

# BioFokus

## An vorderster Front: Forschung an SARS-CoV-2 zu Zeiten von Covid-19

Einblick einer Masterstudentin im Bereich Veterinärmedizin der Universität Bern

## En première ligne: Recherche sur SARS-CoV-2 durant le Covid-19

Aperçu d'une étudiante en Master Département Vétérinaire à l'Université de Berne

## Zusammenfassung

Im Dezember 2019 ist in Wuhan, einer Provinz in China, ein bisher unbekanntes Coronavirus ausgebrochen. Schnell hat sich dieses Virus, SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrom Coronavirus 2) ausgebreitet und eine Pandemie ausgelöst. Die ganze Welt war sogleich in Aufruhr, die Forschung mehr denn je gefragt. Als Masterstudentin im Bereich Veterinärmedizin da hineingeworfen zu werden, ohne molekularbiologischen Hintergrund, war nicht nur etwas stressig, sondern vor allem sehr aufregend. Die Forschungswelt mit naiven Augen zu sehen in einer Situation wie dieser. Wo auf einem ganz neuen Virus geforscht und komplett Neues entdeckt wird. Zu sehen, wie die gesamte Forschungswelt einerseits miteinander, andererseits auch gegeneinander unterwegs ist. Gemeinsam an dem Strang des Wissens ziehend und doch will Jeder der Erste sein, neue Erkenntnisse zu publizieren und sie somit mit allen zu teilen. Das Aneignen von neuem Wissen, die Entwicklung einer real-time RT-qPCR, der Abschluss eines Auftrags der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) bis hin zur Publikation von «Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform» in der Fachzeitschrift Nature – alles innerhalb von drei Monaten. Es hätte für mich keine spannendere Zeit geben können, um einen Einblick in die Welt der Forschung am Institut für Virologie und Immunologie (IVI) der Vetsuisse Fakultät der Universität Bern zu erhalten und alles hautnah mitverfolgen zu dürfen.

## Résumé

En décembre 2019, une nouvelle épidémie de corona virus s'est produite à Wuhan, province de Chine. Ce virus, le SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) s'est rapidement répandu et a déclenché une pandémie. Le monde entier a immédiatement été bouleversé et la recherche était très demandée. Se retrouver dans cette situation, en tant qu'étudiante en master de médecine vétérinaire sans formation en biologie moléculaire, était non seulement un peu stressant, mais surtout très excitant. Voir le monde de la recherche avec des yeux inexpérimentés dans une situation comme celle-ci, où des recherches sont menées sur un tout nouveau virus et où de nouvelles découvertes sont constatées est très enrichissant. De voir comment le monde de la recherche dans son ensemble travaille d'une part soudé et d'autre part, les uns contre les autres. Se rassembler sur le fil de la connaissance, et malgré cela chacun aimerait être le premier à découvrir et à publier quelque chose. L'acquisition de nouvelles connaissances, le développement d'une real-time RT-qPCR, l'achèvement d'un contrat avec l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et la publication de "Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform" dans la revue Nature - tout cela dans un délai de trois mois. Il n'aurait pas pu y avoir de moment plus excitant pour moi de suivre et vivre cette expérience auprès de l'Institut de virologie et d'immunologie de l'Université de Berne.

## Inhaltsverzeichnis

• Einleitung	2
• Was ist eine real-time RT-qPCR?	3
• Meine real-time RT-qPCR für SARS-CoV-2	4
• Zusammenarbeit mit der WHO	4
• Die erste Publikation	5
• Rück- und Ausblick	5

## Einleitung

Kurz nach dem Ausbruch von SARS-CoV-2 in China habe ich unter der Leitung von Prof. Volker Thiel meine Masterarbeit über Coronaviren begonnen.

Zu diesem Zeitpunkt hatte das neue Coronavirus noch nicht den jetzigen Namen SARS-CoV-2, es handelte sich noch nicht um eine Pandemie und man wusste kaum etwas über dieses neuartige Virus. Bis zu dem Zeitpunkt gab es erst 14'557 Infizierte weltweit, davon nur 146 Infizierte ausserhalb von China (verteilt auf 23 Länder) (WHO Situation Report 13). Ich hatte also bereits von diesem Coronavirus gehört, wie sehr es uns aber in nächster Zeit nicht nur in der Forschung, sondern auch im alltäglichen Leben begleiten würde, war nicht klar.

Die Forschung an Coronaviren hat mich bereits früh in meinem Studium interessiert. Denn Coronaviren sind in der Veterinärmedizin ein sehr wichtiges Thema. Es gibt verschiedene Coronaviren, die auch bei Tieren auftreten und dabei teilweise sehr schlimme und tödliche Krankheiten auslösen können.

## Forschung an SARS-CoV-2 zu Zeiten von Covid-19

### Anfang Februar 2020 – Start am IVI Bern

3. Februar 2020: Mein erster Tag am IVI in Bern. Herzlich werde ich begrüsst und allen kurz vorgestellt. Ich setze mich mit meinem Betreuer Volker Thiel zusammen und wir besprechen, wie es in nächster Zeit vor sich gehen soll. Schnell zeichnet sich ab: es ist noch sehr vieles unklar. Der Ausbruch

dieses "neuen Coronavirus" in Wuhan hat die Forschung am Institut für Virologie komplett über den Haufen geworfen. Alle laufenden Projekte wurden unterbrochen und Volker Thiels Team fokussierte sich auf diesem neuen Coronavirus. Er hat sich als Virologe schon früher intensiv mit Coronaviren auseinandergesetzt. Ich erhalte einen ersten Einblick in die Thematik, für mich zeigt sich sehr schnell: das ist mir eine völlig unbekannte Welt! Bisher habe ich mich mit anatomischen Strukturen, Krankheitsverläufen, Therapiemöglichkeiten und Prognosen auseinandergesetzt. Wie man ein Tier untersucht und behandelt. Hier geht es aber um ganz andere Dinge. Zum Glück ist noch etwas Biologie von früher hängen geblieben, sonst hätte ich wohl kaum etwas verstanden. Volker Thiel ist aber sehr verständnisvoll und erklärt es mir so, dass ich es auch verstehe. Die Projekte scheinen alle sehr spannend. Besonders, da man über dieses Virus zu dem Zeitpunkt noch nichts weiss. Es läuft auch ein grosses Projekt, wo es darum geht, dieses "neue Coronavirus" synthetisch herzustellen und dann zu "retten". Ein sehr wichtiges Projekt, denn bisher hat China das Virus noch nicht anderen Ländern zur Verfügung gestellt. Nur die Sequenzen verschiedener Isolate sind bisher publiziert worden. Um dringend nötiges Wissen über das neue Virus zu erhalten, brauchen Forscher aber das lebendige Virus. Es ist von daher ein zentrales Projekt und dementsprechend ist auch viel Druck dahinter. Einige der PhD-Studenten wie auch Post-Docs arbeiten fast rund um die Uhr an diesem Projekt. Als angehende Tierärztin ist das zwar nichts Neues, ich hätte aber nicht gedacht, dass auch in der Forschung teilweise in der Nacht gearbeitet werden muss.

### One Health: Zusammenarbeit mit dem IFIK

Als VPH-Schwerpunkt-Studentin finde ich es immer sehr spannend, wenn es ums Thema "One Health" geht. Wir haben eine Welt, und wir teilen sie nicht nur mit anderen Menschen, sondern auch mit Tieren, Pflanzen und der gesamten Umwelt. Ein One Health-Ansatz ist besonders bei einem Ausbruch eines neuen Virus aus meiner Sicht zentral. Genau das, hat auch die Forschungsgruppe unter der Leitung von Volker Thiel angestrebt. Es gab dabei eine Zusammenarbeit nicht nur innerhalb der Vetsuisse

Fakultät mit der Bakteriologie, sondern auch im Bereich der Human-Medizin mit dem IFIK (Institut für Infektionskrankheiten der Universität Bern). Mit vereintem Wissen wurden viele der Projekte angegangen und erfolgreich umgesetzt.

### Mitte Februar 2020: Ein Sprung ins kalte Wasser

Die Projekte laufen auf Hochtouren, alle wissen, was sie zu tun haben. Ich aber, fühle mich noch etwas wie Dori in "Findet Nemo": etwas verwirrt und noch ohne genaues Ziel. Für mich heisst es zuerst: Grundlagen erlernen. Das Handling eines Skalpells kenne ich nun langsam. Pipetten hingegen sind mir relativ neu. Einige Wochen helfe ich überall etwas mit und die Grundlagen sitzen nun schon ziemlich gut.

Ein erneutes Gespräch mit Volker Thiel verschafft dann für mich endlich Klarheit: das Thema steht. Ich werde direkt ins kalte Wasser geworfen und helfe an einem Projekt an SARS-CoV-2 mit. Das Ziel meiner Masterarbeit wird die Etablierung einer Multiplex real-time RT-qPCR für den gleichzeitigen Nachweis und die Quantifizierung von SARS-CoV und SARS-CoV-2 sein. Übersetzt heisst dies: ich werde eine Methode für den gleichzeitigen Nachweis und die Quantifizierung viraler RNA von SARS-CoV und SARS-CoV-2 erstellen und etablieren. Wie genau ich vorgehen muss, lehrt mich alles Hanspeter Stalder, mein direkter Betreuer. Häufig setzen wir uns zusammen und diskutieren, wie ich vorgehen muss. Zu Beginn ist alles etwas viel und ich komme immer sehr erschöpft nach Hause. Bald macht aber alles mehr Sinn und ich kann auch endlich meine eigenen Ideen miteinbringen, ein erster Erfolg für mich.

### Was ist eine real-time RT-qPCR?

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction = PCR) ist eine Methode mit der man Erbmaterial *in vitro*, d. h. im Reagenzröhrchen vervielfältigen und anschliessend nachweisen kann. Da das Erbmaterial in allen Lebewesen und Viren gleich aufgebaut ist, kann man diese Methode auch für den Nachweis von Erbmaterial der Coronaviren benutzen. Es ist eine der wichtigsten

diagnostischen Methoden zum Nachweis von Viren. Das Erbmaterial, die sog. DNA ist aus vier Bausteinen, sog. Nukleotiden aufgebaut (Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin). Diese Nukleotide bilden eine ganz spezifische Abfolge für jeden Abschnitt im Erbmaterial, die schon nach ca. 20-30 Nukleotiden eine unverwechselbare Sequenzabfolge bilden können. Durch die sorgfältige Auswahl von zwei solcher ca. 20 Nukleotid-langen Abschnitten (sogenannte Primer) auf dem Erbmaterial z.B. von SARS-CoV-2 Viren, können wir ganz gezielt das Erbmaterial nachweisen. Diese zwei spezifischen Primer können synthetisch hergestellt werden und dienen als Starter für die DNA-Polymerase, ein Enzym, dass das Erbmaterial vervielfältigen kann. Wenn dieser Vorgang der Vervielfältigung 30-40x wiederholt wird und die Primer das Erbmaterial erkennen und entsprechend als Starter für die Polymerase dienen, kann man anschliessend die neu synthetisierte DNA mit einer Farbreaktion nachweisen. Die quantitative Echtzeit-PCR (engl. real-time quantitative PCR oder kurz. qPCR) ist eine Methode, die auf der oben beschriebenen herkömmlichen PCR beruht. Bei dieser Methode wird ein weiterer Primer, eine sogenannte Sonde, der zwischen den beiden anderen Primern auf dem Erbmaterial bindet, zur PCR Reaktion dazugegeben. Diese Sonde dient nicht als Starter für die Polymerase, sondern wird mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, der nach jeder Wiederholung (Zyklus, engl. Cycle) freigesetzt wird, wenn die Sonde spezifisch die vervielfältigte DNA gebunden hat. Da man nach jedem Zyklus eine Fluoreszenzmessung durchführt, kann die Messung in Echtzeit (engl. real-time), erfasst werden. Die Fluoreszenz ist direkt proportional zur eingesetzten Menge Erbmaterial der Probe und darum kann daraus auf die Virusmenge geschlossen werden. Je früher in einem Zyklus eine Fluoreszenz gemessen werden kann, die über der Hintergrundfluoreszenz (engl. Background) liegt, desto grösser ist die Virusmenge. Den Zyklus, ab welchem das Signal über die Hintergrundfluoreszenz steigt, nennt man engl. Cycle threshold oder abgekürzt Ct-Wert. Ein wenig verwirrend ist dabei, dass je kleiner der Ct-Wert ist, desto grösser ist die ursprüngliche Virusmenge. Erbmaterial kommt in 2 Varianten vor, als Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder als Ribonukleinsäure (RNA). Die DNA-Polymerase die

in der PCR Reaktion verwendet wird, kann nur DNA vervielfältigen. Das Erbmateriale der Coronaviren besteht aber aus RNA. Deshalb muss vor der PCR Reaktion mit dem Enzym Reverse-Transkriptase (RT) die virale RNA, in DNA umgeschrieben werden. Dieses Prozedere heisst dann entsprechend Reverse-Transkriptase-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion oder kurz RT-qPCR.

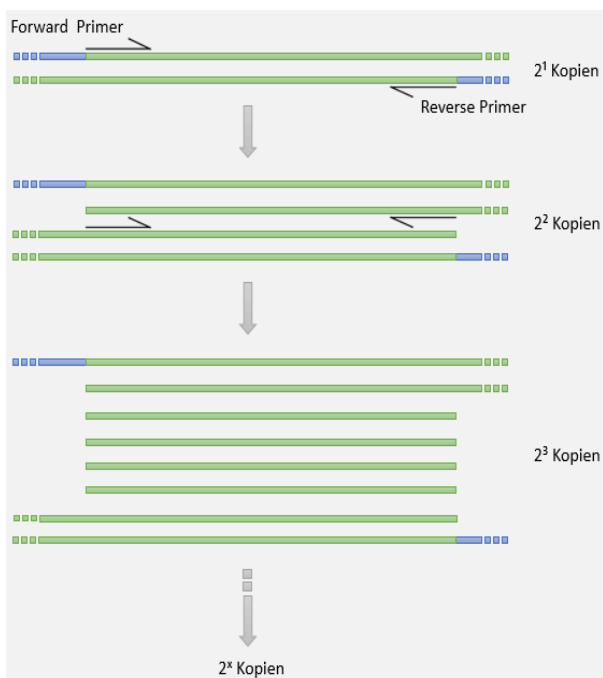


Abbildung 1: Prinzip der Amplifikation bei einer PCR-Reaktion.

## Meine real-time RT-qPCR für SARS-CoV-2

Zu Beginn meiner Arbeiten zur Etablierung einer solchen real-time RT-qPCR für SARS-CoV-2, war noch immer Februar 2020. Der Ausbruch von Covid-19 war zwar schon vorangeschritten, aber diagnostische Möglichkeiten waren noch nicht vollständig zugänglich. Besonders für die Forschung waren die kommerziellen Kits zum Nachweis von SARS-CoV-2 noch kaum erhältlich. Zusammen mit Hanspeter Stalder haben wir drei verschiedene real-time RT-qPCR Systeme erstellt und erprobt. Zudem haben wir RNA-Standards für jede real-time RT-qPCR hergestellt. Alle drei Systeme funktionierten einwandfrei. Eine wichtige Zusammenarbeit bestand und besteht noch immer, mit dem IFIK: wir konnten auch sie mit einer etablierten real-time RT-qPCR, inklusive RNA-Standard ausstatten, welche sie besonders in den ersten Monaten sehr regelmässig gebraucht haben. Auch andere Labore,

teilweise auch aus den Vereinigten Staaten von Amerika, haben nach solchen RNA-Standards gefragt. Wir waren natürlich froh, auch andere Forschende damit ausstatten zu können und die gesamte Forschungswelt damit zu unterstützen.

## Zusammenarbeit mit der WHO

Bereits relativ früh während meiner Zeit am IVI in Bern, zeigte sich, dass die Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) Interesse an verschiedenen RNA-Standards hätte. Dabei handelte es sich um Bereiche der RNA, welche von den diagnostischen real-time RT-qPCR, welche zu dem Zeitpunkt auf dem Markt waren, abgedeckt werden. Dabei wollten sie natürlich nicht mehrere unterschiedliche Tubes für die jeweiligen Tests, sondern ein Tube mit Fragmenten in standardisierten Mengen, welche alle Tests abdeckten. Dafür wurden zwei Mixturen erstellt, einerseits mit dem Fragment 6-8 (vgl. Thi Nhu Thao / Labroussaa / Ebert et. al. 2020) fusioniert, plus den Fragmenten 11 und 12 individuell – Mix #1. Andererseits mit allen Fragmenten (6-8, 11 und 12) einzeln in einem Tube zusammengemischt – Mix #2.

Natürlich war dies möglich und die Arbeiten daran begannen sogleich. Für mich eine spezielle Situation, ich habe es mir kaum zugetraut, als Masterstudentin nun RNA Standards für die WHO herzustellen. Nun gut, mit Druck umzugehen, wird auch später zu meinem Job gehören. Obwohl ich damals doch noch nicht ganz den Durchblick über die einzelnen Schritte hatte, machte ich mich an die Sache. Natürlich wurde ich damit auch nicht alleine gelassen und konnte die Fragmente unter der Leitung von Hanspeter Stalder herstellen. Dabei wurde auch eng zusammen mit Thao Tran (IVI Bern) und der Bakteriologie der Vetsuisse Fakultät der Universität Bern zusammengearbeitet. Danach wurde die RNA isoliert und ausführlich auf Qualität und Funktion getestet. Da die RNA von der WHO aus weiter versendet werden sollte, wurden diese Konditionen auch ausführlich getestet. Dabei haben wir die RNA während 3 Tagen "real-life" Konditionen ausgesetzt. Wir haben die optimalen Lagerkonditionen (-80°C), die optimalen Transportbedingungen (Trockeneis), die suboptimalen Transportbedingungen (Raumtemperatur) und

sommerliche Temperaturen (37°C) nachgestellt. Dies war auch ein sehr guter Qualitätstest für die RNA, ob sie auch bei suboptimalen Bedingungen stabil bleiben würde. Erstaunlicherweise war die RNA nach den 3 Tagen in allen Konditionen stabil. Die Fragmente waren daher von sehr guter Qualität, es waren auch alle Fragmente vorhanden und sie funktionierten genau wie erwartet. Perfekt! Für mich ein riesiger Erfolg. Ich hätte nicht gedacht, dass ich während meines Masters etwas für die WHO machen dürfte. Dass mir auch das Vertrauen von Volker Thiel und seiner Gruppe entgegengebracht wurde, dafür bin ich sehr dankbar.

### Die erste Publikation

Wir kommen langsam wieder zurück zum Anfang: das Projekt der Rekonstruktion von SARS-CoV-2 ausgehend von publizierten Sequenzen des gesamten Genoms, von dem ich bereits zu Beginn geschrieben habe. Es wurde ein Paper verfasst und bei Nature eingereicht. Für mich war die ganze Situation sehr eindrücklich, wie dann wirklich von allen mitgefiebert wird, man auf die Antwort des Editors wartet und kaum mehr schlafen kann. Immer wieder war Kontakt mit dem Editor da und es wurden weitere Dinge zur Publikation benötigt. Doch die Antwort liess auf sich warten.

24.04.2020: Es ist mein letzter Tag am IVI in Bern. Drei Monate sind bereits an mir vorbeigezogen. Langsam heisst es, von Allen Abschied zu nehmen. Doch bevor ich gehen muss, kommt endlich die Antwort des Editors: das Paper ist akzeptiert! Alle freuen sich riesig. All die Mühen und das Warten haben sich gelohnt: Nature publiziert den Artikel

unter dem Titel: «Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform». Für mich nicht nur spannend, mit dabei gewesen zu sein. Wegen kleineren Arbeiten, die ich auch für die Publikation übernommen habe, findet man meinen Namen nun mit auf der Publikation. Wohl der grösste Erfolg für mich und vor allem auch eine riesige Ehre, dass ich dabei mitwirken durfte.

### Rück- und Ausblick

Blicke ich zurück, so war es eine turbulente, lehrreiche und unglaublich spannende Zeit, die viel zu schnell vorüber gegangen ist. Die drei Monate, in denen ich mit dem Team von Volker Thiel mitgehen und mitarbeiten durfte, waren voller neuer Erfahrungen für mich. Erinnere ich mich zurück, wie ich an diesem ersten Tag am 03.02.2020 eingetroffen war und keine Ahnung hatte, was mich erwarten würde. Ich hätte nie gedacht, dass ich nach drei Monaten eine spannende Masterarbeit vorbereitet, einen Auftrag von der WHO abgeschlossen und mein Name mit auf einer Nature-Publikation sein würde. Hätte man mir dies gesagt, hätte ich es keinesfalls geglaubt.

Klar ist: eine Reihe glücklicher Zufälle haben zusammengespielt, um mich hierher zu bringen.

Heute, im Dezember 2020, ist für mich eindeutig: ich wurde mit dem Wissensdurst infiziert. Forschung an Coronaviren wird noch weiterhin ein Thema für mich sein und glücklicherweise sieht auch Volker Thiel einen Platz für mich in seinem Team. Ich musste daher nur vorübergehend Abschied von all den tollen Persönlichkeiten seines

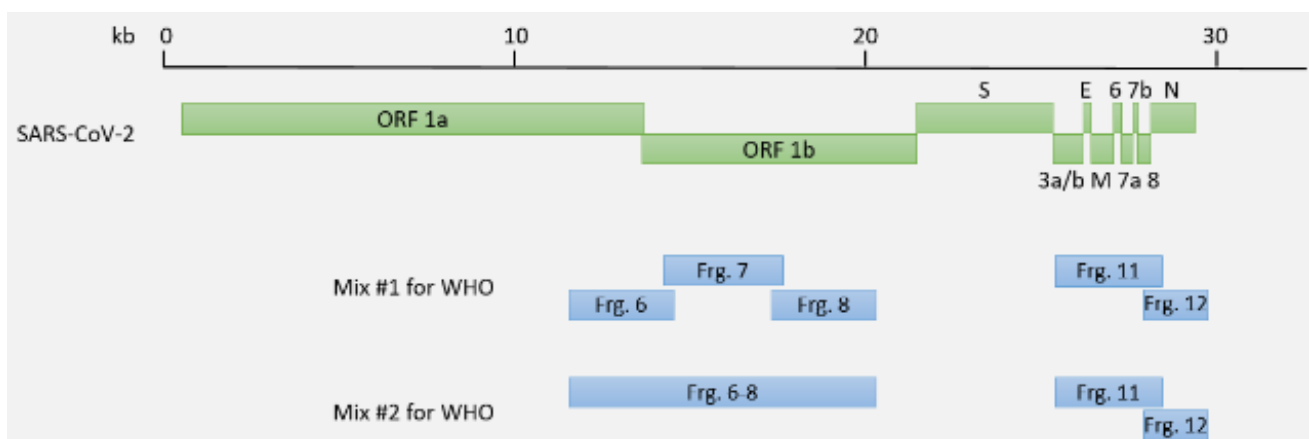


Abbildung 2: RNA-Standard Mixturen produziert für die WHO.

Teams nehmen. Denn ich bin bereits wieder zurück, im Team integriert und habe nun bereits meine Doktorarbeit vorgezogen.

Wie es mit SARS-CoV-2 genau weiter geht, ist ein anderes Thema. Im Vergleich zum Februar 2020, wissen wir bereits sehr viel mehr. Die ersten Impfungen sind bereits in der Zulassungsphase bzw. inzwischen zugelassen. Wir wissen aber noch lange nicht alles über dieses spannende Virus und es wird uns sicherlich sowohl in der Forschung als auch im alltäglichen Leben noch weiter begleiten.

## Literatur

Thi Nhu Thao T., Labroussaa F., Ebert N., V'kovski P., Stalder H., Portmann J., Kelly J., Steiner S., Holwerda M., Kratzel A., Gultom M., Schmied K., Laloli L., Hüsler L., Wider M., Pfaender S., Hirt D., Cippà V., Crespo-Pomar S., Schröder S., Muth D., Niemeyer D., Corman V. M., Müller M. A., Drosten C., Dijkman R., Jores J., Thiel V. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* 582, 561–565 (2020). DOI: 10.1038/s41586-020-2294-9.

WHO, World Health Organization, Novel Coronavirus (2019-nCoV) - Situation Report - 13 (2020). <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>.