Thesis Title Analysis of Naturally Acquired Protective Antibody to Epitopes on Merozoite Surface Protein 1 of the Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*

Author Miss Parichat Prommana

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee Dr. Somdet Srichairatanakool Chairperson
Dr. Chairat Uthaipibull Member

ABSTRACT

Malaria is a mosquito-borne disease that is transmitted by inoculation of malaria parasites Genus *Plasmodium*. Among four species of human malaria parasites, *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) is major cause of morbidity and mortality in children. *P. falciparum* merozoite surface protein 1 (MSP-1) is a blood stage antigen that has been studied extensively and remains a potential vaccine candidate. It is synthesized as ~200 kDa precursor and undergoes two steps of proteolytic processing. First, the protein is cleaved to form four major products bound to merozoite surface via membrane-bound MSP-1_{42} fragment. At RBC invasion, the complex is shed from the parasite surface as a result of a further proteolytic processing (secondary processing). This takes the form of a single cleavage of MSP-1_{42} to form two products; MSP-1_{33} and MSP-1_{19}, which the latter is carried into the invaded host cell on the merozoite surface. An immune response to MSP-1_{19} is expected to stop merozoite invasion of RBCs which is developmental stage of the parasite that cause clinical malaria. There are two groups of specific antibodies (Abs) against MSP1_{19}, inhibitory and blocking Abs. Some inhibitory Abs inhibit MSP-1 processing resulting in the inhibition of RBC invasion by merozoites. On the other hand, blocking Abs interfere inhibitory Abs function and promote invasion of merozoite. This work aimed to analyze the population of naturally acquired protective Abs in immune plasma collected from epidemic areas by characterization of its binding activity to epitopes on *P. falciparum* MSP-1_{19} mutant proteins. Three groups of blood samples from: 1) *P. falciparum* infected patients (group I), 2) healthy volunteers who used to be infected with malaria parasites within two years (group H) and 3) healthy volunteers who have never been infected with malaria parasites, were collected, and the titer against wild type MSP-1_{19} protein was determined. It was found that 16 samples from group I and 20 samples from group H showed high titers against the protein, as compared to normal human plasma. In order to test the activity of protective antibodies, which are mainly IgG, and remove other factors that may complicate further test assays, IgG from the positive plasma samples were purified. The purified IgG samples were then tested for its activities on the inhibition of RBC invasion, as well as inhibition of MSP-1 secondary processing. It was shown that 6 IgG samples from group I and 14 IgG samples from group H significantly inhibited

RBC invasion, with one sample (H10) from group H showed high (45 %) inhibition activity. There was no direct correlation between the antibody titer and level of inhibition activity in general, only sample H10 which has high titer (at 1: 12,800) also has showed high level of RBC invasion inhibition activity. The MSP-1 secondary processing assay, we used mAb 111.4, the anti MSP-1_{42} and MSP-1_{19} antibody to detect amount of MSP-1_{19} produced after the MSP-1 secondary processing. It was found that there were no any purified human IgG samples that could inhibit the MSP-1 secondary processing, suggesting that the mechanism(s) of inhibition of RBC invasion is not mediated only by the inhibition of MSP-1 secondary processing, other inhibition mechanism (s) might be involved. The populations of protective anti-MSP-1_{19} antibodies immune plasma have been investigated by looking at their binding activity to mutant MSP-1_{19} proteins that were shown to have different binding patterns to either inhibitory or blocking antibodies. Five human IgG samples that could inhibit RBC invasion, especially H10 showed the same binding pattern with the inhibitory mAb 12.8. Some samples that have high RBC invasion inhibition activity showed binding pattern similar with blocking mAb 111.4. It is possible that the antibody population in these samples contain other inhibitory antibodies. This work is the first to demonstrate that, in the protective immune plasma, there was higher titer of inhibitory-type of antibodies than those of blocking-type of antibodies, as distinguished by the differences on their binding to mutant MSP-1_{19} proteins. The data obtained in this study have provided a basic knowledge for design and development of anti-MSP-1_{19}-base vaccine against *P.falciparum* malaria.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์แอนติบอดีป้องกันที่ได้จากการติดเชื้อในธรรมชาติต่อเอพิโทปบน Merozoite Surface Protein 1 ของเชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียมฟาลซิปารัม
ผู้เขียน	ปาริชาต พรหมณะ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	อ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกูล ประธานกรรมการ อ. ดร. ชัยรัตน์ อุทัยพิบูลย์ กรรมการ

บทคัดย่อ

มาลาเรียเป็นโรคที่มียุงก้นปล่องเป็นพาหะนำโรค เชื้อมาลาเรียที่ก่อให้เกิดโรคในคนและเกิดความรุนแรงมากที่สุดคือ เชื้อมาลาเรียพลาสโมเดียม ฟาลซิพารัม โปรตีน Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1) มีขนาดประมาณ 200 กิโลดาลตัน ในระหว่างการแตกของไชซอนท์และเมอร์โรซอยท์เข้าสู่เม็ดเลือดนั้นโปรตีนจะถูกตัดออกเป็น 4 ส่วน โดยมีโปรตีน MSP-1_{42} จับอยู่ที่ผิวของเมอร์โรซอยท์ เมื่อเมอร์โรซอยท์เข้าสู่เม็ดเลือดแดงโปรตีน MSP-1_{42} จะถูกตัดเป็นโปรตีนขนาด 19 กิโลดาลตัน (MSP-1_{19}) และ 33 กิโลดาลตัน (MSP-1_{33}) เรียกว่า Secondary processing มีเพียงโปรตีน MSP-1_{19} เท่านั้นที่เข้าสู่เม็ดเลือดแดง ระบบภูมิคุ้มกันที่ตอบสนองต่อโปรตีน MSP-1_{19} น่าจะมีส่วนในการยับยั้งกระบวนการรุกรานเม็ดเลือดแดงของเมอร์โรซอยท์ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน MSP-1_{19} มีอยู่ 2 กลุ่มที่ได้แก่แอนติบอดีป้องกัน (Inhibitory antibodies) ที่ยับยั้งกระบวนการรุกรานเม็ดเลือดแดง และแอนติบอดียับยั้ง (Blocking antibodies) ซึ่งรบกวนการทำงานของแอนติบอดีป้องกันส่งผลให้เชื้อมาลาเรียสามารถรุกรานเม็ดเลือดแดงได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการวิเคราะห์กลุ่มของแอนติบอดีป้องกันในพลาสมาของคน ที่มีจากการติดเชื้อมาลาเรียตามธรรมชาติ โดยการศึกษาลักษณะการจับของแอนติบอดี้ต่อเอพิโทปบนโปรตีนกลายพันธุ์ MSP-1_{19} ต่างๆ กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยกลุ่มติดเชื้อมาลาเรียฟาลซิพารัม (กลุ่ม I) กลุ่มอาสาสมัครที่เคยได้รับเชื้อมาลาเรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภายใน 2 ปี (กลุ่ม H) และกลุ่มอาสาสมัครที่ไม่เคยได้รับการติดเชื้อเป็นกลุ่มควบคุม จากการวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีต่อโปรตีน MSP-1_{19} พบว่า 16 ตัวอย่างจากกลุ่ม I และ 20 ตัวอย่างจากกลุ่ม H มีปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน MSP-1_{19} สูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างปกติ พลาสมาตัวอย่างที่ให้ผลบวกได้ถูกแยกให้เป็น IgG บริสุทธิ์ เพื่อลด factor ต่างๆที่อาจมีผลต่อการทดลองได้ ซึ่ง IgG ตัวอย่างดังกล่าวได้ถูกทดสอบความสามารถในการยับยั้งการรุกรานเม็ดเลือดแดงและกระบวนการ MSP-1 secondary processing พบว่ามี 6 IgG ตัวอย่างจากกลุ่ม I และ 14 IgG ตัวอย่างจากกลุ่ม H ที่สามารถยับยั้งการรุกรานเม็ดเลือดแดงได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีหนึ่งตัวอย่าง(H10) ที่แสดงการยังยั้งการรุกรานเม็ดเลือดแดงได้ดีถึง 45% และพบว่าปริมาณแอนติบอดีต่อโปรตีน MSP-1_{19} กับความสามารถการยังยั้งนั้นไม่มีความสัมพันธ์โดยตรง แต่มีหนึ่งตัวอย่าง (H10) ที่มีปริมาณแอนติบอดี้สูงโดยมีไตเตอร์ถึง12,800 และยังสามารถยับยั้งการรุกรานเม็ดเลือดแดงได้ดีอีกด้วย การทดสอบความสามารถของแอนติบอดี้ในการยับยั้ง MSP-1 secondary processing นั้นจำเป็นต้องใช้แอนติบอดี้ต่อโปรตีน MSP-1_{33} (mAb X509) ในการทดลอง แต่เนื่องจาก mAb X509 ที่มีอยู่หรือผลิตขึ้นเองในห้องทดลองไม่สามารถใช้ตรวจสอบ MSP-1_{33} ได้ ดังนั้น mAb 111.4 ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ MSP-1_{42} และ MSP-1_{19} จึงถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบปริมาณของโปรตีน MSP-1_{19} ที่เกิดจากกระบวนการ MSP-1 secondary processing แทน พบว่าไม่มีแอนติบอดีใดจากกลุ่มตัวอย่างที่สามารถยับยั้งกระบวนการ MSP-1 secondary processing ได้ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งกระบวนการรุกรานเม็ดเลือดแดงนั้นไม่ได้มีผลมาจากการยับยั้ง Secondary processing เพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจมีกระบวนการอื่นเกี่ยวข้องด้วย เพื่อที่จะศึกษากลุ่มของแอนติบอดีโดยการศึกษาความสามารถในการจับกับโปรตีนกลายพันธ์ MSP-1_{19} ที่มีความสามารถในการจับกับแอนติบอดีป้องกันหรือ แอนติบอดียับยั้งแตกต่างกัน พบว่า 5 IgG ตัวอย่างซึ่งมีความสามารถในการยับยั้ง รุกรานเม็ดเลือดแดงได้แสดงลักษณะกระบวนการจับต่อเอพิโทปบนโปรตีนกลายพันธ์ MSP-1_{19} เหมือนกับแอนติบอดีป้องกัน โดยเฉพาะตัวอย่าง H10 มีลักษณะเป็นแอนติบอดีป้องกัน นอกจากนี้ยังมีกลุ่มตัวอย่างส่วนหนึ่งที่มีความสามารถในการยับยั้งรุกรานเม็ดเลือดแดง แต่แสดงลักษณะกระบวนการจับเหมือนแอนติบอดียับยั้ง จึงมีความเป็นไปได้ที่ว่ากลุ่มแอนติบอดีตัวอย่างนี้อาจประกอบด้วยแอนติบอดีป้องกันแบบอื่นๆที่ยังไม่ได้พิสูจน์อีก งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกว่าในระบบภูมิคุ้มกันธรรมชาติที่มีความสามารถในการป้องกันจะมีปริมาณแอนติบอดีแบบป้องกัน มากกว่าแอนติบอดีแบบยับยั้ง โดยการศึกษาลักษณะความแตกต่างในความสามารถจับกับโปรตีนกลายพันธุ์ MSP-1_{19} ความรู้จากการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงหลักฐานของการมีอยู่ในธรรมชาติของแอนติบอดี้แบบป้องกันต่อ MSP-1 ซึ่งเป็นการยืนยันความสำคัญของ MSP-1 ในการพัฒนาเป็นวัคซีนสำหรับโรคมาลาเรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved