

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/21624> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Lin, Jingwen

Title: Generation of genetically attenuated blood-stage malaria parasites : characterizing growth and virulence in a rodent model of malaria

Issue Date: 2013-09-03

Samenvatting

Ondanks vele inspanningen de afgelopen 50 jaar voor het ontwikkelen van een vaccin is er tot op heden geen geregistreerd malariavaccin beschikbaar. Optimistische geluiden omtrent een mogelijke registratie van een eerste-generatie malaria subunit vaccin, gebaseerd op het *Plasmodium* circumsporozoïte eiwit – RTS,S – zijn gedempt door de voorlopige resultaten van de nog lopende fase 3 trials in Afrika welke laten zien dat dit vaccin bij kinderen en zuigelingen slechts 30% bescherming genereert tegen gecompliceerde malaria en dat de geïnduceerde bescherming een kortstondig effect heeft van minder dan 6 maanden. De tegenvallende successen met betrekking tot het induceren van een langdurige, effectieve immuunreactie tegen malaria met subunit vaccins heeft er toe geleid dat het gebruik van verzwakte parasieten, een beproefde strategie voor het induceren van langdurige steriele immuniteit in de mens, opnieuw in de belangstelling staat. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het genereren en karakteriseren van genetisch gemodificeerde, groei- en virulentieverzwakte, bloedstadium malariaparasieten in het *Plasmodium berghei* knaagdier-malariamodel. Dit geldt in het bijzonder voor ‘genetisch geattenuerde bloedstadium parasieten’ (GAP_{BS}) die alleen een infectie opwekken met een kortstondige, lage infectiegraad (parasitemie) en die zichzelf niet kunnen handhaven in het bloed maar wel een krachtige, beschermende immuunreacties opwekken. Om het screenen van een groot aantal potentiële GAP_{BS} mogelijk te maken werden zowel de transfectiemethodes voor het genereren van de GAP_{BS} en de methodes die het mogelijk maken de groei- en virulentie-karakteristieken in het bloedstadium te analyseren verbeterd.

In **Hoofdstuk 2** beschrijf ik de ontwikkeling van een nieuwe methode voor genetische modificatie die toegepast kan worden op de knaagdier-malariaparasieten *P. berghei* en *P. yoelii* waarvan de toepassing niet wordt gelimiteerd door het beperkte aantal effectieve selectiemarkers dat beschikbaar is voor het selecteren van malariaparasiet mutanten. Deze ‘gene insertion/marker out’ (GIMO) methode maakt gebruik van negatieve selectie om snel en effectief transgene mutanten te genereren zonder selectiemarker die geschikt zijn voor verdere genetische modificatie. Deze methode kan ook worden toegepast voor het genereren van zogenaamde transgene reporterparasieten die reporter eiwitten tot expressie brengen (bijvoorbeeld fluorescerende eiwitten). Reporterparasieten faciliteren het fenotypisch karakteriseren van mutanten en het genereren van transgene parasieten die meerdere heterologe genen tot expressie brengen dan wel meerdere gen deleties kennen. Daarnaast is het mogelijk om mutanten met gen deleties of mutanten die gemuteerde genen tot expressie brengen genetische te complementeren, ofwel het herstellen van het oorspronkelijke fenotype door de genetische modificatie ongedaan te maken. De GIMO methode maakt het niet alleen mogelijk sneller en eenvoudiger transgene parasieten zonder selectiemarker te genereren en mutaties te complementeren, ook

het aantal proefdieren nodig voor het genereren/complementeren van mutanten wordt sterk gereduceerd.

We hebben ook de bestaande methodes voor *in vitro* en *in vivo* analyse van de groeikinetiek van malaria parasieten vereenvoudigd door gebruik te maken van reporterparasieten die luciferase tot expressie brengen. Deze methoden zijn gebruikt voor het analyseren van de groei- en virulentie eigenschappen van GAP_{BS} en beschrijven hoe deze reporterparasieten toegepast kunnen worden in *in vitro* en *in vivo* drug screening assays. Deze verbeterde methodieken worden beschreven in **Hoofdstuk 3**.

Voor het genereren van een GAP_{BS} heb ik 41 genen in de virulente *P. berghei* ANKA lijn geselecteerd voor mijn zoektocht naar groei- en virulentie-verzwakte mutanten (GAP_{BS}) die kunnen dienen als beschermend immunogen. De selectie van deze genen was voornamelijk gebaseerd op hun vermeende rol bij de ontwikkeling van de parasiet in het bloedstadium of gebaseerd op *P. falciparum piggyBac* random mutagenese studies waarbij mutanten met een groeidefect zijn gegenereerd door middel van van een *piggyBac* gen insertie. Acht genen coderend voor *Plasmodium* rhomboid proteasen werden specifiek geselecteerd vanwege publicaties waaruit is gebleken dat verschillende rhomboid proteasen een essentiële rol vervullen bij invasie van de gastheercel en bij de pathogenese. Toch hebben we binnen deze familie van proteasen geconstateerd dat 4 van hen (ROM1, 3, 9 en 10) niet noodzakelijk zijn voor de ontwikkeling van de parasiet in het bloedstadium en geen effect hebben op de groei en virulentie van de parasiet. Het fenotype van de knock-out mutanten is gedurende de hele levenscyclus geanalyseerd inclusief de ontwikkeling in de muskiet en lever (**Hoofdstuk 4**). Hieruit is gebleken dat oocysten van *P. berghei* mutanten deficiënt voor ROM3, ondanks het feit dat ze in normale hoeveelheden in de muskiet worden geproduceerd, geen sporozoitenvormen. Dit is het eerste geïdentificeerde rhomboid eiwit die een essentiële rol speelt in sporogenese binnen de groep van organismen die behoren tot de Apicomplexa.

Behalve de rhomboid proteasen hebben we 12 additionele genen geselecteerd met een vermeende rol bij de afbraak van hemoglobine voor deletie/knock-out (**Hoofdstuk 5**). Men vermoedt dat omzetting van hemoglobine essentieel is voor de ontwikkeling van de bloedstadia van malaria parasieten. Het is aangetoond dat een mutant waarin een gen coderend voor één van de eiwitten betrokken bij hemoglobinedigestie (plasmepsin -4) is uitgeschakeld een verzwakte groei en virulentie laat zien. Voor 9 van de 12 genen hebben we met succes knock-out mutanten gegenereerd waarmee tevens is aangetoond dat de afzonderlijke *P. berghei* hemoglobinasen in het algemeen niet essentieel zijn voor de parasiet om te overleven. Vergeleken met wildtype parasieten vertoonden 4 van de 9 mutanten normale groei-eigenschappen. Van de overige 5 mutanten was de groeisnelheid

significanter gereduceerd. Opmerkelijk genoeg zijn we in staat geweest een mutant te maken die deficiënt is voor zowel plasmepsin-4 als berghepain-2, de enige twee enzymen waarvan bekend is dat ze betrokken zijn bij de initiatie van hemoglobinedigestie. Groei van deze mutant was beperkt tot de jonge rode bloedcellen, de reticulocyten, alwaar de parasiet in staat was zich te ontwikkelen zonder waarneembare vorming van hemozoin. Hemozoin is het gedetoxificeerde bijproduct van hemoglobine degradatie en afwezigheid van hemozoin toont aan dat deze mutant in staat is zich in de rode bloedcel te ontwikkelen met weinig of geen hemoglobine digestie. Deze bevinding wordt gestaafd door de observatie dat deze parasiet minder gevoelig is voor chloroquine vergeleken met wildtype parasieten. Chloroquine gaat een directe interactie aan met hem dat vrijkomt bij degradatie van hemoglobine waardoor een voor de parasiet toxisch complex ontstaat. De verhoogde resistentie van deze mutant tegen chloroquine is dan ook consistent met de door ons geobserveerde reductie/afwezigheid van hemoglobine digestie. Deze bevindingen hebben belangrijke implicaties voor de ontwikkeling van een resistentie tegen malariamedicijnen, vooral voor malariaparasieten die zich in reticulocyten kunnen ontwikkelen waarbij hemoglobine digestie niet langer essentieel is.

Van de 41 geselecteerde genen hebben we 22 single knock-out mutanten gemaakt en 2 dubbel knock-out mutanten. De hierboven beschreven mutant is deficiënt voor zowel plasmepsin-4 als berghepain-2 ($\Delta pm4\Delta bp2$) en de tweede dubbel knock-out mutant is deficiënt voor plasmepsin-4 en SMAC (schizont membrane-associated cytoadherence protein, $\Delta pm4\Delta smac$). De groei- en virulente eigenschappen van de 24 mutanten is beschreven in **Hoofdstuk 6**. Negen mutanten lieten een sterk gereduceerde *in vivo* groei zien en 7 van deze 9 mutanten hebben een verminderde virulentie en induceren geen experimentele cerebrale malaria (ECM) in ECM gevoelige (C57BL/6) muizen. Alle 4 mutanten die significant minder hemozoin produceren induceren geen ECM. De Δlap , Δapp en $\Delta pm4\Delta bp2$ mutanten brengen infecties teweeg die zichzelf niet kunnen handhaven in C57BL/6 muizen en ECM-resistente BALB/c muizen.

Een belangrijke uitkomst van mijn onderzoek is dat deze studies laten zien dat het mogelijk is mutanten te genereren met een sterk gereduceerde groei van de bloedstadia en met een verminderde virulentie en dat het door het uitschakelen van meerdere genen mogelijk is mutanten te maken die niet-handhaafbare infecties teweegbrengen in muizen, zonder vorming van hyperparasitemie. Deze mutanten laten dus een geatenuerd phenotype zien, zowel wat betreft groei als virulentie eigenschappen.

Desondanks, zelfs bij infecties met parasieten met sterk gereduceerde groei eigenschappen, zijn zowel C57BL/6 and BALB/c muizen niet in staat om snel een effectieve immunoreactie op te wekken, krachtig genoeg om een acute infectie met lage

parasitemie te controleren. Hierbij moet opgemerkt worden dat in al ons experimenten de muizen werden gevaccineerd met relatief hoge aantallen parasieten ($10^5 - 10^6$). Het is mogelijk dat vaccinatie met minder parasieten de muizen in staat zou stellen de infecties te controleren nog voor de totstandkoming van een hoge parasitemie waardoor infecties zouden kunnen ontstaan met zeer lage parasitemie of 'subpatent' infecties. Deze studies en de studies naar *P. falciparum* infecties bij de mens waarbij beschermende cellulaire immuunreacties worden geïnduceerd met kleine hoeveelheden geïnfecteerde rode bloedcellen (iRBC) zouden kunnen suggereren dat voor de totstandkoming van een beschermende immuniteit, afhankelijk van de gewenste immuunreactie (humoraal of cellulair), verschillende parasieten hoeveelheden nodig zijn. Het is duidelijk dat verder onderzoek nodig is om de factoren van zowel de parasiet als de gastheer die een rol zouden kunnen spelen bij de totstandkoming van een beschermende afweerreactie tegen bloedstadia in kaart te brengen. De toepassing van verzwakte bloedstadium-parasieten kan een bijzonder goed hulpmiddel zijn om meer inzicht te krijgen in geïnduceerde afweerreacties tegen Plasmodium en zou kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van het malariavaccin met de hoogste effectiviteit en de breedste werking.

