

전립선암 바이오마커설명을 위한 발굴 단백질체학 워크플로

응용 자료

저자

Claire Tonry, Stephen Pennington
School of Medicine,
UCD Conway Institute
University College Dublin

Mark Sartain, Christine Miller
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, California, USA

서론

생물학적 시스템에서 숙주 미소 환경은 종양이 성장하는 동안 크게 변화합니다. 혈액 공급이 부족해져서 혈중 산소가 감소하는 것도 여기에 해당합니다. 혈중 산소가 부족한 미소 환경은 종양의 악성도, 침습도, 제거에 대한 저항성 증가와 상관관계가 있습니다[1]. 저산소 조건에서 산소 분자가 부족해지면 다른 영향 외에도 종양 세포 프로테옴이 변조되어 세포 증식과 세포 주기 역학이 변경될 수 있습니다[2]. 안드로젠 조절 단백질의 중요성을 고려할 때 저산소 조건과 안드로젠 민감도 역할의 특징을 자세히 조사하면 악성 세포성 비대/종양 성장을 일으키는 메커니즘에 대해 자세히 알아볼 수 있을 것입니다[3].

이 응용 자료에서는 임상 연구 워크플로에서 LC/MS 기반 발견 부분을 설명합니다. 이를 통해 저산소와 정상 산소 조건에서 안드로젠에 독립적인 세포주와 안드로젠에 민감한 세포주의 프로테옴을 종합적으로 비교하고, 비정상적인 세포 성장을 일으키는 세포 미소 환경 내의 중요한 변화를 나타낼 가능성이 있는 단백질 바이오마커를 식별합니다.



Agilent Technologies

분석법

세포 배양

PCa 세포주 LNCaP, LNCaP-abl(abl) 및 LNCaP-abl-Hof(Hof)는 Helmut Klocker 교수의 연구실 (오스트리아 인스브루크대학교 비뇨의학부)에서 Irish Prostate Cancer Research Consortium(아일랜드 더블린)에 기부했습니다. 위의 세포주는 Class II 층류 캐비닛에서 배양했습니다. 세포는 통풍이 되는 T175cm² 플라스크(Sarstedt)에 담아 CO₂ 5% 대기, 37°C 조건에서 배양했습니다. LNCaP 세포는 Advance RPMI 1640 배지(GIBCO Life Technologies)에 보관하고 10% FCS (우태혈청)(Sigma-Aldrich), 2μM/mL L-글루타민 (GIBCO Life Technologies), 50 unit/mL 페니실린 및 50μg/mL 스트렙토마이신(GIBCO Life Technologies)으로 보강했습니다. Abl 및 Hof 세포는 Advance RPMI 1640 배지에서 배양하고 10% charcoal stripped FCS(Sigma-Aldrich), 2μM/mL L-글루타민(GIBCO Life Technologies), 50 unit/mL 페니실린 및 50μg/mL 스트렙토마이신(GIBCO Life Technologies)으로 보강했습니다. 세포 배지는 3~4일에 1번씩 교체했습니다.

PCa 세포주에서 저산소 시뮬레이션

LNCaP, Abl 및 Hof 세포주를 10cm² 배양 접시에 놓고 70~80% confluence에 도달할 때까지 성장시켰습니다. 각 세포주에서 배지를 제거하고 1mM dimethylxaloglycine(DMOG, Cambridge Bioscience) 또는 1mM dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Aldrich)를 대조군으로 보강한 적절한 배지로 교체했습니다. 세포 용해 전에 세포를 8시간 또는 24시간 동안 처리한 배지에 배양했습니다. 각 세포주는 각 시점에서 3회의 생물학적 복제를 수행했습니다.

나노 LC-MS/MS 분석을 위한 시료 준비

나노 LC-MS/MS 분석을 위한 전체 세포 용해액은 Wisniewski; et al. [4]에서 설명된 여과기 보조 시료 조제법 (FASP)에 따라 조제했습니다. 50μg 세포 용해액 단백질을 최종 농도가 0.1M인 DTT로 잠시 끓여서(95°C에서 5분) 줄였습니다. 그런 다음, 200μL UA 완충액(8M 요소, 0.1M Tris-HCL, pH 8.5)을 각 시료에 추가하고 30,000 MWCO Vivacon 500 스피너 필터(Sartorius)로 옮겨서 14,000g에서 40분간 원심 분리했습니다(21°C). 결합 단백질은 0.05M iodoacetamide (IAA)에 5분간 스피너 필터를 담가 알킬화한 다음, 14,000g에서 30분간 원심 분리했습니다(21°C). 스피너 필터 막은 UB(8M 요소, 0.1M Tris/HCL, pH 8.0)를 더해 3회 세척하고 14,000g에서 40분간 원심 분리했습니다(21°C). 최대한 많은 단백질을 식별하기 위해 시료 단백질은 Lys-C(Wako Chemicals GmbH)와 트립신(Promega) 효소로 분해했습니다. 처음에는 단백질을 습식 챔버에서 Lys-C(효소:기질 1:50)로 하룻밤 동안 분해했습니다. 그런 다음, 37°C 및 600rpm으로 설정한 thermomixer 에 넣고 트립신(효소:기질 1:100)으로 3시간 배양하여 분해를 완료하였습니다. Trifluoroacetic acid (TFA)을 추가하여 최종 농도 1%로 맞추고 시료를 산화하여 분해를 중지시켰습니다. 분해된 세포 용해물의 펩타이드 물질은 C18 수지 ZipTips(Millipore)으로 정제했습니다. 각 ZipTip에는 10μL 피펫 팁에 넣은 C18 수지가 포함되어 있습니다. 각 팁의 단백질/펩타이드 용량은 5μg입니다. 이를 통해 분자량 0~50kDa 사이의 펩타이드 물질을 정제할 수 있습니다. 세포 펩타이드를 정제하기 위해 10μL acetonitrile (x10)로 C18 수지를 활성화했습니다. 그런 다음, 0.5% trifluoroacetic acid (TFA)(x10) 10μL를 피펫으로 넣어 평형 처리했습니다. 그리고 수지(x10)를 통해 분해된 시료 15μL를 피펫으로 넣어 펩타이드를 수지에 결합했습니다. 결합 펩타이드는 25μL 용출 완충액 (70% acetonitrile, 0.1% TFA)(x2)에서 새 Eppendorf 튜브로 용출했습니다. 나노 LC-MS/MS 분석 시 정제된 펩타이드를 최대한 많이 용출하기 위해 각 시료에 이 과정을 4회 반복했습니다. 용출된 펩타이드는 진공에서 약 1시간 동안 건조하고(30°C), 30μL 완충액 A(3% ACN, 0.1 % formic acid)에서 부유시켜 Agilent 6550 Q-TOF 질량 분석기에서 5μL 주입당 펩타이드가 최대 3μg이 되도록 했습니다.

크로마토그래피

크로마토그래피 파라미터

LC 시스템

분석 펌프	Agilent Nano Pump(G2226A)	
로딩 펌프	Agilent Capillary Pump(G1376A)	
자동 시료 주입기 (autosampler)	Agilent Micro Well-plate Sampler(G1377A)	
컬럼	Agilent Polaris-HR-3C18 3 μ m High Performance Chip(G4240-62030) 150mm \times 75 μ m 분리 컬럼 및 360nL 농축 컬럼	
주입량	5.00 μ L	
자동 시료 주입기 온도	4°C	
니들 세척	세척 포트에서 10초 (50% 메탄올에 혼합한 1.0% 포름산)	
이동상	A) 0.1 % formic acid in H ₂ O B) 0.1 % formic acid in 90 % acetonitrile	
유속	300nL/min(분석 펌프) 2.5 μ L/min (로딩 펌프)	
로딩 펌프 용매 조성	3% 용매 B	
분석 펌프 기울기 용리 조건	시간(분)	%B
	0.00	3
	60.00	25
	90.00	40
	95.00	90
	100.00	90
	100.10	3
HPLC-Chip Cube 시간표	시간(분)	내부 밸브 위치
	110.00	농축
정지 시간	120분(분석 펌프)	
평형 시간	3분(분석 펌프)	

소프트웨어

Agilent MassHunter 데이터 분석 제품군(B.06.00)을 정성 분석에 사용했습니다. Q-TOF 데이터는 먼저 Agilent Spectrum Mill 소프트웨어(B.05.00.181 SP1)로 처리했습니다. MS/MS 스펙트럼을 SwissProt 인간 데이터베이스(2015년 5월 18일에 다운로드)에서 검색하고 1.2% FDR을 기준으로 스펙트럼 수준을 확인했습니다. 데이터는 트립신 특이성으로 검색하였고 매개변수는 표 1과 같습니다. 펩타이드 식별 검증은 LC를 실행할 때마다 최대 FDR이 1.2%였고, 최소 펩타이드 길이는 아미노산 6개, 전구체 전하 범위는 2~6이었습니다. 이 데이터는 ± 20 ppm 전구체와 ± 50 ppm 조각 이온 내성에 대해서도 검색했습니다. Spectrum Mill은 각 전구체의 영역을 확인하고 펩타이드 스펙트럼 매칭에 따라 피크 영역을 해당 펩타이드에 할당합니다. 단백질 강도는 단백질에서 펩타이드의 중간 강도를 기준으로 산출했습니다.

질량 분석법

MS 파라미터

기기	Agilent G6550A Q-TOF 질량 분석기
이온화원	Agilent HPLC-Chip Cube(G4240A)
기기 모드	2GHz, 확장된 측정 범위, m/z 1,700
수집 모드	Auto MS/MS
극성	양이온
가스 온도	280°C
건조 가스	11L/min
캐필러리 전압	1,900V
Fragmentor	360V
Skimmer	45V
Octapole RF	750V
수집 속도	3 spectra/second(MS), 3 spectra/s (MS/MS)
격리폭	좁음(최대 1.3amu)
전구물질 선택	
사이클당 최대 전구물질	20
임계값(Abs)	1,000
전구물질 존재비 기반 스캔 속도	예
표적(counts/spectrum)	25,000
MS/MS 누적 시간 제한	예
동위원소 모델	펩타이드
능동 배제	스펙트럼 1개 이후 제외, 0.50분 릴리스
전하 상태 기본 설정	2, 3, >3
충돌 에너지 상승	전하 기울기 오프셋
	2 3.1 1
	3 3.6 -4.8
	>3 3.6 -4.8
참조 보정	m/z 1,221.99063700

표 1. 데이터 검색 파라미터

파라미터	값
최대 누락 분할	2
고정 조정	carbamidomethylation(C)
가변 조정	oxidized methionine(M)
최대 매칭 피크 강도	50 %
전구물질 질량 허용 오차	± 20 ppm
생성물질 질량 허용 오차	± 50 ppm
최대 모호 전구물질 전하	3
최소 검출 피크	4

단백질 강도를 산출한 결과는 Agilent Mass Profiler Professional 소프트웨어(MPP) 버전 B.14.8로 가져와서 차동 분석을 했습니다. MPP 매개변수는 다음과 같습니다. 정상화: 없음, 기준: z 변환, 존재비 기준 필터링: 2 이상, 6개 조건 중 1개에서 66% 존재.

차동 분석 결과는 MPP의 Pathway Architect 모듈로 경로에 맵핑했습니다. 경로 소스는 KEGG였고 맵핑에는 평균 결과를 사용했습니다.

실험

그림 1은 시료 준비 과정을 나타내며 다음과 같이 요약할 수 있습니다.

- 모델 플랫폼으로서 안드로젠에 민감한 LNCaP 세포주와 안드로젠에 독립적인 서브라인, LNCaP-abl과 LNCaP-abl-Hof를 DMOG(dimethylxalylglycine)로 처리하여 저산소 조건을 모방했습니다.
- 8시간 및 24시간 배양한 세포를 1% SDS 완충액에 용해하고 트립신과 Lys C로 FASP 프로토콜에 따라 분해했습니다.
- 이 3가지 생물학적 복제물을 각 조건에 맞게 준비했습니다.
- 8시간 배양 복제물과 24시간 배양 복제물을 혼합한 다음 트립신으로 분해해 2개의 시료 품질 대조군(시료 QC)을 만들었습니다.
- 펩타이드는 C18 충전 스테이지 팁(자체 준비)으로 정제했습니다.
- 기술적 품질 대조 시료(기술적 QC)는 트립신 분해와 펩타이드 정제를 거친 시료 QC를 혼합하여 준비했습니다.
- LC/MS 워크리스트에서 각 시점에 생성된 모든 생물학적 복제물을 무작위 순서로 분석하고 시료 QC와 기술적 QC는 시작, 중간, 종료 시점에 분석했습니다.

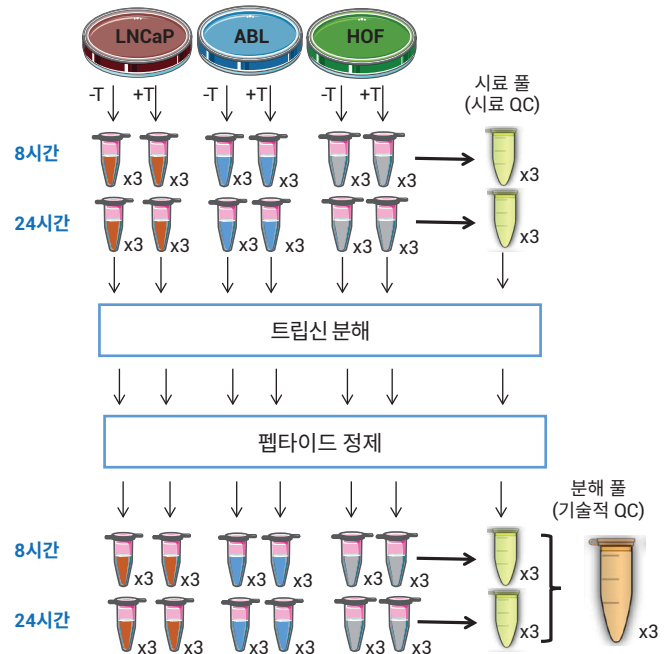


그림 1. 잠재적 전립선암 바이오마커에 대한 LC/MS 기반 식별 실험 설계. 시료는 발견과 표적 분석에 모두 사용되었습니다. -T와 +T는 각각 dimethylxalylglycine을 사용한 처리와 이를 사용하지 않은 처리를 의미합니다.

워크플로 개요

그림 2는 이 장기 연구를 위해 계획된 발견 및 표적화 기반 단백질체학 워크플로입니다. 주요 단계는 다음과 같이 요약할 수 있습니다.

- 발굴 단백질체학 원시 데이터 파일은 Spectrum Mill 소프트웨어를 통해 처리하고 MPP로 가져와서 파일을 생성했습니다.
- 차동 분석 이후에 단백질 발현 변화를 MPP의 Pathway Architect 모듈 내에서 시각화했습니다.
- 분석하고자 하는 특정 단백질을 확인하기 위해, MRM 분석은 Agilent 6495 triple quadrupole 질량 분석기에서 Skyline 소프트웨어로 설계합니다.
- MassHunter Quantitative Analysis와 MPP 소프트웨어를 사용하여 MRM 데이터를 각각 정량화 및 시각화합니다.

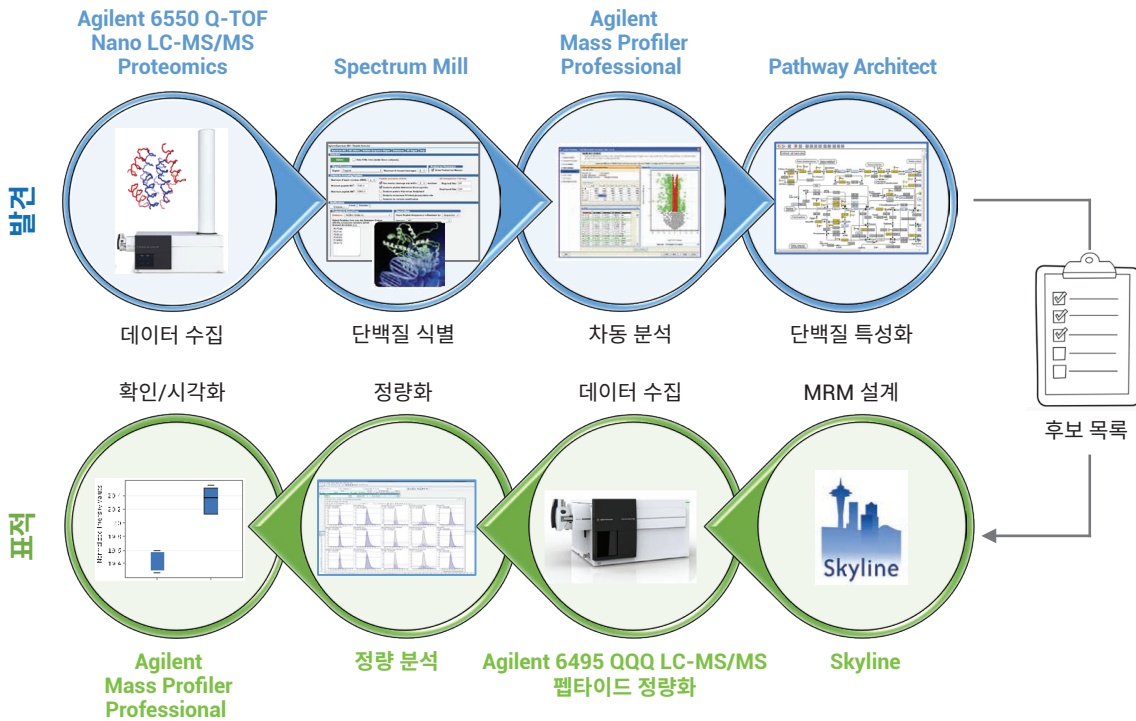


그림 2. 잠재적 전립선암 바이오마커를 특성화하고 확인하기 위한 데이터 수집 및 분석 워크플로

결과 및 토론

단백질 식별

8시간 배양 후 생성된 세포 용해물을 6550 Q-TOF 질량 분석기로 LC-MS/MS 분석한 결과, 모든 시료 그룹에 공통적인 1,225개 성분을 식별하였고 24시간 배양 후 생성된 용해물을 분석한 결과, 모든 시료 그룹에 공통적인 1,324개 성분을 식별했습니다. 데이터 세트를 비교하여 두 시점에서 공통적으로 식별된 1,080개 성분을 알아냈습니다 (그림 3).

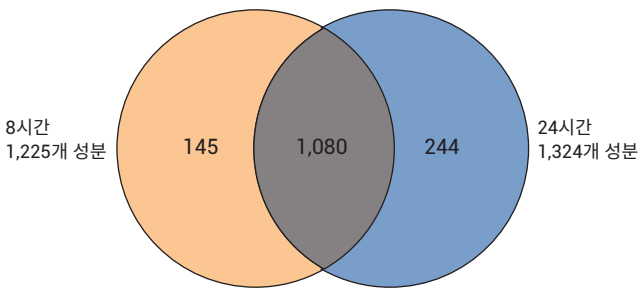


그림 3. 8시간 및 24시간 배양 후 단백질 식별을 비교한 벤다이어그램, 시료 QC 복제물에서 식별된 전체 단백질을 나타냅니다.

차동 분석

Spectrum Mill 단백질 식별 결과와 존재비를 MPP로 내보내 차동 분석을 수행했습니다. MPP는 단백질 발현에 상당한 생물학적 차이가 있을 경우 보관 중인 단백질에 대한 데이터를 정규화할 수 있습니다. 이 데이터는 잘 통제된 조건의 세포주에서 얻었기 때문에 정규화로 변화가 나타나지는 않았습니다. 모든 시료에 대해 일원분산 (One-way ANOVA) 분석을 수행했습니다. p-값 상한은 0.05, 배수 변화는 2.0 보다 높게 설정하고 다중 테스트 보정은 사용하지 않았습니다. 8시간 및 24시간에서 각 세포주의 생물학적 복제물(처리 및 미처리)로 주성분 분석을 수행했습니다(그림 4A). 이 분석을 통해 여러 처리 및 미처리 세포주가 명확히 분리되었습니다. 24시간 시점에서 ANOVA 분석을 한 후 중요하게 나타난 단백질의 군집 분석(차이를 두고 조절한 34개 단백질을 통해 안드로젠에 민감한 세포주(LNCaP)와 안드로젠에 독립적인 세포주(Abl, Hof)가 명확히 구분되었습니다(그림 4B). 이 결과를 종합했을 때 안드로젠에 민감한 세포주와 안드로젠에 독립적인 세포주의 단백질 발현 차이는 저산소로 유도된 발현 차이보다 더욱 두드러진다는 것을 알 수 있습니다.

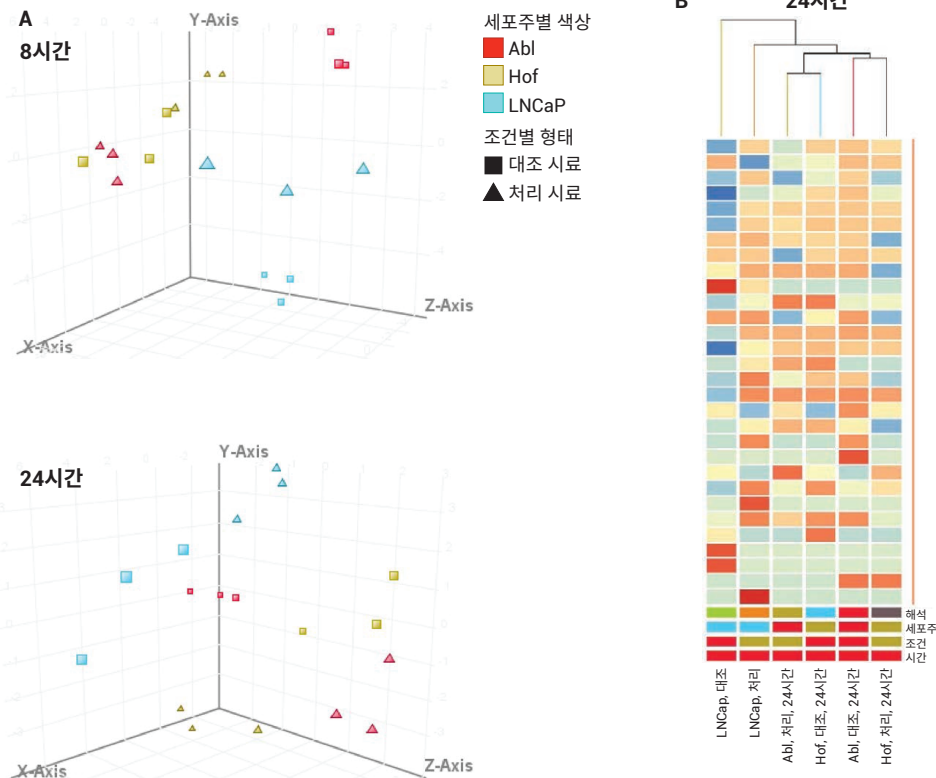


그림 4. 8시간 및 24시간 후에 DMOP로 처리한 세포주 3개와 대조군(약물 없음)의 차동 분석. A) 주성분 분석, B) 24시간 후 중요한 특성의 계층적 군집 분석 결과

저산소 조건으로 유도된 특정 단백질을 식별하기 위해 각 세포주의 대조군과 +DMOG 복제물을 대상으로 비대응 t-검정 분석을 수행했습니다. P-값 상한은 0.05로, 배수 변화는 2.0 보다 높게 설정했습니다. 세포주 3개 모두 DMOG로 8시간 배양한 후에 크게 변화한 단백질이 많이 나왔으나(그림 5A), 24시간 배양한 후에는 그렇지 않았습니다(그림 5B).

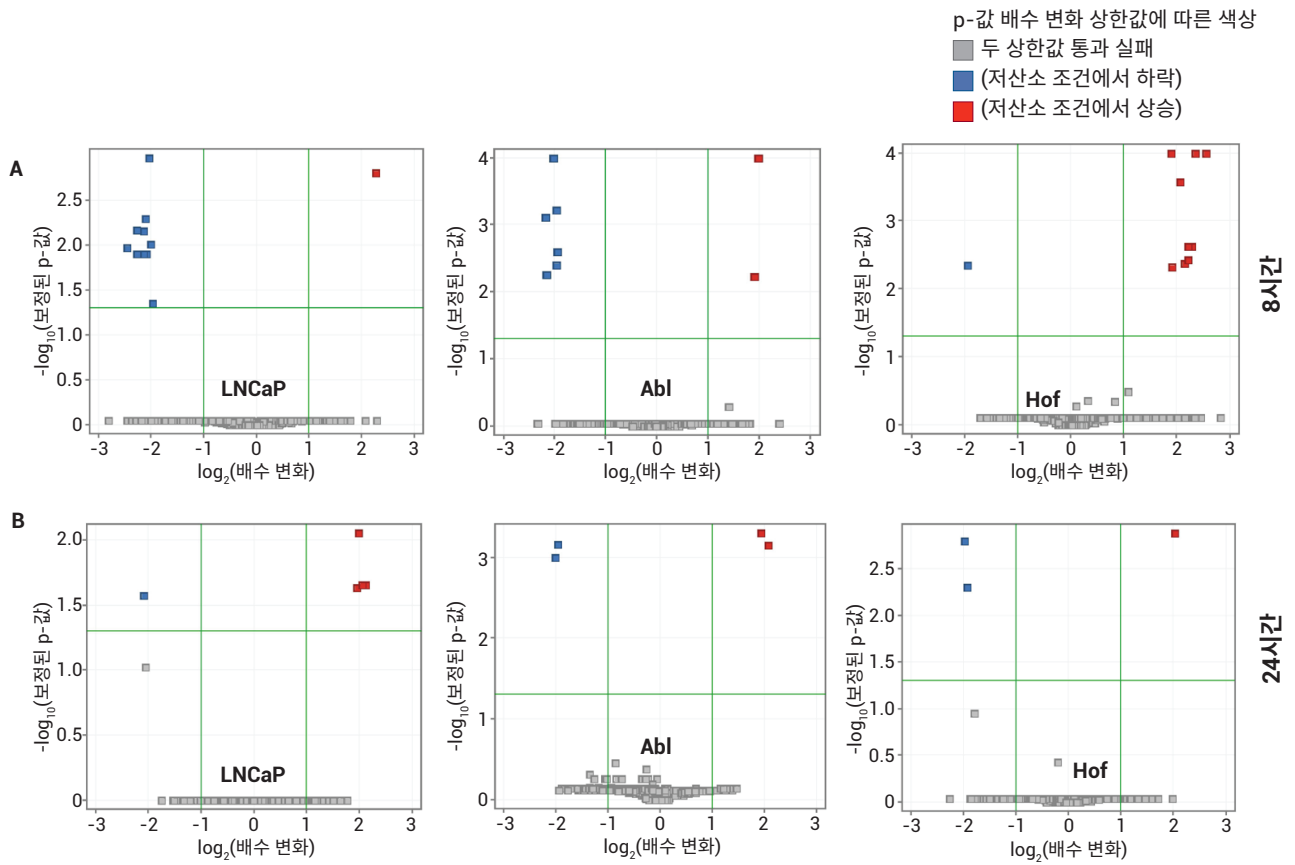


그림 5. 각 세포주의 저산소(DMOG 처리)와 정상(대조군) 조건에서 중요한 특징을 표시한 화산 도표. 8시간(A)과 24시간(B) 시점에서 비교했습니다.

Pathway 분석

ANOVA 분석에서 상당한 차이를 보인 단백질은 Pathway Architect 소프트웨어로 맵핑되어 KEGG 경로 (www.genome.jp/kegg/)를 구성했습니다. 중요한 단백질과 존재비 결과를 맵핑하여 세포주와 처리에 영향을 받은 경로를 확인할 수 있었습니다. 예를 들어 DMOG로 8시간 배양한 후에 산화 인산화 경로가 영향을 받은 것으로

발견되었습니다(그림 6). 이 발견을 통해 산화 인산화는 저산소로 인해 바뀌었다는 것을 확인했습니다[6]. 저산소 조건과 같이 대사 스트레스 조건에서 암세포는 생존을 위한 세포 에너지를 유지하기 위해 ATP를 생성하기 위한 주요 수단을 산화 인산화에서 당분해로 전환합니다[5]. 이러한 현상은 저산소 조건에서의 암 진행을 이해하기 위해 자세히 조사할 만한 가치가 있습니다.

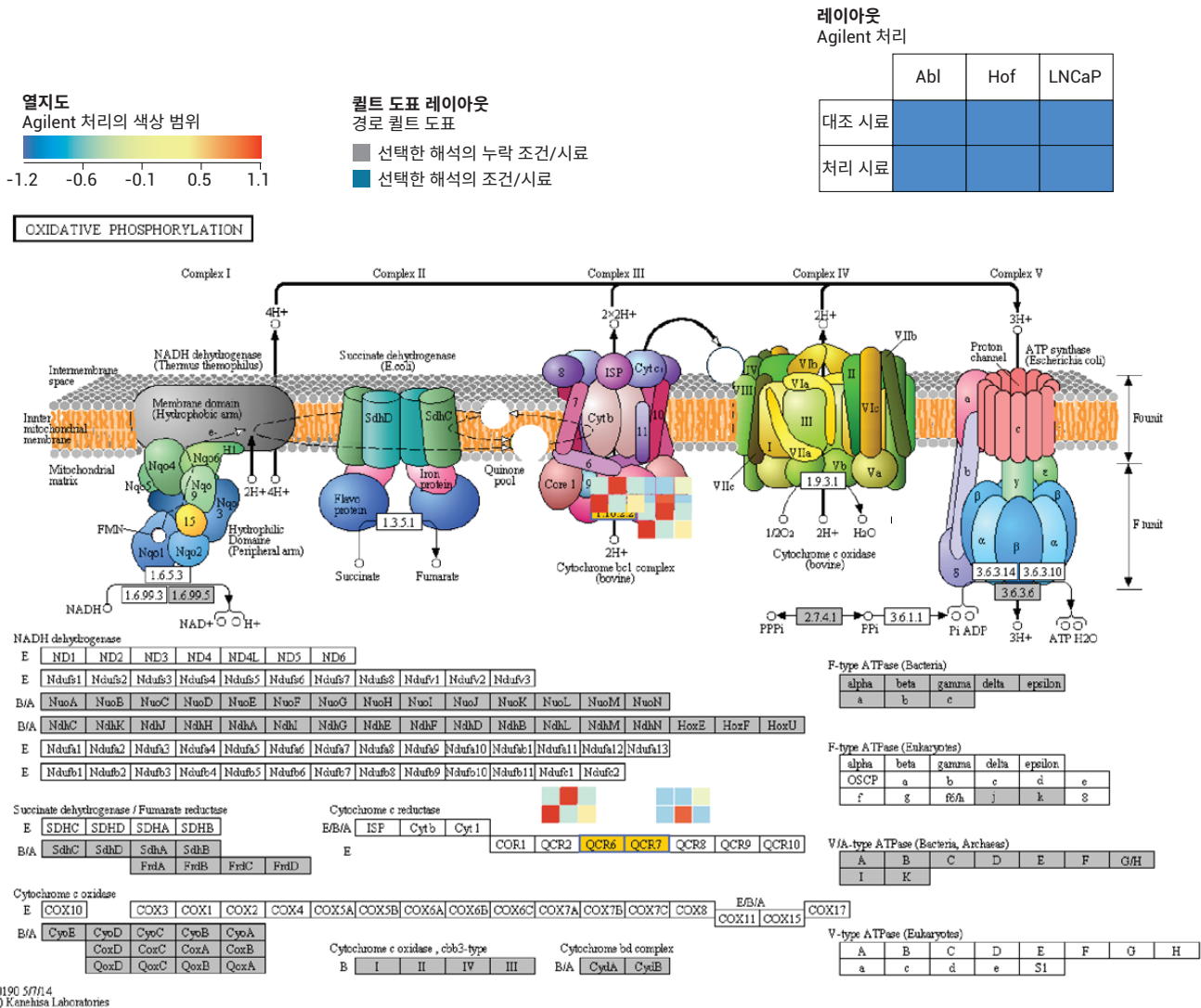


그림 6. 8시간 배양 후 확인된 중요 단백질의 평균 단백질 존재비에 겹친 KEGG 산화 인산화 경로

결론

이 응용 자료는 발견에서 표적화까지의 워크플로를 통해 Q-TOF 기반 비표식 샷건 단백질체학 분석으로 잠재적 암 바이오마커를 식별하는 방법을 소개합니다.

제시된 결과는 발견 단계에 초점을 맞추고 있으며, Agilent Mass Profiler Professional 소프트웨어로 관련 암 세포주와 성장 조건 사이에서 상당한 단백질 차이가 확인되었습니다. 생물학적 맥락을 더하기 위해 차동 단백질을 생물학적 경로에 맵핑하여 Agilent Pathway Architect 소프트웨어로 시각화했습니다. 펩타이드 MRM 기반 정량화를 통해 차동 단백질을 확인하기 위한 표적 실험이 현재 진행 중입니다.

참고문헌

1. A. Fraga, et al. "Hypoxia and Prostate Cancer Aggressiveness: A Tale with Many Endings" *Clin. Genitourin Cancer* [Internet]. Elsevier Inc.; **13**, 295–301 (2015). doi: 10.1016/j.clgc.2015.03.006
2. L. Harrison, K. Blackwell. "Hypoxia and anemia: factors in decreased sensitivity to radiation therapy and chemotherapy?" *Oncologist* [Internet], **9 Suppl 5**, 31–40 (2004). doi: 10.1634/theoncologist.9-90005-31
3. L. Yin, Q. Hu, R. W. Hartmann. "Recent progress in pharmaceutical therapies for castration-resistant prostate cancer" *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. [cited 2014 Jun 3]; **14**, 13958–78 (2013). doi: 10.3390/ijms140713958
4. J. R. Wisniewski, et al. "Universal sample preparation method for proteome analysis" *Nature Methods*, **6(5)**, 359-62 (2009). doi: 10.1038/nmeth.1322
5. K. E. Allison, B. L. Coomber, B. W. Bridle. "Metabolic Reprogramming in the Tumour Microenvironment: a Hallmark Shared by Cancer Cells and T Lymphocytes" *Immunology*, 1–10 (2017). <https://doi.org/10.1111/imm.12777>
6. P. Sontakke, et al. "Hypoxia-like signatures induced by BCR-ABL potentially alter the glutamine uptake for maintaining oxidative phosphorylation" *PLoS ONE*, **11(4)**, 1–16 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153226>

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

애질런트는 이 자료의 오류 또는 장비의 설치, 성능, 이 자료의 사용 등과 관련된 사고나 결과적 손상에 대해 법적 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017

한국에서 인쇄
2017년 11월 20일
5991-8448KO

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



Agilent Technologies