
PERIKARDIÁLIS FOLYADÉKBAN TALÁLHATÓ ANTITESTEK ANTIGÉN- SPECIFITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

36. OTDK Biológia Szekció

Szerző: Öskü-Opra Júlia

Küldő intézmény: Eötvös Lóránd Tudományegyetem

Szak: Biológus, Molekuláris, Immun-és Mikrobiológia specializáció

Évfolyam: MSc II. év

Kutatóhely: Semmelweis Egyetem; Genetikai, Sejt és Immunbiológiai Intézet

Témavezetők: Dr. Buzás Edit, Pálóczi Krisztina

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	2
Bevezetés.....	3
Célkitűzések	5
Anyagok és módszerek.....	5
Mintagyűjtés	5
Immunprecipitáció.....	5
Protein koncentráció meghatározás	5
SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)	5
Western blot	6
Tömegspektrometria.....	6
Adatelemzés	6
Eredmények.....	6
Diszkusszió.....	12
Köszönetnyilvánítás	15

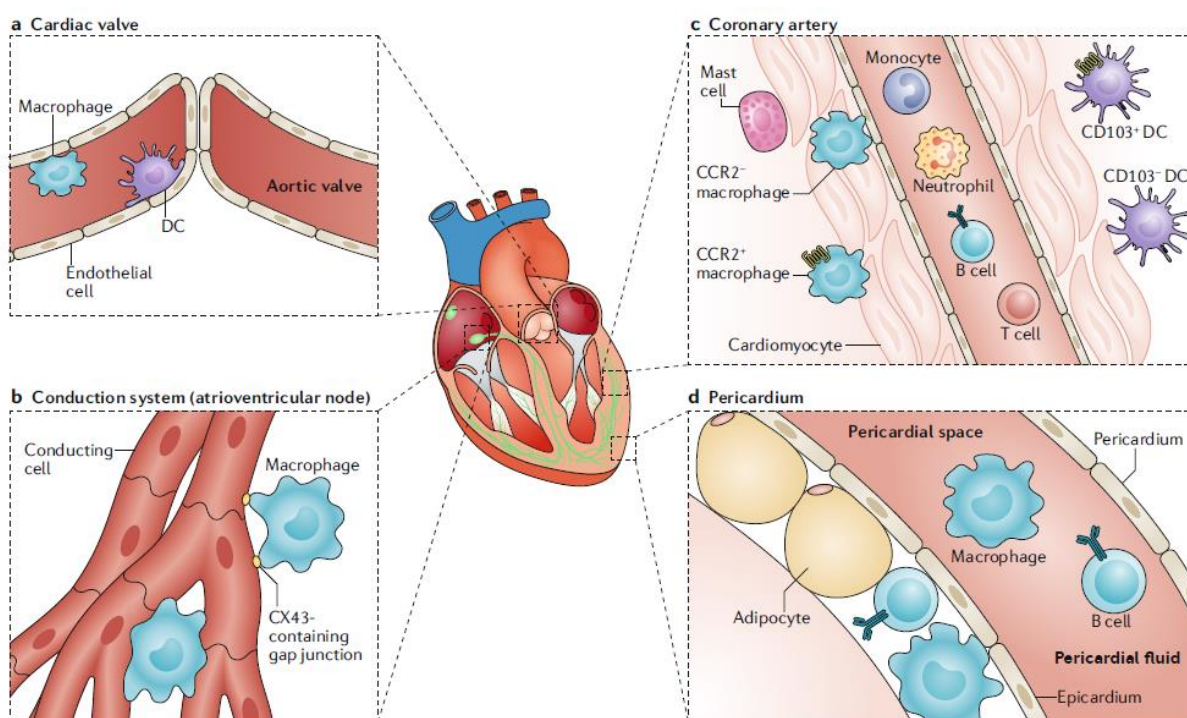
Rövidítésjegyzék

Perikardiális folyadék	PF
Cardiovasculáris betegség	CVD
Ditiotreitol	DTT
Desmoplakin	DSP
Junction plakoglobin	JUP
Lipopolysaccharide-binding protein	LPB
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	TGM3
Apolipoprotein(a)	LPA
Thioredoxin	TXN
Desmocollin-1	DSC1
Serpin B12	SERPINB12
Fatty acid-binding protein 5	FABP5
Plakophilin-1	PKP1

Bevezetés

A kardiovaszkuláris megbetegedések (CVD) az Egészségügyi Világszervezet adatai szerint a halálozások mintegy 32%-át okozzák. Bár a CVD kockázata az életkor előrehaladtával nő, a CVD-ből adódó halálozások mintegy harmada 70 éven aluliakat érint. A kardiovaszkuláris megbetegedések általában multifaktoriális kórképek, amelyek kialakulásához mind környezeti és életmódbeli, mind genetikai tényezők hozzájárulhatnak. A szívelégtelenségek prevalenciája növekszik és a hosszútávú prognózis általában rossz.

Az elmúlt évtizedben egyre több kutatás foglalkozik a szív és az azt körülvevő immunológiai környezet tanulmányozásával. Bebizonyosodott, hogy a szívben és annak közvetlen környezetében sokféle leukocita megtalálható. (1.ábra) Az immunrendszer sejtjes és humorális résztvevői is hozzájárulnak a szív fejlődésének és normál működésének fenntartásához. A különböző területek rezidens immunsejtjei kapcsolatot tartanak fent a kardiomiocitákkal, fibroblaszt és endotél sejtekkel citokineken és növekedési faktorokon keresztül (Nahrendorf 2018).



1. ábra A szív immunológiai környezete és a különböző területek rezidens leukocitái. Forrás: Nature Reviews | Immunology,

Filip K. Swirski and Matthias Nahrendorf, 2018

A savós hártával bélelt testüregek a szerózus membránnal asszociált immunrendszerrel rendelkeznek. Ilyen savós hártával bélelt ürege a mell- és hasüreg, valamint a perikardium is.

Az itt jelenlévő leukociták közül nagy százalékot tesznek ki a természetes immunrendszer B1 B-sejtjei. Ezek a sejtek első védelmi vonalként segítik a veleszületett és az adaptív immunrendszer sejtjeit. Az általuk termelt antitestek IgM típusú immunglobulinok, gyakran alacsony affinitású és polireaktív autoantitestek (C. Frieke Kuper 2021). A B1 sejtek autoimmun kórképekben betöltött fontos szerepe ma már egyértelműnek látszik (Byian Duan 2005). A pleura és peritóneum természetes immunrendszerének működéséről már viszonylag sok információval rendelkezünk, azonban a pericardiális üreg ilyen irányú vizsgálatai egyelőre nem számottevőek.

A perikardiális folyadék a szívet körülölelő szívburok, a pericardium, visceralis és parietalis rétegei közötti „olajozó” funkciót betöltő savós folyadék. A PF a vérplazmából származó ultraszűrlet mellett, a szívizom intersticiális folyadékából, valamint a perikardiális mezoteliális sejtek által termelt molekulákból áll össze. Egészséges emberben a perikardiális folyadék térfogata 15-35 ml, de különböző kórképek vagy fertőzések eredményeként a perikardiális folyadék összetétele megváltozhat. A perikardiális folyadék ionjainak megoszlása hasonló a vérplazmáéhoz (Konstantinos Vogiatzidis 2015). Fehérjekoncentrációja nagyjából a plazma koncentrációjának fele, habár néhány fehérje magasabb arányban fordul elő benne. Ilyen például az albumin, az agyi natriuretikus peptid vagy az endothelin-1 (Ali Fatehi Hassanabad 2021).

A pericardium és a perikardiális folyadék közösen tartják fenn a szív működéséhez szükséges homeosztatisztikus környezetet. A perikardiális folyadék összetétele tükröt mutat számunkra a szív állapotáról. A benne előforduló bioaktív anyagok koncentrációjának változása, és az itt jelenlévő sejtek összetétele sokféle kórlepről árulkodhat. A szívburok gyulladása esetén szignifikánsan megnövekedhet a pro-inflammatorikus citokinek koncentrációja és a beáramló leukociták mennyisége. Emellett az itt jelenlévő növekedési faktorok és biomarker molekulák információt adhatnak a szívizom állapotáról, a revascularizáció folyamatairól vagy akár ventrikuláris diszfunkcióról. (Ali Fatehi Hassanabad 2021).

A fentiek alapján tehát a perikardiális folyadék mechanikus, „olajozó” funkcióján túl diagnosztikus jelleggel is bír. Kutatócsoportunk közelmúltbeli eredményei alapján szívelégtelenségben a perikardiális folyadékban nagyszámú aktivált és memória sejt található (kézirat előkészületben).

Célkitűzések

Egyelőre igen kevés információ áll rendelkezésre a perikardiális üregben jelenlévő immunológiai környezetről. A Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt-és Immunbiológiai intézetében elvégzett előzetes vizsgálatok alapján a perikardiális folyadék nem várt módon gazdag és színes palettáját mutatja az aktivált és memória immunsejteknek. Vizsgálataink során szeretnénk egy átfogó képet kialakítani az itt található antitestekről, ezen felül azonosítani az általuk kötött fehérjéket.

1. Szívelégtelenségben szenvedő páciensek perikardiális folyadékmintáinak immunprecipitációja és az itt található immunkomplexek kinyerése.
2. A komplexekben található, lehetséges antigének azonosítása tömegspektrometriás módszerrel.
3. Az azonosított fehérjék elemzése és válogatása további vizsgálatokra.

Anyagok és módszerek

Mintagyűjtés

A vizsgálatokhoz a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika által a Nemzeti Szívprogram keretében a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet számára eljuttatott perikardiális folyadék minták vizsgálatát végezzük el ETT TUKEB engedély birtokában. A minták szívtranszplantációra kerülő recipiens betegekből származnak. A mintákat -80°C-on tároltuk a felhasználásig.

Immunprecipitáció

A mintákat a Pierce Direct IP Kit (Thermo Fisher) segítségével tisztítottuk a javasolt protokoll szerint. A használt antitest nyúlból származó polivalens IgGAM (Sigma-Aldrich). A mintákat és az immunprecipitátumokat -80°C-on tároltuk a további vizsgálatokig.

Protein koncentráció meghatározás

A natív és az immunprecipitált minták összefehérje koncentrációját fotometriás módszerrel, NanoDrop készüléken mértük, 280 nm-en.

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

Az immunprecipitátumokat és a perikardiális folyadékok mintákat SDS (sodium-dodecilszulfát) poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk. A mintákhoz 1 M-os DTT-t, és a Pierce

Direct IP Kit utasításai szerint Sample Puffert (5x) adtunk. Ezután 95°C-on 5 percig denaturáltuk, jégre tettük, majd 20 µL-t vittünk fel a géltre. Használt gél: Bio-Rad: Mini-Protein TGX, 4-20%. Létra: Spectra Multicolor road Range Protein Ladder. Futtatás: 140V-on 5 percig, majd 100V-on 60 percig zajlott, jéggel hűtött futtató kádban. Futtatás után a gél 30 percig inkubáltuk pufferben (10% metanol, 7% ecetsav) rázatás közben. Ezután SYPRO Ruby (Thermo Fisher) fehérje festékekkel festettük a javasolt protokoll szerint.

Western blot

A fehérjéket ezután polivinilidén-fluorid (PVDF, Thermo Fisher) membránra blottoltuk át (1.5 óra). Használt transzfer puffer: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 20 v/v% metanol; pH 8.3. A membránokat SuperBlock (TBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific) oldattal blokkoltuk szobahőn 1 órán keresztül. Ezután egérben termelt HRP-jelölt antihumán IgG és IgM antitestekkel inkubáltuk őket 2 órán át rázatás mellett. A kemilumineszcens jelet a Clarity MaxWestern ECL Substrate (Bio- Rad) felhasználásával detektáltuk. A detektálást Imager Chemi Premium (VWR) készülékkel, a kiértékelést ImageLab (Bio-Rad) szoftver segítségével végeztük.

Tömegspektrometria

Az SDS-PAGE, a Western blot és a NanoDrop mérések alapján a négy legígéretesebbnek tűnő immunprecipitátumot küldtük el tömegspektrometriás vizsgálatra. A vizsgálatot az ELKH-TTK-val együttműködésben végeztük, Dr. Drahos Lászlóval és Szabó Dániellel kollaborációban.

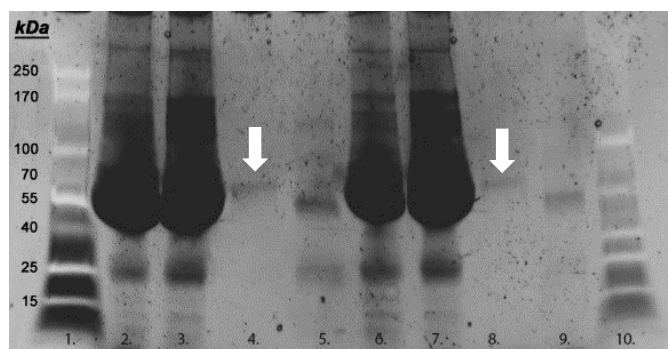
Adatelemzés

A tömegspektrometriával kapott eredményeket a PubMed, UniProt és STRING adatbázisok segítségével elemeztük.

Eredmények

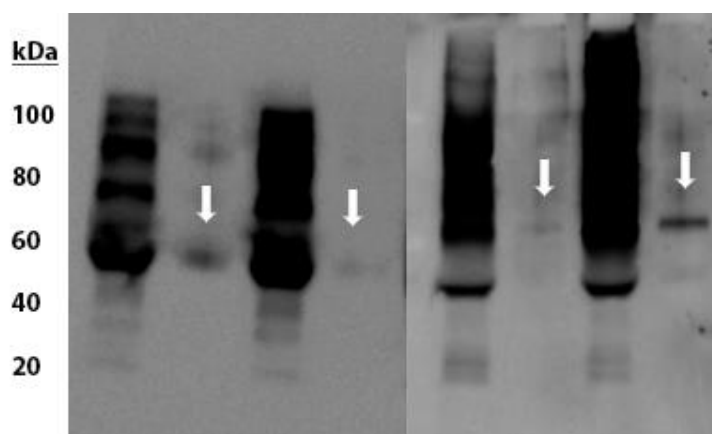
Az direkt fehérjekoncentráció mérésének eredménye a perikardiális folyadékminták (n=4) esetében: $21,22 \pm 1,83$ mg/ml (átlag $\pm$ SD) volt. Az immunprecipitátumok esetében mért koncentráció pedig $0,99 \pm 0,71$ mg/ml (átlag $\pm$ SD) volt.

Az összefehérje koncentráció meghatározása után SDS-PAGE vizsgálattal mutattuk ki a jelenlévő IgG nehézláncát. A 2. ábrán látható a futtatás eredménye. Mind a mintákban, mind a precipitátumban jelentős mennyiségű IgG molekulát detektáltunk.



2. ábra SDS- PAGE futtatás eredménye. 1. zseb: létra, 2-3. zseb: PF minta, 4. zseb: precipitált minta, 5. zseb: IgG kontroll, 6-7. zseb: PF minta, 8. zseb: precipitált minta, 9. IgG kontroll, 10. zseb: létra. Az IgG nehézláncát fehér nyíl jelöli.

Ezután specifikusan jelöltük a keresett antitesteket, és kimutattuk az IgG és IgM molekulák jelenlétét a mintáinkban. A 3. ábrán láthatók a Western blotból származó eredményeink. Mindkét jelölt immunglobulin kimutatható mennyiségben jelen volt az immunprecipitált mintákban.



3. ábra Western blot eredmények: **Bal oldal:** IgG nehézlánc 55kDa-nál. **Jobb oldal:** IgM nehézlánc 75 kDa-nál.

A kapott eredmények alapján négy mintánkat küldtük tovább tömegspektrometria vizsgálatra.

A tömegspektrometria során 117 fehérjét sikerült azonosítani az immunprecipitátumokból. Ezekből a kreatin típusú, feltehetőleg kontamináció révén bekerülő molekulákat, valamint a „vak” mintában is előforduló proteineket kizártuk. Az IgG és IgM molekulák jelenléte a tömegspektrometriás vizsgálattal is megerősítést nyert. A további elemzés során az immunkomplexben antigénként szóba jöhető fehérjéket kerestünk, amelyek feltehetőleg az IgG és IgM molekulákhoz, azok Fv régióján keresztül kapcsolódnak. Ezért kizártuk azokat a fehérjéket, amik az irodalom alapján képesek aspecifikusan kötni az immunglobulinokhoz.

Ebbe a kategóriába a komplement fehérjéken kívül két másik fehérje sorolható: a prolactin-inducible protein (Will Wei-Cheng Chiu 2003) és a clusterin (Mark R. Wilson 1992). A fennmaradó fehérjék közül a szemikvantitatív tömegspektrometriás elemzés alapján a legnagyobb mennyiségben előforduló molekulákat az *1. táblázat* tartalmazza.

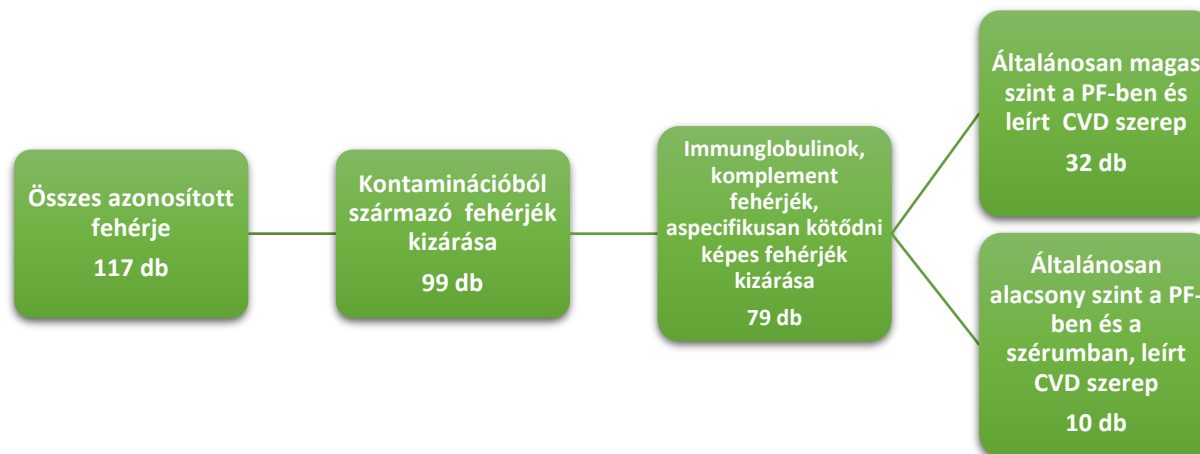
Azonosított fehérje	Accession number	Általános előfordulás a perikardiális folyadékban	Leírt CVD vonatkozás
Serotransferrin	P02787	igen	van (Stephan von Haehling 2018)
Alpha-2-HS-glycoprotein	P02765	igen	van (Katsuhito Mori 2012)
Retinol-binding protein 4	P02753	igen	van (Yanjing Ji 2022)
Hemopexin	P02790	igen	van (Francesca Vinchi 2013)
Vitamin D-binding protein	P02774	igen	van (Viktor Peršić 2019)
Alpha-1-antitrypsin	P01009	igen	van (Sebastian Fährndrich 2017)
Vitronectin	P04004	igen	van (Özlem Balci Ekmekci 2005)
Kininogen-1	P01042	igen	van (Xiaoli Cheng 2021)
Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311	igen	van (Soltani Leila 2020)
Intelectin-1	Q8WWA0	igen	nem ismert
Alpha-1-acid glycoprotein 1	P02763	igen	nem ismert
Alpha-1B-glycoprotein	P04217	igen	nem ismert
Beta-2-glycoprotein 1	P02749	igen	van (P G de Groot 2000)
Haptoglobin	P00738	nem	van (Shmuel Somer 2020)
Antithrombin-III	P01008	igen	van (M G Conlan 1992)
Desmoplakin	P15924	nem	van (Eric D Smith 2020)

Cystatin-C	P01034	igen	van (Malcolm West, és mtsai. 2022)
Fibulin-1	P23142	igen	van (Alexandra Scholze 2013)
Gelsolin	P06396	igen	van (Vaibhav B Patel 2018)
Fibrinogen beta chain	P02675	igen	van (Marlien Pieters Maylene Ferreira 2021)
Alpha-1-antichymotrypsin	P01011	igen	van (Chen-Chi Chang 2022)
Ceruloplasmin	P00450	igen	van (Antonio P. Arenas de Larriva 2020)
Alpha-1-acid glycoprotein 2	P19652	igen	nem ismert
Fibrinogen alpha chain	P02671	igen	van (Marlien Pieters Maylene Ferreira 2021)
Dermcidin	P81605	igen	van (Giovanni Esposito 2015)
Beta-2-microglobulin	P61769	nem	van (Fanchao Shi 2021)
Histidine-rich glycoprotein	P04196	igen	nem ismert
Serum paraoxonase	P27169	igen	van (W. H. Wilson Tang 2013)
Keratinocyte prozseb-rich protein	Q5T749	nem	nem ismert
Protein AMBP	P02760	igen	nem ismert

1. táblázat A szemikvantitatív tömegspektrometria vizsgálat alapján az első 30 leggyakoribb fehérje a mintákban, általános előfordulásuk a perikardiális folyadékban és leírt CVD jelentőségük

Ezután a fehérjéket aszerint vizsgáltuk, hogy a szakirodalom szerint milyen magas az átlagos szintjük a perikardiális folyadékban. Ehhez két, a perikardiális folyadék tömegspektrometriás vizsgálatának eredményeit összefoglaló tanulmányt használtam forrásként (Junaid Ullah Satwat Hashmi 2021)(Fei Xiang 2013), majd a már leírt kardiovaszkuláris szerepük alapján csoportosítottam őket. Összesen 10 olyan fehérjét sikerült azonosítanunk, amelyet előzőleg nem írtak le perikardiális folyadék minták vizsgálatakor, szintjük a szérumban nem magas, és

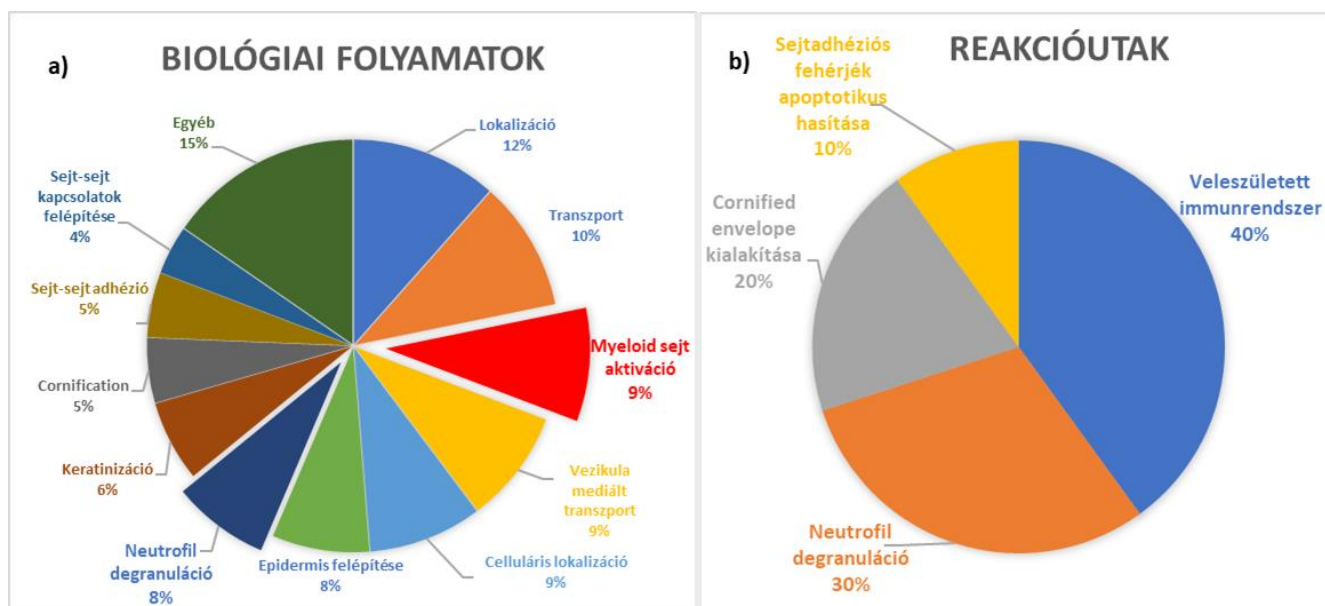
összefüggésbe hozhatók kardiovaszkuláris megbetegedésekkel (2. táblázat). A fenti elemzés folyamatát a 4. ábra mutatja be. Ezt a tíz fehérjét ezután funkcionális vizsgálatnak vetettem alá a STRING adatbázist használva. Az eredményeket a 5. ábra mutatja.



4. ábra A tömegspektrometriával azonosított fehérjék elemzésének folyamatábrája

Identified Proteins	GE	Accession Number
Desmoplakin	DSP	P15924
Junction plakoglobin	JUP	P14923
Lipopolysaccharide-binding protein	LPB	P18428
Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	TGM3	Q08188
Apolipoprotein(a)	LPA	P08519
Thioredoxin	TXN	P10599
Desmocollin-1	DSC1	Q08554
Serpin B12	SERPINB12	Q96P63
Fatty acid-binding protein 5	FABP5	Q01469
Plakophilin-1	PKP1	Q13835

2. táblázat Általunk a perikardiális folyadékban azonosított, az irodalmi forrásként használt vizsgálatokban nem detektált fehérjék.



5. ábra Az általunk detektált 10 fehérje funkcionális vizsgálata. a) Biológiai folyamatokban való részvétel szerint b) reakcióutakban való részvétel szerint

Diszkusszió

A perikardiális folyadék eddigi vizsgálatai során nagyszámú és változatos sejtpopuláció jelenlétét mutatták ki. A Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében végzett korábbi vizsgálatok nagyszámú aktivált és memória immunsejtet azonosítottak szívelégtelenségben szenvedő betegek perikardiális folyadék mintáiban. Érdeklődésünk középpontjában a limfocitákat aktiváló, perikardiális folyadékban megtalálható antigének megismerése állt. Kardiovaszkuláris megbetegedésekkel kapcsolatos antitesteket és az aktiváló antigént korábban már leírtak pár esetben. Ezek az autoantitestek valamilyen bakteriális fertőzéssel voltak kapcsolatban (D. Simon 2018) vagy SLE kórképpel összefüggésben detektálták őket (R. P. Goswami 2018). Emellett régóta sejthető, hogy a miozin elleni autoantitestek szerepet játszanak bizonyos kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában (Udi Nussinovitch & Yehuda Shoenfeld 2011). A kardiovaszkuláris betegségekkel összefüggésbe hozható autoantitestek vizsgálataira irányuló kutatások legnagyobb részben a betegek szérum mintáit vizsgálták. A bevezetésben már ismertetett, szívizomszövettel fenntartott közvetlen kapcsolat miatt tartottuk fontosnak az antigén-antitest interakciók vizsgálatát a perikardiális folyadék közvetlen vizsgálatával.

Western blot vizsgálat megerősítette az IgG és IgM antitestek jelenlétét a perikardiális folyadékból immunprecipitált mintákban. Feltevésünk szerint az immunprecipitáció után, az immunglobulinok mellett megtalálható fehérjék az immunkomplex kialakításában résztvevő antigének voltak. A tömegspektrometriás vizsgálat során azonosított 117 fehérjét a már ismertetett lépésekben szűkítettük végül 42 olyan antigén jelöltre, amelyeknek van ismert kapcsolata a kardiovaszkuláris megbetegedésekkel. Ezen belül is két csoportra oszthatjuk a talált fehérjéket az alapján, hogy általánosan milyen magas a szintjük a plazmában, illetve a perikardiális folyadékban. Kilenc olyan fehérjét sikerült azonosítanunk, amelyet korábban még nem írtak le a perikardiális folyadék vizsgálatakor.

A desmoplakin a dezmoszómák egyik fő molekuláris komponense, feladata a dezmoszóma összekapcsolása az intermedier filamentumokkal. Jelenléte elengedhetetlen a szívizom normál működéséhez. A közelmúltban leírták, hogy a fehérje mutációja a cardiomyopathia egy különleges formájához vezethet (Eric D. Smith, és mtsai. 2020).

A junction plakoglobin szintén a dezmoszómák egyik alkotóeleme, emellett a sejtkapcsoló struktúrákban is megtalálható a kardiomiociták kapcsolódási pontjainál. Szerepe a cadherine

összekapcsolása a sejtvázzal. Knock-out egerekben a fehérje hiánya a kardiomiociták pusztulásához, leukociták és gyulladásos mediátorok megjelenéséhez vezetett a myocardium területén és cardiomyopathia kialakulásához vezetett. (Jifen Li 2011).

Lipopolysaccharide-binding protein a veleszületett immunrendszer egyik molekulája, ami az LPS lipidA összetevőjéhez köt. Az LBP megemelkedett plazma szintje szoros összefüggésben áll a koszorúér betegségek kialakulásával (Yang Yu & Guohua Song 2020).

Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E/ Transglutaminase E a lizin és glutamin oldalláncok közötti keresztkötések létrehozásában részvevő enzim. A transzaminázok családjába tartozik, aminek több tagjáról is leírták a cardiovasculáris megbetegedésekben betöltött szerepüket (David C Sane 2007).

Az apolipoprotein(a) a lipoprotein(a) egyik fő alkotóeleme. Szerin proteáz aktivitással rendelkezik és autoproteolízisre is képes. Az LP(a) különböző fenotípusai és izoformái összefüggésben vannak a koszorúér megbetegedések kialakulásával (C Gazzaruso 1999). Ezen felül a lipoprotein(a) a kardiovaszkuláris megbetegedések azonosított fontos rizikófaktor (Pia R. Kamstrup 2007).

Desmocollin-1 a dezmoszóma felépítésében résztvevő molekula. Szerepe lehet a kardiovaszkuláris megbetegedések kialakulásában azáltal, hogy gátolja a HDL biogenezist az Apolipoprotein A-I megkötésén keresztül (Hong Y Choi 2018).

A serpin B12 a serpin szupercsaládba tartozó szerin proteáz inhibitor. Gátolja a tripszin és plazmin működését. A serpin család több tagjáról is leírták már cardiovasculáris érintettségüket (Marie-Christine Bouton 2022).

Fatty acid-binding protein 5 a hosszúláncú zsírsavak szállítását végzi intracellulárisan a citoszolban és a sejtmagba. A lipid metabolizmusban betöltött szerepük, és az ér endothel homeosztázisának fenntartása miatt CVD vonatkozásuk jelenleg is kutatás alatt áll.

A plakophilin-1 a sejtkapcsoló struktúrák kialakításában résztvevő molekula. A plakophilin családba tartozó fehérjék az embrionális fejlődésben, köztük a szív morfogenezisében és a sejtkapcsolatok fenntartásában játszanak szerepet (Katja S. Grossmann 2004)

A fehérjék funkcionális elemzése során azt láthatjuk, hogy közülük 7 fehérje vesz részt a myeloid sejtek aktivációjában (GO:0002275): LBP, DSC1, PKP1, SERPINB12, FABP5, DSP,

JUP. Hat fehérje pedig a neutrofil degranulációban (GO:0043312) játszik szerepet: DSC1, PKP1, SERPINB12, FABP5, DSP, JUP. A 10 fehérjéből 8 fehérje vesz részt a veleszületett immunrendszer valamely jelátviteli útjában (HSA-168249): LBP, DSC1, PKP1, SERPINB12, FABP5, DSP, TX JUP, közülük 6 pedig a neutrofil degranulációhoz vezető útvonalban is (HSA-6798695) érintett: DSC1, PKP1, SERPINB12, FABP5, DSP, JUP.

Az azonosított fehérjék másik csoportját a perikardiális folyadékban általánosan magas koncentrációban előforduló molekulák képezték. Ezeknek 60%-a vesz részt az immunrendszer folyamataiban (GO:0002376), 47%-a az immunválasz kialakításában (GO:0006955), 22% a neutrofilek mediálta immunitás kialakításában (GO:0002446), 15% pedig a neutrofilek degranulációjában játszik szerepet (GO:0043312). A legtöbb fehérje, 91% a biológiai szabályozásban (GO:0065007) játszik szerepet.

A fehérjék állandó jelenléte megfelelő célponttá teszi őket autoantitestek képződéséhez, amelyben szerepe lehet a savós hártó B1 B sejtjeinek. Mivel a B1 B sejtek által termelt immunglobulinok ismert módon polireaktív tulajdonsággal bírnak, feltételezhető, hogy az autoantitestek többféle antigénhez kapcsolódnak a betegek perikardiális folyadékában. és ezek immunglobulinok vesznek részt az autoimmunitás kialakításának első lépéseiben. Emellett a precipitátumokban IgG molekulát is detektáltunk, amiből arra következtetünk, hogy a patológias folyamatok későbbi szakaszában már ezek a nagy specifitású antitestek is részt vehetnek.

Természetesen a detektált fehérjéket további vizsgálatoknak kell alávetnünk, hogy megerősíthessük feltevésünket lehetséges antigén szerepükről. További perikardiális folyadék és vérplazma mintákat vizsgálunk, mind transzplantációs recipiensektől, mind kontrollként használt donoroktól. Külön vizsgáljuk az antihumán-IgM és antihumán-IgG-vel precipitált mintákat. A tömegspektrometria során virális és bakteriális antigéneket is megpróbálunk azonosítani. A kiválasztott fehérjékkel szemben, humorális és celluláris immunreaktivitás vizsgálatokat fogunk végezni ELISPOT és áramlási citometria segítségével.

Reményeink szerint így közelebb kerülhetünk az immunrendszer és a kardiovaszkuláris megbetegedések közötti kapcsolat, valamint a szívbetegségben szenvedő páciensekre jellemző immunfelismerési mintázat mélyebb megismeréséhez, azaz információt nyerhetünk a szívelégtelenség során zajló immunológiai folyamatokról.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Buzás Edit intézetvezetőnek, hogy lehetővé tette számomra, hogy TDK munkámat a SOTE Genetika, Sejt-és Immunbiológiai intézetben végezzem. Pálóczi Krisztinának a mindenre kiterjedő segítségét és útmutatását munkám során.

Szeretném megköszönni Dr. Drahos Lászlónak és Szabó Dánielnek az MS mérések elvégzését.

Szeretném megköszönni a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikának a betegminták biztosítását.

Szeretném megköszönni Bálintnak a sok türelmet és támogatást.

Hivatkozások

- Alexandra Scholze, Else-Marie Bladbjerg, Johannes J Sidelmann, Axel C P Diederichsen, Hans Mickley, Mads Nybo, W Scott Argraves, Peter Marckmann, Lars M Rasmussen. „Plasma concentrations of extracellular matrix protein fibulin-1 are related to cardiovascular risk markers in chronic kidney disease and diabetes.” *Cardiovascular Diabetology* ., 2013.
- Ali Fatehi Hassanabad, Anna Zarzycki , Justin F Deniset , Paul WM Fedak. „An overview of human pericardial space and pericardial fluid.” *Cardiovascular Pathology*, 2021.
- Antonio P. Arenas de Larriva, Laura Limia-Pérez, Juan F. Alcalá-Díaz, Alvaro Alonso, José López-Miranda, and Javier Delgado-Lista. „Ceruloplasmin and Coronary Heart Disease—A Systematic Review.” *Nutrients*, 2020.
- Byian Duan, Laurence Morel. „Role of B-1a cells in autoimmunity.” *Autoimmunity Reviews*, 2005.
- C Gazzaruso, A Garzaniti, D Geroldi, G Finardi. „Genetics and cardiovascular risk: a role for apolipoprotein(a) polymorphism.” *Cardiologia*, 1999.
- C. Frieke Kuper, Raymond H. H. Pieters, and Jolanda H. M. van Bilsen. „Nanomaterials and the Serosal Immune System in the Thoracic and Peritoneal Cavities.” *International Journal of Molecular Sciences*, 2021.
- Cameron J World, Hideyuki Yamawaki, Bradford C Berk. „Thioredoxin in the cardiovascular system.” *Journal of Molecular Medicine*, 2006.
- Chen-Chi Chang, I-Jung Tsai , Wen-Chi Shen , Hung-Yi Chen Po-Wen Hsu and Ching-Yu Lin. „A Coronary Artery Disease Monitoring Model Built from Clinical Data and Alpha-1-Antichymotrypsin.” *Diagnostics*, 2022.
- D. Simon, O. Gilicze, N. Farkas,‡ J. Najbauer , P. Nemeth L. Lenard and T. Berki. „Correlation of natural autoantibodies and cardiovascular disease-related anti-bacterial antibodies in

- pericardial fluid of cardiac surgery patients.” *Clinical and Experimental Immunology*, 2018: 55–63.
- David C Sane, Jimmy L Kontos, Charles S Greenberg. „Roles of transglutaminases in cardiac and vascular diseases.” *Frontiers in Bioscience*, 2007.
- Eric D Smith, Neal K Lakdawala 2, Nikolaos Papoutsidakis 3, Gregory Aubert 4, Andrea Mazzanti 5, Anthony C McCanta 6, Prachi P Agarwal 7, Patricia Arscott , Lisa M Dellefave-Castillo , Esther E Vorovich , Kavitha Nutakki , Lisa D Wilsbacher ,Silvia G Pr. „Desmoplakin Cardiomyopathy, a Fibrotic and Inflammatory Form of Cardiomyopathy Distinct From Typical Dilated or Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.” *Circulation*, 2020.
- Eric D. Smith, MD1, és mtsai. „Desmoplakin Cardiomyopathy, a Fibrotic and Inflammatory Form of Cardiomyopathy Distinct from Typical Dilated or Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy.” *Circulation*, 2020.
- Fanchao Shi, Luanluan Sun, Stephen Kaptoge. „Association of beta-2-microglobulin and cardiovascular events and mortality: A systematic review and meta-analysis.” *Atherosclerosis*, 2021.
- Fei Xiang, Xuejiang Guo,Wen Chen,Jing Wang,Tao Zhou,Fuhua Huang,Changchun Cao,Xin Chen. „Proteomics analysis of human pericardial fluid.” *Proteomics*, 2013.
- Francesca Vinchi, Lucia De Franceschi, Alessandra Ghigo, Tim Townes, James Cimino,Lorenzo Silengo, Emilio Hirsch, Fiorella Altruda and Emanuela Tolosano. „Hemopexin Therapy Improves Cardiovascular Function by Preventing Heme-Induced Endothelial Toxicity in Mouse Models of Hemolytic Diseases.” *Circulation*, 2013.
- Giovanni Esposito, Gabriele Giacomo Schiattarella, Cinzia Perrino , Fabio Cattaneo , Gianluigi Pironti , Anna Franzone , Giuseppe Gargiulo , Fabio Magliulo , Federica Serino , Giuseppe Carotenuto , Anna Sannino , Federica Ilardi, Fernando S. „Dermcidin: a skeletal muscle myokine modulating cardiomyocyte survival and infarct size after coronary artery ligation.” *Cardiovascular Research*, 2015.
- Hong Y Choi, Isabelle Ruel, Abba Malina, David R Garrod, Michael N Oda, Jerry Pelletier, Adel Schwertani, Jacques Genest. „Desmocollin 1 is abundantly expressed in atherosclerosis and impairs high-density lipoprotein biogenesis.” *European Heart Journal*, 2018.

- Jifen Li, David Swope, Natalia Raess, Lan Cheng, Eliane J. Muller, Glenn L. Radice. „Cardiac Tissue-Restricted Deletion of Plakoglobin Results in Progressive Cardiomyopathy and Activation of β -Catenin Signaling.” *Molecular and Cellular Biology*, 2011.
- Junaid Ullah Satwat Hashmi, Arslan Ali, Faisal Khan,c Shahid Ahmed Sami,Nageeb Basir, Syeda Saira Bokhari, Hasanat Sharif Hesham R. El-Seedifg, and Syed Ghulam Musharraf. „Pericardial fluid proteomic label-free quantification of differentially expressed proteins in ischemic heart disease patients with systolic dysfunction by nano-LC-ESI-MS/MS analysis.” *RSC Advances*, 2021.
- Junaid Ullah, Satwat Hashmi, Arslan Ali, Faisal Khan, Shahid Ahmed Sami, Nageeb Basir,Syeda Saira Bokhari, Hasanat Sharif, Hesham R. El-Seedi, and Syed Ghulam Musharraf. „Pericardial fluid proteomic label-free quantification of differentially expressed proteins in ischemic heart disease patients with systolic dysfunction by nano-LC-ESI-MS/MS analysis.” *RSC Advances*, 2021.
- Katja S. Grossmann, 1 Christine Grund, Joerg Huelsken, Martin Behrend,1 Bettina Erdmann, Werner W. Franke, and Walter Birchmeier. „Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation.” *Journal of Cell Biology*, 2004.
- Katsuhito Mori, Masanori Emoto, and Masaaki Inaba. „Fetuin-A and the cardiovascular system.” *ADVANCES IN CLINICAL CHEMISTRY*, 2012.
- Konstantinos Vogiatzidis, Sotirios G.Zarogiannis, Isaac Aidonidis, Evgeniy I.Solenov, Paschalis-Adam Molyvdas, KonstantinosI.Gourgoulisanis and Chrissi Hatzoglou. „Physiology of pericardial fluid production and drainage.” *FrontiersinPhysiology*, 2015.
- M G Conlan, A R Folsom, A Finch, C E Davis, G Marcucci, P Sorlie, K K Wu. „Antithrombin III: associations with age, race, sex and cardiovascular disease risk factors. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators.” *Journal of Thrombosis and Haemostasis* , 1992.
- Malcolm West, PhD, MSc Adrienne Kirby, MD Ralph A. Stewart, MD Stefan Blankenberg, és MD David Sullivan. „Circulating Cystatin C Is an Independent Risk Marker for Cardiovascular Outcomes, Development of Renal Impairment, and Long-Term Coronary Heart Disease: The LIPID Study.” *Journal of the American Heart Association*, 2022.

- Marie-Christine Bouton, Javier Corral and Alexandra R. Lucas. „Editorial: The Serpin Family in the Cardiovascular System.” *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2022.
- Mark R. Wilson, S. Easterbrook-Smith. „Clusterin binds by a multivalent mechanism to the Fc and Fab regions of IgG.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1992.
- Marlien Pieters Maylene Ferreira, Moniek P M de Maat , Cristian Ricci. „Biomarker association with cardiovascular disease and mortality - The role of fibrinogen. A report from the NHANES study.” *Thrombosis Research*, 2021.
- Nahrendorf, Filip K. Swirski and Matthias. „Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease.” *Nature Reviews | Immunology*, 2018.
- Özlem Balci Ekmekci, Hakan Ekmekci. „Vitronectin in atherosclerotic disease.” *Clinica Chimica Acta*, 2005.
- P G de Groot, B Bouma, B C Lutters, R H Derksen. „Lupus anticoagulant in cardiovascular diseases: the role of beta2-glycoprotein I.” *Annals of Medicine*, 2000.
- Pia R. Kamstrup, Marianne Benn, Anne Tybjaerg-Hansen and Børge G. Nordestgaard. „Extreme Lipoprotein(a) Levels and Risk of Myocardial Infarction in the General Population.” *Circulation*, 2007.
- R. P. Goswami, G Sircar, A Ghosh, P Ghosh. "Cardiac tamponade in systemic lupus erythematosus." *QJM: An International Journal of Medicine*, 2018: 83–87.
- Sebastian Fährndrich, Frank Biertz, Annika Karch, Björn Kleibrink, Armin Koch, Helmut Teschler, Tobias Welte, Hans-Ulrich Kauczor, Sabina Janciauskiene, Rudolf A. Jörres, Timm Greulich, Claus F. Vogelmeier & Robert Bals. „Cardiovascular risk in patients with alpha-1-antitrypsin deficiency.” *Respiratory Research*, 2017.
- Shmuel Somer, Andrew P Levy. „The Role of Haptoglobin Polymorphism in Cardiovascular Disease in the Setting of Diabetes.” *International Journal of Molecular Sciences* , 2020.
- Soltani Leila, Kheirouri Sorayya, Enamzadeh Elgar. „Elevated serum levels of S100A1 and zinc α 2-glycoprotein in patients with heart failure.” *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2020.

Stephan von Haehling, MD, PHD Nicole Ebner, PHD, Ruben Evertz, MD, Piotr Ponikowski, MD, PHD. „Iron Deficiency in Heart Failure.” 2018.

Udi Nussinovitch & Yehuda Shoenfeld. „The Clinical and Diagnostic Significance of Anti-myosin Autoantibodies in Cardiac Disease.” *Clinic Rev Allerg Immunol*, 2011.

Vaibhav B Patel, Pavel Zhabyeyev Xueyi Chen Faqi Wang , Manish Paul , Dong Fan , Brent A McLean , Ratnadeep Basu , Pu Zhang , Saumya Shah John F Dawson , W Glen Pyle Mousumi Hazra , Zamaneh Kassiri Saugata Hazra. „PI3K α -regulated gelsolin activity is a critical determinant of cardiac cytoskeletal remodeling and heart disease.” *Nature Communications*, 2018.

Viktor Peršić¹, 2#, Damir Rajčević, Elitza Markova-Car, Leon Cindrić³, Rajko Miškulin, Marta Žuvić, Sandra Kraljević Pavelić. „Vitamin D-binding protein (rs4588) T/T genotype is associated with antero-septal myocardial infarction in coronary artery disease patients.” *Annals of Translational Medicine*, 2019.

vllv. dátum nélkül.

W. H. Wilson Tang, MD Jaana Hartiala, MS, Yiyang Fan, PhD, Yuping Wu, PhD, Alexandre F.R. Stewart, PhD, Jeanette Erdmann, PhD, Sekar Kathiresan, MD, The CARDIoGRAM Consortium, Robert Roberts, MD, Ruth McPherson, MD PhD, Hooman Allayee, PhD,. „Clinical and Genetic Association of Serum Paraoxonase and Arylesterase Activities with Cardiovascular Risk.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2013.

Will Wei-Cheng Chiu, Lawrence William Chamley. „Human seminal plasma prolactin-inducible protein is an immunoglobulin G-binding protein.” *Journal of Reproductive Immunology*, 2003.

Xiaoli Cheng, Dan Liu , Haixu Song , Xiaoxiang Tian , Chenghui Yan , Yaling Han. „Overexpression of Kininogen-1 aggravates oxidative stress and mitochondrial dysfunction in DOX-induced cardiotoxicity.” *Biochem Biophys Res Commun.*, 2021.

Yang Yu & Guohua Song. „Lipopolysaccharide-Binding Protein and Bactericidal/Permeability-Increasing Protein in Lipid Metabolism and Cardiovascular Diseases.” *Lipid Transfer in Lipoprotein Metabolism and Cardiovascular Disease*, 2020.

Yanjinɡ Ji, Jinyou Song, Tianhong Su and Xiaosong Gu. „Adipokine Retinol Binding Protein 4 and Cardiovascular Diseases.” *Frontiers in Physiology*, 2022.