

Az Irgm3 GTPáz vizsgálata a kölcsönható molekulákon keresztül- egy új lehetséges út a Toxoplasma gondii fertőzés elkerülésére

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Orosz Anita

Biológia MSc. 2. éves hallgató

Immunology Frontier Research Center, Osaka University

Témavezetők:

Prof. Yamamoto Masahiro

Assistant Prof. Sasai Miwa

Küldő intézmény:

Eötvös Loránd Tudományegyetem



Tartalomjegyzék

Abstract	3
Absztrakt	4
Bevezetés	5
<i>A Toxoplasma gondii főbb klonális altípusai:</i>	5
<i>A fertőzés módja:</i>	7
<i>A gazdaszervezet válasza a parazitafertőzésre:</i>	8
<i>A p47 GTPázok az emberi genomban:</i>	10
Anyagok és módszerek	13
Eredmények	15
<i>Az Irgm3 hatása a parazita sejtől való eltávolítására</i>	15
<i>Jelenleg ismeretlen, Irgm3-mal együttműködő molekulák vizsgálata, amelyek fontos szereplői az IFN-γ mediált Toxoplasma gondii elleni immunválaszban</i>	17
<i>p47 GTPáz család új tagjainak azonosítása tömegspektrometriás vizsgálattal</i>	19
Diskusszió	23

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite that causes infection in nearly all species among the vertebrates. It poses a serious threat to humans as well: pregnant women and immunocompromised individuals are especially endangered. The most virulent strains have evolved a set of genes coding special protein kinases that enable parasite to evade host immune response in many different ways. On the other hand, previous researches have confirmed that the host species, mostly mice, are capable of eliminating the parasite from the cells by stripping them apart from their protective niche. The IFN- γ inducible proteins coded by the IRG gene family members constitute one of the most powerful resistance mechanisms of the innate immune system against several important intracellular pathogens. In GTP-bound state, these proteins are capable of disrupting parasite containing vacuole and fuel parasite egression.

The aim of my current research was to thoroughly examine the parasite clearing ability of the so called Irgm3 protein, which is said to be one of the most important elements in the mechanism stated above. I tried to identify the molecules that interact with Irgm3 using Mass spectrum analysis. To do so, I produced different retrovirus vectors to express various N- or C-terminal tagged Irgm3 and tested whether the tagged proteins restore the deficiency of Irgm3-KO cells. My results affirmed, that not only non-tagged Irgm3, but also both N- and C-terminal tagged Irgm3 expression profoundly reduced the number of live parasites in response to IFN- γ stimulation, suggesting a successful restoration of tagged Irgm3 in Irgm3-deficient cells. Therefore these constructions are suitable to detect the proteins which are in direct interaction with Irgm3 and which are definitely an integral part of the immune reaction on eliminating intracellular parasites.

Absztrakt

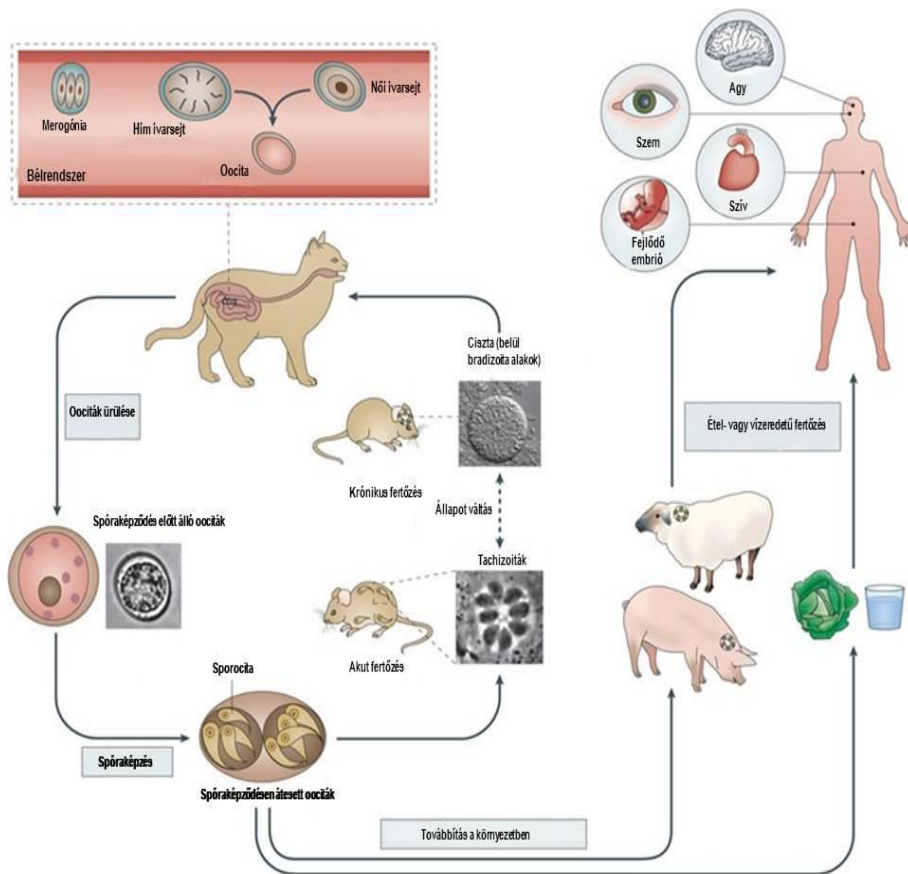
Az *Apicomplexa* törzsbe tartozó *Toxoplasma gondii* egy olyan intracellulárisan élősködő obligát parazita, amely képes bármely melegvérű élőlény megfertőzésére. Ez alól nem kivétel az ember sem: kiváltképp érintettek a terhes nők illetve az immunhiányos egyének. A parazita legvirulensebb válfajai képesek saját speciális protein kinázaiknak köszönhetően kitérni a gazdaszervezet immunválasza alól megnehezítve ezáltal a védekezést velük szemben. Ugyanakkor korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a gazdaszervezetek – különösen az egér, rendelkeznek a veleszületett immunrendszer egy olyan kiemelten fontos elemével, mint az ún. IRG géncsalád, amely képes az intracelluláris kórokozókkal szemben hatékony válaszreakció kialakítására. A gének által kódolt fehérjék a parazitát védő vakuólum membránjának szétesését okozva eliminálják azt a szervezetből. Jelen vizsgálatom célja az ebben a folyamatban résztvevő Irgm3 fehérje anti-parazita hatásának vizsgálata a fehérjével kölcsönhatásban működő egyéb proteinek azonosításán keresztül. Ennek érdekében különböző flag-taggel ellátott Irgm3-at expresszáló retrovírus vektorokat készítettem és vizsgáltam, hogy a jelölt fehérjék kompenzálják-e az Irgm3-KO sejtek fenotípusát. A vizsgálataim igazolták, hogy a tag-gel ellátott Irgm3 alkalmazható a fehérjével interakcióban lévő proteinek kimutatására, amelyek minden bizonnyal szükségesek a parazitával szembeni immunreakció kialakulásához, ugyanis a flag-Irgm3 expressziója az Irgm3-KO sejtekben képes a fehérje eredeti anti-parazita hatásának visszaállítására.

Bevezetés

A *Toxoplasma gondii* egy intracellulárisan élősködő obligát parazita, amelyet elsőként a 20. század elején írtak le Észak-és Dél-Amerikában. Ez az eukarióta parazita a csúcsszerves spórások törzsének (*Phylum Apicomplexa*) tagja, így ő maga is rendelkezik a törzs jellegzetes szekretoros organellumával, amely az állat apikális oldalán található és a gazdaszervezet megfertőzését okozó ágensek ürítéséért felelős (2-5). A törzs evolúciós hatékonyságát mi sem mutatja jobban, minthogy a *Toxoplasma gondii*-t rokonai szálak fűzik többek között olyan hírhedt parazitákhoz is, mint a maláriát okozó *Plasmodium* fajok, amelyek világszerte több millió áldozatot szednek nap mint nap. A *Toxoplasma* maga is egy igen virulens faj, amely képes szinte bármely melegvérű gerinces megfertőzésére, habár a legtöbb esetben az egészséges élőlényeknél csupán látens fertőzést okoz. Sajnos az ember is igen gyakran áldozatul eshet a parazita fertőzésének. Társadalmunk olyan igen veszélyeztetett csoportjai, mint a terhes nők, vagy immunszuppresszált állapotban lévő személyek esetében (legyen az akár egy HIV fertőzött vagy kemoterápiás kezelésre járó beteg), egy *Toxoplasma gondii* fertőzés könnyen vezethet veleszületett rendellenességek kialakulásához a magzatban, sőt akár halálos toxoplazmózishoz is (6). Alapvetően az ember és sok más gerinces állat csupán köztesgazdája a parazitának, amely egyet jelent azzal, hogy a parazita szaporodásának szexuális fázisa csak és kizárólag az elsődleges gazdáknak számító macskafélék családjában (*Felidae*) zajlik le. Az oociták a macskák bélrendszerében jönnek létre, majd innen jutnak az ürülékkel a talajba, ahol lezajlik a meiózis folyamata, amely során a parazita elnyeri az egész életciklusa során legfertőzőbb formáját- létrejönnek a sporociták. Ezek képesek a köztes gazdák megfertőzésére, vagy akár a táplálékhálózatok útján visszajuthatnak a macskafélék emésztőcsatornájaiba beindítva ezzel egy újabb reprodukciós ciklust (1) (1. ábra). Sőt mi több, a spóráképzésen átesett oociták képesek hosszú hónapokig, vagy akár évekig is átvészelni a különböző környezeti hatások ingadozását, miközben mit sem veszítenek a fertőzőképességükből (7).

A Toxoplasma gondii főbb klonális altípusai:

Európában és Észak- Amerikában alapvetően három különböző típusát tudjuk megkülönböztetni a parazitának, amelyek dominánsan embereket vagy más emlős fajokat fertőznek (8). Annak ellenére, hogy genotípusukat tekintve szinte teljesen megegyeznek, virulenciájukban jelentős eltérést mutatnak (9). Kiemelkedik közülük az LD (100) értékkel



Nature Reviews | Microbiology

1. ábra A *Toxoplasma gondii* életciklusa (1) A parazita elsődleges gazdája a macskafélék, amelyek bélrendszerében zajlik a *Toxoplasma gondii* szexuális szaporodási ciklusa. Innen a diploid oociták az ürülékkel jutnak a külvilágba, ahol egy meiózis eredményeként létrejönnek a különösen fertőző sporociták. Az oociták hosszú időn át képesek a környezetben fennmaradni, valamint a víz és élelem megfertőzésén keresztül biztosítják útjukat a köztesgazdákhhoz is. A reprodukciós ciklus aszexuális szakasza ezekben a köztes gazdáknak játszódik le (pl: rágcsálókban). A gyorsan replikálódó tachizoitok az egész szervezetben akut, míg a lassan növekvő bradizoitok a szöveteken belül krónikus fertőzést okoznak. Az omnivór kapcsolatokon keresztül a parazita újra visszajuthat a macskákba, beindítva ezzel egy újabb szexuális szaporodási ciklust. Maga az ember is lehet köztesgazda, a fertőzött étel/víz elfogyasztása révén. Habár a legtöbb fertőzés nem súlyos, de a legyengült immunrendszerű embereknél és a magzatoknál a toxoplazmózis súlyos agy, szem és egyéb szöveti károsodásokat okozhat.

jellemezhető és ezáltal a legvirulensebb I-es típus (10), amelynek egy egyede is elegendő ahhoz, hogy a fertőzött egerek elpusztuljanak. Éppen ezért, a parazita által leggyakrabban okozott akut vagy krónikus betegség- a toxoplazmózis, leginkább a II-es típusnak tulajdonítható. A legkevésbé fertőzőképes a III-as típusú parazita, amely csak nagyon ritka esetekben hozható összefüggésbe bármilyen megbetegedéssel. Ezen változatok fenotipikus tulajdonságaikban igen jelentős különbségeket mutatnak (1. táblázat), amelyek között a legkiemelkedőbb a ROP18 nevű Ser/Thr kináz szekretáló képességük. Ez a fehérje bizonyítottan a *Toxoplasma* fő virulencia faktora (3, 10). Az említett kináz a parazita a gazdasajtbe jutást követően választja ki a szekretoros organelumán- a csúcsszerven keresztül, biztosítva ezáltal a gazdaszervezet immunreakciójával szembeni nagyon hatékony védekezést. Nevezetesen, a ROP18 képes inaktiválni a gazda veleszületett immunrendszerének számos fontos elemét azáltal, hogy a kifejezetten a parazitákkal szemben védelmet biztosító ún. IRG fehérjék GTP-kötő doménjében, az I-es kapcsoló régióban található threonin maradványokat foszforilálja (11, 12), blokkolva ezzel azok parazita ellenes hatását. Továbbá a ROP18 kináz kettős hatásának köszönhetően az adaptív immunrendszer működését is befolyásolja, még inkább fogékonnyá téve a sejteket a parazitafertőzésre: képes az ATF6 β transzkripciós faktor destabilizálására (13), kijelölve azt a proteasómában történő lebontásra, ezáltal szabva gátat a CD8⁺ T-sejtek által mediált immunreakció kialakulásának. A ROP18 működését egy testvérmolekulája, a ROP5 pseudokináz szabályozza (14). A ROP5 úgy akadályozza meg a parazita sejtéből való eliminációját, hogy három szabad metionin aminosaván keresztül képes a gazdasajt parazita-ellenes immunfehérjéjének, az Irga6 fehérjének a megkötésére amennyiben az GDP-kötött állapotban van. A ROP5 a megkötéssel ebben az inaktív (GDP-kötött) állapotban tartja a fehérjét, amely így egy tökéletes szubsztrát lesz a ROP18 kináz számára (14, 15).

A fertőzés módja:

Korábbi vizsgálatok bebizonyították, hogy a *Toxoplasma gondii* a saját aktin filamentumainak motorfehérjéjével történő mozgásán keresztül képes a gazdaszervezet megfertőzésére (16) úgy, hogy a gazdasajt felszínén egyfajta moving junction-t képez (17). Ez a fajta fertőzés jelentősen eltér a fagocitózis mechanizmusától: az invázió néhány másodperc alatt végbemegy, és nem okoz jelentősebb citoszkeleton átrendeződést vagy tirozin foszforilációt sem a gazdasajtban. A fertőzéssel egy időben elkezd kialakulni a parazitát védő vakuólum is, amely leginkább a gazdasajt plazmamembránjának komponenseit tartalmazza. Ám egy gyors maturáció során a vakuólum membránjából kiválnak ezek a fehérjék, ami

feltehetően hozzájárul ahhoz, hogy az ilyen módon létrejött vakuólum rezisztens lesz a gazdasejt endocitotikus vezikuláival való fúzióval szemben (18).

Azonban úgy tűnik, hogy a gazdasejt megfertőzésének módjában is jelentős különbség mutatkozik a parazita különböző típusai között. Az előbbieken említett aktív mechanizmus leginkább a nagyon magas virulenciájú I-es típusra jellemző, míg az avirulens, ám humán megbetegedést okozó II-es típus egyfajta unortodox útvonalon képes a makrofágok megfertőzésére (19). Ez az úgynevezett PTVI útvonal, amelyben a parazita, mint egy trójai faló először fagocitózis útján jut be a makrofágokba, és mindaddig a fagoszómában marad, amíg el nem kezdi a saját védő vakuólumának a kialakítását. Ezt a vakuólumot a virulens törzshöz hasonlóan egy aktív mechanizmus lévén hozza létre, ám annak membránja ebben az esetben nem a sejtmembrán, hanem a fagoszóma egyes komponenseit fogja tartalmazni.

Mindez hozzájárulhat ahhoz, hogy az avirulens típus képes krónikus megbetegedést indukálni az emlős fajok között, amely alapvető feltétele annak, hogy a parazita hosszú időn át túléljen a gazdaszervezetben. Ehhez szükség van arra, hogy az akut fertőzés által kiváltott olyan immunreakciók beinduljanak, mint például az intracellulárisan található TLR-ek aktivációja amely inflammatórikus citokinek (IL-12, IL-1 β) expressziójához vezet. Ezek a mechanizmusok korlátozzák a parazita hiperproliferációját és hozzájárulnak a *Toxoplasma* mélyebb szöveti rétegekbe történő elterjedéséhez (20, 21). A II-es típus ezen tulajdonsága eredményezhette széles körű elterjedését a természetben. Míg ugyan ennek a tulajdonságnak a hiánya a virulencia faktorok megjelenése mellett az I-es típus hipervirulensé válásához vezethetett.

A gazdaszervezet válasza a parazitafertőzésre:

A *Toxoplasma* minden hasonló törekvése az immunválasz kijátszására elengedhetlenné tette azt, hogy a gazdaszervezetek is létrehozzák saját védekező rendszerüket a parazitával szemben, amely vagy képes megakadályozni a fertőzés kialakulását, vagy alkalmas a már sejtekben lévő paraziták eltávolítására. A gazda fajok hasonló felépítésű, de mégis eltérő hatékonyságú immunválaszt fejlesztettek ki a parazitával szemben az együttélés során. Ezek közül kétség kívül a legbonyolultabb védekező rendszer az IFN- γ függő p47 és p65 GTPázokat, másnéven IRG fehérjéket kódoló génklaszter az egerek genomjában (22, 23). A klaszterbe 23 gén tartozik (2/A ábra), és az általuk kódolt fehérjék néhány apró jellegzetesség alapján alapvetően három családba oszthatóak (23). Ugyanakkor a fehérjék legfontosabb közös jellemzője, hogy az expressziójuk kivétel nélkül IFN- γ stimulus

hatására indul be a gének promóter régiójában található γ -aktivált speciális szekvenciáknak köszönhetően (24). Az IRG család fehérjei GTP kötött állapotban képesek a parazita körül a sejtben kialakuló vakuólum membránjának a felhasítására, ezzel beindítva a patogén eltávolító folyamatot (25). Ez a fajta citokin-függő GTPáz rendszer alakítja ki minden kétséget kizárólag az egyik legerősebb rezisztencia mechanizmust a legtöbb intracelluláris patogénnel szemben.

Az alábbi tanulmányomban ezen fehérjecsalád egy kiemelkedően fontos tagjának, az Irgm3 (más néven IGTP) fehérjének a parazitaellenes hatását kívántam vizsgálni. Már egy ideje köztudott, hogy az Irgm3 az egyik fő immunfehérje nagyon sokféle parazitával, így a *Toxoplasma gondii*-val szemben is (28). A fehérje az Irgm1 és Irgm2-es fehérjékkel egy

<i>Toxoplasma gondii</i>	I Típus	II Típus	III Típus
➤ Virulencia	+++	++	+
➤ ROP 18 expresszió	+++	++	+
➤ Migrációs képesség	+++	++	+
➤ Növekedési-ráta	++	+++	++
➤ Th1 sejtek citokin termelésének indukálása	++	+++	++
➤ Növekedés neutrophil granulocitákban	+++	++	+
➤ Újrafertőző képesség	+++	++	++
➤ NF- κ B transzlokációjának indukálása	+	++	-
➤ IL -12 termelés beindítása	+	+++	+
➤ Betegség okozó képesség	++	+++	+
➤ Gazdasajt fertőzése MJ által	+++	-	-
➤ Fertőzés a PTVI úton	-	+++	-
➤ Makrofágok megfertőzése	-	+++	-

1. táblázat Fenotípusos különbségek a parazita vonalak között (10, 19, 26, 27)

alcsaládba tartozik, és közös jellemzőjük, a fenotípusukat jelentősen meghatározó GMS aminosav motívum a GTP-kötő doménjükön (29). A sejt normál, fertőzésmentes állapotában a fehérje több mint 90%-a aktív és ebben a GTP-kötött állapotban az endoplazmás retikulum

membránjához asszociáltan található (30). Mindez azt igazolja, hogy bár a fehérje átírása IFN- γ -függő folyamat, a citokin önmagában nem elegendő a fehérjék aktiválásához (24), ahhoz más hatásokra is szükség van. Ilyen például az akut fertőzés, amely során jelentősen megnő a fehérje expressziója Stat-1 függő úton mind a vérképző, mind pedig a nem vérképző szövetekben (31). Ez vezet rövid időn belül a fehérje felhalmozódásához a parazitát tartalmazó vakuólum körül, beindítva ezzel a parazita-elimináló folyamatokat. Azonban a fehérje pontos effektor működését mind a mai napig homály fedi. Taylor és munkatársainak feltételezései alapján az Irgm3 négy különböző módon befolyásolhatja a parazita eltávolítását:

- 1) beindítja a parazita vakuólum membránjának savasodását és fúzióját a lizoszómákkal
- 2) meggátolja a membrán megújulását azáltal, hogy blokkolja a lipid komponensek beépülését
- 3) előidézi a membrán vezikulák lefűződését, amely a membrán széteséséhez vezet
- 4) illetve közvetlenül eliminálja a patogént a sejtől IFN- γ irányította autofág mechanizmuson keresztül (24).

Bármely folyamat is játszódjon le, a fertőzés után közvetlenül az IFN- γ és az olyan „autofágia-fehérjék” hatására, mint például a Atg7 és az Atg16L1 (32), az Irgm3 fehérjék a parazita vezikulumok köré lokalizálódnak, amely a membrán széteséséhez és a parazita kiszabadulásához vezet. Ezek a paraziták ugyan életben maradnak, de nem lesznek képesek a szomszédos sejtek megfertőzésére, amely rövidtávon az éhhalálukat okozza (25).

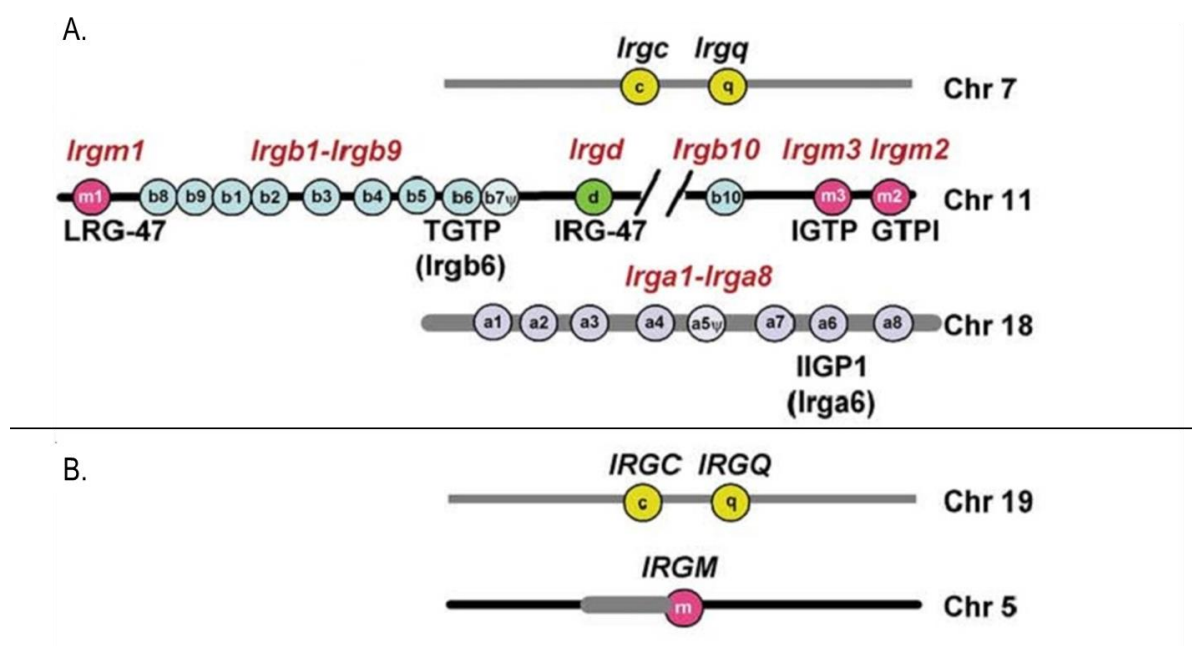
A p47 GTPázok az emberi genomban:

Annak ellenére, hogy az egerekben az IRG gének biztosítják a legkifinomultabb védekezési mechanizmust az intracelluláris kórokozókval szemben, ugyan ez a génklaszter kiveszni látszik a humán genomból. Vizsgálatok bizonyították, hogy az IRG gének a csontos halakkal egy időben jelenhettek meg valamikor az immunrendszer kialakulásának kezdetén, ám a főemlősök evolúciója során jelenlétük a genomban jelentős mértékben redukálódott (33). Ma az emberi genomban mindössze három, az egerekben fellelhető IRG génekkel homológ szekvencia található meg (2/B. ábra). Ezek rendre az IRGC, IRGQ és IRGM gének, amelyek expressziója az egér IRG génekkel ellentétben nem indukálható IFN- γ hatására.

Az IRGC nagyon szövetspecifikusan a herékben termelődik leginkább, és szerkezetét tekintve igen konzervált az emberben, kutyákban és az egérben. Az IRGQ gének pedig olyan „módosított” fehérjéket kódolnak, amelyek feltehetően nem rendelkeznek GTPáz aktivitással,

de a normál működésű IRG fehérjékkel heterodimereket képezve segítik azok munkáját az autofágia folyamatok szabályozásában (33).

Az 5. kromoszómán található IRGM génnek négy különböző splice variánsa van. Mindegyik izoforma transzkripciója egy, a gén 5' vége előtt található, retrovírus eredetű ERV9 szekvenciától indul (34), amely tulajdonképpen a gén funkcionálisan aktív promótere. Ennek a szekvenciának az integrációja feltehetően jelentősen megváltoztatta az IRGM expressziós és splicing mintázatát, valamint azt, hogy a fehérje mely szövetekben és milyen mértékben expresszálódik. Ezek a strukturális változások szignifikáns összefüggést mutatnak a Crohn betegség kialakulásával azáltal, hogy befolyásolják az IRGM gének által kialakított autofág mechanizmusok hatékonyságát (34, 35). Ugyanis a humán IRGM, csakúgy, mint az *Irgm1* az egér genomban, jelentős szerepet játszik a fertőzött sejtek autofágia útján történő elpusztulásában. A makrofágokban beindítja a mikrotubulus-asszociált szolubilis fehérje-az LC3-I LC3-II-vé alakulását. Továbbá, amennyiben expressziója igen magas, úgy az ősi



2. ábra Az egér és humán IRG gének elrendeződése a genomban (36) (A) Az egér *Irg* gének *Irga*, *Irgb*, *Irgc*, *Irgd*, *Irgm* és *Irgq* alcsoportba sorolhatóak. A pirossal jelzett gének expressziója IFN- γ hatására indul meg. (B) A humán genomban 3 IRG gén található.

génekhez hasonlóan, hozzájárul az olyan intracelluláris kórokozókkal szembeni védekezéshez, mint például a *Mycobacterium tuberculosis*, azáltal, hogy más fehérjékkel karöltve előidéz a

mitokondrium membránjának potenciál csökkenését, ezzel beindítva a szervezetben a Bax/Bak –függő sejthalál folyamatokat (36, 37).

Mindezek ellenére az intracelluláris patogénekkal szemben az emberi immunrendszer sokkal inkább olyan folyamatokra támaszkodik, mint a reaktív oxigén gyökök termelése, Rab5a indukálta megemelkedett aciditás kiváltása, kation deplécio vagy éppen az autofágia (38-41). Ezért mind a mai napig nem tisztázott, hogy milyen szempontból volt „költséghatékony” lépés a főemlősöktől az IRG gének által biztosított rezisztencia mechanizmus részleges, vagy egyes gének esetében teljes elhagyása. Ugyanakkor az egér modellrendszereken végzett kísérletek segíthetnek közelebb jutni a megoldáshoz.

A vizsgálatom célja volt tehát felállítani egy olyan egereken alkalmazott kísérleti rendszert, amelyben igazolhatom, hogy az egér IRG géncsalád egyik legfontosabb elemének, az Irgm3-nak, az IFN- γ -mediált aktivitása képes a gazdaszervezetben a parazitaszám kordában tartására. Mindemellett pedig igyekeztem feltárni olyan fehérjék létezését, amelyek az Irgm3-mal szorosan együttműködve befolyásolják annak működését, hozzájárulva ezzel az intracelluláris kórokozók eliminálásához. Ezzel igyekeztem megteremteni a lehetőséget arra, hogy mélyebb betekintést kaphassunk a fehérje valódi működéséről. Mindemellett pedig hosszútávon, akár a humán genomban működő IRGM gén további funkcióinak tisztázására is lehetőség adódhat, ha figyelembe vesszük, hogy Irgm3 és IRGM gén között minden bizonnyal igen szoros evolúciós kapcsolat áll fent.

Anyagok és módszerek

Sejtek és paraziták

A luciferáz expresszázó ME49 (II-es típusú) *Toxoplasma gondii* parazita vonalat Vero sejtekben tartjuk fent RPMI 1640 (Nacalai Tesque) médiumban, amelyet 2%-os hővel inaktivált FCS-sel (JRH Bioscience), 100 mg/ml penicillinnel és 0,1 mg/ml streptomycinnel (Nacalai Tesque) egészítünk ki. Konfluens kultúra létrejötte után hetente kétszer passzáljuk. MEF (egér embrionális fibroblaszt) sejteket DMEM médiumban (Nacalai Tesque) tartunk fent, amelyet kiegészítünk 10% hővel inaktivált FCS-sel (JRH Bioscience), 100 mg/ml penicillinnel és 0,1 mg/ml streptomycinnel (Nacalai Tesque).

Anyagok

A vizsgálatok során az alábbi ellenanyagokat a Santa Cruz vállalattól szereztük be: α -Irgb6 (TGTP; sc- 11079), α -IIGP, α -Irgm3, α -M2 (anti-flag) és aktin (sc- 8432). A rekombináns egér IFN- γ a PeproTech gyártmánya.

Irgm-3 génkiütött MEF sejtek előállítása Cas9/CRISPR-mediált génmódosítással

Az Irgm3 gRNS inzert fragmentumát felszaporítjuk KODFXNEO (Toyobo) és Irgm3_gRNS1_F valamint Irgm_gRNS1_R primerek használatával. Az Irgm3 gRNS-e expresszázó plazmidok előállítására a Nfat4 gRNS fragmentumát inzertáljuk a gRNS klónozó vektorba (Plasmid 41824) a Gibson Assembly keveréket (New England Biolab) alkalmazva. Hozzákapcsoljuk a T7 promótert az Irgm3 gRNS templáthoz a KODFXNEO és az Irgm3_T7gRNS_F, valamint a gRNS_common_R primereket használva. Gélen megtisztítjuk a T7-Irgm3 gRNS PCR termékeket és felhasználjuk az újabb Irgm3 gRNS-ek szintetizálásához. Az Irgm3 gRNS előállításához a MEGAshortscript T7-t (Life Technologies) használjuk. A Cas9 mRNS *in vitro* transzkripcióval állítjuk elő az alábbiak segítségével: mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA kit (Life technologies) és a PCR reakció során felszaporított templát, amely előállításához a pEF6-hCas9-Puro-t valamint a T7Cas9_IVT_F és Cas9_R primereket használtuk (42). A megszintetizált Irgm3 gRNS-t és a Cas9 mRNS-t a MEGAclean kit-tel (Life technologies) tisztítjuk, majd RNáz-mentes vízben eluáljuk (Nacalai tesque). Az Irgm-KO egerek előállításához C57BL/6 nőstény egereket (6 hetes) pároztatjuk C57BL/6 hímekkel. A megtermékenyített egy sejt embriókat

összegyűjtjük a petevezetékéből és ezeket oltjuk 100ng/μl Cas9 mRNS-sel és 50ng/μl Irgm3 gRNS-sel (43). Az egér fibroblaszt sejteket (MEF) az előzőekben leírtak szerint tartjuk fenn.

Toxoplasma gondii számának meghatározása luciferáz próbával

MEF sejteket (5×10^5) kezelünk 10ng/ml IFN- γ -val, és inkubálunk 24 óráig. Kontrollként kezeletlen MEF sejteket is hasonlóképpen inkubálunk. Ezt követően luciferáz expresszáló parazitával fertőzzük meg a sejteket (MOI=1) és újabb 24 óráig inkubáljuk. A fertőzöttség vizsgálatához a sejteket összegyűjtjük. A letapadt, konfluens sejteket tripszinnel oldatba vesszük, majd lizáljuk 100μl lízis puffer hozzáadásával (Promega) és szonikálással. A lizátumot 4 °C-on, 14000 rpm-mel centrifugáljuk, majd a felülúszó 5μl-nek luciferáz aktivitását megmérjük a Dual-Luciferase Reporter Assay System és GLOMAX 20/20 luminométer (Promega) segítségével.

Western-blot

MEF sejteket (10×10^5) kezelünk 10ng/ml IFN- γ -val, és inkubálunk 24 óráig. Kontrollként kezeletlen MEF sejteket is hasonlóképpen inkubálunk. A sejteket 1% Nonidet P-40-t, 150 mM NaCl-t, 20 mM Tris-HCl-t (pH 7,5), 5 mM EDTA-t és proteáz inhibitor tartalmazó pufferben (Roche) lizáljuk. A mintákat 5 percig 95 °C-on inkubáljuk majd a sejt-lizátumokat SDS-PAGE gélelektroforézissel elválasztjuk. A gélre felvisszük az ismert molekulatömegű fehérjékből álló standard mintát is. Az elektroforézis 40 V-on végezzük. A fehérjét polivinyl- difluorid membránra blotoljuk. A blokkolás után a megfelelő ellenanyaggal együtt inkubáljuk a membránt egy éjszakán át. Az előhívás ECL oldattal történik.

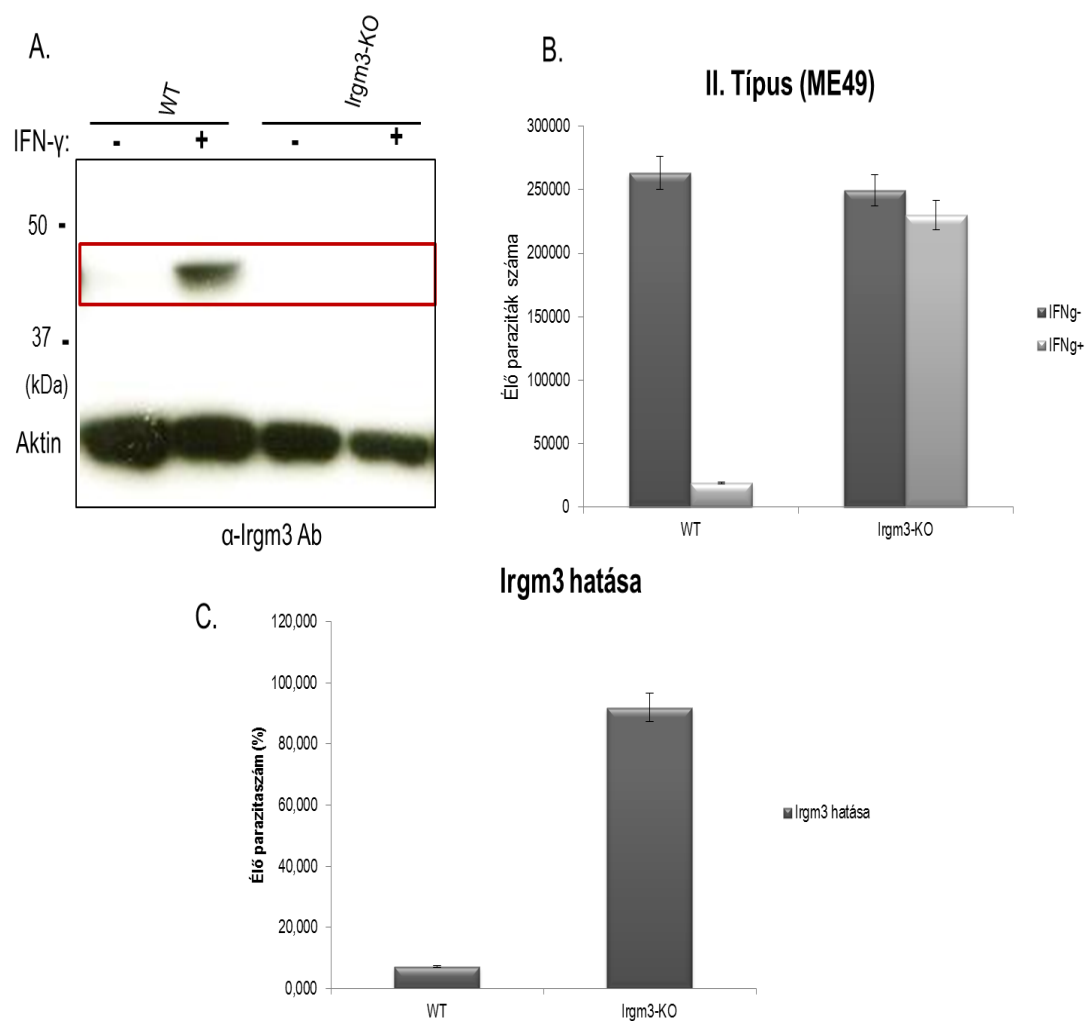
Shotgun Immunoprecipitáció

N terminális flag-taggel ellátott Irgm3-at expresszáló fibroblaszt sejteket lizálunk lízis pufferrel (0,5% Nonidet P-40, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.5) amely proteáz inhibitor (Roche 9) is tartalmaz. A lizátumot előtisztítjuk protein G-s sepharose miniprep segítségével (GE Healthcare) 2 órán keresztül 4 °C-on. Majd egy éjszakán át, állandó forgatás mellett, 4 °C-on inkubáljuk α -flag (M2) ellenanyaggal előkezelt protein G- sepharose miniprepen. A precipitátumokat 4x mossuk lízis pufferrel és flag-proteint tartalmazó (100 μg/ml, SIGMA) lízis pufferrel eluáljuk az oszlopról. A mintákat 4-5 percig gélelektroforézissel megfuttatjuk, majd a gélből az összes mintát izoláljuk.

Eredmények

Az Irgm3 hatása a parazita sejtől való eltávolítására

Annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk az Irgm3 IFN- γ mediált parazitaellenes hatásmechanizmusát, elsőként meg kellett győződnünk arról, hogy ez a p47 GTPáz valóban nélkülözhetetlen a *Toxoplasma gondii* sejtől való eltávolítására. Ennek bizonyítására a 'reverse' genetika módszereit használtuk: a prokarióta eredetű CRISPR/Cas9 adaptív immunrendszer működésén alapuló, legújabb és nagyon pontos génmódosító technikát alkalmazva készítettünk olyan egér embrionális fibroblaszt sejteket (MEF), amelyekből kiütöttük az Irgm3 fehérje kódolásáért felelős gént. A génmódosítás sikerességét Western-blot segítségével igazoltam, és azt találtam, hogy a génkiütött sejtekben IFN- γ kezelés hatására sem expresszáldott a fehérje (3/A. ábra). Tehát a génkiütés megfelelően sikerült. Ezt követően vizsgáltam, hogy kimutatható-e az Irgm3 fehérje kiemelt szerepe a gazdasejt citokin-indukált sejtes immunválaszában a parazita ellen. Ezért vad típusú és Irgm3-KO egér embrionális fibroblaszt sejteket vetettem alá IFN- γ kezelésnek 24 órán keresztül, majd ezeket a sejteket megfertőzttem luciferáz enzimet expresszáló II-es típusú (ME 49) *Toxoplasma gondii* parazitával. Ezt a fertőzést elvégeztem olyan fibroblaszt sejteken is, amelyeket előtte nem kezeltem citokinnel. 24 órával a fertőzést követően megmértem a parazitaszámot luciferáz- próba segítségével. Ahogy az várható volt a negatív kontroll esetében, IFN- γ indukció nélkül sem a vad típusú, sem pedig az Irgm3 génkiütött sejtek nem voltak képesek a parazita számának csökkentésére. Ugyanakkor a vad típusú sejtekben jelentősen lecsökkent a parazita terheltség mértéke amennyiben a sejtek korábban átestek az IFN- γ kezelésen. Ezzel egy időben az Irgm3-KO sejtekben mivel elvesztették képességüket arra, hogy a parazitát eltávolítsák a fertőzött sejtekből, a parazitaszám extrém magas maradt (3/B ábra). Ez a kísérlet tehát bizonyította, hogy a vad típusú sejtekben, IFN- γ stimulus hatására az Irgm3 fehérje nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a gazdasejt képes legyen a paraziták számát mintegy 90%-kal csökkenteni a génkiütött sejtekhez képest (3/C ábra). Így joggal feltételezhetjük azt, hogy az Irgm3 fehérje szerves részét képezi annak a rendszernek, amely képes felvenni a harcot a fertőző ágenssel szemben.



3. ábra Az Irgm3 nélkülözhetetlen a *Toxoplasma* ellenes celluláris immunválasz során. (A) Egyes vad típusú és Irgm3-KO egér embrionális fibroblaszt sejteket inkubáltam 10 ng/ml IFN- γ -val 24 órán át, másokat kezeletlenül hagytam. Lizálást követően Western-blottal mutattam ki az Irgm3 fehérjét. (B, C) Egyes vad típusú és Irgm3-KO egér embrionális fibroblaszt sejteket inkubáltam 10 ng/ml IFN- γ -val 24 órán át, másokat kezeletlenül hagytam. Mindegyik sejt kultúrát ME49-es luciferáz expresszáló *Toxoplasma gondii*-val fertőztem majd 24 óra után összegyűjtöttem őket. A teljes parazitaszámot a luciferáz aktivitás alapján mértem. Az adatok két párhuzamos mérés átlagai.

Jelenleg ismeretlen, Irgm3-mal együttműködő molekulák vizsgálata, amelyek fontos szereplői az IFN- γ mediált Toxoplasma gondii elleni immunválaszban

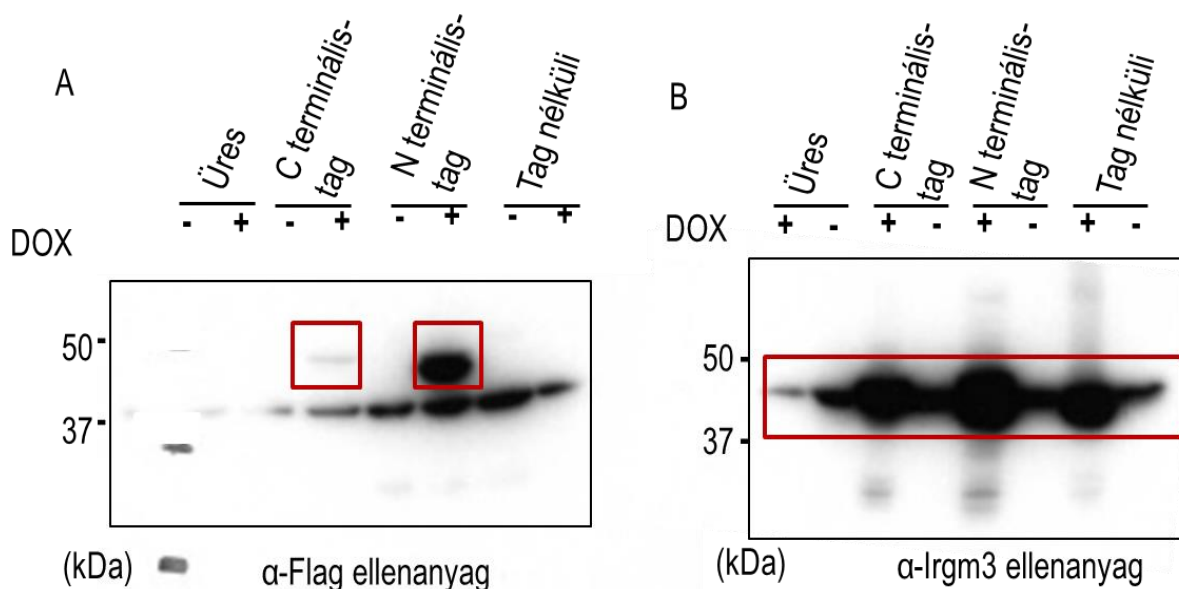
Annak ellenére, hogy sikerült bebizonyítanom, hogy milyen kiemelkedően fontos szerepe van az Irgm3-nak a sejt anti-parazita működésében, a tényleges molekuláris mechanizmus, amellyel a fehérje kifejti hatását a parazitára még mind a mai napig nem ismert. Ennek feltárására tettem kísérletet a következőkben úgy, hogy megpróbáltam megvizsgálni az Irgm3 fehérje kapcsolatát más, ugyanebbe a családba tartozó fehérjékkel. Feltételezhető ugyanis, hogy a p47 és p65 GTPáz család fehérjéi nem önállóan, hanem egymással valamilyen közvetlen, vagy akár közvetett kapcsolaton keresztül egyfajta rendszert alkotva képesek a parazita eliminálására.

Ahhoz, hogy megvizsgáljam, hogy kapcsolódik-e bármilyen molekula az Irgm3 fehérje akár N-vagy C-terminálisához, létrehoztam négy különböző retrovírus vektort. Az egyik képes a teljes, vad típusú Irgm3 kifejezésére, a második és harmadik vektor szintén tartalmazza a teljes Irgm3-at de az egyiket a C, a másikat pedig N-terminusán flag-taggal is elláttam. Illetve készült egy negyedik vektor, amely egyáltalán nem tartalmazta az Irgm3 fehérjét kódoló gént. A retrovírus vektorokat azután GP2-293 ('Packaging system') „csomagoló” sejtvonalba transzfektáltam és alig 48 óra leforgása alatt létrejöttek így nagy számban, igen jó fertőzőképességű virionok. Ezekkel fertőztem meg később a korábbi génmódosítás során előállított Irgm3 génkiűtött sejtjeimet. Egy puromycin szelekciót követően pedig az életben maradt sejttelpeket tartottam fent a kidolgozott protokoll alapján.

A következőkben elvégeztem a konstrukciók tesztelését anti-flag (4/A. ábra) és anti-Irgm3 ellenanyagok (4/B ábra) használatával. A konstrukciók készítésénél ügyeltem arra is, hogy az Irgm3-at kódoló gén elé egy olyan promóter kerüljön, amely doxyciklinnel indukálható. Ennek szerepe egyrészt az, hogy időben szabályozni tudjam a fehérje expresszióját, másrészt pedig a transzlálódott protein mennyiségét is befolyásolni tudtam. Erre azért volt szükség, mivel a fehérje jellegzetes tulajdonsága, hogy aggregálódni képes, amely az effektor funkciójának teljes elvesztésével jár.

Mindezek után vizsgálni kezdtem, hogy az elkészült konstrukciókat tartalmazó sejtek képesek-e a vad típusú egér fibroblaszt sejtekhez hasonlóan kontroll alatt tartani a parazita okozta fertőzést. Először doxyciklin kezelés nélkül, de IFN- γ indukció mellett mértem luciferáz-próbával a sejtekben található parazita mennyiségét és azt tapasztaltam, hogy a vad

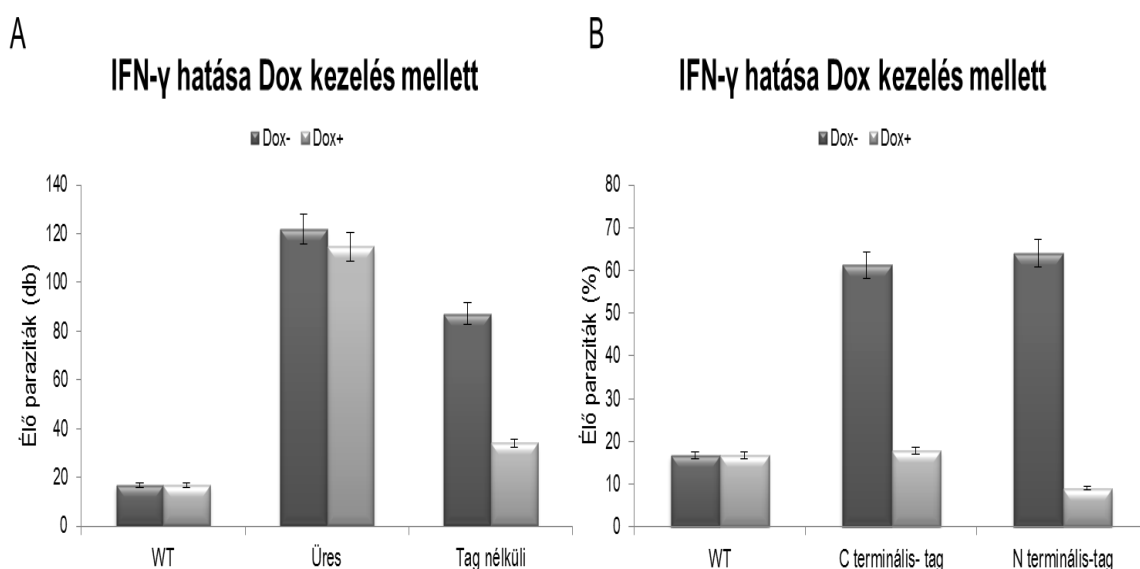
típusú sejtek képesek voltak a parazitaszámot szignifikánsan lecsökkenteni, míg az új konstrukciók a doxyciklin hiányában ugyanerre már nem voltak képesek. Ez az eredmény nem meglepő, ugyanis még a vad típusú sejtekben az Irgm3 parazita ellenes effektor mechanizmusa nem sérült és az ennek a beindulásáért felelős IFN- γ stimulus is jelen van, addig az új sejtekben a doxyciklin indukálta promóter miatt nem indul be a fehérje transzlációja az antibiotikum hiányában még akkor sem, ha az IFN- γ kezelés ezt egyébként lehetővé tenné (5/A. ábra). Ugyanakkor, ha az IFN- γ citokines kezelés párosult az antibiotikum kezeléssel, akkor már nem kizárólag csak a vad típusú sejtek, hanem a flag-tag nélküli, teljes Irgm3 fehérje expresszáására képes új konstrukciót tartalmazó sejtek is



4. ábra Négy új retrovírus konstrukció működésének vizsgálata (A, B) Üres, C terminális-tag, N terminális-tag és tag nélküli retrovírust tartalmazó egér embrionális fibroblaszt sejteket kezeltem 10ng/ml Doxyciklinnel 24 órán keresztül, majd lizátumot készítettem. Kontrollként kezeletlen sejtekből is készítettem lizátumot. A mintákat Western-blottal detektáltam a megjelölt ellenanyagokkal.

képesek visszaállítani a génkiütéssel megkárosodott fibroblaszt sejtek fenotípusát (5/A. ábra). Sőt mi több, nem csak a jelölés nélküli Irgm3, hanem az N-és C-terminálisán flag-taggal ellátott Irgm3-t expresszálo sejtek is képesek voltak látványosan lecsökkenteni a parazita mennyiségét, amennyiben IFN- γ és doxyciklin indukció ezt lehetővé tette (5/B. ábra). Az eredményeim igazolják tehát, hogy mind a jelölt mind pedig a jelöletlen konstrukcióim is

képesek voltak visszaállítani az Irgm3-KO sejtekben az Irgm3 eredeti, parazita ellenes hatását. Ez azt jelenti, hogy a továbbiakban alkalmazhatóak a konstrukciók arra, hogy segítségükkel meghatározzam az Irgm3-mal szorosan kapcsoló, jelenleg ismeretlen fehérjét is. A flag-tag jelölés pedig lehetővé teszi, hogy a későbbiekben ezeket a molekulákat az Irgm3-mal együtt akár izolálni is lehessen.



5. ábra Négy különböző retrovírus konstrukció hatása a parazita eliminálására (A)

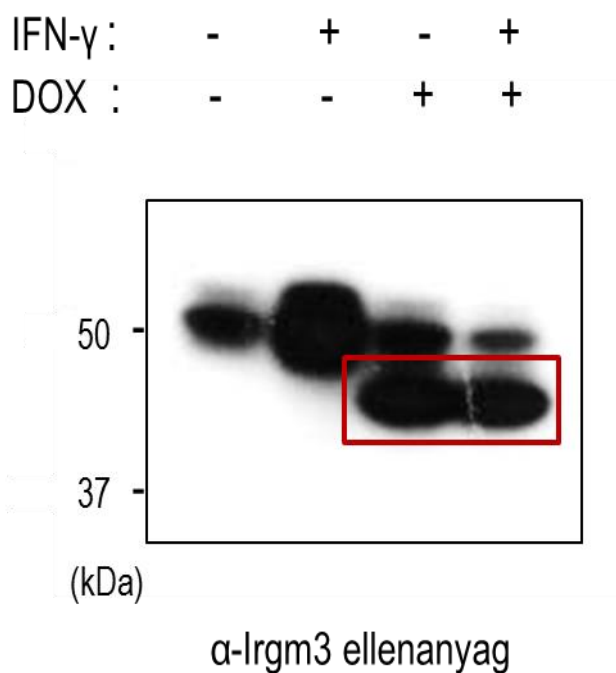
Vad típusú, üres és tag nélküli retrovírus konstrukciót tartalmazó eger embrionális fibroblaszt sejteket inkubáltam 10 ng/ml IFN- γ -val 24 órán át, a kontroll sejteket kezeletlenül hagytam. Mindegyik sejt kultúrát ME49-es luciferáz expresszázó *Toxoplasma gondii*-val fertőztem majd 24 óra után összegyűjtöttem őket. Ugyan ezt az eljárást megismételtem doxyciklin kezelés mellett is. A teljes parazitaszámot a luciferáz aktivitás alapján mértem. Az adatok két párhuzamos mérés átlagai. (B) Az előzőekben leírt luciferáz-próbát újra elvégeztem: itt a sejtek az IFN- γ mellett 10 ng/ml doxyciklin kezelést is kaptak. A kontroll sejteket ebben az esetben is kezeletlenül hagytam.

p47 GTPáz család új tagjainak azonosítása tömegspektrometriás vizsgálattal

Miután megbizonyosodtam arról, hogy a flag-taggel jelölt fehérjék hatása a paraziták eliminálására megegyezik a vad típusú fehérjéével, megkezdtem a minták előkészítését a tömegspektrometriás vizsgálathoz. Az előző kísérletek eredménye alapján (5. ábra) úgy döntöttem, hogy az eddig ismeretlen, az Irgm3-mal asszociált fehérjék felkutatására az N

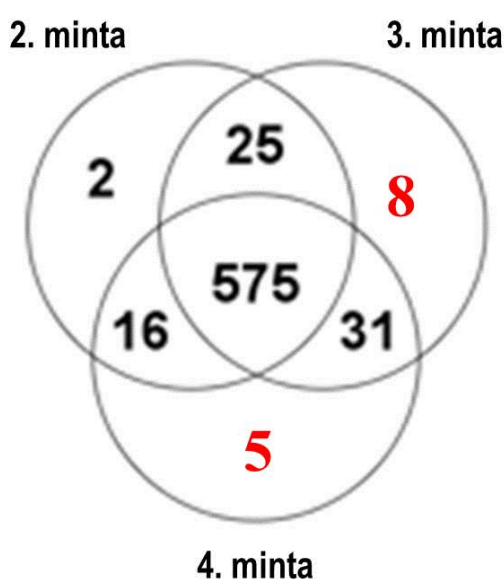
terminális flag-taggal ellátott egér embrionális fibroblaszt sejtkonstrukciót használok, ugyanis ezekben a sejtekben az Irgm3 fehérje mennyisége valamennyivel jobban helyreállíthatónak bizonyult a C terminálisán megjelölt sejtkonstrukcióhoz képest.

A sikeres immunoprecipitáció eredményeként négy különböző mintát készítettem, amelyek mindegyike az N terminálisán flag-taggal ellátott Irgm3 fehérjét expresszáló fibroblaszt sejtekből származott. 1.) az első minta sem IFN- γ , sem pedig doxyciklin kezelést nem kapott, 2.) a második minta sejtjeit csak doxyciklinnel stimuláltam annak érdekében, hogy meginduljon bennük az Irgm3 fehérje transzlációja, 3.) a harmadik minta sejtjei csak IFN- γ kezelést kaptak, 4.) az utolsó mintában lévő sejtek pedig mind a citokin, mind pedig az antibiotikum kezelés stimuláló hatásában részesültek. Ezen minták mindegyikét megküldtem tömegspektrometria vizsgálatot végző központnak, annak érdekében, hogy sikerüljön kimutatnom az Irgm3 fehérjéhez kötődő, és annak parazita ellenes működésében aktívan résztvevő, jelenleg ismeretlen fehérjéket.



6. ábra Immunprecipitáció a tömegspektrometriás méréshez Az N terminális flag-taggal ellátott egér embrionális fibroblaszt sejtekből készült minták 10 ng/ml IFN- γ és 10 ng/ml doxyciklin kezelést kaptak négy féle kombinációban. Sz immunprecipitációt a megjelölt ellenanyaggal végeztem.

A vizsgálathoz szükséges mintákat „shotgun” immunoprecipitációval állítottam elő (6. ábra), amely lehetővé teszi, hogy a mintáknak nem csak egy-egy részét, hanem a teljes mintát vizsgálni lehessen. Ez bár biztosabb módszer abban a tekintetben, hogy nem függ attól, hogy a készítő mely fehérje sávokat izolálja a gélből, mint a klasszikus immunoprecipitáció esetében, ugyanakkor a teljes minták miatt nagyon nagy számú találat is megjelenhet a tömegspektrometria vizsgálat eredményében, amelyekből sok teljesen irreleváns az adott fehérje szempontjából. Az én esetemben is hasonló eredményt kaptam. A négy vizsgált minta alapján összesen 575 lehetséges célfehérjét talált a spektrométer, ugyanakkor a vizsgálat előtt



7. ábra Tömegspektrometriás vizsgálat eredménye Venn diagramon A spektrométer által talált lehetséges gének nagy száma a shotgun immunoprecipitáció eredménye. A eredmény szűkítését a korábban elvégzett citokines és antibiotikus kezelések teszik lehetővé A 2. minta IFN- γ kezelt sejtekből, a 3. doxyciklinnel kezelt sejtekből, a 4. pedig az IFN- γ -val és doxyciklinnel együtt kezelt sejtekből származó minta. A piros számok a lehetséges Irgm3-hoz asszociált molekulák számát jelöli.

négy különböző kombinációban elvégzett kezelés jelentős mértékben szűkítette a találatok számát. Az alábbi Venn diagramon ábrázoltam (7. ábra), hogy hány olyan molekula van, amely kapcsolatban állhat az Irgm3 fehérjével: a 2. minta eredménye a csak IFN- γ kezelést kapott sejtekből származik, a 3. csak doxyciklinnel kezelt minta, a 4. pedig az IFN- γ -val és doxyciklinnel kostimulált mintából izolált molekulákat takarja. Mindez azt jelenti, hogy 5 db olyan gén van, amely az Irgm3 fehérjéhez IFN- γ stimulustól teljes mértékben függő módon

közvetlenül kapcsolódni képes molekulákat kódolja. Ugyanakkor jelen van 8 olyan gén által kódolt fehérje is, amely képes ugyan az Irgm3 fehérjéhez asszociálni, de ez a kapcsolat IFN- γ hatásától teljesen független. Ha figyelembe vesszük azt, hogy mi kizárólag csak az Irgm3 fehérjéhez közvetlenül kapcsolódni képes molekulákat keressük, akkor 5+ 8, azaz 13 lehetséges célfehérjét találunk. Ebbe a körbe azért számolhatjuk bele a citokintől függetlenül megjelenő 8 molekulát kódoló gént is, mert az Irgm3 fehérje expressziója már önmagában véve egy IFN- γ hatására beinduló folyamat.

A vizsgálat alapján a 13 fehérjéről az is kiderül, hogy a különböző molekulák igen széles mérettartományba esnek. Összességében tehát elmondható, hogy egyértelműen vannak olyan molekulák, amelyek az Irgm3 fehérjéhez közvetlenül kapcsolódnak, tehát az nem egyedül látja el a feladatát. Azt, hogy ezek a molekulák az Irgm3 GTPázsal azonos családba tartoznak, vagy esetleg attól teljesen különbözőek csak későbbi vizsgálatok tudják kideríteni.

Diszkusszió

Az alábbi tanulmányomban az Irgm3 GTPáz fehérje *Toxoplasma gondii* ellenes immunreakcióját vizsgáltam olyan egér embrionális fibroblaszt sejteken, amelyek genomjából géntechnológiai úton eltávolítottuk ezt az esszenciális immunkomponenst kódoló gént. A vizsgálataim során sikerült a korábbi eredményekkel (25, 28) erősen korreláló megállapításokat tennem, miszerint a p47 GTPáz családba tartozó Irgm3 fehérje egyértelműen szignifikáns szereplője az egér immunrendszer által biztosított védekező reakciónak az intracellulárisan élősködő *Toxoplasma gondii*-val szemben. Ez a reakció minden kétséget kizárólag egy IFN- γ irányította folyamat, ugyanis a citokin indukció hiánya végzetes kimenetelű minden *Toxoplasma*-val fertőzött sejtre nézve. A parazita sejtéből való eliminációja tehát csak akkor lehetséges, ha IFN- γ és Irgm3 fehérje is kellő mennyiségben, aktív formában jelen van a sejtben.

Noha a protein anti-parazita hatása megkérdőjelezhetetlen, a pontos mechanizmus, amellyel képes a parazitát az azt védő burkától megfosztani, és a sejtéből eltávolítani a tudomány mai állása szerint ismeretlen. Mindenesetre azt feltételeztük, hogy a fehérje parazitaölő hatásában nagy szerepet játszhatnak azok a járulékos fehérjék, amelyek közvetlenül kapcsolódnak a fehérjéhez. A vizsgálataim igazolták számos ilyen molekula létezését. Továbbá abban is biztosak lehetünk, hogy ezek a molekulák képesek az Irgm3 fehérje effektor funkcióját visszaállítani még az Irgm3-KO sejtekben is, amennyiben a fő fehérje N-vagy C-terminálisához kapcsolódnak. Azt, hogy ez a közvetlen kapcsolat a fehérjék között a 2 specifikus G-domén dimerizációjának köszönhető-e (44, 45), avagy más domének biztosítják a molekulák összeköttetését csak akkor válik világossá, ha mind az Irgm3, mind pedig a többi molekula kristályszerkezeti modellje elkészül.

Ahhoz, hogy szélesebb körű képet kapjunk a megismert fehérjék működéséről még számos egyéb vizsgálatot kell elvégezni a jövőben. A méretük alapján akár azt is feltételezhetnénk, hogy az újonnan megtalált fehérjék az Irgm3-mal megegyező módon a p47 és p65 GTPáz családba tartoznak, ugyanakkor arról mit sem tudunk, hogy ezek önállóan is rendelkeznek bármiféle *Toxoplasma gondii* ellenes aktivitással, vagy csak és kizárólag más fehérjékkel (pl: Irgm3-mal) karöltve képesek a funkciójuk ellátására. Sőt akár az is elképzelhető, hogy nem a GTPáz család részei, csupán közreműködői a sejt immunválasz kialakulásának. Jelenlegi ismereteim alapján én úgy gondolom, hogy a legnagyobb valószínűséggel ezek egyfajta

„segéd molekulái” az Irgm3 fehérjének: támogatják az Irgm3-at a parazitát tartalmazó vakuólum megtalálásában, segíthetik a vakuólum felszínén a fehérjék összerendeződését, vagy akár a vakuólum felhasadásáért felelős vezikulációban is részt vehetnek. Azt is elképzelhetőnek tartom, hogy ez a fizikai interakció az Irgm3 és az új molekulák között nélkülözhetetlen magának az Irgm3 funkciójának manipulációjához, például az által, hogy a GKS aktivációt gátolják (46).

Bármely variáció fedje is a valóságot annyi bizonyos, hogy ezek a molekulák és az Irgm3 által közösen beindított és irányított mechanizmusok vezetnek a parazita elpusztulásához. A folyamatok feltáráshoz pedig legjobb út a 'reverse' genetikai vizsgálatokon keresztül vezet: a jövőben a kutatócsoportunk célja az, hogy létrehozzunk olyan embrionális fibroblaszt sejteket, amelyekből egyesével kiütjük a vizsgálataim során kimutatott 13 molekulát kódoló gént, hogy ezeket a konstrukciókat tesztelve jobb képet kaphassunk mind a molekulák, mind pedig az Irgm3 parazita ellenes immunválaszban betöltött szerepéről.

Minden olyan genetikai faktor megértése, amely befolyásolja a *Toxoplasma gondii* virulenciáját és az általa okozott fertőzést, hosszabb távon vezethet olyan új terápiás módszerek vagy vakcinák kidolgozásához, amelyek megállíthatják a fertőzés kialakulását, vagy adott esetben gyógyítani tudják azt. Ezek kifejlesztése a leghosszabb távú cél, és egyben a legégetőbb probléma is, különösen, hogy a veszélyeztetett csoport mérete napról-napra növekszik. Vakcinák előállítására lenne talán a legjobb megoldás, de mindenekelőtt fontos, hogy sokkal jobban megértsük egér modelleken keresztül, hogy hogyan is működik az immunrendszer az ilyen fajta parazitával szemben. Ugyanakkor az is nagy kérdés, hogy a jelenlegi tudásunkat erről a diverz immunmechanizmusról át lehet-e ültetni a humán használatba, mivel az emberi genomból az IRG család fehérjéit kódoló génklaszter vagy javarészt hiányzik (34), vagy a még meglévő gének funkciója is teljesen eltérő az egerekéhez képest (33). Ennek tisztázáshoz mindenképpen a jelenlegi ismereteink elmélyítése szükséges.

Összességében úgy vélem, a jövőben érdemes lenne vizsgálni, hogy a jelenleg ismert IRG fehérjék és a család feltételezett új elemei hogyan képesek együtt, egymásra hatva és egymás hatását erősítve kialakítani az anti-*Toxoplasma* választ, annak érdekében, hogy fény derülhessen egy mindezidáig ismeretlen, de nagyon hatékony parazitaelimináló mechanizmus működésére.