



# LC-TANDEM MS-MRM

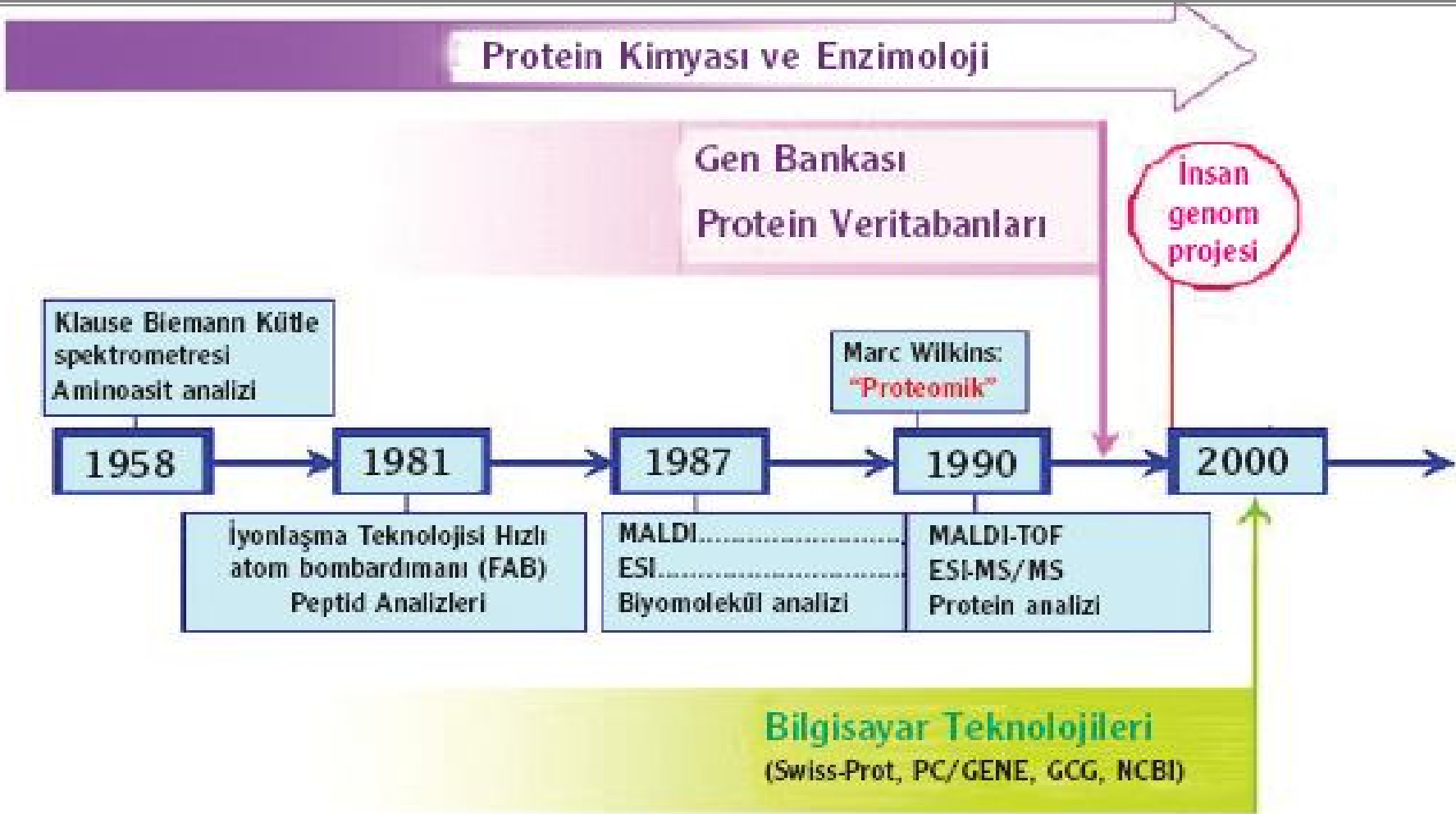
## TEMEL ARAŞTIRMA VE KLİNİK LABORATUVARDA KULLANIMI

**Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL**

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**1 Aralık 2011 - ADANA**

# Kütle Spektrometresi Tarihsel Süreci



# Kimya Dalında Nobel Bilim Ödülü (2002) (Fenn J. B. ve Tanaka K)

## ESI and MALDI

The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the Nobel Prize  
in Chemistry for 2002



*"for the development of methods for identification and structure analyses of biological macromolecules"*

John B. Fenn, Virginia Commonwealth University, Richmond, USA, and  
Koichi Tanaka, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan

*"for their development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules"*

Kurt Wüthrich, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zürich, Switzerland and  
The Scripps Research Institute, La Jolla, USA

*"for his development of nuclear magnetic resonance spectroscopy for determining the three-dimensional structure of biological macromolecules in solution"*

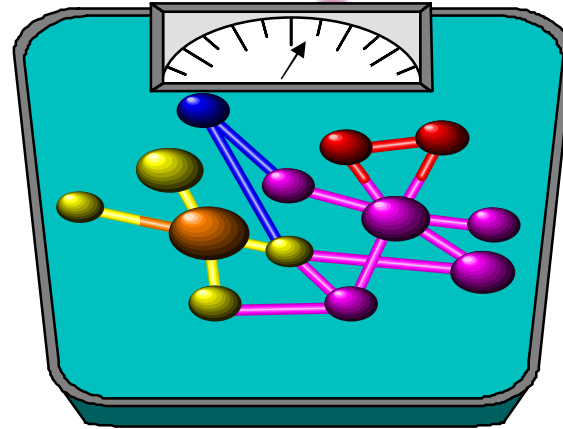
# Kütle Spektrometri (MS)

- ❑ Bilinmeyen bileşiklerin **tanımlanması**
  - ❑ Organik ve inorganik moleküllerin **yapısal özelliklerinin belirlenmesi**
- ❑ Her tipte bilinen bileşiğin **kantitasyonu**  
**“yüksek duyarlılık ve özgüllükte”**  
**analitik bir teknik**

# MS moleküllerin kütlelerini tartar

Tek bir hidrojen atomu ağırlığı

$$1.66 \times 10^{-24} \text{ g}$$



Çok hassas molekül tartısı

# MS moleküllerin kütlelerini tartar

- ❑ Kütle Spektrometre doğrudan moleküler kütle ölçmek yerine moleküllerin **kütle/yük oranına ( $m/z$ )** göre ayırır ve ölçer
- ❑ Moleküller iyonlara dönüştürülmeli (elektriksel olarak + ya da - yüklü olmalı)
- ❑ Gaz fazına geçirilmeli

# Kütle Spektrometresi



**İyon kaynağı**

Atmosferik basınçta molekülün gaz fazına geçirilmesi ve iyonizasyonu

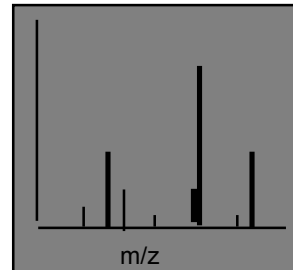
**Kütle Analizörü**

Gaz fazındaki iyonların vakum altında m/z e göre ayrılması

**Detektör**

Ayrılmış iyonların tespiti

**Veri Analizi**

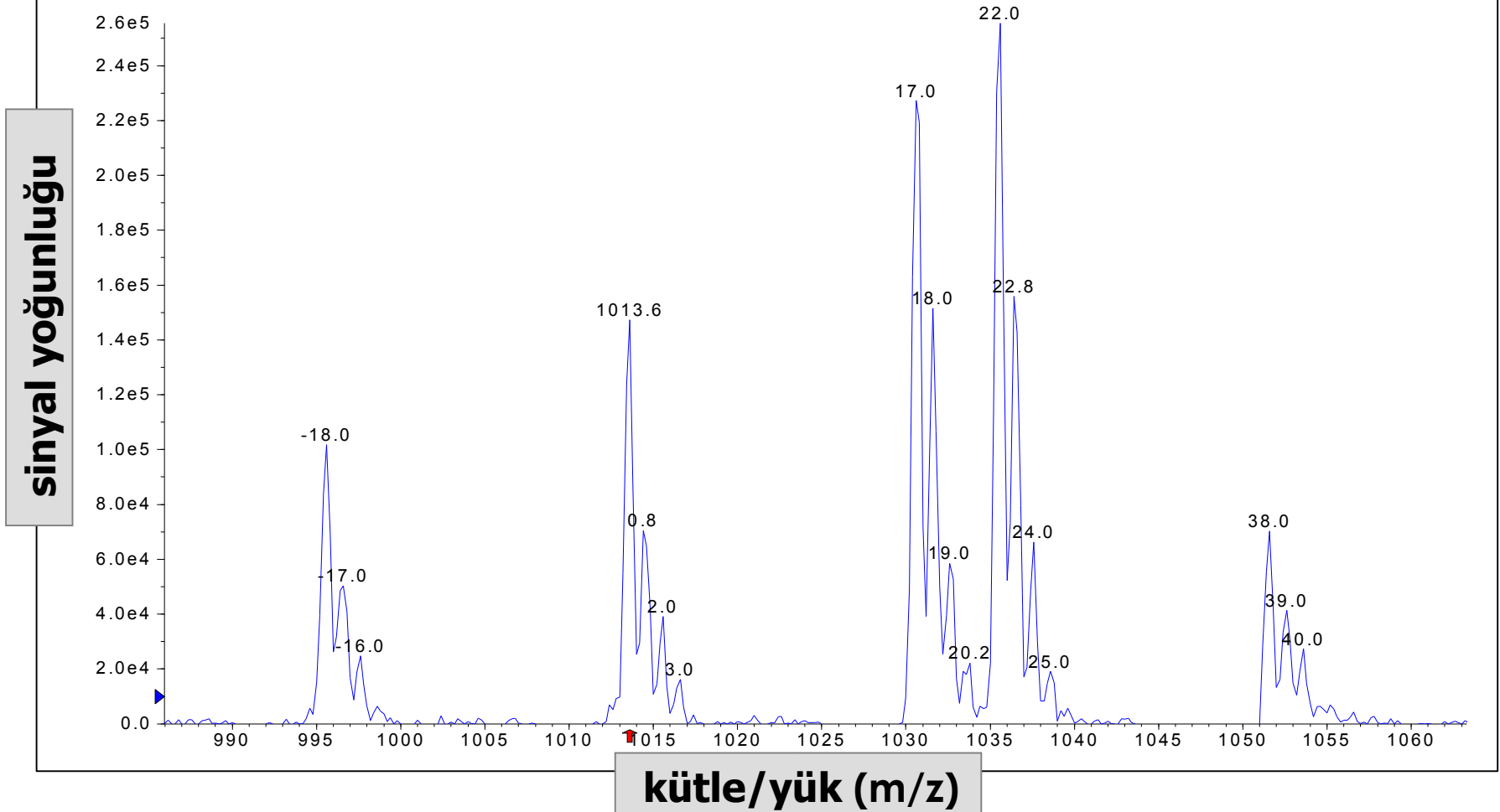


**Kütle Spektrumu**



# Kütle Spektrumu

+Q1: 6.700 to 6.834 min from Sample 8 (MCF) of Data Q1 scans MC.wiff, subtracted (6.399 to 6.549 ... Max. 2.6e5 cps.

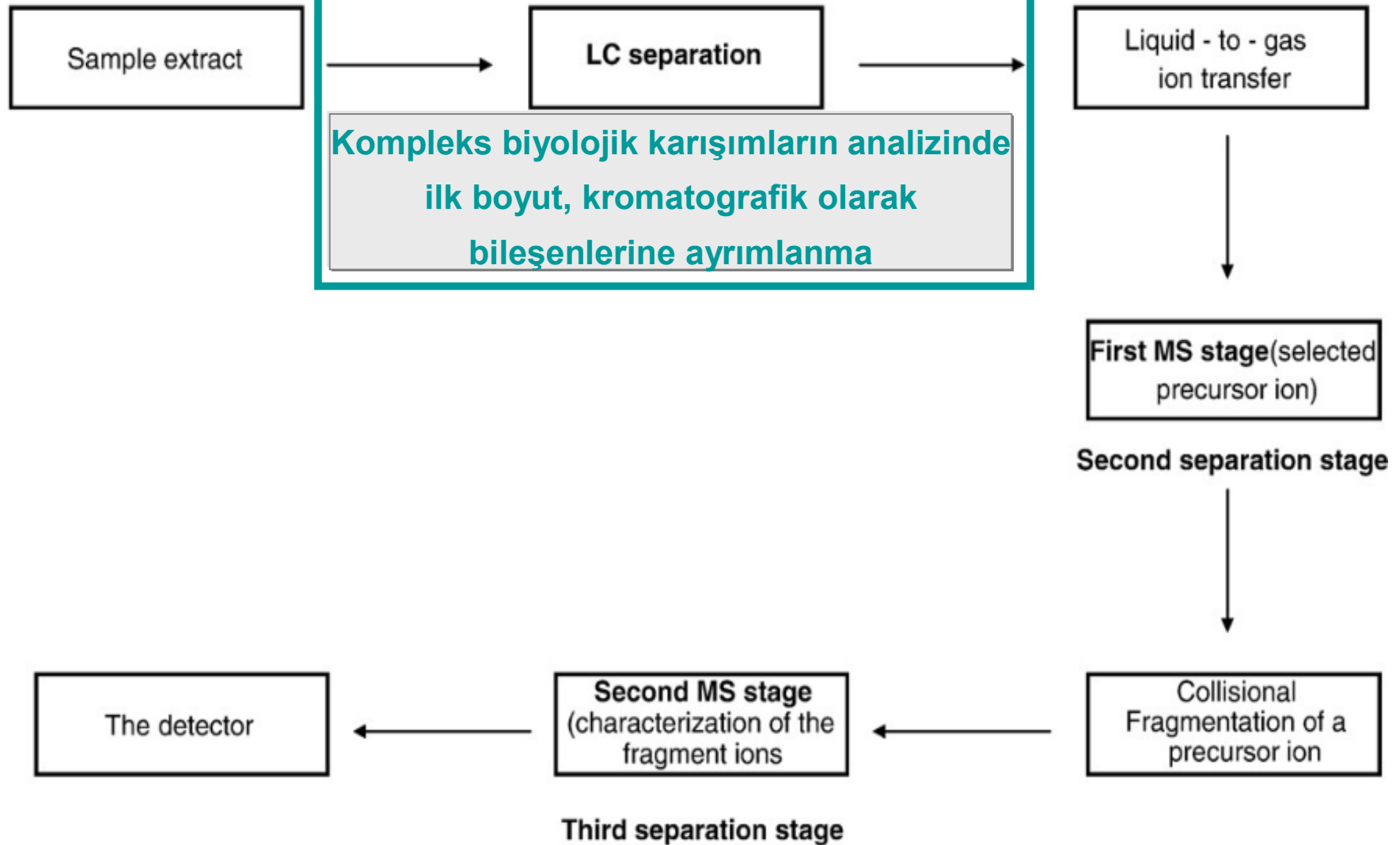


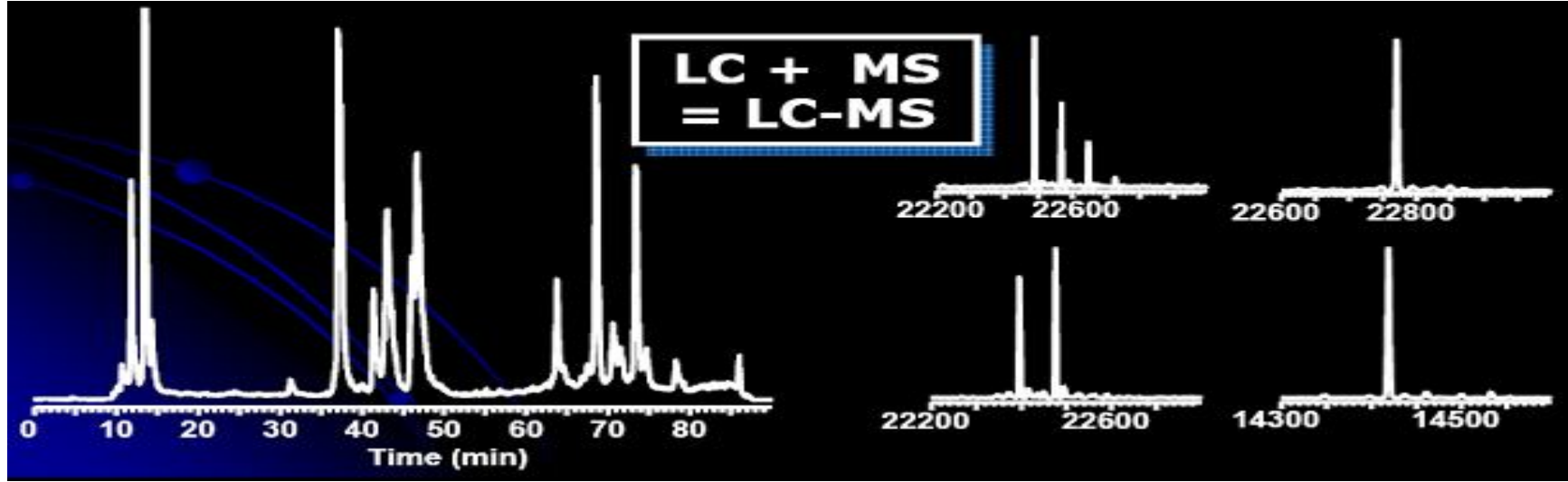


# LC-MS/MS ile özgül ve duyarlı kantitasyonun sırrı ????



# LC-MS/MS ile özgül ve duyarlı kantitasyonun sırrı ????

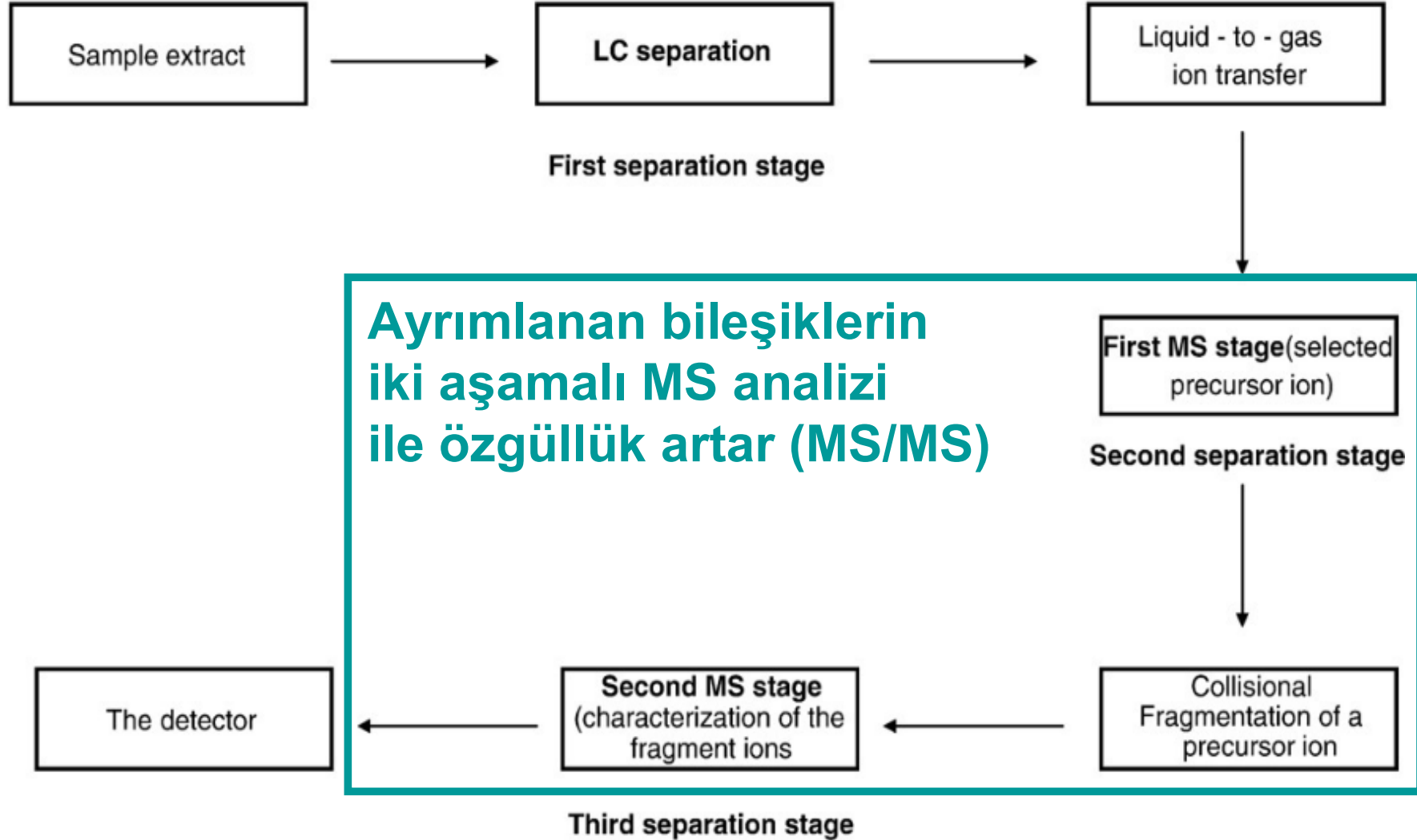




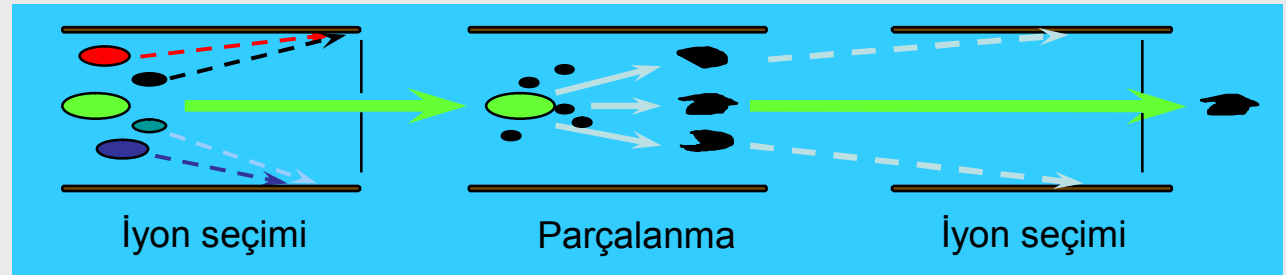
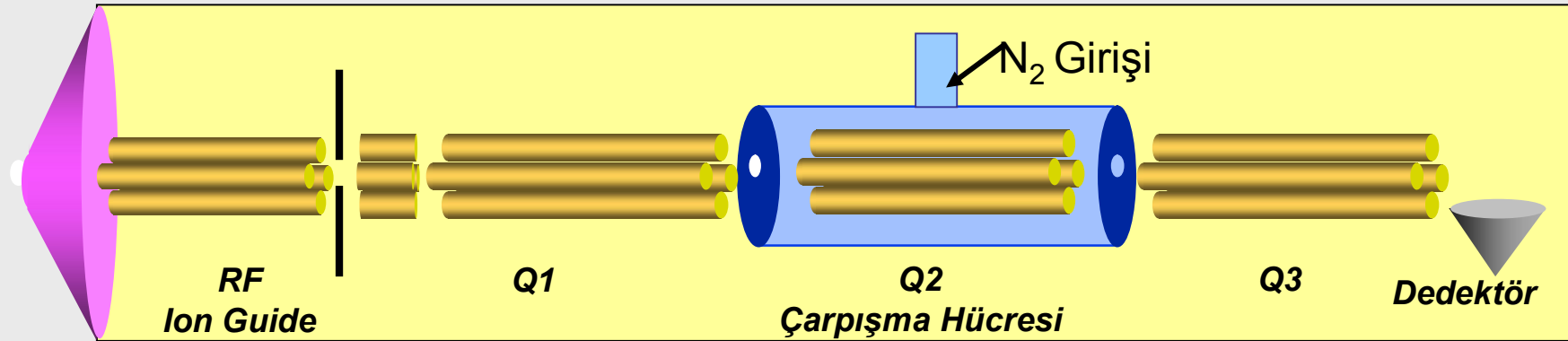
LC-MS de her analit için

1. Retansiyon zamanı
2.  $m/z$  değeri

# LC-MS/MS ile özgül ve duyarlı kantitasyonun sırrı ????



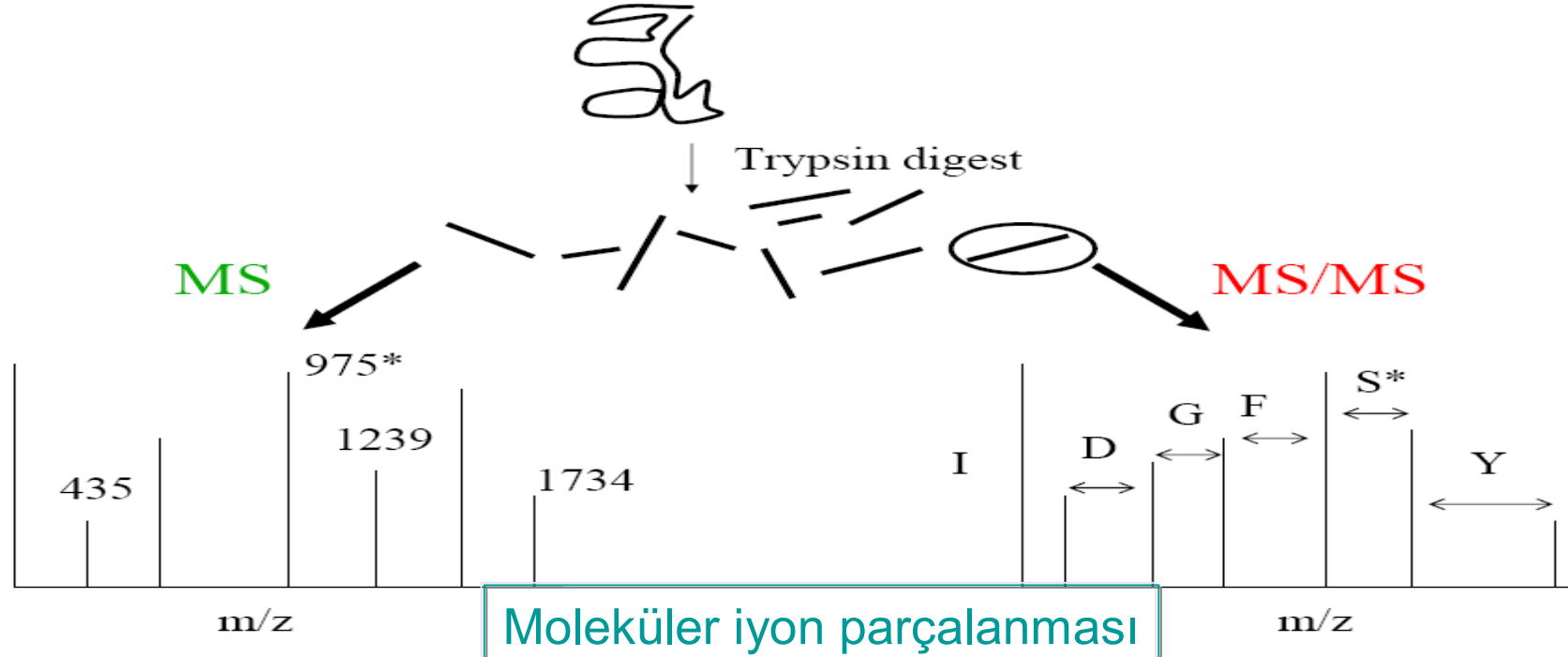
# Tandem MS (MS/MS) (Sıralı Kütle Analizörü)



moleküler iyon/  
precursor ion

ürün iyon/  
product ion

# Neden Tandem MS (MS/MS)



proteinin  
peptidlerinin dizilimi

helyumla  
çarpıştırılarak  
amid  
bağlarının  
kopartılması

peptidin aa dizilimi

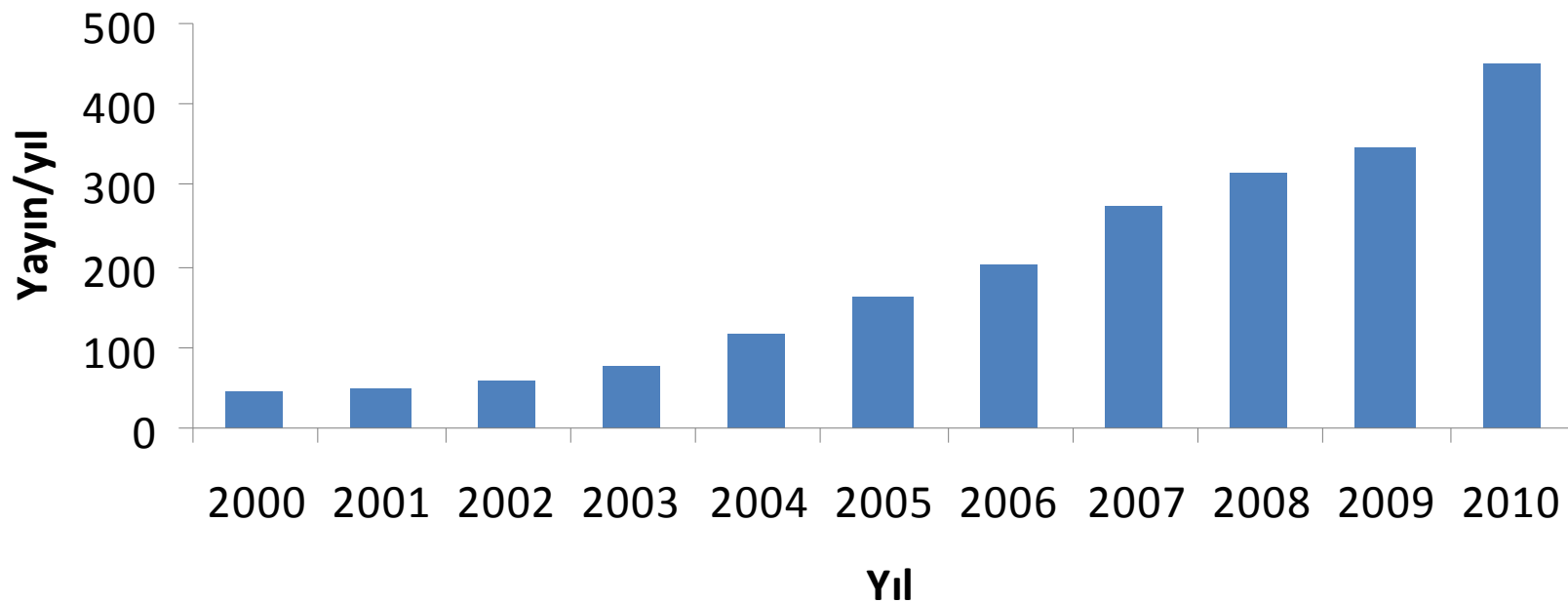
# Multiple Reaction Monitoring (MRM) Çoklu Reaksiyon İzleme

Bileşiklerin **kantitasyonunun** yüksek duyarlılık ve özgüllükte yapıldığı **hedefli** bir tandem MS yöntemi

# PubMed

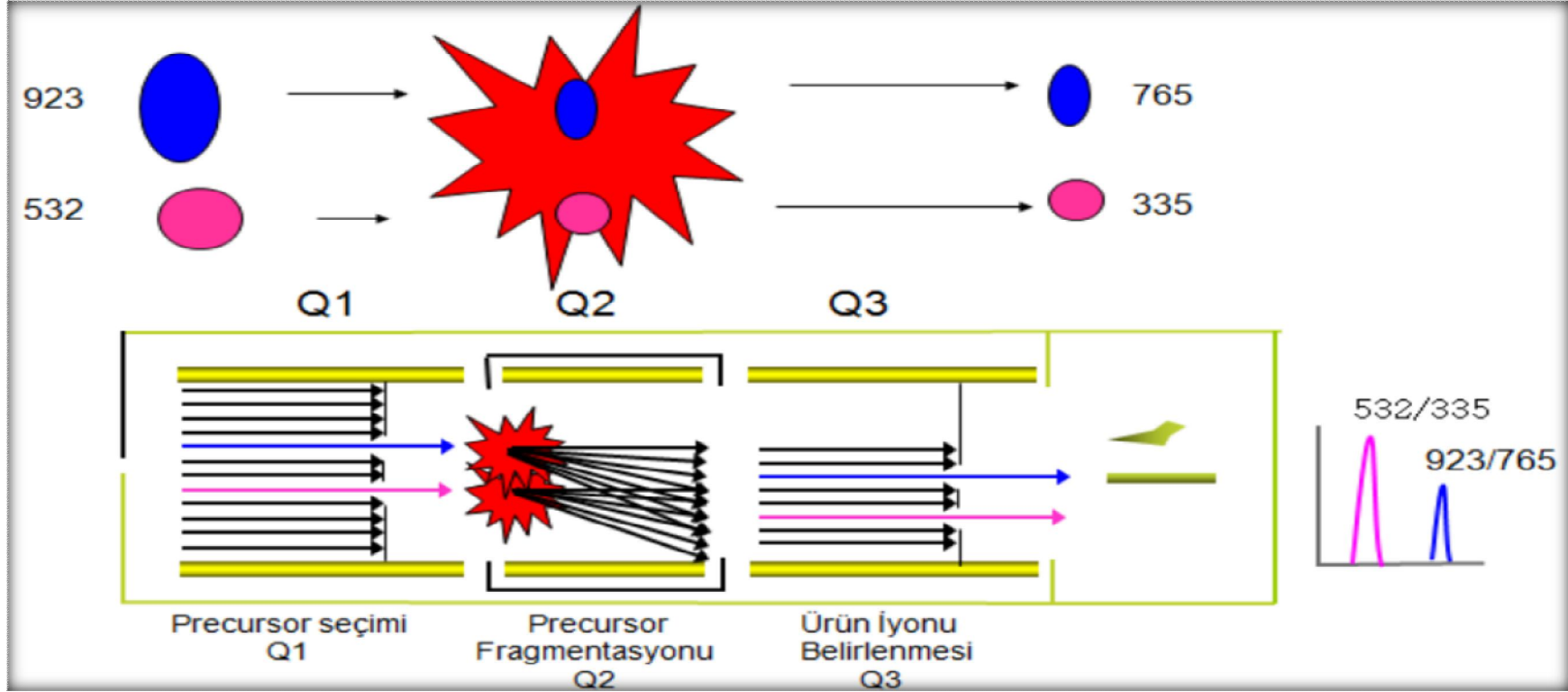
## “MRM” “2000-2010”

### "Multiple Reaction Monitoring"





# Multiple Reaction Monitoring (MRM)



Kantitasyonu yapılacak analit/lere özgü ve daha önceden tanımlanmış m/z değerindeki ana iyon ve fragment iyon ikilisi (transition) izlenir.

# Multiple Reaction Monitoring (MRM)

- ❑ Ana iyon ile fragman ion çifti olarak adlandırılan “transition” kantite edilecek analite spesifik olup, bir ya da daha fazla ürün iyon çifti izlenerek spesifite artırılmış olur.
- ❑ MS analizi süresince tüm m/z değerlerini taramak yerine sadece belirli m/z aralıklarına odaklanılır ve diğerleri göz ardı edilir.
- ❑ Bir dizi transition ile birlikte hedef analitin tam retansiyon zamanı birleşince kesin bir ölçüm olur.
- ❑ Tek bir LC- MS/MS deneyi sırasında birden çok analitin ölçümü mümkündür.

# Çoklu Reaksiyon İzleme-MRM

SRM

$889.45\ m/z \rightarrow 504.25\ m/z$

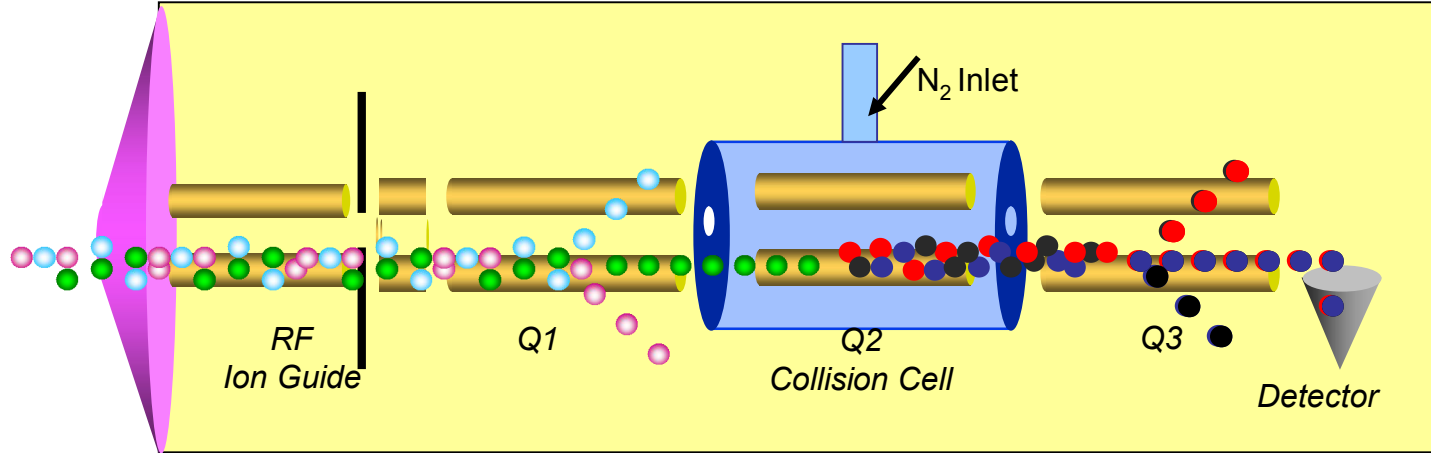
MRM

$889.45\ m/z \rightarrow 504.25\ m/z$

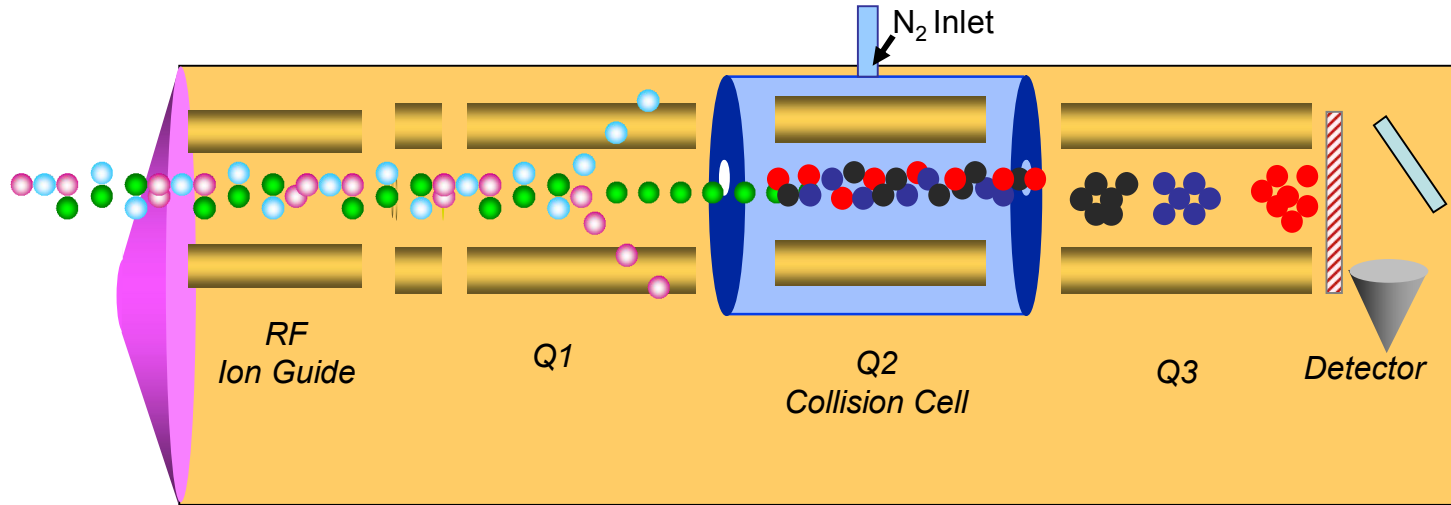
$889.45\ m/z \rightarrow 386.20\ m/z$

$889.45\ m/z \rightarrow 761.39\ m/z$

# Triple Quadrupole MS/MS

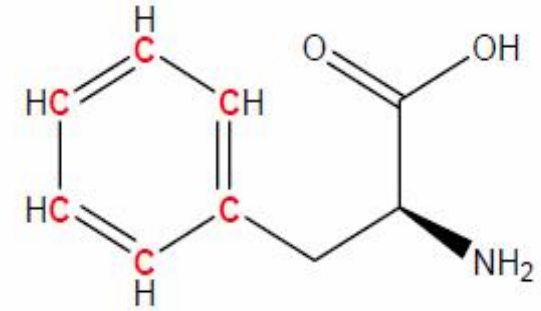


# Triple Quadrupole Ion Trap MS/MS

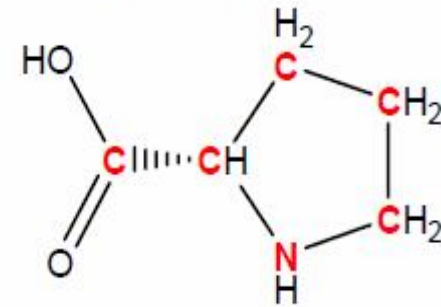


# İzotop İşaretli İnternal Standart

- MS öncesi (ekstraksiyon, HPLC enjeksiyonu...)
- MS koşullarındaki değişiklikleri standardize etmek ve kesin, tekrarlanabilir sonuçlar için



<sup>13</sup>C<sub>6</sub>-Phenylalanine, Δ 6 Da



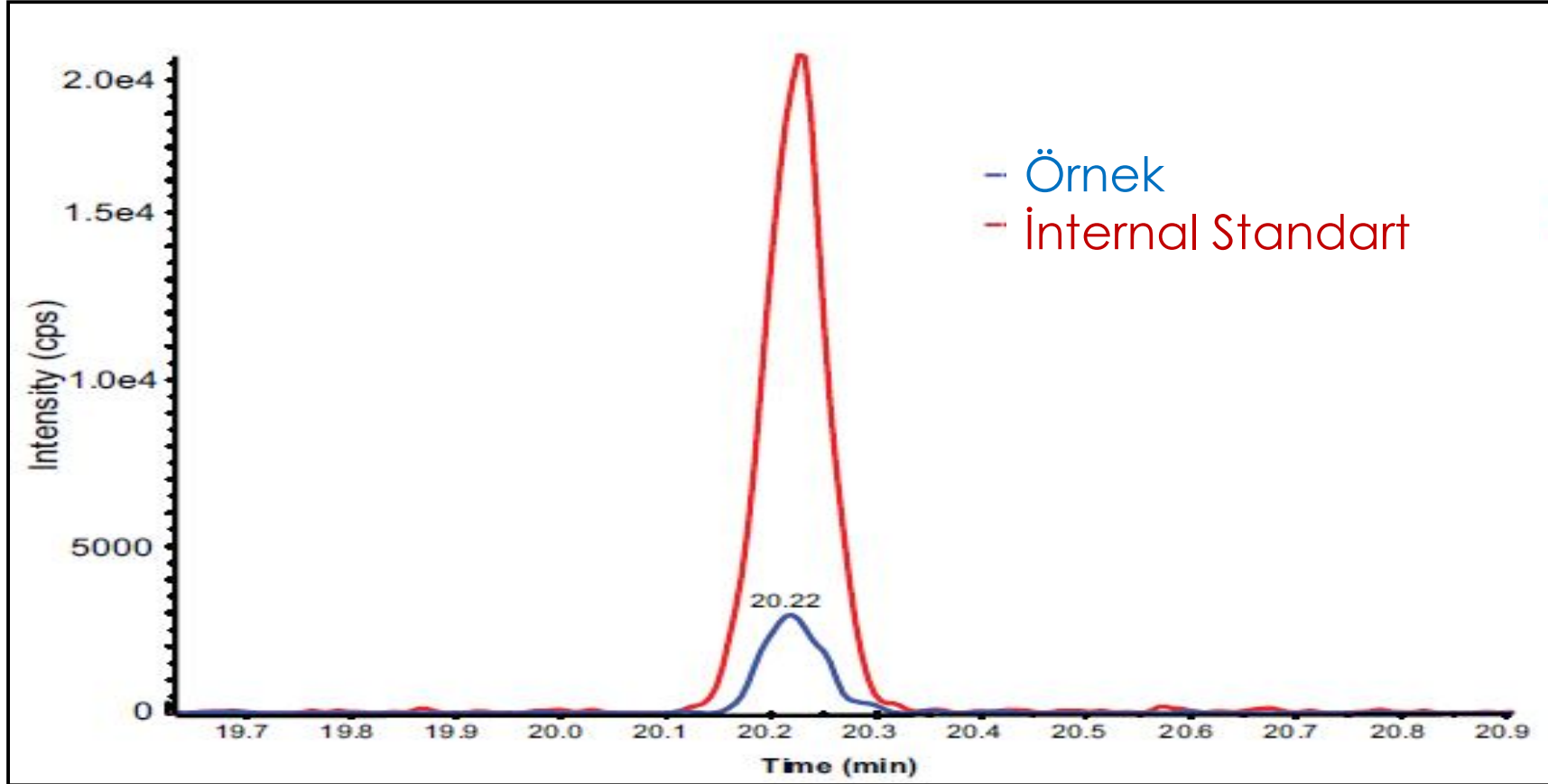
<sup>13</sup>C<sub>5</sub><sup>15</sup>N-Proline, Δ 6 Da

# İnternal Standart Özellikleri

Hedef analit ile

- kimyasal özellikleri
- kromatografik ayırılma özelliği
- iyonizasyon etkinliği
- fragment iyon dağılımı aynı olmalıdır.
- Tek farkı analitten daha ağır kütleye sahip olmasıdır.

# MRM Yöntemiyle Kantitasyon



$$\frac{(\text{örnek pik alanı})}{(\text{internal standart pik alanı})} \times (\text{internal standart konsantrasyonu})$$

**MRM-LC-MS/MS ile  
Kantitasyon Alanları**



# İlaç Düzeyi Belirlenmesi

## Adli Toksikoloji

- ❑ Tedavi etkinliğinin, tedaviye uyumun ve ilaca bağlı toksisitenin belirlenmesi amacıyla biyolojik sıvılarda ilaç düzeylerinin ölçümü
- ❑  $\mu\text{L}$  örnek hacimlerinde ng, pg düzeyinde duyarlılıkta ölçüm
- ❑ antiepileptik ilaçlar  
kardiyoaktif ilaçlar  
bronkodilatörler  
antibiyotikler  
antiretroviral ilaçlar  
antipsikotikler  
antimetabolitler  
immunsupresan ilaçlar vb.  
alkol  
illegal ilaç ve metabolitleri



# Yeni Dođan Metabolik Hastalıkları

## Yeni doğan metabolik hastalıklarının taramasında (NBS)

- Amino asit analizleri
- Yađ asidi oksidasyon defektlerinde karnitin, açil karnitin
- Organik asidemi, asidürilerde organik asitler

## Doğrulama

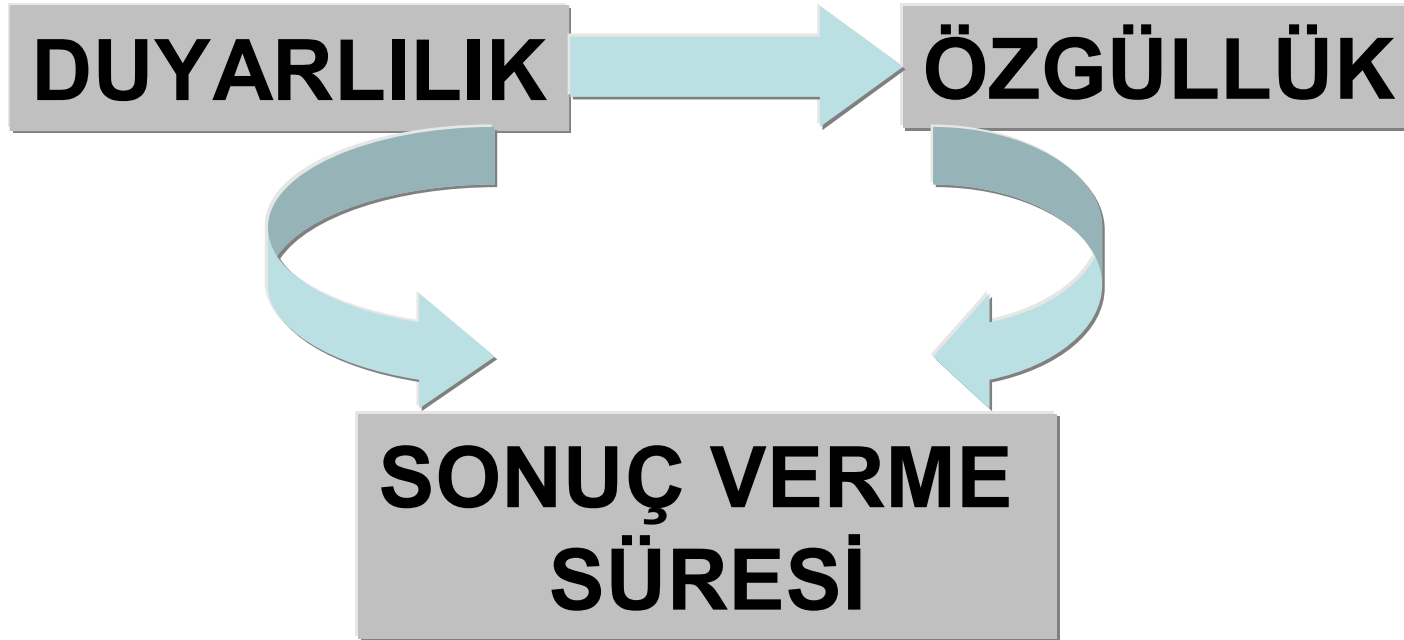
- Tirozinemi I:Tirozin
- Propionik asidemi:3-OH-propionik asit
- Metil malonik asidemi:MMA
- MSUD:Dallı aa lerin analizi
- CAH:17 OH progesteron
- Lizozomal depo hastalıkları:Enzim substrat reaksiyon ürünü

# Hormon/Vitamin/Biyolojik Amin Analizleri

- ❑ Steroid hormonlar
  - Östrojen (E1ve E2)
  - Kortizol
  - Testosteron
  
- ❑ 25-hidroksi vitamin D
  - HPLC-UV, HPLC-EC
  - RIA
  - Otomatize kemilüminesans immunoasaay
  
- ❑ College of American Patologists LC-MS/MS i referans yöntem olarak önerdi
  
- ❑ NIST kalite kontrol materyali (SRM 972)  
  
(25OHD<sub>2</sub> ve 25OHD<sub>3</sub> ve 3-epi izomerleri)

•Grebe and Sngh Clin. Biochem Rev Feb 2011 Mayo Clinic

**Klinik Laboratuvarda LC-MS/MS  
Diğer Yöntemler (İmmun Ölçüm-HPLC-GCMS)  
ile Karşılaştırıldığında**



# Klinik Laboratuvarda LC-MS/MS Diğer Yöntemler ile Karşılaştırıldığında

## Otomatize immün ölçüm yöntemleri

- ❑ Sonuç verme süresi kısa
- ❑ Sınırlı manuel işlem gerekliliği
- ❑ Özellikle düşük konsantrasyonlarda analitik spesifitesi yetersizliği
- ❑ Sınırlı dinamik aralık
- ❑ Monoklonal antikor gerekliliği
- ❑ Tekrarlanabilirlik yetersizliği
- ❑ Yüksek reaktif maliyeti
- ❑ Radyoaktif atık uzaklaştırılması, uzun inkübasyon süresi, çapraz reaktiviteyi engellemek için organik ekstraksiyon/kromatografi gerekliliği (RIA)

## GC-MS ve HPLC

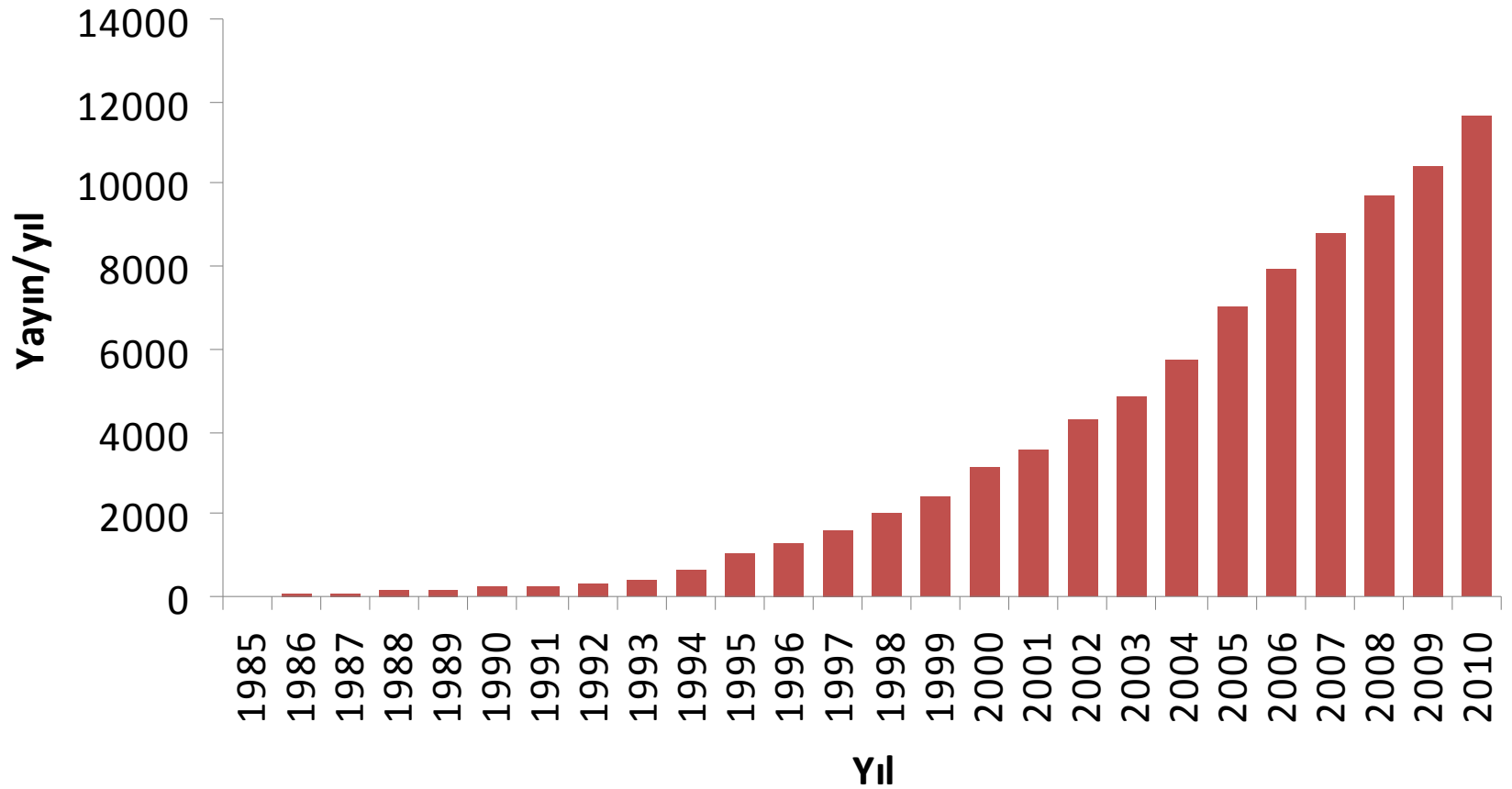
- ❑ GC-MS non-polar uçucu ve ısıya dayanıklı metabolit analizinde uygun
- ❑ İş akışının daha uzun (Özellikle GC-MS örnek derivatizasyonu gerektirmesi)
- ❑ Analitik spesifite daha düşük (Özellikle konvansiyonel HPLC)

# LC-MS/MS ile Ölçüm Sınırlılıkları

- ❑ Örnek hazırlığında manuel işlem gerekliliği
- ❑ Analizin kompleksliği, kullanıcı eğitimi, deneyim gerekliliği
- ❑ Cihazın kurulum maliyeti, bakım ve sürdürülebilirliği

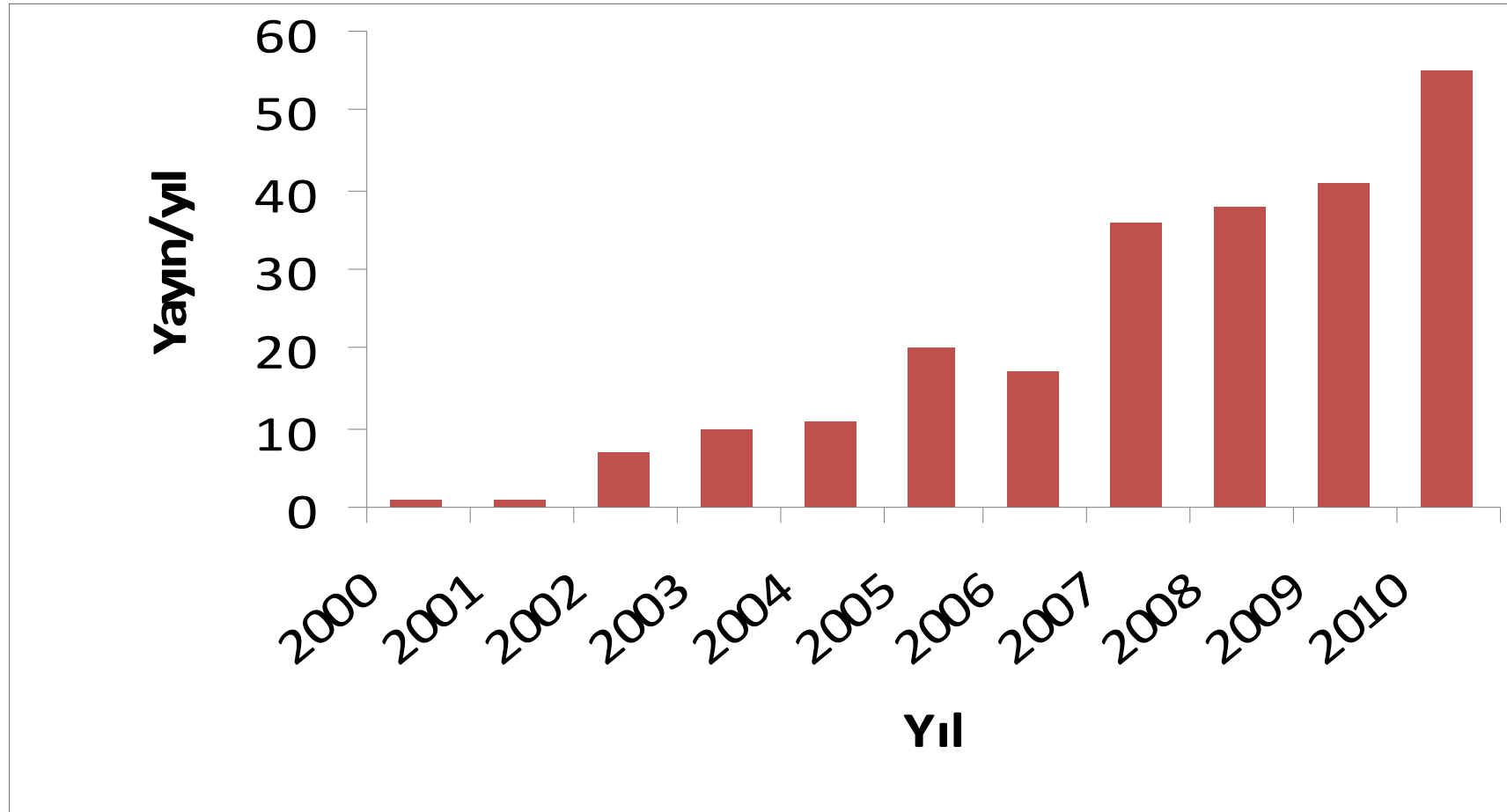


# PubMed “Oxidative stress”





# PubMed “Oxidative stress” “LC-MS/MS”



# Oksidatif stres değerlendirmesinde LC-MS/MS kullanımı

Oksidatif stres biyobelirteęlerinin çoklu kantitasyonunda

- ❑ örnek hazırlık aşamasında kimyasal derivatizasyon işlemine nadiren gerek duyulması
- ❑ n ayırlama işlemleri ve örnek hazırlığı ile ardışık olarak (in-line) kullanılabilmesi
- ❑ yüksek duyarlılık ve özgüllükte analiz

*\*Giustarini, D., et al., Crit Rev Clin Lab Sci, 2009.*

*\*Winnik and Kitchin, Toxicology and Applied Pharmacology, 2008*

# LC-MS/MS ile İzoprostanların Ölçümü

## Lipids

Isoprostanes	Human urine	96 well plate Oasis HLB extraction plate for SPE	Yan et al. (2007)
F2-isoprostanes	Human plasma	Administration of antioxidants and tobacco smoking were studied	Dietrich et al. (2002)
F2-isoprostanes	Human urine	SPE cartridge cleanup (Oasis HLB)	Zhang and Saku (2007)
F2-isoprostanes	Human urine	SPE cartridge cleanup (Sep-pak C18)	Davies et al. (2006)
F2-isoprostanes	Human plasma	SPE (silica Sep-pak), extraction with hexane	Taylor et al. (2006)
Isoprostanes	HepG2 cells	SPE cartridge cleanup (Sep-pak C18)	Milne et al. (2004)
Most of the lipidome	Mouse liver	Chloroform extraction used as cleanup step	Han et al. (2004)

# LC-MS/MS ile Tiyol Biyobelirteçlerin Ölçümü

## General

GSH, GSSG

Whole blood

LC-MS only, N-ethylmaleimide used to derivatize GSH Steghens et al. (2003)

GSH, GSSG

Rat hepatocytes

Iodoacetic acid used to derivatize GSH, ion exchange chromatography Loughlin et al. (2001)

Thiols and carboxymethyl (CM) thiols: cystine, CM-cysteine, homocystine, CM-homocysteine, CM-Cys-Gly, gamma-Glu-(CM)Cys, CM-GSH, GSSG

Mouse liver

Iodoacetic acid used to derivatize GSH Bouligand et al. (2006)

# LC-MS/MS İle Okside Aromatik Amino Asit Ölçümü

## Proteins and amino acids

Protein carbonylation	Mouse brain	100 carbonylated proteins were identified in a proteomic analysis	Soreghan et al. (2003)
Protein carbonylation	Mouse liver and brain	MALDI-TOF and LC-MS/MS	Nabeshi et al. (2006)
Albumin 4-hydroxy-2-nonenal adduct	Human albumin	10 adducts found including histidine and lysine as targets	Szapacs et al. (2006)
<i>o,o'</i> -Dityrosine, <i>m</i> -tyrosine, <i>o</i> -tyrosine, 3-chlorotyrosine, 3-nitrotyrosine	Human urine	Method also determines 8-OHdG	Orhan et al. (2004)
<i>o,o'</i> -Dityrosine, <i>o</i> -tyrosine, <i>o</i> -nitrotyrosine	Cat urine	Butylation of <i>o</i> -tyrosine and <i>o</i> -nitrotyrosine increased MS signal by 6-fold	Marvin et al. (2003)
Sulphonation of cysteine	Human plasma	Cysteine 34 of human albumin is sulphonated	Musante et al. (2006)
Nitrotyrosine	Human exhaled breath condensates	SPE cleanup	Goen et al. (2005)
Nitrotyrosine	Mouse liver	Protein bound nitrotyrosine determined	Ishii et al. (2006)
3-Nitrotyrosine	Human plasma and cerebrospinal fluid	A review article on nitrotyrosine with 8 LC-MS/MS and 111 total references	Ryberg and Caidahl (2007)

# LC-MS/MS ile

## 8-OHdG ve İlişkili DNA Biyobelirteçleri Ölçümü

Oxidative stress parameter	Biological matrix	Sample preparation or other aspects	Reference
<b>DNA</b>			
3-(2-choxy-β-d-erythropentofuranosyl)pyrimidinol[1,2-α]purin-10(3H)one; (M1dG)	Urine	Pharmacokinetic study of the disappearance of M1dG in rats	Otteneder et al. (2006)
Etheno-DNA adducts: epsilonAde, epsilonA, and epsilonC	Human urine	Dietary olive oil study	Hillestrom et al. (2006a)
8-Oxo-guanine (8oxoGua), 8-oxo-guanosine (8oxoGuo), 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8oxodG), and 1,N6-ethenodeoxyadenosine (epsilonA)	Human urine	Administration of free fatty acids to healthy male volunteers	Hillestrom et al. (2006b)
11 total indicators of DNA damage including 8-oxo-7,8-dihydropurine deoxynucleosides, four dinucleoside monophosphates bearing the formamido lesion, a double lesion and four dinucleoside monophosphates having an apurinic site	Mouse fibroblast cells	No SPE step, negative ion mode used	Dawidzik et al. (2003)
Tobacco specific nitrosamine-derived DNA adduct with dG	Human pancreas tissue	SPE cartridge cleanup (strong cation exchange)	Ricicki et al. (2005)
1,N-2-ethenoguanine (1,N-2-ε Gua)	Human urine	SPE (cation exchange), an adduct associated with tobacco smoking	Chen and Chiu (2005)
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine (8-OH-dA), 2-hydroxy-2'-deoxyadenosine (2-OH-dA), thymidine glycol (TG), and 5-hydroxy-methyl-2'-deoxyuridine (HMDU)	Salmon testes DNA	For thymidine glycol the negative ion mode was 100-fold better in signal/noise	Hua et al. (2001)
8-OHdG	Human urine	Method also determines five oxidized tyrosines	Orhan et al. (2004)
8-OHdG	Human urine	SPE cartridge cleanup (isolute Env)	Sabatini et al. (2005)
8-OHdG	Human urine	SPE cartridge cleanup (Sep-pak C18)	Hu et al. (2004)
8-OHdG	Human urine	Study of 85 critically septic patients	Cheng et al. (2007)
8-OHdG	Marine mammal liver and kidney	SPE cartridge cleanup (Sep-pak C18)	Li et al. (2005)
8-OHdG	Urine	Oxidative stress, tobacco smoking	Renner et al. (2000)

# 8-Hidroksi-2'-deoksi-guanozin (8OHdG)

- ❑ Oksidatif DNA hasarının klasik bir biyobelirteçi
- ❑ 8OHdG ölçüm yöntemleri:

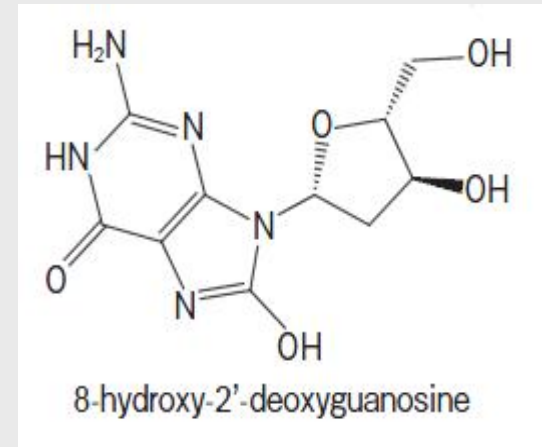
- ❑ HPLC-ECD

- ❑ GC-MS

- ❑ LC-MS

- ❑ Enzimatik teknikler

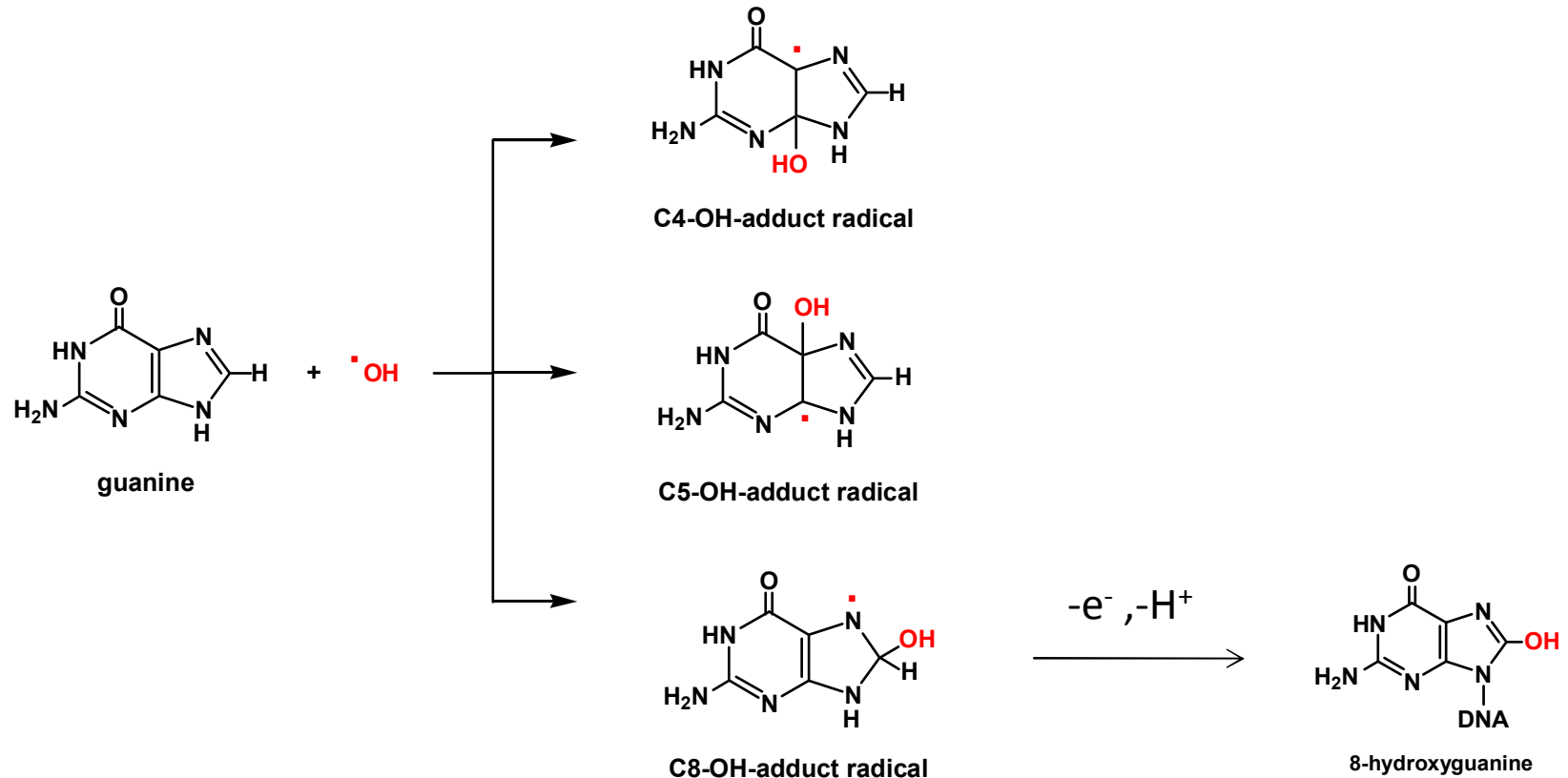
- ❑ LC-MS/MS (Avrupa Oksidatif DNA Hasarı Standartlar Komitesi (ESCODD) önerisi)



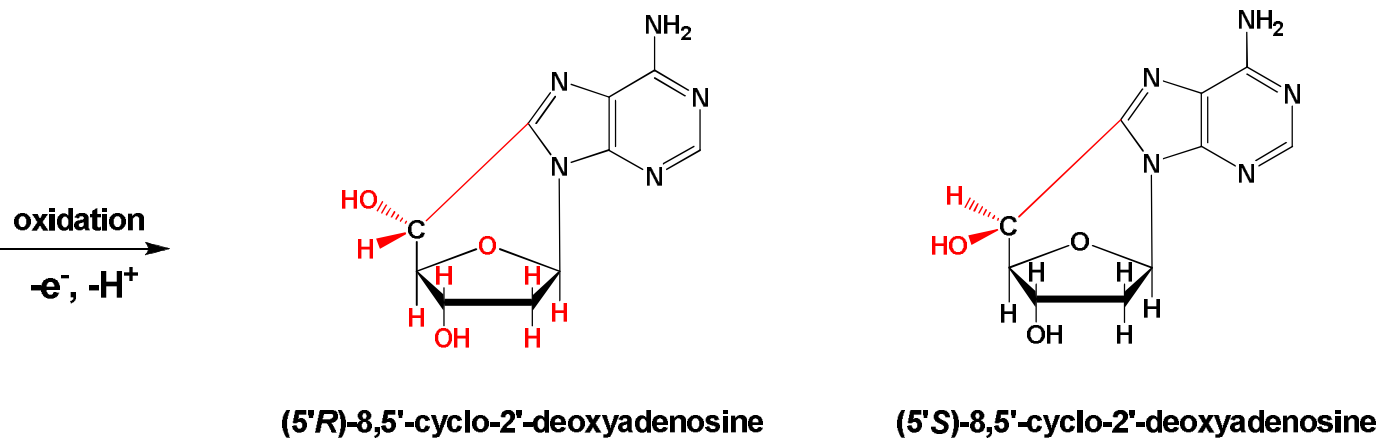
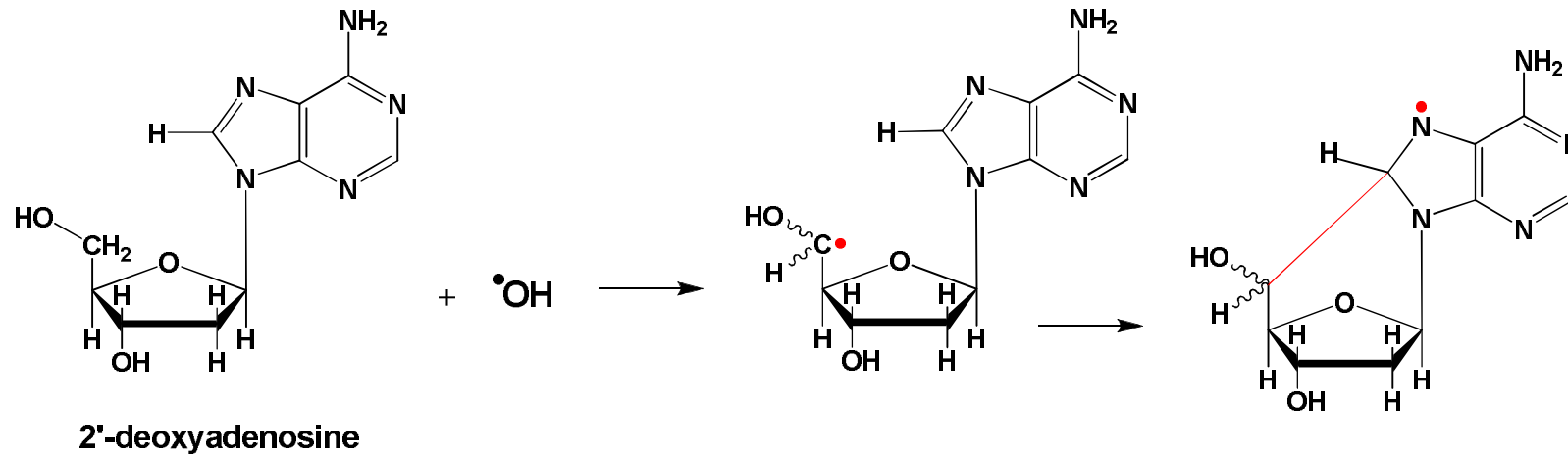
**DNA BAZ HASARI ÖLÇÜMÜ İÇİN  
LC-MS/MS-MRM YÖNTEMİ  
OPTİMİZASYON VE  
GEÇERLİ KILMA ÇALIŞMALARI**



# 8OHdG (8-hidroksi-2' deoksiguanozin)



# ScdA (8,5'-siklo-2' deoksiadenozin )



# **Gereç ve Yöntem**

# LC-MS/MS

- ❑ HPLC (Shimadzu LC-20AD)
- ❑ Triple Quadrupole Ion Trap LC-MS/MS (Applied Biosystems 4000 Q-TRAP)
- ❑ Elektrosprey iyonizasyon (Turbo V iyon kaynağı)
- ❑ MRM-pozitif iyon modu
- ❑ Analyst Software Version 1.5

# LC Koşulları

- ❑ Kolon Özellikleri: RP C18, 2.1 mm x 150 mm, 3.5 µm
- ❑ Guard kolonu: 2.1 mm x 12.5mm, 5 µm
- ❑ Mobil faz: %2 Asetonitril, %95 dH<sub>2</sub>O
- ❑ Akış hızı: 0.3 mL/dk
- ❑ Enjeksiyon hacmi: 10 – 20 µL



# MS Koşulları

## Kaynak bağımlı parametreler

- curtain gas: 10 psi
- ion spray voltage: 5.500 V
- temperature: 500 °C
- ion source gas 1: 50 psi
- ion source gas 2: 50 psi
- duration time: 26 dk



## Bileşik bağımlı parametreler

- DP: 61
- EP: 10
- CE: 25
- CXP: 10
- dwell time: 150 ms

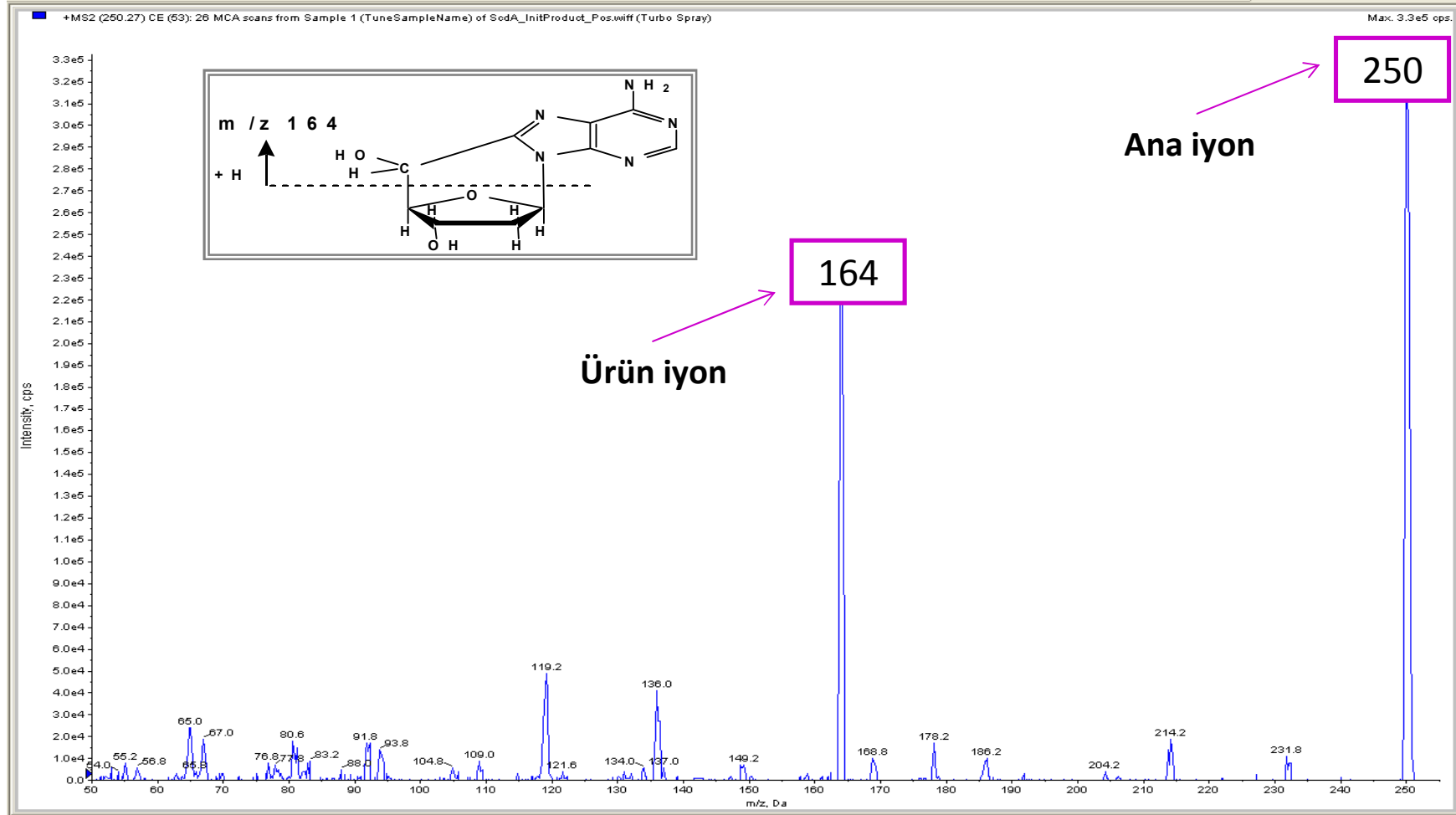
# MRM Ana İyon/Ürün İyon Çiftleri

	MRM Transition (m/z)	Retansiyon Zamanı (dk)
ScdA	250/164	4.7
ScdA <sup>15</sup> N <sub>5</sub>	255/169	4.7
8OHdG	284/168	5.3
8OHdG <sup>15</sup> N <sub>5</sub>	289/173	5.3

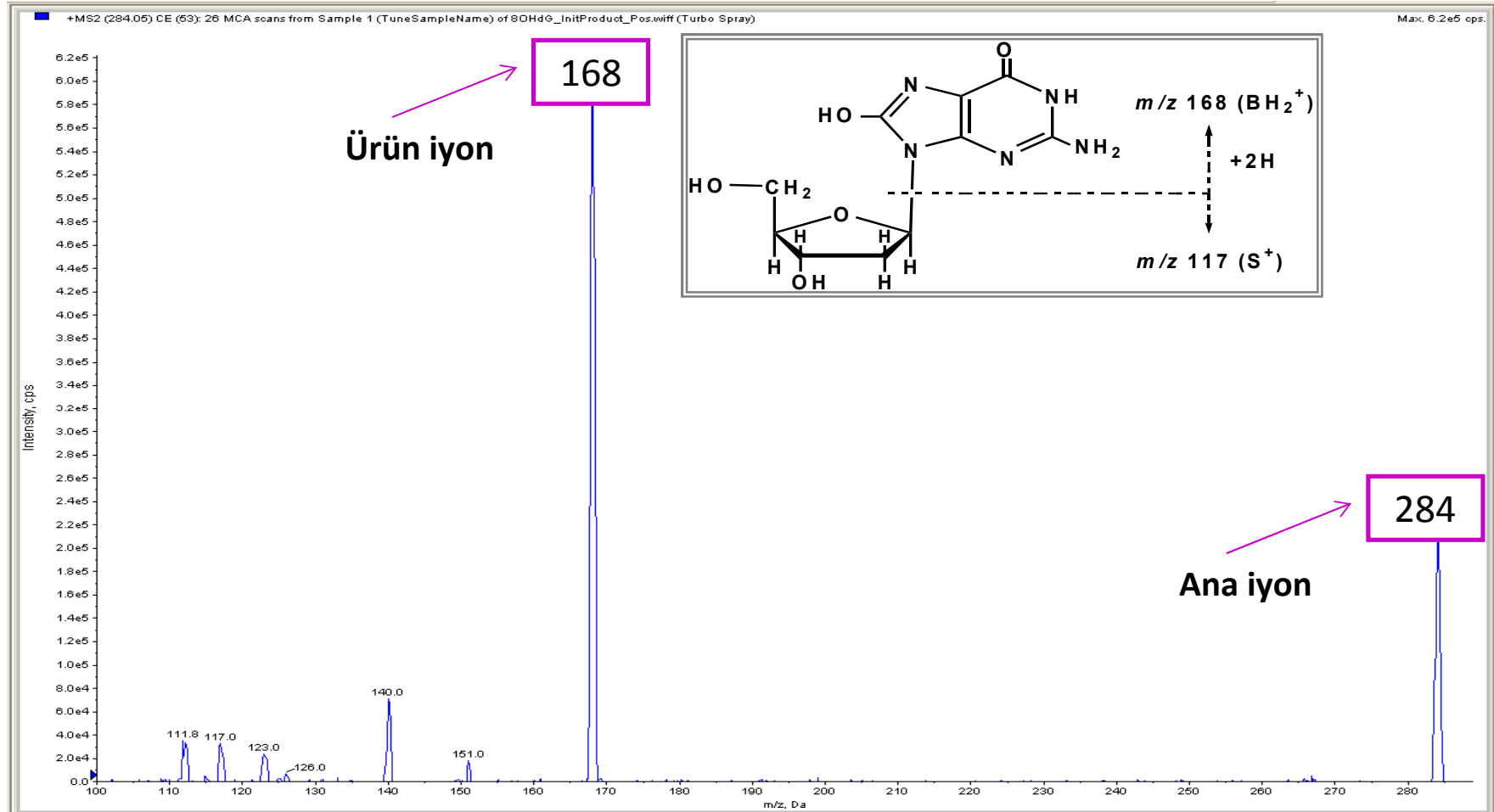
# Sonuçlar



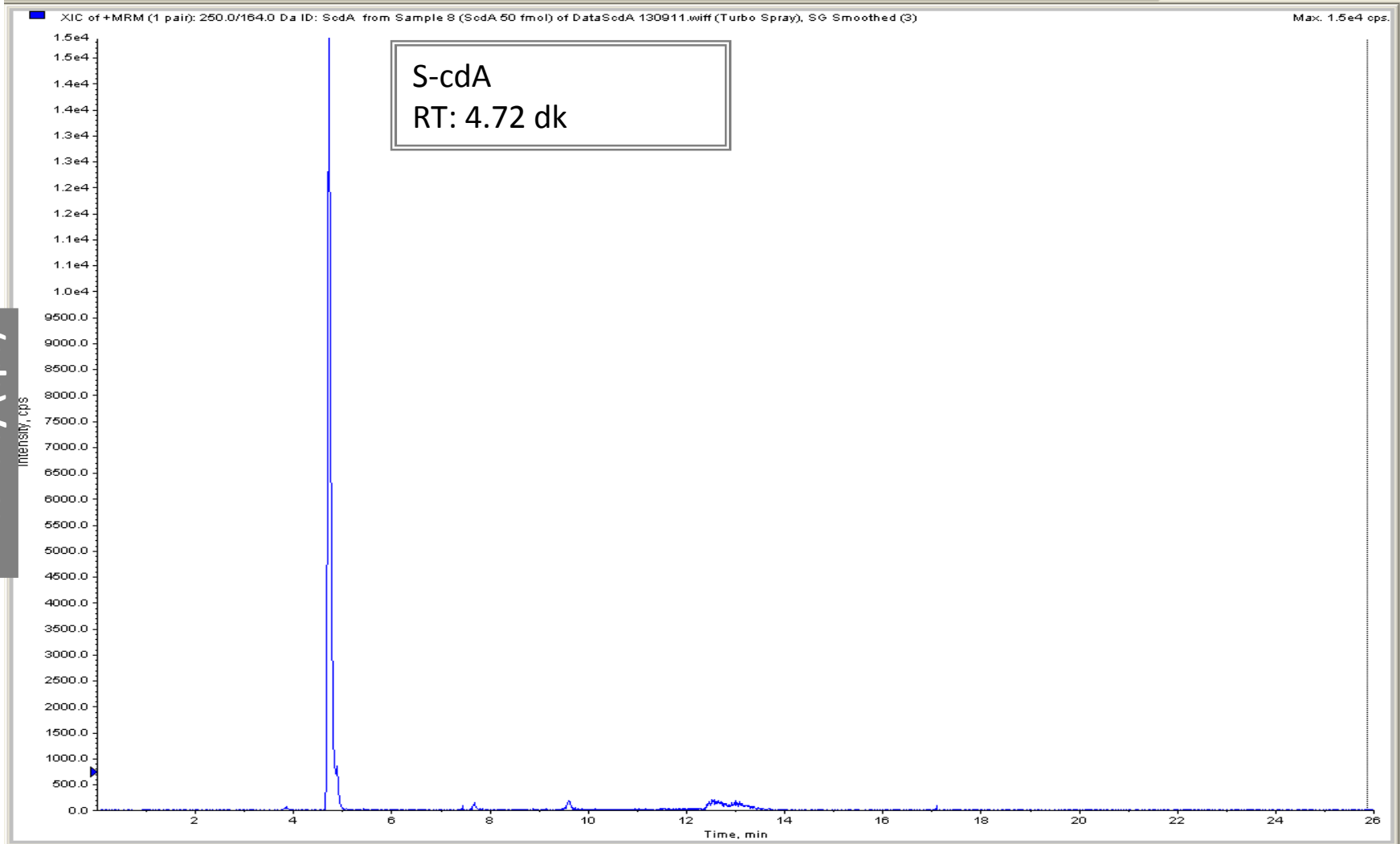
# S-cdA Fragmantasyonu



# 8-OH-dG Fragmentasyonu



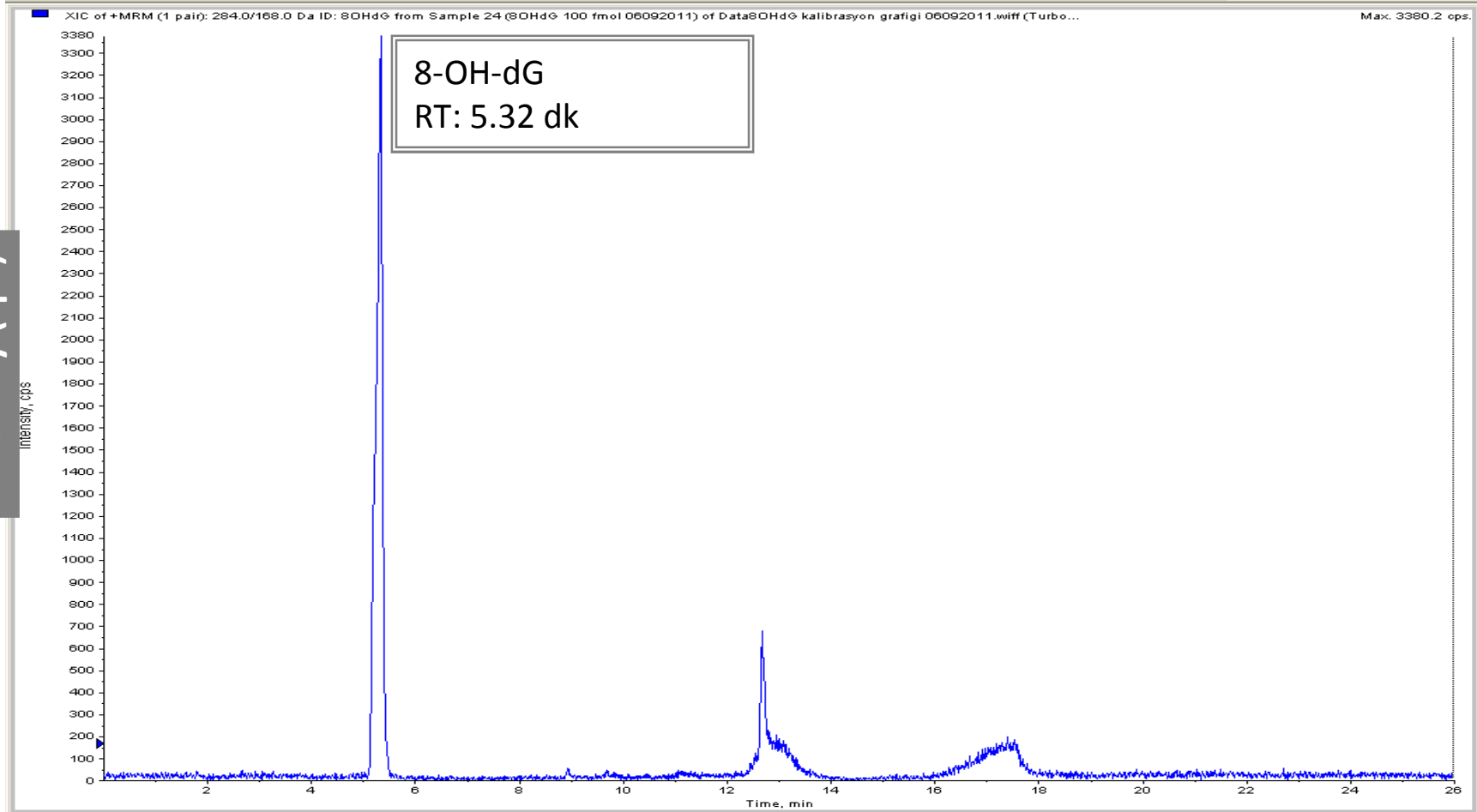
# S-cdA İyon Kromatogramı (0-26 dk)



Intensity (cps)

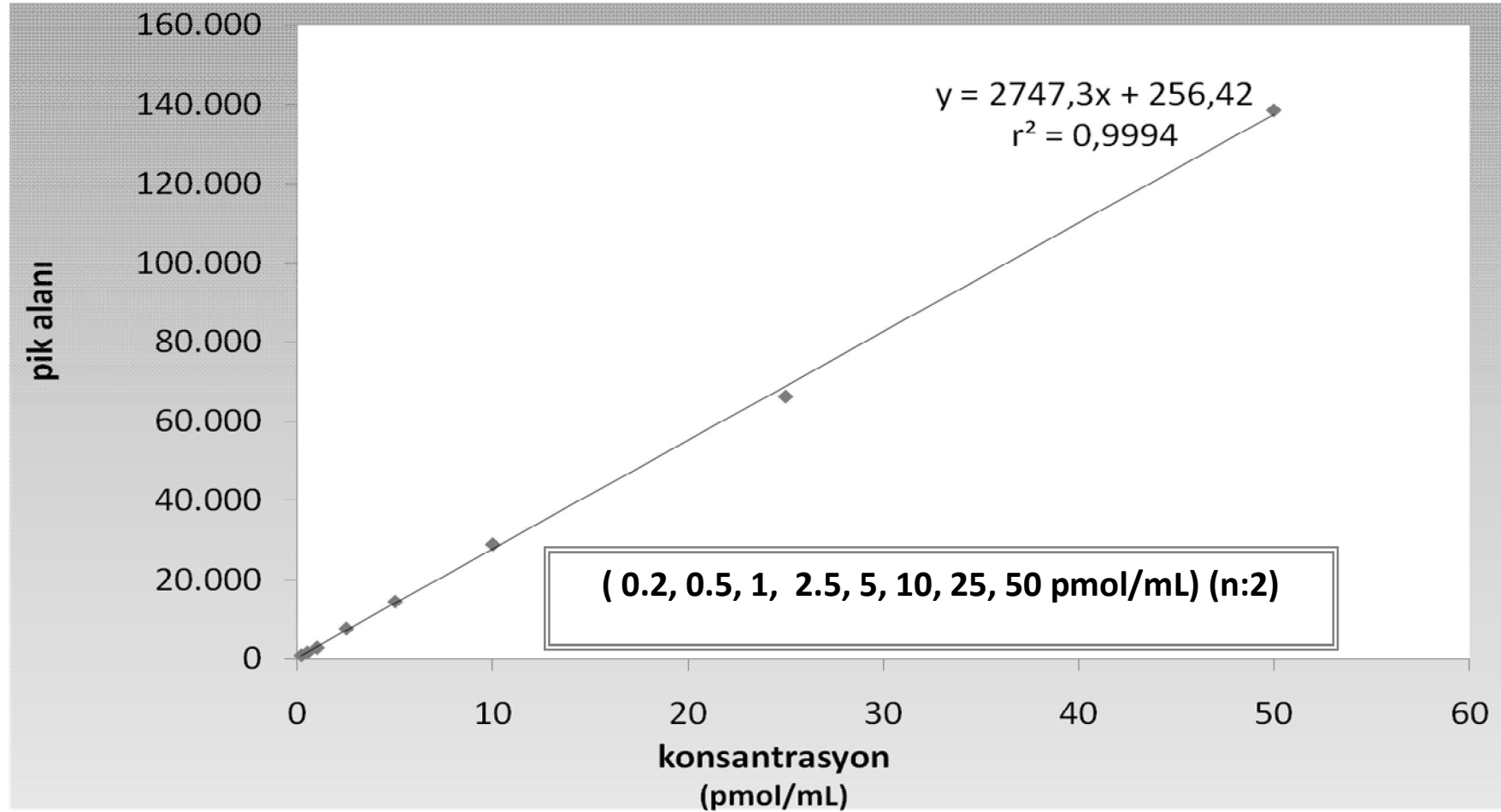
Retansiyon zamanı (dk)

# 8-OH-dG İyon Kromatogramı (0-26 dk)

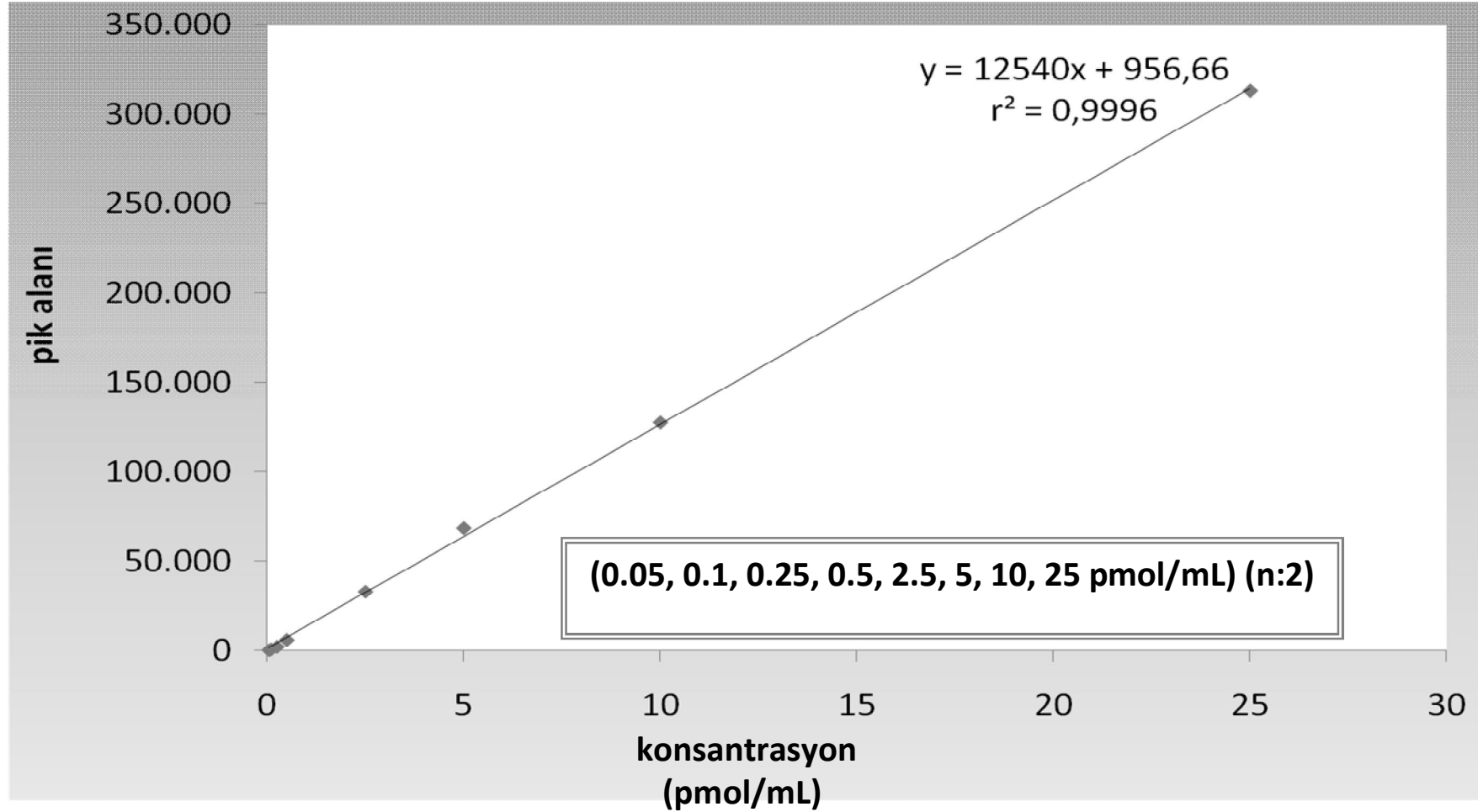


Retansiyon zamanı (dk)

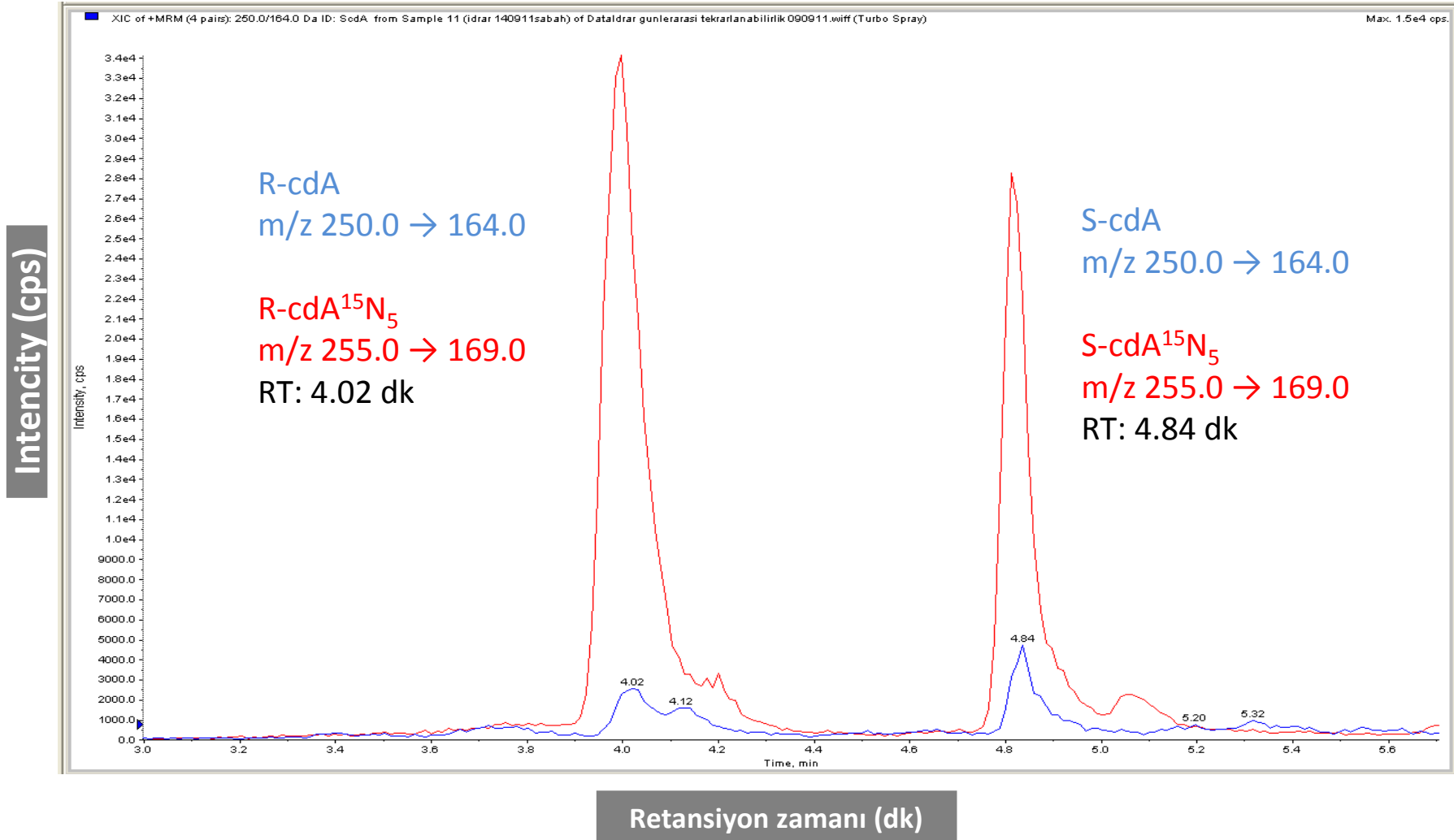
# 8-OH-dG Standart Grafiđi



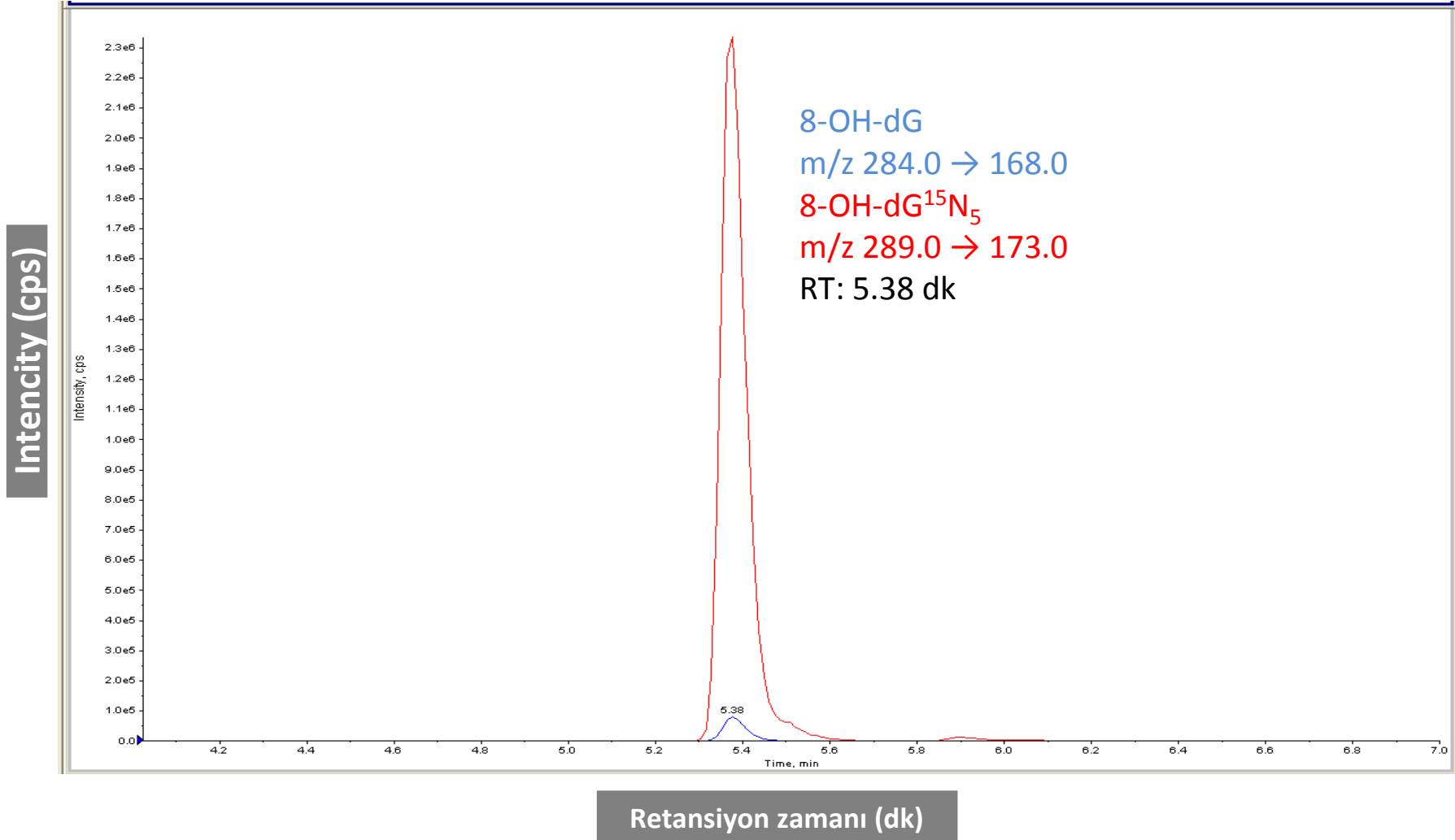
# ScdA Standart Grafiđi



# İdrar S-cdA İyon Kromatogramı



# İdrar 8-OH-dG İyon Kromatogramı





# Gün-içi Tekrarlanabilirlik

	Ortalama (pmol/mL) ( <i>n</i> =10)	SD	% CV
<b>S-cdA</b>	0,25	0,0121	4,94
<b>8-OH-dG</b>	0,20	0,0106	5,24

---

# Günler-arası Tekrarlanabilirlik

	Ortalama (pmol/mL) ( <i>n</i> =10)	SD	% CV
<b>S-cdA</b>	0,15	0,0137	9,25
<b>8-OH-dG</b>	0,14	0,0031	2,31

---

**En Düşük Tespit Limiti (LOD)**  
**En Düşük Kantitasyon Limiti (LOQ)**

	<b>LOD</b>	<b>LOQ</b>
<b>S-cdA</b>	1,1x10 <sup>-3</sup> pmol/mL (S/N =3.5)	4,4x10 <sup>-3</sup> pmol/mL (S/N=12.6)
<b>8-OH-dG</b>	1.8x10 <sup>-4</sup> pmol/mL (S/N=3.6)	5,8x10 <sup>-4</sup> pmol/mL (S/N =11)

---

# İnternal Standart Kullanarak İdrar Örneklerinde S-cdA Kantitasyonu

İdrar Örneği	S-cdA Ana İyon 164	S-cdA <sup>15</sup> N <sub>5</sub> Ana İyon 169	164/169	*S-cdA (pmol/mL)	S-cdA (nmol/L)	Kreatinin (mmol/L)	S-cdA (nmol/mmol kreatinin)
1.Örnek	14000	53300	0,26	0,24	0,24	6,26	0,04
2.Örnek	18500	130000	0,14	0,13	0,13	14,23	0,01
3.Örnek	16900	42100	0,40	0,37	0,37	18,25	0,02
4.Örnek	23700	138000	0,17	0,16	0,16	3,56	0,04

$$*S-cdA \text{ (pmol/mL)} = (0,26)^a \times (0.076 \text{ mM})^b \times (24\mu\text{L})^c \times (1000)^d / (2000)^e$$

**a:** 164/169 pik alanlarının oranı

**b:** İnternal standart konsantrasyonu

**c:** Eklenen internal standart miktarı

**d:**  $\mu\text{L}$ 'den mL'ye dönüşüm faktörü

**e:** İnternal standart dilüsyon faktörü

# İnternal Standart Kullanarak İdrar Örneklerinde 8-OH-dG Kantitasyonu

İdrar Örneği	8-OH-dG Ana İyon 168	8-OH-dG <sup>15</sup> N <sub>5</sub> Ana İyon 173	168/173	*8-OH-dG (pmol/mL)	8-OH-dG (nmol/L)	Kreatinin (mmol/L)	8-OH-dG nmol/ mmoL kreatinin
1.Örnek	108000	2380000	0,05	0,20	0,20	6,26	0,03
2.Örnek	398000	5320000	0,07	0,33	0,33	14,23	0,02
3.Örnek	284000	2910000	0,10	0,43	0,43	18,25	0,02
4.Örnek	359000	9110000	0,04	0,17	0,17	3,56	0,05

$$*8\text{-OH-dG (pmol/mL)} = (0,05)^a \times (0.092 \text{ mM})^b \times (2.4\mu\text{L})^c \times (1000)^d / (50)^e$$

**a:** 168/173 pik alanlarının oranı

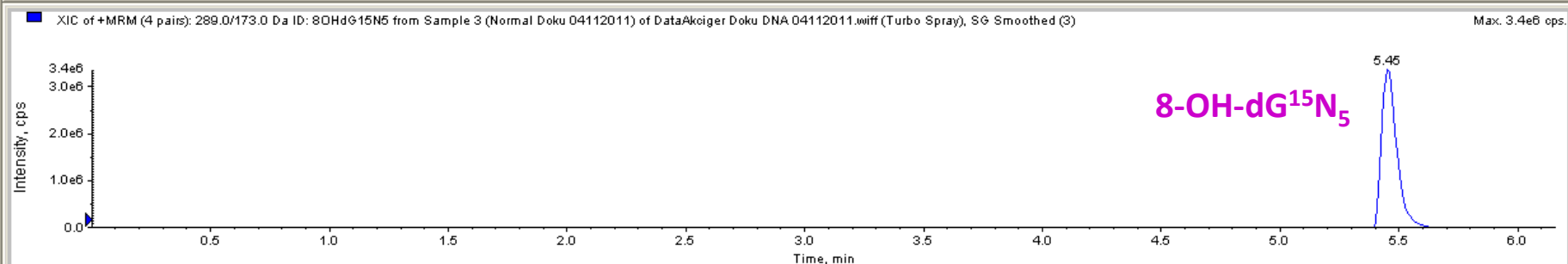
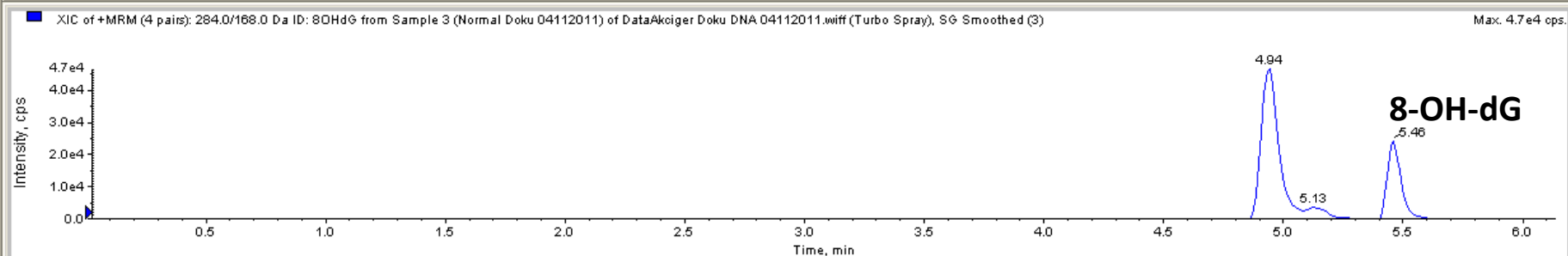
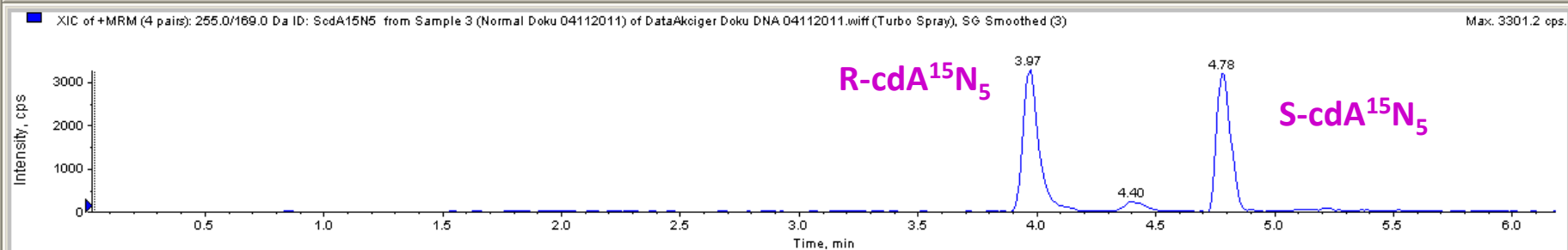
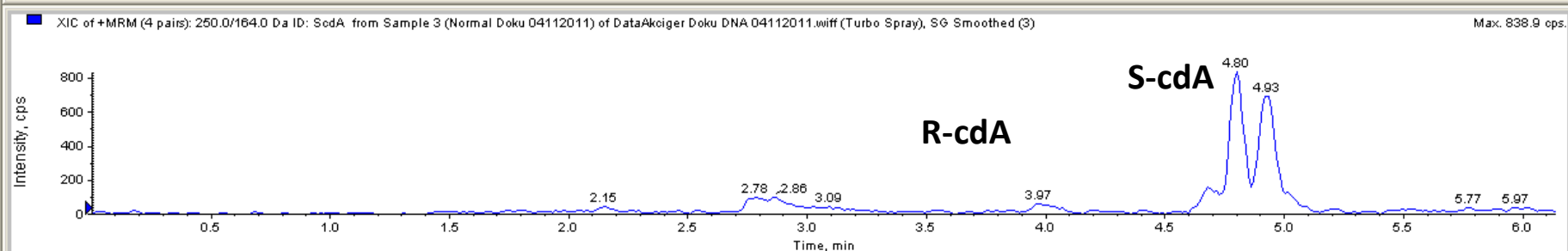
**b:** İnternal standart konsantrasyonu

**c:** Eklenen internal standart miktarı

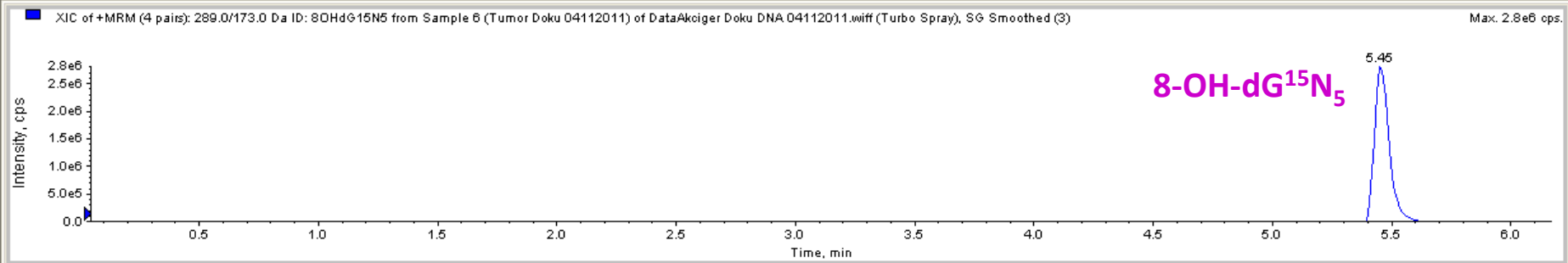
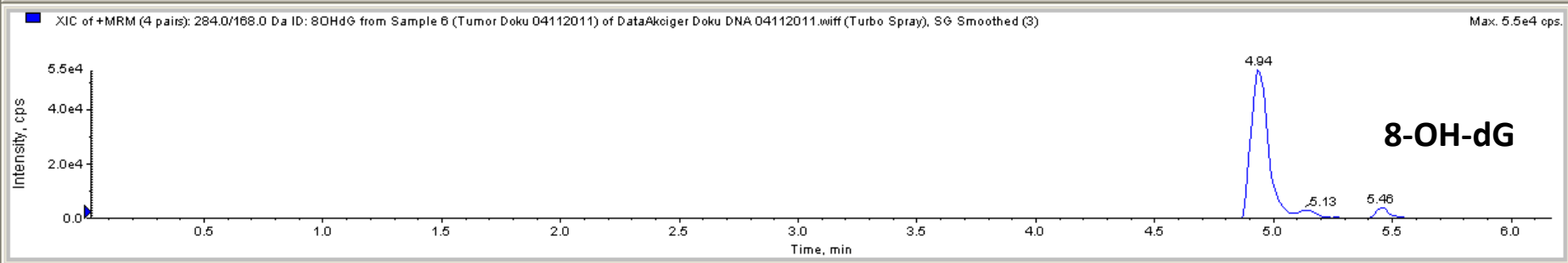
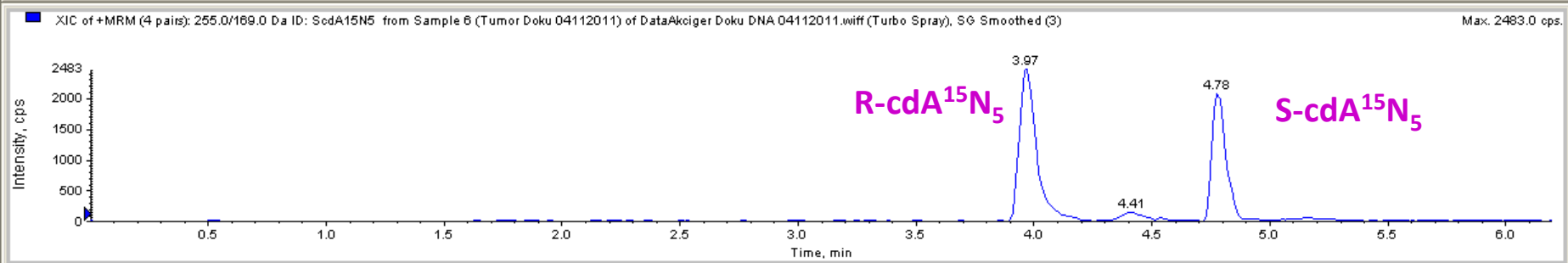
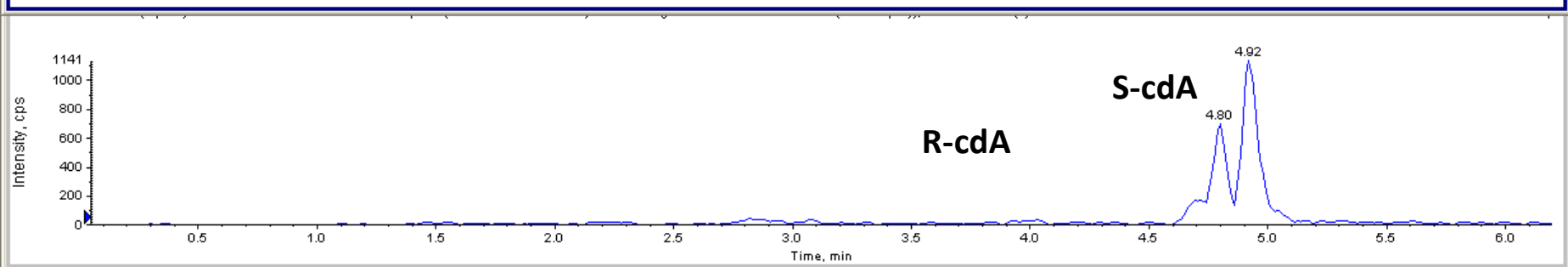
**d:**  $\mu\text{L}$ 'den mL'ye dönüşüm faktörü

**e:** İnternal standart dilüsyon faktörü

# Normal Akciğer Dokusunda S-cdA ve 8-OH-dG



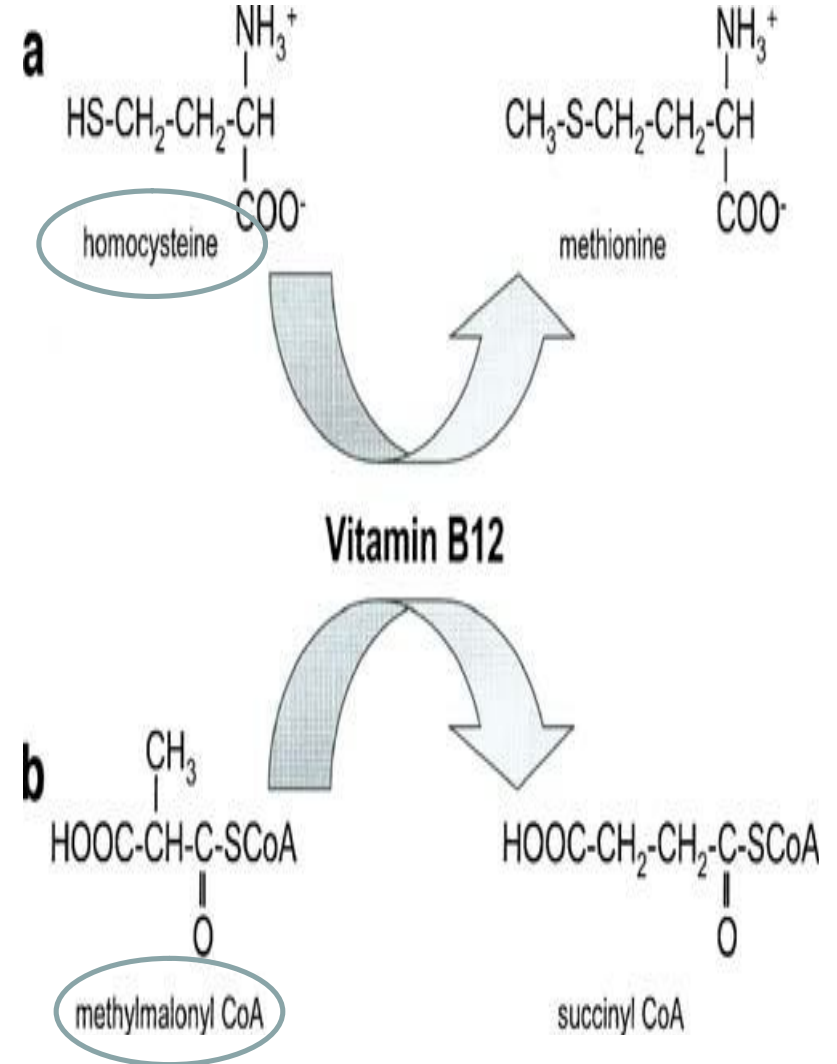
# Tümörlü Akciğer Dokusunda S-cdA ve 8-OH-dG



AKCİĞER KANSERİNDE  
OKSİDATİF HASARIN  
DOKU VE İDRARDA  
DNA BAZ HASARI VE 8-İZOPROSTAN  
DÜZEYLERİ İLE GÖSTERİLMESİ



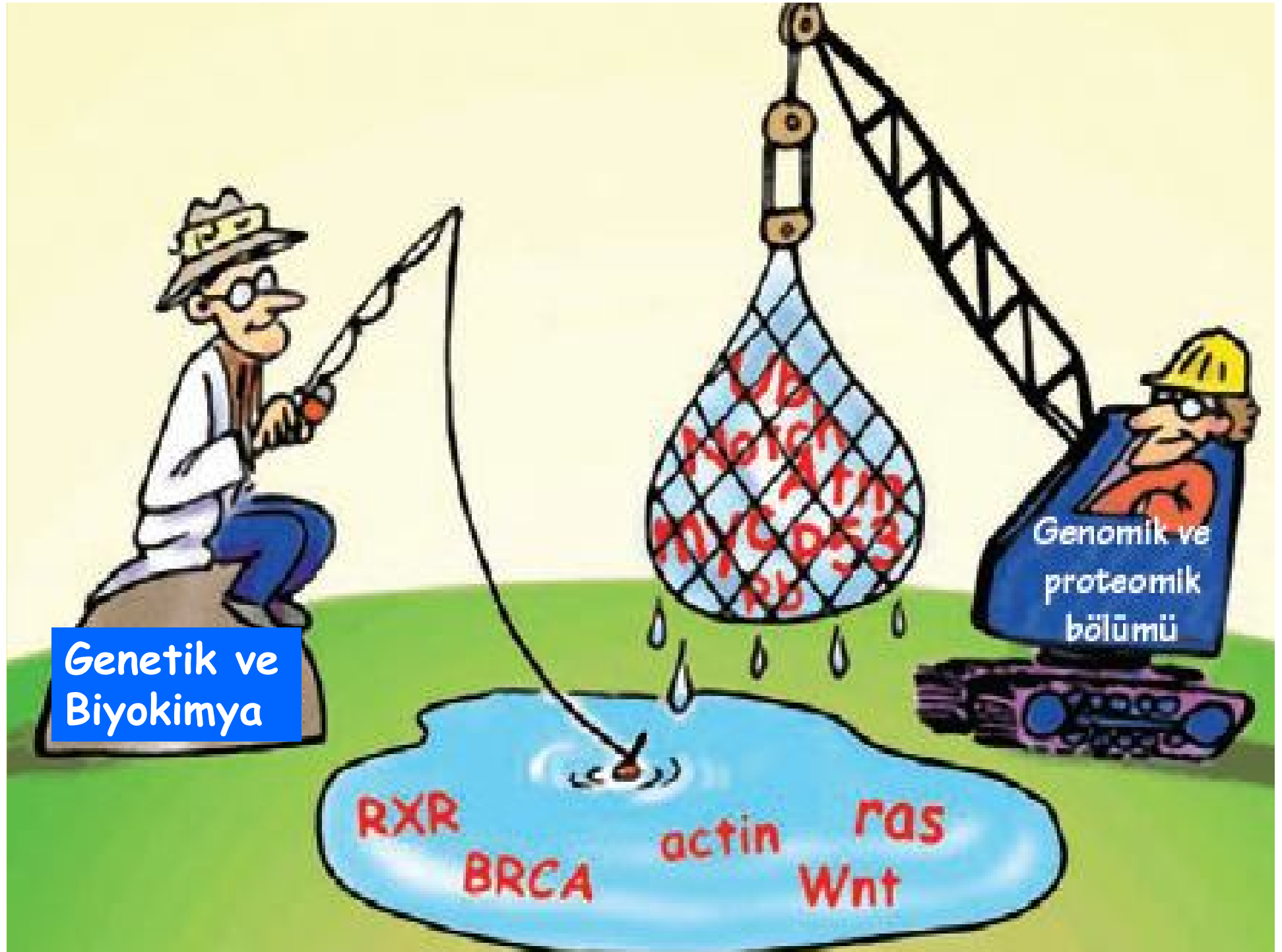
**DİYET ALAN  
FENİLKETONÜRİLİ  
ÇOCUKLARDA  
FONKSİYONEL  
B12 VİTAMİN  
EKSİKLİĞİNİN  
İNCELENMESİNDE  
MMA VE  
HOMOSİSTEİN  
DÜZEYLERİNİN  
BELİRLENMESİ**



Genetik ve  
Biyokimya

Genomik ve  
proteomik  
bölümü

RXR actin ras  
BRCA Wnt



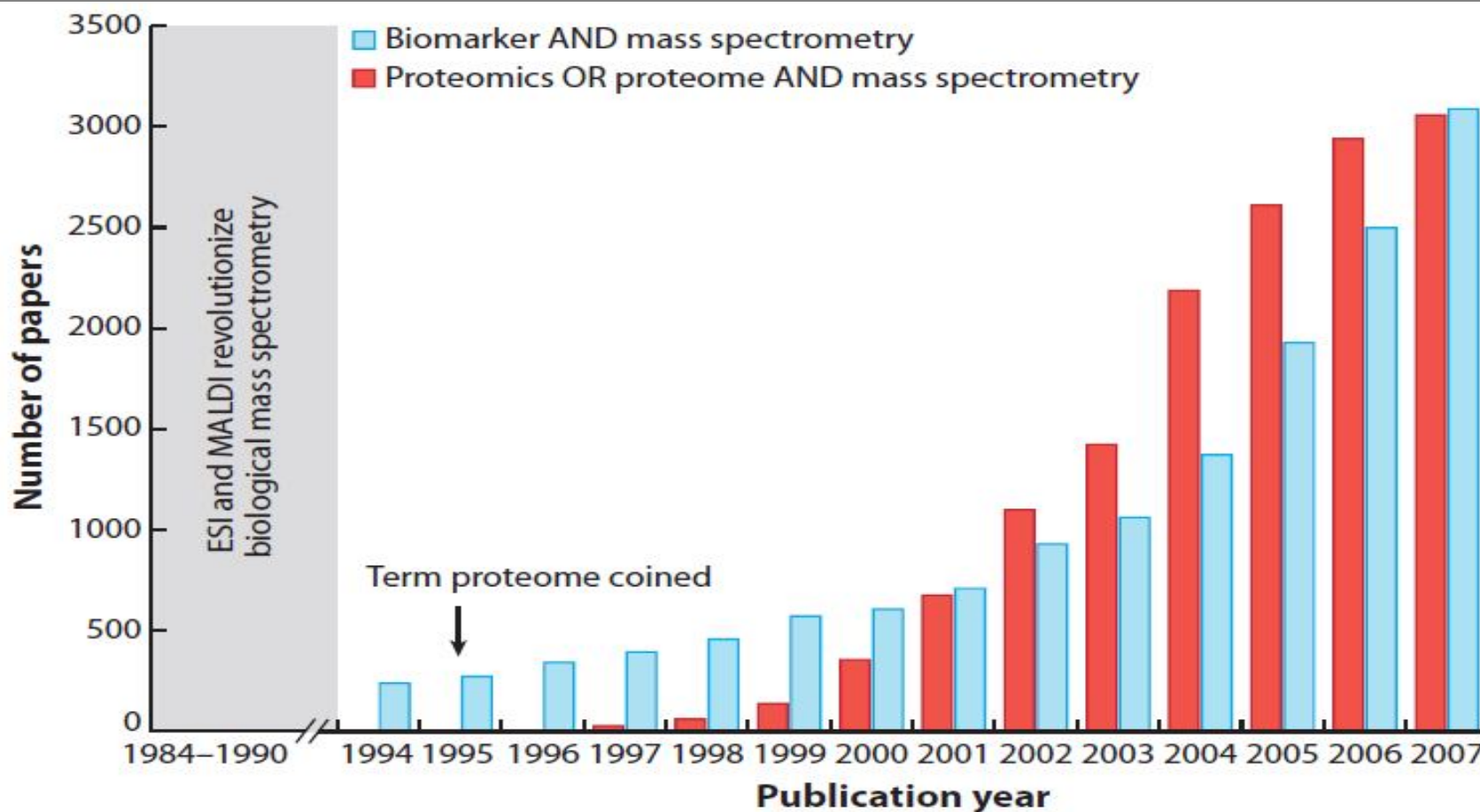
# İnsan genom projesinin sonlanması

- ❑ İnsan Genom Projesinin ilginç bir sonucu: mRNA ve protein sayılarının arasındaki zayıf korelasyonun ortaya konması
- ❑ İnsan genomunda 25-30 000 protein kodlayan gen
- ❑ İnsan proteomu > 500 000 protein



*White House Press Release, June 26, 2000*

# Proteomiks & MS (PubMed)



**Figure 1**

Number of publications as a function of publication year (1994–2007) found through the Web of Science database using the search terms biomarker AND mass spectrometry and proteomics OR proteome AND mass spectrometry. Geometric growth in this field can be clearly attributed to the introduction of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) and electrospray ionization (ESI).

# Proteomikste MRM uygulama alanları

## EKSPRESYONEL PROTEOMİKS

### Protein Tanımlama

Doku hücre, organel vb proteinleri

### Protein Ekspresyon Analizi (göreceli & mutlak kantitasyon)

Bir duruma özgü proteinler tanımlanması (diferansiasyon, evre, ilaç yanıtı vb)

### Protein Biyobelirteç

Keşif (Discovery)  
Doğrulama (Verification)  
Geçerlilik onaylama (Validation)

## FONKSİYONEL PROTEOMİKS

### Proteinler arası etkileşim analizi

Biosentez yolları, sinyal yolları, multiprotein karışımlar

### Protein modifikasyon haritalaması

(PTM analizi fosforilasyon, glikozilasyon, oksidasyon vb)

# MRM Yöntemiyle Protein Kantitasyonu

Hedef proteinlerin seçilmesi



Proteotipik peptidlerin seçilmesi



Transition seçilmesi



İnternal standartların belirlenmesi



MRM ile kantitasyon

Metot  
Geliştirme  
Basamakları

Hedef Protein

Hedef Peptid

Kütle

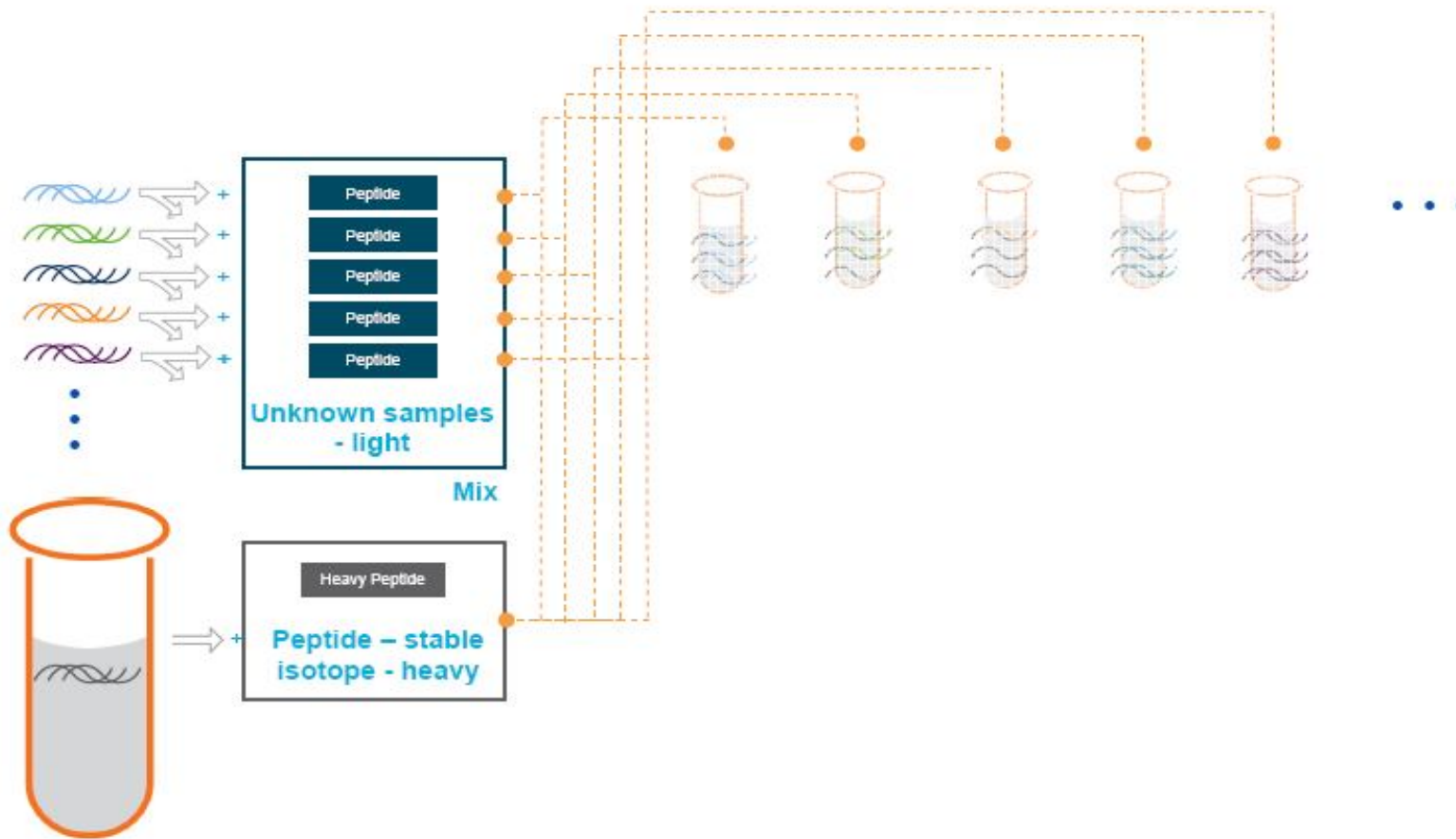
Yük

Q1 öncül iyon m/z  
Q2 transition m/z

öncül/ürün iyon çifti:  
744.8/959.4

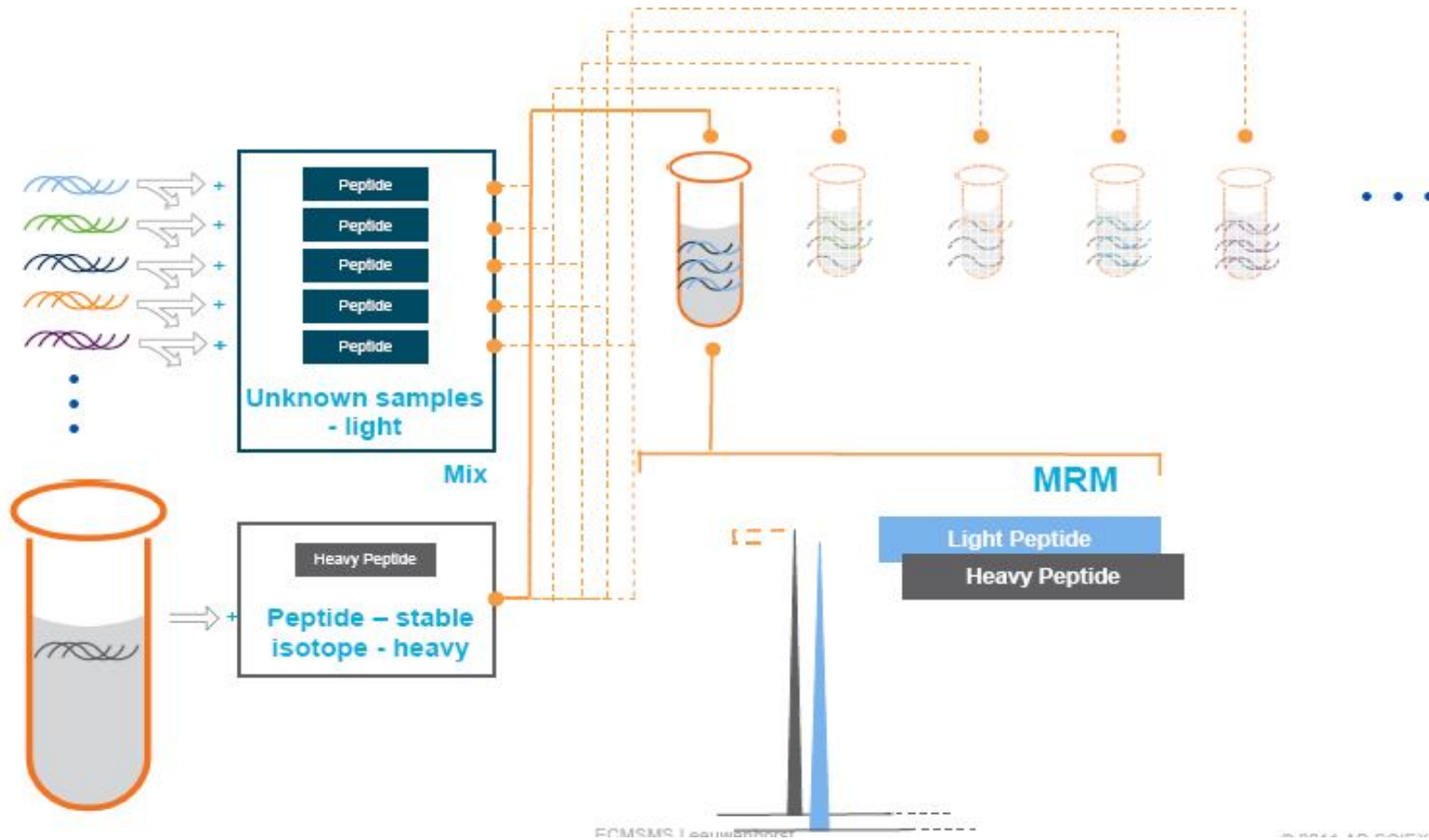
Protein	Source	MW (kDa)	Signature Peptide	MH+ (mono)	z (Q1)	MRM Transitions <sup>b</sup>	
						Q1	Q3
Aprotinin	bovine lung	6.4	AGLC <sub>amc</sub> QTFVYGGC <sub>amc</sub> R <sup>a</sup>	1488.7	2	744.8	858.3, 959.4, 1087.1
			AGLC <sub>amc</sub> QTF[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]VYGGC <sub>amc</sub> R <sup>a</sup>	1493.7	2	747.3	863.4, 964.4, 1092.5
Leptin	mouse	10	INDISHTQSVSAK	1399.7	3	467.2	543.2, 586.8, 643.3
			INDISHTQS[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]VSAK	1404.7	3	468.9	543.2, 589.3, 646.3
Myoglobin	Horse heart	17	LFTGHPETLEK	1271.7	3	424.6	506.2, 579.7, 716.3
			LFTGHPET[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]LEK	1277.7	3	426.6	509.2, 582.8, 722.4
Myelin Basic Protein	bovine	18	HGFLPR	726.4	2	363.7	385.2, 532.3, 589.3
			HGF[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]LPR	732.4	2	366.7	391.2, 538.3, 595.3
			YLASASTMDHAR	1322.6	3	441.5	488.2, 523.7, 817.3
			Y[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]LASASTMDHAR	1328.6	3	443.5	488.2, 523.7, 817.3
Prostate Specific Antigen	human	30	IVGGWEC <sub>amc</sub> EK <sup>a</sup>	1077.5	2	539.3	808.3, 865.3, 964.4
			I[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]VGGWEC <sub>amc</sub> EK <sup>a</sup>	1082.5	2	541.7	808.3, 865.3, 969.4
			LSEPAELTDAVK	1272.7	2	636.7	775.4, 846.4, 943.4
			LSEPAE[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]LTDAVK	1278.7	2	639.7	781.3, 852.5, 949.4
Peroxidase	Horse radish	48	DTIVNELR	959.5	2	480.3	531.2, 630.3, 743.4
			DTIVNE[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]LR	965.5	2	483.3	537.3, 636.3, 749.4
			SSDLVALSGGHTFGK	1475.7	3	492.6	703.3, 790.3, 974.5
			SSDLVA[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]LSGGHTFGK	1481.8	3	494.6	703.3, 790.3, 980.5

# MRM Yöntemiyle Protein Kantitasyonu

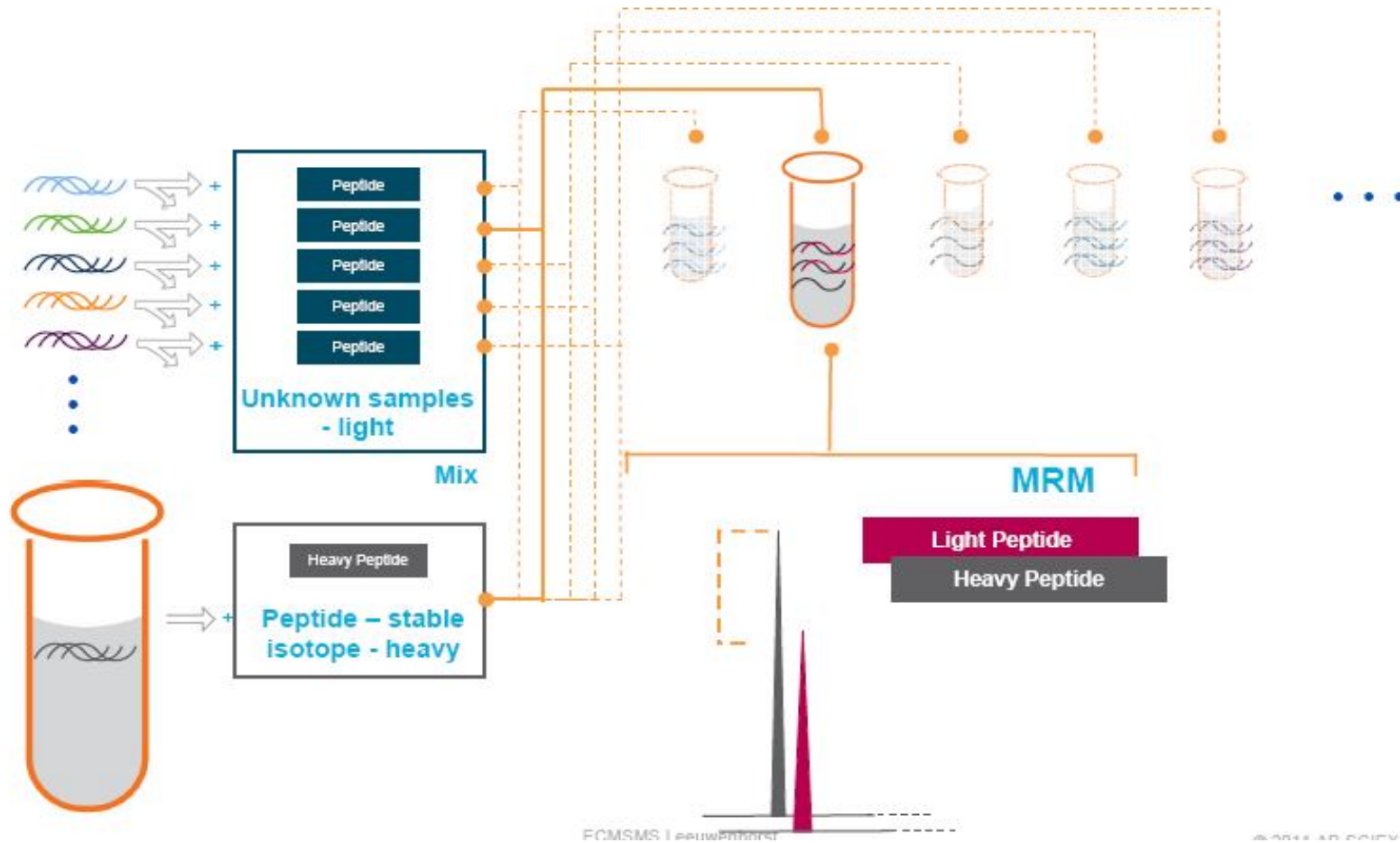




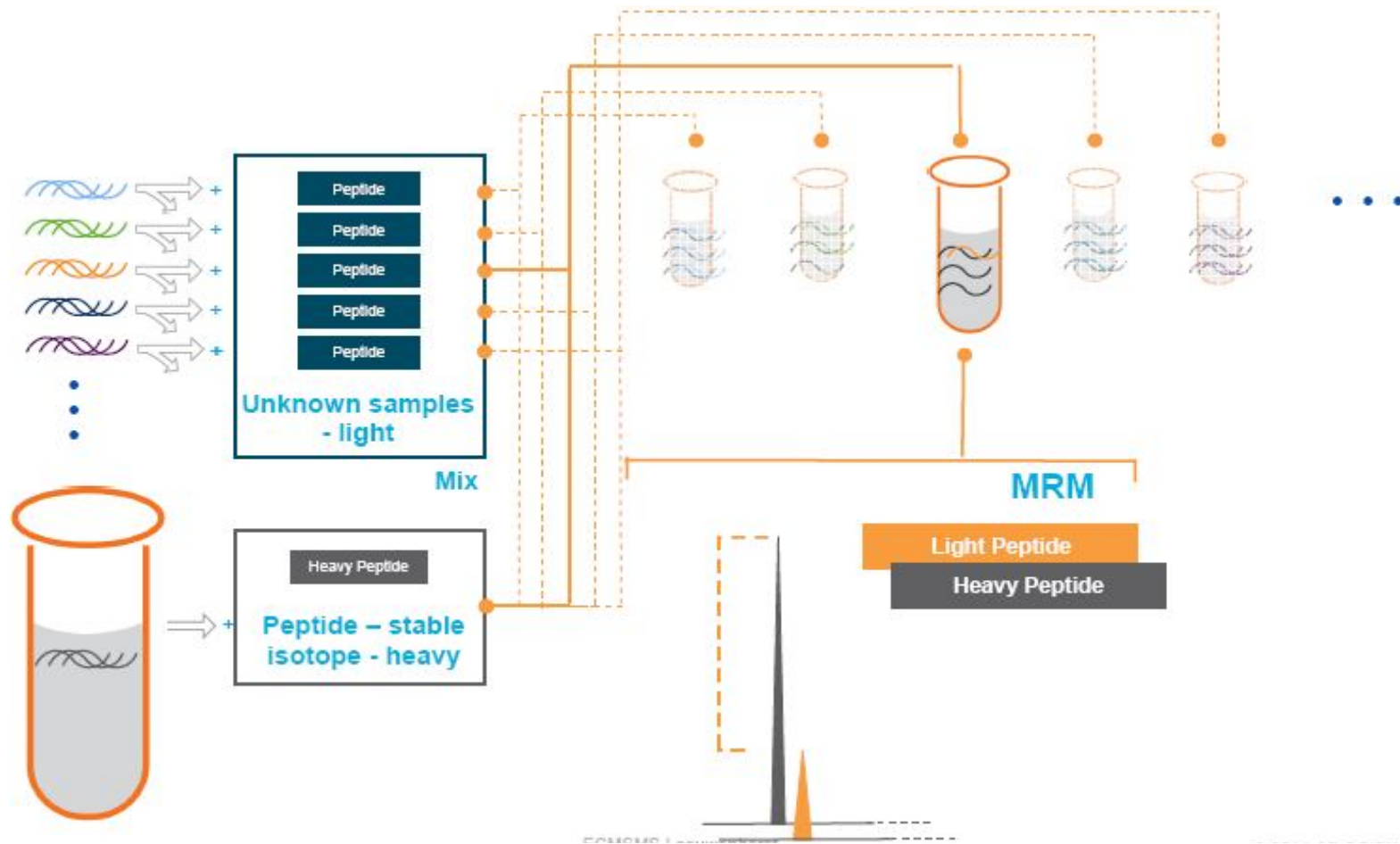
# MRM Yöntemiyle Protein Kantitasyonu



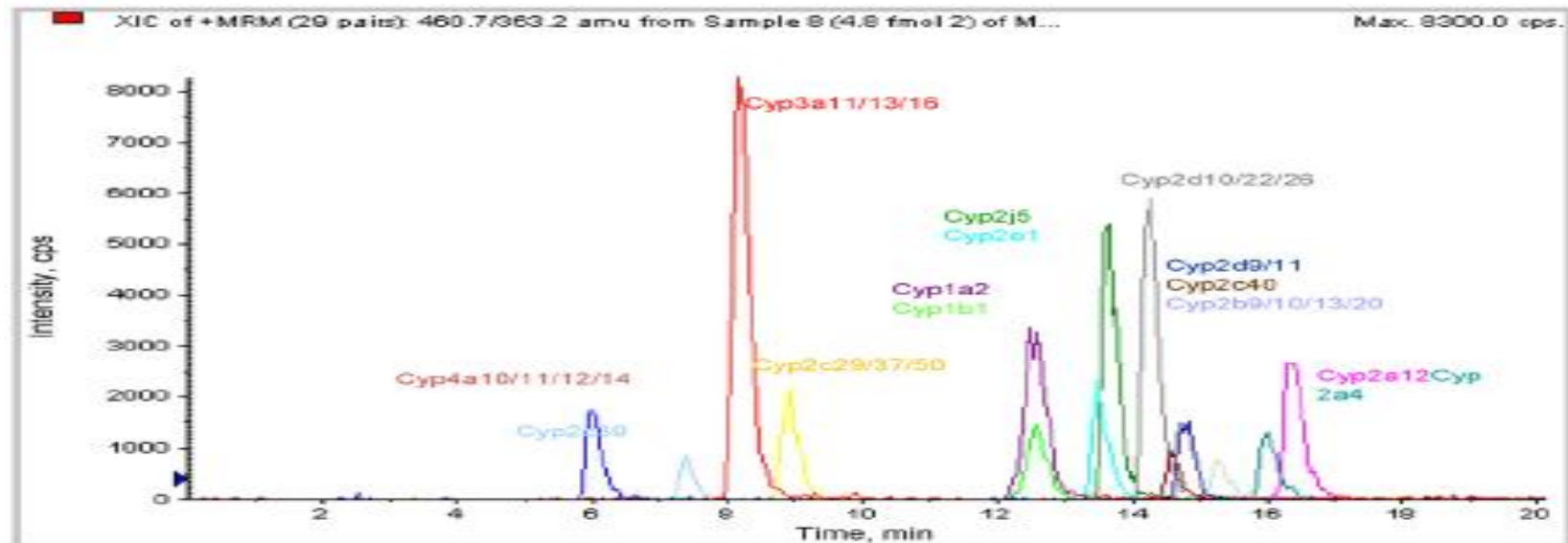
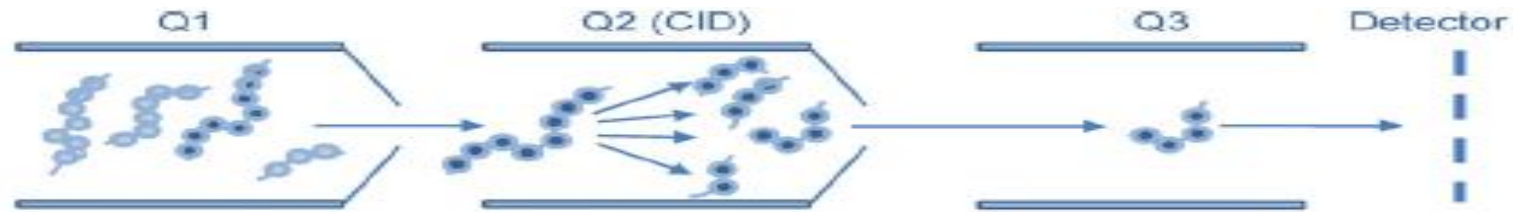
# MRM Yöntemiyle Protein Kantitasyonu



# MRM Yöntemiyle Protein Kantitasyonu

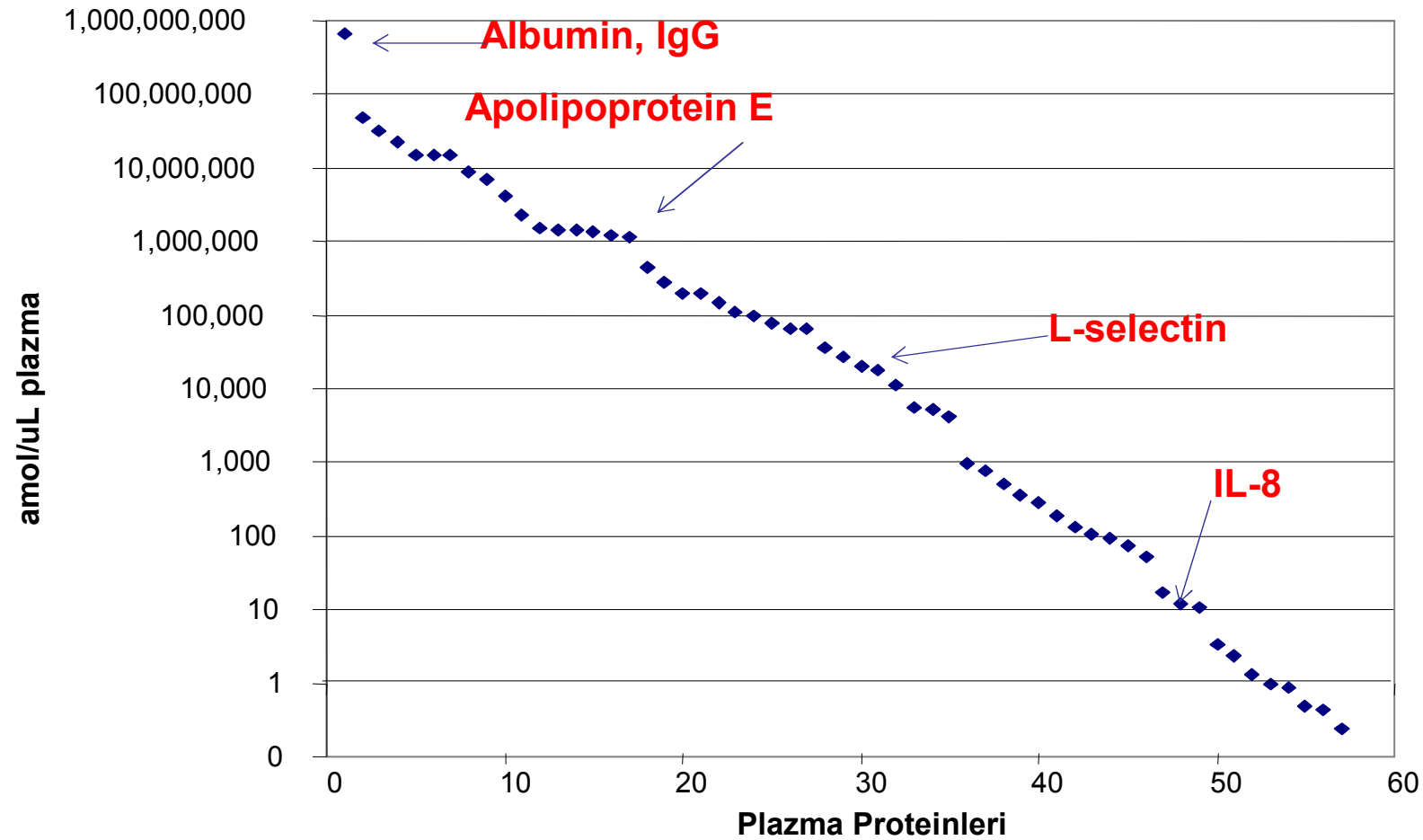


# MRM Yöntemiyle Protein Kantitasyonu

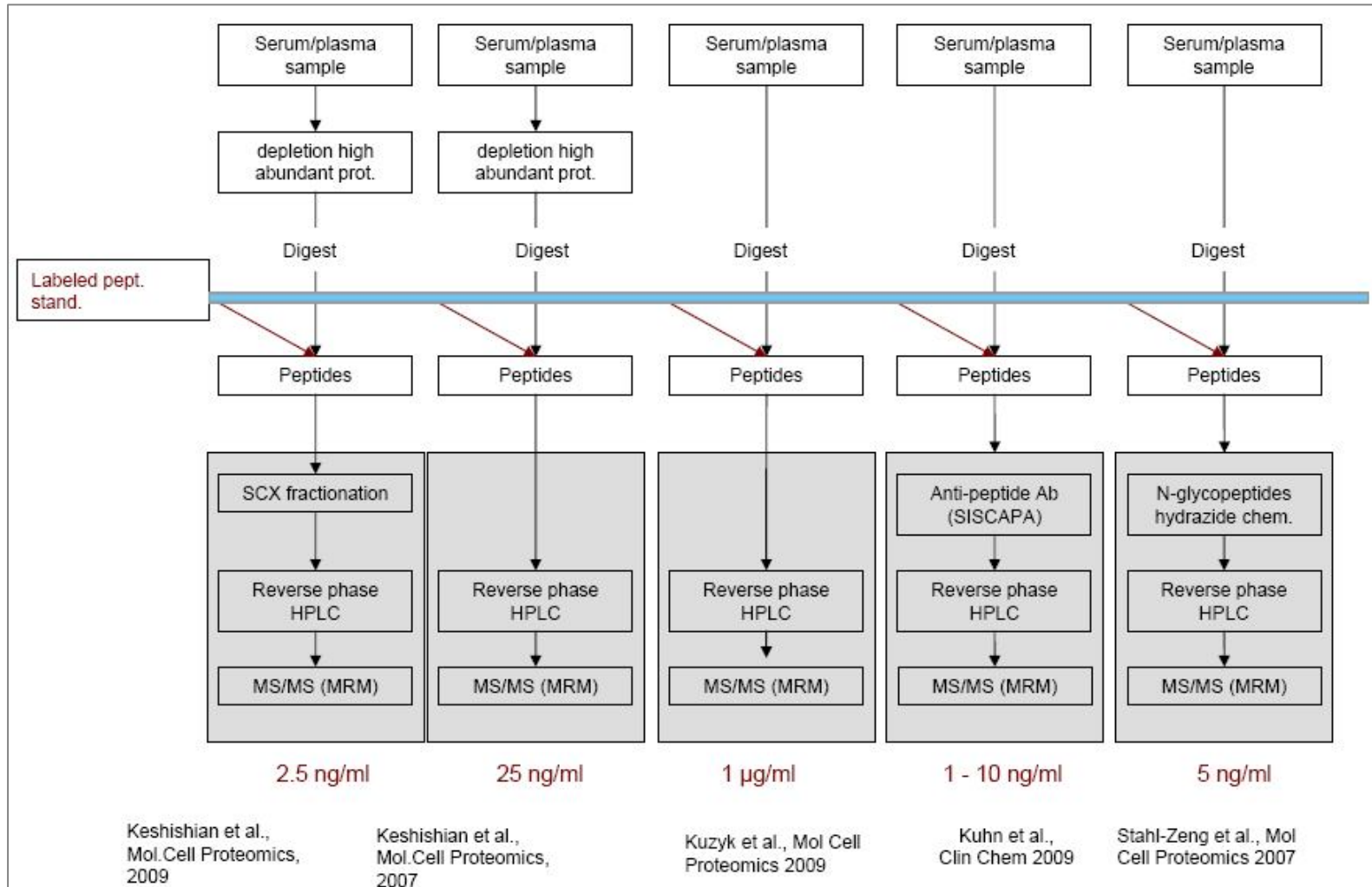


Protein	Peptide	MRM transition	Control (fmol/mg)	PB-induced (fmol/mg)	Fold induction	95% CI	P value
Cyp1a2	CIGEIPAK	529.3 / 315.3	1.38	1.25	0.91	0.87 - 0.95	0.013
Cyp1b1	CIGEELSK	553.3 / 662.3	14.11	14.99	1.06	1.00 - 1.13	0.031
Cyp2a4	YCFGEGLAR	621.8 / 749.4	11.53	13.02	1.13	1.00 - 1.28	0.043
Cyp2a12	FCLGESLAK	590.8 / 703.4	15.07	14.99	1.00	0.93 - 1.07	0.905
Cyp2b9/10/13/20	ICLGESLAR	594.8 / 745.4	11.41	68.97	6.07	5.08 - 7.24	<0.0001
Cyp2c29/37/50	ICAGEGLAR	558.8 / 673.4	55.84	171.18	3.06	2.66 - 3.55	0.001
Cyp2c39	VCAGEGLAR	551.8 / 673.4	7.58	7.48	0.99	0.92 - 1.06	0.844
Cyp2c40	ICVGESLAR	587.8 / 731.4	16.15	15.85	0.98	0.93 - 1.03	0.625
Cyp2d9/11	SCLGEALAR	573.8 / 729.4	12.42	7.56	0.61	0.52 - 0.7	0.002
Cyp2d10/22/26	SCLGEPLAR	586.8 / 642.4	21.66	19.61	0.90	0.86 - 0.96	0.007
Cyp2e1	VCVGEGLAR	565.8 / 701.4	35.13	30.38	0.86	0.82 - 0.91	0.006
Cyp2j5	ACLGEQLAK	580.3 / 758.4	9.05	8.82	0.98	0.93 - 1.02	0.008
Cyp3a11/13/16	NCLGMR	460.7 / 363.2	5.48	19.56	3.58	3.23 - 3.96	<0.0001
Cyp4a10/11/12/14	NCIGK	381.2 / 204.1	2.71	4.32	1.61	1.31 - 1.98	0.003

# İnsan Plazmasındaki Proteinlerin “Dinamik Aralığı”



# Örnek Hazırlama Yaklaşımları



# MRM-Metabolomiks (<1500 Da)

## Hedefli olmayan

- ❑ Hücre, doku ya da organizmada bulunan tüm bilinen ve bilinmeyen (100-1000 lerce) metabolitin incelenmesi
- ❑ Amino asitler ve türevleri  
Şeker fosfatlar  
Nukleotidler  
Koenzim A ve türevleri  
Karboksilik asitler  
Lipidler ve türevleri.....

## Hedefli

- ❑ Belirlenmiş metabolitlerin (10-100 lerce) kantitasyonu
- ❑ Hücresel metabolik olaylar
- ❑ Hastalık metabolizması
- ❑ Terapotik hedefler
- ❑ İlaçların etki mekanizmaları
- ❑ Var olan biyobelirteçlerin validasyonu.....

# Grubumuz



*Ar. Gör. Melis KANT*  
*Ar. Gör. Merve Akış*  
*Ar. Gör. Gamze TUNA*  
(DEÜTF Tıbbi Biyokimya AD)

Teşekkür...

*Prof. Dr. Güldal KIRKALI*  
*Prof. Dr. Miral DİZDAROĞLU*  
(NIST/Washington DC)