

## SAMENVATTING

Malaria is nog steeds verantwoordelijk voor bijna een half miljoen doden per jaar. Momenteel worden er campagnes voor de bestrijding en eliminatie van malaria uitgevoerd in malaria endemische gebieden. Geneesmiddelenresistentie is echter een van de belangrijkste belemmeringen voor eliminatie van malaria. In dit proefschrift hebben we onderzocht hoe *P. falciparum* parasieten resistentie tegen sommige toxische verbindingen hebben ontwikkeld door middel van functionele variatie van *clag3* genen gereguleerd door epigenetische mechanismen. Deze genen komen tot expressie in klonale varianten en zijn verantwoordelijk voor de vorming van het transport kanaal dat zich op het membraan van de geïnfecteerde rode bloed cel bevindt; genaamd Plasmodium Surface Anion Channel (PSAC). De hypothese van deze studie was dat *P. falciparum* parasieten de permeabiliteit van het membraan voor specifieke opgeloste stoffen kan aanpassen door middel van epigenetische regulatie van de expressie van *clag3*-genen; en dit mechanisme kunnen parasieten gebruiken om resistentie ontwikkelen tegen antimalariamiddelen. Om deze hypothese te testen, hebben we de rol van de wisseling van expressie van *clag3* varianten onderzocht in de ontwikkeling van resistentie tegen het antibioticum BS, en tevens de dynamiek van *clag3*-genexpressie bij menselijke infecties onderzocht, alsmede de geneesmiddelen onderzocht die hypothetisch via dit resistentiemechanisme zouden kunnen falen.

Ten eerste laten we zien dat bij groei bij lage concentraties BS er werd geselecteerd voor parasieten die *clag3.1* tot expressie brachten, terwijl parasieten die waren blootgesteld aan hogere concentraties BS de expressie van beide *clag3* varianten hadden onderdrukt. We hebben geen mutatie gevonden in het genoom van deze parasieten die de verandering in fenotype konden verklaren. Zo concludeerden we dat parasieten de resistentie tegen toxische stoffen kunnen ontwikkelen door epigenetische regulatie van *clag3*-genen. Vervolgens ontdekten we dat parasieten geïsoleerd uit patiënten met ongecompliceerde malaria voornamelijk een van de twee paralogen tot expressie brengen, consistent met de eigenschap van wederzijds exclusieve expressie, zoals eerder beschreven in lab-aangepaste cel lijnen. Aanpassing aan kweekomstandigheden of selectie met toxische verbinding resulteert in veranderingen in *clag3*-expressie die verschilt per isolaat, hetgeen functionele verschillen impliceert tussen de gecodeerde eiwitten. We hebben ook waargenomen dat monsters die op dag 9 na experimentele humane infectie werden afgenomen (de tijd nodig voor ongeveer één erythrocytische cyclus in het perifere bloed) een mix van parasieten bevatten die ofwel *clag3.1*, ofwel *clag3.2* tot expressie brachten, wat suggereert dat het epigenetische geheugen van *clag3*-genen wordt gereset tijdens transmissiefasen. Ten slotte hebben we getest of andere geneesmiddelen, waarvan wordt vermoed dat ze gefaciliteerd transport nodig hebben om de cel binnen te dringen, mogelijkwijs falen door het gebruik van dit mechanisme van resistentie door de parasiet. We vonden dat de antimalariaverbindingen T3 en T16 (bis-thiazoliumzouten) het product van *clag3*-genen vereisen om opgenomen te kunnen worden door de geïnfecteerde erythrocyt en dat *P. falciparum*-populaties resistentie tegen deze verbindingen kunnen ontwikkelen door selectie van parasieten met sterk verminderde expressie van beide genen. De rest van de geneesmiddelen die we hebben getest, zou alternatieve mechanismen kunnen gebruiken waarbij *clag3*-genen niet betrokken zijn.

We hebben voor het eerst een resistentiemechanisme tegen malariamiddelen beschreven dat op het epigenetische niveau in *P. falciparum*-parasieten wordt gereguleerd. Dit fenomeen kan van belang zijn voor de aanpassing van parasieten aan de aanwezigheid van toxische verbindingen in menselijk bloed, waarbij snel parasieten kunnen worden geselecteerd die het minder permeabele fenotype, en dus resistentie tegen geneesmiddelen, in een enkele infectie ontwikkelen.