



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

고 병 준 교수 지도

석사학위 청구논문

질량분석기를 이용한  
immunopeptidome 방법 구축

-암세포에 제시된 펩타이드 분석-

2024

성신여자대학교 대학원

미래응용과학학과

장혜주

질량분석기를 이용한  
immunopeptidome 구축

-암세포에 제시된 펩타이드 분석-

고 병 준 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2023년 11월

성신여자대학교 대학원

미래응용과학학과


장혜주

# 인준서

장혜주의 석사학위 논문으로 인준함

2023년 11월

심사위원장 \_\_\_\_\_ 임동현 (서명 또는 인) 

심사위원 \_\_\_\_\_ 고병준 (서명 또는 인) 

심사위원 \_\_\_\_\_ 현정은 (서명 또는 인) 

성신여자대학교 대학원

## 논문개요

암 면역요법 중 펩타이드 기반 암 치료 백신은 중앙 면역 요법의 효과적인 치료법 중 하나로 주목받고 있다. 이 면역 요법은 세포독성 CD8+ T 세포 반응을 매개하는 MHC class I에 제시된 펩타이드에 의존한다. 이때, 사람의 MHC를 HLA라고 한다. HLA가 제시하는 펩타이드 전체는 세포 또는 조직에서의 HLA ligandome으로 지칭되며, 중앙에서는 immunopeptidome으로 불린다. 이 세포 표면 단백질은 자기 세포와 비 자기 세포를 구별하고 비 자기 구성요소를 제거하는 면역 체계를 활성화시킨다. 이러한 T 세포 기반 면역치료 시 암 특이적 항원 중 개별환자의 암세포에 의해 제시되는 항원을 찾아내는 것이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용해 HLA class I이 제시하는 펩타이드를 동정했다.

실험에 사용된 세포는 인체 전이성 유방암세포주인 MDA-MB-231 세포와, B 림프구 세포주인 Ramos 세포였다. LC-MS/MS 데이터 처리 시 PEAKS studio 소프트웨어를 이용해 펩타이드 동정을 진행했다. 분석은 데이터베이스를 *Homo sapiens*로 설정한 Database search(DB search)와 데이터베이스가 없는 상태로 분석한 *De novo*로 진행했다. 첫 번째로, 분석 장비에 따른 펩타이드 동정 수를 비교했다. 그 결과, Q-TOF 장비에 비해 Orbitrap 장비에서 펩타이드가 더 많이 동정되었다. 따라서 이후 실험은 모두 Orbitrap으로 진행했다. 두 번째로, 세포 수에 따른 동정 수를 비교했다. 두 가지 세포 모두 세포 수가 증가할수록 DB search 및 *De novo*로 동정한 펩타이드 수가 증가했다. 세 번째로, 실험 시 사용한 비드 및 항체의 양에 따라 비교했다. Ramos 세포에서는 비드 및 항체의 양이

증가함에 따라 펩타이드 동정 수가 증가했으나, MDA-MB-231 세포에서는 비드 및 항체의 양이 증가했을 때 *De novo* 동정 수만 더 증가했다. 각 세포에서 동정된 펩타이드의 길이별 분포를 보면 모두 9 mer에서 가장 많은 펩타이드가 동정되었고, 뒤이어 8 mer 또는 10 mer에서 많은 펩타이드가 동정되었다. 상대적으로 11 및 12 mer에서 동정된 펩타이드 수는 적게 검출되었다. 마지막으로, 두 세포에서 동정된 펩타이드와 HLA class I과의 결합력을 측정했다. 이때, IEDB에서 동정된 펩타이드는 제외시켰다. 그 결과 Ramos 세포에 비해 MDA-MB-231 세포에서 강한 결합을 지닌 펩타이드가 더 많이 검출되었고, Ramos 세포에서는 HLA-A\*03:01에서 결합력이 강한 펩타이드가 가장 많았다. 반면에 MDA-MB-231 세포에서는 각 아형에 따라 펩타이드 분포가 비교적 고르게 검출되었다. 이렇게 강한 결합을 가진 펩타이드를 TAA로 선별했다.

# 목차

## 논문개요

I. 서론	1
II. 재료 및 실험방법	6
1. 세포주 및 세포 배양	6
2. HLA class I 확인	7
1) 세포 회수	7
2) 세포 용해	8
3) BCA assay	8
4) Bradford assay	8
5) Western blot	9
3. HLA class I 펩타이드 분석	10
1) HLA class I 면역침강법	10
2) HLA class I 용출	10
3) HLA class I 펩타이드 정제	11
4) HLA class I 펩타이드 LC-MS/MS 분석	13
5) 소프트웨어를 활용한 HLA class I 펩타이드 동정	20
6) HLA 펩타이드 결합 친화도 예측	21
III. 결과	22
1. 항-HLA class I 항체 (W6/32) 확인	22
2. HLA class I 분자의 확인	23
3. HLA 펩타이드의 LC-MS/MS를 통한 동정	29
1) 분석 장비에 의한 비교	29

2) 세포 수에 따른 비교.....	31
3) 항체 및 비드 양에 따른 비교.....	36
4) HLA 펩타이드의 길이별 분포.....	41
5) HLA class I 펩타이드의 MHC 결합 친화도 예측.....	43
IV. 결론.....	46

참고문헌

영문초록

## 그림 목차

그림 1. MHC class I 및 II 항원 제시 경로.....	3
그림 2. 면역침강법을 이용한 HLA class I 펩타이드 분리.....	12
그림 3. W6/32 항체의 SDS-PAGE 결과.....	22
그림 4. Bradford assay 용 BSA standard curve.....	24
그림 5. BCA assay 용 BSA standard curve.....	26
그림 6. 각 세포 별 western blot 을 통한 HLA class I 발현 확인.....	28
그림 7. 서로 다른 기기로 분석한 Ramos HLA 펩타이드 크로마토그램 .....	30
그림 8. Orbitrap장비로 분석한 세포수 별 HLA 펩타이드 크로마토그램 .....	32
그림 9. HLA class I 펩타이드의 세포수 별 MS/MS 데이터.....	34
그림 10. 항체 및 비드수에 따른 세포 별 MS 크로마토그램.....	37
그림 11. 항체 및 비드수에 따른 세포 별 MS/MS 데이터.....	39
그림 12. 세포 별 펩타이드 길이 분포.....	42

## 표 목차

표 1. Q-TOF 분석 장비 정보.....	14
표 2. Xevo G2-XS Q-TOF MS tune 조건.....	14
표 3. Q-TOF UPLC gradient 조건.....	15
표 4. Q-TOF UPLC condition.....	15
표 5. Q-TOF MS method.....	16
표 6. Orbitrap UHPLC gradient 조건.....	18
표 7. QE Orbitrap 분석 조건.....	19
표 8. PEAKS studio search parameter.....	20
표 9. Bradford assay standard(STD) .....	24
표 10. Ramos 세포 용해물 농도 측정.....	25
표 11. BCA assay standard(STD).....	26
표 12. MDA-MB-231 세포 용해물 농도 측정.....	27
표 13. 장비 별 PEAKS 분석 결과.....	31
표 14. 세포 종류 및 세포 수 별 PEAKS 분석 결과.....	36
표 15. 항체 및 비드 양에 따른 세포 별 PEAKS 분석 결과.....	41
표 16. 세포 별 HLA 아형에 따른 강한 결합력을 가진 펩타이드 수.....	44
표 17. SB 상위 10 개 펩타이드 서열 및 점수.....	45

## I. 서론

암은 전 세계적으로 주요한 공중 보건 문제이며, 세계적인 인구통계학적 조사에 따르면 향후 수십 년 동안 암 발병률은 증가할 것으로 예측되고, 2025년에는 매년 약 4억 2천만 건의 새로운 암 발병이 예상된다.<sup>1</sup> 이러한 암을 치료하기 위한 다양한 방법 중 암 면역 요법으로는 면역 관문 차단요법, CAR(Chimeric Antigen Receptor)-T 세포 면역요법, 수지상 세포 백신, 치료용 암 백신 및 종양 신생항원 활용 등 여러 방법이 존재한다.<sup>2</sup> 면역 요법들은 암과 싸우기 위한 T-세포 매개 세포독성을 높이는 것을 목표로 한다.<sup>3</sup> 이 중 펩타이드 기반 암 치료 백신은 종양 면역요법의 효과적인 치료법 중 하나로 최근 많은 주목을 받고 있다.<sup>4</sup> 이 면역요법은 주조직적합성복합체(Major Histocompatibility Complex, MHC) class I 펩타이드 리간드에 의존하는데, 이는 제시된 펩타이드가 세포독성 CD8+ T 세포 반응을 매개하기 때문이다.<sup>5</sup>

MHC에 의해 암호화되는 펩타이드 항원은 세포 표면에 제시된 분자에 결합된 형태로 T 림프구의 표적을 형성한다.<sup>6</sup> MHC 분자는  $\alpha$ -chain 및  $\beta$ 2-microglobulin chain으로 구성되며, class I 분자에 의한 펩타이드의 결합은 heavy chain의  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 도메인에 의해 생성된 결합 홈과 펩타이드 아미노산 side chain의 상호작용에 의해 이루어진다.<sup>7</sup> MHC Class I 분자에 의해 제시되는 펩타이드의 길이는 주로 8-10 aa 길이로, 이는 결합 홈의 양쪽 끝이 보존된 티로신 잔기에 의해 차단되기 때문이나, 종종 더 긴 펩타이드 길이인 11-14개의 아미노산을 포함하는 펩타이드 결합체가 확인된다.<sup>8,9</sup>

인간의 MHC 대립유전자 및 상응하는 MHC 동종이형은 특히 인간 백혈구 항원(Human Leukocyte Antigen, HLA)라고 하며, 이는 이 유전자 계열의 산물이 백혈구에서 처음으로 발견되었기 때문이다.<sup>5,10</sup> HLA가 제시하는 펩타이드 전체는 세포 또는 조직에서의 HLA ligandome으로 지칭되며, 종양에서는 면역펩티돔(immunopeptidome)으로 불린다.<sup>10</sup> 이 세포 표면 단백질은 자기 세포(self-cells)와 비 자기 세포(non-self-cells)를 구별하고 비 자기 구성요소를 제거하는 면역체계를 활성화시킨다.<sup>11</sup> HLA class I에는 18,000개 이상의 대립유전자가 있으며, 각 대립유전자는 세포 내 분해체로부터 생성된 고유한 펩타이드 세트에 결합하며 동일한 항원이라도 HLA 대립 유전자에 따라 다른 방식으로 면역 체계에 제시될 수 있다. 따라서 항원성 펩타이드 및 HLA 단백질 사이의 상호작용을 해독하는 것은 자가면역 질환과 암의 면역 반응을 이해하는 데 중요하다.<sup>12</sup>

dT 림프구에 의한 외부 항원 인식은 적응 면역의 초석이다. 항원제시는 여러 수준에서 조절장애가 발생할 수 있는 복잡한 다단계 과정이다. 구체적으로, 세포 내로 유입된 내인성 항원은 세포질 프로테아좀의 작용에 의해 펩타이드로 분해된다. 이후 항원 처리(Transporter associated with antigen processing, TAP) 이중이합체와 관련된 운반체에 의해 소포체(Endoplasmic reticulum, ER)로 운반된다. 펩타이드는 직접 또는 ER 아미노 펩티다제에 의한 추가 처리 후에 MHC class I에 결합한다. 미성숙한 MHC class I 분자는 샤페론 단백질인 tapasin, Erp57, calreticulin(Crt) 복합체에 의해 안정화된다. 이렇게 펩타이드 항원이 로딩된 mature MHC class I complex는 골지체를 통해 세포 표면으로 수송되어 CD8+ T세포에 의해 모니터링된다(그림 1).<sup>3,6</sup>

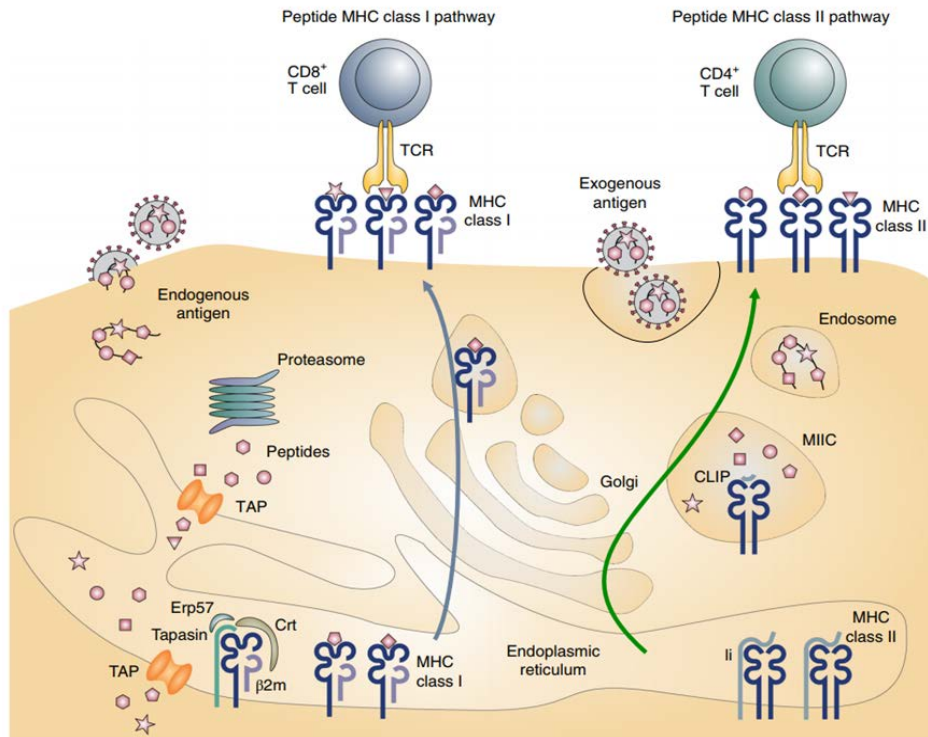


그림 1. MHC Class I 및 II 항원 제시 경로 [6].

TAP(Transporter associated with antigen processing), Crt(Calreticulin),  $\beta 2m$ ( $\beta 2$ -microglobulin), TCR(T-cell receptor), Ii(Invariant chain), CLIP(Class II-associated invariant chain peptide), MIIC(MHC class II compartment)를 의미한다.

항종양 반응을 유도할 수 있는 두 가지 유형의 항원 중, 종양 특이적 T 세포 인식을 유도할 수 있는 체세포 돌연변이로 새로 형성된 펩타이드를 종양 특이적 항원(Tumor specific antigen, TSA) 또는 신생항원(neoantigen) 이라고 하며, 이는 단백질로 번역될 때 생성된다.<sup>1</sup> 반면에, 내인성 단백질이나 레트로 바이러스에서 유래할 수 있는 종양 관련 항원(Tumor-associated antigen, TAA)은 종양세포에 의해 선택적으로 발현되거나 과발현 되지만, 정상세포 집단에서도 발현될 수 있다.<sup>13,14</sup>

HLA 유전자에는 네 가지 그룹(Class I, II, III, IV)이 있으며, 이들의  $\alpha$ -chain은 염색체 6번에 위치한다. 반면에  $\beta 2$ -microglobulin 유전자는 염색체 15번에 암호화되어 있다. 각각의 유전자 산물은 구조 및 기능이 다른 단백질이다. 이 중, HLA I 유전자에는 일반적으로 HLA-A, HLA-B, HLA-C가 가장 많이 포함되며, 드물게 HLA-E, HLA-F, HLA-G 유전자가 포함된다.<sup>15,16</sup> HLA-G, HLA-E는 면역억제 인자로 간주된다. 이들의 발현이 증가되면 종양은 낮은 면역원성과 강한 면역억제성 종양 미세 환경을 나타내며, 적응성 면역 반응을 유발하지 않는다.<sup>17</sup>

암 치료에 있어서 강력하고 안전한 접근법은 암 특이적 항원이 탑재된 항원 제시 세포(Antigen-Presenting Cell, APC)로 자가 T 세포를 자극하여 환자의 항종양 면역반응을 증폭시키는 것이다. T세포 기반 면역치료 시 암 특이적 항원 중 개별환자의 암세포에 의해 제시되는 항원을 찾아내는 것이 필요하다.<sup>18</sup> 따라서 어떤 펩타이드가 세포 표면의 HLA 복합체에 결합하여 제시될 가능성이 더 높은지 예측하기 위한 중요한 노력들이 이어졌다.<sup>19</sup> 이전에 신생항원을 예측하기 위해선 분자복제 및 cDNA 라이브러리를 사용한 면역 스크리닝이 사용되었다. 또한, 일반적으로 정제된 재조합 MHC 분자에 결합된 합성 펩타이드를 활용해 안정성 및 결합 분석과 같은 생화학적 방법이 많이 사용되었다. 그러나, 이러한

접근법은 처리량이 낮고, 펩타이드 선택에 의해 편향되어 있으며, 내인성 HLA-ligand 처리 및 제시를 제어하는 내재적인 규칙을 포착할 수 없다. 따라서 LC-MS/MS(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) 접근 방식이 HLA 제시 펩타이드를 특성화하기 위해 많이 활용되고 있다.<sup>20</sup>

LC-MS/MS 방식은 생화학적 방식과 대조적으로 처리량이 많고, 표적 선택에 편향되어 있지 않다.<sup>20</sup> 또한, Orbitrap 등 질량분석기의 개발 및 향상된 크로마토그래피 성능을 통한 기술적 진보로 인해 질량 정확도, 감도, 분해능 및 속도가 크게 향상되었다. 이와 동시에 MS 데이터를 처리하고, 시퀀싱 결과를 통합하고, 다중 대립 유전자 데이터 세트를 분리하기 위한 생물정보학 도구가 개발됨에 따라 HLA 제시 펩타이드 레퍼토리 연구에 대한 높은 잠재력을 가지게 되었다.<sup>10</sup> 이러한 방식에는 여전히 주요한 과제가 많이 남아있으나, 질량분석기를 통한 항원 제시 펩타이드 분석은 HLA 분자의 새로운 특성을 학습하는 능력을 향상시킬 수 있고, 추정 에피토프의 스크리닝을 촉진할 수 있다.<sup>19</sup>

따라서 이번 논문에서는 면역친화 포획법을 사용해 HLA class I 을 얻어내고, acid elution 및 정제를 통해 얻은 펩타이드를 질량분석기로 분석했다. 또한, PEAK studio 프로그램을 이용해 펩타이드를 동정한 뒤, NetMHCpan 4.1 에서 펩타이드와 HLA class I 사이의 결합성을 평가했다. 이후 결합력이 높은 데이터 중 IED(Immune Epitope Database)에서 동정된 펩타이드를 제외한 나머지 펩타이드를 TAA(Tumor-associated Antigen) 항원으로 예측했다.

## II. 재료 및 실험방법

### 1. 세포주 및 세포 배양

인체 전이성 유방암세포인 MDA-MB-231은 오송첨단의료산업 진흥재단으로부터 제공받았다. B 림프구 세포주인 Ramos는 고려대학교 의과대학 정상택교수님 연구실로부터 제공받았다. MDA-MB-231 세포는 10% FBS (Gibco, Cat. No. 12483020), 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Cat. No. 15070063), 1% Glutamax (Gibco, Cat. No. 35050-061), 1% Pyruvate (Welgene, Cat. No. LS013-01)가 포함된 DMEM (Welgene, Cat. No. LM001-01) 배지를 사용하여 T225 flask (SPL, Cat. No.700225)에서 배양했고, Ramos 세포는 10% FBS, 1% Glutamax, 1% Pyruvate, 1% Anti-Anti (Gibco, Cat. No. 15240062)가 포함된 RPMI 1640 (Welgene, Cat. No. LM011-05)를 사용하여 T75 flask (SPL, Cat. No. 70075)에서 배양했다. 각 세포는 5% CO<sub>2</sub>, 37° C로 유지되는 세포배양기에서 배양되었다.

## 2. HLA Class I 확인

### (1) 세포 회수

MDA-MB-231 세포 회수 시 DMEM 배지를 모두 빨아들인 후, DPBS (Welgene, Cat. No. LB 001-02) 12 mL로 세척했다. 이후 0.05% Trypsin-EDTA (Gibco, Cat. No. 25300062) 6 mL를 첨가해 세포를 떼어냈다. 다음으로 18 mL의 DMEM 배지를 넣은 뒤 50 mL conical tube에 모아 125g로 5분 동안 원심분리 했다. 세포 펠렛을 제외한 상층액은 모두 빨아들이고 DPBS 10 mL로 세척했다. 필요에 따라 세척 단계는 2번 반복했다. 상층액을 모두 제거한 뒤 다음 실험을 위해  $-80^{\circ}\text{C}$  초저온 냉동고에 보관했다. Ramos 세포 회수 시 T75 내의 세포 및 배지를 모두 회수해 50 mL conical tube에 모은 뒤 125g로 5분간 원심분리했다. 펠렛을 제외한 상층액은 모두 빨아들이고, DPBS 6 mL로 세척했다. 잘 풀어준 세포를 다시 125g로 5분간 원심분리하고 상층액을 제거했다. 회수한 세포는 사용 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$  초저온 냉동고에 보관했다. 각 세포의 세척 단계에서, DPBS에 현탁 된 세포들 중  $10\ \mu\text{L}$ 를 취해 Trypan blue Stain 0.4% (Gibco, Cat. No. 15250061)  $10\ \mu\text{L}$ 와 섞은 뒤, Countess cell counting chamber slide (Invitrogen, Cat. No. C10283)에  $10\ \mu\text{L}$ 를 넣어 Cell countess (Invirtogen, SN. 2185A17061389)로 cell counting을 진행했다.

## (2) 세포 용해

초저온 냉동고에 보관되어 있던 세포에 용해버퍼 (8 mM CHAPS, 150 mM NaCl supplement with protease inhibitors, 50 mM Tris-HCl pH 8.0,) 3 mL를 넣고, 4° C에서 3시간 반응시켜 세포를 용해했다. 이후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 가라앉은 펠렛은 제거하고, 상층액만 취해 단백질을 얻었다.

## (3) BCA assay

MDA-MB-231 세포 용해 후 얻은 상층액에 존재하는 단백질의 농도를 파악하기 위해 BCA assay를 진행했다. 먼저, BSA(Bovine serum albumin, Sigma, A7030)를 0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL로 희석하여 표준용액을 만든 뒤, 세포용해 후 얻은 상층액을 1/4 - 1/10로 희석했다. 표준용액 및 시료를 96 well plate에 각각 10  $\mu$ L씩 넣고, BCA assay reagent A:B=49:1로 희석하여 각 well에 200  $\mu$ L씩 넣은 뒤 37° C에서 30분간 반응시켰다. 이때 96 well plate는 호일로 감싸 어두운 상태에서 반응시켰다. 이후 Microplate reader (Molecular Devices, SpectraMax M5)를 사용해 562 nm에서 흡광도를 측정하고, 계산값을 통해 각 세포의 농도를 측정했다.

## (4) Bradford assay

Ramos 세포 용해 후 얻은 상층액에 존재하는 단백질의 농도를 파악하기 위해 Bradford assay를 진행했다. 먼저, BSA를 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL로 희석하여 표준용액을 만들고,

세포 용해물을 1/2로 희석했다. 이후 96-well plate에 BSA 표준용액 및 시료 10  $\mu$ L를 넣고, Bradford assay reagent를 1:5로 희석하여 각 well당 200  $\mu$ L씩 넣어 상온에서 약 10분간 반응시켰다. 이후 Microplate reader로 shake 한 뒤, 595 nm에서 흡광도를 측정했다.

#### (4) Western blot

각 세포에서의 HLA class I 발현 여부를 확인하기 위해 western blot을 실시했다. 세포 용해 후 얻은 cell lysate 6  $\mu$ g과 4x sample buffer를 희석하여 SDS-PAGE를 실시했다. 이때 running gel과 stacking gel의 조성은 각각 12.5%, 4.3%였다. 이후 PVDF membrane으로 transfer했다. 먼저 막을 100% methanol에 3분간 담가 활성화시킨 뒤, 1X Transfer buffer에 담갔다. 다음으로 cassette 조립을 하며, 이때 겔과 막이 잘 겹쳐지게 두고 기포를 제거해 줬다. 이는 PowerPac HC (Bio-rad, SN. 043BR67783)으로 110V에서 1시간 40분간 전기영동 시켰다. Transfer가 끝난 막은 5% skim milk로 4°C에서 overnight 시켜 blocking 했다. 이후 1X TBST로 2번 간단히 세척하고, 5분, 10분간 shaker에서 교반 하여 blocking 용액을 세척했다. 다음으로 HLA class I에 대한 1차 항체인 w6/32를 1:2000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, 1X TBST로 간단히 2번 세척 및 5분, 10분, 15분 세척시켰다. 그 뒤 2차 항체인 Goat-anti-mouse antibody with HRP를 1:20000으로 희석한 뒤 상온에서 1시간 반응시켰다. 2차 항체까지 결합한 막을 1X TBST로 15분씩 총 2번 세척하고, ECL solution을 A:B=1:1로 총 2 mL를 제작해 막에 뿌려 상온에서 1분간 반응시켰다. 모든 과정이 끝난 막을 ImageQuant 500 (Cytiva, SN. 26610029)을 통해 단백질 검출 이미지를 촬영했다.

### 3. HLA class I 펩타이드 분석

#### (1) HLA class I 면역침강법

Protein A Sepharose fast flow(Cytiva, 17127902) 80  $\mu$ L(또는 40  $\mu$ L)를 5 mL tube에 담은 후, 1X PBS pH 7.4 1 mL로 세척했다. 이후 3,500 rpm으로 2분간 원심분리해서 상층액을 버린 뒤, 1회 더 반복했다. 다음으로 W6/32 항체 1 mg(또는 500  $\mu$ g)에 해당하는 양을 넣고 4° C에서 3시간 동안 Bio RS-24, Mini rotator(Biosan, BS-010133-AAG)에 반응시켰다. 반응이 끝나면 1X PBS 1 mL를 넣고 tapping 해준 뒤 4,000 rpm에서 3분간 원심분리하고 상층액을 제거했다. 이 과정을 총 3회 반복했다. 항체-비드 복합체에 앞서 세포 용해 후 얻은 상층액의 세포 용해물을 넣어 4° C에서 16시간 반응시켰다(그림 2).

#### (2) HLA class I 용출

세포 용해물에서 원하는 HLA class I만을 얻기 위해 비드-항체와 결합된 HLA class I 용출 과정을 거쳤다. 앞서 16시간 반응시킨 비드-항체-HLA class I 반응물을 원심분리(4,000 rpm, 3분)시킨 후 상층액을 버린 뒤, MS grade water 1 mL로 세척했다. 이후 상층액을 제거한 뒤, MS grade water 500  $\mu$ L를 넣어 약하게 pipetting 후 비드-항체-세포 용해물 복합체를 미리 MS grade water 500  $\mu$ L로 세척한 Costar spin-X column(Corning, PN. 8160)에 넣고 4,000 rpm에서 3분 동안 원심분리 했다. 이 과정을 총 5회 반복하여 column 아래로 빠져나온 용액을 폐기했다. 마지막으로, 10% acetic acid를 컬럼 내 비드에 가깝게 200  $\mu$ L 넣어준 뒤, 4° C에서 10분간 반응시킨 후, 4,000 rpm에서 5분동안 원심분리하여 원하는 HLA class I을 얻었다(그림 2).

### (3) HLA class I 펩타이드 정제

앞서 얻은 HLA class I에 결합된 HLA class I 펩타이드를 얻기 위해 정제를 진행했다. 먼저, Sep-pak tc18 cartridge에 100% MS grade ACN(Thermo fisher, A995-1) 1 mL를 넣어 activation 시켜줬다. 다음으로 solution A(95% ms grade water+5% ms grade ACN+0.1% FA) 1 mL를 넣어 Equilibration 시켜줬으며, 이 과정을 3번 반복했다. 이후 앞서 용출해서 얻은 시료에 800  $\mu$ L의 solution A를 넣어 잘 섞어준 후 cartridge에 모두 로딩했다. 빠져나온 용액을 한 번 더 cartridge에 로딩하여 recycling 해줬다. 시료 로딩이 끝난 후 다시 solution A를 1 mL씩 총 3번 로딩하여 세척 과정을 거쳤다. 마지막으로 30% ACN, 65% ACN을 각각 150  $\mu$ L씩 총 2번 로딩하여 용출을 진행했다. 얻은 HLA class I 펩타이드를 진공농축기를 사용해 buffer를 제거한 뒤, 분석 시까지  $-20^{\circ}$  C에서 보관했다(그림 2).

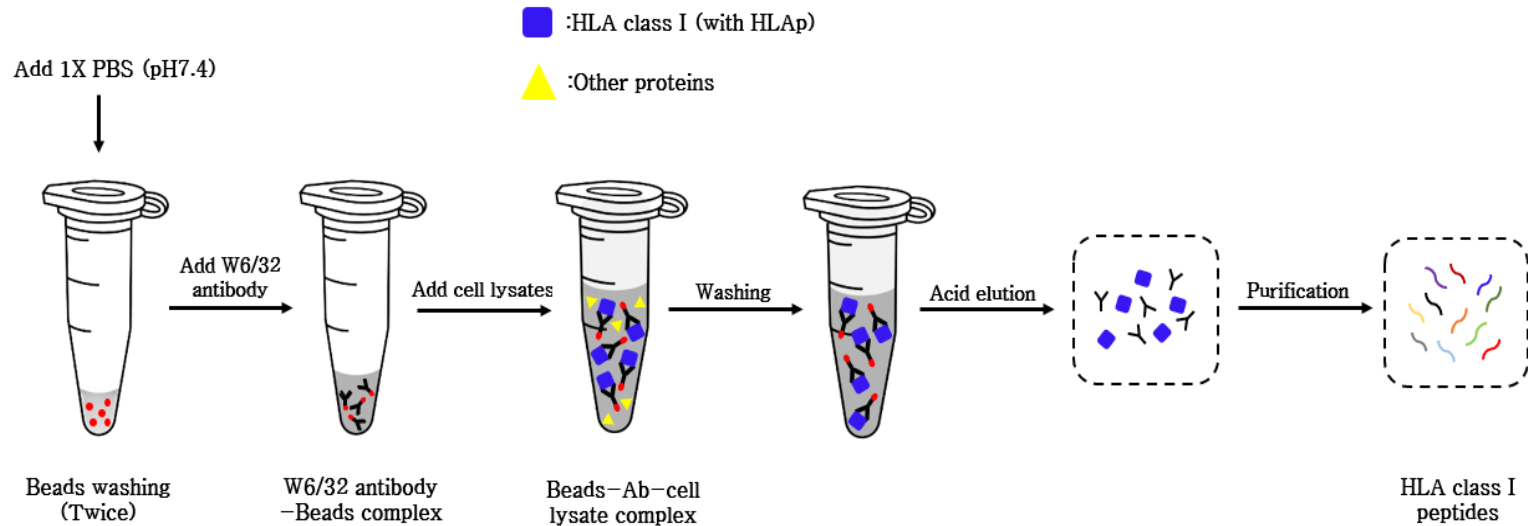


그림 2. 면역침강법을 이용한 HLA class I 펩타이드 분리

Protein A 비드에 anti-HLA class I 항체인 W6/32를 4 ° C에서 3시간 반응시켜 비드-항체 복합체를 얻었다. 이후 세포 용해를 거친 세포 용해물과 16시간동안 4 ° C에서 반응시켜 비드-항체-세포 용해물 복합체를 얻었다. 10% Acetic acid로 elution해서 복합체를 분리한 뒤, C18 SPE 컬럼으로 HLA class I 펩타이드만 분리했다.

#### (4) HLA class I 펩타이드 LC-MS/MS 분석

앞선 과정을 거쳐 얻은 HLA Class I 펩타이드를 Xevo G2-XS Q-TOF (Waters, SN. YFB1960K) 및 QE Orbitrap (ThermoScientific) 장비를 이용해 분석했다. 먼저, Q-TOF 기기(표 1)를 이용한 분석 방법은 다음과 같다. 이동상 A는 0.1% FA in Water, 이동상 B는 0.1% FA in ACN(Acetonitrile)으로 연결하여 각각 5분씩 prime을 진행했다. Seal wash는 80% ACN, Needle wash는 10% ACN으로 연결하여 prime을 15초로 20 cycle, Needle wash를 99초로 진행했다. 이후 200 pg/ $\mu$ L의 Leucine enkephalin (Waters, PN. 186007091-1)을 제조 및 sonication 후 3회 purge했다. 또한, Sodium Iodide(Alfa aesar, PN. 04347)을 제조 및 sonication 후 3회 purge했다. 분석에 앞서 MS tune page를 설정한 뒤(표 2), 보정물질인 leucine enkephalin을 주입하여 positive mode에서 556.2771 m/z의 beam을 확인했다. 다음으로 m/z 400-1800에 해당하는 범위를 Sodium Iodide로 calibration 했다. LC 및 MS 안정화가 끝난 후 앞선 실험을 통해 얻은 HLA class I 펩타이드를 ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Column, 300Å, 1.7  $\mu$ m, 2.1  $\times$  100 mm column(Waters, SN. 01403635115845)에 주입했다. 주입된 샘플은 0.2 mL/min의 유속으로 이동상 A 97%, 이동상 B 3%의 조성으로 시작해 ACN의 비율을 43%까지 올려 분석을 실시했다(표 3). 분석 동안 컬럼 온도는 65° C, 샘플 온도는 4° C로 유지되었다(표 4).

이후 질량분석기인 Q-TOF로 주입해서 분석을 실시했다. MS 분석은 Data dependent acquisition(DDA) 방식으로 실시했고,<sup>28</sup> 상위 10개의 m/z intensity에 해당하는 것만 ms/ms로 분석했다. 이때 m/z range는 400-2000, Collision energy는 ramping으로 설정했다(표 5).

표 1. Q-TOF 분석장비 정보

장비	Serial No.	제조사
TUV Detector	L21TUV331A	Waters
Sample manager FTN_1	D21CHA435G	Waters
Binary Solvent Manager	A22BSP525G	Waters
Xevo G2-XS Q-TOF	YFB1960K	Waters
ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 Column, 300Å, 1.7 μm, 2.1 × 100 mm	01403635115845	Waters

표 2. Xevo G2-XS Q-TOF MS tune 조건

Parameter	Condition
Capillary	3.0 kV
Sampling cone	30 V
Source temperature	120 ° C
Desolvation temperature	250 ° C
Cone gas flow	0 L/h
Desolvation gas flow	600 L/h
Mass range	400-2000 m/z
Acquisition mode	Fast DDA

표 3. Q-TOF UPLC Gradient 조건

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
Initial	0.2	97	3	Initial
2	0.2	97	3	6
40	0.2	57	43	6
42	0.2	20	80	6
45	0.2	20	80	6
46	0.2	97	3	6
60	0.2	97	3	6

표 4. Q-TOF UPLC condition

Parameter	Condition
Column temperature	65° C
Sample temperature	4° C
Needle wash	80% ACN
Seal wash	10% ACN
Run time	60 min

### ㉮ 5. Q-TOF MS method

<b>Parameter</b>	<b>Value</b>
Acquisition	60min
M/Z range	400-2000
MS/MS Ions	10
Charge state	+1~+4
Collision Energy	(LM) 6-9V (HM) 65-85V

다음으로, Orbitrap을 사용한 분석 조건은 표 6과 같다. 이동상 A는 DW with 2% ACN and 0.1% FA이고, 이동상 B는 0.1% FA in ACN이었다. 분석 시 0.3  $\mu$ L/min의 유속으로 이동상 A 94%, B 6%의 조성으로 시작해 이동상 B의 조성을 50%까지 올려서 분석했다(표 6). Full MS에서의 Resolution은 70,000이며, AGC는 106, m/z range는 300–2000이었다. DDA mode에서 TOP12에 해당하는 부분을 ms/ms로 분석했고, Resolution은 17,500이었다. 또한, AGC는  $10^5$ 이었다. Ionization energy는 2.0 kV였으며, capillary temperature은 275° C였다(표 7).

표 6. Orbitrap UHPLC gradient 조건

Time (min)	Flow ( $\mu$ L/min)	%A	%B
0	0.3	94	6
5	0.3	94	6
95	0.3	50	50
105	0.3	5	95
110	0.3	5	95
111	0.3	94	6
130	0.3	94	6

표 7. QE Orbitrap 분석 조건

<b>LC-MSMS</b>	Dionex Ultimate 3000 RSLC + Q-Exactive Plus mass spectrometer
<b>Columns</b>	PepMap RSLC C18 (2 $\mu\text{m}$ , 100 $\text{\AA}$ , 75 $\mu\text{m}$ $\times$ 50 cm) + Acclaim PepMap 100 column (75 $\mu\text{m}$ $\times$ 2 cm)
<b>Buffer</b>	Loading A (DW with 2% ACN and 0.1% FA) + Loading B (ACN with 0.1% FA)
<b>Full MS</b>	
Resolution	70,000
AGC	$10^6$
Max IT	250 ms
Range	300 – 2000 m/z
<b>ddMS2/dd-SIM</b>	
Resolution	17,500
AGC	$10^6$
Max IT	100 ms
Count	Top12
Isolation	2.0 m/z
Min AGC	$10^3$
Exclusion	1, 7, 8, >8
<b>Ionization</b>	
Voltage	2.00 kV
Capillary T	275°C
S-lens RF	60.0

(5) 소프트웨어를 활용한 HLA class I 펩타이드 동정

분석이 완료된 HLA Class I 펩타이드를 PEAKS studio를 이용해 동정했다. 이때 사용된 database는 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 사이트에서 *Homo sapiens* fasta 파일을 다운받아 사용했다. PEAKS 분석은 Database search(DB search) 및 *de novo* sequencing을 수행했으며, 분석 조건은 표 8과 같다.

표 8. PEAKS Studio Search parameter

Precursor mass	10.0 ppm
Fragment ion	0.02 Da
Enzyme	Trypsin
Max Missed Cleavages	3
Database	<i>Homo sapiens</i>

## (6) HLA 펩타이드 결합 친화도 예측

각 세포에서 얻은 HLA class I 펩타이드에 대한 MHC 결합 친화도를 예측하고자 NetMHCpan 4.1 프로그램을 사용했다. 이 소프트웨어는 인공 신경망을 사용해 알려진 서열의 MHC 분자에 대한 펩타이드의 결합력을 예측한다. MDA-MB-231 세포의 경우 HLA-A\*02:01, 02:17, HLA-B\*40:02, 41:01, HLA-C\*02:02, 17:01 의 HLA 아형을 갖는 것으로 알려져 있으며,<sup>21</sup> Ramos 세포의 경우 HLA-A\*03:01, HLA-B\*44:03, 51:01, HLA-C\*16:01 의 아형을 갖는 것으로 알려져 있다.<sup>22</sup> 따라서 각 아형에 따라 strong bind(SB)를 갖는 수를 정리했으며, 이때 여러 번의 반복 실험 중 PEAKS 로 분석 시 가장 많은 수가 동정된 세포 수 2 가지로 각각 비교했다. 또한, 모든 결과의 펩타이드 fasta 파일은 9mer 을 기준으로 사용했다. SB 를 갖는 펩타이드 중 IEDB(The Immune Epitope Database)에 존재하는 펩타이드는 제외하고, 식별되지 않는 펩타이드 중 상위 10 개에 해당하는 펩타이드를 선별하여 TAA 로 예측했다.

### Ⅲ. 결과

#### 1. 항-HLA class I 항체 (W6/32) 확인

Abclon에서 구매한 mouse Hybridoma cell에서 분비한 W6/32 항체에 DTT(Sigma, Cat. No. D9779, Dithiothreitol)와 4X sample buffer (Bio-RAD, Cat. No. 1610747)를 혼합해 환원시킨 후, SDS-PAGE를 실시했다. 그 결과, Heavy chain은 약 50 kDa, Light chain은 약 25 kDa으로 밴드가 검출되었다(그림 3).

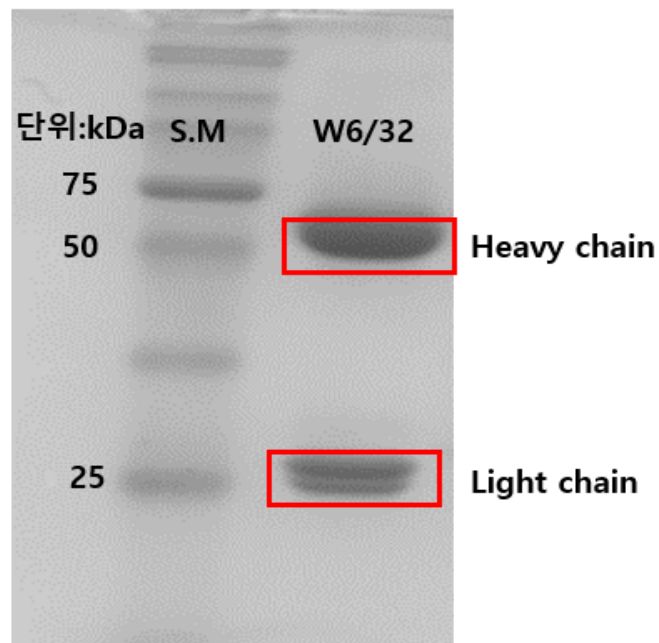


그림 3. W6/32 항체의 SDS-PAGE 결과. S.M은 Size marker를 의미하며, 단위는 kDa이다. 재조합 단백질의 밴드 크기와 검출하려는 시료의 크기를 비교하여 원하는 물질이 검출됐는지 파악할 수 있다.

## 2. HLA class I 분자의 확인

앞선 실험에서 세포용해 후 얻은 세포 용해물 상의 단백질 확인을 위해 Bradford assay 및 BCA assay를 수행했고, HLA class I의 유무를 확인하기 위해 western blot을 수행했다. 먼저, Bradford assay를 위한 BSA 표준용액의 흡광도를 측정하고, 그래프를 그린 결과  $R^2$ 값이 0.99 이상으로 측정되었다(표 9, 그림 4). 이를 토대로 계산 시 세포 수에 따라 1.0–2.2 mg/mL 범위로 농도가 측정됐다(표 10). 이때  $1 \times 10^9$  cell은 BCA assay를 시행했으며, 농도는 1.98 mg/mL로 측정됐다. 다음으로 MDA-MB-231 세포의 BCA assay를 위한 BSA 표준용액 흡광도 측정 및 그래프를 그리고,  $R^2$ 값이 0.99 이상이 되도록 했다(표 11, 그림 5). 그 결과 세포 수에 따라 2.7–7.5 mg/mL 범위로 농도가 달라졌다(표 12). Ramos cell  $1 \times 10^9$ , MDA-MB-231 cell  $1 \times 10^7$  및  $5 \times 10^7$  cells로 western blot을 수행했다.

실험 결과, Ramos cell의 수가 약 100배 많음에도 불구하고 western blot 결과에서는 밴드가 비슷하거나 더 얇게 관찰되고, MDA-MB-231 세포의 경우 cell 수가 더 적음에도 불구하고 더 많은 HLA class I 발현량이 관찰되었다. 또한, 세가지 밴드 모두 약 40 kDa에서 검출되어 HLA Class I 세포의 존재를 확인할 수 있었다(그림 6).

표 9. Bradford assay standard(STD)

STD(mg/mL)	STD(OD)
0.010	0.0040
0.025	0.012
0.050	0.038
0.10	0.11
0.25	0.28
0.75	0.70
1.0	0.83

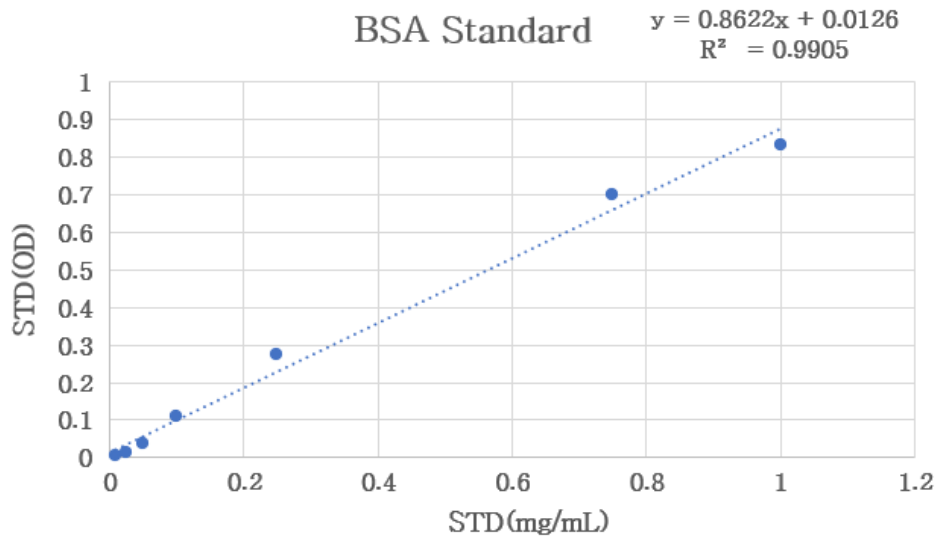


그림 4. Bradford assay용 BSA Standard curve

표 10. Ramos 세포 용해물 농도 측정

Cells	Sample(O.D)	Sample Con. (mg/mL)	Dilution fold	Ramos Con. (mg/mL)
$8.3 \times 10^7$ cells	0.777	0.887	2	1.77
$1.2 \times 10^8$ cells	0.923	1.06	2	2.11
$4.1 \times 10^7$ cells	0.475	0.536	2	1.07
$8.0 \times 10^7$ cells	0.515	0.583	2	1.17

표 11. BCA assay STD

STD(mg/mL)	STD(OD)
0	0.081
0.031	0.082
0.063	0.097
0.13	0.13
0.25	0.20
0.50	0.32
1.0	0.54

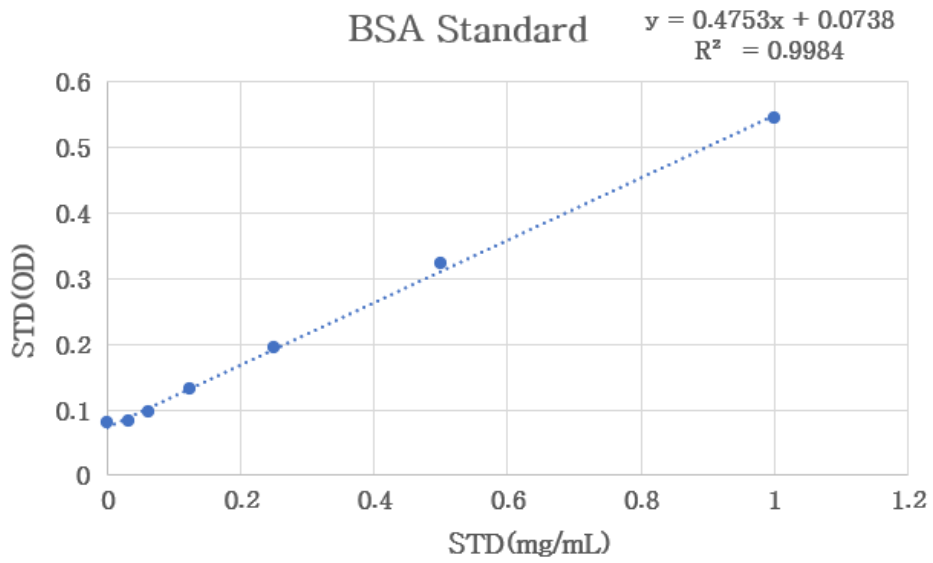


그림 5. BCA assay용 BSA Standard curve

표 12. MDA-MB-231 세포 용해물 농도 측정

Cells	Sample (O.D)	Sample Con. (mg/mL)	Dilution fold	MDA-MB-231 Con. (mg/mL)
$1.1 \times 10^7$ cells	0.395	0.676	4	2.70
$2.8 \times 10^7$ cells	0.438	0.766	4	3.06
$3.0 \times 10^7$ cells	0.412	0.712	4	2.85
$5.0 \times 10^7$ cells	0.428	0.745	10	7.45

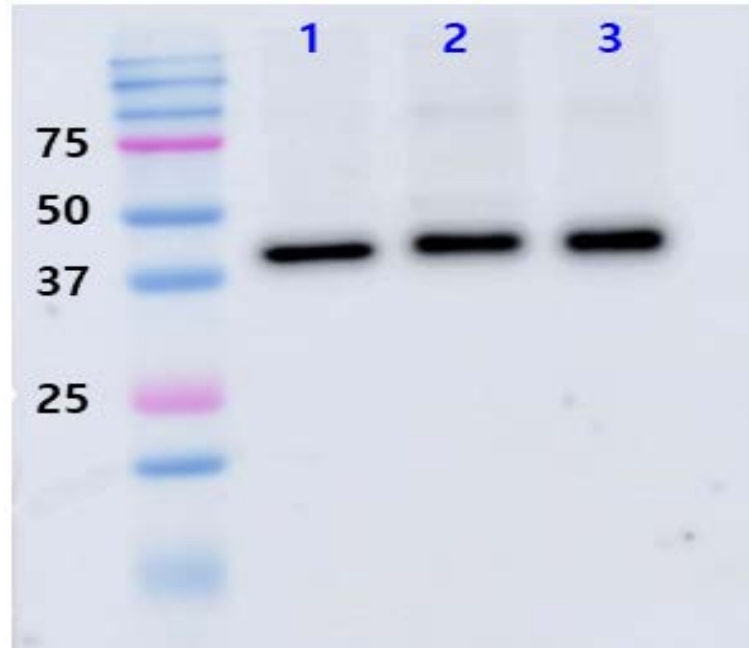


그림 6. 각 세포 별 western blot을 통한 HLA class I 발현 확인

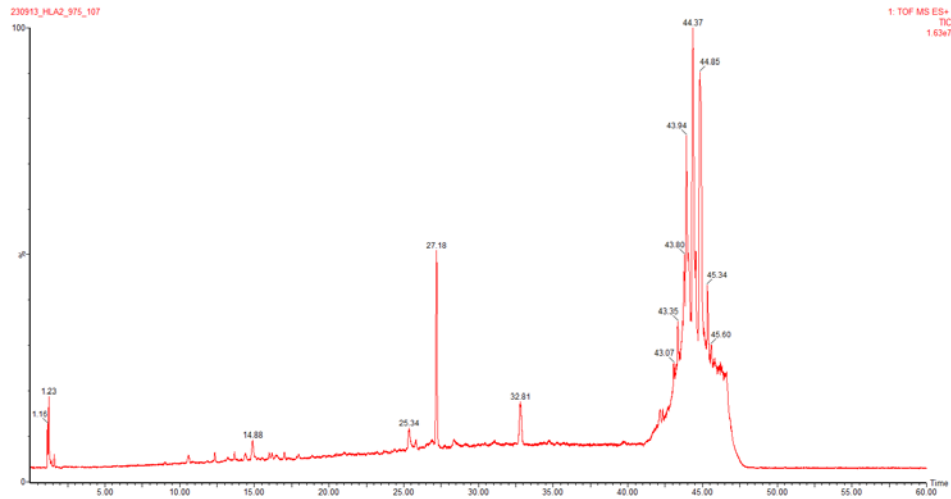
(1) Ramos  $1.0 \times 10^9$  cells, (2) MDA-MB-231  $1.0 \times 10^7$  cells, (3) MDA-MB-231  $5.0 \times 10^7$  cells를 나타낸다. 가장 왼쪽 밴드는 사이즈마커를 나타내며, 단위는 kDa을 의미한다. Ramos 세포는 MDA-MB-231 세포에 비해 약 100배 이상 세포 수가 많으나, 밴드는 비슷하거나 더 얇은 형태로 검출되었다.

### 3. HLA 펩타이드의 LC-MS/MS를 통한 동정

#### (1) 분석 장비에 의한 비교

Ramos 세포의 HLA class I 펩타이드 동정을 위해 Q-TOF 및 QE Orbitrap 장비를 통해 분석을 실시하고, PEAKS studio 소프트웨어로 값을 비교했다. 그 결과, Q-TOF 장비로 분석한 Ramos 세포를 PEAKS로 분석 시 Database search로 3개의 펩타이드가 검출되었고, *de novo*로 12개의 펩타이드가 검출되었다. QE Orbitrap 장비로 분석한 경우 DB search로 151개, *de novo*로 379개의 펩타이드가 검출되어 이후 데이터 분석 및 비교시에는 QE Orbitrap 장비로만 진행했다(그림 7, 표 13).

(a)



(b)

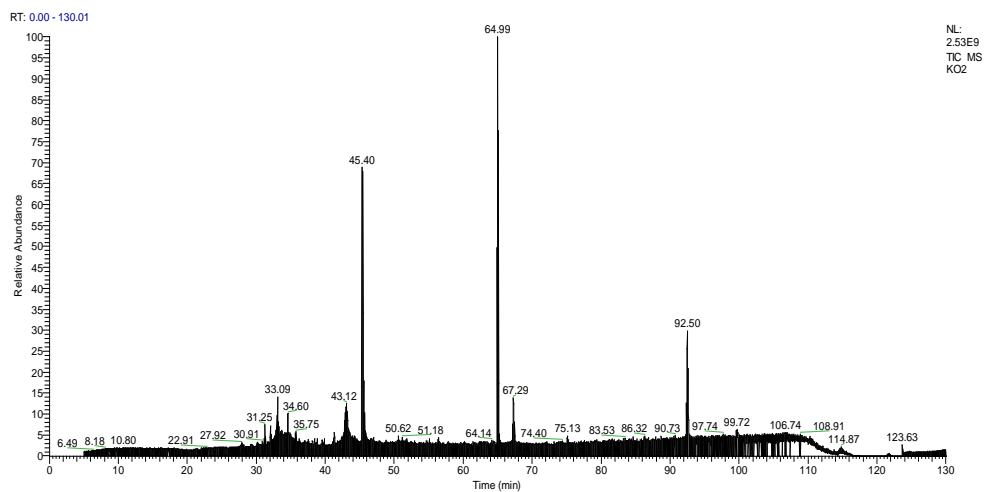


그림 7. 서로 다른 기기로 분석한 Ramos HLA 펩타이드 크로마토그램

(a) Q-TOF, Ramos  $9.75 \times 10^7$  cells (b) Orbitrap, Ramos  $9.75 \times 10^7$  cells

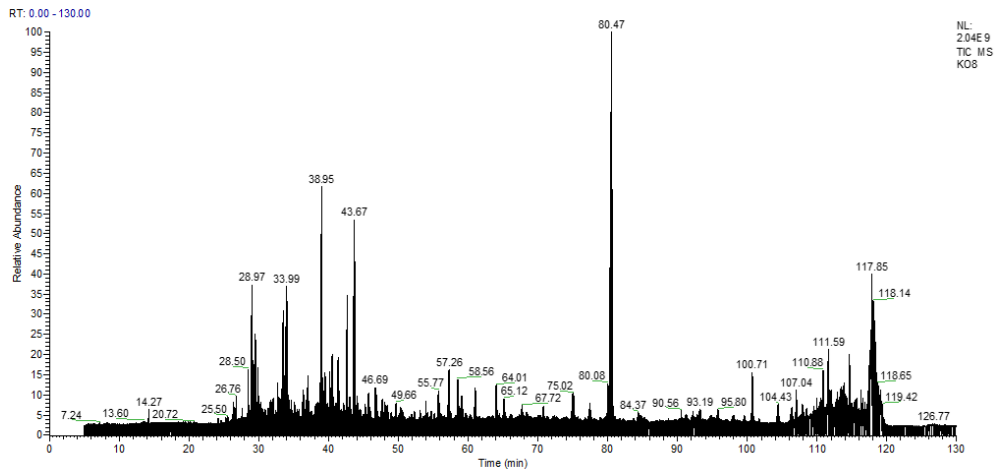
표 13. 장비 별 PEAKS 분석 결과

	Q-TOF	QE Orbitrap
DB Search	3	151
<i>De novo</i>	12	379

(2) 세포 수에 따른 비교

Ramos 및 MDA-MB-231 세포수에 따른 QE 분석결과를 PEAKS로 분석하여 펩타이드 동정 수를 비교했다. 이때 Ramos 세포의 beads 양은 40  $\mu$ L, 항체 양은 500  $\mu$ g으로 실험했고, MDA-MB-231 세포의 beads 양은 80  $\mu$ L, 항체 양은 1 mg으로 실험했다. Ramos 세포 수는  $4.0 \times 10^7$ ,  $1.2 \times 10^8$ 으로 총 2가지였으며 MDA-MB-231 세포 수는  $1.22 \times 10^7$ ,  $5.0 \times 10^7$ 으로 총 2가지였다. 각 분석결과 MS 크로마토그램은 그림 8에, PEAKS 분석 결과는 표 14에 나와있다. 분석 결과, Ramos 및 MDA-MB-231 각각 세포 수가 증가할수록 PEAKS DB 및 *de novo* 값이 증가했으며, HLA 펩타이드로 유력한 8-12mer 길이의 펩타이드 수 역시 증가했다. 또한, *de novo* 결과에서 신뢰할만한 펩타이드의 평균 서열의 정확도를 의미하는 ALC(Average Local Confidence)  $\geq 90\%$  값 역시 증가했다. 각 세포의 PEAKS DB search에 해당하는 펩타이드의 MS/MS 데이터는 그림 9에 나와있으며, 모두 9mer에 해당하는 결과를 나타냈다.

(a)



(b)

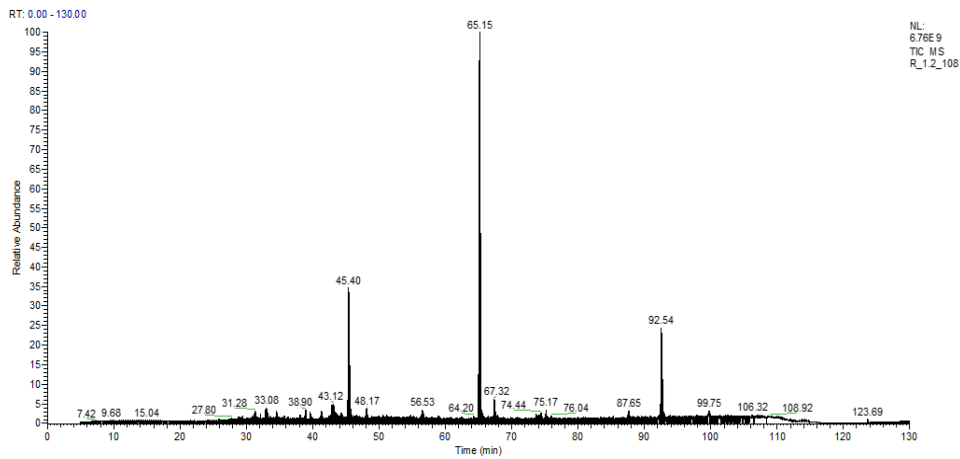
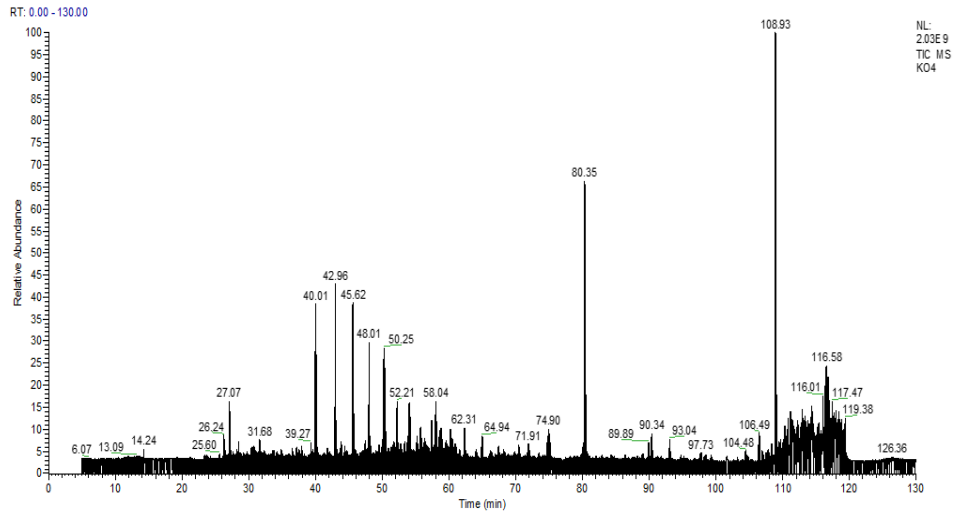


그림 8. Orbitrap장비로 분석한 세포수 별 HLA 펩타이드 크로마토그램

(a) Ramos 4.0 × 10<sup>7</sup> cells, (b) Ramos 1.2 × 10<sup>8</sup> cells. (a)–(c)는 m/z 범위를 300–2000으로, (d)의 경우 m/z 범위를 400–1800으로 분석했다. x축은 Retention time(min), y축은 relative abundance를 나타낸다.

(c)



(d)

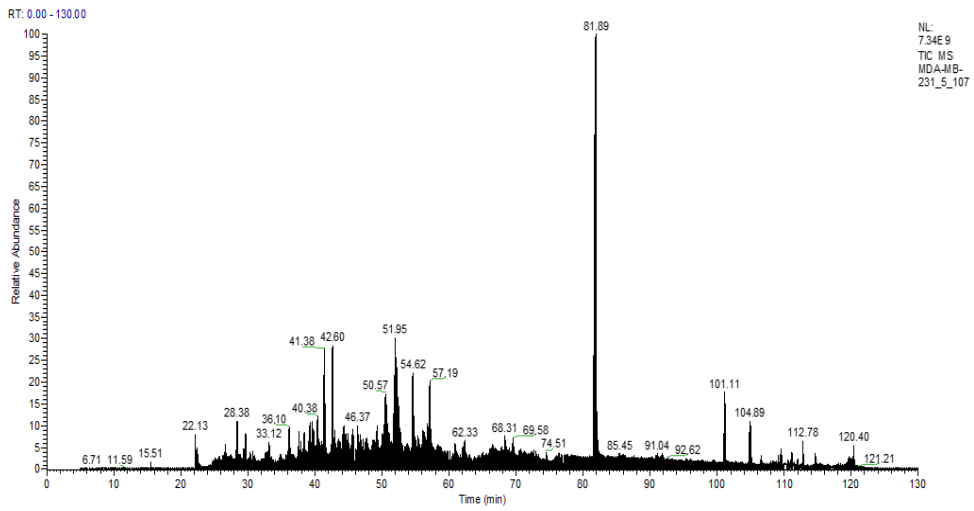
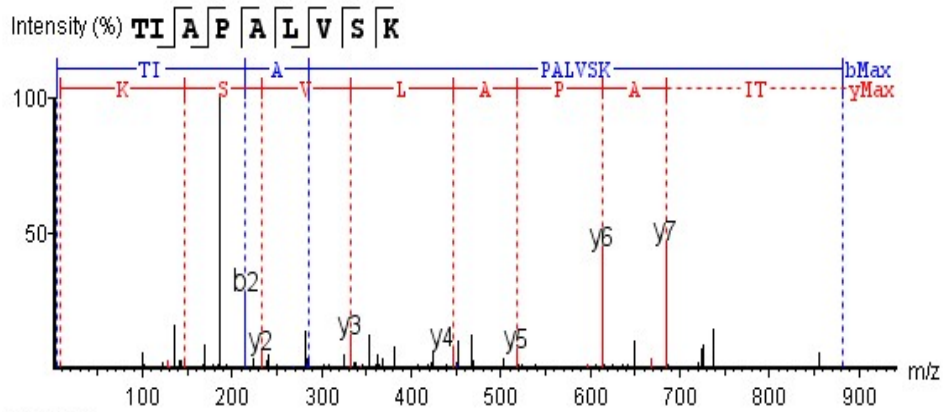


그림 8. Continued

(c) MDA-MB-231  $1.22 \times 10^7$ , (d) MDA-MB-231  $5.0 \times 10^7$ .

(a)



(b)

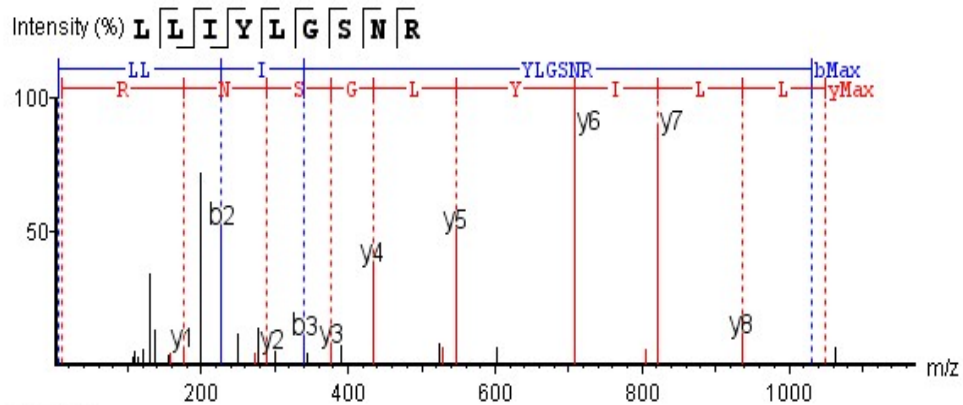
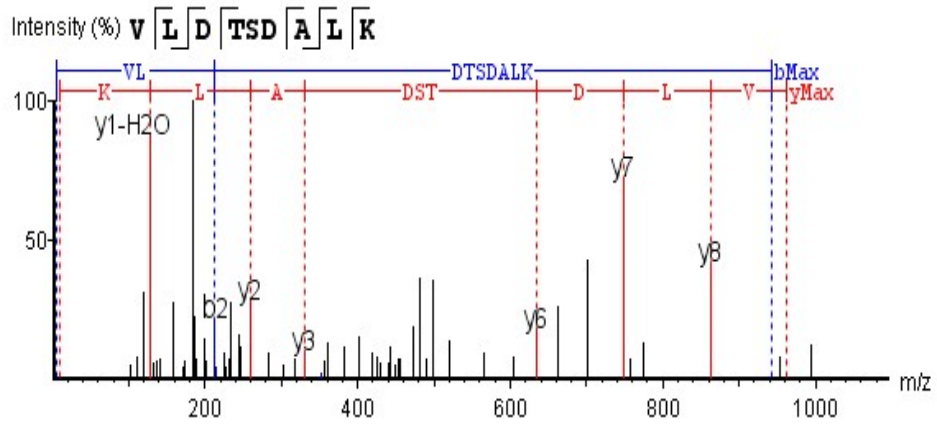


그림 9. HLA class I 펩타이드의 세포수 별 MS/MS 데이터

Ramos (a)  $4.0 \times 10^7$ , (b)  $1.2 \times 10^8$ , b계열 이온은 전하가 펩타이드의 N-말단측에 머무르고 있는 조각이온에 대해서 개열하는 부위이며, 카르보닐기(C=O)와 아미노기(NH)사이의 펩타이드 사이에서 절단된다. y 계열 이온은 전하가 펩타이드의 C말단측에 머무르고 있는 조각이온에 대해 개열하는 부위이며, b이온과 동일하게 카르보닐기 및 아미노기 사이에서 절단된다.

(c)



(d)

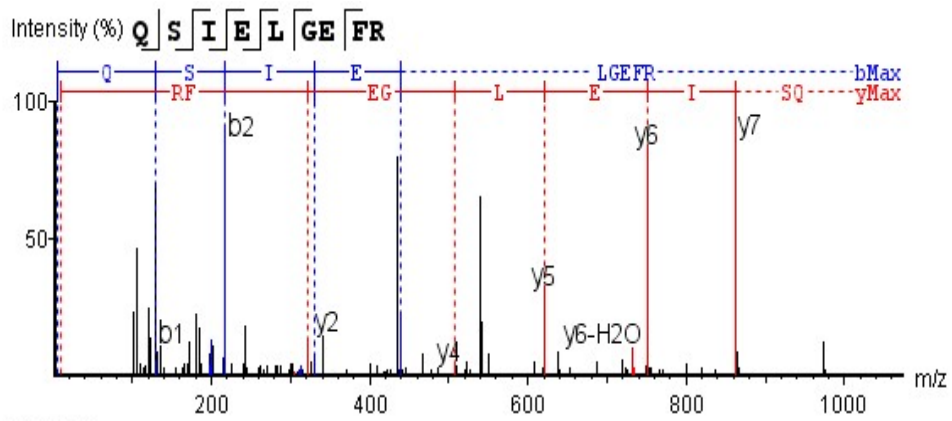


그림 9. Continued. MDA-MB-231 (c)  $1.22 \times 10^7$ , (d)  $5.0 \times 10^7$ .

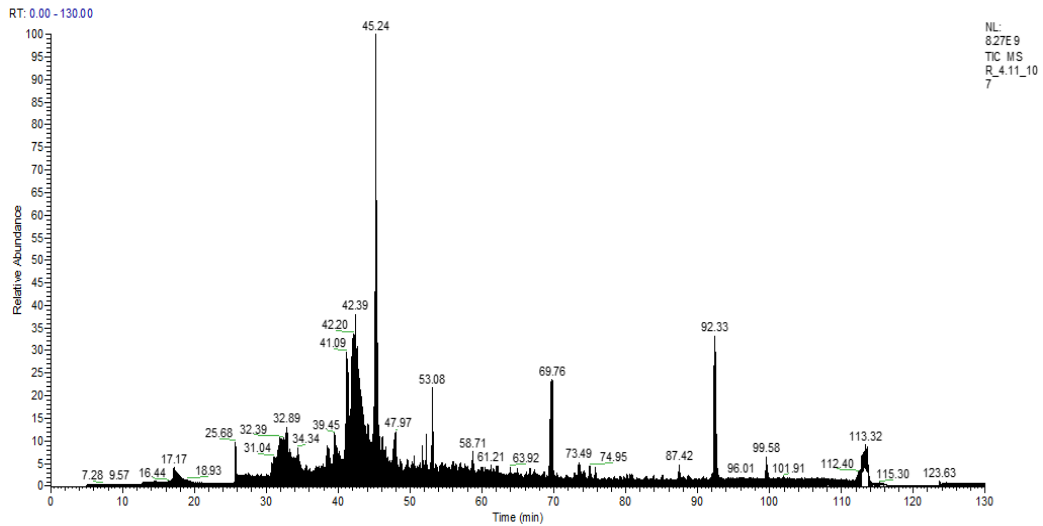
표 14. 세포 종류 및 세포 수 별 PEAKS 분석 결과

Cell 종류	Cell 수 (단위: cells)	PEAKS DB	PEAKS DB (8-12mer)	<i>De novo</i>	<i>De novo</i> ALC≥90%
Ramos	$4.0 \times 10^7$	94	71	515	37
	$1.2 \times 10^8$	187	125	759	80
MDA-MB-231	$1.2 \times 10^7$	174	145	1342	41
	$5.0 \times 10^7$	398	324	2722	159

### (3) 항체 및 비드 양에 따른 비교

Ramos 및 MDA-MB-231 세포에 대한 항체 및 beads 양을 달리하여 동정되는 수를 비교했다. Ramos 세포  $4.11 \times 10^7$  및 MDA-MB-231 세포  $1.19 \times 10^7$ 은 항체 500  $\mu$ g, beads 40  $\mu$ L로 IP를 진행했으며 Ramos 세포  $4.74 \times 10^7$  및 MDA-MB-231 세포  $1.0 \times 10^7$ 은 항체 1 mg, beads 80  $\mu$ L로 IP를 진행했다. 각 실험에 따른 MS 크로마토그램은 그림 10에 나와있다. 그 결과, Ramos 세포의 경우 항체 및 beads의 양이 증가함에 따라 PEAKS DB 및 *de novo*로 동정되는 수가 많아졌다. 그러나, MDA-MB-231 세포의 경우 항체 및 beads의 양이 증가함에 따라 *de novo* 데이터만 증가했고, PEAKS DB 데이터는 소량 감소했다(표 15.). 각 세포에 관한 MS/MS 데이터는 그림 11에 나와있으며, 모두 9mer의 결과를 나타냈다.

(a)



(b)

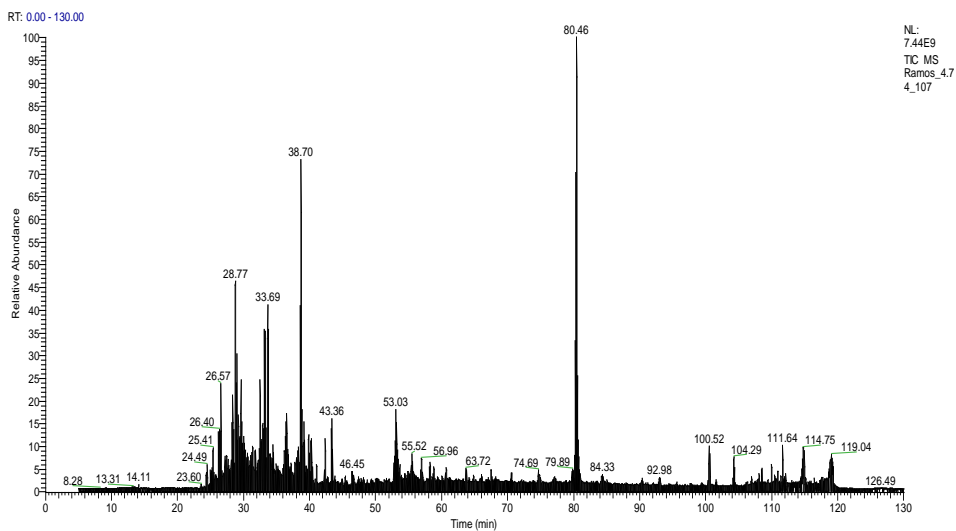
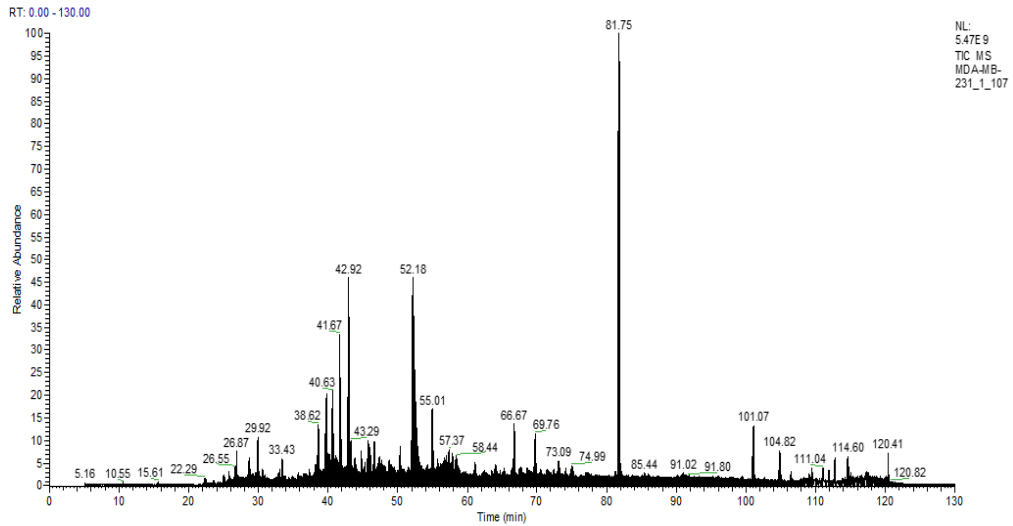


그림 10. 항체 및 비드 수에 따른 세포 별 MS 크로마토그램

항체 500  $\mu$ g, beads 40  $\mu$ L (a) Ramos  $4.1 \times 10^7$  cells, (c) MDA-MB-231  $1.0 \times 10^7$  cells, 항체 1 mg, beads 80  $\mu$ L (b) Ramos  $4.74 \times 10^7$  cells, (d) MDA-MB-231  $1.19 \times 10^7$  cells.

(c)



(d)

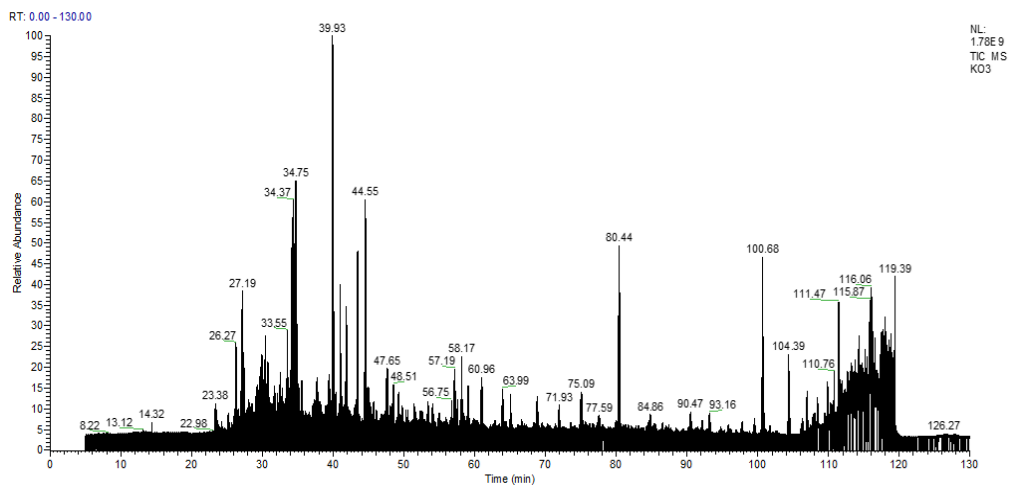


그림 10. Continued.

항체 500  $\mu$ g, beads 40  $\mu$ L (a) Ramos  $4.1 \times 10^7$  cells, (c) MDA-MB-231  $1.0 \times 10^7$  cells, 항체 1 mg, beads 80  $\mu$ L (b) Ramos  $4.74 \times 10^7$  cells, (d) MDA-MB-231  $1.19 \times 10^7$  cells.

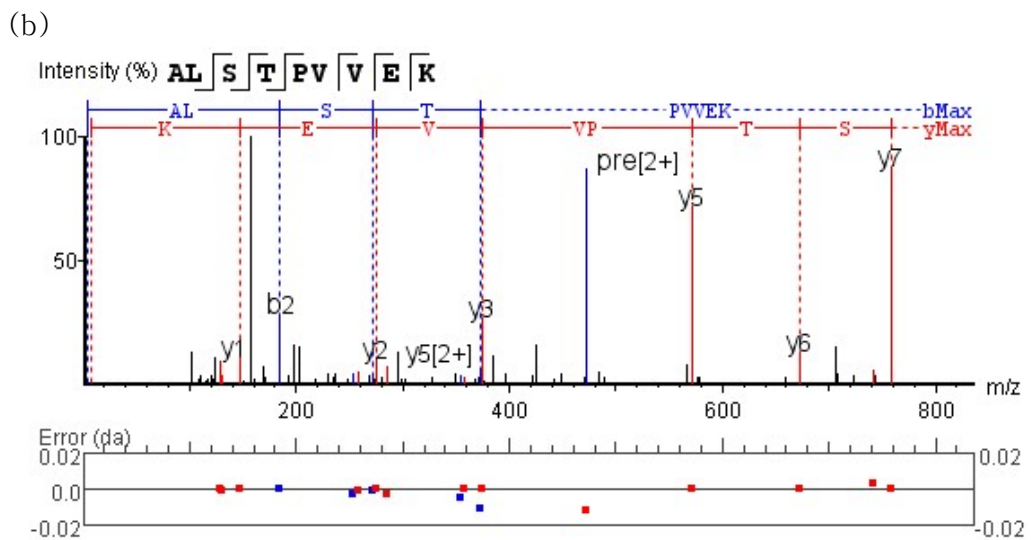
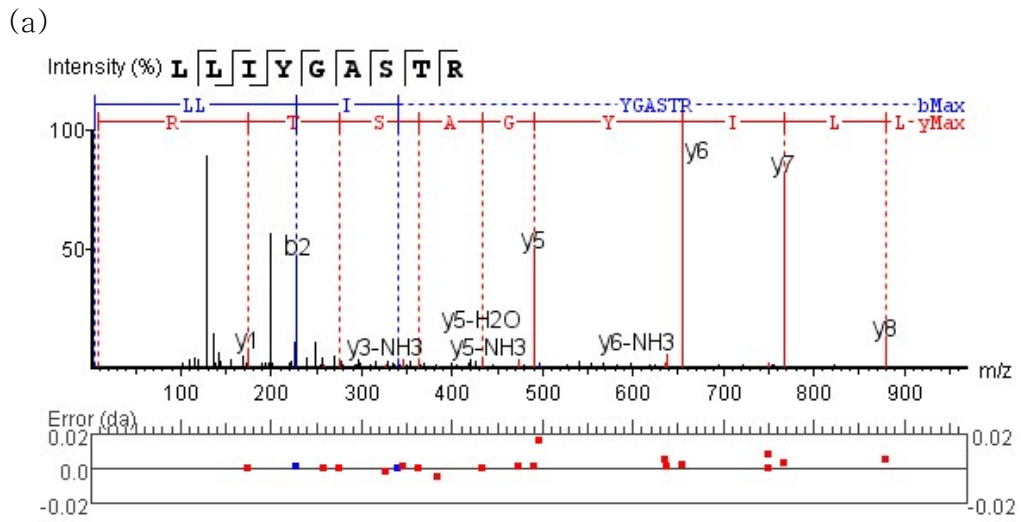
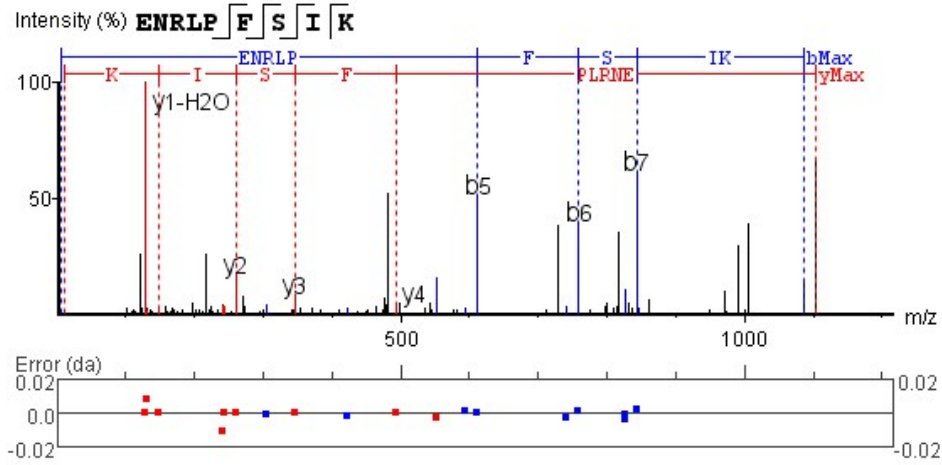


그림 11. 항체 및 비드 수에 따른 세포 별 MS/MS 데이터

항체 500  $\mu$ g, beads 40  $\mu$ L (a) Ramos  $4.1 \times 10^7$  cells, (c) MDA-MB-231  $1.0 \times 10^7$  cells, 항체 1 mg, beads 80  $\mu$ L (b) Ramos  $4.74 \times 10^7$  cells, (d) MDA-MB-231  $1.19 \times 10^7$  cells.

(c)



(d)

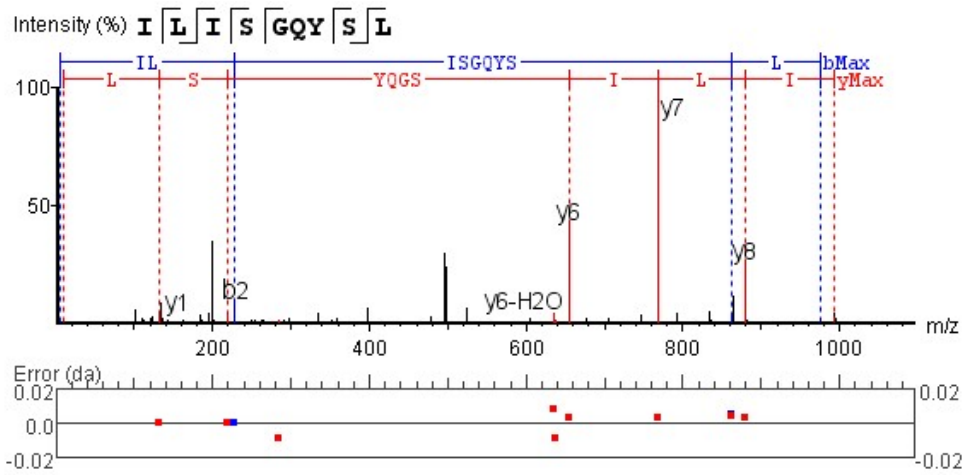


그림 11. Continued.

항체 500  $\mu$ g, beads 40  $\mu$ L (a) Ramos  $4.1 \times 10^7$  cells, (c) MDA-MB-231  $1.0 \times 10^7$  cells, 항체 1 mg, beads 80  $\mu$ L (b) Ramos  $4.74 \times 10^7$  cells, (d) MDA-MB-231  $1.19 \times 10^7$  cells.

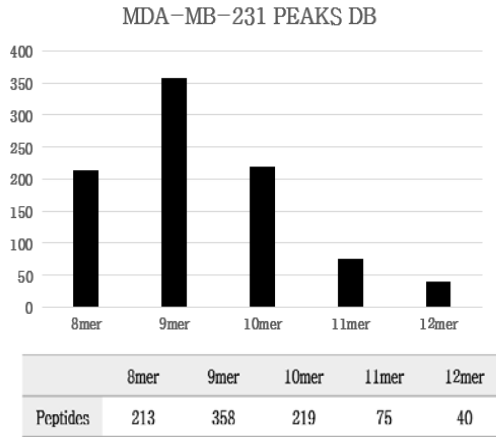
표 15. 항체 및 비드 양에 따른 세포 별 PEAKS 분석 결과

Cell 종류		항체, beads	PEAKS DB	PEAKS DB (8-12mer)	De novo	De novo ALC≥90%
Ramos	4.11×10 <sup>7</sup>	500 mg, 40 μL	195	95	608	86
	4.74×10 <sup>7</sup>	1 mg, 80 μL	200	134	1106	94
MDA-MB-231	1.00×10 <sup>7</sup>	500 mg, 40 μL	278	202	1120	82
	1.19×10 <sup>7</sup>	1 mg, 80 μL	200	151	1481	43

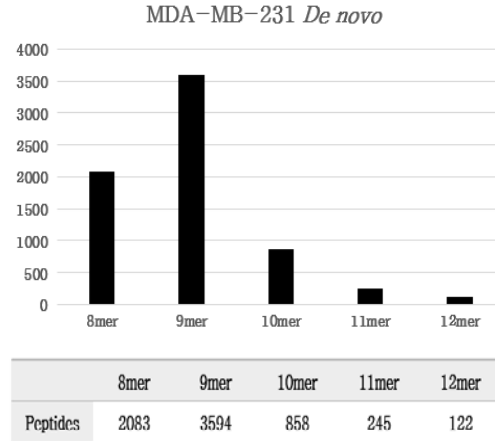
#### (4) HLA 펩타이드의 길이별 분포

Ramos 및 MDA-MB-231 세포 각각에서 실험으로 얻어낸 HLA 펩타이드의 분석 결과를 길이별로 비교했다. 이때, PEAKS DB 및 *de novo* 결과를 따로 도출했으며, 각 세포 별 반복 실험 후 PEAKS studio 로 가장 많은 펩타이드 동정 수를 가진 상위 5 개 세포의 길이별 서열을 취합했다. 이때 각 세포 별 길이에 따라 중복된 서열은 한번만 계산하여 포함시켰다. 그 결과, MDA-MB-231 세포 및 Ramos 세포 PEAKS DB 와 *de novo* 결과 중 9mer 에서 가장 많은 펩타이드가 동정되었다. MDA-MB-231 *de novo* 결과를 제외하고 8mer 와 10mer 의 분포는 비슷하게 나타났으며, 11mer 와 12mer 는 모든 결과에서 낮게 동정되었다(그림 12).

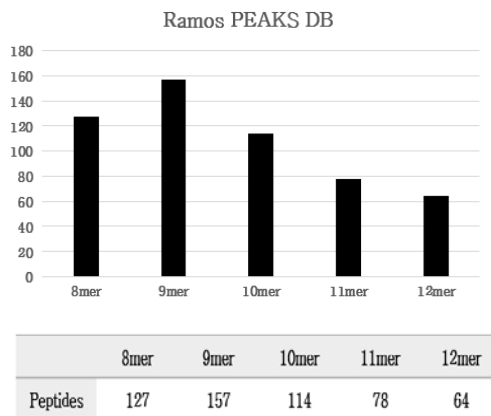
(a)



(b)



(c)



(d)

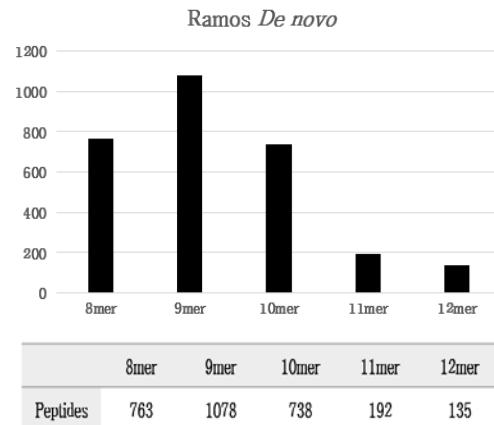


그림 12. 세포 별 펩타이드 길이 분포. MDA-MB-231 (a) PEAKS DB, (b) *De novo*, Ramos (c) PEAKS DB, (d) *De novo*. 가로축은 펩타이드 서열 길이, 세로축은 동정 된 펩타이드 수를 의미한다. 두 세포 모두 9mer 에서 가장 많은 펩타이드 수가 검출되었다.

#### (5) HLA class I 펩타이드의 MHC 결합 친화도 예측

세포 별 HLA 의 각 아형에 따른 면역원성 및 결합친화도를 확인하고, SB(Strong binder)의 개수를 정리했다(표 16). 그 결과, Ramos 세포에서는 HLA-A\*03:01 에서 대부분 강하게 결합하고 있었으며, 나머지 아형에서는 강한 결합을 많이 보이지 않았다. 반면, MDA-MB-231 세포에서는 Ramos 세포에 비해 각 아형별로 비교적 고른 분포를 보였으나, HLA-B\*40:02 에서 가장 많은 강한 결합을 나타냈다. 또한, 상대적으로 Ramos 에 비해 MDA-MB-231 세포에서 강한 결합을 가진 펩타이드 수가 많이 동정되었다. 이때, 모두 9mer 에 해당하는 결과만을 나타냈으며, 상위 10 개에 해당하는 SB score 를 가진 펩타이드를 표 x 에 나타냈다. Ramos 세포의 경우 상위 10 개의 아형 모두 HLA-A\*03:01 에 해당했고, MDA-MB-231 세포의 경우 HLA-A\*02:01 에서 3 개, HLA-B\*40:02 에서 5 개, HLA-A\*02:17 에서 1 개, HLA-B\*41:01 에서 1 개로 검출되었다(표 17). 따라서 이들을 중앙 관련 항원(TAA)으로 예측했다.

표 16. 세포 별 각 아형에 따른 강한 결합력을 가진 펩타이드 수

(a)

Ramos	Strong Binder (SB)
HLA-A*03:01	45
HLA-B*44:03	5
HLA-B*51:01	4
HLA-C*16:01	4

(b)

MDA-MB-231	Strong Binder (SB)
HLA-A*02:01	45
HLA-A*02:17	47
HLA-B*40:02	69
HLA-B*41:01	54
HLA-C*02:02	31
HLA-C*17:01	56

\*각 세포 별 결과는 여러 번의 실험 중 가장 많은 펩타이드 수가 동정된 두 번의 실험 결과 데이터를 합하여 도출한 값임.

표 17. SB 상위 10 개 펩타이드 서열 및 점수

(a)

Rank	MHC	Peptide	Score
1	HLA-A*03:01	KLLPSVVLK	0.98964
2	HLA-A*03:01	RLNHVLYK	0.98945
3	HLA-A*03:01	KIFSGVFK	0.98156
4	HLA-A*03:01	RLAEYFPNK	0.97752
5	HLA-A*03:01	ALSTPVVEK	0.97618
6	HLA-A*03:01	KLYDIDVAK	0.96158
7	HLA-A*03:01	RIFQKFLQR	0.95660
8	HLA-A*03:01	RVFDVPIRR	0.95412
9	HLA-A*03:01	TIAPALVSK	0.92449
10	HLA-A*03:01	VIFTGGVGK	0.91833

(b)

Rank	MHC	Peptide	Score
1	HLA-A*02:01	LLQEKIQEL	0.97598
2	HLA-A*02:01	YLASVAQEL	0.96711
3	HLA-A*02:01	RLADALQEL	0.96327
4	HLA-B*40:02	TEVVQKIEL	0.95741
5	HLA-B*40:02	AEIQNKSL	0.94505
6	HLA-A*02:17	LLQEKIQEL	0.94358
7	HLA-B*40:02	RENRLPFSI	0.93816
8	HLA-B*40:02	AENDRILKV	0.93181
9	HLA-B*40:02	SEIFGPRTV	0.92529
10	HLA-C*17:01	YSLPRTDEL	0.91202

\*a 는 Ramos 세포, b 는 MDA-MB-231 세포의 결과를 나타냄.

\*Score 가 높을수록 강한 결합력을 지님.

## IV. 결론

세포 매개 면역을 담당하는 T 세포의 활성화를 위해서 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 작은 조각(펩타이드)으로 제시된 항원의 인식이 매우 중요하다.<sup>23</sup> 특히 종양 면역학에서는 인간 백혈구 항원인 HLA 리간드가 다양한 방식으로 사용되는데, 이는 악성 형질전환과 같은 세포 내 이상을 나타내는 바이오마커 및 암 특이적 T 세포를 활성화하는 용도로 사용될 수 있다.<sup>24</sup> 이때 질량분석기는 암 특이적 항원의 표적화 및 식별을 향상시키는 도구로 사용될 수 있다.<sup>25</sup> 따라서, 본 연구에서는 면역 침강법 및 질량분석기를 이용하여 HLA class I 에 제시된 펩타이드를 동정하고, 결합력을 측정하여 종양 관련 항원(TAA) 후보군으로 도출하고자 하였다.

먼저, HLA class I 발현 여부 파악을 위해 western blot 을 수행한 결과, Ramos 세포가 MDA-MB-231 세포에 비해 약 100 배 이상 많은 수를 가질 때 밴드가 비슷하게 검출되었다. 이전 실험에서 Ramos 세포와 MDA-MB-231 세포의 수를 비슷하게 수확하여 세포 용해를 진행한 뒤, western blot 을 측정했을 때 Ramos 세포에서는 밴드가 검출되지 않았다. 즉, 세포별로 HLA 분자의 발현량에 차이가 있음을 나타낸다. 이는 암이 진행되면서 면역 기작을 회피하고, 면역 억제성 종양 미세환경(Tumor microenvironment, TME)를 확립하고자 하는 성질에 기인한다. 즉 이러한 면역 회피 기작이 MHC class I 의 발현 감소로 이어지며, 이는 항원 손실로 이어진다.<sup>17</sup> 이 특성에 기반하여, Ramos 세포는 passage 가 75 이상인 세포를 사용했고, MDA-MB-231 세포는 passage 가 10 이하인 세포를 사용한 것도 HLA class I 제시 펩타이드 발현량에 영향을 끼쳤을 것으로 생각된다. 다음으로 분석 장비에 따라 동정되는 펩타이드 수를 비교했다. 그 결과, Q-TOF 장비에 비해 QE Orbitrap 을 이용해 분석했을 때 PEAKS studio 에서

동정되는 펩타이드 수가 더 많았다. Q-TOF 장비는 전분자량 측정에 더 특화된 장비로 생각되며, 더 많은 펩타이드 수를 얻기 위해선 스캔 속도가 빠른 Orbitrap 장비를 이용하는 것이 효율적이라고 생각된다. 따라서 이후 실험은 모두 QE Orbitrap 으로 분석 후 결과를 도출했다. 다음으로, 세포 수에 따른 동정 결과를 비교했다. 두 세포 모두 세포수가 증가할수록 Database search 및 *de novo* 로 동정되는 펩타이드 수가 증가했다. 따라서 펩타이드 수를 많이 얻기 위해선 세포 수를 늘려서 실험하는 것이 좋으나, 다른 조직세포 등에서 실험할 경우 매우 많은 세포 수를 확보하기 어렵기 때문에 본 연구에서는 약 천만개 이상의 세포 수로 실험을 진행했다. 실험 시 사용되는 항체 및 비드의 양도 달리하여 비교했다. 그 결과, Ramos 세포에서는 DB search 및 *de novo* 결과 모두 펩타이드 동정 수가 소폭 증가했다. 그러나 MDA-MB-231 세포에서는 *de novo* 데이터만 증가했고 DB search 데이터는 소량 감소했다. 즉, 항체와 비드 양을 2 배가 아닌 그 이상으로 많이 증가시켰을 때의 결과를 비교해보고 각 세포마다 최적의 항체 및 비드의 양을 파악해야 할 것으로 보인다. 분석 후 PEAKS studio 로 펩타이드 동정을 한 뒤 길이에 따라 분포를 비교해본 결과, 두 세포 모두 9mer 에서 가장 많은 펩타이드가 검출되었다. 일반적으로 MHC class I 이 제시하는 펩타이드의 대표적인 길이는 9mer 로 알려져 있다.<sup>26</sup> 따라서 실험을 통해 HLA 제시 펩타이드 동정이 잘 이루어졌음을 1 차적으로 확인할 수 있었다. 마지막으로, 동정한 펩타이드의 HLA class I 과의 결합력을 확인했다. 이때, IEDB 에서 동정된 펩타이드 서열은 제외시켰다. 두 세포 유형 중, 유방암 세포에서 강한 결합을 하는 펩타이드가 더 많았고, Ramos 세포에서는 상위 10 개의 강한 결합을 가진 펩타이드가 HLA-A\*03:01 에서 모두 동정되었다. 반면 MDA-MB-231 세포에서는 HLA 아형 별로 비교적 고른 분포를 보였다. 그러나 이 결과는 반복 실험 횟수가 많지 않을 때

도출한 결과이기 때문에, 이후 반복 실험을 거쳐 더 많은 데이터를 축적해서 비교하면 뚜렷한 결과를 볼 수 있을 것으로 예상된다. 이렇게 강한 결합력을 가진 펩타이드들을 정상세포에도 존재하면서 암세포에도 존재할 수 있는 종양 관련 항원(TAA)으로 선별했다. 프로그램상의 예측을 토대로 동정된 펩타이드와 T 세포간의 결합력을 분석하기 위한 후속 실험을 통해 실험적으로 검증하는 과정이 필요할 것으로 보인다. 또한 종양 특이적 항원인 TSA 선별을 위해서 본 연구에서 실시한 실험을 토대로 얻은 *de novo* 로 검출된 펩타이드 데이터를 축적해 새로운 fasta 파일을 생성하고, 이를 토대로 펩타이드를 동정하여 정상 세포의 서열과 비교하여 암세포 특이적인 펩타이드 서열을 얻을 수 있을 것이라 기대한다.

## V. 참고문헌

1. Zugazagoitia, Jon, MD, PhD, Guedes C, MD, Ponce S, MD, Ferrer I, PhD, Molina-Pinelo S, PhD, Paz-Ares, Luis, MD, PhD. Current challenges in cancer treatment. *Clinical therapeutics*. 2016;38(7):1551–1566.
2. Yang Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(9):3335–3337.
3. Cornel AM, Mimpfen IL, Nierkens S. MHC class I downregulation in cancer: Underlying mechanisms and potential targets for cancer immunotherapy. *Cancers*. 2020;12(7):1760.
4. Liu W, Tang H, Li LL, Wang XX, Yu Z, Li JL. Peptide-based therapeutic cancer vaccine: Current trends in clinical application. *Cell Proliferation*. 2021;54(5). doi: 10.1111/cpr.13025.
5. Sturm T, Sautter B, Wörner TP, et al. Mild acid elution and MHC immunoaffinity chromatography reveal similar albeit not identical profiles of the HLA class I immunopeptidome. *J Proteome Res*. 2020;20(1):289. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00386.
6. Purcell AW, Ramarathinam SH, Ternette N. Mass spectrometry-based identification of MHC-bound peptides for immunopeptidomics. *Nature protocols*.

7. Sidney J, Peters B, Frahm N, Brander C, Sette A. HLA class I supertypes: A revised and updated classification. *BMC Immunology*. 2008;9(1):1.
8. Rist MJ, Theodossis A, Croft NP, et al. HLA peptide length preferences control CD8+ T cell responses. *The Journal of immunology (1950)*. 2013;191(2):561–571.
9. Chu Y, Zhang Y, Wang Q, et al. A transformer-based model to predict peptide–HLA class I binding and optimize mutated peptides for vaccine design. *Nature machine intelligence*. 2022;4(3):300–311.
10. Freudenmann LK, Marcu A, Stevanović S. Mapping the tumour human leukocyte antigen (HLA) ligandome by mass spectrometry. *Immunology*. 2018;154(3):331. doi: 10.1111/imm.12936.
11. Zhang Y, Xing Z, Liu C, et al. Identification of the core regulators of the HLA I–peptide binding process. *Scientific Reports*. 2017;7(1):42768.
12. Khan A, Shin J, So MK, et al. Characterization of HLA- A\*33:03 epitopes via immunoprecipitation and LC- MS/MS. *Proteomics*. 2021;22(1–2). doi: 10.1002/pmic.202100171.
13. Richters MM, Xia H, Campbell KM, Gillanders WE, Griffith OL, Griffith ML. Best practices for bioinformatic characterization of

neoantigens for clinical utility. *Genome Med.* 2019;11(1). doi: 10.1186/s13073-019-0666-2.

14. Ren Y, Cherukuri Y, Wickland DP, et al. HLA class-I and class-II restricted neoantigen loads predict overall survival in breast cancer. *Oncoimmunology.* 2020;9(1):1744947.

15. Kuznetsov A, Voronina A, Govorun V, Arapidi G. Critical review of existing MHC I immunopeptidome isolation methods. *Molecules.* 2020;25(22). doi: 10.3390/molecules25225409.

16. Chaplin DD. 1. overview of the human immune response. *Journal of allergy and clinical immunology.* 2006;117(2):S430-S435.

17. Steven A, Seliger B. The role of immune escape and immune cell infiltration in breast cancer. *Breast care (Basel, Switzerland).* 2018;13(1):16-21.

18. Michael R. Shurin, Yuri S. Smolkin. Immune-mediated diseases. *Advances In experimental medicine and biology.* Volume 601.

19. Gfeller D, Bassani-Sternberg M. Predicting antigen Presentation—What could we learn from a million peptides? *Front Immunol.* 2018;9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01716.

20. Creech AL, Ting YS, Goulding SP, et al. The role of mass spectrometry and proteogenomics in the advancement of HLA epitope prediction. *Proteomics.* 2018;18(12):e1700259-n/a.

21. Boegel S, Löwer M, Bukur T, Sahin U, Castle JC. A catalog of HLA type, HLA expression, and neo-epitope candidates in human cancer cell lines. *OncoImmunology*. 2014;3(8). doi: 10.4161/21624011.2014.954893.
22. Scholtalbers J, Boegel S, Bukur T, et al. TCLP: An online cancer cell line catalogue integrating HLA type, predicted neo-epitopes, virus and gene expression. *Genome Med*. 2015;7(1). doi: 10.1186/s13073-015-0240-5.
23. Joosten SA, Sullivan LC, Ottenhoff THM. Characteristics of HLA-E restricted T-cell responses and their role in infectious diseases. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:2695396-11.
24. Ghosh M, Gauger M, Marcu A, et al. Guidance document: Validation of a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry immunopeptidomics assay for the identification of HLA class I ligands suitable for pharmaceutical therapies. *Molecular & cellular proteomics*. 2020;19(3):432-443.
25. Kote S, Pirog A, Bedran G, Alfaro J, Dapic I. Mass spectrometry-based identification of MHC-associated peptides. *Cancers*. 2020;12(3):535.

26. Koşaloğlu–Yalçın Z, Lanka M, Frentzen A, et al. Predicting T cell recognition of MHC class I restricted neopeptides. *OncoImmunology*. 2018;7(11). doi: 10.1080/2162402x.2018.1492508.
27. Wang Q, Nie Y, Sun S, et al. Tumor–associated antigen–based personalized dendritic cell vaccine in solid tumor patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(7):1375–1387.
28. Guan S, Taylor P, Han Z, Moran M, Ma B. DDIA: Data dependent–independent acquisition proteomics – DDA and DIA in a single LC–MS/MS run. *bioRxiv*. 2019.

# ABSTRACT

## Development of Immunopeptidome Profiling Using Mass Spectrometry –Peptide analysis presented on cancer cells–

Hye Joo Jang

Department of Next Generation

Applied Science

Graduate School of

Sungshin University

Peptide-based cancer vaccines are gaining attention as an effective treatment method in tumor immunotherapy. This immunotherapy relies on peptides presented on the Major Histocompatibility Complex (MHC) class I, mediating cytotoxic CD8 T cell responses. In humans, the MHC is referred to as Human Leukocyte Antigen (HLA). In T cell-based immunotherapy, it is essential to identify antigens presented by individual cancer cells for effective treatment. In this study, peptides presented by HLA class I were characterized through the utilization of LC-MS/MS.

There were two types of cells used in the experiment; MDA-MB-231 cells which originated from the metastatic human breast cancer, and Ramos cells that is from a B lymphocyte cell line.

Peptide identification during LC-MS/MS data processing was conducted using PEAKS studio software. The analysis involved both Database search (DB search) with the database set to *Homo sapiens* and *de novo* analysis without a database. Firstly, we compared the number of identified peptides based on the analysis equipment. The results showed that more peptides were identified using the Orbitrap instrument compared to Q-TOF. Consequently, all subsequent experiments were conducted using the Orbitrap. Secondly, we compared the number of identifications based on cell quantity. In both cell types, as the cell quantity increased, the number of peptides identified through both DB search and *de novo* analysis also increased. Thirdly, we explored the impact of altering the amount of beads and antibodies to examine how these alterations influenced the results. In the case of Ramos cells, when elevating the quantity of beads and antibodies, the amount of identified peptides increased also. In contrast, when experimenting with the MDA-MB-231 cells, the surge in the amount of beads and antibodies resulted only in the increase of *de novo* searched peptides. Looking at the distribution of identified peptides based on their length in each cell, the majority of peptides were identified as 9-mers, followed by 8-mers or 10-mers. Peptides of lengths 11 and 12 demonstrated relatively fewer detections in the identification process. Lastly, the binding affinity between the identified peptides and HLA class I was measured for both cell types. Through this analysis, peptides identified from the Immune Epitope Database (IEDB) were excluded. The results indicated that, compared to Ramos cells, MDA-MB-231 cells exhibited a higher

abundance of peptides with strong binding affinity. In Ramos cells, peptides with strong binding affinity to HLA-A\*03:01 were the most prevalent. Conversely, in MDA-MB-231 cells, peptides were relatively evenly distributed among different HLA alleles. These peptides with strong binding affinity were selected as Tumor-associated Antigen (TAA), associated with the tumor.