

Henriette Luise Prinz

Dr. med.

## **Grundlagen eines Malaria-Lebendimpfstoffes: Kryokonservierung von Sporozoiten**

Fach/Einrichtung: Infektiologie

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Friedrich Frischknecht

Nach dem aktuellen World Malaria Report geht die WHO von 219 Millionen Malaria-Erkrankungen im Jahr 2017 aus. Fast die Hälfte der Weltbevölkerung ist dem unmittelbaren Risiko einer Plasmodien-Infektion ausgesetzt. Effektive Medikamente zur Prophylaxe und Behandlung der Malaria existieren, allerdings nehmen Resistenzen der Erreger zu. Der einzige bisher zugelassene Impfstoff, RTS,S/AS01 (Mosquirix), weist bei Kindern eine protektive Effizienz von etwa 25-50% auf. *In vivo* Untersuchungen in Modellorganismen sowie immunologische Erkenntnisse bei der Entwicklung anderer Impfstoffe legen nahe, dass attenuierte Lebendvakzine einen höheren Schutz vor Infektion bieten können und im Gegensatz zu rekombinanten Antigenen keine Adjuvantien benötigen. Für den erfolgreichen Einsatz eines denkbaren, effektiven Lebendimpfstoffes müssen jedoch auch logistische Herausforderungen gemeistert werden: eine Konservierung des Lebendimpfstoffes für den Transport unter Beibehaltung der protektiven Effektivität ist dabei unabdingbar.

In dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur Kryokonservierung von *Plasmodium berghei* Sporozoiten entwickelt. Dabei wurden die Effekte der Kryokonservierung auf die Viabilität sowie Infektiosität der Plasmodien *in vitro* sowie *in vivo* untersucht. Außerdem wurde die protektive Effektivität von kryokonservierten *Lisp2(-)* Sporozoiten in einer Immunisierung mit der von frisch isolierten Sporozoiten verglichen.

Hierbei zeigte sich, dass nur etwa 50% ( $\pm 13\%$ ) der zuvor isolierten Sporozoiten nach der Kryokonservierung wiedergewonnen werden konnten. Die kryokonservierten Sporozoiten zeigten allerdings in *in vitro* „Gliding Assays“ auf einer Glasoberfläche verglichen mit frisch isolierten Sporozoiten einen gleichen Anteil an produktiver Motilität ( $54 \pm 5\%$  vs.  $42 \pm 1\%$ ,  $p=0,1$ ) sowie vergleichbare Geschwindigkeiten ( $2,9 \pm 1,0$  Kreise/100s vs.  $2,8 \pm 1,2$  Kreise/100s). Kryokonservierte Sporozoiten zeigten zudem *in vitro* einen Defekt bei der Invasion von, nicht jedoch in der Entwicklung in Hepatozyten ( $21 \pm 8\%$  vs.  $60 \pm 4\%$ ,

bei vergleichbaren Größen der entwickelten Leberstadien nach 24h, 48h und 72h). Gleichmaßen konnte dieser Defekt bei der *in vivo* Infektion in Mäusen nachgewiesen werden (Reduktion der Leberlast um das 35fache). Bei der Untersuchung der Motilität auf weicheren Substraten ließ sich eine deutliche Einschränkung der kryokonservierten Sporozoiten bezüglich des prozentualen Anteils an produktiv bewegten Sporozoiten im Vergleich zu frisch isolierten Sporozoiten nachweisen ( $21 \pm 6 \%$  vs.  $41 \pm 12 \%$ ). Zwei Immunisierungsstudien wurden mit kryokonservierten *Lisp2(-)* Sporozoiten im Vergleich zu frisch isolierten *Lisp2(-)* Sporozoiten durchgeführt. Hierbei zeigte sich sowohl in Einfach- wie auch Doppel-Immunisierungen ein konstant höherer protektiver Effekt durch frisch isolierte *Lisp2(-)* Sporozoiten. Prinzipiell waren jedoch auch kryokonservierte *Lisp2(-)* Sporozoiten zu der Induktion einer protektiven Immunantwort in der Lage.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Plasmodium berghei* Sporozoiten mittels Kryokonservierung eingefroren und wieder aufgetaut werden können. Dabei wurde ihre Motilität auf Glasoberflächen (konventioneller „Gliding Assay“) nicht beeinträchtigt, wohl aber ihre Fähigkeit, Hepatozyten zu invadieren, und eine Infektion *in vivo* zu etablieren. Dementsprechend war ihre protektive Effektivität im Rahmen von Immunisierungen mit kryokonservierten genetisch attenuierten Parasiten abgeschwächt. Eine mögliche Erklärung für diesen beobachteten Defekt ist, dass durch die Kryokonservierung Organellen, die für die Invasion notwendig sind, geschädigt werden, ohne Organellen zur parasitären „Gliding Motility“ zu beeinträchtigen. Eine alternative Erklärung könnte sein, dass die Kraftentwicklung der Sporozoiten durch Kryokonservierung verringert wird, wodurch die nötige Kraft, die für eine effektive Bewegung auf weichen Substraten vonnöten ist, nicht aufgebracht werden kann. Auch eine unspezifische Schädigung, ähnlich der DNA-Doppelstrangbrüche durch Bestrahlung, die einen gewissen Prozentsatz der kryokonservierten Sporozoiten gänzlich ausschaltet, scheint denkbar. In einer Immunisierung erscheinen eine Erhöhung der Einzeldosen oder Verlängerung des Impfregimes als vielversprechende Kompensationsmechanismen um diesen Defekt auszugleichen.