



Ixodes scapularis cinsi kenelere karşı gelişen immunitede Salp14 antijeni içeren mRNA, DNA ve rekombinant protein aşı tekniklerinin karşılaştırılması

Jaqueline Matias, Cheyne Kurokawa , Andaleeb Sajid Sukanya Narasimhan , Gunjan Arora , **Husrev Diktas*** Geoffrey E. Lynn , Kathleen DePonte , Norbert Pardi Jesus G. Valenzuela , Drew Weissman, Erol Fikrig

SBÜ Şişli Hamidiye Etfal EAH, Yale Üniveristesi

Sunu planı

- **GİRİŞ ve AMAÇ**
- **YÖNTEM**
- **BULGULAR**
- **TARTIŞMA ve SONUÇ**



GİRİŞ ve AMAÇ



- Ixodes scapularis cinsi keneler tüm dünyada ve özellikle Kuzey Amerikada Lyme hastalığının etyolojisinde yer almaktadırlar.
- Morbidite açısından son derece yıkıcı seyredebilen bu hastalığa karşı son yıllarda aşı geliştirme çalışmaları yoğun bir şekilde yürütülmektedir.
- Deney hayvanlarının *Ixodes scapularis* cinsi kene ile enfestasyonları sonucunda, bu kenelere karşı kazanılmış dirence sahip olmaları bu immunitenin sağlanmasında özellikle tükürük salgısının önemli olabileceği hipotezinin gelişmesine katkıda bulunmuştur.
- Bu çalışmada *I. scapularis* kene tükürüğünde yer alan antikoagulan fonksiyonu olan Salp14 antijeninin farklı antijen salınım mekanizması olan aşı teknikleri ile uygulanması ile en etkin aşı tekniği araştırıldı.**





YÖNTEM

- 4–5-haftalık dişi Hartley guinea pigs hayvan modeli olarak kullanıldı
- *I.scapularis cinsi* keneler
- mRNA aşıları 101-nükleotid uzunluğundaki poly A kuyruğu ile stabilize hale getirilmiş olup nukleozid modifikasyonu amacıyla N-1-methylpseudouridine –triphosphate kullanıldı. LNP ile enkapsulasyon işlemi uygulandı.
- DNA-Salp14 aşı protokolü için cDNA ile PCR amplifikasyonunu takiben VR2010 plazmid içerisine klonlandı. Klonlama işlemi için plazmid üzerinde bulunan BamH1 ve Bgl2II bölgeleri restriksiyon bölgesi olarak seçildi. Ardından DNA sekanslama ile klonların sekansı kontrol edildi ve plazmid purifikasyonu yapıldı.



YÖNTEM

- Rekombinant protein aşılması için *I. scapularis* cDNA kullanılarak Salp14 elde edildi. Ardından pMT-Bip-V5-HisA plazmidi klonlandı. DNA sekans analizi sonrasında Drosophila ekspresyon sistemi kullanılarak rekombinant protein üretimi sağlandı.
 - İmmunizasyon için:
 - ✓ 20 ug Salp14 mRNA-LNPs, kontrol grubu olarak IL-21 mRNA-LNP
 - ✓ 80 ug DNA-Salp14, kontrol grubu olarak VR2010
 - ✓ 20 ug rekombinant Salp14, kontrol grubu olarak Ovalbumin kullanıldı.
 - ✓ Yavaş salınımlı immunizasyon (rekombinant Salp14)
- *Deney hayvanları 4 hafta ara ile 2 kez immunize edildi.

YÖNTEM



- *I. scapularis* cinsi keneler sırt bölgeleri traş edilen deney hayvanlarının bu bölgesine her birisine 25-30 adet olacak şekilde challenge testi yapıldı.
- 24 saat aralıklar ile kenelerin yapışma bölgelerindeki kızarıklık izlendi ve skorlama yapıldı. Eritem yok (-), hafif (+), orta (++), güçlü (+++) şeklinde sınıflandırıldı.
- 104 aa bulunan Salp14 proteini 6 peptide şeklinde Genscript firması tarafından sentezlendi.
- Antikor yanıtını değerlendirmek için ELISA testi kullanıldı.

BULGULAR

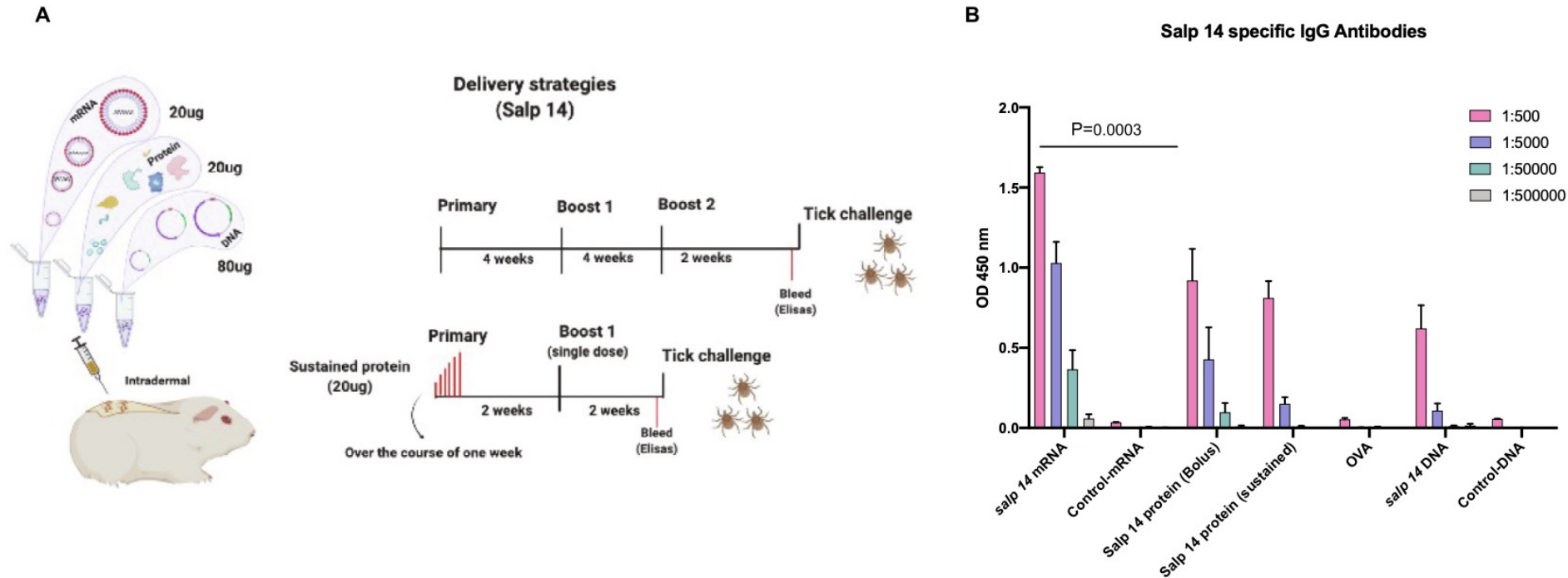


Fig. 1. *Salp 14* immunization strategies elicit *Salp14* IgG responses in guinea pigs. (A) Guinea pigs were immunized intradermally with *salp14* mRNA-LNPs or murine (μ)IL-21 mRNA-LNP (control), *salp14* DNA or empty plasmid VR2010 (control), *Salp14* protein (bolus and sustained) or Ovalbumin (OVA control). Two weeks after the last immunization, sera were collected to assess the humoral immune response and challenged with 25 nymphal *I. scapularis* ticks. Illustration generated using Biorender.com. (B) *Salp14*-specific IgG antibodies were detected by ELISA. The error bars represent mean $\pm$ SEM of at least 3 values. Statistical significance was determined by two-way ANOVA; P value = 0.0003.

BULGULAR

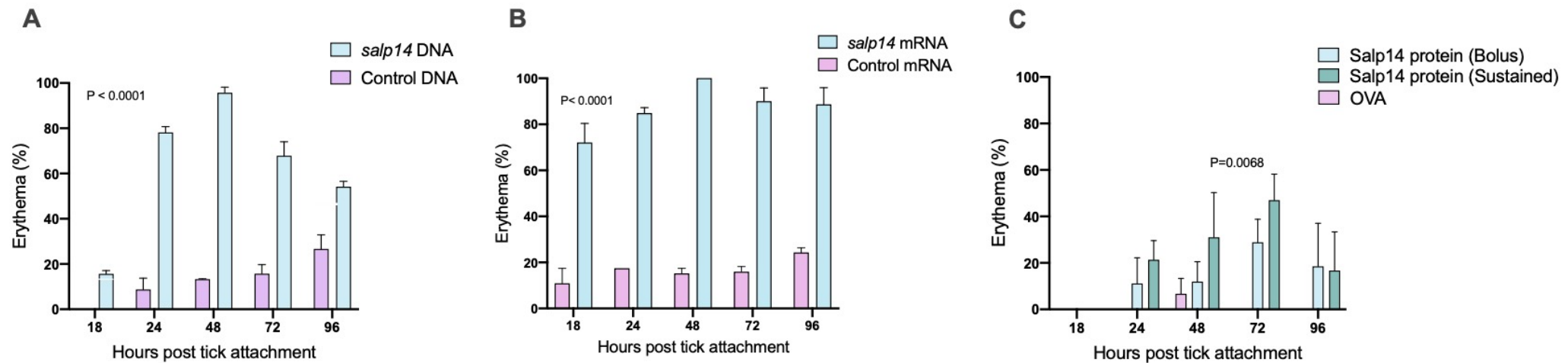
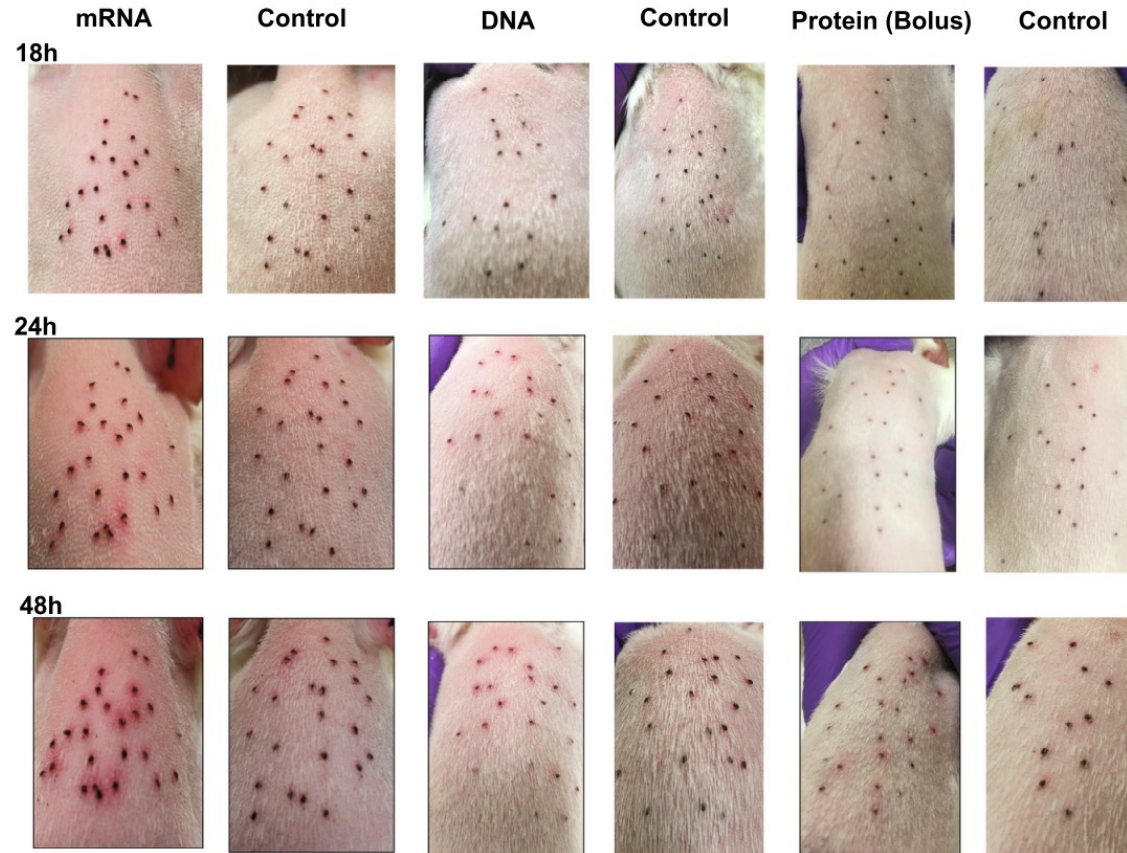


Fig. 2. Comparison of erythematic response generation: Guinea pigs were challenged with *I. scapularis* nymphs and monitored for erythema at the bite sites. Graphs show erythema after tick challenge in the animals immunized with (A) *salp14* DNA (n = 3), empty plasmid VR2010 (control) (n = 3); (B) *salp14* mRNA (n = 3), murine (mu)IL-21 mRNA-LNP (control) (n = 3); (C) Salp14 protein bolus (n = 3), sustained (n = 3) and Ovalbumin (OVA control) (n = 3). Immunization with *salp14*-mRNA elicits robust erythema upon tick challenge. The error bars represent mean $\pm$ SEM. Statistical significance was determined by two-way ANOVA; (A-B) P value < 0.0001 and (C) P value = 0.0068.

BULGULAR

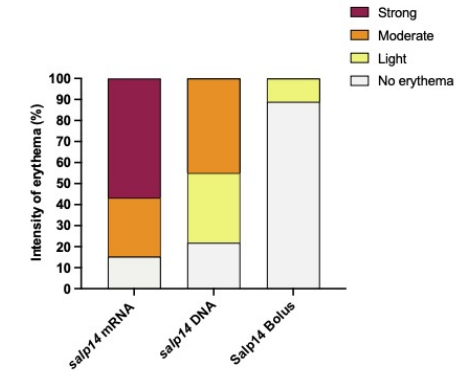


A



B

Intensity of erythema/ 24 hours



C

Intensity of erythema/ 48 hours

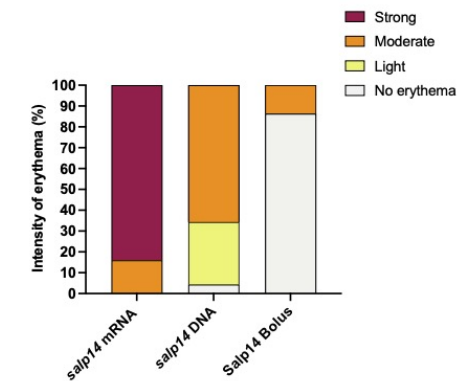


Fig. 3. Rapid erythema induced at the bite site of mRNA-*salp14* vaccinated animals. (A) Guinea pigs were monitored following the tick challenge and redness at the bite site was photographed. Representative animals are shown at 16, 24 and 48 h post-tick challenge. (B-C) Visual inspection was performed to determine the degree of erythema at the site of the tick bite at 24 and 48 h. Erythema was scored as: No erythema (-), Light (+), Moderate (++), Strong (+++), and the percentage of the degree of erythema was generated from these data.

BULGULAR

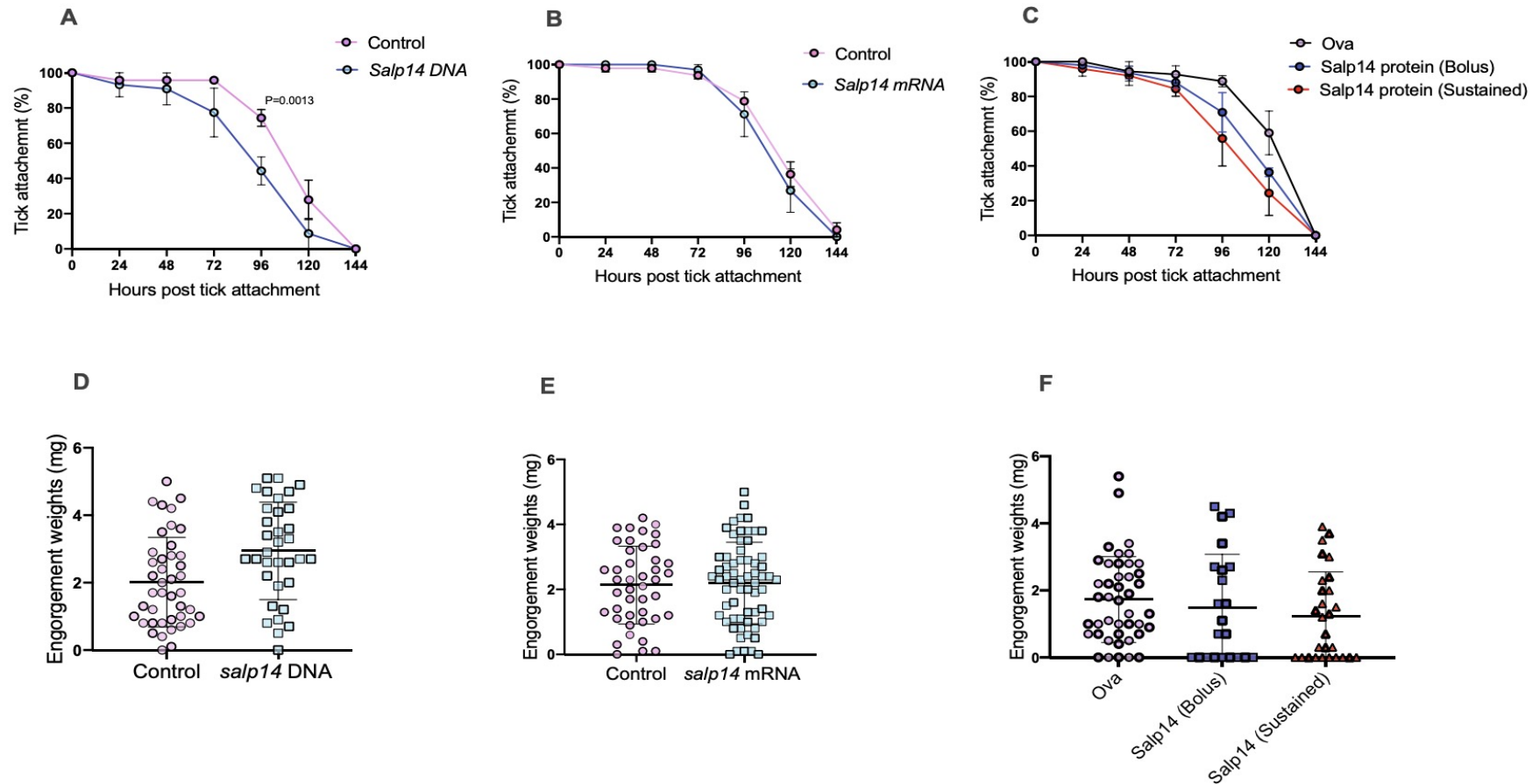


Fig. 4. Tick feeding kinetics on immunized guinea pigs. Guinea pigs ($n = 3$ per group) were immunized with *salp14* DNA (A and D), *salp14*-mRNA (B and E), and Salp14 protein (bolus and sustained) (C and F) and challenged with *I. scapularis*. Guinea pigs were monitored for evidence of tick rejection and the tick feeding kinetics were monitored for the duration of the experiment (A-C). The success of tick feeding was determined by examining engorgement weights of the recovered ticks (D-F). Statistical significance was determined (A) by two-tailed student *t*-test, P value = 0.0013 and (C) Mann Whitney test, P value = 0.0059.

BULGULAR

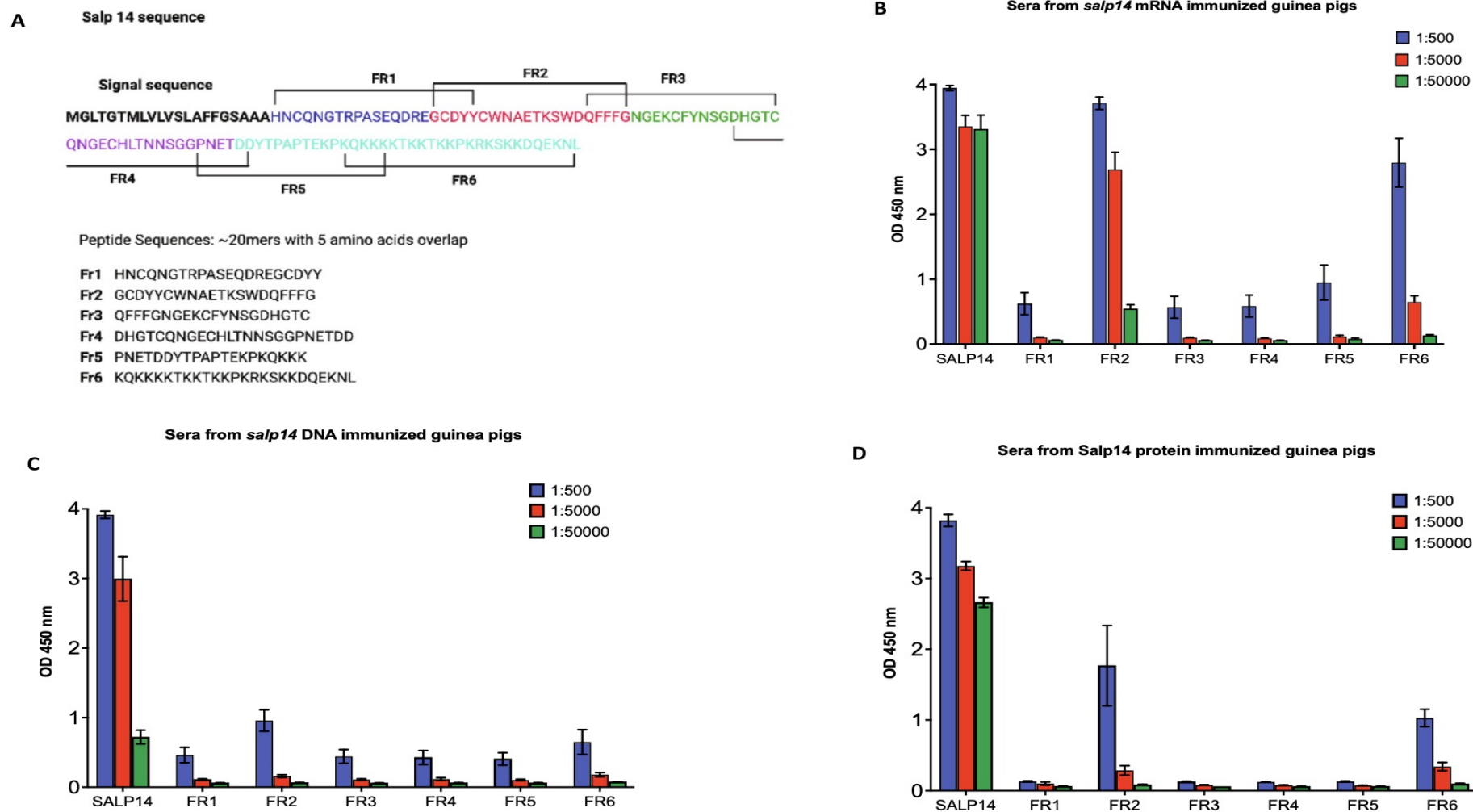


Fig. 5. Identification of the immunogenic domains of Salp14. A) Small peptides (approximately 20–25 amino acids) were synthesized that covered the entire Salp14 protein sequence (without signal peptide). ELISAs were performed to identify the fragment recognized by sera obtained from animals immunized with B) *salp14* mRNA-LNPs, C) *salp14* DNA, D) Salp14 protein.



TARTIŞMA-SONUÇ

- Kene ile bulaşan enfeksiyonlara karşı en önemli korunma yöntemi aşı ile elde edilen kızarıklık ve kaşıntı sonucunda kısa süre içerisinde kenenin vücuttan uzaklaştırılmasıdır.
- Salp 14 proteinin Nucleoside-modified mRNA-LNP yöntemi ile aşılama, DNA-Salp14 ve rekombinant protein Salp14 yöntemleri ile kıyaslandığında çok daha kısa sürede kızarıklık ve antikor yanıtı geliştirmektedir.
- Bu sebeple güçlü immun yanıt oluşturan antijen seçimi yanı sıra, doğru immunizasyon metodunun seçilmesi de kene ile bulaşan hastalıklara karşı geliştirilecek aşılarda etkinliği açısından son derece önemlidir.

Acknowledgements



Fikrig Lab

Erol Fikrig

Sukanya Narasimhan

Kathleen Deponte

Geoff Lynn

Cheyne Kurokawa

Jiri Cerny

Ming-Jie Wu

Andaleeb Sajid

Jaqueline Matias dos Santos

Funding

Steven and Alexandra Cohen Foundation

University of Pennsylvania, Philadelphia

Norbert Pardi

Drew Weissman

National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health

Jesus G. Valenzuela