

Lukas Keiber

Dr. med.

Developing genetically attenuated parasites as an experimental vaccine

Fach: Parasitologie

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

Malaria wird von Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursacht. Obwohl ein enormer Aufwand zur Bekämpfung dieser Krankheit betrieben wird, verursacht sie dennoch mehrere hunderttausend Tote jährlich. Das derzeit einzige verfügbare Malariavakzin (Stand 2021) ist der Untereinheitenimpfstoff RTS,S, welcher in prä-erythrozytären Stadien wirkt und auf Strukturen des circumsporozoite protein (CSP) basiert. Es gelingt dem Impfstoff jedoch in der Praxis nicht, das von der WHO vorgegebene Wirksamkeitsziel für Malariaimpfstoffe von 75% zu erreichen. Deshalb müssen neue Ansätze für Malariaimpfstoffe gefunden werden, die der Bevölkerung in betroffenen Gebieten einen ausreichenden Schutz bieten können.

Eine große Herausforderung bei der Suche nach einem Impfstoff ist die enorme Antigenvariabilität des Malariaerregers. Um dem Immunsystem des Wirtes ein breiteres Spektrum an Antigenen zu präsentieren, wird zunehmend auf Impfstoffe gesetzt, die ganze Erreger enthalten, anstatt nur einzelner Anteile davon. Damit verhindert wird, dass durch die Gabe von intakten Malariaerregern die Krankheit ausgelöst wird, muss der Malariaerreger gleichzeitig oder schon vorher abgeschwächt (attenuiert) werden.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass parallel zu einer bewusst herbeigeführten Infektion Antimalariamedikation eingenommen wird. Obwohl in Studien durch diese Pharmaka Durchbruchinfektionen meist verhindert werden, sind eine ständige Überwachung und regelmäßige Kontrollen im Nachgang notwendig. Dies könnte in der praktischen Anwendung logistische und infrastrukturelle Probleme verursachen. Ein weiterer Ansatz besteht in der Verabreichung von Sporozoiten, die vorher durch Röntgenstrahlen geschwächt wurden und sich dadurch nicht über das Leberstadium hinaus entwickeln können. Jedoch hat sich auch dieses Konzept bis jetzt noch nicht im klinischen Betrieb etabliert.

Genetisch attenuierte Parasiten (GAP) stellen in diesem Zusammenhang ein Konzept dar, das sich von den oben genannten Ansätzen unterscheidet. Hier wird das Parasitengenom spezifisch modifiziert, anstatt stochastische strahlungsbedingte Schäden zu verursachen. Die Identifikation passender Zielgene ist jedoch nicht trivial, da spezielle Anforderungen an GAP gestellt werden. In dieser Studie werden im Kontext einer experimentellen Malaria-Immunsierung 17 mögliche Zielgene von *P. berghei* untersucht. Diese wurden im Vorfeld mit bioinformatischen Methoden identifiziert. Um bei der Suche berücksichtigt zu werden, musste von jedem Gen unter anderem eine relative Wachstumsrate (RGR) zwischen 0.2 und 0.4 nach dem *PlasmoGEM* screening aufgewiesen werden.

Zunächst wurden alle Kandidaten durch Elektroporationsverfahren in Schizontenkulturen transfiziert. Dabei wurde auf Knock-Out Vektoren von *PlasmoGEM* zurückgegriffen. Anschließendes Klonieren gelang mit seriellen Verdünnungsreihen. Die anschließenden *in vivo* Experimente wurden mit Moskitos der Gattung *A. stephensi* und zwei unterschiedlichen Reihen von Labormäusen durchgeführt. Letztendlich gelang es, drei transgene Parasitenlinien zu erzeugen: Man-1-P-GT KO, PK KO and U2SURP KO, denen individuell jeweils das Gen PBANKA_1022300, PBANKA_0826900 beziehungsweise PBANKA_1039300 fehlt.

Mäuse, die mit Man-1-P-GT KO infiziert wurden, verstarben größtenteils. Der kleine Anteil an Überlebenden war jedoch vor einer Wildtypinfektion mit 1000 *PbA* Sporoziten geschützt. In infizierten Moskitos wurden keine Oozysten gefunden. Versuche mit *in vitro* Ookinetenkulturen ließen darauf schließen, dass das Überleben des Man-1-P-GT KO Parasiten in Moskitostadien deutlich verringert ist. Daher ist dieser Kandidat für ein durch Stechmücken übertragbares Vakzin ungeeignet. Infektionen mit dem PK KO wurden von Mäusen nicht überlebt. Abgesehen von einer reduzierten RGR in asexuellen Blutstadien wurden im Lebenszyklus keine phänotypischen Abweichungen zum Wildtyp gefunden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass der Infektionsverlauf stark davon abhängig ist, ob Leberstadien durchlaufen werden. Diese Tatsache könnte helfen, die immunologische Relevanz der eigentlich klinisch asymptomatischen Leberstadien zu klären, da die entsprechenden Mäuse keine cerebralen Komplikationen entwickelten. Leider hat, wie bereits zuvor erwähnt, der PK KO ohne Ausnahme zum Versterben der infizierten Mäuse geführt. Damit scheidet er als alleiniger Kandidat für eine Immunisierung vorerst aus, könnte aber zukünftig als Teil eines kombinierten Knock-Outs in Frage kommen.

Die dritte Parasitenlinie des U2SURP KO hat in keiner infizierten Maus zum Tode geführt. Stattdessen waren die Tiere sogar dazu in der Lage, ausnahmslos die Infektion selbst zu bekämpfen. Ob dies zur Immunität vor Wildtypparasiten führt, ist noch nicht abschließend geklärt und verlangt weitere Experimente. Der U2SURP KO war unfähig, reife Gametozyten auszubilden. Da der Parasit somit nicht den Lebenszyklus vollständig durchlaufen konnte, wurden auch keine Moskitostadien untersucht. Zukünftige Ansätze könnten darin bestehen, die Moskitostadien zugänglich zu machen und das Immunisierungspotenzial des Parasiten weiter zu untersuchen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die drei Kandidaten einen guten Ausgangspunkt für zukünftige Ansätze bieten, die sich mit Immunisierungen durch ganze Parasiten beschäftigen, bei denen mehrere Gene ausgeschaltet werden. Das Fehlen eines einzelnen Kandidaten hat noch nicht zum gewünschten Phänotyp und Immunisierungsverhalten geführt. Besonders im Hinblick auf die Untersuchung der Entwicklung von sexuellen Stadien könnten die drei Zielgene jedoch in Zukunft von Interesse sein.