



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A plasmodium falciparum sporozoite's journey: through organs and across CD8+ T-cell challenges

Schuijlenburg, R. van

Citation

Schuijlenburg, R. van. (2026, March 12). *A plasmodium falciparum sporozoite's journey: through organs and across CD8+ T-cell challenges*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4296576>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4296576>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Elk jaar sterven ongeveer 600.000 mensen aan malaria, een door muggen overgedragen parasitaire infectie. Hiervan vindt 94% van de sterfgevallen plaats in Sub-Sahara Afrika. Van de verschillende malariasoorten is *Plasmodium falciparum* (Pf) verantwoordelijk voor de meeste sterfgevallen. Helaas hebben maatregelen gericht op het bestrijden van de mug, zoals klamboes en insecticiden, slechts beperkt effect. Daarom werken onderzoekers al jaren aan de ontwikkeling van een effectief vaccin. Voor het eerst in 2023 zijn twee malariavaccins goedgekeurd door de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO): RTS,S/AS01 en R21/Matrix-M. Deze vaccins richten zich op het circumsporozoïet-eiwit (CSP), dat tot expressie komt aan de buitenkant van de malaria sporozoïeten (SPZ), de infectieuze vorm van de parasiet. Hoewel dit een belangrijke mijlpaal is, bieden deze vaccins in endemische gebieden slechts 35-75% bescherming. Bovendien zijn meerdere booster-immunisaties nodig en neemt de bescherming na verloop van tijd af. Hierdoor zijn deze vaccins onvoldoende effectief om malaria volledig uit te schakelen, en is verder onderzoek naar betere vaccins noodzakelijk.

Levenscyclus

Malaria SPZ worden door de *Anopheles*-mug in de huid geïnjecteerd tijdens een bloedmaaltijd. Ongeveer 20% van de SPZ verlaat de huid en bereikt via de bloedbaan verschillende organen, waarna SPZ uiteindelijk in de lever terecht komen. In de lever infecteren SPZ levercellen en ontwikkelt zich tot een lever-schizont gevuld met merozoïeten. Dit proces duurt 6-7 dagen. Wanneer de lever-schizont uitbarst, komen de merozoïeten in de bloedbaan terecht en infecteren ze rode bloedcellen. De parasiet doorloopt vervolgens een asexueel en een seksueel bloedstadium. In het seksuele bloedstadium ontwikkelen mannelijke en vrouwelijke gametocyten die, wanneer ze door een *Anopheles*-mug worden opgenomen, zich in de mug ontwikkelen tot nieuwe SPZ, waarmee de infectiecyclus opnieuw begint.

Verzwakte malaria sporozoïeten vaccines

In de loop der jaren hebben onderzoekers geprobeerd om vaccins te ontwikkelen die zich richten op elk stadium van de parasiet. Vaccins gebaseerd op het SPZ- en leverstadium, bleken het meest effectief. Het eerste hele SPZ-vaccin bestaat uit met straling verzwakte SPZ – radiation-attenuated SPZ (RAS). Sindsdien zijn meerdere SPZ-vaccins ontwikkeld, waaronder genetisch verzwakte SPZ. Bij deze SPZ zijn specifieke genen verwijderd, waardoor de parasiet verzwakt is. Hierdoor kunnen mensen niet meer ziek worden, maar wordt het immuunsysteem wel blootgesteld aan de SPZ. Een voorbeeld is de Pf GA1-parasiet, een Pf SPZ die zich niet verder kan ontwikkelen dan

het vroege leverstadium. Daarna werd de *Pf* GA2-parasiet, waarin het mei2-gen verwijderd is (*Pf*Δmei2), ontworpen. Deze *Pf* GA2-parasiet kan zich niet verder ontwikkelen dan het late leverstadium. Hierdoor kunnen merozoïeten de bloedbaan niet bereiken, terwijl het immuunsysteem voldoende tijd krijgt om de parasiet te herkennen. Immunisatie met de *Pf* GA2 laat 89% bescherming zien, terwijl *Pf* GA1 slechts 13% bescherming biedt bij Nederlandse vrijwilligers. Deze resultaten onderstrepen het belang van het late leverstadium in het opwekken van effectieve immuun responsen tegen malaria. De specifieke immuun cellen die verantwoordelijk zijn voor bescherming tijdens het leverstadium bij mensen zijn echter nog onbekend. Dit komt onder andere doordat het kweken van *Pf* GA2 in het late leverstadium *in vitro* tot op heden niet mogelijk is. Bovendien zijn leverbiopten van met malaria geïnfecteerde vrijwilligers zeer invasief, risicovol en bieden ze een lage kans op het vinden van geïnfecteerde levercellen door de lage infectiviteit in dit stadium. Deze uitdagingen belemmeren het onderzoek naar lever-specifieke immuun mechanismen. Daarom is een functioneel equivalent model ontwikkeld met de muizen parasiet *Plasmodium berghei* (*Pb*) GA2, waarmee immuun responsen in het leverstadium in de muis in detail bestudeerd kunnen worden.

Immuun activatie

Onderzoek bij muizen heeft aangetoond dat CD8⁺ T-cellen in de lever een cruciale rol spelen bij het elimineren van de parasiet, omdat de bescherming na RAS immunisatie verdween met het verwijderen van de CD8⁺ T-cellen. Om malaria-specifieke antigenen te herkennen, moeten naïeve CD8⁺ T-cellen eerst worden geactiveerd door antigeen presenterende cellen (APC), zoals macrofagen en dendritische cellen. Na activatie van naïeve CD8⁺ T-cellen differentiëren ze tot epitoopecifieke CD8⁺ T-cellen, waarvan sommige zich vestigen in specifieke organen als weefselspecifieke geheugen – tissue-resident memory T-cellen (Trm). In de lever is aangetoond dat Trm CD8⁺ T-cellen bescherming bieden door geïnfecteerde levercellen specifiek te herkennen en te elimineren. Het is echter nog onduidelijk waar en hoe naïeve CD8⁺ T-cellen worden geactiveerd en getraind om specifieke epitopen te herkennen. Daarnaast is het ook onduidelijk welke epitopen worden gepresenteerd door geïnfecteerde levercellen. Met deze kennis kunnen CD8⁺ T-cellen epitoopecifiek getraind worden waardoor er een grotere kans bestaat dat deze cellen malaria geïnfecteerde levercellen kunnen herkennen en uitschakelen. Daarnaast is het, door de herhaaldelijke blootstelling aan malaria geïnfecteerde muggen in endemische gebieden, belangrijk dat vaccins langdurige immuniteit opwekken. Het inzicht in hoe CD8⁺ T-cellen worden getraind en wat geïnfecteerde levercellen presenteren, zal bijdragen aan een langere levensduur en effectiviteit van deze cellen.

Het trainen van CD8⁺ T-cellen en herkenning van geïnfecteerde levercellen

Activatie en training van CD8⁺ T-cellen om specifieke epitopen te herkennen kan in verschillende lymfoïde organen plaatsvinden. Zo worden SPZ door een mug in de huid geïnjecteerd, waar zij in contact komen met huid specifieke APC. Deze door SPZ gestimuleerde huid specifieke APC migreren naar de huid-drainerende lymfeklieren (huid-dLN), waar ze naïeve CD8⁺ T-cellen primen. De geactiveerde CD8⁺ T-cellen migreren vervolgens naar de lever. Echter, verwijdering van de huid-dLN voorafgaand aan SPZ-infectie leidt niet tot verlies van leverstadium-bescherming, wat erop wijst dat CD8⁺ T-cel training die relevant is voor leverstadium-immuniteit elders plaatsvindt. Daarom onderzochten we de mogelijkheid van CD8⁺ T-cel activatie en training in andere organen. Aangezien de longen sterk gevasculariseerd zijn en vaak fungeren als immuun-surveillancelocaties voor circulerende pathogenen, onderzochten we of ook zij betrokken zijn bij CD8⁺ T-cel activatie en training na *Pb* GA2 SPZ-immunisatie. Het was voorheen onbekend of SPZ via de circulatie de longen bereiken en hoe het immuunsysteem daarop reageert. In **hoofdstuk 2** observeerden we geactiveerde CD8⁺ T-cellen in de longen na *Pb* GA2 SPZ-immunisatie in muizen, wat erop wijst dat SPZ door de longen reizen. Opvallend was dat we een verhoogd aantal long specifieke Trm CD8⁺ T-cellen vonden. Deze populatie was eerder alleen in de lever beschreven na *Pb* GA2 SPZ-immunisatie. In vergelijking met activatie in de lever (7 dagen na immunisatie), vond activatie in de longen eerder plaats (2 dagen na immunisatie). Deze bevindingen suggereren dat CD8⁺ T-cel activatie in meerdere organen plaatsvindt. Het blijft echter onduidelijk of in de longen geactiveerde CD8⁺ T-cellen direct SPZ kunnen elimineren, of dat hun aanwezigheid juist het overleven van SPZ bevordert, aangezien deze geactiveerde CD8⁺ T-cellen zich eigenlijk in de lever zouden moeten bevinden.

Om te onderzoeken wat *Pf* SPZ geactiveerde en getrainde CD8⁺ T-cellen kunnen herkennen, hebben we in **hoofdstuk 3** HLA-A*02 positieve naïeve CD8⁺ T-cellen geactiveerd en getraind, middels een *in vitro* co-kweek model, om *Pf* SPZ specifiek te herkennen. Deze *Pf* SPZ geheugen CD8⁺ T-cellen vormen een sterk geactiveerde populatie van effector-geheugen – effector memory CD8⁺ T-cellen (Tem). Deze cellen vertonen robuuste functionele kenmerken, waaronder de expressie van activatie markers CD137, IFN γ en Perforine, en vormen verschillende T-celreceptor (TCR) clusters na herstimulatie met *Pf* SPZ, wat duidt op antigeen specifieke herkenning en cytolytisch potentieel. Na stimulatie met verschillende SPZ en leverstadium specifieke epitopen zagen we activatie van deze SPZ-specifieke geheugen-CD8⁺ T-cellen gericht tegen het complex-release (CRA) epitoom GLLGNVSTV. Dit geeft aan dat dit epitoom wordt gepresenteerd door SPZ-gestimuleerde APC en herkend door *Pf* SPZ geheugen CD8⁺ T-

cellen. Dit model kan worden gebruikt om aanvullende epitopen te identificeren die herkend worden door SPZ-specifieke geheugen-CD8⁺ T-cellen, en kunnen zo bijdragen aan gerichtere vaccin ontwikkeling. Wel is vervolgonderzoek nodig om te bepalen of deze *Pf* SPZ geheugen-CD8⁺ T-cellen die CRA epitooop GLLGNVSTV kunnen herkennen, ook effectief *Pf*-geïnfecteerde levercellen kunnen herkennen en elimineren. Dit ligt eraan of de *Pf*-geïnfecteerde levercellen dit GLLGNVSTV epitooop tot expressie brengen.

Naast CRA epitooop GLLGNVSTV zijn er in eerdere studies CD8⁺ T-cellen gevonden, uit perifere bloed van mensen uit malaria-endemische gebieden, die het CSP-epitooop YLNKIQNSL specifiek kunnen herkennen. Dit specifieke epitooop is geassocieerd met beschermende immuniteit in muismodellen. Daarom onderzochten we in **Hoofdstuk 4** of een humane HLA-A*02 positieve geheugen-CD8⁺ T-cel kloon specifiek voor het CSP-epitooop YLNKIQNSL in staat is om humane HLA-A*02 *Pf*-geïnfecteerde levercellen *in vitro* te herkennen en te elimineren. Hier zagen we dat deze cellen ongeveer 45% van de geïnfecteerde levercellen konden herkennen en uitschakelen. Deze gegevens leveren bewijs dat levercellen het *Pf* CSP-epitooop YLNKIQNSL kunnen presenteren tijdens het leverstadium, en daardoor doelwit zijn van CD8⁺ T-cel gemedieerde eliminatie. Dit *in vitro* model kan worden ingezet om aanvullende leverstadium-epitopen te identificeren, met als doel het verhogen van epitooop diversiteit en het verbeteren van de vaccindoeltreffendheid.

Onze bevindingen tonen aan dat CD8⁺ T-cellen in de longen geactiveerd en getraind kunnen worden en dat geheugen CD8⁺ T-cellen in staat zijn om *Pf*-geïnfecteerde levercellen te herkennen en te doden via het CSP-epitooop YLNKIQNSL. Om deze effectorfuncties volledig te benutten, moeten vaccin-geïnduceerde CD8⁺ T-celresponsen krachtig en epitooop specifiek zijn. Bovendien tonen individuen in malaria-endemische gebieden vaak een verminderde bescherming vergeleken met mensen in niet-endemische gebieden. Dit kan worden veroorzaakt door verschillen in genetische achtergrond, blootstelling aan ziekteverwekkers, en mogelijke mismatches tussen vaccinstammen en wilde parasietstammen. In het laboratorium aangepaste genetisch verzwakte SPZ, zoals GA2, kunnen verschillen van natuurlijk circulerende stammen, wat kan leiden tot suboptimale CD8⁺ T-cel training en verminderde herkenning van *Pf*-geïnfecteerde levercellen. Een beter begrip van de optimale vaccin formulering, zoals de biologie van SPZ, de toedieningsroute en de dosis, kan daarom de omvang en kwaliteit van immuun responsen aanzienlijk beïnvloeden.

Verbeteren van bescherming van het GA2 SPZ vaccine

Biologische variatie in SPZ, zoals de SPZ-leeftijd op het moment van immunisatie, kan een aanzienlijke invloed hebben op de werkzaamheid van het vaccin. In de literatuur worden *Pf* SPZ tussen 10 en 21 dagen na de bloedmaaltijd van de mug verzameld, ondanks beperkte kennis over hoe de biologie van SPZ in de tijd verandert of hoe dergelijke veranderingen hun beschermende werking beïnvloeden. Daarom onderzochten we in **hoofdstuk 5** de verschillen in motiliteit, immuun activerend vermogen en infectiviteit tussen *Pf* SPZ op dag 14 en dag 20 na de bloedmaaltijd. Hier ontdekten we dat jongere *Pf* SPZ (14 dagen na bloedmaaltijd) bewegelijker zijn, sterkere activatie van macrofagen en een hogere infectiviteit van levercellen vertoonden, maar wel zwakkere CD8⁺ T-cel responsen opwekten dan oudere *Pf* SPZ (20 dagen na bloedmaaltijd). Toekomstige studies moeten uitwijzen of juist een hogere infectiviteit van levercellen of sterkere CD8⁺ T-cel activatie tot betere bescherming leidt, inzichten die cruciaal zijn voor de verdere ontwikkeling van effectieve SPZ-vaccins.

Daarnaast hebben muismodellen aangetoond dat de toedieningsroute van SPZ-vaccins een grote invloed heeft op de vaccinwerkzaamheid. Intradermale (ID) SPZ-immunisatie, die gemakkelijker toe te dienen is dan intraveneuze (IV) immunisatie, leidt tot een lagere parasitaire belasting in de lever en verminderde bescherming na herhaalde SPZ-immunisaties met *Pb* SPZ gevolgd door anti parasitaire behandeling. Het identificeren van de meest effectieve toedieningsroute kan de efficiëntie van het vaccin verbeteren, de benodigde dosis verlagen en de kosten reduceren. In **hoofdstuk 6** onderzochten we waarom ID-immunisatie leidt tot verminderde bescherming. Onze bevindingen tonen een lager aantal CD8⁺ Trm-cellen en verminderde activatie van CD8⁺ T-cellen en dubbel negatieve (DN) T-cellen in de milt, longen en lever na ID *Pb* GA2-immunisatie vergeleken met IV *Pb* GA2-immunisatie. In de huid, huid-dLN en in de lever identificeerden we een grote populatie myeloïde cellen met een overwegend regulerend fenotype na ID *Pb* GA2 SPZ-immunisatie. Deze cellen vertoonden een verlaagde CD86 expressie in de huid en een verhoogde PD-L1 expressie in de huid-dLN. Deze resultaten suggereren dat myeloïde cellen in de huid en huid-dLN een regulatoire immuunrespons coördineren, wat resulteert in een lager aantal CD8⁺ Trm-cellen en verminderde T-cel activatie in de milt, longen en lever na ID *Pb* GA2-immunisatie vergeleken met IV-immunisatie. Recente studies tonen aan dat het verlagen van het injectievolume de werkzaamheid van vaccinatie via de ID-route kan verbeteren. Deze inzichten vormen samen een belangrijke basis voor het optimaliseren van ID-immunisatie strategieën om beschermende immuniteit te bereiken die vergelijkbaar is met IV-toediening.

Tot slot hebben recente studies aangetoond dat te veel booster-immunisaties bescherming kunnen verminderen. Samen met het reduceren van kosten en aantal vaccinaties in moeilijk bereikbare gebieden, onderstreept dit de noodzaak om het minimale aantal benodigde doses voor effectieve immuniteit vast te stellen. In **hoofdstuk 7** gebruikten we een humane klinische studie om aan te tonen dat een enkele *Pf* GA2 SPZ-immunisatie via muggenbeten, 90% bescherming biedt. Verhoogde niveaus van cytokine-producerende CD4⁺ T-cellen werden geassocieerd met deze bescherming. Deze ongeëvenaarde effectiviteit van een enkele dosis benadrukt het potentieel van het GA2-vaccin en rechtvaardigt verder onderzoek naar optimalisatie van toedieningsroutes en doseringen voor maximale bescherming in endemische gebieden.

Conclusie

De studies in dit proefschrift tonen gezamenlijk aan dat CD8⁺ T-cellen in de longen geactiveerd en getraind kunnen worden, dat *Pf* SPZ geheugen-CD8⁺ T-cellen in staat zijn om CRA-epitoom GLLGNVSTV te herkennen, en dat CSP-epitoom YLNKIQNSL specifieke CD8⁺ T-cellen effectief *Pf*-geïnficeerde levercellen kunnen herkennen en elimineren. Daarnaast hebben we aangetoond dat de werkzaamheid van GA2 SPZ-vaccins verbeterd kan worden door zowel de leeftijd van de SPZ als de toedieningsroute te optimaliseren. Tot slot hebben we laten zien dat een enkele dosis GA2 SPZ tot wel 90% bescherming kan bieden bij mensen. Deze bevindingen verschaffen belangrijke inzichten in de immuun mechanismen die geactiveerd worden door GA2-immunisatie en bieden strategieën voor het verbeteren van vaccinontwerpen, waarmee ze bijdragen aan het lange termijn doel om malaria te elimineren.