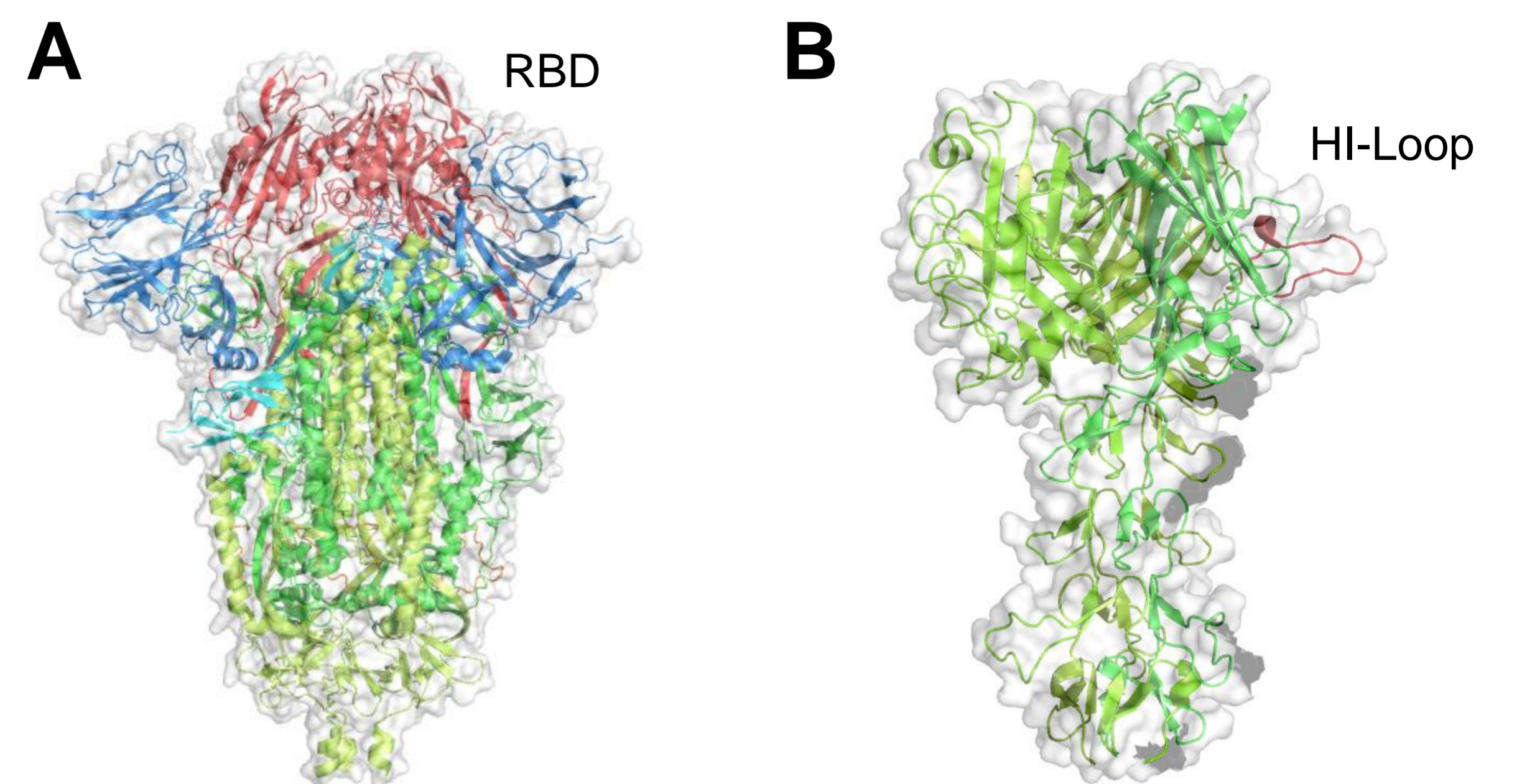


# Generierung und Charakterisierung von SARS-CoV-2-Spike Vektoren auf adenoviraler Basis

Denice Weklak, Julian Tisborn, Maurin Mangold, Franziska Jönsson, Claudia Hagedorn, Florian Kreppel  
Lehrstuhl für Biochemie und Molekulare Medizin, ZBAF, Department für Humanmedizin, Fakultät für Gesundheit, Universität Witten/Herdecke

## Einleitung

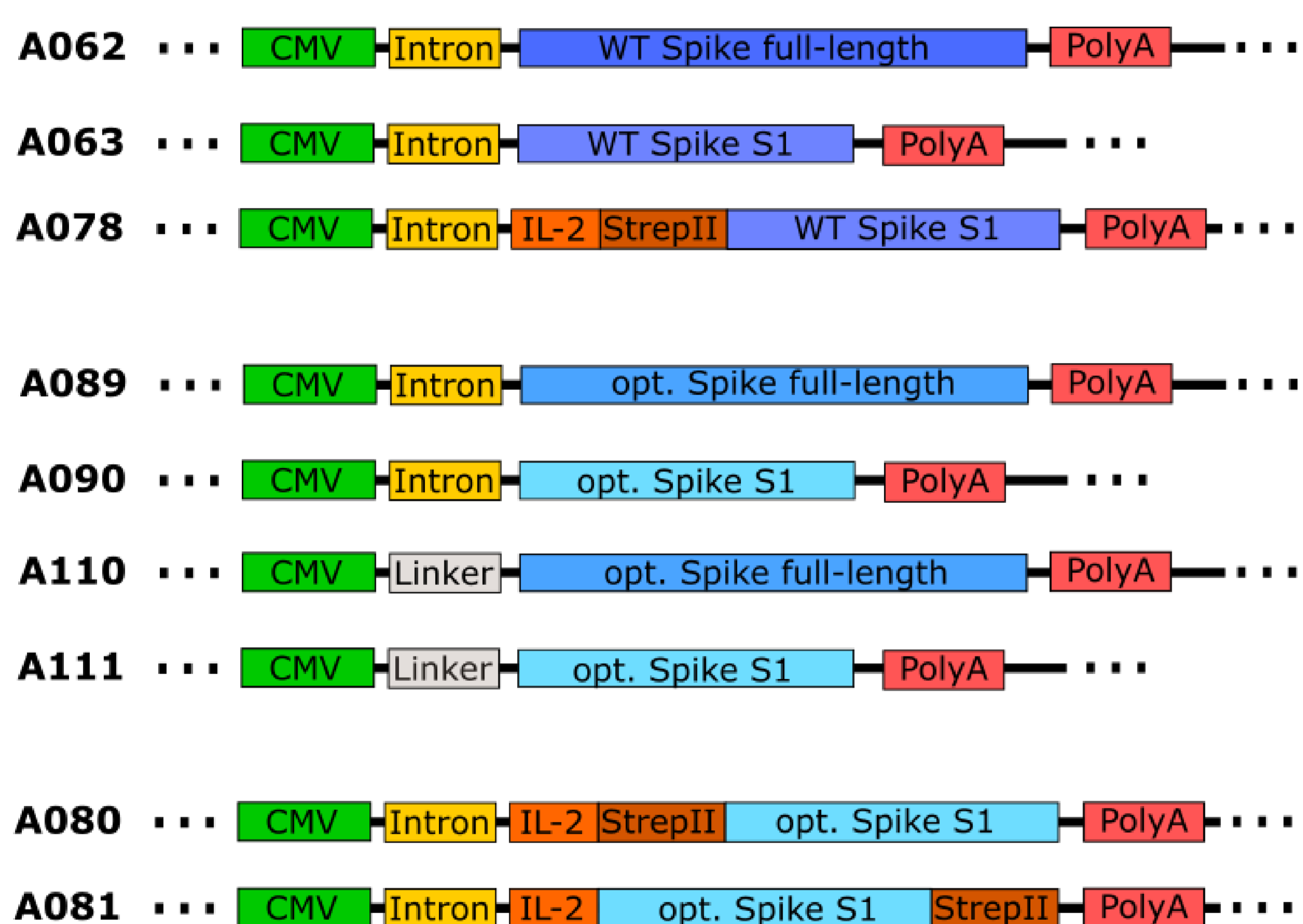
Adenovirale (Ad) Vektoren bieten eine effiziente Möglichkeit des Gentransfers zur Expression eines gewünschten Transgens. Das Spike (S) -Protein des SARS-CoV-2-Virus erkennt und bindet über die Rezeptor-Bindedomäne (RBD) der S1-Untereinheit den Rezeptor ACE2.<sup>1</sup> Durch proteolytische Spaltung in S1- und S2-Domäne kann die Membranfusion mit der Wirtszelle vermittelt werden.<sup>2</sup> Im Rahmen dieses Projektes werden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen soll das Spike-Protein selbst (siehe A) mittels eines adenoviralen Vektorsystems exprimiert werden, zum anderen soll ein Motiv der RBD in den HI-Loop (siehe B) des adenoviralen Fiber-Proteins integriert werden. Die so generierten Ad-Vektoren können sowohl der Impfstoffherstellung als auch der weiteren Charakterisierung der Spike-Wechselwirkungen mit der Wirtszelle dienen.



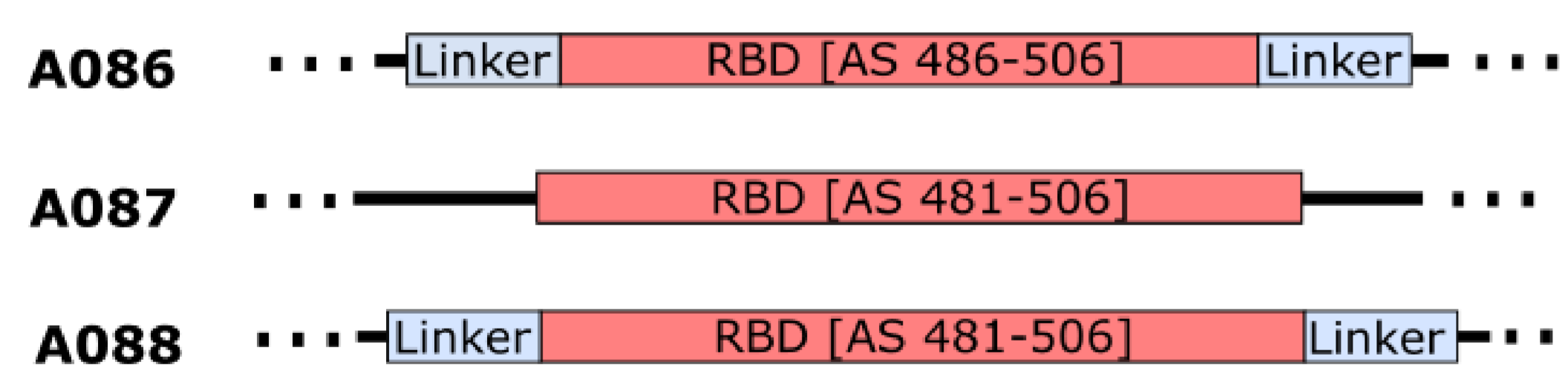
A) SARS-CoV-2 Spike-Protein. Blau: N-Terminus, Rot: Rezeptor-Bindedomäne, Grün: S2-Domäne.

B) Ad5-Fiber-Protein. Rot: HI-Loop.

## Expressionskassetten/Vektoren



### Fiber-Insertion in HI-Loop

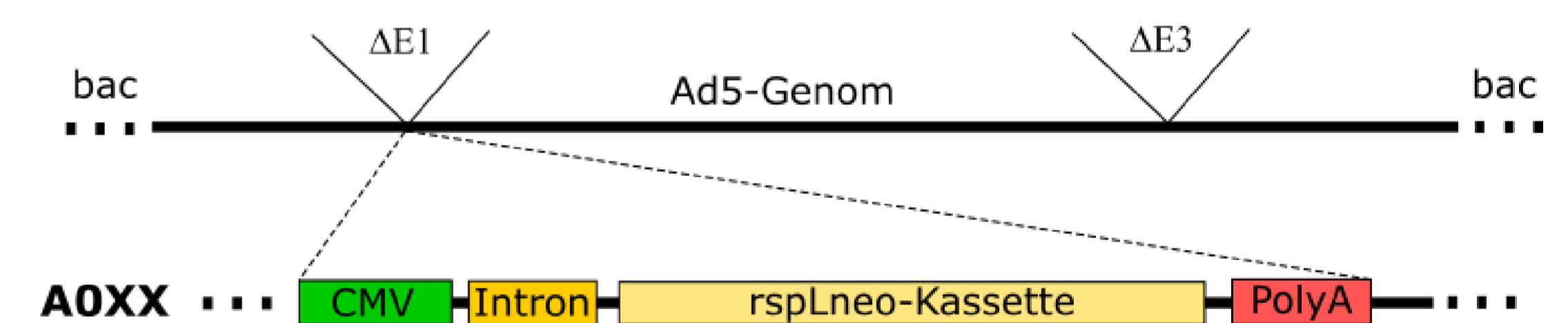


### Darstellung aller generierten Vektorkonstrukte

A062, A063, A078: WT (Wuhan-Isolat) Spike (full-length und S1)  
A089, A090: Codon-optimiertes Spike; A110, A111: zusätzlich Intron ersetzt durch Linker  
A080, A081, A078: Spike in Ad-Expressionsvektoren mit IL2-Signalpeptid (Sekretion) und StrepII-Tag  
A086-A088: Insertion RBD (AS481-506) in HI-Loop des Ad5-Fiber

## Methoden

Basierend auf dem Prinzip der homologen Rekombination wurde eine rpsLneo-Selektionskassette (Kanamycin-Resistenz) in einem Ad5ΔE1ΔE3-Vektor über Selektion durch Antibiotika gegen das gewünschte Insert ausgetauscht.



Die so gewonnen Vektoren wurden in HEK293-Zellen transfiziert und propagiert. Mittels eines CsCl-Dichtegradienten konnten die so generierten Viruspartikel aufgereinigt und isoliert werden. Um die Reinheit und den Titer zu überprüfen, wurde die OD<sub>260</sub> gemessen, eine SDS-PAGE (siehe Abbildung 2) mit anschließender Silbernitrat-Färbung, sowie ein Restriktionsverdau (siehe Abbildung 1) durchgeführt. Mittels Western-Blot werden aktuell erste Expressionen des Spike-Proteins untersucht.

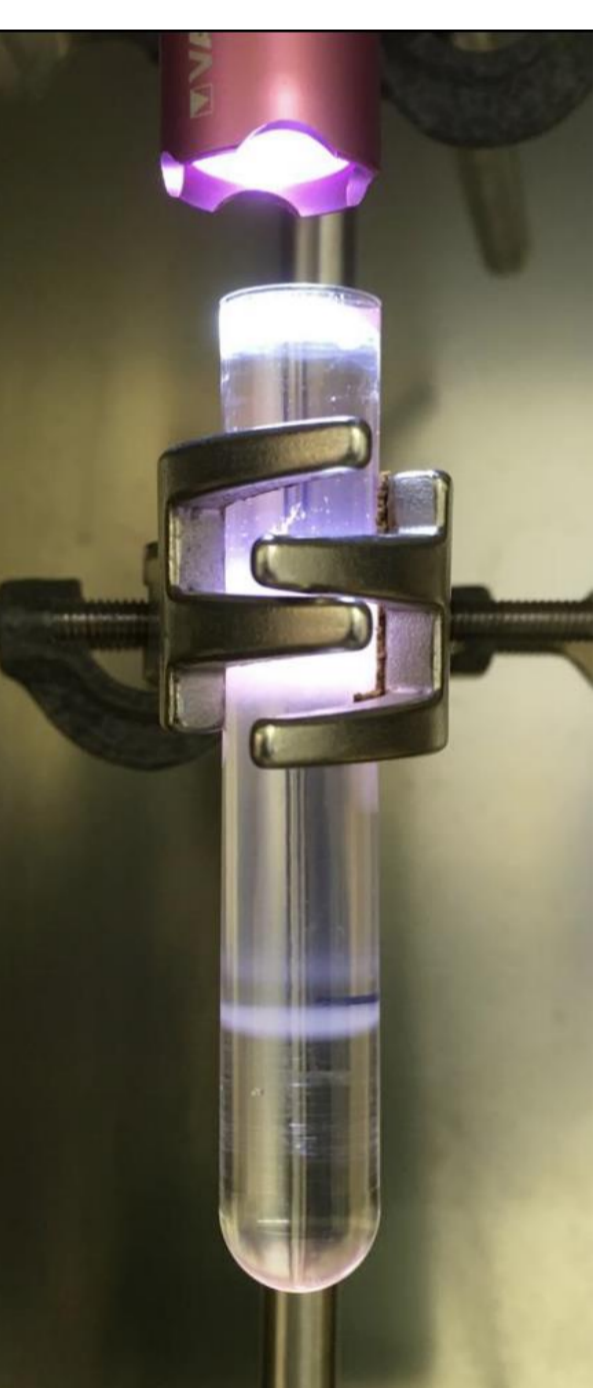


Abbildung 1: Restriktionsverdau.

Abbildung 2: SDS-Page.

## Zusammenfassung und Ausblick

Mit Hilfe der homologen Rekombination war es möglich, verschiedene Expressionskassetten für adenovirale Vektorsysteme zu generieren, welche auf dem SARS-CoV-2-Spike-Protein basieren. Hierbei wurden zwei Herangehensweisen unternommen um Ad-5-Viruspartikel zu generieren.

Im Folgenden soll die Expression des Spike-Proteins in humanen Zelllinien mittels eines Western-Blots verifiziert werden und sezerniertes Spike-Proteins über die adenovirale Expressionsplattform isoliert und aufgereinigt werden. Die generierten Vektoren werden in Kooperation *in vivo* getestet, um T-Zell- und Antikörperantworten nachweisen und potentielle Impfstoffkandidaten definieren zu können. Des Weiteren können verschiedene Wechselwirkungen zwischen Spike-Protein und Wirtszelle untersucht werden.

<sup>1</sup> Y. Huang, C. Yang, X.-F. Xu, W. Xu, S. W. Liu, *Acta pharmacologica Sinica* **2020**, *41*, 1141.

<sup>2</sup> M. Hasöksüz, S. Kiliç, F. Saraç, *Turkish journal of medical sciences* **2020**, *50*, 549.