

Paleopatológiás emberi maradványok tömegspektrometriás vizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés

Bóna Agnes

Programvezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs, D.Sc.

Témavezető: Dr. Márk László, Ph.D.



**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet**

2014

Bevezetés

Az oszteoszarkóma a leggyakoribb rosszindulatú csontdaganat, melyet az oszteoblaszt progenitor sejtekből származó tumoros sejtek csont-jellegű sejtközötti állományának (oszteoid) termelése jellemez. Leggyakrabban gyermekek, fiatal felnőttek hosszú csöves csontjainak növekedési tartományában (metafizisében) alakul ki. Miután a mezenchimális mutációk kiszabadulnak a sejtből, mértéktelenül burjánzani kezdenek, azonban ezen sejtek nem különböztethetők meg a normál oszteoblaszt sejtektől a sejtciklus során. A tüdőáttét a leggyakoribb ennél a rosszindulatú daganat típusnál.

Az oszteoszarkóma korai diagnosztizálása igen nehéz, mivel az áttétek a legtöbb esetben már a klinikai diagnózis előtt kialakulnak. Az új terápiás gyógymódokkal kapcsolatos intenzív kutatás ellenére, az előrehaladott stádiumban levő betegek túlélési rátája igen alacsony.

A tumoros sejtekből kiextrahálható, a rosszindulatú elváltozásra jellemző fehérjék, feltételezhetően véráram útján szállítódnak, majd a csont hidroxipatit rétegeiben abszorbeálódnak. Az oszteoszarkóma mint tumoros megbetegedés, hagyományos morfológiai vizsgálatokkal történő azonosítása régészeti csontmintákból nem könnyű feladat. A csonttani vizsgálatok mellett sok esetben biomolekuláris vizsgálatok is szükségesek lehetnek. A humán tumorok modern proteomikai vizsgálata lehetővé teszi a neoplasztikus elváltozások patogenezisének megértését valamint új, a korai diagnózishoz szükséges biomarkerek azonosítását.

A tuberkulózis a legrégebb óta ismert, a forgalomban levő védőoltások és antibiotikumok ellenére a mai napig a legtöbb áldozatot követelő krónikus, fertőző megbetegedés. A tuberkulózist a *Mycobacterium tuberculosis* komplex (MTC) okozza, azonban humán eredetű megbetegedések esetén a betegség legfőbb kiváltói a *Mycobacterium tuberculosis* és a *Mycobacterium bovis*.

A *Mycobacterium tuberculosis* az emberi testben vérárammal valamint a nyirokrendszerrel terjed, osztódása a csontszövetben történik, ezáltal jellemző csontszöveti károsodást okoz. A betegségben leginkább a gerincoszlop, a csípő- és térd ízület, a kar illetve a láb csontjai érintettek. A paleoproteomikai vizsgálatok mint független, robusztus, nagy hatékonyságú módszerek jelentős szerepet játszhatnak a humán patogén mikobaktérium fajok azonosításában.

Célkitűzések

- megfelelő fehérje extrakciós módszer kifejlesztése oszteoszerkómás illetve tuberkuloid régészeti csontmintákra
- az extrahált fehérjék tömeg szerinti elválasztása SDS PAGE gélelektroforézis segítségével
- a kontroll mintától eltérő bandek gélből való kivágása, triptikus emésztése valamint tömegspektrometriás analízise (MALDI TOF/TOF MS)
- rosszindulatú csonttumorra jellemző biomarkerek illetve mikobaktériumra jellemző fehérjék azonosítása különböző kereső szerverek (Mascot, ProteinScape) segítségével.
- oszteoszarkómás, patológiás (tuberkuloid) valamint nem-patológiás (kontroll) mintacsoportok statisztikai vizsgálata

Anyagok és módszerek

Régészeti csontminták

Oszteoszarkómás régészeti csontminták

A vizsgált oszteoszarkómás minta egy 25-35 év körüli, töredezett női csontvázból származott, melyet Szombathely (Savaria) késő római kori területein tártak fel. A mintavétel helye a jobb felkarcsont kortikális része volt.

Az antropológiai (kor- és nem meghatározás, makroszkópikus és morfológia vizsgálatok) valamint a paleopatológiai (röntgen) vizsgálatok Knusmann és Józsa leírása alapján történtek. Kontrollmintaként, egy szintén ebből a temetőből származó nem tuberkuloid női felkarcsont minta szolgált. A statisztikai analízishez, az oszteoszarkómás mintákon kívül további, a korábbi proteomikai méréseink során is vizsgált kontroll (nem-patológiás), valamint tuberkuloid mintákat használtunk fel.

Tuberkuloid régészeti csontminták

Több különböző régészeti korból származó *Mycobacterium tuberculosis* baktériummal fertőzött valamint morfológiailag "egészséges" emberi csontmaradványt vizsgáltunk. A vizsgált paleopatológiás mintákat az 1. táblázat tartalmazza.

No.	Location	Grave	Age	Sex	Anatomy	Date
1	Bélmegyer-Csömöki domb	65	30-40	Female	vertebra	700-800 AD
2	Csongrád-Ellés	183	40-45	Male	vertebra	1000-1200 AD
3	Bácsalmás-Homokbánya	39	40-50	Male	vertebra	1500-1600 AD

1. Táblázat: A *M. tuberculosis* baktériummal fertőzött régészeti csontminták antropológiai adatai

A paleopatológias mintákat (Csongrád-Ellés kivételével) DNS tesztnek vetettük alá *Mycobacterium tuberculosis* komplexre, a teszt minden esetben pozitív volt. A mikolsavak mint lipid biomarkerek, a mikobakteriális fertőzés további bizonyítékaként a kutatócsoport előző cikkében leírt módon kimutathatók voltak. A kontroll mintákból mikolsavat nem tudtunk detektálni.

Fehérjeextrakció régészeti mintákból

A vizsgált csontdarabokat foszfát –pufferes sóoldattal (PBS) és desztillált vízzel mostuk le. A csontokat achát mozsárban elporítottuk (~0,2 mm szemcseméret). 100 mg csontport 1.00 ml 0.5 M EDTA-val (pH=8,0) dekalifikáltuk, majd az üledékhez 100 µl 6 M guanidine-HCl 0.1 M Tris (pH=7,5) oldatát adtuk. A fehérjék extrakciója 4°C-on 8 órás állandó rázatás mellett, proteáz inhibitor (Sigma Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) jelenlétében történt.

A fehérje extraktumot C18 állófázisú töltet segítségével tisztítottuk, ehhez a lépéshez a kutatócsoportunk által készített 5 µm szemcseméretű 120 Å pórusátmérőjű C18 állófázist használtunk. Az állófázist 0,1% TFA oldattal aktiváltuk, az állófázisra juttatott a fehérje extraktumot háromszor 100 µl 2% acetonitril 0,1% TFA oldattal mostuk. A fehérjéket végül 50 µl 50% acetonitril 0,1% TFA oldattal eluáltuk.

A kapott oldatot liofilizáltuk, a további mérésekig -86°C-on tároltuk.

SDS-PAGE gélelektroforézis és enzimatis emésztés

A régészeti mintákból származó liofilizált fehérje extraktumokat 100 µL 3 mM EDTA, 5 mM β-merkaptoetanol és 1% nátrium dodecilszulfát (SDS) tartalmú 20 mM Tris/HCl, (pH=7,4) pufferben oldottuk. 1% brómfenolkék hozzáadása után a mintákat 2 percig forraltuk majd lecentrifugáltuk (8000 g, 2 perc).

A nátrium dodecilszulfát poliakrilamid gél elektroforézist (SDS PAGE) 12%-os gélen, Laemmli módszere alapján végeztük. A molekula tömegek becslésére mólsúly standardot használtunk. Az elválasztás minőségének növelése, bandek jobb elkülönülésének érdekében a gélfuttatást 4 °C-on végeztük. A gélét Coomassie Brilliant Blue R-250 festékkal festettük meg, a felesleges festéket 5% (v/v) ecetsav, 16% (v/v) metanol oldatával távolítottuk el.

A kontroll régészeti mintától eltérő, intenzív fehérje bandeket a gélből pengével kivágtuk, feldaraboltuk majd Eppendorf csőbe raktuk. A gél darabokat 10-10 percig háromszor 200 µL 50 mM NH₄HCO₃ tartalmú 50% (v/v) acetonitril oldattal mostuk. A fehérjében jelen levő diszulfidhidakat 50 µL 20 mM ditiotreitolt (DTT) 100 mM NH₄HCO₃-ot és 5% acetonitrilt tartalmazó oldattal redukáltuk 55°C-on, 1 órán át. Az alkilálást 50 µL 20 mM jódacetamid-oldattal végeztük. Az oldószert Speed Vac készülék (Speed Vac Plus, SC100A, Savant) segítségével távolítottuk el a mintákból, szobahőmérsékleten. Az emésztéshez 10 µL, 2.5 mM Tris pufferben (pH=8.5) oldott módosított tripszint (Promega, Madison, WI, sequencing grade) (0.04 mg / mL) használtunk, a hőmérsékletet egy éjszakán át 37 °C-on tartottuk.

Az emésztést 15 µL acetonitril, hangyasav vizes oldatával állítottuk le (50/1/49 v/v/v). A mintákat ezután szobahőmérsékleten 60 percig inkubáltuk, majd liofilizáltuk.

Régészeti csontminták MALDI TOF/TOF MS alapú azonosítása

A liofilizált mintákat 0,1%-os TFA oldatban oldottuk fel, majd C18 ZipTip SPE pipetta hegygel (Millipore Kft, Budapest, Magyarország) koncentráltuk illetve sóalanítottuk az egyes mintákat. A következő lépésben a peptideket közvetlen a mintatartó lemezre (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics, Bréma, Németország) cseppentettük 3 μ L telített, α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (CHCA) mátrix jelenlétében, melyet előzőleg acetonitril/ 0,1% TFA-ban (1/2, v/v) oldottunk fel. A mérések során egy Autoflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) típusú tömegspektrométert használtunk, mely refletron üzemmódban működött PMF (peptide mass fingerprinting) mérések és LIFT üzemmódban LID (lézer indukálta disszociáció) valamint CID (ütközés indukálta disszociáció) fragmentáció esetén. A gyorsító feszültség 20,00 kV volt. A mérések során alkalmazott lézer egy 337 nm hullámhosszúságú nitrogén lézer (modell MNL-205MC, Lasertechnik Berlin GmbH., Berlin, Németország) volt. A vizsgált peptid tömegtartomány 700-5000 m/z volt. Egy minta mérése során legalább 500 lézerlövés átlagát vettük. A készülék vezérlésére FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics, Bréma, Németország), a spektrumok kiértékelésére FlexAnalysis 2.4 szoftvert (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) használtunk. Az egyszerűen töltött monoizotópos peptidtömegeket Swiss-Prot illetve NCBI nr adatbázisban kerestettük Mascot kereső szerver (version 2.2) (www.matrixscience.com, Matrix Science Ltd., London, UK), Bruker BioTools 3.0 szoftver (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) illetve ProteinScape szerver 2.1 (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) segítségével. A keresési beállításoknál maximum egy kihagyott triptikus hasítási helyet illetve 80ppm hibahatárt adtunk meg. Globális poszttranszlációs módosításként karbamidometilációt, variálható poszttranszlációs módosításként metionin oxidációt állítottunk be. Egyes fehérjék azonosításának további bizonyítékeként LID és CID fragmentációt végeztünk MALDI TOF/TOF MS segítségével.

Statisztikai analízis

Tömegspektrometriás eredményeink összehasonlítására ClinProTools 2.2 (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) szoftvert használtunk. Több oszteoszarkómás, nem patológiás (kontroll) illetve tuberkuloid mintát vizsgáltunk egyidőben. A spektrumok kalibrálása, összehasonlítása, a csúcsok normalizálása, detektálása valamint a csúcs alatti terület kiszámítása automatikusan, a ClinProTools program segítségével történt. A statisztikailag jelentős csúcsok azonosításánál logisztikus regressziós modellt alkalmaztunk, a normalizált csúcs alatti területeket felhasználva. A különböző mintacsoportok nem parametrikus vizsgálatához Wilcoxon tesztet használtunk.

Eredmények és megbeszélésük

Oszteoszarkóma

Tudományos kutatásunk részeként, több, potenciális tumor biomarkert sikerült azonosítanunk egy 2000 éves oszteoszarkomás régészeti csontmintából. A mintákból származó fehérjéket 1D gélelektroforézis segítségével választottuk el, majd a megfelelő, gélből kivágott bandeket enzimatikusan emésztettük. Az így nyert triptikus peptideket MALDI TOF/TOF tömegspektrométerrel analizáltuk, PMF illetve MS/MS keresés alapján több, az irodalomban leírt, tumoros elváltozásra illetve oszteoszarkómára jellemző fehérjét azonosítottunk patológiás régészeti csontmintából (1. Táblázat).

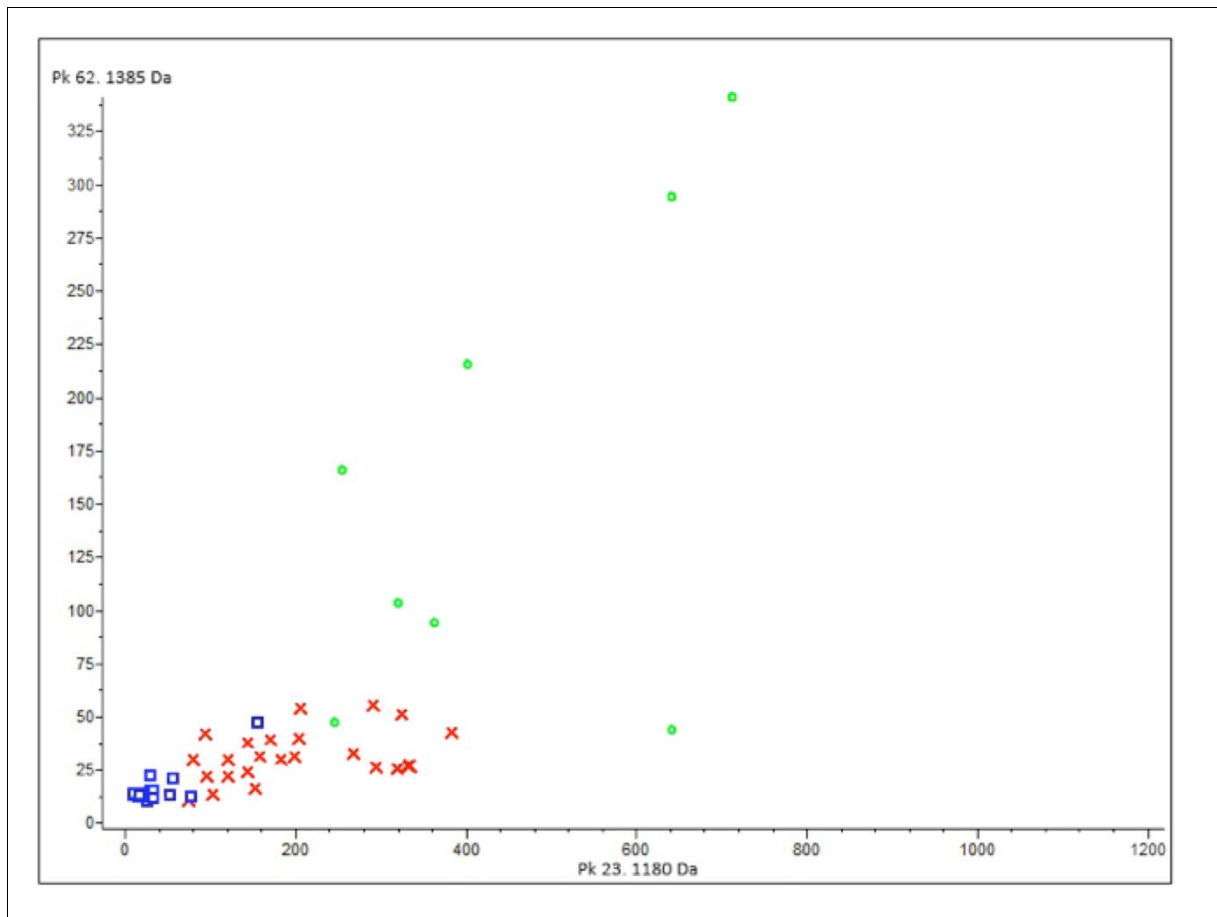
Az azonosított annexin (ANX) fehérje, mint kalcium és foszfolipid kötő fehérje jelentős szerepet játszik az exocitózis és endocitózis transzport folyamataiban, a sejtek növekedésének szabályozásában, proliferációjában valamint apoptózisában. Számos tudományos munka igazolja az ANXA10 fehérje expressziójának növekedését tumoros elváltozás esetén. A B sejt limfóma 2 (BCL2) fehérje családba tartozó BCL2A1 fehérje felelős a proapoptotikus BCL2 fehérjék elválasztásáért. BCL2A1 fehérjeszint növekedését figyelték meg leukémia valamint limfóma esetén, azonban nagy valószínűséggel az autoimmunitásban valamint a kemoterápia rezisztanciában is szerepet játszik. A kalciumkötő fehérjék családjába tartozó calgizzarin (S100A11) sejtek növekedésében, a sejtmozgásban és osztódásban játszik szerepet. Ezen fehérje a tumor növekedésével, metasztázisával hozható összefüggésbe. A DLC1 (deleted in liver cancer 1) egy ismert tumor szupresszor fehérje, mely a Rho GTPáz aktiváló (RhoGAP) fehérjéken keresztül fejt ki hatását, jelentős szerepet játszva ezzel a tumoros sejtek növekedésében és migrációjában, in vitro apoptózist előidézve. A hősokkfehérjék termelődése hő által okozott, fiziológiai vagy bármely más stressz hatásra megnő, ezáltal elősegítve a sejtek túlélését nem megfelelő körülmények között. A hősokkfehérjék meghatározó szerepet játszanak az apoptózisban, a sejthalál különböző folyamataiban (a kaszpáz aktiváció gátlása által). Az irodalomban több helyen is megnövekedett HSP béta -6 szintet detektáltak oszteoszarkomás betegeknél.

A DJ1, egy mitogen-függő onkogén által termelt, Ras jelátviteli folyamatokban résztvevő fehérje, melynek overexpressziója tumoros elváltozást jelez. A RhoGAP családba tartozó fehérjék fontos szerepet játszanak a sejtek migrációjában, morfológiájában és citoskeletális organizációjában. A RhoGap fehérjék gátlása a tumor szupresszív hatást csökkenti. A transferrin, mint a vaskötő vérplazma glükoprotein, elsősorban a vér szabad vas tartalmának szabályzásáért felelős. A transferrin megnövekedett szintje, többek között tumoros elváltozással, például oszteoszarkómával hozható összefüggésbe. A citoskeletális intermedier filament fehérje, a vimentin (VIM), oszteoszarkóma esetén megnövekedett expressziója illetve tumor biomarker szerepe valószínűsíthetően a tumoros sejtek metasztázisának elősegítéséből következik. Kutatásaink során több keratint is azonosítottunk, ezen fehérjék jelentősége azonban nem pontosan ismert, feltehetően jelenkori vagy korabeli szennyeződésből származnak. Mindazonáltal a citokeratinok mennyiségének növekedését mutatták ki U2OS oszteoszarkóma specifikus sejtvonalból.

Accession	Name	MW [kDa]	Peptides	SC [%]
AK1A1_HUMAN	Alcohol dehydrogenase (NADP+)	36,5	5	14,2
gi 225939	aldehyde reductase	36,3	5	14,2
gi 48762937	annexin A10	37,3	8	27,2
gi 62087532	arginine/serine-rich splicing factor 6 variant	31,8	6	27,6
ARI5B_HUMAN	AT-rich interactive domain-containing protein 5B	132,2	11	13,0
gi 33878074	BAT2 protein	17,1	5	29,9
gi 49456879	BCL2A1	20,3	7	44,0
VMDL3_HUMAN	Bestrophin-4	76,1	7	14,5
gi 882391	bone morphogenic protein type II receptor	59,9	6	13,2
S10AB_HUMAN	Calgizzarin (S100 calcium-binding protein A11)	11,7	4	43,8
CAN7_HUMAN	Calpain-7	92,6	7	12,3
K1C10_HUMAN	Cytokeratin 10	59,5	14	23,1
gi 33188433	deleted in liver cancer 1 isoform 1	170,5	13	7,9
gi 28704113	DHX8 protein	138,7	13	13,8
G59435	DLC-1	122,7	10	10,9
DNL3_HUMAN	DNA ligase III	102,6	10	16,3
TDT_HUMAN	DNA nucleotidylexotransferase	58,4	9	22,2
MP2K6_HUMAN	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6	37,5	7	23,4
DTNA_HUMAN	Dystrobrevin alpha	83,9	6	10,5
gi 15010856	galectin-12 isoform d	30,0	5	30,5
GCC2_HUMAN	GRIP and coiled-coil domain-containing protein 2	184,5	18	12,3
gi 40555827	heat shock factor protein 2 isoform c	27,0	7	23,9
HSPB6_HUMAN	Heat-shock protein beta-6	17,1	5	35,0
CAC10772	Immunoglobulin heavy chain variable region	12,4	5	65,5
gi 17318569	keratin 1	66,0	15	25,8
Q8N175_HUMAN	Keratin 10	58,8	14	23,5
gi 31559819	keratin 25C	49,8	8	17,2
gi 47132620	keratin 2a	65,4	9	16,4
CAA82315	keratin 9	62,1	11	16,9
A44861	keratin, 67K type II epidermal	65,8	9	16,3
K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	61,9	11	20,7
AAP97338	Methyl-CpG-binding domain protein 4	60,9	13	16,3
NEBL_HUMAN	Nebulette	116,4	14	16,7
NRAP_HUMAN	Nebulin-related-anchoring protein	197,0	24	14,9
gi 4506335	parvalbumin	12,1	8	56,4
PRVA_HUMAN	Parvalbumin alpha	11,9	8	56,9
gi 39653323	PHD finger protein 20-like 1 isoform 1	47,7	7	15,8
gi 39653321	PHD finger protein 20-like 1 isoform 3	16,6	6	42,0
gi 31873386	phospholipase C	39,7	7	30,7
gi 346323	phosphoprotein phosphatase (EC 3.1.3.16) X catalytic chain	35,1	6	26,1
PDIP2_HUMAN	Polymerase delta-interacting protein 2	42,0	7	22,0
CAF00150	Proteasome subunit beta type 3	16,6	5	34,9
gi 565647	proteasome subunit HsC10-II	22,9	5	25,4
PARK7_HUMAN	Protein DJ-1 (Oncogene DJ1)	19,9	5	32,3
gi 55859594	PTAR1 protein	32,4	7	30,1
gi 4960030	Rab GDP dissociation inhibitor beta	41,0	6	22,0
gi 39841018	RAB GTPase activating protein 1-like	92,5	8	10,3
gi 537327	receptor tyrosine kinase	18,5	6	30,0
gi 2665850	rheumatoid factor RF-ET7	10,9	6	74,5
RHG07_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 7	122,7	10	10,9
gi 41152086	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6	42,6	9	29,3
gi 38382764	SET-binding protein isoform b	26,4	7	25,6
gi 46250431	Transcription factor NRF	77,7	11	20,4
gi 62088924	Transducin-like enhancer of split 3 splice variant 1 variant	22,9	6	37,1
gi 37747855	Transferrin	77,0	10	21,9
gi 4507659	translocated promoter region (to activated MET oncogene)	265,4	24	12,0
gi 4827050	ubiquitin specific protease 14	56,0	8	20,6
gi 71774197	ubiquitin specific protease 47	147,1	10	13,4
gi 34532272	unnamed protein product (homolog of CCDC144A protein)	56,3	12	21,9
gi 21754902	unnamed protein product (homolog of Zinc finger protein 781)	17,8	7	48,7
gi 57471648	vimentin	26,8	8	38,2
WBP4_HUMAN	WW domain-binding protein 4	42,5	7	15,7
ZN224_HUMAN	Zinc finger protein 224	82,2	10	19,4
gi 74355161	Zinc finger protein 624	85,6	11	22,5

1. Táblázat: A 2000 éves oszteoszarkómas mintából azonosított fehérjék. (Mascot score > 50)

Az egészséges (kontroll), a patológiás (tuberkuloid) valamint az oszteoszarkómás mintákat statisztikai analízis segítségével tudtuk elkülöníteni, kettő, a vizsgált oszteoszarkómás csontmintából származó csúcs segítségével (m/z 1180, 1385). Az oszteoszarkómás minták statisztikai profilja lényegesen eltért a másik két vizsgált csoporttól (1. ábra).



1. ábra: A különböző mintacsoportok nem-parametrikus Wilcoxon statisztikai analízise. Oszteoszarkómás (zöld), egészséges, kontroll minta (piros) és tuberkuloid (kék) minta csoportok klaszter analízise, az m/z 1180 és 1385 csúcsok alapján. Az x és y tengelyek a peptid csúcsok relatív intenzitását mutatják.

Tuberkulózis

Kutatásaink további célja ősi, mikobaktériumból származó fehérjék régészeti csontmintákból való azonosítása volt. A kivágott protein bandeket tripszinnel emésztettük, az így kapott peptideket pedig MALDI TOF/TOF MS tömegspektrometriás mérésnek vetettük alá. A mikobaktérium specifikus fehérjék azonosítása PMF keresés illetve a triptikus peptidek szekvenciája alapján történt, mely minden vizsgált, tuberkulózisos régészeti csontminta esetén sikeres volt. A legrégebbi csontminta (Bélmegyer-Csömöki domb) proteomikai analízisének eredményeit a 2 táblázat tartalmazza.

Protein ID	Accession no.	Theoretical MW (Da)	Mascot score	Peptides matched	Sequence coverage (%)
Adenylate kinase (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 15607873	20113	263	14	65
Hypothetical protein (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 254232569	50448	71	8	15
LysR family transcriptional regulator (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 15607518	33616	68	8	29
Putative helicase (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 260187090	111734	113	19	25
Translation initiation factor IF-2 (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 215431780	54012	95	10	32

2. Táblázat: Az Bélmegyer-Csömöki domb 65.sírából származó régészeti csontmintából azonosított mikobakteriális fehérjék proteomikai paraméterei

Ezen mintából több mikobaktériumból származó fehérjét is azonosítottunk, úgymint adenilát kináz, LysR családba tartozó transzkripció szabályzó fehérje, putatív helikáz, transzláció iniciátor faktor IF-2 fehérje, valamint szintén a vizsgált baktériumból származó hipotetikus fehérje.

A másik két régészeti csontmintából (Csongrád-Ellés valamint Bácsalmás-Homokbánya) származó proteomikai eredmények 3. és 4. táblázatban találhatóak.

A vizsgált mintákból több mikrobakteriális enzimet (kataláz-peroxidáz-peroxinitritáz-T katG, dehidrogenáz/reduktáz, fumarát reduktáz flavoprotein alegység, glikozil transzferáz, oxidoreduktáz, peptid szintáz nrp) valamint egyéb mikobakteriális szabályzó- és hipotetikus fehérjét sikerült azonosítanunk.

Protein ID	Accession no.	Theoretical MW (Da)	Mascot score	Peptides matched	Sequence coverage (%)
Catalase-peroxidase-peroxinitritase-T katG (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 219557862	51220	62	8	24
Fumarate reductase flavoprotein subunit (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 15608690	63723	163	18	34
Hypothetical protein (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 15843166	37267	85	10	28
Oxidoreductase (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 15610689	36808	86	10	28
Peptide synthetase nrp (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 254233496	269241	122	23	11

3. Táblázat: Csongrád-Ellés 183. sírból származó régészeti csontmaradványból azonosított mikobakteriális fehérjék proteomikai paraméterei.

Protein ID	Accession no.	Theoretical MW (Da)	Mascot score	Peptides matched	Sequence coverage (%)
Dehydrogenase/reductase (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 218751933	32749	101	10	40
Fumarate reductase flavoprotein subunit (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 15608690	63723	113	15	30
Glycosyl transferase (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 218754716	20715	91	9	47
Hypothetical protein (<i>M. tuberculosis</i>)	gi 215428650	36324	93	12	31
Regulatory protein (<i>M. sp. JLS</i>)	gi 126436787	28284	119	8	43

4. Táblázat: Bácsalmás-Homokbánya 39. sírból származó régészeti csontmaradványból azonosított mikobakteriális fehérjék proteomikai paramétereit.

A proteomikai profilok közötti különbség egyik fő oka valószínűsíthetően a tuberkuloid csontminták különböző eredete és eltérő kora.

A morfológiailag egészséges kontroll mintákból több különböző típusú keratint illetve kollagéneket azonosítottunk, azonban tuberkulózisra utaló fehérjét egyik mintából sem tudtunk kimutatni.

A tandem tömegspektrometria alkalmazása (aminosav szekvencia meghatározás), ideális eszköz lehet a különböző fajok egymástól való elkülönítésére. Az összes azonosított bakteriális fehérje, kizárólag humán patogén mikobaktérium fajtából származott, következésképp a talajban előforduló mikobaktériummal való szennyezés kizárható a különböző aminosav szekvenciákat figyelembe véve. A fajok szerinti elkülönítés könnyen megvalósítható, ha a kapott aminosav szekvencia töredékek alapján homológia keresést hajtunk végre (NCBI BLAST szoftver).

Új eredmények összefoglalása

- Egyedülálló extrakciós eljárást fejlesztettünk ki, mely lehetővé teszi különböző jellegű betegségekhez (tumor illetve baktérium által okozott fertőzés) köthető protein biomarkerek kinyerését.
- A betegségekre jellemző biomarkereket, tömeg szerint, SDS PAGE gélelektroforézis segítségével elkülönítettük.
- A kontroll, morfológiailag egészséges mintáktól eltérő, intenzívebb fehérjesávokat a gélből kivágtuk, tripszinnel emésztettük, a kapott triptikus peptideket MALDI TOF/TOF MS PMF illetve MS/MS tömegspektrumok alapján analizáltuk.
- Több különböző tumor biomarker fehérjét (ANXA10, BCL2, DJ1, DLC1, HSP béta-6, RhoGTPáz-aktiváló protein 7, S100A11, transferrin, VIM) sikerült azonosítanunk, egy közel 2000 éves oszteoszarkómás csontmaradványból, az MS illetve MS/MS tömegspektrumok alapján, Mascot fehérje adatbázis kereső szerver alkalmazásával.
- Az irodalomban szintén először, kutatócsoportunknak sikerült *Mycobacterium tuberculosis* fertőzésre jellemző fehérjék leírnia paleopatológias mintákból, MALDI TOF/TOF MS mérést követő adatbázis keresés alapján.
- Bemutattuk, hogy az oszteoszarkómás, egyéb patológiás (tuberkuloid) illetve a nem-patológiás (kontroll) mintacsoportok statisztikailag egyedülállóak, ezáltal egymástól elkülöníthetők.

Publikációs lista

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

1. **Bona A**, Papai Z, Maasz G, Toth GA, Jambor E, Schmidt J, et al. Mass spectrometric identification of ancient proteins as potential molecular biomarkers for a 2000-year-old osteogenic sarcoma. PLoS One. 2014;9(1):e87215.

Impakt faktor: 3.534

Hivatkozások: 1

2. Boros-Major A, **Bona A**, Lovasz G, Molnar E, Marcsik A, et al. New perspectives in biomolecular paleopathology of ancient tuberculosis: a proteomic approach. J. Archaeol. Sci. 2011;38:197–201.

Impakt faktor: 1.914

Hivatkozások: 8

Egyéb közlemények:

Budán Ferenc, Szabó István, Jámbor Éva, **Bóna Ágnes**, Váczy Alexandra, Maász Gábor, Ohmacht Róbert, Kiss István, Márk László, Tényi Tamás: A skizofrénia biomarkereinek kimutatása és azonosítása tömegspektrometriával új lehetőséget nyithat a megelőzésben. Magyar Epidemiológia 7: p. 69. (2010)

Jarai T., Maasz G., Burian A., **Bona A.**, Jambor E., Gerlinger I., Mark L.: Mass spectrometry-based salivary proteomics for the discovery of head and neck squamous cell carcinoma, Pathol. Oncol. Res. 18(3): 623-628 (2012)

Impakt faktor: 1.555

Hivatkozások: 18

Szabo Gy. T.; Tihanyi R.; Csulak F.; Jambor E.; **Bona A.**; Szabo Gy.; Mark L.: Comparative salivary proteomics of cleft palate patients, *The Cleft Palate-Craniofacial Journal* 49(5): 519-523 (2012)

Impakt faktor: 1.238

Hivatkozások: 4

Szanto I., Mark L., **Bona A.**, Maasz G., Sandor B., Gelencser G., Turi Zs., Gallyas F.: High-throughput screening of saliva for early detection of oral cancer.: A pilot study, *Technology in Cancer Research and Treatment* 11(2): 181-188. (2012)

Impakt faktor: 1.943

Hivatkozások: 9

Gubicskóné Kisbenedek Andrea; Kovács Bernadett; Polyák Éva; Szekeresné Szabó Szilvia; Breitenbach Zita; Szabó Zoltán; Márk László; **Bóna Ágnes**; Figler Mária: A bogyós gyümölcsökből készült készítmények Rezveratrol-, rutin- és kvercetin tartalmának meghatározása Új Diéta. - ISSN 1587-169X. - 2012. 19. évf. 5-6. sz., p. 34-35.

Jambor E.; Bona A., Schmidt J., Mark L., Ohmacht R.: Preparation and investigation of LC packing made by microwave-assisted solid-phase synthesis. *Journal of Separation Science* 36 (5) 827–831 (2013)

Impakt faktor: 2.594

Hivatkozások: 0

Kisbenedek G. A., Szabo Sz., Polyak E., Breitenbach Z., **Bona A.**, Mark L., Figler M.: Analysis of trans-resveratrol in oilseeds by high performance liquid chromatography, *Acta Alimentaria* (2013)

Impakt faktor: 0.427

Hivatkozások: 0

Összesített impakt faktor: 13.205

Összes hivatkozás: 40

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Márk Lászlónak valamint programvezetőmnek Prof. Dr. Sümegi Balázsnak, hogy kutatásomat kitűnő ötleteikkel valamint anyagilag is támogatták.

Hálával tartozom továbbá Prof. Reglődi Dórának és Prof. Vértes Ákosnak tudományos cikkem szakmai valamint nyelvi lektorálásáért.

Szeretném megköszönni kollégáim Jámbor Éva, Dr. Fekete Katalin, Schmidt János, Dr. Maász Gábor, Dr Takátsy Anikó, Dr. Pápai Zoltán, Dr. Avar Péter, Petrovics Dóra valamint Dr. Böddi Katalin segítségét, baráti támogatását.

Köszönöm Szemmelróthné Mátrai Erika és Horváth Anita vegyésztechnikusoknak a laboratóriumi munkában nyújtott segítségét.

Továbbá köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik nevét nem említettem, de tudományos kutatási munkámhoz hozzájárultak.