

Description of endeavour

Unser Ziel: Zellbasierte und direkte Detektion von SARS-CoV-2

Nach dem Auftreten erster Covid-19 Symptome dauert es Tage, bis man einen Arzttermin erhält, und nach erfolgreichem (!) Abstrich vergehen weitere Tage, bis man das Testergebnis erfährt. Zudem kann man bereits Tage vor Krankheitsausbruch hoch ansteckend sein. Vor diesem Hintergrund ist ein SARS-CoV-2 Test hilfreich, welcher das Virus tatsächlich direkt und nicht indirekt via Antikörper detektiert - eine mögliche Ansteckung deshalb frühzeitig nachweist - und der wiederholt, einfach und zu Hause durchgeführt werden kann (Point-of-Care). In Kombination mit einer Tracing-App ist 1) ein systematisches Massentesten und 2) eine flächendeckende Datenerfassung zur effektiven Eindämmung von Ansteckungen möglich. Diese Herausforderung hat uns inspiriert, und wir wollen sie mit der Entwicklung eines zellbasierten SARS-CoV-2 Tests annehmen!

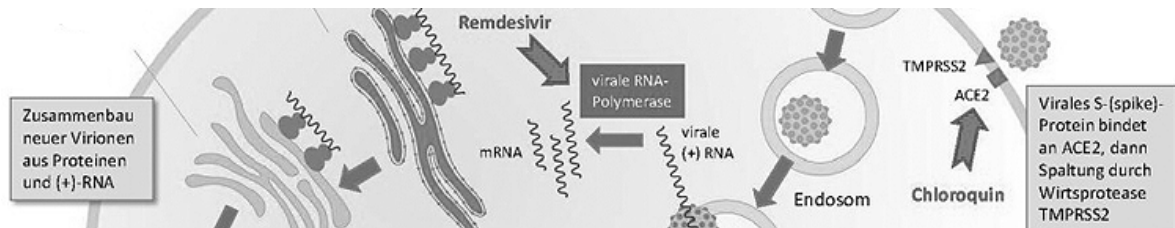


Modulare und hochspezifische Lab-in-a-cell Nachweismethode

Unser Detektionsprinzip soll modular aufgebaut sein, so dass der Test idealerweise auch zum Nachweis anderer Viren eingesetzt werden kann. Der Nachweis soll zellbasiert sein, damit niedrige Produktionskosten des Biosensors resultieren. Nach einer effektiven Infektion unserer Zellen, werden wir unverpackte, replizierte SARS-CoV-2 (+)ssRNA als Target für unser Detektionssystem nutzen. Die Wahl dieses Targets ist mit Risiken behaftet, da die Konzentration zytosolischer und unverpackter Virus-RNA während des Replikationszyklus nicht im Detail bekannt ist. Dafür ermöglicht das Target eine hochspezifische sowie modulare Detektion, welche wir mit einem sequenz-spezifischen RNA bindenden CRISPR-Cas System (RnCas) umsetzen. Heute sind mehrere erfolgreiche Applikationen mit RNA bindenden Proteinen beschrieben und validiert (Dedow et al. 2019).

Zellbasiertes Infektionsmodell

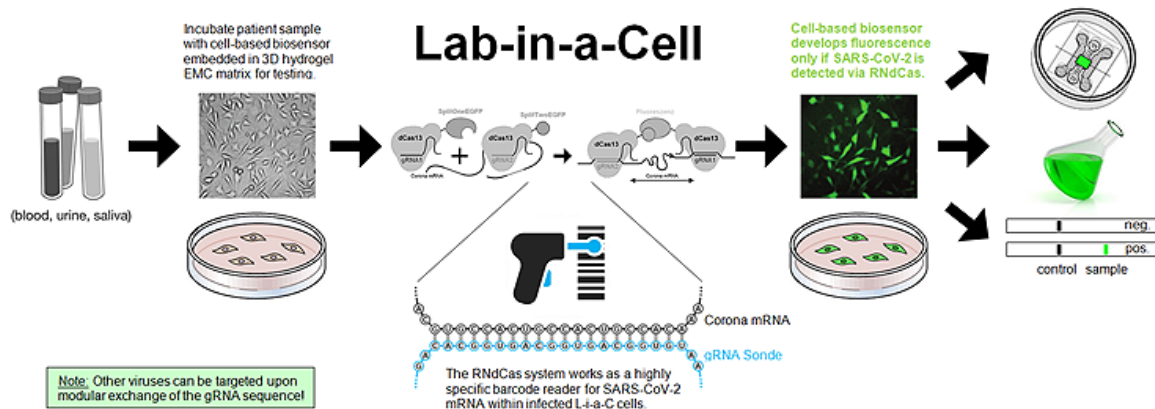
Der Nachteil unserer Methode ist die langsame Entwicklung des biochemischen Readoutsignals. Nach effektiver live Infektion dauert es 12-36 Stunden, bis durch RNA Replikation genügend Virus-Material vervielfältigt wurde. Wir werden deshalb diese Phase des Zyklus gezielt beschleunigen (RdRP Expression). In der klinischen Anwendung wird dieser Nachteil durch gestaffelte Wiederholungen des Tests wieder wettgemacht. Ist das Virus erst einmal in der Zelle, ist es permanent unserem Biosensor ausgesetzt. Wieviele SARS-CoV-2 Virionen zur Infektion nötig sind, ist bis heute nicht bekannt. Schätzungen gehen von einigen wenigen bis etwa hundert Virionen aus. Im Vergleich zu Influenzaviren scheint SARS-CoV-2 ungefähr 10x infektiöser zu sein. Inkubationszeiten von mehreren Stunden mit infektiösem Probematerial sind für eine erfolgreiche Infektion ausreichend.



SARS-CoV-2 (+)ssRNA Detektion via CRISPR-Cas

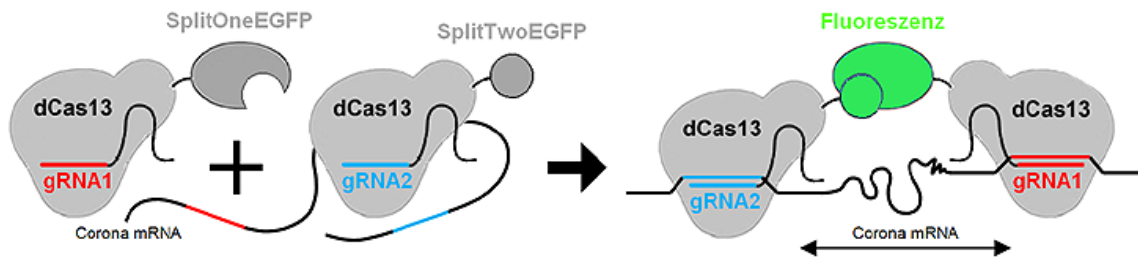
Analog zum WHO empfohlenen PCR Verfahren werden wir die RNA Sequenz des Envelope E-Proteins von SARS-CoV-2 detektieren. In den letzten 7 Jahren hat das CRISPR-Cas System in der Life Science Community laufend an Bedeutung gewonnen. Ursprünglich wurde dieses in der Biotechnologie zum gezielten Editieren von doppelsträngiger DNA angewendet. Inzwischen ist die CRISPR-Cas Toolbox ständig mit neuen Entwicklungen erweitert worden. Seit einigen Jahren sind ebenfalls RNA bindende CRISPR-Cas Systeme (RnDCas) bekannt, mit und ohne katalytischer Funktion. In unserem Nachweisverfahren sind wir an der spezifischen RNA Bindung von zwei inaktiven dCas13 Komplexen interessiert. Letztes Jahr wurde ein ähnliches Prinzip mit zwei inaktiven dCas9 Komplexen zur Detektion doppelsträngiger DNA angewendet. Diesen Frühling wurde via CRISPR-Cas eine hervorragende Nachweisgrenze zur SARS-CoV-2 Detektion experimentell bestätigt (Broughton et al. 2020).

Komplettes System



Lab-in-a-cell Biosensor als hochspezifischer Barcode-Reader

EGFP ist ein hell fluoreszierendes Protein und kann in zwei Untereinheiten gespalten werden (Split-EGFP). Diese sind nur dann fluoreszenzfähig, wenn beide einander räumlich genug nähern und die funktionelle Konformation einnehmen. Wir fusionieren je eine EGFP Split-Untereinheit an ein RNA bindendes CRISPR-Cas System (RnDCas). Die beiden RnDCas/gRNA Komplexe (Biosensor) detektieren SARS-CoV-2 schliesslich via komplementärer Basenpaarung der gRNA-Sonden und der SARS-CoV-2 mRNA (Barcode-Reader Prinzip). Nur bei optimalem Abstand der entsprechenden Sequenzabschnitte auf der SARS-CoV-2 mRNA findet eine EGFP Split-Complementation statt. Die zwei Komplementärpaarungen ermöglichen einen hochspezifischen Virusnachweis.



Referenzen (z.T. in abgekürzter Form)

- James Broughton et al. (2020) CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. Nature Biotechnology 38: 870–874.
- Michael Terns et al. (2018) CRISPR-based Technologies: Impact of RNA-targeting Systems. Mol Cell 72: 404–412.
- Jennifer Rauch et al. (2020) Scalable Protocol for Cas13-Based Detection of SARS-CoV-2 RNA. bioRxiv 2020.04.052159.
- Yan Zhang et al. (2020) CRISPR-Cas13 as an Antiviral Strategy for Coronavirus Disease 2019. The CRISPR Journal 3: 140–142.
- Tuan Nguyen et al. (2020) Virus against virus: a potential treatment for SARS-CoV-2 and RNA viruses. Cell Research 30: 189–190.
- Timothy Abbott et al. (2020) Development of CRISPR as a Strategy to Combat SARS-CoV-2 and Influenza. Cell 181: 865–876.

- Lauren Dedow et al. (2019) Searching for a Match: Sequence-Specific RNA-Binding Proteins. Cell Physiology 60: 1927–1938.
- Rekha Jalandra et al. (2020) Strategies to develop SARS-CoV-2 diagnostics. Biomedicine & Pharmacotherapy 129: 110446.
- Ran Liu et al. (2020) Promising methods for detection of novel coronavirus SARS-CoV-2. VIEW 2020/1: e4.

- Sophie Mavrikou et al. (2020) Development of a Ultra-Rapid Cell-Based Biosensor for Detection of SARS-CoV-2. Sensors 20: 3121.
- David Nelles et al. (2016) Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9. Cell 165: 488–496.
- Kazuo Takayama et al. (2020) In Vitro and Animal Models for SARS-CoV-2 research. Trends Pharmacol. Sciences 41: 513–516.
- Jiali Cao et al. (2019) Nanobody-based reporter for living cell sensing influenza A virus infection. Scientific Reports 9: 15899.

Quellen verwendeter Bilder (z.T. in abgekürzter Form)

- RNA Basenpaarung: Wikipedia 2020.
- CRISPR dCas13: Noack et al. (2018) Epitranscriptomics: New Regulatory Mechanism of Brain Function. Frontiers in Neuroscience.
- Zellkultur Schale: Racaniello et al. (2011) Multiplicity of infection. Virology Blog.
- Diagnostik Test: Zhang et al. (2019) Development of CRISPR-Cas systems for genome editing. Quarterly Reviews of Biophysics.
- Plasmidmodul: Aubry et al. (2019) Modular Vectors for Synthetic Biology Applications. Applied and Environmental Microbiology.
- Replikation: Ausgabe 24. März 2020. Zeitschrift für Infektionstherapie.

Link zur wemakeit Projektseite: <https://wemakeit.com/projects/corina-gegen-corona/>