

**Human glutathione S-transferase polymorphisms and *P. falciparum*  
ATP-binding cassette transport proteins in malaria**

Thesis by: **Reginald A. Kavishe**

Promotor:

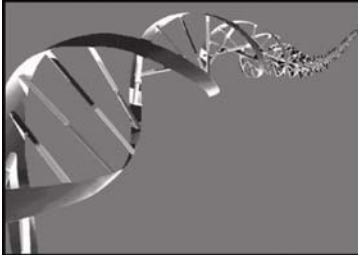
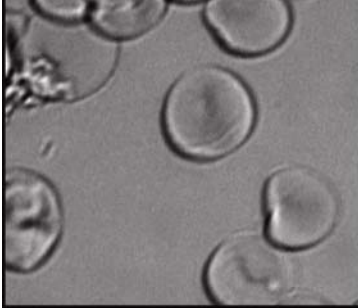
**Prof. dr. F.G.M. Russel**

Copromotores:

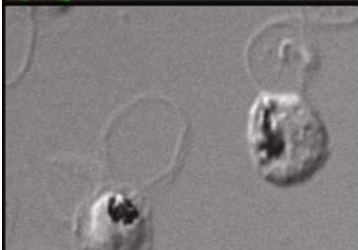
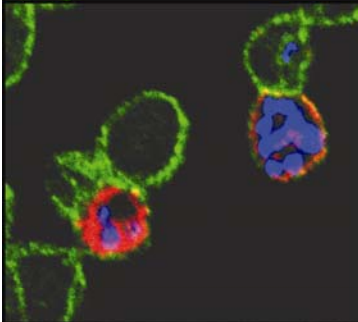
**Dr. J.B. Koenderink  
Dr. A.J.A.M. van der Ven**

Radboud Universiteit Nijmegen, The Netherlands

Date: 25-1-2010



Human glutathione S-transferase polymorphisms and  
*P. falciparum* ATP-binding cassette transport proteins  
in malaria



Reginald A. Kavishe

**HUMAN GLUTATHIONE S-TRANSFERASE POLYMORPHISMS  
AND PLASMODIUM FALCIPARUM ATP-BINDING CASSETTE  
TRANSPORT PROTEINS IN MALARIA**

**Reginald Adolph Kavishe**



## Summary

Malaria has remained an enormous health problem worldwide with highest morbidity and mortality among all infectious diseases. The emergence of multidrug resistant parasites and the lack of effective vaccines are major obstacles to malaria control. The molecular mechanisms involved in drug resistance evolution are complex and involve multiple genes. They range from alternative glutathione-dependent heme detoxification to active efflux of antimalarial drugs from the parasite. Current literature data implicate glutathione (GSH) as an important antioxidant in parasite survival as well as in drug resistance pathways. While increased cellular oxidative stress accelerates parasite clearance, malaria-induced oxidative stress is also known to exacerbate the pathology. Thus antioxidant status of the host cell may be important in determining clinical outcome of the infection. Several antioxidant enzyme systems exist in the parasite as well as in the host cell. Glutathione transferases (GSTs) are both phase-II detoxification and antioxidant enzymes. They use GSH to function as peroxidases and also conjugate drugs with GSH thereby predisposing them for efflux by ATP-binding cassette (ABC) transporters. The aim of this thesis was to investigate the role of GST polymorphisms in susceptibility to severe falciparum malaria and to clone, express and characterize putative ABC transporters of *P. falciparum*.

In **chapter 2** and **3** using multiplex and RFLP (Restriction fragment length polymorphism) PCR we determined the prevalence of GST mu (*GSTM1*), pi (*GSTP1*), and theta (*GSTT1*) genotypic polymorphisms in severe versus mild malaria cases. Severe malaria classification was based on the WHO criteria. The study in chapter 2 was performed on DNA samples from Cameroonian children where the severe malaria group

was mostly characterized with hyperpyrexia, severe anemia, respiratory distress, and coma. In our results *GSTM1-null* genotype was significantly higher in severe versus mild malaria cases. *GSTP1* and *GSTT1* did not vary between the two groups. In chapter 3 we determined the same GST polymorphisms in Tanzanian children. The severe malaria group was mainly characterized by severe anemia. We observed a significantly higher prevalence of the *GSTP1-I105V* genotype in severe than in mild malaria. The *GSTM1-null* genotype was also higher in the severe malaria group, but the difference was not significant. We concluded that *GSTM1-null* and *GSTP1-I105V* genotypic variants are associated with severe malaria in children.

In **chapter 4** we used bioinformatics techniques to retrieve and phylogenetically classify *P. falciparum* ABC proteins from the *Plasmodium* database. We show that 11 out of 16 genome encoded ABC proteins are membrane transporters. Furthermore, we determined the sub-cellular localization of PfMRP1 (*Plasmodium falciparum* Mutidrug Resistance-associated Protein 1), PfMRP2, and PfMDR5 (*Plasmodium falciparum* MultiDrug Resistance protein 5) in the asexual stages of the parasite using immunocytochemistry. We found that all three ABC transporters localized to the parasite's plasma membrane in all asexual stages. There were no localization signals on the erythrocyte membrane, parasite food vacuole membrane or in cytoplasmic compartments such as endoplasmic reticulum.

In **chapter 5** we cloned and investigated expression of the PfABC transporters in various heterologous expression systems. Expression of PfABCB7, PfMRP1, PfMRP2, and PfMDR5 was investigated in transduced mammalian cells; baculovirus infected insect cells (Sf9) and injected *Xenopus laevis* oocytes. Expression of codon harmonized full-length PfMDR5 and EYFP-PfMDR5 fusion fragments were evaluated in Sf9 and

mammalian HeLa cells. We observed a decrease in expression level with increasing size of native EYFP-fusion PfMDR5 fragments in both Sf9 and HeLa cells. No expression of full-length transporters was observed in any of the systems used. The codon harmonized EYFP-PfMDR5 fusion fragment was expressed in slightly higher amounts compared to the native form. We concluded that gene size, A/T-richness or codon bias may affect expression of falciparum membrane proteins in HeLa and Sf9 cells. Codon harmonization may improve expression of falciparum proteins in Sf9 cells.

In **chapter 6** all the results obtained in this thesis have been discussed and put into a broader perspective. Our results on GST polymorphisms and susceptibility to severe malaria contribute to the knowledge on molecular processes of malaria disease. It also stimulates research on the impact of oxidative stress-inducing drugs in individuals with reduced or deficient antioxidant enzyme activity, especially in case of multiple enzyme deficiencies. Furthermore, our results from chapters 4 and 5 contribute to the molecular biology knowledge of the parasite and give more insights into the avenues for further characterization of the falciparum ABC transporters as possible antimalarial drug targets.

## Samenvatting

Malaria is wereldwijd nog steeds een enorm gezondheidsprobleem met de hoogste morbiditeit en mortaliteit onder alle infectieziekten. De opkomst van multi-resistente parasieten en het ontbreken van effectieve vaccins zijn grote obstakels voor de bestrijding van malaria. De moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van resistentie tegen geneesmiddelen zijn complex en omvatten meerdere genen. Ze variëren van glutathion-afhankelijke detoxificatie van heem tot actieve efflux van antimalariamiddelen uit de parasiet. De huidige literatuurgegevens impliceren dat glutathion (GSH) een belangrijke rol speelt als anti-oxidant bij de overleving van de parasiet, evenals bij de resistentie tegen geneesmiddelen. Hoewel een toename in cellulaire oxidatieve stress de eliminatie van parasieten verhoogt, is het ook bekend dat het de pathologie kan verergeren. De anti-oxidantstatus van de gastheercel zou dus het klinisch beloop van de infectie kunnen beïnvloeden. Verschillende enzymsystemen die oxidanten wegvangen, zijn aanwezig in de parasiet en de gastheercel. Glutathion S-transferases (GSTs) zijn daarvan een voorbeeld, daarnaast kunnen GSTs lichaamsvreemde stoffen ontgiften. Zij maken gebruik van GSH voor hun functie als peroxidases en koppelen GSH aan toxische stoffen (fase II-ontgiftiging) welke vervolgens door ATP-binding cassette (ABC) transporters buiten de cel worden getransporteerd. Het doel van dit proefschrift was om de rol van GST-polymorfismen in de gevoeligheid voor ernstige malariaïnfecties met *Plasmodium falciparum* te onderzoeken en tevens nieuwe ABC-transporters in *P. falciparum* te kloneren, tot expressie te brengen en te karakteriseren.



In **hoofdstuk 2** en **3** hebben we met behulp van multiplex-PCR en RFLP ('Restriction fragment length polymorphism') de prevalentie van GST-mu- (GSTM1), -pi- (GSTP1) en -theta (GSTT1)-polymorfismen in ernstige versus lichte malariagevallen bepaald. De classificatie van ernstige malaria was gebaseerd op de WHO-criteria. De studie in hoofdstuk 2 werd uitgevoerd op DNA-monsters van kinderen uit Kameroen, waar de ernstige malariagroep meestal gekenmerkt was door zeer hoge koorts, ernstige anemie, ademnood, en coma. Wij vonden dat het GSTM1-null-genotype significant frequenter voorkwam in ernstige versus lichte malariagevallen. Er was geen verschil tussen GSTP1 en GSTT1 in de twee groepen. In hoofdstuk 3 hebben we dezelfde GST-polymorfismen in Tanzaniaanse kinderen vastgesteld. De ernstige malariagroep werd voornamelijk gekenmerkt door ernstige bloedarmoede. We hebben een significant hogere prevalentie van het GSTP1-I105V-genotype waargenomen bij de ernstige malariagroep in vergelijking met de licht aangedane groep. Het GSTM1-null-genotype was ook frequenter aanwezig in de ernstige malariagroep, maar het verschil was niet significant. Wij hebben geconcludeerd dat bij kinderen de GSTM1-null- en GSTP1-I105V-genotypische varianten geassocieerd zijn met ernstige malaria.

In **hoofdstuk 4** gebruiken we bioinformaticatechnieken om *P. falciparum* ABC-eiwitten uit de Plasmodium database fylogenetisch te classificeren. We tonen aan dat 11 van de 16 genomgecodeerde ABC-eiwitten, membraantransporters zijn. Verder bepaalden we de subcellulaire lokalisatie van PfMRP1 (*P. falciparum* Multidrug Resistance-associated Protein 1), PfMRP2 en PfMDR5 (*P. falciparum* MultiDrug Resistance protein 5) in de aeksuele stadia van de parasiet met behulp van immunocytochemie. We vonden dat deze drie ABC-transporters op de plasmamembraan van de parasiet zijn gelokaliseerd in alle aeksuele stadia. Er waren

geen signalen aanwezig op de erythrocytmembraan, de voedsel-vacuolemembraan of in cytoplasmatische compartimenten zoals het endoplasmatisch reticulum.

In **hoofdstuk 5** hebben we enkele PfABC-transporters gekloneerd en de expressie onderzocht in verschillende heterologe expressiesystemen. De expressie van PfABCB7, PfMRP1, PfMRP2 en PfMDR5 werd onderzocht in getransduceerde zoogdiercellen, baculovirus-geïnfecteerde insectencellen (Sf9) en geïnjecteerd *Xenopus laevis*-oöcyten. De codon-geharmoniseerde PfMDR5- en EYFP-PfMDR5-fusiefragmenten werden tot expressie gebracht in het baculovirus-expressiesysteem en in humane HeLa-cellen. We zagen een afname van het expressieniveau als het PfMDR5-fragment groter werd, in Sf9- en HeLa-cellen. Bij geen van de gebruikte systemen werd expressie van de volledige transporters waargenomen. Het codon geharmoniseerde EYFP-PfMDR5-fusiefragment werd in iets grotere hoeveelheden tot expressie gebracht dan de oorspronkelijke vorm. Wij hebben geconcludeerd dat gengrootte, A/T-rijkdom of codonbias van invloed kunnen zijn op de expressie van falciparum membraan eiwitten in HeLa- en Sf9-cellen. Codon-harmonisatie kan de expressie van falciparum-eiwitten in Sf9-cellen verbeteren.

In **hoofdstuk 6** zijn alle resultaten uit dit proefschrift besproken en in een breder perspectief geplaatst. Onze resultaten met betrekking tot GST-polymorfismen en de gevoeligheid voor ernstige malaria dragen bij aan de kennis over de moleculaire processen van malaria. Het stimuleert ook het onderzoek naar de effecten van oxidatieve stress-inducerende geneesmiddelen bij personen met beperkte of gebrekkige antioxidant-enzymactiviteit, met name in geval van meerdere enzymdeficiënties. Bovendien zullen de resultaten van de hoofdstukken 4 en 5 bijdragen aan de kennis van de moleculaire biologie van de parasiet en geven ze meer inzicht in de mogelijkheden

voor verdere karakterisering van de ABC-transporters in de parasiet als aangrijpingspunt voor mogelijke antimalariamiddelen.