

- Zusammenfassung -

Karl Octaviano Sutanto
Dr. med

Chaperones as alternative targets for malaria Rapid Diagnostic Tests (RDTs)

Fach/Einrichtung: Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. Michael Lanzer

In der Malariaforschung wurden im letzten Jahrzehnt viele wissenschaftliche Fortschritte erzielt. Dennoch ist Malaria in Entwicklungsländern weltweit immer noch eine bedeutende Ursache für Mortalität und Morbidität. Jährlich sind rund eine halbe Million Todesfälle durch Malaria verursacht. Derzeit gibt es fünf Plasmodium-Spezies, die beim Menschen Malaria verursachen können: *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. vivax*. Unter den fünf Spezies ist die durch *P. falciparum* verursachte Malaria weltweit für die Mehrzahl der durch Malaria verursachten Todesfälle verantwortlich. Neben Therapieresistenzen und mangelndem Zugang zum Gesundheitssystem ist das diagnostische Versagen in vielen Ländern mit Malaria-Endemie nach wie vor ein großes Problem. Obwohl hochpräzise Methoden zur Diagnose von Malaria wie PCR und Mikroskopie verfügbar sind, erfordern sie häufig spezielle Geräte und ausgebildete Personal, was ihre Anwendbarkeit in vielen Malaria-Endemiegebieten einschränkt. Ein Ansatz zur Lösung dieses Problems sind Rapid Diagnostic Tests (RDT), von denen gezeigt wurde, dass sie eine vergleichbare Spezifität und Sensitivität wie die Mikroskopie aufweisen. Mehrere in den letzten Jahren veröffentlichte Studien haben jedoch gezeigt, dass ein Teil von *P. falciparum* kein PfHRP2 exprimiert, ein Protein, das für *P. falciparum* spezifisch ist und in vielen RDTs als Zielprotein verwendet wird. Da viele *P. falciparum*-RDTs aufgrund ihrer Empfindlichkeit nur auf den Nachweis von PfHRP2 basiert sind, ist es von großem Interesse, einen neuen Schnelltest auf der Basis anderer plasmodialer Proteine zu entwickeln.

PfHsp70-x ist ein einzigartiges Chaperon in *P. falciparum*. Es ist das einzige Hsp70-Homolog, das in den infizierten Erythrozyten exportiert wird. Nach derzeitigem Wissenstand ist PfHsp70-x nur von den sieben Spezies der Untergattung *Laverania* exprimiert wird, von denen nur *P. falciparum* ein humaner Erreger ist. Es wurden umfangreiche Untersuchungen durchgeführt, um die Rolle von PfHsp70-x für das Überleben und die Virulenz von Parasiten bei der *P. falciparum* Infektion aufzuklären. Es wurde jedoch wenig Forschung betrieben, um die mögliche Verwendung von PfHsp70-x als diagnostisches Ziel zu untersuchen. Diese Studie zielt darauf ab, die Möglichkeit der Verwendung von PfHsp70-x, von dem angenommen wird, dass es in Parasiten ohne *phrp2*-Gen erhalten bleibt, als potenzielles RDT Zielprotein zu untersuchen.

Im ersten Teil der Studie wurde rekombinantes PfHsp70 für die Assayentwicklung gereinigt. Während des Expressionsverfahrens wurde eine unerwartete Deletion in der Promotorregion des Expressionsvektors entdeckt. Obwohl es durch erneutes Klonieren des Zielgens in einen geeigneteren Vektor angemessen gelöst wurde, könnte dieser Befund auf ein tiefgreifendes Problem hinweisen, wenn das T5-Promotorsystem zur Expression eines rekombinanten plasmodialen Proteins verwendet wird.

Im zweiten Teil wurde die Möglichkeit der Verwendung von PfHsp70-x als diagnostisches Ziel untersucht, indem zwei ELISA-Setups als Ausgangspunkt für die RDT-Entwicklung festgelegt wurden. Der erste ELISA-Aufbau verwendet ein Antigen-Capture-Verfahren, um den Nachweis von Antigen in minimaler Konzentration zu ermöglichen. Der Assay konnte das Vorhandensein des Zielproteins PfHsp70-x im Parasitenkulturüberstand nicht erfolgreich nachweisen. Für dieses Ergebnis könnten mehrere Faktoren verantwortlich sein: Matrixeffekt, Proteinabbau, niedrige Analytkonzentration und ungeeignetes Antikörperpaar. Der Antigen-Capture-Ansatz wurde nicht weiter verfolgt, da nur ein Antikörperpaar zur Verwendung verfügbar war.

Im zweiten ELISA-Aufbau wurde der spezifische Antikörper gegen PfHsp70-x aus verfügbaren Proben gemessen. Ein interessantes Ergebnis wurde beim Testen des von NIBSC erhaltenen WHO-Standardserums gegen Malaria beobachtet. Obwohl das Serum nicht explizit auf den Anti-PfHsp70-x-Antikörper gescreent wurde, zeigte es einen hohen Titerwert. Während eine Folgestudie erforderlich ist, um die Korrelation zwischen der Antikörperantwort und dem Infektionsstatus zu bestimmen, eröffnet dieses Ergebnis die Möglichkeit, die Antikörperantwort gegen PfHsp70-x für diagnostische Zwecke zu verwenden.

Zusammenfassend konnte PfHsp70-x unter Verwendung des in dieser Studie beschriebenen Systems nicht unter Verwendung von Antigen-Capture nachgewiesen werden. Eine Folgestudie sollte durchgeführt werden, um verschiedene Bedingungen zu optimieren, die für dieses Ergebnis verantwortlich sein könnten. Hauptsächlich sollte verschiedene Antikörperpaare generiert und in der potenziellen Folgestudie getestet werden. Die Antikörperantwort gegen PfHsp70-x wurde jedoch erfolgreich in einem indirekten ELISA-Aufbau gemessen. In Anbetracht der Tatsache, dass der gemessene Titer sehr hoch ist, sollte eine Folgestudie durchgeführt werden, um die Möglichkeit zu untersuchen, den indirekten ELISA-Aufbau für diagnostische Zwecke zu verwenden. Obwohl für die Entwicklung eines klinisch validierten Tests eine Weiterentwicklung erforderlich ist, dienen diese Ergebnisse als Proof-of-Concept für die Entwicklung eines Schnelltests auf der Basis von Plasmodium-Chaperonen.