

HepG2 세포에서의 ^{13}C Glucose 정성 Flux 분석

Agilent 6546 LC/Q-TOF 및 VistaFlux의 활용

저자

Siriluck Wattanavanitchakorn
and Sarawut Jitrapakdee
Department of Biochemistry,
Faculty of Science,
Mahidol University,
Bangkok, Thailand

Israr Ansari,
Melissa J. Longacre, and
Michael J. MacDonald
Children's Diabetes Center,
University of Wisconsin
School of Medicine and Public
Health, Madison, WI, USA

Mahmoud El Azzouny and
James Pyke
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA.

개요

Agilent 6546 LC/Q-TOF는 수집 속도와 무관하게 우수한 동위원소 비율 측정 정확도 (fidelity)와 넓은 측정 범위(dynamic range) 및 높은 질량 분해능 등을 동시에 제공하도록 설계되었습니다. Flux 분석에서 우수한 결과를 얻기 위해서는 동위원소 비율 측정 정확도와 고분해능 및 넓은 측정 범위(dynamic range) 모두의 결합이 필요합니다. Agilent MassHunter VistaFlux 소프트웨어와 함께 사용 시, 데이터 수집부터 데이터 분석까지의 통합적인 워크플로를 제공하여 과학자들이 원활하게 정성 flux 분석을 수행할 수 있도록 도와드립니다. VistaFlux 소프트웨어는 특징 추출, 동위원소 결합 및 동위원소체 존재비 분석, 자연 존재비 보정, 통계 분석 그리고 대사 경로상의 데이터 시각화를 위한 도구로 구성되어 있습니다.

본 응용 자료에서는 U- ^{13}C glucose를 추적자로 이용한 인간 암종 세포주에서의 정성 flux 분석을 소개합니다. 데이터는 6546 LC/Q-TOF 시스템을 이용해 수집하였으며, MassHunter VistaFlux로 분석하였습니다. 본 연구는 pyruvate carboxylase knockdown이 HepG2 세포 내 TCA 사이클의 glucose flux에 미치는 영향을 입증하였습니다.

서론

안정 동위원소 표지(Stable isotope labeling)는 세포 내 대사에 관한 독특한 정보를 제공합니다. 대사체학 프로파일링이 여러 대사체의 존재비에 대한 우수한 개요를 제공하지만, 많은 대사적 변화가 대사체 농도의 축적 또는 감소를 야기하는 것은 아닙니다. 안정 동위원소 추적은 일반적인 대사체학적 프로파일링을 통해 밝힐 수 없는 통찰력 있는 정보를 제공합니다. 안정 동위원소 추적에서는 농축 백분율을 계산하기 위해 동위원소체(isotopologue)를 상호 정규화합니다. 이러한 자가 정규화 접근법은 안정 동위원소 추적자 연구를 세포 수가 다를 수 있는 까다로운 생물학적 시스템 내에서 대사적 변화를 조사하는 강력한 도구로 만듭니다.

정상적인 대사체 동위원소 분포를 변화시키는, 작지만 중요한 동위원소 변화를 정확하게 식별하는 데에는 많은 어려움이 존재합니다. 올바른 대사체 식별 및 정량을 수행하기 위해서는 질량 분석기(MS)가 복잡한 시료 내에서도 정확한 동위원소 존재비와 질량 측정을 유지해야 합니다. 또한 MS는 넓은 측정 범위(dynamic range)와 높은 분해능을 동시에 제공할 수 있어야 합니다. 넓은 측정 범위(dynamic range)는 다양한 대사체 농도와 동위원소 결합물을 수용할 수 있으며, 높은 분해능은 동시 용리 화합물로부터의 간섭을 줄일 수 있습니다. 마지막으로, 데이터 분석 소프트웨어는 동위원소체를 올바르게 할당하고, 자연 동위원소 보정을 수행하여 정확한 순 표지 결합을 제공해야 합니다.

이처럼 6546 LC/Q-TOF 및 VistaFlux 소프트웨어는 정성 flux 분석을 위한 통합 워크플로를 제공합니다. 6546 LC/Q-TOF는 정성 flux 분석에 필요한 동위원소 비율 측정 정확도와 넓은 측정 범위(dynamic range) 및 높은 질량 분해능을 동시에 제공하며, VistaFlux 소프트웨어는 전체 데이터를 분석하여 flux 데이터를 시각화 합니다.

이 완전한 워크플로 솔루션을, U-¹³C glucose로 처리한 pyruvate carboxylase knockdown HepG2 세포에 적용하였습니다.

Pyruvate carboxylase(PC)는 생합성 목적의 citric acid 사이클 중간산물을 생성하는 미토콘드리아 보충 효소(anaplerotic enzyme)입니다. 이 효소는 간과 신장 내의 gluconeogenesis, 지방 조직 내의 *de novo* 지방합성 및 체장 베타 세포 내의 글루코스 유도 인슐린 분비 등에 필수적입니다. 최근의 연구에 따르면, PC는 여러 종류의 암 형성에서 다양한 동화 경로를 지원하는 핵심적인 역할을 담당합니다. 연구진은 이전의 연구를 통해 PC 억제가 높은 침습성의 유방암 세포 증식 속도를 늦추고, glucose와 glutamine 보충(anaplerosis)을 감소시킬 수 있다는 사실을 입증한 바 있습니다¹. 본 응용 자료에서는 PC 억제가 인간 간암 세포(HepG2)에 대해서도 비슷한 효과를 나타낸다는 사실을 보여줍니다.

실험

세포 배양 및 시약

이전의 자료에서 서술한 바와 같이, siRNA를 이용하여 pyruvate carboxylase knockdown HepG2 세포를 준비하였습니다¹. 서로 다른 억제 레벨의 5개 knockdown 세포주를 생성하였습니다(PC179, PC2096, PC 3436 및 PC847). 60mm 배양 플레이트에 약 3×10^6 개의 세포를 심었습니다. 10%(v/v)의 소 태아혈청(FBS)과 100units/mL의 penicillin 및 100µg/mL의 streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's 배지(DMEM)에서 세포를 배양하였으며, 5% CO₂, 37°C 조건에서 이틀간 유지하였습니다. 배지를 3mM glucose가 포함된 완전한 DMEM으로 교체한 후, 세포를 하루 더 배양하였습니다. 실험 당일, 세포를 0mM 글루코스 DMEM에서 30분간 배양한 다음, 배지를 2mL의 10mM ¹³C-labeled glucose

포함 DMEM 로 교체하고, 37°C에서 30분간 배양하였습니다. 실험은 각 세포주에 대해 3회 반복 분석하였습니다.

대사체 추출

세포를 150mM ammonium acetate로 빠르게 세척한 후, 8:1:1(v/v/v) methanol: chloroform: water로 추출한 다음 초음파 처리와 원심분리하였습니다. 그 뒤, 맑은 상층액을 HPLC 바이알로 옮겨 주입하였습니다.

LC/MS 분석

6546 LC/Q-TOF와 Agilent 1290 Infinity II LC로 구성된 시스템을 이용하여 데이터를 수집하였습니다. 크로마토그래피 분리는 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100mm, 2.7µm(p/n 675775-924), UHPLC Guard, HILIC-Z, 2.1mm × 5mm, 2.7µm(p/n 821725-947)를 이용하여 수행하였습니다. 먼저, 물에서 10배의 이동상 완충 원액(100mM ammonium acetate, pH 9.0)을 제조한 후, 물(A) 또는 acetonitrile(ACN, B)을 추가하여 최종 이동상을 제조하였습니다. 기울기 용리 동안 일정한 농도를 유지하기 위해, 수용액과 유기 이동상에 모두 InfinityLab Deactivator Additive(p/n 5191-4506)를 첨가하였습니다. 크로마토그래피적 안정성을 보장하기 위해, 혼합 시료 및 바탕 주입을 분석하였습니다².

소프트웨어 패키지

- MassHunter Acquisition 소프트웨어 버전 10.0
- Agilent Profinder V10.0
- Omix Premium V1.9.30
- PCDL Manager B.08
- Agilent MassHunter Pathways to PCDL 소프트웨어 B.08

표 1. LC 및 MS 파라미터

파라미터	값	MS 조건	
LC 조건		MS 시스템	6546 Q-TOF LC/MS
컬럼	InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100mm, 2.7µm (p/n 675775-924), UHPLC Guard, HILIC-Z, 2.1mm × 5 mm, 2.7µm(p/n 821725-947)	이온화원	Agilent Jet Stream
이동상	A) 10mM Ammonium acetate in water, pH 9 with 5µm deactivator additive (p/n 5191-4506) B) 10mM Ammonium acetate in water/ACN 10:90 (v:v), pH 9 with 5µm deactivator additive(p/n 5191-4506)	극성	음이온
유속	0.25mL/분	가스 온도	200°C
그라디언트	0~2분 90%B 2~12분 90~60%B 12~15분 60%B 15~16분 60~90%B 16~24분 90%B	건조 가스	10L/분
컬럼 온도	25°C	Nebulizer 압력	40psi
주입 부피	1µL	Sheath 가스 온도	300°C
자동 시료 주입기 온도	6°C	Sheath 가스 유속	12L/분
		캐필러리 전압	3,000V
		노즐 전압	0V
		Fragmentor	125V
		Skimmer	65V
		Octopole 1 RF 전압	750V
		수집 범위	m/z 50~1,000
		기준 질량	m/z 980.01638 및 119.0363

데이터 분석

Agilent MassHunter Pathways to PCDL 소프트웨어를 이용하여 BioCyc 에서 얻은 tricarboxylic acid(TCA) 회로에 대한 애질런트 개인 복합물 데이터베이스 및 라이브러리(Personal Compound Database and Library, PCDL) 파일(.cdb)을 작성하였습니다. 또한 pyruvate, aspartate 및 glutamate을 맞춤형 PCDL에 추가 하였습니다. 대사체 머무름 시간을 맞춤형 PCDL에 추가한 후, 이를 Profinder에서 동위원소체 배치 추출을 위한 데이터베이스로 사용하였습니다. Profinder의 결과는 Omix Premium 소프트웨어에서 시각화하기 위해 내보내기 하였습니다. 그림 1은 데이터 분석 워크플로의 개요를 요약한 것입니다.

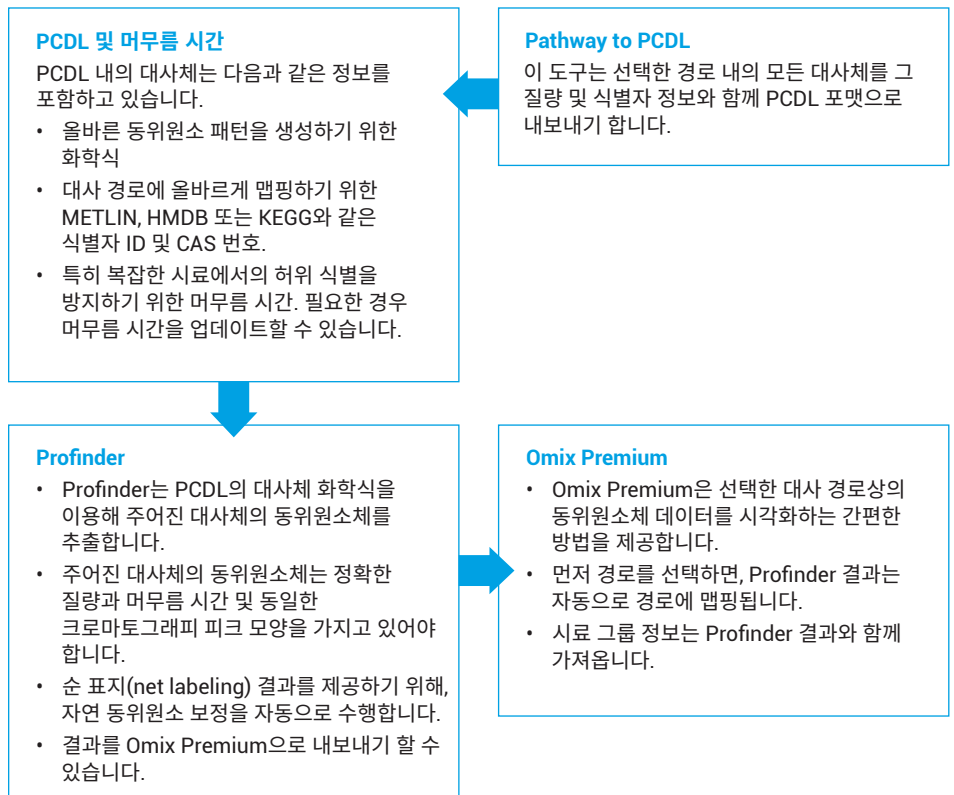


그림 1. VistaFlux 데이터 분석 워크플로 개요

결과 및 토의

6546 LC/Q-TOF MS에서 flux 시료를 분석하였습니다. 그림 2는 분해능이 40,000이상인 malate 동위원소체의 MS 스펙트럼을 보여주며, 7회의 기술적 반복 분석에서 모든 동위원소체에 대한 CV는 5% 미만을 나타냅니다(그림 3). 6546 Q-TOF의 높은 분해능은 잠재적 간섭을 줄여 데이터 분석의 신뢰도를 향상시킵니다. 동위원소 비율의 탁월한 재현성을 통해 정성 flux 실험에서 낮은 결합율도 측정할 수 있습니다.

Profinder에서의 동위원소체 배치 추출은 동위원소체 데이터를 분석하는 가장 쉽고 효율적인 방법입니다. 이는 동위원소체를 머무름 시간과 정확한 질량 및 크로마토그래피 피크 모양에 기반하여 식별함으로써 위양성을 줄이는 알고리즘을 포함하고 있습니다. 데이터는 각 대사체의 모든 동위원소체에 대해 수동으로 검토하였습니다(그림 4). 재현성 평가를 위해, 그룹별 보정된 존재비 또는 농축 백분율이 개별적으로 또는 조합되어 나타나 있습니다(그림 4). U-¹³C glucose는 HepG2 대조군 세포의 glutamic acid에서 상당량의 표지를 나타내며, 그중 m+2 표지가 주요 동위원소체입니다. 반면에 pyruvate carboxylase knockdown 세포는 훨씬 낮은 표지율을 나타냈습니다(그림 4). 모든 대사체를 경로상에 시각화하기 위해, 결과를 Profinder Archive 파일(.PFA)로 Omix Premium에 내보내기 하였습니다. Profinder archive 파일은 자연 발생 동위원소 보정 결과와 시료 그룹 정보 및 화합물 식별자를 함께 포함하고 있습니다.

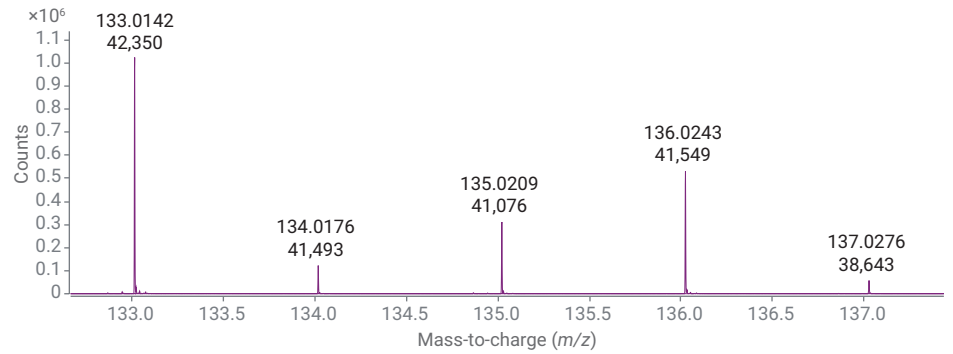


그림 2. Malate 동위원소체 질량 스펙트럼, 각 이온 피크에 m/z 및 분해능 표시

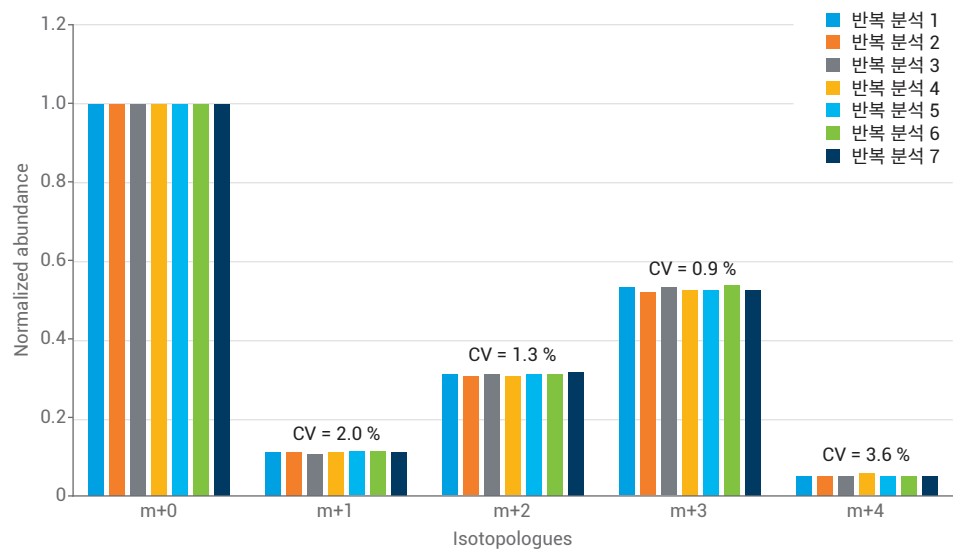


그림 3. 7회의 기술적 반복 실험에 대한 모든 malate 동위원소체의 변동 계수(CV%)

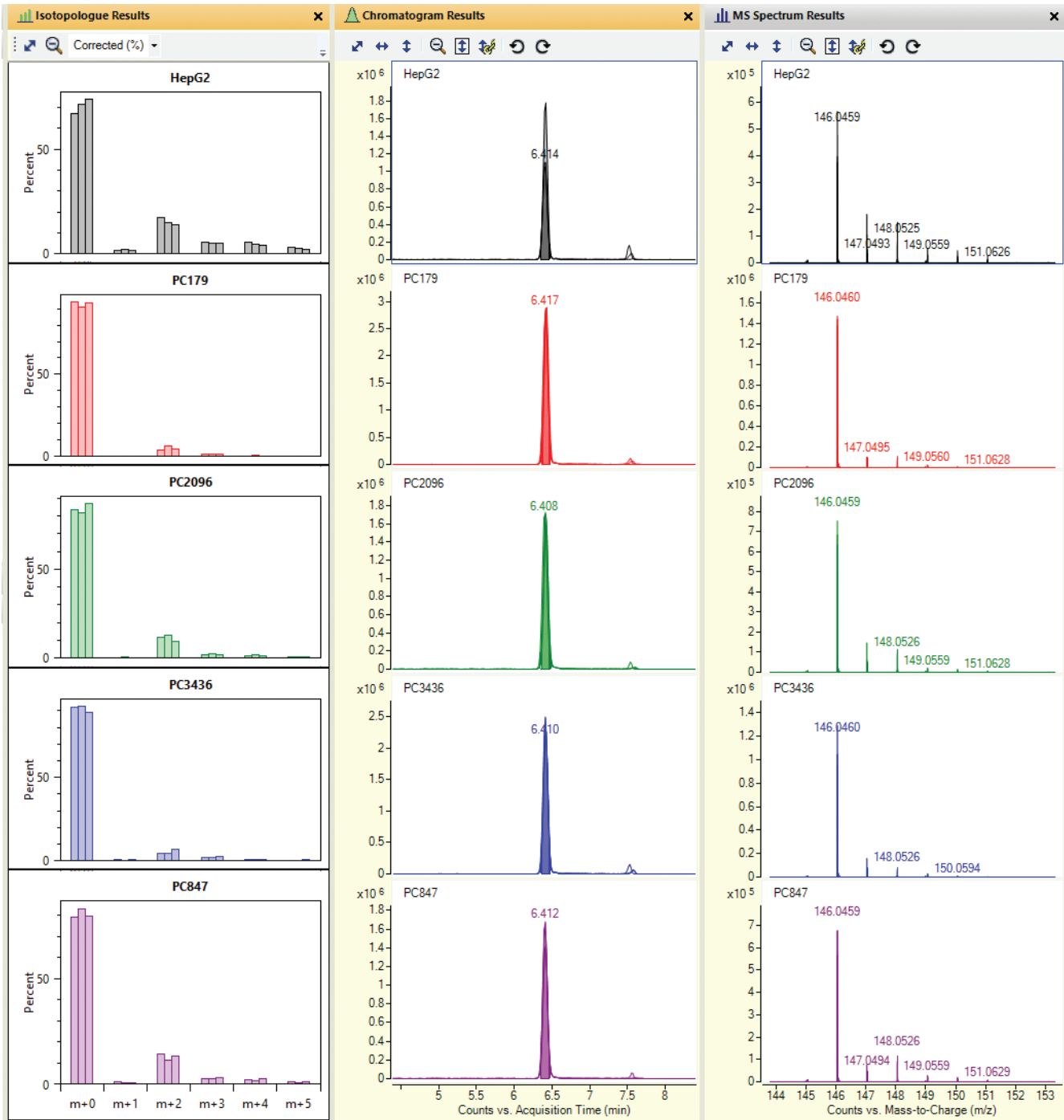


그림 4. 동위원소체, 크로마토그램 및 MS 스펙트럼 결과를 보여주는 Profinder 시각화

Omix Premium은 정성 flux 데이터의 시각화와 해석을 위해 설계된 그래픽 옵션을 제공합니다. 결과는 절대량 또는 동위원소 농축 비율 등을 이용해 다양한 방법으로 살펴볼 수 있습니다. Citrate 결과는 HepG2 대조 세포 내의 농축율이 약 50%이고, PC-knockdown 세포 내의 농축율은 약 25%임을 보여줍니다. 이는 pyruvate carboxylase knockdown이 TCA 사이클에 들어가는 glucose flux를 감소시켰음을 의미합니다(그림 5A). Knockdown 세포 내의 citrate 총 존재비는 약간 낮지만, 표지된 citrate의 존재비는 매우 낮습니다(그림 5B). 이는 knockdown 세포가 TCA 사이클 회전율을 감소시켰거나, 또는 세포가 glutamate와 같이 glucose flux 감소를 대체하고 TCA 사이클을 보충하기 위한 기타 보충 소스에 의존하고 있음을 나타냅니다.

자세한 표지 패턴을 이해하기 위해, 켈트 도표 또는 개별 동위원소체 농축 도표 등 기타 시각화 방법을 사용하였습니다(그림 6). 이들 도표는 U-¹³C glucose로 배양한 이 짧은 시간 동안, 가장 높은 존재비 표지가 탄소 수 m+2 및 m+3에 있음을 명확하게 보여줍니다. 배양 시간이 보다 길어지면 TCA 사이클 회전수가 증가하므로 더 많은 수의 탄소가 표지될 것입니다. m+2, m+3, m+4, m+5와 같은 대부분의 동위원소체는 나머지 세포 대비 HepG2 세포 내에서 더 많이 농축되었으며, 이는 knockdown 세포가 대조군 세포보다 TCA 사이클 회전율이 낮다는 것을 의미합니다.

Glutamate가 PC knockdown 세포에서 TCA 사이클을 보충하고 있는지의 여부를 측정하기 위해, glutamate와 그 동위원소체의 존재비를 살펴보았습니다. 표지되지 않은 glutamate(m+0)(그림 7)는 knockdown 세포 내에서 더 많은 축적을 보이며, 이는 glutamate가 더 적게 소모된다는 것을 시사합니다. 반대로 glutamate(m+n)는 보다 활성이 있는 대조군 HepG2 세포의 TCA 사이클에서 능동적으로 소모되었으며, 이는 glutamate가 HepG2 세포에서 보충 기질의 역할을 담당하고 knockdown 세포에서는 훨씬 적은 영향을 미치는 것을 나타냅니다. 따라서 pyruvate carboxylase knockdown은 TCA 사이클 내의 글루코스 flux를 변화시킬 뿐만

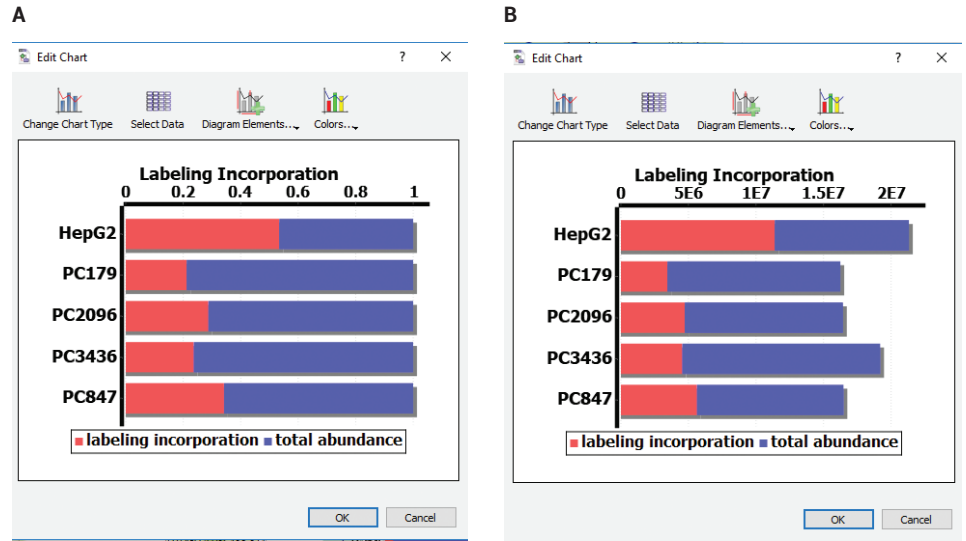


그림 5. 부분 표지(A) 또는 존재비(B)를 사용한 citrate 결과를 보여주는 Omix Premium 소프트웨어

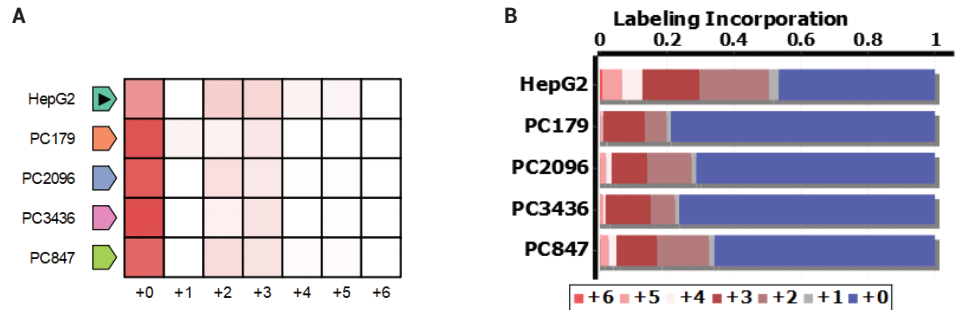


그림 6. 켈트 도표(A) 또는 개별 동위원소체 농축 도표(B)로 citrate 표지를 보여주는 Omix Premium 소프트웨어

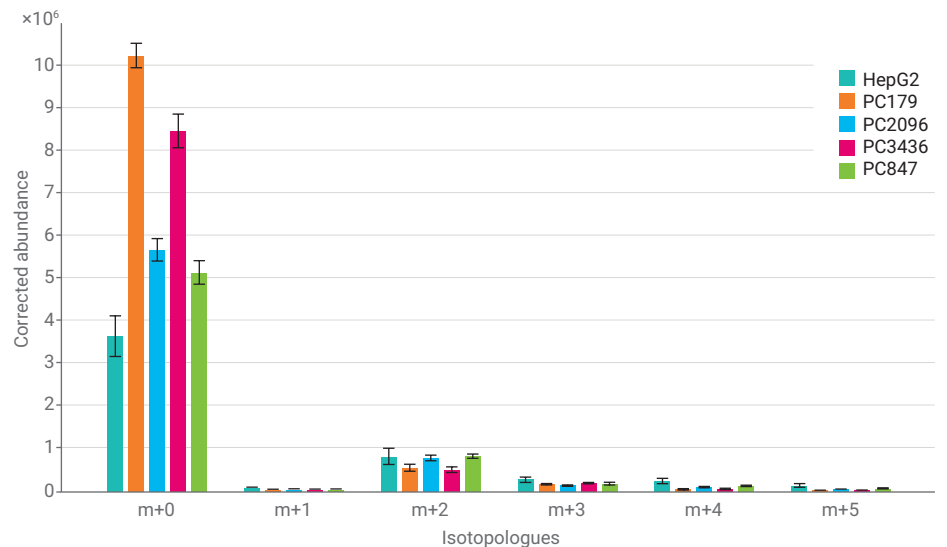


그림 7. Glutamate 동위원소체의 존재비를 보여주는 Omix Premium 소프트웨어

아니라, TCA 사이클의 glutamate 보충도 감소시켰습니다. 이 데이터는 유방암 세포 내 glucose 및 glutamate 보충에 대한 PC

knockdown 효과와 일치합니다¹. 그림 8은 TCA 사이클에 맵핑된 대사체와 그에 해당하는 농축 결과를 요약하여 보여줍니다.

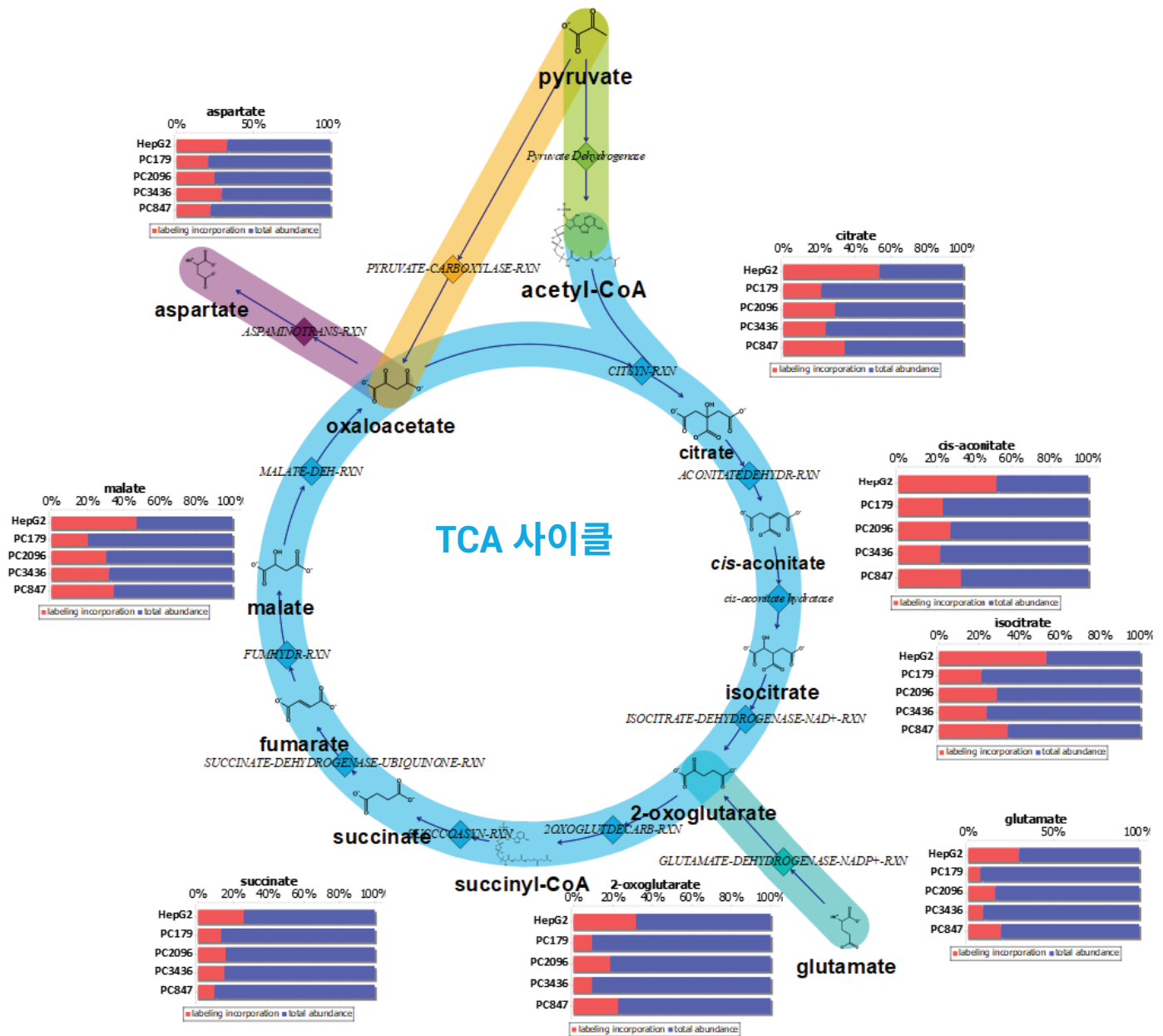


그림 8. TCA 사이클 및 관련 대사체 표지를 보여주는 Omix Premium 소프트웨어

결론

6546 LC/Q-TOF는 안정 동위원소 표지 추적에 있어 동위원소 비율 측정 정확도와 높은 분해능 및 넓은 측정 범위(dynamic range)를 제공합니다. 이 플랫폼은 VistaFlux 소프트웨어와 결합하여 정량 flux 분석을 수행하기 위한 통합적 워크플로 솔루션을 제공합니다. 이 워크플로를 이용한 결과, pyruvate carboxylase 효소를 knockdown한 HepG2 세포에서 glucose 산화의 감소를 보였습니다. Glucose 산화의 감소는 결과적으로 glutamate 보충을 감소시켰습니다.

VistaFlux 워크플로는 자연 동위원소 존재비를 보정하고 결과를 시각화할 수 있는 빠르고 강력한 동위원소체 정보 추출 솔루션을 제공합니다.

참고문헌

1. Phannasil, P.; *et al.* Mass spectrometry analysis shows the biosynthetic pathways supported by pyruvate carboxylase in highly invasive breast cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **2017**, *1863*(2), 537–551.
2. Hsiao, J. J.; *et al.* Monitoring of Mammalian Cell Culture Media with HILIC LC/MS. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5994-0024EN, **2018**.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 2월 21일, 한국에서 인쇄
5994-0713KO

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