

# Projektbeskrivelse: Malaria

## Introduktion og projektets mål

Selvom der i 2015 blev lanceret en malaria-vaccine, findes der i øjeblikket ingen behandlings- eller forebyggelsesmetode, der endegyldigt kan komme sygdommen til livs. Det skyldes blandt andet, at de *Plasmodium*-parasitter, der forårsager sygdommen, er yderst tilpasningsdygtige. Hvis man vil nedbringe malaria-dødsraten, er det derfor nødvendigt at opnå mere viden om parasitterne og deres overlevelsestrategier. En af *Plasmodium falciparum*-parasiternes strategier er cytoadhæsion. Dette projekts hovedmål er at undersøge cytoadhæsionen mellem *P. falciparum*-inficerede erythrocytter og endothelceller nærmere eksperimentelt og med inddragelse af viden fra tidligere malaria-forskning.

## Baggrund

*P. falciparum*-parasitter i merozoit-stadiet kan invadere menneskets erythrocytter, hvori de syntetiserer en række proteiner, som præsenteres på erythrocytternes membraner. Nogle af proteinerne fungerer som adhæsionsmolekyler, der gør *P. falciparum*-inficerede erythrocytter i stand til at binde til glycocalyx, der omgiver den lumenale membran hos endothelceller. Glycocalyx er et protein- og polysaccharid-netværk, hvortil adhæsionsmolekyler som f.eks. chondroitinsulfat (CS), heparansulfat (HS), ICAM-1 og CD36 er bundet. Glycocalyx kan have forskellige kompositioner og strukturer: det kan f.eks. være umodent (korthårret) eller modent (langhårret).<sup>1</sup> Bindningen mellem glycocalyx og *P. falciparum*-inficerede erythrocytter betegnes cytoadhæsion. Cytoadhæsion kan medføre blodpropper i hjernen, som den malaria-ramte dør af. Ved at binde til endothelcellerne undgår parasitterne at blive transporteret via blodet til milten, hvor de kan elimineres af fagocytter.<sup>2</sup>

De parasit-inducerede overfladeproteiner fungerer som antigener. Man skulle tro, at dette skaber en mulighed for forebyggelse af malaria med vacciner rettet mod parasittens erythrocytiske stadie. Parasitterne kan imidlertid variere antigenerne, hvorfor vaccinefremstilling er vanskelig. Viden om antigener (heriblandt adhæsionsmolekyler) essentiel for vaccineudvikling og forebyggelse af malaria.

## Hypoteser

I forbindelse med den eksperimentelle undersøgelse af cytoadhæsionen forventes det

1. at *P. falciparum*-inficerede erythrocytter binder bedst til den type glycocalyx, de er selekteret på.
2. at kunne eftervises, at *P. falciparum*-inducerede overfladeproteiner har afgørende betydning for cytoadhæsionen.
3. at adhæsionsmolekylerne heparansulfat (HS) og chondroitinsulfat (CS) på glycocalyx er med til at skabe cytoadhæsion.

## Metode

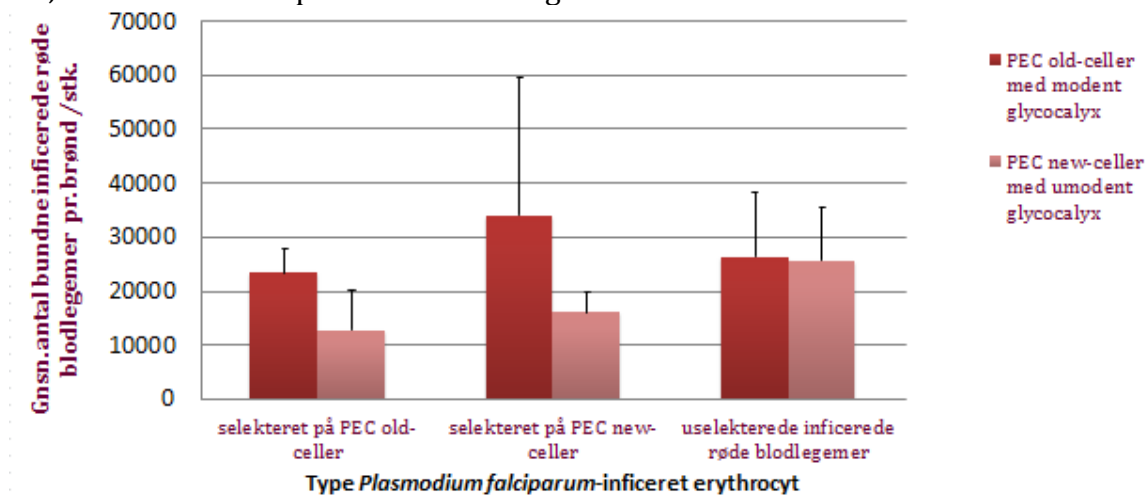
Følgende metode har jeg benyttet til at estimere, hvor mange *P. falciparum*-inficerede erythrocytter, der binder til endothelcellers glycocalyx.<sup>3</sup>

1. *P. falciparum*-inficerede erythrocytter selekteres: endothelceller med umodent og modent glycocalyx (hhv. PEC new og PEC old) påføres *P. falciparum*-inficerede erythrocytter. De ubundne erythrocytter bortvaskes - dermed udvælges bestemte fænotyper.
2. I en dyrkningsplade dyrkes PEC new-celler, PEC old-celler og Chinese hamster ovary-celler (CHO-celler) i forskellige brønde.

- De selekterede og uselekterede *P. falciparum*-inficerede erythrocytter tilsættes brøndene med hhv. PEC new, PEC old og CHO-celler af forskellige typer (7,5 mio pr. brønd). I nogle af brøndene tilsættes der chondroitinsulfat til mediet; i nogle tilsættes der heparansulfat. I andre brønde tilsættes der trypcin-behandlede erythrocytter, hvor de parasit-inducerede adhæsiionsmolekyler forventes at være enzymatisk nedbrudte. Ovenstående udføres efter et planlagt forsøgsdesign.
- De ubundne inficerede erythrocytter bortvaskes, så antallet af bundne kan estimeres.
- Blod- og endothelcellerne i hver brønd lyses, så hæm frigives.
- Koncentrationen af hæm i brøndene proportional med antallet af bundne erythrocytter. Hæm kan agere som en pseudo-peroxidase og katalyserer oxidationen af 3,3',5'5-tetramethylbenzidin, når der er H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> til stede. Produktet af oxidationen er blåt.
- Absorbansen i brøndene måles med et spektrofotometer. Ud fra absorbansen kan det estimeres, hvor mange inficerede erythrocytter, der er bundet i hver brønd.

## Resultater

Nedenfor er et forsøgsresultat vist. Grafen viser, om *P. falciparum*-inficerede erythrocytter, der er selekteret på hhv. PEC new og PEC old binder bedst til PEC new eller PEC old.



## Diskussion og konklusioner

- Det udførte forsøg viser, at *P. falciparum*-inficerede røde blodlegemer i de fleste tilfælde binder bedst til den type glycocalyx, de er selekteret på. De inficerede erythrocytter, der er selekteret på PEC new, binder dog overraskende effektivt til PEC old. Resultatet kan muligvis forklares med, at de adhæsiionsmolekyler, der findes på PEC new, eksisterer på PEC old i et større omfang, da glycocalyx er mere modent.
- Forsøget tyder klart på, at de parasit-inducerede adhæsiionsmolekyler på erythrocytterne er essentielle for en effektiv binding til endothelcellerne (resultatet er ikke vist her).
- Resultaterne divergerer, hvad angår forsøgene med heparansulfat og chondroitinsulfat (resultaterne er ikke vist her). Dette strider mod hypotese 3 og skyldes formentlig fejlkilder. En fejlkilde kunne være, at oxidationen påbegyndes og afsluttes manuelt. Dette kan medføre, at oxidationstiden ikke er den samme i alle brønde.

<sup>1</sup>Reitsma, Sietze et al. The endothelial glykokalyx: composition, functions, and visualization. Pflügers Archive - European Journal of Physiology. 2007. pp. 345-359.

<sup>2</sup>Høj Jakobsen, Palle. Immunologi. 1. udgave. Nucleus Forlag, 2012.

<sup>3</sup>Hempel, Casper et al. An automated method for determining the cytoadhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to immobilized cells. Malaria Journal 14, 2015. pp.114-124.