

# ***SARS-CoV-2-Spike beeinträchtigt die DNA-Schadensreparatur und hemmt die V(D)J-Rekombination in vitro***

Hui Jiang 1,2,\* und Ya-Fang Mei 2,\*

1 Abteilung für Molekulare Biowissenschaften, The Wenner-Gren Institute, Universität Stockholm, SE-10691 Stockholm, Schweden

2 Abteilung für klinische Mikrobiologie, Virologie, Universität Umeå, SE-90185 Umeå, Schweden

\* Korrespondenz: [hui.jiang@su.se](mailto:hui.jiang@su.se) (H.J.); [ya-fang.mei@umu.se](mailto:ya-fang.mei@umu.se) (Y.-F.M.)

**Zusammenfassung:** Das Schwere Akute Respiratorische Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) hat zur Pandemie der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19) geführt, die die öffentliche Gesundheit und die Weltwirtschaft stark beeinträchtigt. Die adaptive Immunität spielt eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung der SARS-CoV-2-Infektion und hat direkten Einfluss auf die klinischen Ergebnisse der Patienten. Klinische Studien haben gezeigt, dass Patienten mit schweren COVID-19-Infektionen eine verzögerte und schwache adaptive Immunantwort zeigen. Der Mechanismus, durch den SARS-CoV-2 die adaptive Immunität behindert, ist jedoch noch unklar. Mit Hilfe einer In-vitro-Zelllinie berichten wir, dass das SARS-CoV-2-Spike-Protein die DNA-Schadensreparatur, die für eine wirksame V(D)J-Rekombination in der adaptiven Immunität erforderlich ist, erheblich hemmt. Mechanistisch gesehen haben wir herausgefunden, dass das Spike-Protein im Zellkern lokalisiert ist und die DNA-Schadensreparatur hemmt, indem es die Rekrutierung der wichtigen DNA-Reparaturproteine BRCA1 und 53BP1 an der Schadensstelle behindert. Unsere Ergebnisse zeigen einen potenziellen molekularen Mechanismus auf, durch den das Spike-Protein die adaptive Immunität behindern könnte, und unterstreichen die potenziellen Nebenwirkungen von Impfstoffen auf Spike-Basis in voller Länge.

## **1. Einleitung**

Das Coronavirus 2 des Schweren Akuten Respiratorischen Syndroms (SARS-CoV-2) ist für die derzeitige Coronavirus-Pandemie 2019 (COVID-19) verantwortlich, die zu mehr als 2,3 Millionen Todesfällen geführt hat. SARS-CoV-2 ist ein umhülltes Single-Positive-Sense-RNA-Virus, das aus strukturellen und nicht-strukturellen Proteinen besteht [1]. Nach der Infektion kapern und dysregulieren diese viralen Proteine die zelluläre Maschinerie des Wirts, um sich zu replizieren, zu assemblieren und Nachkommen zu verbreiten [2]. Jüngste klinische Studien haben gezeigt, dass eine SARS-CoV-2-Infektion die Anzahl und Funktion der Lymphozyten außerordentlich beeinträchtigt [3-6]. Im Vergleich zu leicht und mittelschwer erkrankten Überlebenden weisen Patienten mit schwerem COVID-19 eine signifikant geringere Anzahl an Gesamt-T-Zellen, Helfer-T-Zellen und Suppressor-T-Zellen auf [3,4]. Außerdem verzögert COVID-19 die IgG- und IgM-Spiegel nach Auftreten der Symptome [5,6]. Insgesamt deuten diese klinischen Beobachtungen darauf hin, dass SARS-CoV-2 das adaptive Immunsystem beeinträchtigt. Der Mechanismus, durch den SARS-CoV-2 die adaptive Immunität unterdrückt, bleibt jedoch unklar.

Das Immunsystem und das DNA-Reparatursystem sind zwei wichtige Überwachungssysteme des Wirts und die wichtigsten Systeme, auf die sich höhere Organismen bei der Verteidigung gegen verschiedene Bedrohungen und bei der Gewebemöostase verlassen. Neue Erkenntnisse deuten darauf hin, dass diese beiden Systeme voneinander abhängig sind, insbesondere während der Entwicklung und Reifung von Lymphozyten [7]. Als einer der wichtigsten Reparaturwege für DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) spielt die NHEJ-Reparatur (Non-Homologous End Joining) eine entscheidende Rolle bei der Lymphozyten-spezifischen V(D)J-Rekombination, die durch die aktivierende Gen-Endonuklease (RAG) vermittelt wird und zu einem äußerst vielfältigen Repertoire an Antikörpern in B-Zellen und T-Zell-Rezeptoren (TCRs) in T-Zellen führt [8]. So führt beispielsweise der Funktionsverlust wichtiger DNA-Reparaturproteine wie ATM, DNA-PKcs, 53BP1 u. a. zu Defekten bei der NHEJ-Reparatur, die die Produktion funktioneller B- und T-Zellen hemmen und zu Immunschwäche führen [7,9-11]. Im Gegensatz dazu induziert eine Virusinfektion normalerweise DNA-Schäden über verschiedene Mechanismen, wie z. B. die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Stress bei der Replikation der Wirtszellen [12-14]. Wenn DNA-Schäden nicht ordnungsgemäß repariert werden können, tragen sie zur Verstärkung der durch die Virusinfektion hervorgerufenen Pathologie bei. Daher wollten wir untersuchen, ob SARS-CoV-2-Proteine das DNA-Schadensreparatursystem unterwandern und dadurch die adaptive Immunität in vitro beeinträchtigen.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Antikörper und Reagenzien

DAPI (Kat. #MBD0015), Doxorubicin (Kat. #D1515), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kat. #H1009) und  $\beta$ -Tubulin-Antikörper (Kat. #T4026) wurden von Sigma-Aldrich erworben. Antikörper gegen His-Tag (Kat. #12698), H2A (Kat. #12349), H2A.X (Kat. #7631),  $\gamma$ -H2A.X (Kat. #2577), Ku80 (Kat. #2753) und Rad51 (Kat. #8875) wurden von Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) erworben. Die Antikörper 53BP1 (Kat. #NB100-304) und RNF168 (Kat. #H00165918-M01) wurden von Novus Biologicals (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) bezogen. Die Antikörper Lamin B (Kat. #sc-374015), ATM (Kat. #sc-135663), DNA-PK (Kat. #sc-5282) und BRCA1 (Kat. #sc-28383) wurden von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) hergestellt. Der Antikörper XRCC4 (Kat. Nr. PA5-82264) wurde von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) erworben.

### 2.2. Plasmide

pHPRT-DRGFP und pCBASceI wurden freundlicherweise von Maria Jasin (Addgene plas-mids #26476 und #26477) zur Verfügung gestellt [15]. pimeJ5GFP war ein Geschenk von Jeremy Stark (Addgene plas-mid #44026) [16]. Die NSP1-, NSP9-, NSP13-, NSP14-, NSP16-, Spike- und Nukleokapsidproteine wurden zunächst mit einer Codon-Optimierung synthetisiert und dann mit einem C-terminalen 6xHis-Tag in einen Mam-Malia-Expressionsvektor pUC57 kloniert. Für den V(D)J-Reporter-Vektor wurde eine invertierte RSS-GFP-Komplementärsequenz mit 12 Spacern synthetisiert - eine RSS mit 23 Spacern. Anschließend wurde die Sequenz in den pBabe-IRES-mRFP-Vektor kloniert, um den pBabe-12RSS-GFPi-23RSS-IRES-mRFP-Reporter-Vektor zu erzeugen. 12-Spacer-RSS-Sequenz: 5'-CACAGTGCTACAGACTGGAACAAAAACC-3'. 23-Abstandshalter-RSS-Sequenz: 5'-CACAGTGGTAGTACTCCACTGTCTGGCTGTACAAAAACC-3'. Die RAG1- und RAG2-Expressionskonstrukte wurden großzügig von Martin Gellert zur Verfügung gestellt (Addgene Plasmid #13328 und #13329) [17].

### 2.3. Zellen und Zellkultur

HEK293T- und HEK293-Zellen, die von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen wurden, wurden unter 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, hohe Glukose, GlutaMAX) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS, Gibco), 1 % (v/v) Penicillin (100 IU/mL) und Streptomycin (100  $\mu$ g/mL) kultiviert. HEK293T-DR-GFP- und HEK293T-EJ5-GFP-Reporterzellen wurden wie zuvor beschrieben generiert und unter 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C in dem oben genannten Nährmedium kultiviert.

### 2.4. HR- und NHEJ-Reporter-Assays

Die HR- und NHEJ-Reparatur in HEK293T-Zellen wurde wie zuvor beschrieben mit stabilen DR-GFP- und EJ5-GFP-Zellen gemessen. Kurz gesagt, 0,5 x 10<sup>6</sup> stabile HEK293T-Reporterzellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und mit 2  $\mu$ g I-SceI-Expressionsplasmid (pCBASceI) zusammen mit SARS-CoV-2-Proteinexpressionsplasmiden transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion und der Aspirin-Behandlung wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch auf die GFP-Expression untersucht. Die Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten gewonnen.

### 2.5. Zellfraktionierung und Immunoblotting

Für den zellulären Fraktionstest wurde das Subcellular Protein Fractionation Kit (Thermo Fisher) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Protein-Lysate wurden mit dem BCA-Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) quantifiziert. Die Proteine wurden aufgelöst durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), übertragen auf Nitrocellulosemembranen (Amersham protran, 0,45  $\mu$ m NC) und immunoblotiert mit spezifischen primären Antikörpern, gefolgt von HRP-konjugierten sekundären Antikörpern. Die Proteinbanden wurden mit dem SuperSignal West Pico oder Femto Chemilumineszenz-Kit (Thermo Fisher Scientific) nachgewiesen.

### 2.6. Comet-Assay

Die Zellen wurden mit verschiedenen DNA-Schadensreagenzien behandelt und dann zu den angegebenen Zeitpunkten für die Analyse geerntet. Die Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/mL in kalter phosphatgepufferter Kochsalzlösung [PBS]) wurden bei 40 °C in 1% niedrigschmelzender Agarose im Verhältnis 1:3 vol/vol resuspendiert und auf einen CometSlide pipettiert. Die Objektträger wurden dann in vorgekühlten Lysepuffer (1,2 M NaCl, 100 mM EDTA, 0,1 % Natriumlaurylsarkosinat, 0,26 M NaOH pH > 13) getaucht und über Nacht (18-20 h) bei 4 °C im Dunkeln lysiert. Anschließend wurden die Objektträger vorsichtig entnommen und 20 Minuten lang bei Raumtemperatur (RT) und im Dunkeln in Spülpuffer (0,03 M NaOH und 2 mM EDTA, pH > 12) getaucht. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die Objektträger wurden in eine horizontale Elektrophoresekammer mit Spülpuffer überführt und 25 Minuten lang bei einer Spannung von 0,6 V/cm getrennt. Schließlich wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen, mit 10 i.g/mL Propidiumiodid angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zwanzig Felder mit etwa 100 Zellen in jeder Probe wurden ausgewertet und mit der Fiji-Software quantifiziert, um die Schwanzlänge (Schwanzmoment) zu bestimmen.

## 2.7. Immunofluoreszenz

Die Zellen wurden auf Glasdeckgläsern in einer 12-Well-Platte ausgesät und 24 Stunden lang mit dem angegebenen Plasmid transfiziert. Anschließend wurden die Zellen je nach Versuchsaufbau mit oder ohne DNA-Schadensreagenzien behandelt. Die Zellen wurden 20 Minuten lang bei RT in 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert und anschließend 10 Minuten lang in 0,5% Triton X-100 permeabilisiert. Die Objektträger wurden mit 5 % normalem Ziegen Serum (NGS) blockiert und über Nacht bei 4 °C mit in 1 % NGS verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit den angegebenen, mit Alexa Fluor 488 oder 555 (Invitrogen) markierten Sekundärantikörpern, verdünnt in 1 % igem NGS, bei RT 1 Stunde lang inkubiert und anschließend 15 Minuten lang bei RT mit DAPI gefärbt. Die Deckgläser wurden mit Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent) aufgezogen und mit einem konfokalen Mikroskop von Nikon (Eclipse C1 Plus) abgebildet. Alle Auswertungen wurden unter verblindeten Bedingungen durchgeführt.

## 2.8. Analyse der V(D)J-Rekombination

Kurz gesagt, das V(D)J-Reporterplasmid enthält invertiertes GFP und IRES, das kontinuierlich exprimiertes RFP antreibt. Kontinuierlich exprimiertes RFP ist die interne Transfektionskontrolle. Nachdem das Rekombinationsaktivierungsgen 1/2 (RAG1/2) in die Zellen kotransfiziert wurde, schneidet RAG1/2 die RSS und vermittelt die Induktion von DSBs. Wenn V(D)J-Rekombination auftritt, werden die invertierten GFPs in positiver Reihenfolge durch NHEJ-Reparatur ligiert. Dann wird die Zelle funktionelles GFP exprimieren. Die doppelt positiven GFP- und RFP-Zellen sind also das Ergebnis des V(D)J-Reporter-Tests [18]. 293T-Zellen mit 70 % Konfluenz wurden mit dem V(D)J-GFP-Reporter allein (Hintergrund) oder in Kombination mit RAG1- und RAG2-Expressionskonstrukten in einem Verhältnis von 1 i.g V(D)J-GFP-Reporter: 0,5 i.g RAG1: 0,5 i.g RAG2 transfiziert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, und nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und mittels Durchflusszytometrie auf GFP- und RFP-Expression untersucht.

## 2.9. Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden mindestens dreimal mit unabhängig voneinander gesammelten oder vorbereiteten Proben wiederholt. Die Daten wurden mittels Student's t-Test oder ANOVA, gefolgt von Tukey's Multiple-Comparison-Tests mit GraphPad 8 analysiert.

# 3. Ergebnisse

## 3.1. Wirkung der im Zellkern lokalisierten SARS-CoV-2-Virusproteine auf die DNA-Schadensreparatur

Die Reparatur von DNA-Schäden findet hauptsächlich im Zellkern statt, um die Stabilität des Genoms zu gewährleisten. Obwohl SARS-CoV-2-Proteine im Zytosol synthetisiert werden [1], sind einige virale Proteine auch im Zellkern nachweisbar, darunter Nsp1, Nsp5, Nsp9, Nsp13, Nsp14 und Nsp16 [19]. Wir untersuchten, ob diese im Kern lokalisierten SARS-CoV-2-Proteine das DNA-Schadensreparatursystem der Wirtszelle beeinflussen. Zu diesem Zweck konstruierten wir diese viralen Proteinexpressionsplasmide zusammen mit Spike- und Nukleoproteinexpressionsplasmiden, die im Allgemeinen als zytosolokalisiert Proteine gelten. Wir bestätigten ihre Expression und Lokalisierung durch Immunoblotting und Immunfluoreszenz (Abbildungen 1A und S1A). Unsere Ergebnisse stimmten mit denen früherer Studien überein [19]; die Proteine Nsp1, Nsp5, Nsp9, Nsp13, Nsp14 und Nsp16 sind tatsächlich im Zellkern lokalisiert, während die Nukleoproteine hauptsächlich im Zytosol zu finden sind. Überraschenderweise fanden wir die Häufigkeit des Spike-Proteins im Zellkern

(Abbildung 1A). Die NHEJ-Reparatur und die Reparatur durch homologe Rekombination (HR) sind zwei wichtige DNA-Reparaturwege, die nicht nur die Integrität des Genoms kontinuierlich überwachen und sicherstellen, sondern auch für die Funktionen der adaptiven Immunzellen unerlässlich sind [9]. Um festzustellen, ob diese viralen Proteine den DSB-Reparaturweg behindern, untersuchten wir die Reparatur eines ortsspezifischen DSB, der durch die I-SceI-Endonuklease induziert wurde, unter Verwendung des direkten Repeat-Grünfluoreszenzproteins (DR-GFP) und des Gesamt-NHEJ-GFP (EJ5-GFP) Reportersystems für HR bzw. NHEJ [15,16]. Die Überexpression von Nsp1, Nsp5, Nsp13, Nsp14 und Spike-Proteinen verringerte die Effizienz sowohl der HR- als auch der NHEJ-Reparatur (Abbildungen 1B-E und S2A,B). Darüber hinaus stellten wir fest, dass die Überexpression von Nsp1, Nsp5, Nsp13 und Nsp14 die Proliferation im Vergleich zu anderen untersuchten Proteinen drastisch unterdrückte (Abbildung S3A,B). Die hemmende Wirkung von Nsp1, Nsp5, Nsp13 und Nsp14 auf die Reparatur von DNA-Schäden könnte daher auf sekundäre Effekte wie Wachstumsstillstand und Zelltod zurückzuführen sein. Interessanterweise beeinträchtigte das überexprimierte Spike-Protein weder die Zellmorphologie noch die Zellproliferation, unterdrückte aber sowohl die HR- als auch die NHEJ-Reparatur signifikant (Abbildungen 1B-E, S2A,B und S3A,B).

### 3.2. SARS-CoV-2-Spike-Protein hemmt DNA-Schadensreparatur

Da Spike-Proteine für die Vermittlung des viralen Eindringens in Wirtszellen entscheidend sind und im Mittelpunkt der meisten Impfstrategien stehen [20,21], haben wir die Rolle der Spike-Proteine bei der DNA-Schadensreparatur und der damit verbundenen V(D)J-Rekombination weiter untersucht. Es wird angenommen, dass Spike-Proteine im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert werden [1]. Nach posttranslationalen Modifikationen wie der Glykosylierung werden Spike-Proteine zusammen mit anderen viralen Proteinen durch den zellulären Membranapparat transportiert und bilden das reife Virion [1]. Das Spike-Protein enthält zwei Hauptuntereinheiten, S1 und S2, sowie mehrere funktionelle Domänen oder Wiederholungen [22] (Abbildung 2A). Im nativen Zustand liegen die Spike-Proteine als inaktive Proteine in voller Länge vor. Während der viralen Infektion aktivieren Proteasen der Wirtszelle, wie z. B. die Furin-Protease, das S-Protein, indem sie es in die Untereinheiten S1 und S2 spalten, was für den Eintritt des Virus in die Zielzelle notwendig ist [23]. Wir untersuchten verschiedene Untereinheiten des Spike-Proteins, um die für die Hemmung der DNA-Reparatur erforderlichen funktionellen Merkmale zu klären. Nur das Spike-Protein in voller Länge hemmte sowohl die NHEJ- als auch die HR-Reparatur stark (Abbildungen 2B-E und S4A,B). Als nächstes wollten wir feststellen, ob das Spike-Protein direkt zur genomischen Instabilität beiträgt, indem es die DSB-Reparatur hemmt. Wir überwachten die Anzahl der DSBs mit Hilfe von Comet-Assays. Nach verschiedenen DNA-Schadensbehandlungen, wie  $\gamma$ -Bestrahlung, Doxorubicin-Behandlung und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung, findet in Gegenwart des Spike-Proteins weniger Reparatur statt (Abbildung 2F und G). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass das Spike-Protein die DNA-Reparatur im Zellkern direkt beeinflusst.

**Quelle:** (Citation ) Jiang, H.; Mei, Y.-F. SARS-CoV-2 Spike Impairs DNA Damage Repair and Inhibits V(D)J Recombination In Vitro. *Viruses* **2021**, *13*, 2056. <https://doi.org/10.3390/v13102056>