

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/67294> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Marin Mogollon, C.Y.

Title: CRISPR/CAS9 genetic modification of plasmodium falciparum and transgenic parasites in malaria vaccine research

Issue Date: 2018-11-28

APPENDIX

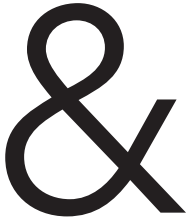
Nederlandse samentvatting

English summary

Acknowledgements

Curriculum vitae

List of publications



Nederlandse samentvatting

De beschikbaarheid van een verscheidenheid aan transgene knaagdier malariaparasieten die verschillende reportereiwitten tot expressie brengen onder controle van stadium specifieke- of constitutieve promotors, is van grote waarde gebleken in studies naar de functie van genen van de parasiet en in onderzoek gericht op de evaluatie van nieuwe medicijnen en vaccins. De beschikbaarheid van vergelijkbare transgene *Plasmodium falciparum* reporterlijnen zou het onderzoek naar gen-functies en de ontwikkeling van nieuwe behandeltherapieën voor humane parasieten kunnen versnellen. In **Hoofdstuk 2** geven we een overzicht van het gebruik van transgene knaagdier en humane malariaparasieten voor vaccinonderzoek.

In deze thesis beschrijven we een reeks van studies uitgevoerd met *P. falciparum* naar de ontwikkeling van nieuwe CRISPR/Cas9 methodieken ter optimalisatie van de genetische modificatie en het genereren van nieuwe transgene *P. falciparum* reporterparasieten waarmee parasiet-gastheer interacties kunnen worden geanalyseerd en welke toegepast kunnen worden in het onderzoek naar nieuwe medicijnen en vaccins. We hebben ons eerst gericht op het verbeteren van de CRISPR/Cas9 genommodificatietechniek en het introduceren van transgenen in een nieuw, potentieel neutraal, locus van het *P. falciparum* genoom. Gebruik makend van deze verbeterde CRISPR/Cas9 methodieken werden transgene *P. falciparum* parasieten ontwikkeld die of fluorescente-luminescente reporter eiwitten tot expressie brengen of een potentieel vaccin kandidaat eiwit van *P. vivax*, een andere belangrijke humane malariaparasiet.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we studies gericht op het optimaliseren van genetische modificatie middels CRISPR/Cas9 voor het introduceren van transgenen in het genoom van *P. falciparum*. We rapporteren over het nog verder verbeteren van zowel de CRISPR/Cas9 DNA constructen als de selectieprocedure om zo het genoom van *P. falciparum* sneller en efficiënter te kunnen modificeren en om het mogelijk te maken om transgenen in het genoom in te brengen zonder selectiemarkers. Deze methode is gebruikt voor de stabiele integratie van het gen coderend voor GFP in het *P. falciparum* genoom. Het GFP gen werd geïntroduceerd onder controle van promotors van 3 verschillende *Plasmodium* genen (*calmodulin*, *gapdh* en *hsp70*) om te selecteren voor constitutieve en sterke promotors, die ingezet kunnen worden voor het aansturen van expressie van reporter genen in verschillende levensstadia van de parasiet. Bovenstaande genen werden geselecteerd op basis van hun hoge transcriptie in bloedstadia. We tonen aan dat de *in vitro* groei-kinetiek en medicijn-gevoeligheidsprofielen van de bloedstadia van de in deze studie gegenereerde reporter parasietlijnen (GFP@cam, GFP@gapdh en GFP@hsp70) vergelijkbaar zijn met die van de *P. falciparum* wildtype (NF54) moederlijn. Zowel de seksuele als asexuele bloedstadia van de drie reporterlijnen lieten GFP fluorescentie zien en flowcytometrische analyse van de fluorescentie intensiteit heeft aangetoond dat de hoogste expressie van GFP plaats vond in schizonten van de GFP@hsp70 lijn.



De verbeterde CRISPR/Cas9 constructen en protocollen zullen er toe bijdragen dat sneller genetisch gemodificeerde *P. falciparum* parasietlijnen ontwikkeld kunnen worden, waaronder lijnen die verschillende reportereiwitten onder verschillende (stadium-specifieke) promotors tot expressie brengen. Bovendien zal deze methode het uitvoeren van opeenvolgende gen-deleties en gen-mutaties vergemakkelijken, wat van waarde kan zijn bij gen functieanalyses en voor het genereren van meervoudig genetische verzwakte parasieten, geschikt voor vaccins.

In bovengenoemde studies voor de introductie in het genoom van de *gfp* expressie-cassettes werd gebruik gemaakt van het *p230p* gen-locus. Omdat dit locus in knaagdier malariaparasieten niet essentieel is, ongeacht het ontwikkelingsstadium van de parasiet, werd verondersteld dat dit gen-locus in de humane malariaparasiet neutraal is (een locus dat gemodificeerd kan worden zonder verandering van het fenotype van de verschillende ontwikkelingsstadia van de levenscyclus). Echter, parasieten waarvan het *p230p* gen-locus was uitgeschakeld waren geheel onverwacht niet langer in staat muggen te infecteren en zich in de mug te ontwikkelen.

In **Hoofdstuk 4** beschrijven we het fenotype van de *p230p* gen-deletie mutanten (*PfΔp230p*) in muggen en de mogelijke rol van het P230p eiwit in de ontwikkeling van de parasiet in het muggenstadium. P230p behoort tot de kleine familie van zogenaamde s48/45-domain 6-cysteine (6-cys) eiwitten. Twee andere eiwitten die tot deze familie behoren, P48/45 en P230, zijn mede bepalend voor de vruchtbaarheid van gameten en zodanig belangrijke antigeenkandidaten voor transmissie-blokkade vaccins. In tegenstelling tot P48/45 en P230, die in zowel mannelijke als vrouwelijke parasieten tot expressie worden gebracht, komt P230p uitsluitend tot expressie in mannelijke gametocyten en gameten van zowel knaagdier als humane malariaparasieten. De *PfΔp230p* mutanten produceerden normale aantallen mannelijke en vrouwelijke gametocyten waarvan expressie van P48/45 en P230 onveranderd was. Met de activatie van mannelijke gametocyten vindt 'exflagellatie' plaats waarbij de mannelijke gameten worden gevormd. Echter, in tegenstelling tot wild type gameten waren de *PfΔp230p* gameten niet in staat zich aan rode bloedcellen te hechten waardoor de vorming van karakteristieke 'exflagellatie-centra' *in vitro* achterwege bleef. Daarnaast bleek de vorming van zygoten en ontwikkeling van zowel oocysten en sporozoieten in muggen is in afwezigheid van P230p sterk gereduceerd (>98%). Mannelijke gameten van knaagdier malariaparasieten waarvan P230p is uitgeschakeld daarentegen laten een normale binding aan rode bloedcellen zien en de vruchtbaarheid en vorming van oocysten van deze parasieten zijn vergelijkbaar met wildtype parasieten. Deze observaties tonen aan dat *P. falciparum* P230p, net als P230 en P48/45, een sleutelrol speelt in de vorming van zygoten en dat verder onderzoek naar P230p als aangrijppunt voor transmissie-blokkade vaccins zinvol is.

In **Hoofdstuk 5** beschrijven we het vervaardigen en evalueren van een *P. falciparum* reporterlijn, die een fusie-eiwit bestaande uit luciferase en mCherry, onder controle van de *etramp10.3* promotor, tot expressie brengt. Deze transgene parasieten werden in kweken van bloed- en leverstadia geanalyseerd, alsmede in muggen. Het *P. falciparum*

ETRAMP10.3 eiwit is gerelateerd aan het UIS4 eiwit van knaagdier malariaparasieten welke ook tot de familie van ETRAMP eiwitten behoort. De promotor van *uis4* wordt toegepast voor de expressie van transgenen in de leverstadia van knaagdier malariaparasieten. Gebruik makend van de in Hoofdstuk 3 beschreven CRISPR/Cas9 methodieken werd de *mCherry-luc@etramp10.3* expressie-cassette geïntegreerd in het reeds eerder gekarakteriseerde, neutrale gen-locus *P. falciparum p47*. Deze reporterlijn laat expressie van mCherry zien in gametocyten, sporozoieten en leverstadia, terwijl mCherry niet aangetoond kon worden boven de achtergrond van aseksuele bloedstadia en zich ontwikkelende oocysten. Expressie van luciferase werd aangetoond in aseksuele bloedstadia, gametocyten, sporozoieten en leverstadia met de hoogste expressie gemeten in stadium III-V gametocyten en sporozoieten. Expressie van mCherry en luciferase in gametocyten en sporozoieten maakt deze transgene parasietlijn uitermate geschikt voor het analyseren van de effecten van remmers van de gametocyt-ontwikkeling en het analyseren van de biologie van sporozoieten en leverstadia.

In **Hoofdstuk 6** beschrijven we de ontwikkeling van twee chimere *P. falciparum* parasieten (*Pf-PvCSP*) waarvan het *csp* gen, met behulp van CRISPR/Cas9 methodieken, werd vervangen door twee *csp* gen varianten (VK210 & VK247) van de humane parasiet *P. vivax*. Als zijnde de belangrijkste oppervlakte-eiwit van sporozoieten, speelt CSP een belangrijke rol in sporozoiet formatie en bij de invasie van de speekselklieren van de mug en levercellen van de gastheer door sporozoieten. Het CSP antigeen is het aangrijppingspunt van het tot nu toe meest geavanceerde malariavaccin (RTS,S) en is ook een zeer belangrijke antigeen voor de ontwikkeling van een vaccin tegen *P. vivax*. Knaagdier malariaparasieten waarvan het *csp* gen werd vervangen door *csp* genen van de humane parasiet *P. falciparum* of *P. vivax* worden gebruikt in preklinische evaluaties van CSP vaccins *in vivo*. Deze chimere knaagdier malariaparasieten produceren sporozoieten in *A. stephensi* muggen welke in staat zijn levercellen van knaagdieren en mensen te infecteren. De beschikbaarheid van chimere *P. falciparum* parasieten waarin het *csp* gen is vervangen door het *csp* gen van *P. vivax* zou mogelijkheden bieden voor het testen van *P. vivax* CSP vaccins in kleinschalige klinische trials gebaseerd op 'controlled human malaria infection' (CHMI) studies. De twee ontwikkelde chimere *Pf-PvCSP* parasietlijnen vertoonden een normale ontwikkeling van aseksuele en seksuele bloedstadia *in vitro* en waren in staat sporozoiet-bevattende oocysten te produceren in *A. stephensi* muggen. We hebben bevestigd dat sporozoieten, afkomstig uit de *Pf-PvCSP* oocysten, de overeenkomstige *PvCSP* variant tot expressie brengen, maar een groot deel van de oocysten degenereren reeds voordat de sporozoieten volledig tot ontwikkeling zijn gekomen en sporozoieten werden niet aangetoond in de hemocoel noch in de speekselklieren van de mug. In de oocysten van *P. falciparum* waarvan CSP werd uitgeschakeld daarentegen werden geen sporozoieten geproduceerd. Deze observaties tonen aan dat *PvCSP* de functie van *PfCSP* deels kan complementeren, maar dat soort-specifieke eigenschappen van CSP noodzakelijk zijn voor het doorlopen van de volledige ontwikkeling van sporozoieten in beide humane malariaparasieten.

