



Rapport av projekt: Hur blir man immun mot malaria?

FORSKNING

MSB:s kontaktpersoner:
Sara Brunnberg, 010-240 4087

Publikationsnummer MSB917 - september 2015

Innehållsförteckning

1. Projektets mål	5
2. Bakgrund	6
2.1 Om malaria.....	6
2.2 Försvaret mot malaria.....	6
2.3 Malaria i Uganda	7
3. Våra studier av immunitet mot malaria	8
3.1 Studier av antikroppar: Kan antikroppar hindra malariamerozoiter från att invadera nya röda blodkroppar?.....	8
3.2 Studier av antikroppar: Bindningsstyrka	9
3.3 Studier av icke-immuna B-celler.....	9
3.4 Studier av immuna B-celler	10
3.5 B-celler har odödliggjorts	10
4. Sammanfattning	11
5. Referenser	12
Bilaga 1: Publikationer 2011-2013	13

Sammanfattning

Malaria är en sjukdom som dödar en miljon människor varje år, och man måste ha det många gånger för att så småningom bli immun mot sjukdomen. Vår forskargrupp har undersökt hur kroppens försvarsceller i blodet reagerar när de träffar på malariaparasiter. Med hjälp av dessa studier kan vi nu bättre förstå varför det tar så lång tid att bli immun mot malaria. Därmed finns det också bättre förutsättningar för att kunna tillverka ett fungerande vaccin mot malaria.

1. Projektets mål

Vi har undersökt hur kroppen utvecklar ett försvar mot malaria för att komma ihåg och känna igen malariaparasiter i blodet. Om man vet hur immunitet mot malaria uppstår, kan man sedan tillverka ett vaccin mot sjukdomen, något som hittills har misslyckats.

2. Bakgrund

2.1 Om malaria

Malaria är ett mycket stort problem globalt sett, resulterande i ca 1 miljon dödsfall varje år. Ända tills för drygt hundra år sedan fanns sjukdomen även i Sverige, och kallades då för "frossan". Symtomen på malaria är hög feber, blodbrist och i allvarliga fall medvetslöshet. Det finns inget vaccin mot malaria, och resistens mot malariamediciner är ett snabbt växande problem. Sjukdomen sprids med myggor, och många av dem som dör i malaria är små barn. De som bor i områden där det finns malaria, och som inte dör i unga år av sjukdomen, utvecklar så småningom ett immunförsvar mot malaria. Problemet är att man först måste ha malaria kanske 10-15 gånger (och överleva varje gång!) innan man utvecklar ett bra försvar mot malaria.

De flesta fallen av allvarlig malaria orsakas av parasiten *Plasmodium falciparum*, som invaderar röda blodkroppar vilka finns i blodet. Efter två dygn har parasiten vuxit till sig och förökats sig, och den röda blodkroppen "sprängs" när flera nya mini-parasiter (s.k. malariamerozoiter) tar sig ut för att ge sig iväg och invadera nya röda blodkroppar. Det långsiktiga målet för vår forskning är att hitta ett vaccin mot malaria, men för att kunna göra det måste vi veta vilka proteiner man isåfall ska använda i ett vaccin, och hur immunitet mot malaria uppstår.

2.2 Försvaret mot malaria

För att försvara sig mot malariaparasiterna bildar man antikroppar, som kan liknas vid soldater som marscherar omkring i kroppen och letar efter avvikande saker att attackera. En del antikroppar är mycket bra och kan hjälpa till att ta död på många malariaparasiter, medan andra antikroppar inte verkar göra någon nytta alls. Vad som gör att vissa antikroppar fungerar bättre än andra vet man inte riktigt, men man vet att de celler som är viktiga för tillverkningen av antikroppar är en sorts vita blodkroppar som heter B-celler. Man vet också att det krävs upprepade tillfällen under längre tid av malaria för att bli immun, det räcker inte med ett enda tillfälle. Ett mål för våra studier har varit att ta reda på hur B-celler och malariaparasiter interagerar med varandra, för att bättre förstå hur immunitet mot malaria uppstår. Vid andra sjukdomar, som tex HIV, har man sett att det verkar som om B-cellerna inte utvecklas som de ska (1), de blir uttröttade efter ett tag. Både HIV och malaria är sjukdomar som finns i kroppen under lång tid, och det är därför intressant att jämföra immunförsvaret vid dessa sjukdomar, även om det i övrigt är helt olika orsaker till de symptom som uppstår. Om inte B-cellerna fungerar ordentligt, så kommer antikropparna som bildas heller inte att fungera som de ska. Man vet att antikroppar är viktiga i försvaret mot malaria, för man har renat fram antikroppar från människor som överlevt malaria, och gett dem till barn som var sjuka i malaria och de tillfrisknade då (2).

Om det finns antikroppar som kan hindra malariamerozoiter från att invadera nya röda blodkroppar, så borde de proteiner som antikropparna är riktade mot vara bra att använda i ett vaccin. För att studera antikroppar, har man tidigare ffa använt en metod som heter ELISA (Enzyme Linked Immuno sorbent Assay), som är relativt billig och enkel att använda. Denna metod mäter hur mycket antikroppar det finns, men man får inte veta något alls om

funktionen hos antikropparna. Man kan således ha två patienter med samma nivå antikroppar, där en patient är skyddad mot malaria därför att han/hon har välfungerande antikroppar som hindrar invasion av nya röda blodkroppar, medan en annan patient har dåligt fungerande antikroppar som inte gör någon nytta. Välfungerande antikroppar binder förmodligen till sina målproteiner väldigt hårt, medan dåliga antikroppar kan binda löst och lossna snabbt så att de inte hinner utöva sin funktion så bra. Detta har man visat för t ex bakterier, men ingen har tidigare studerat hur hårt naturligt bildade antikroppar hos människor binder till malariaproteiner, eller vilka faktorer som får antikroppar mot malaria att binda hårdare.

Vi har varit speciellt intresserade av att studera antikroppar mot två familjer av malariamerozoitproteiner som tillhör EBA (Erythrocyte Binding Antigen) och Rh (Reticulocyte Binding homologue) familjerna, som innehåller proteinerna EBA140, EBA175, EBA182 och Rh2. Vi har tidigare visat att dessa familjer av proteiner är av betydelse för att bilda antikroppar som kan hindra merozoiter från att invadera nya röda blodkroppar, och vi har utvecklat en metod för att studera hämning av invasion(3, 4). Man vet dock inte exakt vilka av dessa proteiner som är de viktigaste i försvaret mot malaria. Vi har också intresserat oss för funktionella antikroppar mot malariamerozoitproteinerna MSP2 (Merozoite Surface Protein 2) och AMA1 (Apical Membrane Antigen 1), vilka också är viktiga för invasionen av röda blodkroppar.

2.3 Malaria i Uganda

Uganda är ett av de länder i världen där det finns mest malaria. De flesta drabbas av malaria första gången redan som mycket små barn, och de får sedan malaria upprepade gånger. De som överlever upp till vuxen ålder har skaffat sig ett bra försvar mot malaria. Vi har ett samarbete med Makerere University i Kampala i Uganda, och har via detta samarbete fått tillgång till blod från vuxna blodgivare i Kampala.

3. Våra studier av immunitet mot malaria

3.1 Studier av antikroppar: Kan antikroppar hindra malariamerozoiter från att invadera nya röda blodkroppar?

De B-celler som fungerar bäst i kroppen i försvaret mot malaria, är de som kan hjälpa till att producera riktigt bra antikroppar. Vad är då bra antikroppar? Om antikroppar mot malariamerozoiter kan hindra parasiter från att invadera nya röda blodkroppar, så kan inte parasiterna kunna föröka sig och infektionen kommer att avstanna. Vi har tidigare utvecklat en metod för att studera funktionen hos malariamerozoitantikroppar (3, 4), och vi har nu använt denna metod tillsammans med knock-out parasiter, dvs parasiter som saknar ett visst protein. Vi har använt knock-out parasiter för malariamerozoitproteinerna EBA140, EBA175 och EBA181 och vi fann att många immuna människor hade funktionellt viktiga antikroppar mot EBA140, men inte alls många hade antikroppar mot de andra EBA-proteinerna (5). Om man skulle välja bland olika vaccinkandidater så är detta viktig information, eftersom EBA140 till skillnad från de andra proteinerna kan inducera bra antikroppar.

Vi har också gjort en annan studie, där vi jämförde inhibitorisk aktivitet hos antikroppar i blodet mot olika varianter av parasiter (6). Vi fann att det var mycket stor skillnad på inhibitorisk aktivitet beroende på vilken parasit man använde i testet, och detta är också viktigt att veta om man ska testa ett vaccin, så att man vet vilken parasit man ska välja.

I ytterligare en studie jämförde vi olika metoder att mäta antikroppar, såsom nivån av antikroppar (med hjälp av ELISA), bindningsstyrka (ytplasmonresonans) och invasionsinhibition (7). Vi fann att den enda metoden som korrelerade med hur mycket malariaparasiter patienterna hade i blodet var invasionsinhibition, vilket verkligen talar för att vi borde använda mycket mer funktionella metoder för att mäta antikroppar hos malariapatienter, både för att ta reda på hur immunitet utvecklas och för att utvärdera olika vaccinförsök.

När man ska odla malariaparasiter i laboratoriet, är det viktigt att förhållandena är så bra som möjligt. Vi har gjort en studie där vi jämförde olika odlingsbetingelser, och vi odlade också malariaparasiter direkt från patienter vilket är mer komplicerat än att odla parasiter som funnits i laboratoriet ett tag (8). Vi kunde då se att de invasionsvägar som parasiterna använde, ofta inkluderade de proteiner som vi tidigare ansett intressanta ur vaccinationssynpunkt.

För att sammanfatta våra studier över hur man bör mäta antikroppar mot malaria, och betona hur viktigt funktionella studier är, t ex invasionsinhibition, har vi skrivit en översiktsartikel om olika sätt att mäta antikroppar (9).

Sammanfattningsvis kan man säga att vi har visat att det är viktigt med antikroppar som kan hindra malariamerozoiterna från att invadera nya röda blodkroppar, och vissa specifika antikroppar är viktigare i försvaret mot malaria än andra.

3.2 Studier av antikroppar: Bindningsstyrka

Om antikroppar ska kunna hindra malariamerozoiter från att invadera nya röda blodkroppar i blodet, så måste de binda och sitta hårt fast på sina målproteiner. Vi har utvecklat en ny metod för att undersöka affinitet, dvs hur hårt antikroppar binder, till olika malariaproteiner. Vi har använt ytplasmonresonans (Surface Plasmon Resonance, SPR, Biacore) vilket är en mycket exakt metod där små skillnader kan studeras i realtid, när man har ett flöde av antikroppar över en yta till vilken man bundet sitt protein. I blodet har man ju alltid ett flöde, och vi tror därför att denna metod är mer lik hur det verkligen är i blodet, jämfört med många andra metoder. Tidigare har denna metod använts mest för att studera monoklonala antikroppar, dvs sådana som framställts från tex möss, men vi har nu använt SPR för att studera mänskliga polyklonala antikroppar, vilka är riktade mot många olika proteiner. Ytterligare en fördel med denna metod är att ingen rening av antikropparna behövs. Man kan då mäta bindningsstyrka hos antikroppar som förekommer i mycket låg koncentration, vilket annars är svårt. Eftersom det ingår flera olika antikroppar samtidigt, får man också en uppfattning om hur de påverkar varandra när de blandas tillsammans, något som också förekommer naturligt i blodet.

Vi använde SPR och undersökte blod (innehållande antikroppar) från individer i Uganda, och vi såg att olika proteiner uppvisade olika bindningsstyrka hos antikropparna (10). Antikroppar mot t ex AMA1 band hårdare än antikroppar mot MSP2, vilket är bra att veta om man ska välja protein som ska ingå i ett vaccin. Troligen har AMA1 då större chans att lyckas som vaccin, eftersom det kan skapa antikroppar som binder hårt och stannar kvar bundna under längre tid. För proteinet MSP2 hade vi tillgång till två olika varianter av MSP2, och vi fann att antikroppar mot den ena (MSP2-3D7) band hårdare än antikroppar mot den andra (MSP2-FC27). Detta är också viktigt att veta, eftersom det finns olika varianter av parasiter och det är viktigt att välja rätt variant att inkludera i ett eventuellt vaccin. Vi kunde också se att de som hade antikroppar med hög bindningsstyrka hade mindre risk att senare insjukna i malaria.

Sammanfattningsvis har vi visat att mänskliga, naturliga antikroppar mot malaria är bättre om de binder starkt till sina målproteiner, och att det är skillnad på vilket protein man väljer, något som är viktigt att veta i utvärderingar av vaccinförsök där man tidigare aldrig inkluderat studier av bindningsstyrka.

3.3 Studier av icke-immuna B-celler

För att få ett riktigt bra immunförsvar mot malaria, så måste man ha bra B-celler. B-cellerna ska utvecklas till celler som producerar antikroppar, och för att det ska bli bra antikroppar måste man ha bra B-celler. Problemet är

att malariaparasiterna verkar påverka B-cellerna så att de inte utvecklas normalt. För att studera detta närmare, har vi odlat malariaparasiter tillsammans med B-celler. Vi renade fram B-celler från blod från Blodcentralen, dvs från svenska friska blodgivare som aldrig haft malaria. Vi satte sedan B-cellerna tillsammans med malariaparasiter i odlingskultur i 37 grader i två veckor. Ingen har så vitt vi vet lyckats med detta tidigare. De flesta publicerade experiment med B-celler och malariaparasiter har endast pågått ett par timmar, sedan har antingen B-cellerna eller malariaparasiterna dött. Vi gjorde ett antal försök med olika odlingsbetingelser för att få detta att fungera, men till sist lyckades vi få både B-cellerna och malariaparasiterna att överleva. Vi tror att det är viktigt att göra experiment som pågår så här lång tid, för i människokroppen har man malariaparasiter tillsammans med B-celler under ganska lång tid. När vi satte B-celler och malariaparasiter tillsammans, såg vi mycket förvånande och intressanta resultat, som vi just nu håller på att analysera. Vi har dels studerat malariaparasiterna och hur de påverkas, men också B-cellerna. B-cellerna får ändrat uttryck av olika molekyler på sin yta (sk CD-antigen), och en del av de förändringar vi ser kan förklara varför det tar så lång tid att uppnå immunitet mot malaria. Vi såg också ändrade nivåer av olika immunförsvarmolekyler (t ex interleukiner), och vi såg förändringar i de gener som styr olika processer i B-cellerna. Vi håller nu på att analysera de sista av dessa data för att sammanställa det till en publikation.

Sammanfattningsvis kan man säga att dessa studier har väsentligt ökat kunskapen om hur malariaparasiter och B-celler interagerar med varandra, och därmed kan vi bättre förstå hur immunitet mot malaria uppstår.

3.4 Studier av immuna B-celler

Vi har använt oss av blod från friska blodgivare i Uganda (som vi fått tillgång till via ett samarbete med Makerere University i Kampala, Professor Kironde), och har renat fram B-celler från dessa. Om man lyckats överleva till vuxen ålder i Uganda, så har man troligen haft malaria många gånger. Vi har genomfört liknande experiment som med de icke-immuna cellerna från svenska blodgivare ovan, och kunde därmed jämföra immuna och icke-immuna B-celler med varandra. Vi såg tydliga skillnader i hur B-cellerna reagerade, och vi håller just nu på att analysera dessa data för att sammanställa det till en publikation.

3.5 B-celler har odödliggjorts

För att kunna använda samma B-celler i många olika experiment, har vi odödliggjort en del B-celler från immuna individer genom att tillsätta Epstein-Barr Virus (EBV). Dessa celler är nu nerfrysta och vi kan använda dem för olika jämförelser i experiment vid olika tidpunkter.

4. Sammanfattning

Sammanfattningsvis kan vi säga att vi genom våra studier av immunförsvaret vid malaria nu bättre kan förstå varför det tar så lång tid att bli immun mot malaria. Därmed finns det också bättre förutsättningar för att skapa ett fungerande vaccin mot sjukdomen, vilket skulle spara många liv varje år.

Alla resultat som är publicerade kan återfinnas som vetenskapliga artiklar i peer-review granskade tidskrifter på PubMed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>.

Stockholm 2013-12-30

Kristina E M Persson, M.D., Ph.D., DTMH, Docent

5. Referenser

1. Kuppers, R. 2008. Human memory B cells: memory B cells of a special kind. *Immunol Cell Biol* 86:635-636.
2. Cohen, S., McGregor, I.A., and Carrington, S.C. 1961. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature* 192:733-737.
3. Persson, K.E.M., Lee, C.T., Marsh, K., and Beeson, J.G. 2006. Development and optimization of high-throughput methods to measure *Plasmodium falciparum*-specific growth inhibitory antibodies. *J Clin Microbiol* 44:1665-1673.
4. Persson, K.E.M., McCallum, F.J., Reiling, L., Lister, N.A., Stubbs, J., Cowman, A.F., Marsh, K., and Beeson, J.G. 2008. Variation in use of erythrocyte invasion pathways by *Plasmodium falciparum* mediates evasion of human inhibitory antibodies. *J Clin Invest* 118:342-351.
5. Persson, K.E.M., Fowkes, F.J., McCallum, F.J., Gicheru, N., Reiling, L., Richards, J.S., Wilson, D.W., Lopaticki, S., Cowman, A.F., Marsh, K., et al. 2013. Erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* are targets of human inhibitory antibodies and function to evade naturally acquired immunity. *J Immunol* 191:785-794.
6. Rono, J., Färnert, A., Olsson, D., Osier, F., Rooth, I., and Persson, K.E.M. 2012. *Plasmodium falciparum* line-dependent association of in vitro growth-inhibitory activity and risk of malaria. *Infect Immun* 80:1900-1908.
7. Ahmed Ismail, H., Ribacke, U., Reiling, L., Normark, J., Egwang, T., Kironde, F., Beeson, J.G., Wahlgren, M., and Persson, K.E.M. 2013. Acquired antibodies to merozoite antigens in children from Uganda with uncomplicated or severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin Vaccine Immunol* 20:1170-1180.
8. Ribacke, U., Moll, K., Albrecht, L., Ahmed Ismail, H., Normark, J., Flaberg, E., Szekely, L., Hultenby, K., Persson, K.E.M., Egwang, T.G., et al. 2013. Improved in vitro culture of *Plasmodium falciparum* permits establishment of clinical isolates with preserved multiplication, invasion and rosetting phenotypes. *PLoS One* 8:e69781.
9. Chuangchaiya, S., and Persson, K.E.M. 2013. How Should Antibodies against *P. falciparum* Merozoite Antigens Be Measured? *J Trop Med* 2013:493834.
10. Reddy, S.B., Anders, R.F., Beeson, J.G., Färnert, A., Kironde, F., Berenzon, S.K., Wahlgren, M., Linse, S., and Persson, K.E.M. 2012. High affinity antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with protection from malaria. *PLoS One* 7:e32242.

Bilaga 1: Publikationer 2011-2013

1. H Ahmed Ismail, U Ribacke, L Reiling, J Normark, T Egwang, F Kironde, J G Beeson, M Wahlgren and **K E M Persson**. Acquired antibodies to merozoite antigens in children from Uganda with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2013, June 5.
2. S Chuangchaiya and **K E M Persson**. How should antibodies against *P. falciparum* merozoite antigens be measured? *J Trop Med*. 2013. Epub Apr 18.
3. **K E M Persson**, F J I Fowkes, F J McCallum, N Gicheru, L Reiling, J S Richards, D W Wilson, S Lopaticki, A F Cowman, K Marsh, J G Beeson, Erythrocyte-binding antigens of *Plasmodium falciparum* are targets of human inhibitory antibodies and function to evade naturally acquired immunity. *J Immunology*: 2013: June 17.
4. U Ribacke , K Moll , H Ahmed Ismail, L Albrecht , J Normark, E Flaberg , L Szekely , K Hultenby, **K E M Persson**, T G Egwang, M Wahlgren. Improved in vitro culture of *Plasmodium falciparum* isolates permit accurate assessment of multiplication, invasion and rosetting in severe malaria. *PlosOne*. 2013:e69781.
5. J Rono, A Färnert, D Olsson· F Osier, I Rooth, and **K E M Persson**. *Plasmodium falciparum* line dependent association of *in vitro* growth-inhibitory activity and risk of malaria. *Infect Immun* 2012: 80: 1900-8.
6. S B Reddy, R F Anders, J G Beeson, A Färnert, F Kironde, S Kühlman Berenzon, M Wahlgren, S Linse, **K E M Persson**. High affinity antibodies to *Plasmodium Falciparum* merozoite antigens are associated with protection from malaria. *PlosOne* 2012: 7(2) e32242.

Manuscripts

1. How B-cells and *P. Falciparum* parasites affect each other: implications for development of immunity against malaria. S B Reddy, N Nagy, C Rönnberg, F Urio, S Chan, L Szekely, M Wahlgren, F Chiodi, F Heuts, **K E M Persson**
2. Antibody responses against EBA175 and PfRh2 in naturally acquired immunity against *Plasmodium falciparum* malaria. H Ahmed Ismail, T M Kolapo, C Langer, L Reiling, J G Beeson, M Wahlgren, R Nwuba, **K E M Persson**
3. Role of merozoite antigen conformational dynamics in *Plasmodium falciparum* specific immunity. S B Reddy, R F Anders, N Cross, I Mueller, P Siba, M Wahlgren, F Kironde, J G Beeson, **K E M Persson**
4. Enabling Dynamic Partnerships between Low and High Income Countries through Joint Degrees for Capacity Development in Global Health Research. N Sewankambo, J Tumwine, G Tomson, C Obua, F Bwanga, P Waiswa, E Katabira, H Akuffo, **K E M Persson**, S Peterson (submitted to *The Lancet*)
5. Functional antibody responses against *P. Falciparum* merozoite antigens: Invasion inhibition and affinity of antibodies are more important than levels of antibodies. T M Kolapo, S B Reddy, H Ahmed Ismail, R Nwuba, **K E M Persson**

