

지질 프로파일링 워크플로에 의한 백혈병 세포 내 약물 유도 지질합성 차단 입증

Agilent 6546 LC/Q-TOF 및 MassHunter Lipid Annotator 소프트웨어 사용

저자

Mark Sartain,
Genevieve Van de Bittner,
Sarah Stow
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

개요

약물 처리한 급성 골수성 백혈병(AML) 세포 연구에 대하여 Agilent 6546 LC/Q-TOF 및 Agilent MassHunter Lipid Annotator 소프트웨어를 사용한 애질런트 지질체학 프로파일링 워크플로를 적용하였습니다. 결과는 전에 보고된 바 있는 관측 결과와 일치하였으며, 이 포괄적 워크플로의 확장된 적용 범위를 통해 지질의 차이가 더욱 명백하게 드러났습니다.

서론

이전의 연구에서 지질 저하제인 bezafibrate (BEZ)와 피임약인 medroxyprogesterone acetate(MPA)의 약물 조합(BaP)이 공격적인 혈액암 중 하나인 급성 골수성 백혈병(AML)에 대해 강력한 항암 특성을 가지고 있는 것으로 밝혀졌습니다. 해당 저자는 지질 분석을 포함한 일련의 실험을 통해 BaP가 지질합성 효소를 하향 조절함으로써 지방산 및 인지질의 신생합성(*de novo biosynthesis*)을 늦춘다는 것을 입증하고, 지질합성의 조절 장애가 BaP의 항암 효과에 대한 주요 요인임을 시사하였습니다.

본 연구는 개념 증명 연구로서, 지질체학 프로파일링 워크플로를 적용하여 BEZ, MPA 및 BaP 약물 조합에 대한 AML K562 세포주의 지질 변화를 분석했습니다. 수집 속도와 관계없이 향상된 분해능과 넓은 측정 범위(dynamic range)를 동시에 지원하도록 고안된 질량 분석기인 6546 LC/Q-TOF를 사용하여 애질런트 지질 분석 워크플로를 수행하였습니다. 이 워크플로의 핵심은 MassHunter Lipid Annotator 소프트웨어입니다. 이 소프트웨어는 심도있는 어노테이션 커버리지를 바탕으로 지질 MS/MS 스펙트럼을 빠르게 어노테이션하고 검출된 지질에 대한 맞춤형 라이브러리를 간편하게 생성합니다. 이러한 라이브러리는 완전한 지질 분석 워크플로의 핵심 구성 요소이며 표적 및 비표적 지질체학 프로파일링을 지원합니다.

실험

세포 배양

보충 RPMI 배지에서 AML K562 세포를 배양했습니다. 배양 세포를 2.4×10^5 cells/mL(3mL/well)로 6-well plate에 시딩(seeding)한 다음, 0.5mM BEZ, 5mM MPA, BaP(0.5mM BEZ 및 5mM MPA의 조합) 또는 vehicle 대조군(1:1 에탄올/DMSO)의 네 종류 처리를

적용했습니다. 각 처리 방식에 대하여 4개의 반복 주입용 웰을 준비하였습니다. 24시간 동안 배양한 후, 세포를 원심분리로 펠릿(침전)을 만들고 PBS(-Ca, -Mg, 1mL, 4°C)로 세척한 다음 다시 펠릿을 형성하였습니다. 그런 다음 -80에서 급속 냉동하여 보관하였습니다. 그림 1은 세포 배양 전략을 보여줍니다.

지질 추출

세포 펠릿(침전물)을 얼음 위에서 해동하고 변형된 Folch 추출법으로 지질을 추출하였습니다. 메탄올(200μL)을 2mL Eppendorf 튜브에 첨가하여 튜브 내 각 세포 펠릿을 잠기게 한 후, vortex 믹서를

사용하여 2분간 튜브를 진탕하였습니다. Chloroform(400μL)을 첨가하고, vortex 믹서를 사용하여 2분간 진탕하였습니다. 상 분배(phase partitioning)를 유도하기 위해 각 시료에 물 120μL를 추가하였습니다. 그 다음, 혼합물을 vortex 믹서로 2분간 혼합하고 4 °C에서 16,000×g로 5분간 원심분리하였습니다. Gas-tight 유리 시린지로 조심스럽게 하층액을 취해, 두 번째 Eppendorf 튜브로 옮겼습니다. 남아있는 중간층과 상층액을 재추출하기 위해 450μL의 chloroform/methanol/water (86:14:1, v/v/v) 혼합물을 첨가하고, 2분간 vortex 믹서로 혼합하였습니다.

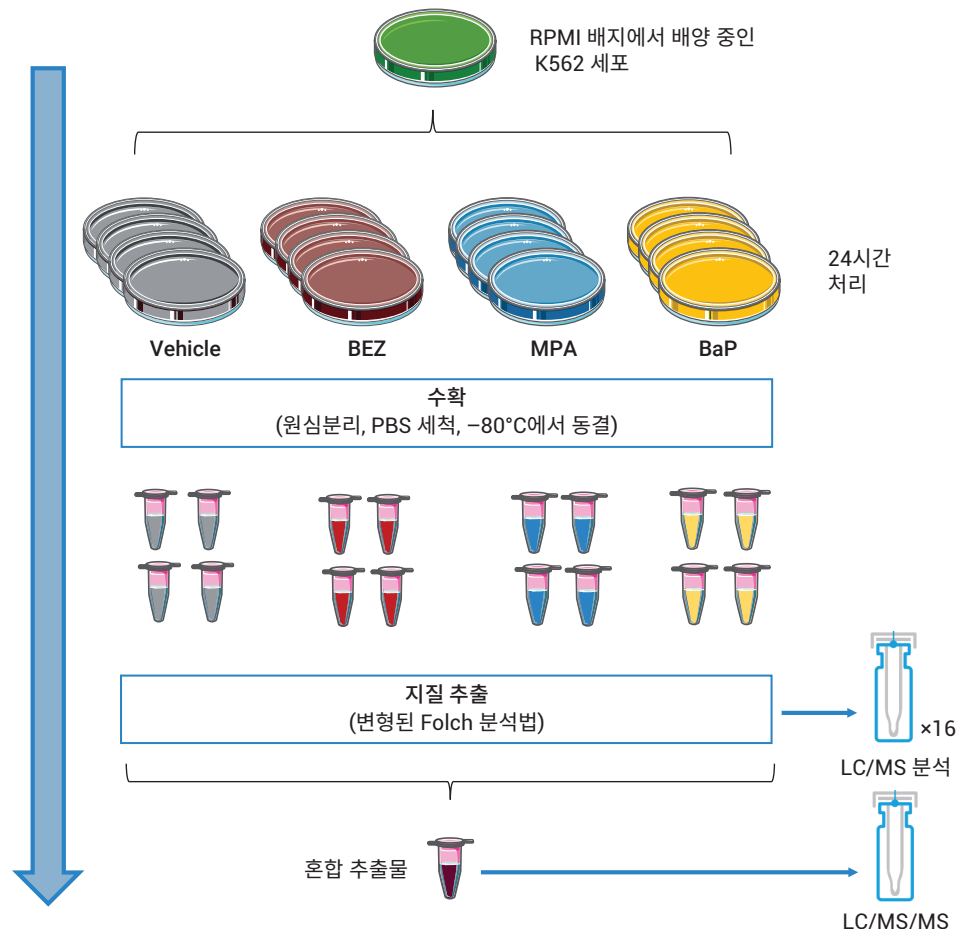


그림 1. 암세포 지질체에 대한 약물 처리 효과 연구를 위한 실험 설계

하층액을 혼합하고 600 μ L의 chloroform/methanol/water(3:48:47, v/v/v) 혼합물을 첨가한 다음, 용액을 2분간 vortex 믹서로 혼합하고 원심분리하였습니다. 하층액을 새로운 Eppendorf 튜브로 옮기고 진공 농축기로 건조한 다음, 200 μ L의 재용해 용매(methanol/chloroform(9:1 v/v))로 재현탁시키고 vortex 믹서로 가볍게 혼합하였습니다. 추출물을 나누고 농축하여 다음과 같은 여러 LC/MS 수집 분석법에 이용하였습니다.

- 양이온 모드 LC/MS용 시료:
 1. 각 반복 시료의 MS1 데이터를 수집하기 위해 50 μ L의 추출물을 비활성화된 유리 바이알 삽입튜브로 옮겼습니다.
 2. 각 50 μ L 시료에서 분취한 10 μ L 용액을 하나의 유리 바이알 삽입튜브에 넣어 혼합하였습니다 (16개 시료 = 160 μ L). 이렇게 혼합된 분취액을 진공 농축기에서 건조 및 농축시키고 50 μ L의 재용해 용매로 재현탁하여 AutoMS/MS(Iterative MS/MS) 데이터 수집에 사용하였습니다.
- 음이온 모드 LC/MS용 시료:
 1. 나머지 150 μ L의 각 추출물을 비활성화된 유리 바이알 삽입튜브로 옮기고 진공 농축기로 건조시켰습니다. 각 시료를 50 μ L의 재용해 용매에 재현탁시켜 각 반복 시료의 MS1 데이터 수집에 사용하였습니다.

2. 각 재용해된 50 μ L 시료에서 분취한 10 μ L 용액을 하나의 유리 바이알 삽입튜브에 넣어 혼합하였습니다 (16개 시료 = 160 μ L). 혼합된 분취액을 진공 농축기에서 건조 및 농축시키고 50 μ L의 재용해 용매에 재현탁시켜 AutoMS/MS(Iterative MS/MS) 데이터 수집에 사용하였습니다.

- 모든 시료에 대하여 주입량은 5 μ L 이었습니다.

기기

- **LC 시스템:** Agilent 1290 Infinity II LC 구성:
 - Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A)
 - 온도 조절 장치를 장착한 Agilent 1290 Infinity II Vialsampler(G7129B)
 - Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)

- **MS 시스템:** Agilent Jet Stream Technology 이온화원을 탑재한 Agilent 6546 LC/Q-TOF

분석법

Iterative MS/MS를 이용하여 16개의 시료 (4개 조건 \times 4회 반복 분석)를 대표하는 혼합 K562 지질 추출물을 수집하였습니다. Iterative MS/MS는 완전 자동화된 Q-TOF 수집 모드로써 시료를 여러 번 주입하며, 이전의 주입에서 MS/MS 조각화를 위해 선택한 전구체는 rolling basis 방식으로 배제합니다. 단일 시료로부터 보다 방대한 지질 어노테이션을 얻을 수 있는 Iterative MS/MS의 가치에 대해서는 기존의 연구를 통해 입증한 바 있습니다².

상세 실험 방법에 따라 크로마토그래피 및 AutoMS/MS 질량 분석을 수행하였으며², 해당 파라미터는 표 1과 2에 나타나 있습니다. 또한, 초당 3개 스펙트럼의 MS 수집 속도로 개별 시료에 대해 MS-only 데이터를 수집하였습니다.

표 1. 크로마토그래피 조건

파라미터	Agilent 1290 Infinity II LC
분석 컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 \times 100mm, 2.7 μ m(p/n 695975-302)
가드 컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 \times 5mm, 2.7 μ m(p/n 823750-911)
컬럼 온도	50°C
주입 부피	5 μ L
자동 시료 주입기 온도	50°C
니들 세척	세척 포트에서 15초(50:50 methanol/isopropanol)
이동상	A) 10 mM ammonium acetate, 0.2 mM ammonium fluoride in 9:1 water/methanol B) 10 mM ammonium acetate, 0.2 mM ammonium fluoride in 2:3:5 acetonitrile/methanol/isopropanol
유속	0.6mL/분
그라디언트 프로그램	시간 %B 0.00 70 1.00 70 3.50 86 10.00 86 11.00 100 17.00 100 17.10 70 19.00 70
중지 시간	19분
사후 시간	없음
관측된 컬럼 압력	170~330bar

소프트웨어

- Agilent MassHunter Q-TOF Data Acquisition 버전 10.0을 사용하여 6546 LC/Q-TOF를 작동하였습니다.
- Agilent MassHunter Lipid Annotator 버전 1.0을 기본 설정 파라미터로 사용하였으나, 양이온 모드 분석에서는 $[M+H]^+$ 및 $[M+NH_4]^+$ 전구체만 고려하였으며, 음이온 모드 분석에서는 $[M-H]^-$ 및 $[M+HAc-H]^-$ 전구체만을 고려하였습니다.
- Agilent MassHunter PCDL Manager 버전 B.08 SP1을 사용하여 (Lipid Annotator에서) 내보내진 어노테이션된 지질 라이브러리 (PCDL)를 관리 및 편집하였습니다. 구체적으로는 PCDL Manager를 사용하여 9개의 Cer_NS 지질에 대한 중복을 제거하였는데, 이 부분에서 $[M-H]^-$ 및 $[M+acetate]^-$ 분자 이온이 별도 항목으로 분리되어 있는 것을 관찰할 수 있었습니다. $[M-H]^-$ Cer_NS 항목을 삭제하여 음이온 모드 PCDL에 653종의 지질이 남았습니다.
- 특징 추출에는 Agilent MassHunter Profinder 버전 10.0을 사용하였습니다³. 제공된 "Profinder - Lipids.m" 분석법은 다음과 같이 변경하여 배치 표적 특징 추출(Batch Targeted Feature Extraction)에 사용하였습니다.
 - 1단계:** +H 및 +NH4 선택(양이온), -H 및 -CH3COO 선택(음이온); 전하 상태 z = 1인 단일 이온 또는 단일 이온 특징 보고: 선택
 - 2단계:** MS 동위원소 존재비의 예상 데이터 편차: 12.5%
 - 3단계:** 평활화 함수: 함수 폭이 8인 2차/3차 Savitzky-Golay; height filter: 선택 해제; 최고(높이 기준) 피크의 최대 허용 개수: 10개 피크
 - 4단계:** 변경하지 않음
 - 5단계:** Score (Tgt) 선택 해제

표 2. Agilent 6546 LC/Q-TOF AutoMS/MS(Iterative) 파라미터

파라미터	Agilent 6546 LC/Q-TOF
가스 온도	200°C
가스 유속	10L/분
Nebulizer(psig)	50
Sheath 가스 온도	300°C
Sheath 가스 유속	12L/분
VCap	3,500V(+), 3,000V(-)
노즐 전압	0V
Fragmentor	150V
Skimmer	65V
OctopoleRF Vpp	750V
기준 질량	m/z 121.050873, m/z 1221.990637 (+) m/z 119.03632, m/z 980.016375 (-)
MS 및 MS/MS 범위	m/z 40~1,700(+)
MS 및 MS/MS 최소 수집 속도	3스펙트럼/초
분리 폭	좁음(약 1.3m/z)
충돌 에너지	20eV(+), 25eV(-)
주기당 최대 전구체 수	3
전구체 존재비 기반 스캔 속도	예, 표적 25,000카운트/스펙트럼
MS/MS 누적 시간 제한 사용	예
표적 TIC에 도달할 수 없는 전구체 거부	아니요
MS/MS 임계값	5,000카운트 및 0.001%
능동 배제 활성화	예, 1회 반복 후 0.05분간 배제
순도	엄격도 70%, cutoff 0%
동위원소 모델	일반 유기 분자
전구체 정렬	1, 2, unknown
정적 배제 범위	m/z 40~151(+) m/z 40~210(-)
Iterative MS/MS 질량 오차 허용 한계	20ppm
Iterative MS/MS RT 배제 허용 한계	±0.1분

- 차이 분석에는 Agilent MassHunter Mass Profiler Professional 버전 15.1을 사용했습니다. "Lipidomics" 실험 유형으로 2개의 실험(양이온 또는 음이온)을 생성하여 해당 Profinder 아카이브(.pfa)를 데이터 소스로 사용하였습니다. Percentile shift 정규화 알고리즘(75%)을 사용하였으며, 데이터세트의 비교 기준점으로 전체 시료의 중앙값(median)을 선택하였습니다.
- MPP 내에서 Agilent MassHunter ID Browser 버전 10.0을 사용하였고, 이때 질량 ±5ppm과 머무름 시간 ±0.10분 기준을 적용하였습니다.

워크플로

앞서 설명한 대로 표적 및 비표적 지질체학 워크플로를 모두 사용하였습니다⁴.

결과 및 토의

혼합 AML 세포 지질 추출물을 이용한 Lipid Annotator 데이터베이스 생성

지질체학 워크플로의 첫 번째 단계로, 혼합된 AML 세포 추출물에서 얻은 5개의 Iterative MS/MS 데이터 파일 두 세트를 Lipid Annotator 소프트웨어로 분석하였습니다(그림 2). 양이온 모드에서는 17개 클래스를 대표하는 430종의 지질을 어노테이션하였으며, 음이온 모드에서는 25개 클래스를 대표하는 653종 지질을 어노테이션하였습니다. Lipid Annotator 결과는 PCDL(cdb) 파일로 내보내기 하였습니다.

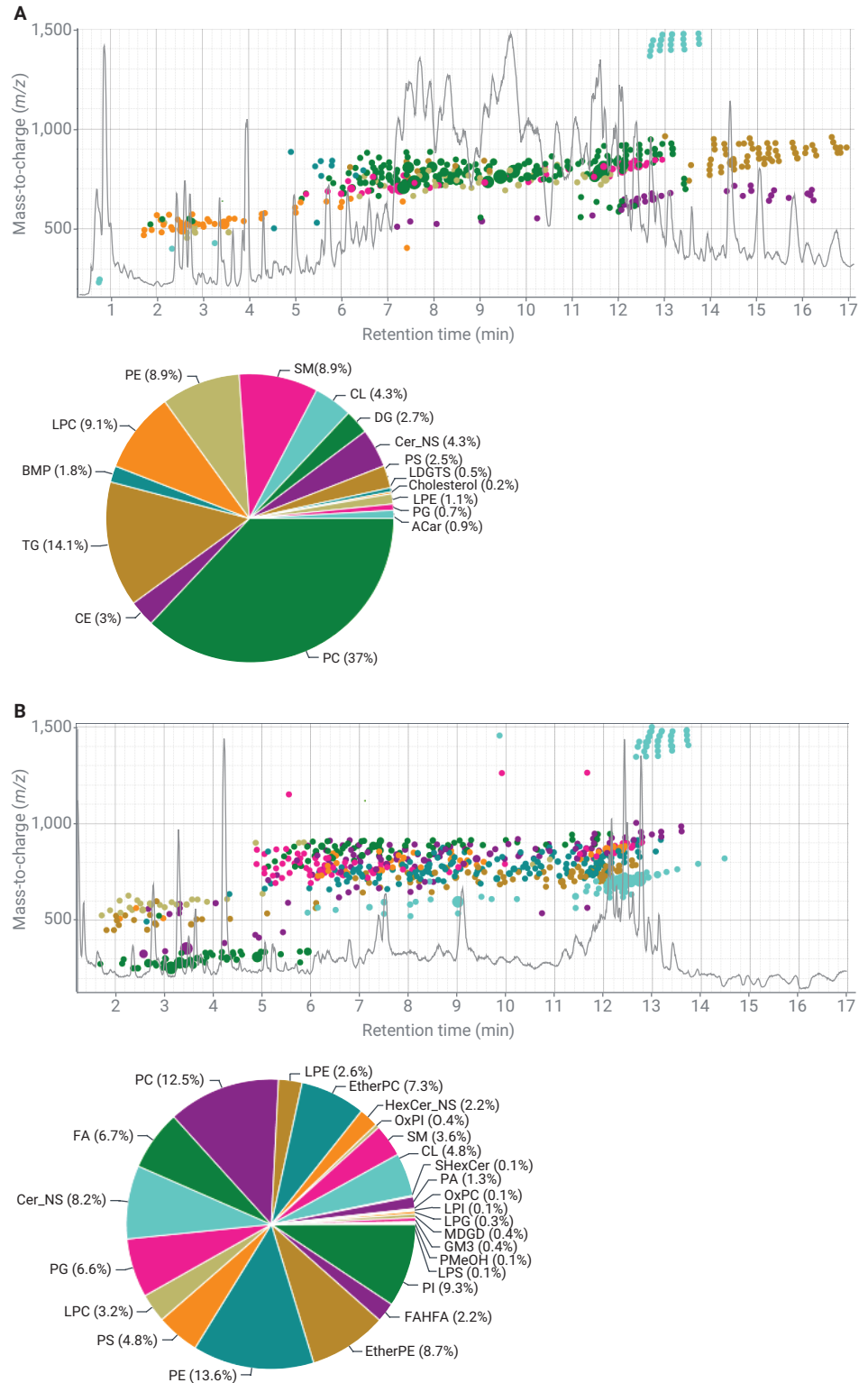


그림 2. 양이온(A) 및 음이온(B) 이온화 모드에 대한 Lipid Annotator 소프트웨어 결과. 5개의 Iterative MS/MS 데이터 파일을 각 프로젝트별 하나의 배치로 분석하였습니다. 이해를 돕기 위해, 대표적인 총 이온 크로마토그램을 m/z 대 머무름 시간 산점도와 오버레이하였습니다. 지질 특징은 파이 차트에 대응하는 지질 클래스 컬러로 표시하였으며, 파이 차트에는 어노테이션된 지질의 수가 백분율로 표시되어 있습니다.

약물 처리로 유도된 작은 변화를 식별하는 지질 프로파일링

앞서 생성한 PCDL(.cdb) 데이터베이스를 사용하여 Profinder에서 각 배치의 16개 MS1 데이터 파일에 대한 배치 표적 특징 추출을 수행하였습니다. 중요한 것은 표적화된 방식으로 지질 특징에 대한 MS1 데이터 파일을 검색하기 위해 데이터베이스 화합물 화학식 및 머무름 시간 모두를 필요 기준으로 사용했다는 점입니다. 결과 화합물을 Profinder에서 검토했으며 일부 특징의 경우 불량하거나 모호한 특징 피크 모양으로 인해 수동으로 적분하거나 제거하였습니다. 수동 큐레이션 후, 양이온 및 음이온 모드 데이터세트에 각각 375종 및 548종의 화합물이 남았습니다. 통계 분석을 위해 Profinder 결과(.pfa 파일)를 MPP(Mass Profiler Professional)로 가져오기 하여 양이온 및 음이온 모드에 대해 별도의 실험을 생성하였습니다. 정규화 및 베이스라이닝(비교 기준점 설정) 후, 두 극성에 대해 얻은 PCA 플롯 결과는 유사했습니다. 성분을 필터링하지 않은 상태에서(모든 화합물 유지), 각 조건 하에 생물학적 반복 분석이 밀집된 클러스터링을 이루며 약물 처리 사이의 명백한 차이를 입증하는 결과가 나타났습니다. BEZ와 MPA 각각은 모두 조합 BaP 효과와 별개로 영향을 미쳤습니다(그림 3). 주요 성분 1에 따른 그룹의 분리는 지질체에 미치는 조합 BaP 약물 효과에 있어 BEZ 처리가 MPA 이상으로 기여했음을 시사했습니다. 이러한 관찰 결과는 기존 연구 결과와 일치했습니다.

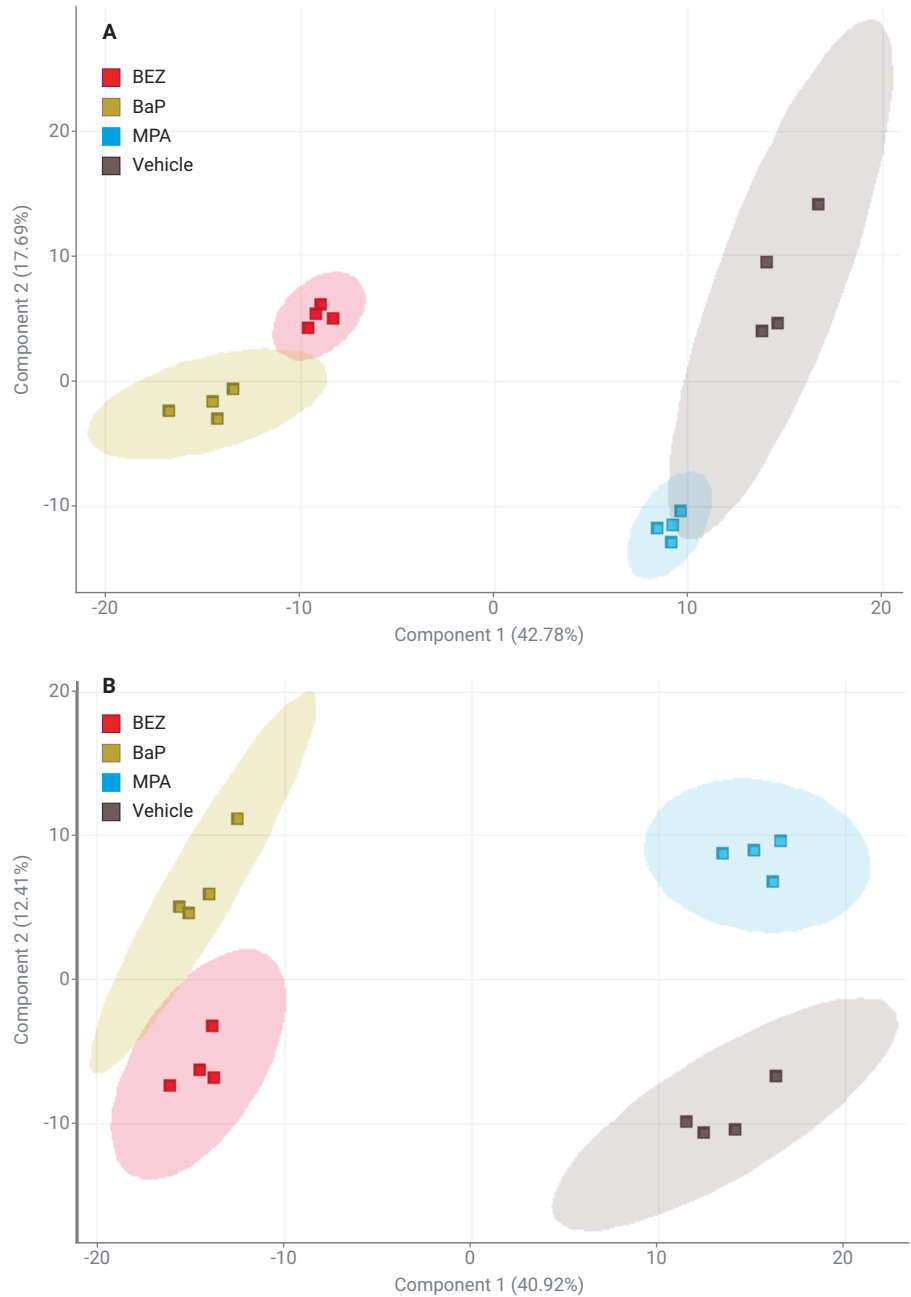


그림 3. 양이온(A) 및 음이온(B) 데이터세트에 대한 PCA 플롯

시료 상관 관계(표시되지 않음)와 무감독 계층적 클러스터링(그림 4) 또한 PCA 결과를 추가적으로 뒷받침하였습니다. 조건별 생물학적 반복 시료를 한 그룹으로 묶어서 보면, BEZ 시료가 MPA 시료보다 BaP와 더 밀접한 관계를 나타냄을 알 수 있습니다. 어노테이션된 지질 특징에 대한 무감독 클러스터링에서도 이러한 경향이 관찰되었습니다. 예를 들어, 분명한 패턴을 보이는 구역 내에서 클러스터 트리를 조사해 보면 여러 triacylglycerol(TG) 지질에서 밀접한 관계가 있음을 확인할 수 있습니다. 이러한 지질은 MPA 및 vehicle 대조군에 비해 BEZ 및 BaP 처리군에서 증가하였습니다.

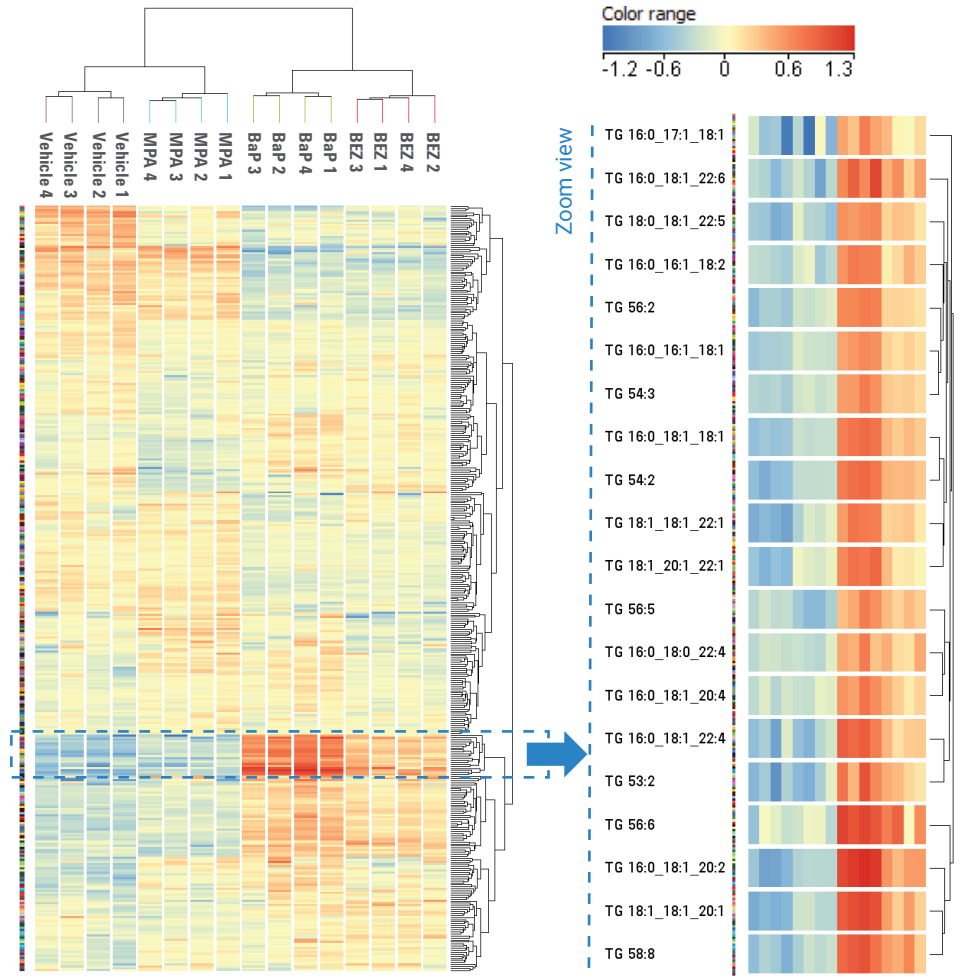


그림 4. 양이온 데이터세트의 화합물(n = 375) 및 조건을 결합한 무감독 계층적 클러스터링 결과. (오른쪽 그림) 어노테이션된 TG 지질이 많은 클러스터 트리 영역의 확대도를 보여줍니다. 색상 범위는 각 TG 특징에 대해 정규화 및 변환한 존재비를 log2 단위로 나타냅니다.

지질 프로파일링을 통한 지질합성 차단 입증

지질 클래스 존재비에 대한 차이를 보다 상세하게 평가하기 위해 MPP에서 양이온 모드 데이터셋을 사용하여 지질 클래스 매트릭스 플롯(히트 맵)을 생성하였습니다(그림 5). 결과는 명확한 차이를 보였습니다. Southam 등¹의 결과에서와 마찬가지로, vehicle 대조군 대비 BaP 처리군 내에서 TG는 증가하고 diacylglycerol(DG)는 감소하였습니다. DG는 인지질 신(*de novo*) 생합성 경로의 중간체로, 저자는 해당 논문에서 BaP 처리에 의한 DG 고갈이 acyl 사슬 첨가 단계에서의 인지질 합성 차단에 기인한 것이라고 제안하였습니다. 표 3에 양이온 및 음이온 데이터셋에서 유의미하게 다른 존재비를 갖는 지질 클래스를 요약하였습니다.

이전의 보고와 달리, 본 연구에서는 BaP 처리에 의한 lysophosphatidylcholine(LPC) 또는 lysophosphatidylethanolamine(LPE) 클래스 존재비의 현저한 감소는 관찰되지 않았습니다. 이러한 불일치의 원인은, MS 지질 데이터셋에 대한 정규화 및 처리 분석법의 차이를 비롯하여 여러 가지가 있을 수 있습니다. 본 연구에서는 이전의 연구에서 보고되지 않은 중요한 지질 클래스의 차이를 관찰할 수 있었으며, 특히 vehicle 대조군 대비 BaP 처리 세포 내에서 ceramide nonhydroxyfatty acid-sphingosine(Cer_NS) 및 hexosylceramide nonhydroxyfatty acid-sphingosine(HexCer_NS) 수준이 현저하게 증가하였고, phosphatidylcholine(PC) 수준은 감소하였습니다. 이전의 연구는 제한된 지질 클래스 패널에 대해 표적화된 스캔을 수행하는 샷건 지질체학 접근법을 적용했지만, 본 연구에서 수행한 표적 워크플로는 포괄적인 *in silico* 스펙트럼 라이브러리를 검색하기 위한 발견 단계부터 시작하여 여기에서 얻은 결과를 이용해 표적화된 데이터 마이닝을 수행하였습니다. 따라서, 본 연구의 접근법은 제한이 없었으며 지질 클래스 차이에 있어 이러한 결과를 얻어냈을 가능성이 높습니다.

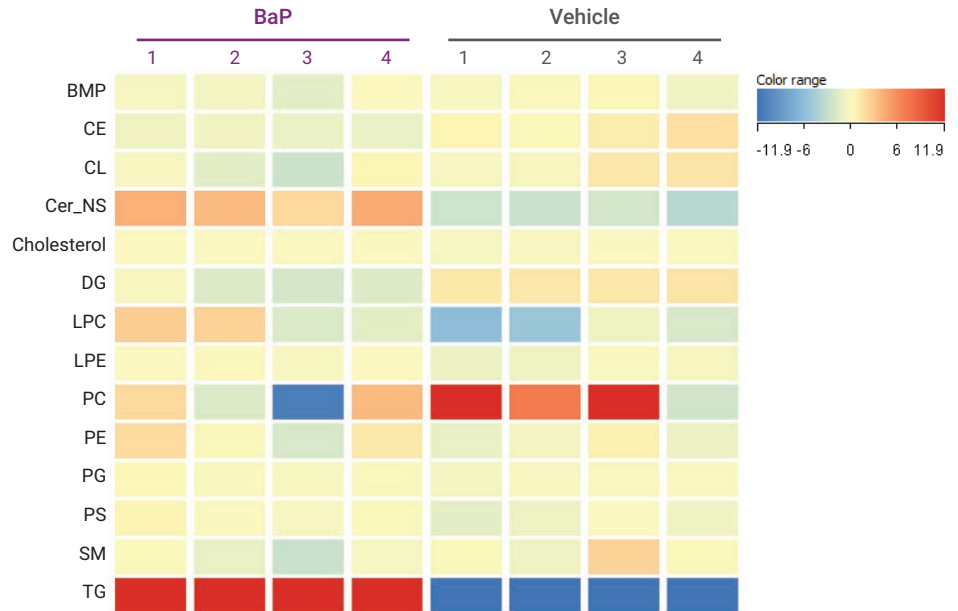


그림 5. BaP 처리 및 vehicle 대조군 시료 반복 분석에 대해 정규화된 총 지질 클래스 존재비의 MPP 지질 클래스 매트릭스. 색상 범위는 지질 클래스 내의 모든 지질 특징에 대해 표준화 및 변환한 존재비의 합을 나타냅니다.

표 3. BaP 처리에 기인하여 유의미하게 다른 존재비 수준을 갖는 지질 클래스 요약

지질 클래스	약어	BaP 효과	극성 [†]
Ceramide Nonhydroxyfatty Acid-Sphingosines	Cer_NS	증가	(+) ^{***} , (-) [*]
Hexosylceramide Nonhydroxyfatty Acid-Sphingosines	HexCer_NS	증가	(-) ^{***}
Triacylglycerols	TG	증가	(+) ^{***}
Gangliosides	GM3	증가	(-) ^{**}
Lyso-Phosphatidylglycerols	LPG	증가	(-) ^{**}
Ether-Linked Phosphatidylcholines	Ether PC	증가	(-) [*]
Lyso-Phosphatidylethanolamines	LPE	증가	(+) [*]
Lyso-Phosphatidylserines	LPS	증가	(-) [*]
Sulfatides	SHexCer	증가	(-) [*]
Diacylglycerols	DG	감소	(+) ^{***}
Monogalactosyldiacylglycerols	MGDG	감소	(-) ^{***}
Phosphatidylinositols	PI	감소	(-) ^{***}
Cholesterol Esters	CE	감소	(+) ^{**}
Cardiolipins	CL	감소	(-) ^{**}
Oxidized Phosphatidylcholines	OxPC	감소	(-) [*]
Oxidized Phosphatidylinositols	OxPI	감소	(-) [*]
Phosphatidic Acids	PA	감소	(-) [*]

[†] Vehicle 및 BaP 시료 그룹 사이의 유의성을 결정하기 위해 양측 t-검정 이용:

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

지질 클래스 내에서 개별 지질 특징의 존재비 차이를 시각화하기 위해 MPP에서 지질 매트릭스도 생성했습니다. Phosphatidylcholine(PC) 매트릭스 플롯을 확인한 결과, BaP 처리에 기인한 포화 fatty acyl 사슬 구성 PC의 감소(예를 들어, PC 16:0_26:0) 및 다중불포화 fatty acyl 사슬 구성 PC의 증가(예를 들어, PC 18:1_22:6)에 해당하는 일부 역패턴이 나타났습니다(그림 6). 이러한 관측 결과는 BaP 처리로 유도된 지방산과 인지질의 신(*de novo*)합성 감소로 인해 0~2개의 이중 결합을 갖는 PC 지질이 감소된다고 제안했던 Southam 등의 연구 결과와도 일치합니다. 이들은 또한 다중불포화 PC 지질의 증가는 포도당 이외의 외인성 공급원으로부터 다중불포화 지방산을 얻는 세포에 기인할 가능성이 가장 높을 것이라고 가정했습니다.

약물 처리에 대한 지질 이성질체의 차이 감응

포괄적인 LC 기반 지질체학 접근법을 통해 총구성이 동일하지만(즉, exact mass 동일) 크로마토그래피에서 분리된 지질 이성질체를 프로파일링 할 수 있었습니다. 이러한 이성질체가 데이터셋에 상당수 존재하였습니다. 양이온 모드 데이터셋에서는 어노테이션된 430종의 지질 중 94종이 이성질체인 반면, 음이온 모드 데이터셋에서는 어노테이션된 653종 지질 중 165종이 이성질체였습니다. 많은 경우에 이성질체는 약물 처리에 대해 현저하게 서로 다른 감응을 나타냈습니다. MPP에서 ceramide(Cer_NS) 지질 매트릭스를 검토한 결과, 여러 쌍의 이성질체에서 서로 반대되는 상관 관계가 있음이 드러났습니다(그림 7A). 예를 들어, 부분 분리된 Cer_NS 42:2 이성질체 쌍에 대한 추출 이온 크로마토그램에서 BaP 처리에 대한 역감응을 확인하였으며, BaP 처리 시 나중에 용리되는 이성질체는 앞서 용리되는 이성질체 대비 감소하였습니다(그림 7B). 이성질체는 동일한 총구성으로

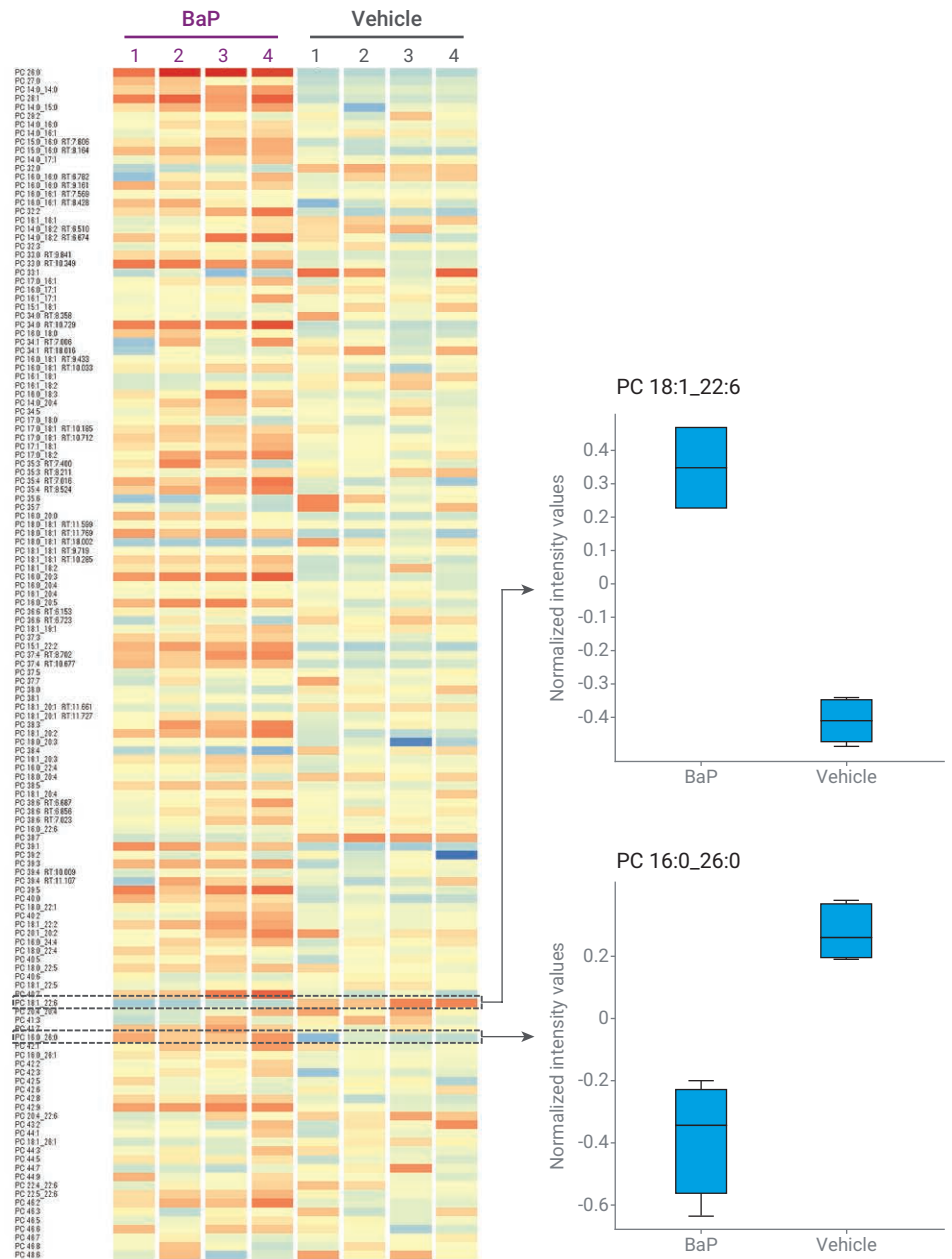


그림 6. BaP 처리 및 vehicle 대조군 시료 반복 분석에 대한 137개 phosphatidylcholine(PC) 지질 특징의 MPP 지질 매트릭스. 선택한 두 개의 PC 특징에 대한 상자수염플롯(box and whisker plot)이 오른쪽에 나타나 있습니다.

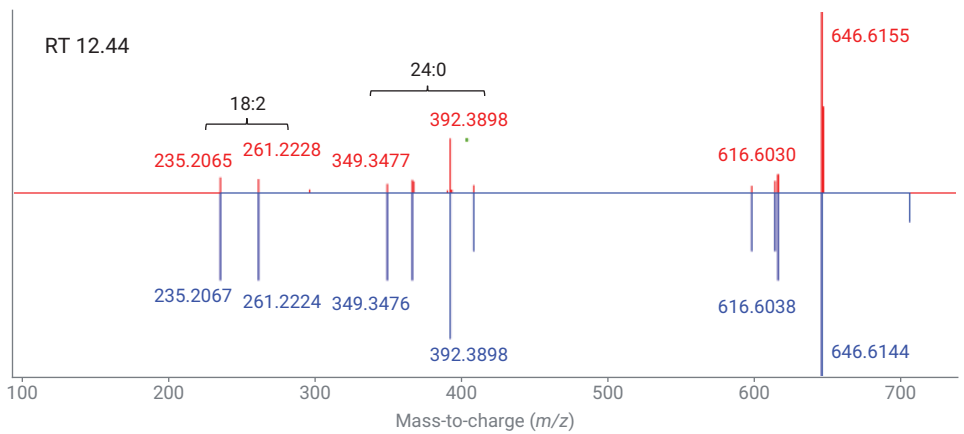
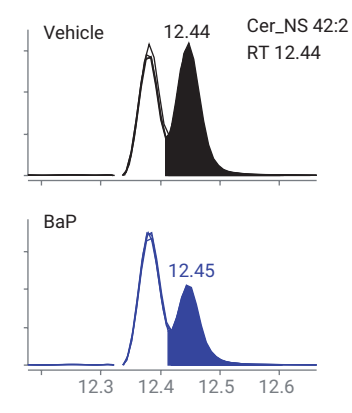
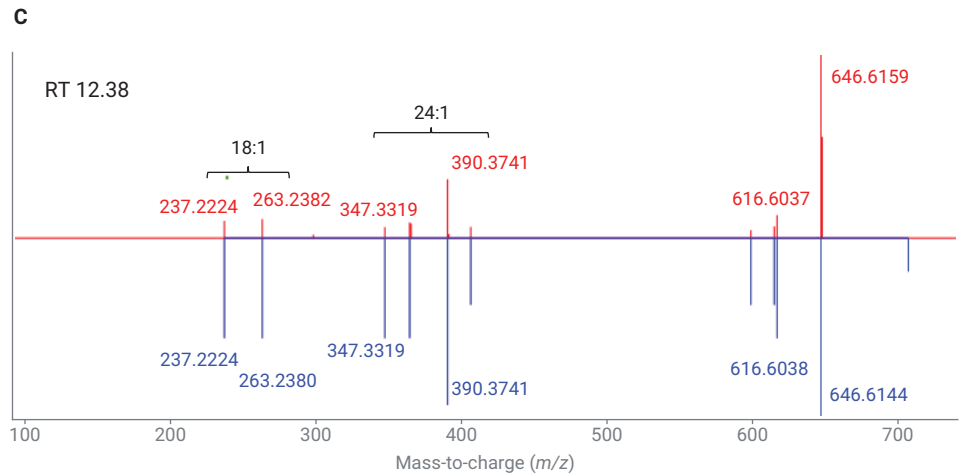
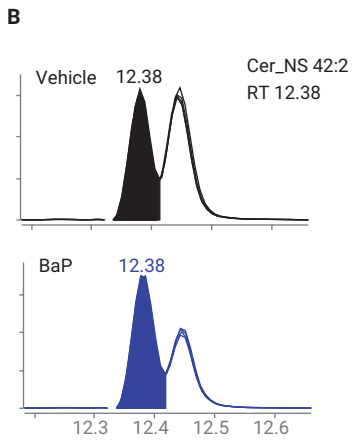
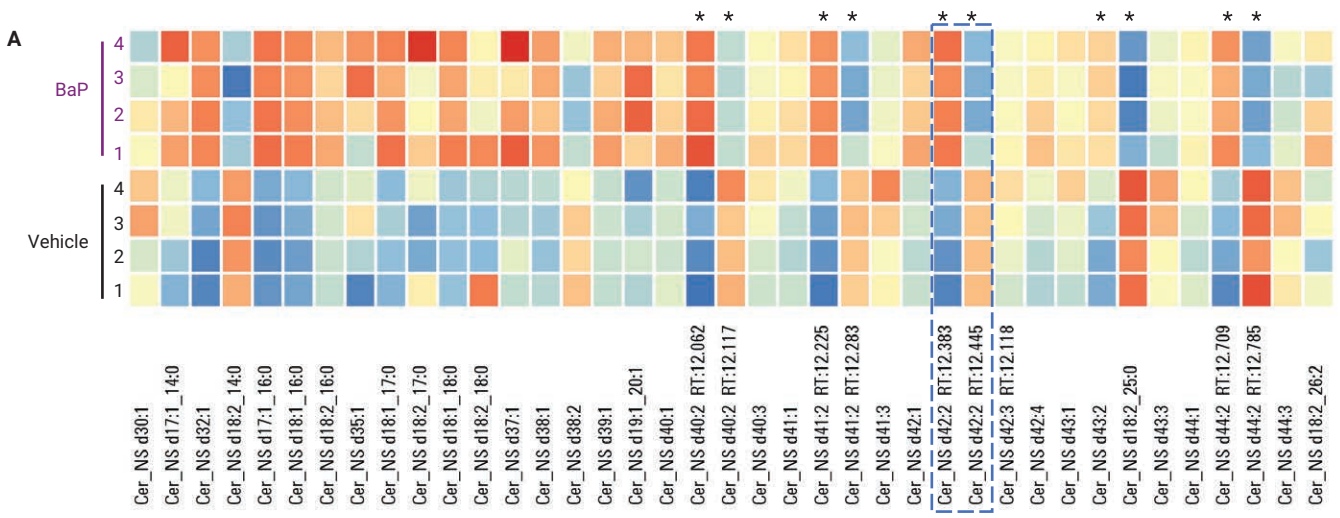


그림 7. Ceramide nonhydroxyfatty acid-sphingosine(Cer_NS) 이성질체의 차이 감응 및 구조 규명. (A) BaP 처리 및 vehicle 대조군 시료 반복 분석에 대한 39 개 Cer_NS 지질 특징의 MPP 지질 매트릭스. 별표 표시된 이성질체 쌍은 동일한 exact mass를 가지고 있지만 머무는 시간이 다르며 서로 반대되는 감응을 보임. (B) Cer_NS 42:2 이성질체 쌍에 대한 vehicle 대조군(n = 4) 대비 BaP 처리(n = 4)를 비교한 추출 이온 크로마토그램 오버레이. (C) Lipid Annotator의 헤드-테일 플롯. 매칭된 주요 생성 이온에 추가적으로 표지(관측 결과는 빨간색; 데이터베이스 값은 파란색). 두 플롯 사이에 플러스/마이너스 m/z 2.0156의 생성 이온 이동은 스프링고신 염기 및 에스테르화 지방산(표지됨)에서 이중 결합 개수에 차이가 있다는 증거를 제공했습니다. 관측된 스펙트럼은 Cer_NS d18:1_24:1 및 Cer_NS d18:2_24:0 데이터베이스 스펙트럼과 일치하였으며, Lipid Annotator 소프트웨어에서 가장 가능성 높은 성분으로 표시되었습니다.

어노테이션 되었지만, Lipid Annotator 결과 확인을 통해 앞서 용리되는 이성질체는 Cer_NS d18:1_24:1이고 나중에 용리되는 이성질체는 Cer_NS d18:2_24:0이라는 강력한 증거를 제공하였습니다(그림 7C). BaP 처리에 대한 ceramide 이성질체의 차이 감응에 대한 생물학적 유의성은 알려져 있지 않지만, 이러한 유형의 정보는 오직 지질체학 프로파일링 접근법을 통해서만 밝힐 수 있습니다.

비표적 지질체학 워크플로에 의한 매우 특이적인 비정형 지질의 확인

타 응용 자료에서 기술했던 바와 같이⁴ 비표적 워크플로도 지원하며 앞서 설명한 표적 워크플로와 동일한 PCDL 및 소프트웨어를 사용합니다. 주요 차이점은 다음과 같습니다.

- Profinder에서 비표적 특징 추출(재귀적 배치 특징 추출 알고리즘) 기능을 사용하고,
- MPP 내의 워크플로 후반부에서 ID Browser 도구를 사용하여 지질 어노테이션을 수행합니다.

본 연구에서는 16종 음이온 MS1 데이터 파일을 Profinder의 재귀적 배치 특징 추출 알고리즘으로 분석하여 2,052개의 특징을 MPP로 가져왔습니다. 결과적으로, 위에서 생성한 것과 동일한 음이온 PCDL 라이브러리를 사용하여 ID Browser를 통해 2,052개의 특징 중 513개를 지질로 어노테이션하였습니다(RT±0.10분을 필수 기준으로 지정).

재현성 있는 특징에 대한 차이 분석에 초점을 맞추기 위해, 네 가지 조건 모두에서 시료 변동성 CV<25%를 기준으로 성분 목록을 필터링하였습니다. 그 결과, 성분 목록은 1,377개 특징으로 줄어들었습니다. Vehicle 대조군과 비교하여 BaP 처리에 대해 moderated t-검정을 수행한 결과 상당한 차이를 보이는 93종 성분을 얻었으며(배율 변화 cutoff 1.5, p-값 0.05), 이들 성분 중 41개는 지질로 어노테이션 되었습니다(그림 8A). Vehicle 대조군 대비 가장 큰 차이를 보인 특징은 BaP 세포에서 3.93배의 증가를 나타냈으며(p-값 3.54×10^{-5}) 성분을 조사한 결과, 네 가지 조건에 걸쳐 현격한 차이가 나타났습니다(그림 8B). 관심 대상 화합물의 중성 질량은 339.2774Da였으며 ID Browser에서 어노테이션하지 못했습니다.

이 화합물의 본질에 대한 보다 상세한 정보를 얻기 위해, 513개의 어노테이션된 지질과 93개의 차이 성분을 결합한 목록에 대해 MPP에서 Kendrick 질량 결손(KMD) 플롯을 작성했습니다(그림 8C). 지질 클래스(X-축)에 대한 KMD(Y-축)를 플로팅한 결과, 관심 특징은 각각 두 개의 이중 결합을 갖는 네 개의 Cer_NS 지질 그룹과 유사한 KMD를 공유한다는 사실이 밝혀졌습니다. 흥미롭게도, 네 개의 ceramide 지질 질량(질량 707~735Da)은 관심 특징(339Da) 보다 훨씬 컸습니다. Lipid Annotator 내의 Lipid Calculator 도구를 사용하여 m/z 339.2774에 가까운 질량을 가진 총구성을 생성할 수 있는지를 평가하기 위해 가상의 Cer_NS 지질을 생성했습니다. 이러한

접근법에서 지질 Cer_NS d18:2_2:0가 관측된 특징 질량의 ±0.3 ppm 범위 내에 있었습니다. 또한, 정성 분석 소프트웨어를 사용한 분석에서는 d18:2 스피고신 백본에서 특징적인 MS/MS 생성 이온이 나타났는데, 이는 후보 Cer_NS d18:2_2:0 어노테이션에 대한 추가적인 증거를 제공하였습니다(데이터는 나타내지 않음). 그림 8D에는 C2 ceramide 또는 N-acetylsphingosine으로도 알려진 Cer_NS d18:2_2:0에 대한 후보 구조가 나타나 있습니다. 이 C2 ceramide는 많은 지질 데이터베이스(Lipid Annotator 포함)에 존재하지 않으며, 지질체학 연구에서 아직까지 일상적으로 확인되지 않았던 것입니다. 그러나 C2 ceramide는 다른 AML 세포주(HL-60)에서 생리학적으로 낮은 수준에서 발견되었습니다⁵. 합성 C2 ceramide는 세포 증식을 억제하고 세포자멸을 유도하는 능력을 포함해 생물학적 활성 특성에 대한 연구 도구로 널리 이용됩니다⁶. 우리는 BaP 처리 세포에서의 C2 ceramide 증가가 BaP의 항암 효과와 관련이 있을 수 있다고 추정하며, 이 정보가 암 연구계에서 관심의 대상이 될 수 있을 것으로 생각합니다.

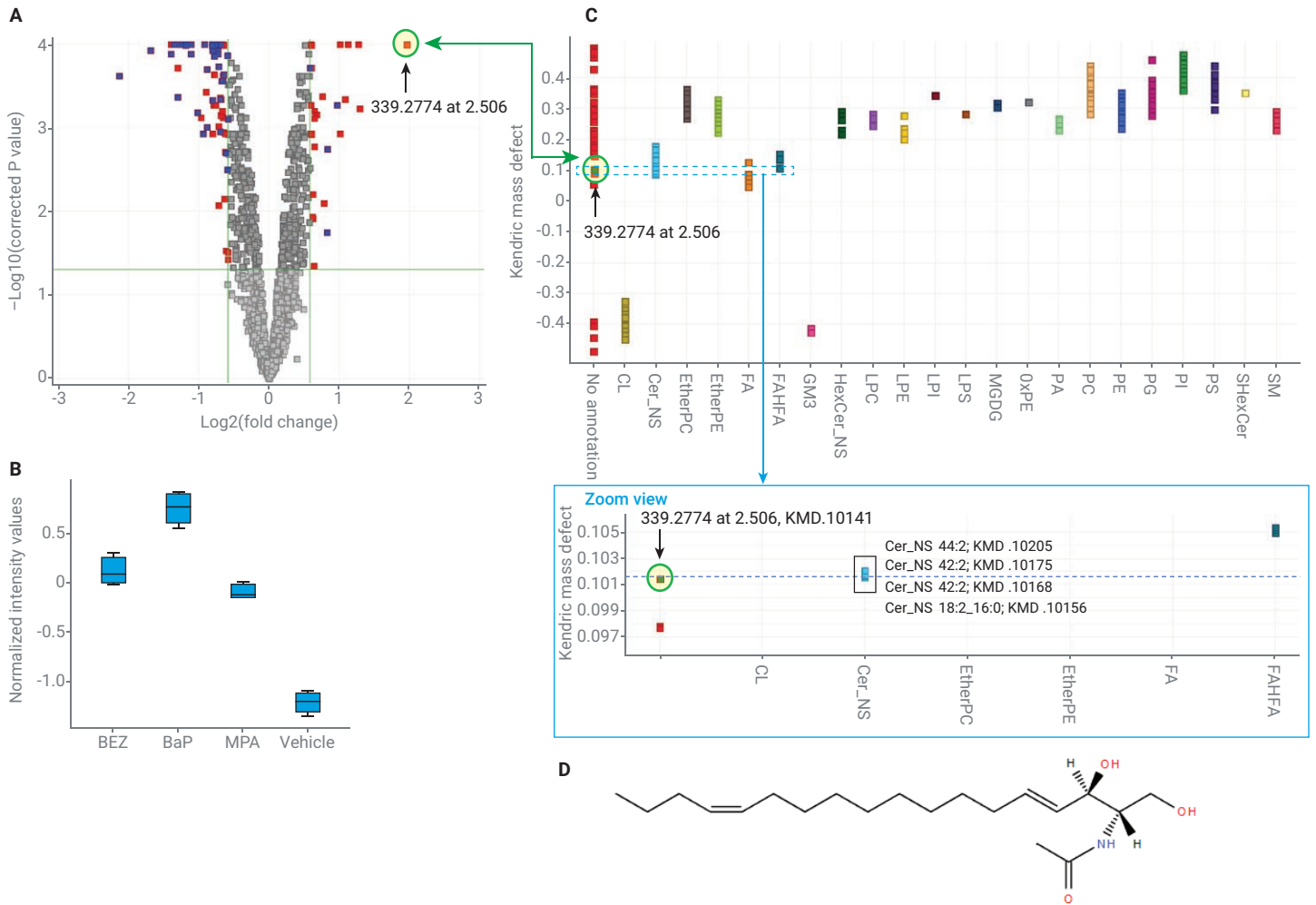


그림 8. 비표적 워크플로를 이용한 미지의 차이 특징 규명. (A) BaP 처리 대 vehicle 대조군에 대한 Benjamini-Hochberg FDR 다중 테스트 보정을 통해 moderated t-검정에서 얻은 MPP Volcano plot. 중요한 특징(배수 변화 cutoff >1.5, p-값 >0.05)은 파란색(어노테이션된 지질)과 빨간색(어노테이션되지 않은 특징)으로 표시하였습니다. 관심 특징 (2.506에서 m/z 339.2774)은 녹색 원으로 표시하였습니다. (B) 네 가지 약물 처리 조건에 대한 관심 특징의 상자수염플롯(Box and whisker plot). (C) 93개의 차이 특징 목록과 함께 513개의 어노테이션된 지질을 결합한 성분 목록의 MPP Kendrick 질량 결손(KMD) 플롯($n = 565$). PCDL에서 어노테이션할 수 없었던 특징은 첫 번째 열에 빨간색으로 표시되어 있습니다. 확대된 구역은 Cer_NS 지질 그룹과 관심 대상 특징의 KMD를 정렬시킨 결과입니다. (D) 관심 특징에 대한 Cer_NS 18:2_2:0 후보 구조.

결론

본 응용 자료에서는 Lipid Annotator 소프트웨어를 포함한 지질체학 프로파일링 워크플로가 지질 어노테이션 및 복잡한 시료의 차이 분석을 실질적으로 개선해 준다는 사실을 보여줍니다. 여기서는 BEZ 및 MPA 약물 후보 조합에 대한 급성 골수성 백혈병 K562 세포주의 지질체 변화를 연구하기 위해 표적 워크플로를 적용하였습니다. 분석 결과를 통해 diacylglycerol의 감소, triacylglycerols의 증가 및 fatty acyl 성분의 차이를 포함하여 약물 처리에 대응하는 여러 세포 변화를 밝혀냈습니다. 결과를 종합했을 때, 이러한 결과는 BaP 조합이 지질합성을 차단해 항암 특성을 발휘할 수 있음을 시사한 이전의 보고를 뒷받침합니다.

또한 이 지질 프로파일링 워크플로는 기존 샷건 기반의 지질체학 접근법으로 얻을 수 있는 것보다 더 포괄적인 지질 어노테이션을 제공합니다. 구체적으로, 이 워크플로를 이용하여 BaP 처리로 유도된 지질 클래스 존재비에서 유의미한 차이가 있음을 새롭게 확인하였으며 이는 이전에 보고된 적이 없는 것입니다. 또한 본 연구를 통해 크로마토그래피에서 분리된 지질 이성질체 중 약물 처리에서 차이 반응을 보이는 특정 사례가 있음을 확인했습니다. 마지막으로, 비표적 접근법에서는 추가적인 도구를 이용하여 어노테이션되지 않은 지질 특징에 어노테이션 후보를 제안하는 기능을 소개하였습니다.

참고 문헌

1. Southam, A. D. *et al.* Drug Redeployment to Kill Leukemia and Lymphoma Cells by Disrupting SCD1-Mediated Synthesis of Monounsaturated Fatty Acids. *Cancer Res.* **2015**, *75(12)*, 2530–2540.
2. Sartain, M. *et al.* Improving Coverage of the Plasma Lipidome Using Iterative MS/MS Data Acquisition Combined with Lipid Annotator and 6546 LC/Q-TOF. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-0775EN, **2019**.
3. MassHunter Profinder: Batch Processing for High-Quality Feature Extraction of Mass Spectrometry Data. *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5991-3947EN, **2014**.
4. Lipidomics Analysis with Lipid Annotator and Mass Profiler Professional. *Agilent Technologies Technical Overview*, publication number 5994-1111EN, **2019**.
5. Snyder, F. *et al.* Biosynthesis of N-Acetylsphingosine by Platelet-activating Factor: Sphingosine CoA-independent Transacetylase in HL-60 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271(1)*, 209–217.
6. Hannun, Y. A. *et al.* Programmed Cell Death Induced by Ceramide. *Science* **1993**, *259(5102)*, 1769–1771.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
2019년 10월 25일, 한국에서 인쇄
5994-1356KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울 특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

