트웨어** 버전 12.0을 사용하여 Revident LC/Q-TOF 시스템을 작동했습니다.

Agilent **MassHunter Explorer 소프트웨어** 버전 1.0을 사용하여 feature 추출 및 차등 분석을 수행했습니다. 대사체 분석을 위해 다음과 같은 수정을 거쳐 Default-Metabolomics.M 분석법을 사용했습니다. Height 필터: 1,500; 이온 종: -H, +CH₃COO; multi-pass exhaustive grouping 사용; 질량 허용 오차 ± 10 ppm; 최소 한 시료 그룹의 데이터 파일 중 최소 75%에서 스코어(MFE) ≥ 70 ; RT Correction 사용(참조 데이터 파일 사용). 지질 분석을 위해 다음과 같은 수정을 거쳐 Default-Metabolomics.M 분석법을 사용했습니다. 높이 필터: 600; 이온 종: +H, +NH₄⁺, +Na; multi-pass exhaustive grouping 사용; RT 허용 오차 ± 0.15 분; 질량 허용 오차 ± 10 ppm; 최소 한 시료 그룹의 데이터 파일 중 최소 75%에서 스코어(MFE) ≥ 70 . 두 프로젝트 모두 백그라운드 감산을 위해 모든 그룹에 추출 블랭크(대조군)에 대한 fold change 테스트를 적용했으며, 최소 쌍 2개와 1개를 컷오프로 삼았습니다. 다른 파라미터는 그림에 나와 있습니다.

Agilent **Mass Profiler Professional(MPP) 소프트웨어** 버전 15.1을 사용하여 추가적인 차등 분석과 결과 시각화를 수행했습니다. MassHunter Explorer 프로젝트에서 데이터 소스로 파일(.pfa)을 가져왔습니다. 양이온 지질 데이터 세트는 "Lipidomics" 실험 타입으로 생성했습니다. Percentile shift 정규화 알고리즘(75%)을 사용하였으며, 데이터세트의 비교 기준으로 전체 시료의 중앙값(median)을 선택했습니다.

기본 분석법 파라미터를 포함하는 Agilent **MassHunter Lipid Annotator 소프트웨어** 버전 1.0이 사용되었으며, 양이온 모드 분석에는 [M+H]⁺ 및 [M+NH₄]⁺ 전구체만 고려되었습니다. FAHFA 지질 종류는 선택 취소했습니다.

세포 배양

보충된 RPMI 배지에서 배양된 THP-1 세포는 2-8 × 10⁵ 세포/mL 사이로 유지되었습니다. 세포 배양액은 최종 DMSO 함량이 1% (v/v)가 되도록 4.98µM SU1498, 1.36µM AG-879 또는 DMSO 운반체로 2시간 또는 18시간 동안 처리했습니다. 18시간 처리의 경우, 세포를 6 × 10⁵ 세포/mL의 밀도로 시딩하여 18시간 후 7.5 × 10⁵ 세포/mL의 목표 밀도에 도달했습니다. 2시간 처리의 경우, Seahorse XF 어세이를 시작하기 전에 2시간 및 18시간 처리된 세포의 동일한 세포 분열 및 배지 조절을 유지하기 위해 전날 사용된 세포 배양액에서 세포를 채취하여 18시간 배양 처리를 준비했습니다.

시료 정규화를 위한 NovoCyte 세포 계수

세포 계수는 Seahorse XF Pro 분석기와 LC/MS 시료 정규화에 모두 사용되었으며, NovoSampler Q를 갖춘 NovoCyte Quanteon 유세포 분석기와 이전에 설명한 것과 유사한 절차를 사용하여 수행했습니다.⁴ DMSO 대조 시료에서 400µL를 두 개의 200µL 분취량으로 나누어 살아 있는 세포/죽은 세포 시료 대조군을 만들었습니다. 200µL 분취량 하나는 실온에 보관하고, 두 번째 200µL 분취량은 죽은 세포 대조군을 만들기 위해 65°C에서 10분간 가열했습니다. 가열한 시료를 실온에서 몇 분간 식힌 뒤, 살아 있는 세포와 죽은 세포 시료를 다시 합쳐서 부드럽게 혼합했습니다. 살아 있는/죽은 시료에서 100µL씩 2개 분취량, 각 실험 시료에서 100µL씩 1개 분취량을 떼어 U자형 바닥 96웰 플레이트로 옮겼습니다. 세포 생존력 분석을 위해 7-AAD(0.1mg/mL) 1µL 분취량을 각 시료에 첨가하였고, 살아 있는 시료/죽은 시료 하나는 염색되지 않은 대조군으로 보관했습니다. 시료를 피펫으로 가볍게 섞은 후, 플레이트를 NovoSampler Q에 넣어 데이터를 수집했습니다. 살아 있는 세포/죽은 세포 시료는 데이터 분석 중 살아 있는 세포와 죽은 세포 게이트를 정의하는 데 사용되었습니다. Seahorse XF Pro 분석기 세포 계수 정규화를 위해 살아있는 세포 계수만 사용했는데, 살아있는 세포만 OCR 및 ECAR 신호에 기여하기 때문입니다. 모든 세포가 피크 존재비 신호에 기여하므로 LC/MS 세포 계수 정규화를 위해 전체 세포 계수가 사용되었습니다.

Seahorse XF Pro 분석기 셀 준비

18시간 처리를 위해, 1.4mL의 세포 배양액을 12웰 플레이트에 첨가하고, 약물 화합물이나 운반체를 첨가한 후, 시료를 완전히 혼합했습니다. 18시간 후, 피펫으로 시료를 잘 섞어 균일한 세포 부유물을 만든 다음, 세포 계수를 위해 100µL씩 분취했습니다. 이와 동시에 각 시료 1mL을 1.5mL 마이크로 원심분리 튜브로 옮기고 실온에서 250xg로 5분간 원심분리하여 세포를 침전시켰습니다. 세포 계수가 완료된 후, 1mL 세포 배양액에서 상층액을 제거했습니다. 그런 다음, 약물 화합물이나 운반체가 포함된 Agilent Seahorse XF RPMI 배지를 각 시료에 mL당 100만 세포가 될 수 있는 용량으로 첨가했습니다. 각 시료 50µL를 분취하여 Seahorse XFe96/XF Pro PDL 세포 배양 마이크로플레이트로 옮겨 웰당 50,000개 세포를 시딩했습니다. 비 CO₂ 인큐베이터에서 20분간 침전시킨 후, 세포 배양 마이크로플레이트를 실온에서 300xg로 5분간 원심분리했습니다. 세포 분주 후, Seahorse 어세이를 시작하기 전에 적절한 약물 또는 운반체가 포함된 130µL의 Seahorse 배지를 추가로 각 웰에 첨가했습니다. 2시간 처리를 위해, 세포 계수를 완료한 후 Seahorse XF 배지에 다시 부유시키고, 단일 세포 계수를 완료하고, 세포를 분취하고, 약물 화합물이나 운반체를 첨가하고, 각 처리 그룹에서 50µL 분취량을 PDL 세포 배양 마이크로플레이트로 옮겼습니다. 세포 침전 기간, 원심분리, 그리고 추가적인 Seahorse 배지 첨가는 18시간 처리법을 재현했습니다.

LC/MS 대사체학 및 지질체학 분석을 위한 세포 용해 및 퀵칭

LC/MS 분석을 위한 시료를 준비하기 위해, 실온 조건에서 TFE를 사용하여 포유류 세포를 용해하고 대사를 퀵칭하는 이전에 설명된³ 세포 추출 분석법을 적용했습니다. 특히, TFE 퀵칭은 차가운 액체 퀵칭의 문제점을 극복하고, 안전성을 향상시키며, 로봇 자동화에 적합합니다. NovoCyte 세포 계수는 시료당 100만 개의 THP-1 세포를 얻는 데 필요한 세포 배양량을 계산하는 데 사용되었습니다. 획득한 세포 시료를 실온의 PBS 1mL로 세척한 다음, 100µL 1:1 trifluoroethanol:물을 사용하여 실온에서 용해 및 퀵칭시키고, 볼텍스 믹서로 혼합한 다음, 실온에서 10분간 배양했습니다.

Bravo 자동화된 이중 대사체 및 지질 분획

Bravo 대사체학 시료 전처리 플랫폼(그림 2)에서 이전에 설명된³ 자동화된 분석법을 사용하여 운반체와 약물로 처리한 THP-1 세포에 해당하는 TFE 세포 용해물에서 극성 대사체와 지질을 순차적으로 추출했습니다. 이 분석법에는 아실 탄화수소 사슬을 포함한 지질을 선택적으로 유지하는 독특한 고체 흡착제가 들어간 96-well Agilent Captiva EMR-Lipid 플레이트가 사용되었습니다. 단백질이 침전된 후, TFE로 권장된 추출물을 플레이트에 첨가하고 단백질을 Captiva EMR-Lipid 흡착제 위의 필터에 포집했습니다. 극성 대사체를 흡착제를 통해 흘리고 흡착제에 지질을 포집했습니다. flow through의 극성 대사체를 건조한

후, HILIC-LC/MS 분석에 앞서 200µL 4:1 아세토니트릴:물에 재용해했습니다. 다른 수집 플레이트를 지질 용출에 사용했는데, 여기서 지질을 더 강한 용출 용매로 용출시킨 후 건조시키고 역상 (RP) LC/MS 분석을 위해 200µL 9:1 메탄올:클로로포름으로 재용해했습니다. 원활한 재용해를 위해 두 플레이트 모두 실온에서 20분 동안 500rpm으로 진탕했습니다. Iterative(반복) MS/MS 실험을 위해 5배 농축된 지질 시료를 모으기 위해 모든 웰에서 20µL 분취량을 처리 반복물과 합치고 진공 건조시킨 후, 별도의 바이알에 9:1 비율의 메탄올:클로로포름을 넣어 1/5 부피로 재부유시켰습니다.

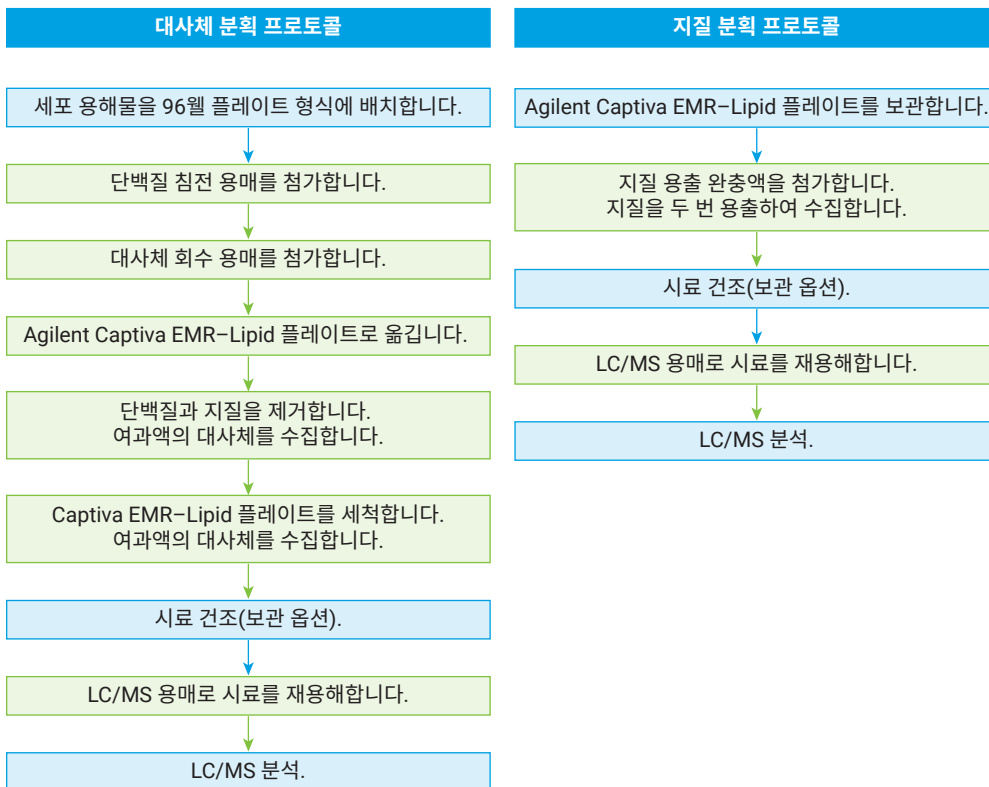


그림 2. 세포 용해물의 자동화된 이중 대사체 + 지질 분획 분석법.³ 녹색 단계는 Agilent Bravo 대사체학 시료 전처리 플랫폼을 사용하여 수행했습니다.

LC/MS 분석법

대사체 HILIC LC 분석법 파라미터는 이전 응용 자료에서 가져왔습니다.⁵ 지질 LC 분석법 파라미터는 이전 응용 자료에서 가져왔습니다.⁶ LC 조건과 LC/Q-TOF auto MS/MS 파라미터에 대한 자세한 실험 분석법은 표 1-4에 나와 있습니다. 또한, 음이온 대사체 LC/Q-TOF MS 전용 데이터를 개별 시료에서 수집했으며, MS 수집 속도는 초당 2 스펙트럼이었습니다. 양이온 지질 LC/Q-TOF All Ions 데이터를 개별 시료에서 수집했으며, 수집 속도는 초당 8 스펙트럼이고 충돌 에너지는 0, 10, 20, 40eV였습니다. 모든 작업 목록은 무작위로 선정되었습니다.

표 1. 대사체 HILIC-LC 기기 파라미터.

파라미터	Agilent 1290 Infinity II Bio LC																																				
분석 컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 150mm, 2.7µm(제품 번호 683775-924)																																				
인라인 필터	Agilent 1290 Infinity II Bio 인라인 필터 키트, 0.3µm (제품 번호 5720-0020)																																				
컬럼 온도	15°C																																				
주입량	10µL (MS 및 MS/MS)																																				
자동 시료 주입기 온도	5°C																																				
니들 세척	표준 세척, 10초, 이소프로판올:ACN:물 1:1:1																																				
이동상	A: 20mM 아세트산 암모늄 및 5µM Agilent InfinityLab 비활성화 첨가제(제품 번호 5191-3940) 수용액, pH 9.3 B: ACN																																				
그라디언트 프로그램	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간(분)</th> <th>%B</th> <th>유속(mL/분)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>1</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>8</td><td>78</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>12</td><td>60</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>15</td><td>10</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>18</td><td>10</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>19</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>19.1</td><td>90</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>22</td><td>90</td><td>0.5</td></tr> <tr><td>22.1</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> <tr><td>23</td><td>90</td><td>0.4</td></tr> </tbody> </table>	시간(분)	%B	유속(mL/분)	0	90	0.4	1	90	0.4	8	78	0.4	12	60	0.4	15	10	0.4	18	10	0.4	19	90	0.4	19.1	90	0.5	22	90	0.5	22.1	90	0.4	23	90	0.4
시간(분)	%B	유속(mL/분)																																			
0	90	0.4																																			
1	90	0.4																																			
8	78	0.4																																			
12	60	0.4																																			
15	10	0.4																																			
18	10	0.4																																			
19	90	0.4																																			
19.1	90	0.5																																			
22	90	0.5																																			
22.1	90	0.4																																			
23	90	0.4																																			
정지 시간	23분																																				
사후 시간	없음																																				

표 2. 대사체 LC/Q-TOF 기기 파라미터.

Auto MS/MS 분석법 파라미터	Agilent Revident LC/Q-TOF
기기 모드	750 Fragile
이온화원	Agilent Dual Jet Stream
극성	음이온
가스 온도	225°C
건조 가스(질소)	9L/분
Nebulizer 가스	40psi
Sheath 가스 온도	375°C
Sheath 가스 유속	12L/분
캐필러리 전압	3,000V
노즐 전압	500V
Fragmentor	100V
Skimmer	45V
OctopoleRF Vpp	750V
기준 질량	m/z 112.985587, m/z 980.016375
MS 범위	m/z 50-1,400
MS/MS 범위	m/z 25-1,000
MS 수집 속도	8스펙트럼/초
최소 MS/MS 수집 속도	6스펙트럼/초
분리 폭	Narrow(약 1.3m/z)
충돌 에너지	10, 20, 40eV
주기당 최대 전구체	2
가변적 수집 속도	예, 목표 카운트 MS/MS: 25,000
MS/MS 누적 시간 제한 사용	예
표적 TIC에 도달할 수 없는 전구체 거부	아니요
전구체 임계값	5,000카운트, 0.001%
능동 배제	비활성화됨
순도	엄격성 100%, 컷오프 30%
동위원소 모델	일반 유기 분자
Precursor Charge-State Selection and Preference	1, 2, Unknown, by charge state
m/z 포함 범위	m/z 50-1,400
Iterative(반복) MS/MS 질량 오차 허용 범위	20ppm
Iterative(반복) MS/MS RT 제외 허용 범위	± 0.2분

표 3. 지질 RP-LC 기기 파라미터.

파라미터	Agilent 1290 Infinity II Bio LC																						
분석 컬럼	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 100 x 2.1mm, 1.8µm (제품 번호 959758-902)																						
인라인 필터	Agilent 1290 Infinity II Bio 인라인 필터 키트, 0.3µm (제품 번호 5720-0020)																						
컬럼 온도	45°C																						
주입량	5µL(All Ions 및 auto MS/MS)																						
자동 시료 주입기 온도	20°C																						
니들 세척	표준 세척, 10초, 1:1 이동상 A:B																						
이동상	A: 5:3:2 물:아세트니트릴:이소프로판올에 10mM 포름산 암모늄, 0.2mM 불화 암모늄 및 5µM InfinityLab 비활성화 첨가제 B: 1:9:90 물:아세트니트릴:이소프로판올에 10mM 포름산 암모늄 및 0.2mM 불화 암모늄																						
유속	0.4mL/분																						
그라디언트 프로그램	<table border="1"> <thead> <tr> <th>시간(분)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>15</td></tr> <tr><td>2.5</td><td>50</td></tr> <tr><td>2.6</td><td>57</td></tr> <tr><td>9</td><td>70</td></tr> <tr><td>9.1</td><td>93</td></tr> <tr><td>11</td><td>96</td></tr> <tr><td>11.1</td><td>100</td></tr> <tr><td>12</td><td>100</td></tr> <tr><td>12.2</td><td>15</td></tr> <tr><td>16</td><td>15</td></tr> </tbody> </table>	시간(분)	%B	0	15	2.5	50	2.6	57	9	70	9.1	93	11	96	11.1	100	12	100	12.2	15	16	15
시간(분)	%B																						
0	15																						
2.5	50																						
2.6	57																						
9	70																						
9.1	93																						
11	96																						
11.1	100																						
12	100																						
12.2	15																						
16	15																						
정지 시간	16분																						
사후 시간	없음																						

표 4. 지질 LC/Q-TOF 기기 파라미터.

Auto MS/MS 분석법 파라미터	Agilent Revident LC/Q-TOF
기기 모드	1,700 Stable
이온화원	Agilent Dual Jet Stream
극성	양이온
가스 온도	320°C
건조 가스(질소)	8L/분
Nebulizer 가스	45psi
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유속	11L/분
캐필러리 전압	3,500V
노즐 전압	1,000V
Fragmentor	175V
Skimmer	45V
OctopoleRF Vpp	750V
기준 질량	m/z 121.050873, m/z 922.009798
MS 범위	m/z 100-1,700
MS/MS 범위	m/z 50-1,700
MS 수집 속도	3스펙트럼/초
최소 MS/MS 수집 속도	3스펙트럼/초
분리 폭	Narrow(약 1.3m/z)
충돌 에너지	20eV
주기당 최대 전구체	3
가변적 수집 속도	예, 목표 카운트 MS/MS: 25,000
MS/MS 누적 시간 제한 사용	예
표적 TIC에 도달할 수 없는 전구체 거부	아니요
전구체 임계값	5,000카운트, 0.001%
능동 배제	활성화, 2 스펙트럼 이후 제외, 0.05분 후 해제
순도	엄격성 70%, 컷오프 0%
동위원소 모델	일반 유기 분자
Precursor Charge-State Selection and Preference	1, 2, Unknown, by abundance
m/z 포함 범위	m/z 151-1,700
Iterative(반복) MS/MS 질량 오차 허용 범위	20ppm
Iterative(반복) MS/MS RT 제외 허용 범위	± 0.1분

결과 및 토의

Seahorse XF Pro 분석기를 이용하면 약물 치료가 미토콘드리아 분리를 통해 glycoATP 및 mitoATP 생성률을 교란한다는 사실이 드러납니다.

이전 응용 자료¹에서 80가지 화합물로 구성된 티로신 키나제 억제제 라이브러리를 Seahorse XF Real-Time ATP 생성률 어세이를 통해 스크리닝하여 암성 THP-1과 건강한 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 모두에서 미토콘드리아(mitoATP) 및 해당작용(glycoATP) ATP 생성률에 미치는 억제제의 급성 효과를 평가했습니다. 이러한 결과에 따라 이 응용 자료에서는 활성도를 바탕으로 추가 연구를 위해 두 가지 화합물을 선택했습니다. AG-879는 THP-1 암세포와 건강한 PBMC 모두에서 mitoATP 생성률을 감소시킨 반면, SU1498은 암성 THP-1 세포에서 mitoATP 생성률을 감소시켰지만 건강한 PBMC에서는 그러하지 않았습니다. 여기에서는 이들 화합물의 대사 효과에 대한 추가적인 Seahorse XF 특성 규명을 수행했습니다.

첫 번째 단계로, Seahorse XF Real-Time ATP 생성률 어세이를 사용하여 두 가지 선택된 약물이 mitoATP 및 glycoATP 생성률에 미치는 급성(2시간) 및 장기(18시간) 치료 영향을 측정했습니다. 약물 치료 농도로 이전에 결정된 mitoATP 반수 최대 억제 농도(IC₅₀)를 사용했습니다.¹ 두 치료 기간 모두에서 AG-879와 SU1498은 glycoATP 생성률을 증가시켜 mitoATP 생성률 감소를 보상했습니다(그림 3A 및 B). 18시간 처리 후, 총 ATP 생성률은 18시간 DMSO 운반체 대조군과 비교했을 때 20-30% 감소하였는데, 이는 AG-879와 SU1498의 급성 효과가 장기간 처리로 증폭되었음을 나타냅니다. Seahorse 어세이를 위해 살아 있는 생존 세포 계수를 기준으로 세포를 도말했기 때문에 키나제 억제제 처리에 따른 총 ATP 생성의 감소는 세포 생존력 상실로 인한 것이 아니었습니다. 특히, 세포 생존력은 18시간 처리 후에도 높은 수준(>92%)을 유지했으며, 이는 대조군과 약물 처리군에서 일관적이었습니다(그림 3C).

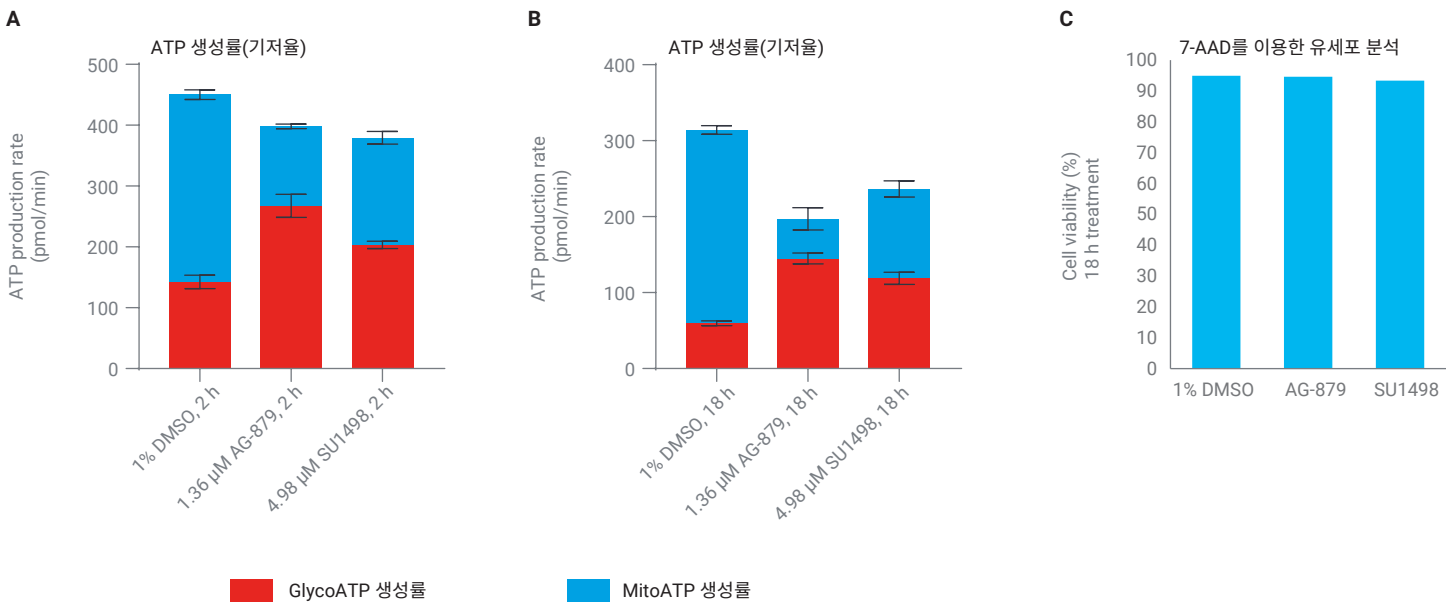


그림 3. Agilent Seahorse XF Real-Time ATP 생성률 어세이는 약물 치료에 따른 미토콘드리아 및 해당작용 ATP 생성률의 조절을 보여줍니다. THP-1 세포를 운반체 대조군(1% DMSO), 1.36μM AG-879 또는 4.98μM SU1498로 (A) 2시간, (B) 18시간 동안 전처리한 후 mitoATP 및 glycoATP 생성률을 분석했습니다. (C) 세포 생존력은 18시간 처리 후 유세포 분석기와 7-AAD 염색을 통해 측정했습니다.

약물이 미토콘드리아 호흡률에 미치는 영향을 심층적으로 조사하기 위해 Seahorse XF Mito Stress Test 키트가 제공하는 일반적인 측정값인 양성자 누출과 SRC를 분석했습니다. 양성자 누출은 다양한 치료군의 세포에서 미토콘드리아 분리 정도를 정량화하는 데 사용되었습니다. 미토콘드리아 분리란 세포가 미토콘드리아 운반 사슬을 통해 여전히 산소를 소비하지만 더 이상 이 산소 소비로부터 효율적으로 ATP를 생성할 수 없어 양성자가 누출되는 현상을 나타내는 용어입니다. 두 티로신 키나제 억제제 모두 운반체 처리 세포에 비해 양성자 누출이 증가했기 때문에 “미토콘드리아 분리제”인 것으로 입증되었습니다(그림 4A). 미토콘드리아 분리를 보상하기 위해 세포는 glycoATP 생성률을 증가시킵니다(그림 3A 및 B).

AG-879와 SU1498은 서로 다른 운동 반응으로 THP-1 미토콘드리아 분리를 유발했습니다. 구체적으로, AG-879에 의한 양성자 누출은 치료 2-18시간 사이에 증가하여 비교적 느린 분리 효과를 시사했습니다(그림 4A). 이와 대조적으로, SU1498에 의한 양성자 누출은 치료 후 2-18시간 사이에 감소하였는데, 이는 분리가 더 빨리 시작되었음을 시사하며, 세포가 일찍 발생한 분리에 반응하여 18시간에 산소 소비를 하향 조절하기 시작한다는 것을 의미합니다. 산소 소비의 이러한 하향 조절은 트리카복실산(TCA) 회로 중간체의 상대적 수준에 교란을 일으킬 수 있으며, 이는 LC/MS 대사체학 분석을 통해 평가되었습니다. 또한, SU1498은 SRC를 감소시키는 것으로 나타났는데, 이는 세포 적합성과 관련된 특성입니다(그림 4B). AG-879는 SRC를 완전히 상실시켰는데, 이는 AG-879로 치료한 세포가 대사 재프로그래밍을 통해 약물 내성을 유발할 수 있는 생존 신호 전달 능력이 낮을 가능성이 있음을 시사합니다.

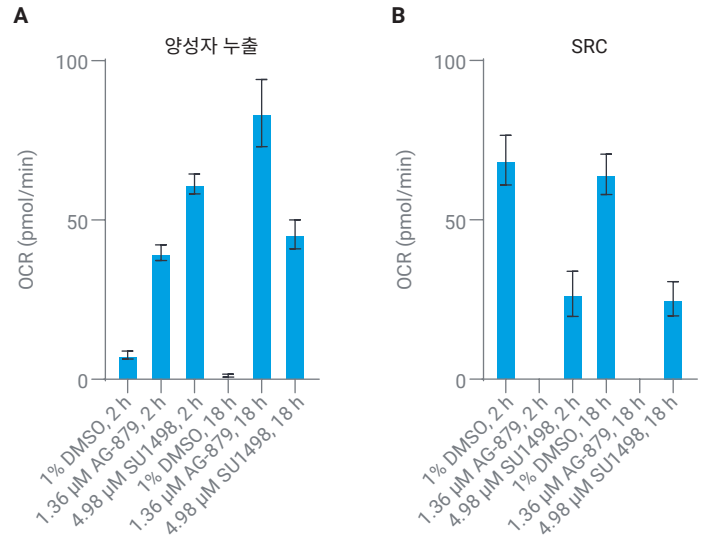


그림 4. AG-879 및 SU1498 처리는 미토콘드리아 분리와 세포 적합성 감소를 일으켰습니다. THP-1 세포를 2시간과 18시간 동안 운반체 대조군(1% DMSO), 1.36μM AG-879 또는 4.98μM SU1498로 전처리한 후, (A) 양성자 누출 및 (B) SRC에 대해 분석했습니다.

비표적 대사체학을 통해 해당작용 및 미토콘드리아 호흡과 관련된 주요 대사체의 변화를 식별했으며 이는 Seahorse XF Pro 분석기 결과와 상관관계가 있습니다.

재용해된 96well 대사체 분획 플레이트를 특수 생체적합성 합금인 MP35N으로 구성된 1290 Infinity II Bio LC에 넣었습니다. 철 성분이 없는 이 유로는 인산화 화합물 분석에 뛰어난 성능을 보여줍니다.⁶ 추출물은 세포 대사체 분리에 적합하고, 기존에 확립된 견고한 HILIC 크로마토그래피 분석법을 통해 분리했습니다.⁵ LC 용출액은 Revident LC/Q-TOF를 사용하여 분석했으며, 그 결과 스펙트럼 품질이 개선되어 질량 분해능, 동적 범위, 동위 원소 충실도가 더욱 향상되었습니다.

HILIC LC/Q-TOF 데이터 세트는 MassHunter Explorer로 처리했습니다. 이 소프트웨어는 워크플로우 기반 사용자 인터페이스를 제공하고 데이터 추출, 정규화, 데이터 분석, 비표적 LC/Q-TOF 데이터의 feature 식별을 단일 애플리케이션으로 결합합니다. 차등 분석을 수행하고 약물 치료에 의해 영향을 받는 대사체를 찾기 위해 운반체 대조군, AG-879, SU1498 및 추출 블랭크 데이터 파일을 MassHunter Explorer 프로젝트에

추가했습니다. 데이터 추출 및 정규화 후, 추출 블랭크와 세포 시료에서 비슷한 수준으로 검출된 화합물을 프로젝트에서 제거하여 1,802개의 화합물 그룹을 남겼습니다. 다음으로, SU1498 및 AG-879 약물에 해당하는 질량값을 가진 여러 화합물 그룹을 프로젝트에서 제거하여 1,797개의 화합물 그룹을 남겼습니다. MassHunter Explorer 그래픽 사용자 인터페이스 (GUI)를 사용하면 탐색 리본에서 앞뒤로 이동할 수 있으며, 다양한 워크플로 절차의 결과가 연결됩니다. 본 연구에서는 먼저 화합물 그룹을 식별한 후, 통계로 넘어갔습니다. 내인성 대사체를 식별하기 위해, 실제 화학 표준물질의 HILIC-Z 머무름 시간을 사용하여 선별된 Agilent METLIN Personal Compound Database and Library의 471개 화합물 세트를 대상으로 데이터베이스 검색을 수행했습니다.⁵ 질량과 머무름 시간이 모두 필요한 데이터베이스 (DB) 매칭 기준으로 선택되어, 1,797개 중 101개의 주석이 달린 화합물 그룹이 얻어졌습니다(그림 5). DB 검색이 ± 5 ppm 질량 오차 허용 범위로 수행되었다는 점을 고려할 때 101개 화합물 중 79개가 < 1.0의 관찰된 Δ ppm을 보여 Revident LC/Q-TOF의 뛰어난 질량 정확도를 입증했습니다.

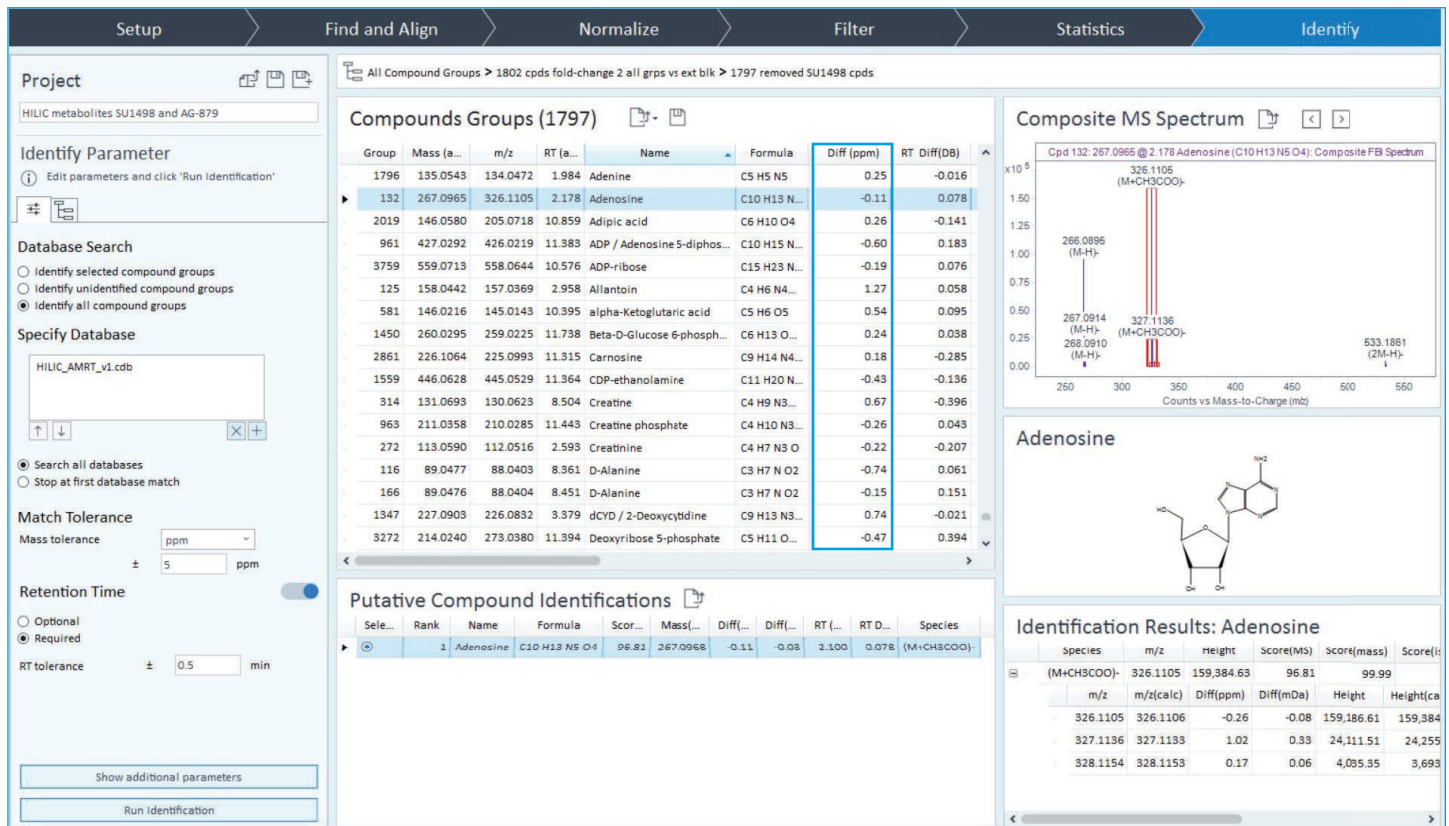


그림 5. "Identify" 절차의 결과를 표시하는 Agilent MassHunter Explorer 소프트웨어 GUI입니다. HILIC RT가 있는 471개 화합물로 구성된 DB가 지정되어 101개의 주석이 달린 화합물 그룹이 생성되었으며, 그 일부가 표시되어 있습니다. 질량 허용 오차는 ± 5ppm이고 RT 허용 오차는 ± 0.5분입니다. 관찰된 Δ ppm 값은 파란색 상자에 강조 표시되어 있습니다.

약물 처리 시료 그룹과 대조군 간에 상당한 차이를 보이는 화합물 그룹을 식별하기 위한 통계적 검정으로 Volcano 플롯을 사용했습니다. SU1498로 처리한 시료의 경우, 131개 화합물 그룹이 폴드 변화 > 1.5 및 P < 0.05로 통계적 유의성을

나타냈습니다(그림 6). 동일한 통계적 검정을 통해 AG-879 volcano 플롯에서 단 6개의 화합물 그룹만이 유의성을 나타냈습니다(표시되지 않음).

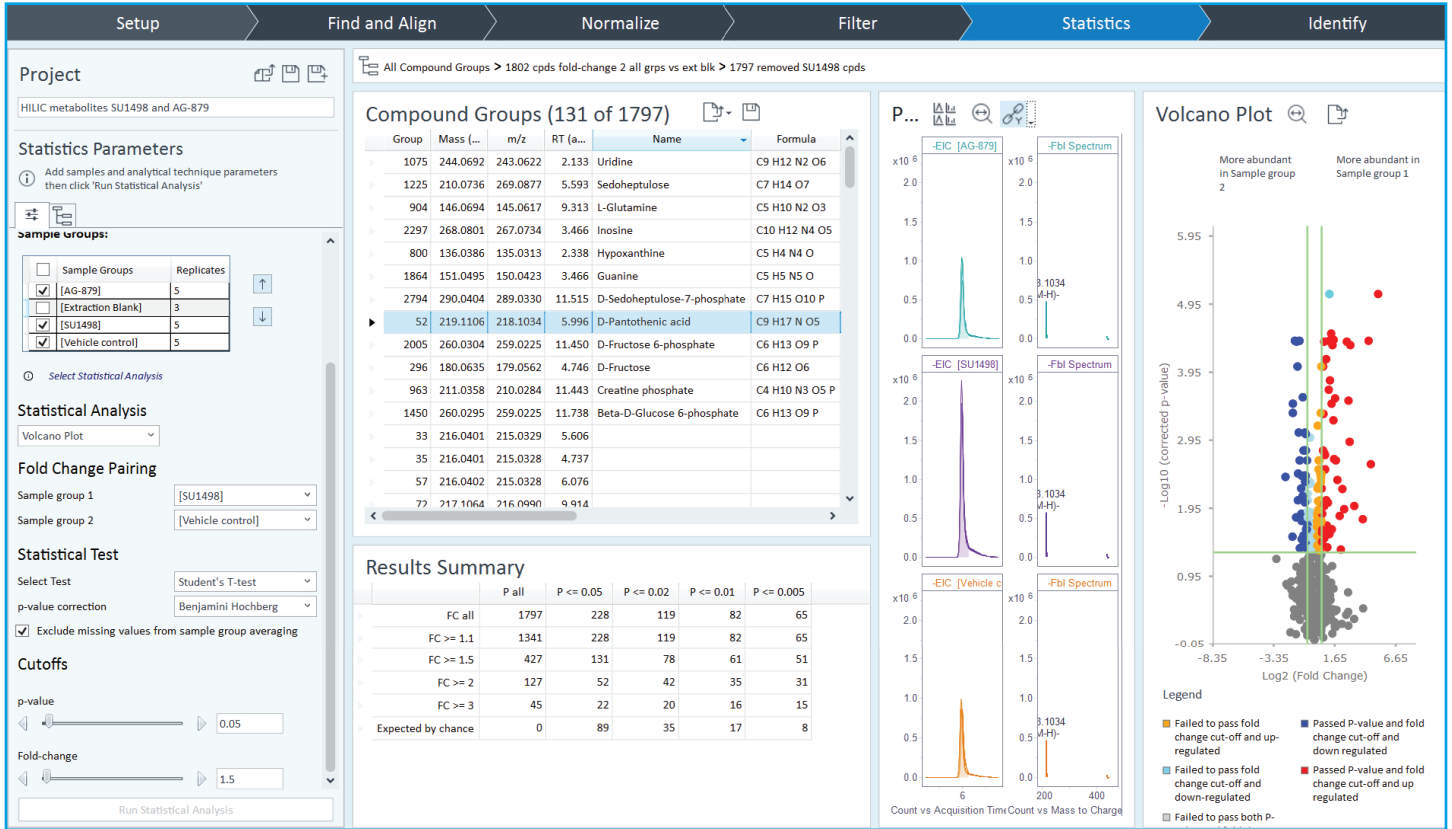


그림 6. "Statistics" 절차의 결과를 표시하는 Agilent MassHunter Explorer 소프트웨어 GUI입니다. 표시된 적용 파라미터로 SU1498 처리군과 운반체 대조군을 비교하여 volcano 플롯을 수행했습니다. d-pantothenic acid에 대한 주석이 달린 화합물 그룹이 선택되었습니다. 해당하는 추출 이온 크로마토그램과 질량 스펙트럼은 즉각적인 시각화와 검증을 위해 연결되며, volcano 플롯의 해당 데이터 포인트는 자동으로 밝은 파란색으로 강조 표시됩니다.

MassHunter Explorer 소프트웨어 GUI에는 정규화 단계, 필터 및 통계 검정을 적용할 때마다 자동으로 업데이트되는 주성분 분석(PCA) 플롯이 표시됩니다. 131개의 주요 화합물 그룹을 기반으로 한 PCA는 약물 처리 그룹과 대조군 간에 명확한 분리를 보여주었습니다(그림 7A). 주성분 1(X축)은 플롯의 변동성에 가장 크게 기여했으며(68%), AG-879 군은 SU1498군과 대조군 사이에 위치했습니다. 그림 7B는 AG-879와 SU1498 결과의 차이와 주석이 달린 대사체의 반응을 보여줍니다. 특히, AG-879 처리에서 유래된 여섯 가지 주요 화합물 그룹이 SU1498 처리에서도 모두 관찰되었으며, 공통적인 세 가지 주석 처리 대사체는 두 약물 처리 모두에서 감소했습니다. 종합해 보자면, (1) PCA에 의한 시료 그룹의 분리 정도, (2) AG-879에서 유의미한 화합물 그룹의 수가 적음, (3) 두 처리 모두에서 대사체의 공통적 반응은 모두 AG-879 처리가 SU1498 처리와 비교하여 세포 대사에 유사하지만 약화한 효과를 일으킨다는 사실을 시사합니다. AG-879에 대한 미토콘드리아 분리의 운동 속도가 SU1498에 비해 느린 것으로 나타났으므로 AG-879로 장기간 처리하면 AG-879를 18시간 처리한 후에 관찰된 것보다 더 많은 화합물 군에서 유의미한 증가 및 감소가 검출될 가능성이 있습니다. 한편, AG-879의 효과가 덜한 것은 이들 세포에서 SRC가 부족하기 때문일 수 있으며, 이로 인해 세포가 대체 대사 경로를 사용하는 능력이 감소할 수 있습니다.

Seahorse XF Pro 분석기 결과와 관련하여 관찰된 특정 대사체의 증가/감소를 통해 몇 가지 결론을 도출할 수 있습니다. 두 가지 약물 처리 모두에서 해당작용 및 동시 펜토스(PP) 인산 경로 모두에 속하는 여러 가지 당인산이 감소했습니다. Seahorse XF Pro 분석기 결과는 두 약물 처리 모두에서 glycoATP 생성률이 증가한 것을 보여주었고(그림 3), 이는 해당작용(그리고 아마도 PP 경로)의 증가로 인해 당인산을 포함한 해당분해 중간체가 고갈되었음을 시사합니다. 반대로, TCA 회로와 지질 생합성에 필요한 Coenzyme A(CoA)의 전구체인 판토텐산은 SU1498 처리에서 증가했습니다. 앞서 언급했듯이, SU1498 처리로 인한 양성자 누출 데이터는 18시간 처리 후 TCA 회로의 하향 조절을 시사하는데, 이는 이 전구체 화합물의 축적과 잘 연관되어 있습니다. SU1498 처리로 가장 두드러진 변화는 퓨린과 피리미딘 대사에 관여하는 대사체인 우리딘, 이노신, 히폭산틴 및 구아닌의 현저한 증가였습니다. Ribose-5-phosphate은 퓨린과 피리미딘 생합성의 전구체이기 때문에 해당작용 과정과 PP 경로의 플럭스(flux)가 증가하면 이러한 대사체에 영향을 미칠 수 있습니다. 이에 따라 퓨린/피리미딘 대사에 대한 추가 전구체인 L-글루타민은 SU1498 처리로 감소하는 것으로 밝혀졌습니다. 따라서 Seahorse XF Pro 분석기를 사용해 식별한 주요 에너지 경로 외부의 교란된 대사체를 LC/MS로 감지하는 작업은 LC/MS에서 얻은 통찰력이 이들 세포의 새로운 취약성을 가리켜 조합 치료에 정보를 제공할 수 있는 사례가 될 수 있음을 보여줍니다.

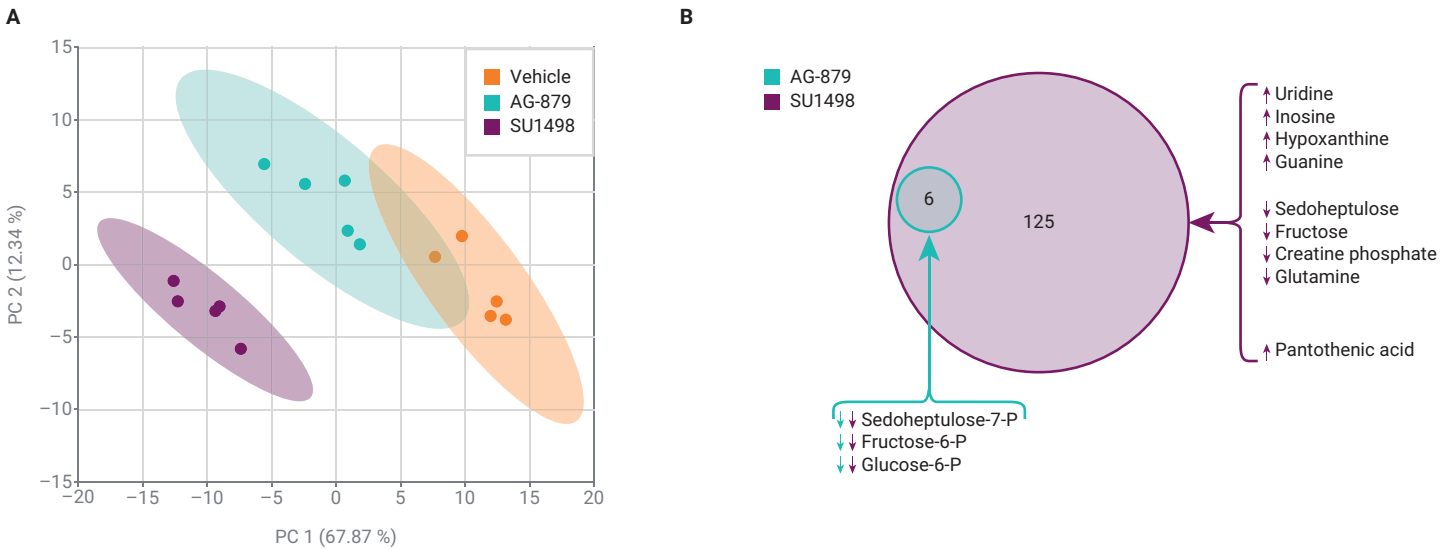


그림 7. AG-879와 SU1498의 결과를 비교한 것입니다. (A) 131개의 중요 화합물을 기반으로 한 PCA. (B) AG-879와 SU1498 처리 간에 공통된 중요 화합물 그룹을 보여주는 벤다이어그램, 및 주석이 달린 대사체와 변화 방향이 표시되어 있습니다. 화살표는 약물 처리 그룹에서 대사체 수준이 대조군에 비해 증가(↑)했는지 또는 감소(↓)했는지를 나타냅니다.

비표적 지질체학은 해당작용 및 미토콘드리아 호흡과 관련된 주요 지질의 변화를 드러내는데, 이는 Seahorse XF Pro 분석기 및 LC/MS 대사체학 결과와 상관관계가 있습니다.

재용해된 96웰 지질 플레이트를 대사체 분석에 사용된 것과 동일한 하드웨어 구성인 Revident LC/Q-TOF에 연결된 1290 Infinity II Bio LC에 넣었습니다. HILIC-LC 대신, 지질 분리에 최적화된 기존 RP-LC 분석법으로 추출물을 분리했으며, 용출액은 Revident LC/Q-TOF의 양이온 모드에서 분석했습니다.

지질체학 데이터 분석은 이전에 설명한 대사체 분석과 유사한 워크플로를 따랐습니다. 우선, 차등 분석을 수행하고 약물 치료에 의해 영향을 받는 지질을 찾기 위해 운반체 대조군, AG-879, SU1498 및 추출 블랭크 데이터 파일을 MassHunter Explorer 프로젝트에 추가했습니다. 데이터 추출 및 정규화 후, 추출 블랭크와 세포 시료에서 비슷한 수준으로 검출된 화합물을 프로젝트에서 제거하여 2,662개의 화합물 그룹을 남겼습니다.

통계로 진행하기 전에 화합물 그룹에 주석을 달았습니다. 지질 주석을 달기 위해 MassHunter Lipid Annotator 소프트웨어를 먼저 사용하여 지질 데이터베이스를 구축했습니다. 지질 데이터베이스는 이 연구에서 사용된 THP-1 세포와 처리법, 그리고 다른 연구에서 사용된 K562 세포와 처리법을 결합하여

대표적인 세포 추출물에서 얻은 MS/MS 스펙트럼을 이용한 in silico MS/MS 스펙트럼 라이브러리 매칭을 기반으로 했습니다. 구체적으로, 6개의 양이온 모드 및 6개의 음이온 모드 Iterative (반복) MS/MS 데이터 파일 세트를 분석했습니다. 이를 통해 562개의 지질(16개 클래스를 대표함)이 양이온 모드(그림 8A)에 대해 주석 처리되었고, 500개의 지질(22개 클래스를 대표함)이 음이온 모드(그림 8B)에 대해 주석 처리되었습니다. MassHunter Lipid Annotator 소프트웨어 결과를 내보낸 뒤, 생성된 데이터베이스(.cdb) 파일을 MassHunter Explorer 소프트웨어에서 순차적으로 검색하여 주석을 MassHunter Explorer 프로젝트의 화합물 그룹에 매핑했습니다(그림 8C). MassHunter Explorer 프로젝트는 양이온의 데이터 파일에서만 생성되었지만, 계산된 화합물 그룹의 중성 질량을 통해 극성에 관계없이 데이터베이스의 중성 질량과 일치시킬 수 있었습니다. 음이온 데이터베이스를 추가적으로 검색하는 식으로 주석이 더 많아지고 일부 주석의 특이성이 더 높아졌습니다. Acyl 사슬 정보를 음이온 모드 MS/MS 데이터에서 추론할 수 있는 경우가 많기 때문입니다. 질량과 머무름 시간이 모두 필수 DB 매칭 기준으로 선택되어 23개 지질 종류를 포함하는 2,662개 화합물 그룹 중 507개에 대한 주석이 생성되었습니다.

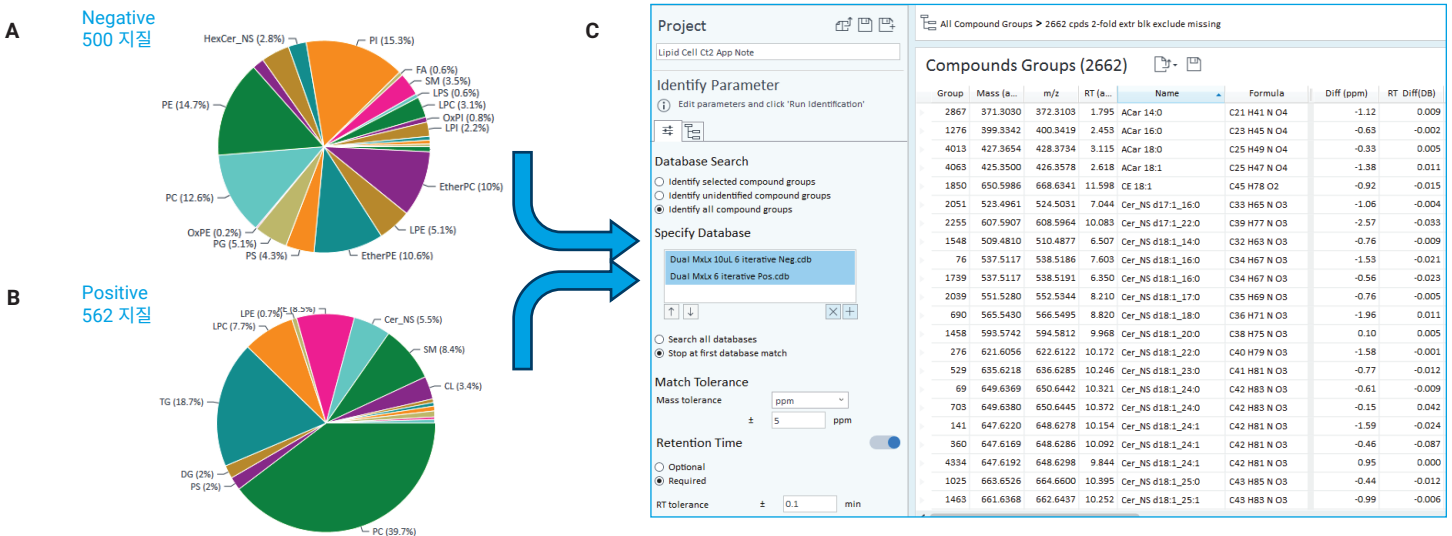


그림 8. 지질 주석 전략. Agilent MassHunter Lipid Annotator 소프트웨어에서 6개의 Iterative(반복) MS/MS데이터 파일을 일괄적으로 분석했습니다. (A) 음성 이온화 모드와 (B) 양성 이온화 모드에 대한 주요 지질류의 백분율을 나타낸 파이 차트가 표시됩니다. (C) Agilent MassHunter Explorer 소프트웨어의 식별 워크플로 단계에서 데이터베이스가 순차적으로 이용되었습니다. 질량 허용 오차는 ± 5 ppm이고 RT 허용 오차는 ± 0.1 분입니다.

대사체에서와 마찬가지로 중요한 지질 화합물을 추출하는 데 volcano 플롯이 사용되었습니다. SU1498로 처리한 시료의 경우, 521개 화합물 그룹이 폴드 변화 > 1.5 및 $P < 0.05$ 로 통계적 유의성을 나타냈습니다(그림 9A). 동일한 통계적 검정을 통해 AG-879 volcano 플롯에서 단 23개의 화합물 그룹만이 유의성을 나타냈습니다(그림 9B). 521개의 유의한 화합물을 기반으로 한 PCA 플롯은 약물 처리군과 대조군 간에 명확한 구분을 보여주었고(그림 9C), 벤다이어그램은 AG-879 처리에서 발견된 23개의 유의한 화합물 그룹 모두가 SU1498 처리에서도 발견되었음을 보여줍니다(그림 9D). 전반적으로, 이러한 지질 결과는 대사체 결과와 밀접하게 일치하여 AG-879 치료가 SU1498 치료와 비교하여 세포 대사에 유사하지만 약화된 효과를 일으킨다는 사실을 다시 한번 시사했습니다. 다시 말해, 이는 양성자 누출 데이터와 AG-879 처리 세포의 SRC 부족으로 알 수 있는 AG-879의 느린 운동학적 특성에 기인할 수 있습니다. 주석이 달린 지질과

관련하여 가장 두드러진 결과는 62개 트리글리세리드(TG) 지질의 증가였으며, 운반체 대조군에 비해 SU1498에서 최대 8배 증가를 보였습니다. TG 함량의 증가는 판토텐산과 마찬가지로 TCA 회로 하향 조절에 따른 에너지 전구체의 축적과 관련이 있을 수 있으며, 이는 Seahorse XF Pro 분석기를 사용하여 확인된 SU1498 양성자 누출 데이터에서 알 수 있습니다. 한편, 글루타민 수치의 감소와 TG의 증가를 함께 고려하면 SU1498로 처리된 세포가 재프로그래밍과 아나플레로시스 구현으로 처리에 적응하고 있음을 시사합니다. 여기서 글루타민은 지질 생산을 위한 TCA 회로의 구동력이 됩니다. 이는 또한 판토텐산의 증가를 설명할 수 있는데, 아나플레로시스 중에 생성되는 acetyl-CoA는 판토텐산 키나제의 피드백 억제제로서 판토텐산을 4'-phosphopantothenic acid으로 전환하기 때문입니다. 어떤 경우에는 아나플레로시스가 당신생성(glyconeogenesis)을 촉진하여 glycoATP 생성 및 기타 생합성 과정에 사용되는 해당작용 플럭스(flux)를 증가시키는 데 사용됩니다.

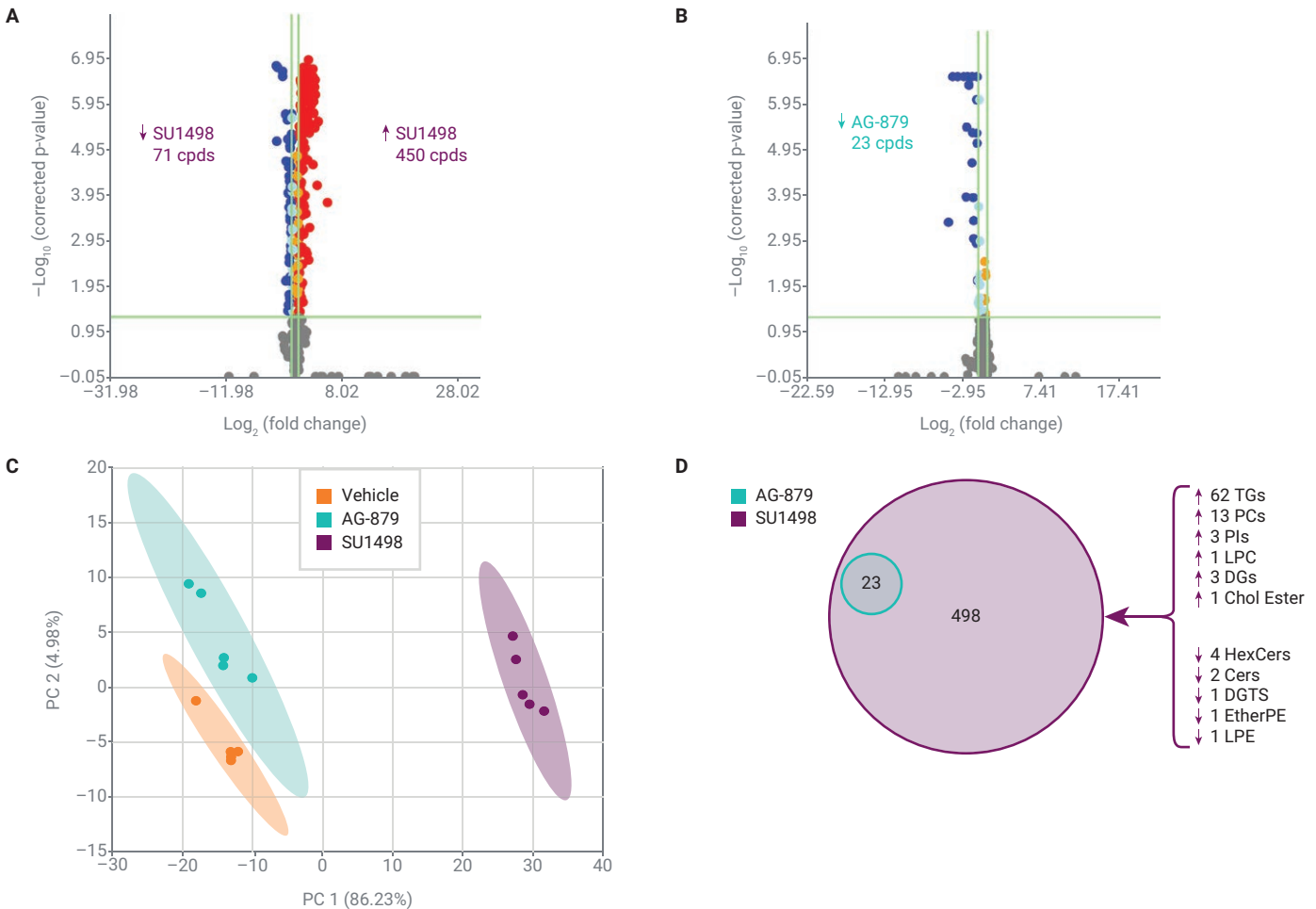


그림 9. AG-879 및 SU1498 지질 결과 비교. (A) SU1498 처리군과 운반체 대조군, (B) AG-879 처리와 운반에 대해 수행된 volcano 플롯 분석. (Student's t-test, FC > 1.5, $P < 0.05$, with Benjamini-Hochberg correction.) (C) 521개의 중요 화합물을 기반으로 한 PCA. (D) AG-879와 SU1498 처리 간에 공통된 중요 화합물 그룹을 보여주는 벤다이어그램, 및 주석이 달린 92개 지질과 변화 방향이 표시되어 있습니다. 화살표는 S1498 처리에서 지질 수준이 증가(↑)했는지 또는 감소(↓)했는지를 나타냅니다.

고급 통계 및 시각화에 이용하기 위해 MassHunter Explorer 소프트웨어 결과를 MPP로 내보냈습니다. 따라서 지질 결과에 대한 더 깊은 통찰력을 얻기 위해 MassHunter Explorer 프로젝트를 .pfa 파일로 MPP로 내보냈습니다. 지질 종류 내에서 존재비 차이를 쉽게 시각화하기 위해 지질 매트릭스 플롯을 생성했습니다. TG 기반의 지질류 매트릭스 플롯은 SU1498에서 TG 지질의 존재비가 운반체 대조군에 비해 거의 보편적으로 증가했음을 명확히 보여주었습니다(그림 10A). 이는 이전에 설명한 MassHunter Explorer volcano 플롯에서도 유사하게 추론되었습니다. 그러나 매트릭스 플롯은 TG 지질 프로파일의

미세한 차이까지 추가적으로 보여주었으며, 이는 일반적으로 이중 결합량이 높은 TG는 SU1498 처리에 따라 더 많이 증가한다는 것을 나타냅니다. 포스파티딜이노시톨(PI) 기반의 지질류 매트릭스 플롯을 검사한 결과, PI 프로파일은 두 가지 특정 지질류 (PI 18:1_18:2 및 PI 38:6)을 제외하고 일반적으로 변하지 않은 것으로 나타났습니다(그림 10B). 이들 지질의 MS/MS 스펙트럼은 다중불포화산(PUFA), 즉 리놀레산(18:2)과 아라키돈산(20:4)과의 에스테르화 증거를 보여주었으며, 둘 모두 에이코사노이드 생합성에 관여합니다(표시되지 않음). PI가 이러한 신호 지방산의 저장소 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 특정 PI

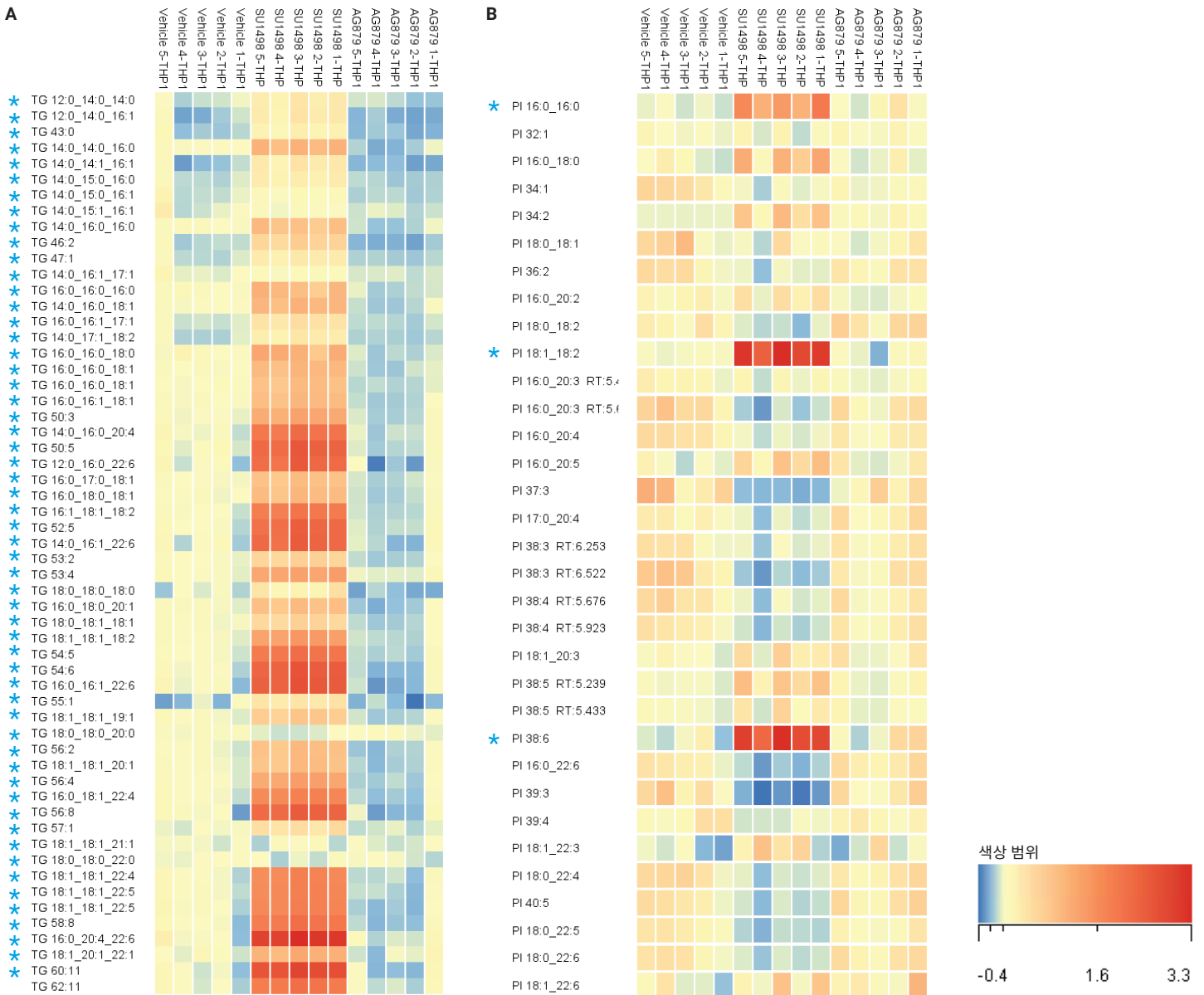


그림 10. SU1498 처리, AG-879 처리 및 운반체 대조 시료 반복에 걸친 (A) 57개 TG 및 (B) 33개 PI 지질 feature의 Agilent MPP 소프트웨어 지질 매트릭스 플롯. Agilent MassHunter Explorer 소프트웨어 volcano 플롯 분석을 통해 SU1498 처리 후 증가한 것으로 확인된 주요 화합물은 파란색 별표(*)로 표시했습니다.

지질은 암세포, 특히 이 연구에 사용된 THP-1 세포주와 같이 p53 돌연변이가 있는 세포에서 감소하는 것으로 나타났습니다. 연구 결과에 따르면 SU1498 처리가 THP-1 세포에서 이러한 PI 지질 수준을 증가시키며, 이는 이들 세포의 하위 신호 전달 생물학에 영향을 미칠 수 있습니다.

결론

이 응용 자료에서는 Agilent Seahorse XF Pro 분석기와 Q-TOF LC/MS를 결합하여 약물 치료에 대한 암세포의 세포적 및 분자적 대사 반응에 대한 더 깊은 통찰력을 얻기 위한 전체 워크플로를 보여주었습니다. 구체적으로, AG-879와 SU1498 처리에 대한 XF 분석은 이전의 결과를 뒷받침하였고¹, 두 약물 모두 미토콘드리아 분리를 유발한다는 새로운 사실을 입증했습니다. 비표적 대사체학을 통해 XF 결과와 상관관계가 있는 해당작용 및 미토콘드리아 호흡에 영향을 미치는 주요 대사체의 변화를 확인했으며, 추가적으로 퓨린/피리미딘 대사에 관여하는 영향을 받는 대사체를 확인했습니다. 비표적 지질체학을 통해 SU1498 처리에 따른 TG 함량의 증가와 PUFA를 함유한 PI 지질의 높은 존재비가 밝혀졌으며, 후자는 SU1498 처리에 따른 신호 전달 생물학의 변화를 시사할 수 있습니다. 특히, 미토콘드리아 분리 (XF), 글루타민 감소, 판토텐산 증가(대사체학), TG의 급격한 증가 (지질체학) 등의 결과를 종합적으로 고려하면 SU1498로 처리한 세포가 지질을 생성하기 위해 보전 분해(anaplerosis)를 사용하도록 신호 전달 경로를 재프로그램했다는 새로운 가설을 세울 수 있었습니다. 이 가설은 세포 분석 기술을 결합하는 경우에만 가능했습니다. AG-879 처리 후 감지된 대사체와 지질의 제한적 변화는 AG-879로 인한 SRC 부족, 두 억제제 간의 반응 속도 차이, 선택된 약물 농도 등 다양한 요인에 기인할 수 있습니다. 향후 연구 방향에는 (1) 확인되지 않은 중요 feature의 추가적인 발굴, (2) Agilent MassHunter VistaFlux 소프트웨어를 사용한 정성적 플럭스(flux) 분석⁸, (3) 약물 치료에 따른 연료 의존성을 평가하기 위한 Agilent Seahorse XF Substrate Oxidation Stress Test 키트의 사용, (4) THP-1 암세포에 대한 대사 경로 교란을 비교하기 위해 건강한 PBMC 세포에 대한 유사한 연구 수행 등이 포함됩니다.

참고 문헌

1. Vander Heiden, M. G.; *et al.* Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **2009**, 324(5930), 1029–1033.
2. Kam, Y.; *et al.* Rapid Bioenergetic Functional screening of Anticancer Drug Candidates. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-5651EN, **2023**.
3. Van de Bittner, G. C.; *et al.* An Automated Dual Metabolite + Lipid Sample Preparation Workflow for Mammalian Cell Samples. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5994-5065EN, **2022**.
4. Wang, G.; *et al.* Using the Agilent NovoCyte Flow Cytometer for Immune Suspension Cell Normalization in Agilent Seahorse XF Assays. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-6245EN, **2023**.
5. Yannell, K.; *et al.* An End-to-End Targeted Metabolomics Workflow. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-5628EN, **2023**.
6. Huynh, K.; *et al.* 혈장 지질체의 상세한 분석을 위한 종합적이고 선별된 고처리량 분석법. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-3747KO, **2021**.
7. Feith, A.; *et al.* Improved Metabolomic Analysis Using an Iron-Free Flow Path. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-4622EN, **2022**.
8. Wattanavanitchakorn, S.; *et al.* HepG2 세포에서의 ¹³C Glucose 정성 Flux 분석. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-0713KO, **2019**.

www.agilent.com

RA45477.0354166667

연구용으로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 7월 30일 한국에서 발행
5994-7449KO

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