

Die genetische Struktur von SARS-CoV-2 schließt einen Laborursprung nicht aus

Die chimäre SARS-COV-2-Struktur und die Furin-Spaltstelle könnten das Ergebnis einer genetischen Manipulation sein

Rossana Segreto , Yuri Deigin

Erstmals veröffentlicht: 17. November 2020

<https://doi.org/10.1002/bies.202000240>

Für diese Arbeit wurden keine externen Mittel erhalten.

Rossana Segreto und Yuri Deigin haben gleichermaßen zu dieser Studie beigetragen.

Abstrakt

Der Ursprung des schweren Coronavirus (SARS-CoV) 2 mit akutem respiratorischem Syndrom ist immer noch umstritten. Genomanalysen zeigen, dass SARS-CoV-2 wahrscheinlich chimär ist, wobei der größte Teil seiner Sequenz dem Fledermaus-CoV-RaTG13 am nächsten kommt, während seine Rezeptorbindungsdomäne (RBD) fast identisch mit der eines Pangolin-CoV ist. Chimäre Viren können *über* entstehennatürliche Rekombination oder menschliches Eingreifen. Die Furin-Spaltstelle im Spike-Protein von SARS-CoV-2 verleiht dem Virus die Fähigkeit, Spezies und Gewebebarrieren zu überwinden, war jedoch in anderen SARS-ähnlichen CoVs bisher nicht sichtbar. Könnten genetische Manipulationen durchgeführt worden sein, um Pangoline als mögliche Zwischenwirte für von Fledermäusen abgeleitete CoVs zu bewerten, die ursprünglich nicht an menschliche Rezeptoren binden konnten? Sowohl die Spaltstelle als auch die spezifische RBD könnten aus einer ortsgerichteten Mutagenese resultieren, einem Verfahren, das keine Spuren hinterlässt. Angesichts der verheerenden Auswirkungen von SARS-CoV-2 und der Bedeutung der Verhinderung künftiger Pandemien sind die Forscher dafür verantwortlich, eine gründliche Analyse aller möglichen SARS-CoV-2-Ursachen durchzuführen.

EINFÜHRUNG

Fast ein Jahr ist seit dem Ausbruch des schweren akuten respiratorischen Syndroms Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Wuhan, China, vergangen, und sein Ursprung ist immer noch umstritten. Trotz der internationalen Forschungsanstrengungen wurde ein natürlicher Wirt, entweder direkt oder mittelschwer, noch nicht identifiziert. Die Hypothese, dass die Wuhan Huanan Meeresfrüchte Großmarkt die erste Quelle für Tier-Mensch Übertragung des Virus war wurde nun entlassen schlüssigⁱ und die wenigen Marktproben, die nur Menschen angepassten SARS-CoV-2, ohne Spuren von Zoonose - Vorgänger zeigte gesammelt Stämmeⁱⁱ. Fast alle bisher veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten geben an, dass SARS-CoV-2 einen natürlichen Ursprung hat, und die einzige veröffentlichte Arbeit, die einen möglichen Laborursprung in Betracht zieht^[1] konzentriert sich auf die serielle Passage als die Technik, die eine spezielle Anpassung von SARS-CoV-2 an menschliche Zellen rechtfertigen könnte. Wir beschreiben hier, wie die beiden Hauptmerkmale von SARS-CoV-2: (1) das Vorhandensein einer Furin-Spaltstelle, die in anderen CoVs derselben Gruppe fehlt, und (2) eine Rezeptorbindungsdomäne (RBD), die für die Bindung an menschliche Zellen optimiert ist^[2] könnte das Ergebnis von Labormanipulationstechniken wie ortsgerichteter Mutagenese sein. Es ist weniger wahrscheinlich, dass die Erfassung beider einzigartiger Merkmale durch SARS-CoV-2 mehr oder weniger gleichzeitig natürlich ist oder nur durch die serielle Passage von Zellen / Tieren verursacht wird.

Die engsten Verwandten von SARS-COV-2 sind Fledermaus- und PANGOLIN-CORONAVIREN

Zhou et al.^[3] vom Wuhan Institute of Virology (WIV) identifizierten als erste ein neues Coronavirus (CoV), SARS-CoV-2. Die aus frühen Fällen erhaltenen genomischen Sequenzen hatten eine Sequenzidentität von 79% mit den CoVs, die 2002–2003 ein schweres akutes respiratorisches Syndrom (SARS-CoV) verursachten, und eine Sequenzidentität von 96,2% mit RaTG13 (MN996532), einer CoV-Sequenz, die aus einer Fledermaus von *Rhinolophus affinis* nachgewiesen wurde. RaTG13 ist derzeit der engste phylogenetische Verwandte für SARS-CoV-2,^[4] aber seine vollständige genomische Sequenz wurde nicht vor dem Ausbruch von SARS-CoV-2 veröffentlicht und die Originalprobe wurde in der Provinz Yunnan (China) von der EU gesammelt gleiche Gruppe von WIV-Forschern im Jahr 2013. Zhou et al.^[3] gaben an, eine Übereinstimmung zwischen SARS-CoV-2 und einer kurzen Region der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) eines CoV in ihrer Datenbank gefunden zu haben, und sequenzierten dann die 2013 gesammelte Originalprobe, die sie RaTG13 nannten, vollständig.

Wir entdeckten, dass der RdRp von RaTG13 eine 100% ige Nucleotididentität mit der Sequenz BtCoV / 4991 (KP876546) aufweist, die von Ge et al.^[5] in einer Fledermaus von *Rhinolophus affinis* in der Provinz Yunnan im Jahr 2013, am selben Ort und im selben Jahr wie RaTG13. BtCoV / 4991 wurde in einer von Fledermäusen besiedelten Mine in der Nähe von Tongguanzen, Mojiang, Yunnan gesammelt. Die WIV-Forscher wurden eingeladen, die Mine zu untersuchen, nachdem sich 2012 sechs Bergleute dort eine schwere Lungenentzündung zugezogen hattenⁱⁱⁱ und drei der Bergleute gestorben sind.^[6] Die Bergleute wurden beauftragt, Fledermauskot in der Mine zu beseitigen, und der Schweregrad ihrer Lungenentzündung korrelierte mit der Dauer der Exposition gegenüber der Mine.^[7] Vier Minenarbeiterproben wurden anschließend bei WIV getestet, wo in allen Proben Immunglobulin G (IgG) -Antikörper gegen SARS identifiziert wurden.^[8] Angesichts der Tatsache, dass während des SARS-Ausbruchs von 2002 bis 2004 nur etwa 5300 Menschen auf dem chinesischen Festland infiziert waren, von denen die meisten in Guandong lebten, ist die Wahrscheinlichkeit, dass vier Bergleute in Yunnan Antikörper aus dem SARS-Ausbruch von 2002 bis 2004 zurückhalten, vernachlässigbar. Andererseits ist es möglich, dass der den Bergleuten verabreichte SARS-Antikörpertest mit einem neuartigen SARS-ähnlichen Fledermausvirus kreuzreagierte, das die Bergleute in der Mine erworben hatten. Ge et al.^[5] haben eine Reihe von CoVs in der Mine identifiziert, aber basierend auf der phylogenetischen Analyse war BtCoV / 4991 der einzige SARS-verwandte Stamm, der zu diesem Zeitpunkt klar von allen bekannten Alpha- und Beta-CoVs getrennt war. BtCoV / 4991 unterschied sich auch von anderen Fledermaus-CoVs in der phylogenetischen Analyse von Wang et al. im Jahr 2019.^[9] Chen et al.^[10] identifizierten BtCoV / 4991 als die SARS-CoV-2 am nächsten liegende Sequenz, da RaTG13 zu diesem Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht worden war. Es wurde später behauptet, dass BtCoV / 4991 und RaTG13 zwei verschiedene Codierungsnamen desselben Stammes sind, da ihre ursprünglichen Autoren bei WIV die beiden Stämme als einen Eintrag in der Datenbank der Fledermaus-assoziierten Viren (DBatVir) registriert haben.^{iv}

Ende Juli 2020 bestätigte Zhengli Shi, der führende CoV-Forscher von WIV, in einem E-Mail-Interview^[11] die Umbenennung der RaTG13-Probe und erklärte unerwartet, dass die vollständige Sequenzierung von RaTG13 bereits im Jahr 2018 durchgeführt wurde und nicht nach dem SARS-CoV-2-Ausbruch, wie in Zhou et al.^[3] Die Umkehrung der Haltung von WIV, wann genau RaTG13 vollständig sequenziert wurde, könnte auf die Entdeckung unabhängiger Forscher zu den Ursprüngen von SARS-CoV-2 zurückzuführen sein, dass die Dateinamen der rohen Sequenzierung von WIV am 19. Mai 2020 hinterlegt wurden^v scheint darauf

hinzudeuten, dass die Sequenzierung für RaTG13 in den Jahren 2017 und 2018 durchgeführt wurde.^{vi} Kein formales Erratum über das Jahr der Sequenzierung und Probenumbenennung von den Autoren von Zhou et al. [3] ist noch erschienen oder wurde, soweit derzeit bekannt, eingereicht.

Die zweite nicht-humane RdRp-Sequenz, die BtCoV / 4991 am nächsten kommt (91,89% Nucleotidentität), ist die CoV-Sequenz MP789 (MT084071), die 2019 in einem malaysischen Pangolin (*Manis javanica*) aus der Provinz Guangdong (GD), China, isoliert wurde. [12] Das Hüllprotein von MP789 zeigt eine überraschend 100% ige Aminosäureidentität mit dem entsprechenden Protein in RaTG13, in Fledermaus-SL-CoVZXC21 (MG772934.1), in Fledermaus-SL-CoVZC45 (MG772933.1) und in einigen frühen SARS CoV-2-Isolate (zB YP_009724392). [13] Das Hüllprotein von CoVs ist an kritischen Aspekten des viralen Lebenszyklus beteiligt, wie z. B. dem Eintritt, der Replikation und der Pathogenese von Viren. [14]

Fledermaus-CORONAVIREN wurden gründlich untersucht und genetisch manipuliert

Viele Studien haben berichtet, dass Fledermäuse natürliche Reservoir für eine breite Vielfalt potenziell pathogener SARS-ähnlicher CoVs sind. [15, 16] Einige dieser Viren können möglicherweise Menschen direkt infizieren [17], während andere ihr Spike-Protein mutieren müssen, um effektiv an den humanen Angiotensin-1-Converting-Enzym-2-Rezeptor (hACE2) zu binden und den Viruseintritt zu vermitteln. [18] Um das Entstehungspotential neuartiger CoVs zu bewerten, haben Forscher eine Reihe von chimären CoVs entwickelt, die aus Fledermaus-CoV-Grundgerüsten bestehen, die normalerweise keine menschlichen Zellen infizieren können und deren Spike-Proteine durch solche aus CoVs ersetzt wurden, die mit menschlichem ACE2 kompatibel sind. Diese Chimären sollten Rekombinationsereignisse simulieren, die in der Natur auftreten könnten. [19, 20] Solche Experimente zum Funktionsgewinn haben eine Reihe von Bedenken hinsichtlich der biologischen Sicherheit aufgeworfen und bei Forschern und der Öffentlichkeit Kontroversen ausgelöst. Eines der Hauptargumente für Funktionsgewinnstudien ist die Notwendigkeit, mit einem Arsenal an Medikamenten und Impfstoffen auf die nächste Pandemie vorbereitet zu sein. [21] Im Gegensatz dazu ist eines der Hauptargumente gegen sie, dass die nächste Pandemie selbst durch diese Experimente verursacht werden könnte, da die Gefahr einer Flucht aus dem Labor besteht. [22, 23]

In den letzten Jahren lag der Schwerpunkt der Koronavirologie auf Pan-CoV-Therapien und -Impfstoffen, wie aus den in den letzten 5 Jahren durchgeführten Untersuchungen [24-27] sowie aus Medienberichten hervorgeht. [vii](#) Die synthetische Erzeugung verschiedener Panels potenzieller CoVs vor dem Auftauchen wurde zum Ziel aktiver Zuschüsse für die EcoHealth Alliance erklärt, die in Zusammenarbeit mit Laboratorien in den USA und anderen internationalen Partnern einen Teil dieser Forschung bei WIV finanzierte. ^{viii}

Das Erstellen von chimären CORONAVIREN mit neuartigen RBDS ist seit Jahrzehnten abgeschlossen

Forscher erzeugen seit über zwei Jahrzehnten chimäre CoVs, lange bevor moderne Sequenzierungs- oder Gentechnik-Techniken aufkamen. Beispielsweise verwendete eine Gruppe der Universität Utrecht 1999 eine gezielte RNA-Rekombination, um eine CoV-Chimäre für Katz und Maus zu erzeugen: Die RBDS eines Katzen- und Maus-CoV wurden ausgetauscht, was zeigt, dass dieser Austausch auch den Tropismus von Arten *in vitro* austauschte Experimente. [28]

2007 schuf die Shi-Gruppe am WIV eine Reihe von chimären „Bat-Man“-CoV-Spike-Proteinen, um herauszufinden, was CoVs genau die Fähigkeit verleiht, von einer Art zur anderen zu springen. Die Forscher verwendeten verschiedene Segmente des Spike-Proteins des humanen SARS-Virus, um entsprechende Segmente im Spike-Protein eines Fledermaus-Virus-Rückgrats zu ersetzen. Es wurde der Schluss gezogen, dass eine relativ kurze Region (aa 310 bis 518) des Spike-Proteins „notwendig und ausreichend ist, um Rp3-S in ein huACE2-bindendes Molekül umzuwandeln“²⁹, um dem CoV-Spike-Protein der Fledermaus eine neue Fähigkeit zu verleihen der Bindung an einen menschlichen ACE2-Rezeptor.

Im Jahr 2008 ging die Baric-Gruppe an der University of North Carolina (UNC) einen Schritt weiter mit der WIV-Forschung: Anstatt Pseudoviren mit humanen Immundefizienzviren (HIV) mit Fledermaus-CoV-Spike-Proteinen zu verwenden, wurde ein lebendes chimäres CoV erstellt. Nach den Experimenten ihrer WIV-Kollegen von 2007 verwendete die Baric-Gruppe ein Fledermaus-SARS-ähnliches CoV als Rückgrat und ersetzte seine RBD durch die RBD aus menschlichem SARS. [30]

Im Jahr 2015 schlossen sich die Shi- und Baric-Gruppen zusammen und veröffentlichten das wahrscheinlich berühmteste Virologiepapier zum Funktionsgewinn, in dem die Entstehung eines weiteren synthetischen chimären Virus beschrieben wurde. [19] Diesmal wurde die RBD eines mausangepassten SARS-Rückgrats (SARS-MA15) durch die RBD von RsSHC014 ersetzt, einem Fledermausstamm, der 2011 von der Shi-Gruppe aus Yunnan-Fledermäusen isoliert worden war. Im Jahr 2016 wiederholte die Baric-Gruppe ihr Experiment von 2015 unter Verwendung des gleichen SARS-MA15-Rückgrats und der RBD von Rs3367 [31], einem nahen Verwandten von RsSHC014, der zuvor von YIV in Yunnan gefunden und nach Lebendkultivierung in „WIV1“ umbenannt wurde. [17]

Die wahrscheinlich größte gemeldete Anzahl neuartiger chimärer Viren wurde in einem Artikel der Shi-Gruppe von WIV aus dem Jahr 2017 beschrieben [15], in dem die Autoren berichteten, dass acht chimäre Viren mit WIV1 als Rückgrat erzeugt und verschiedene RBDS aus Fledermaus-SARS in dieses transplantiert wurden wie Viren. Diese Viren wurden über einen Zeitraum von 5 Jahren in derselben Höhle in der Nähe von Kunming, Provinz Yunnan, gesammelt, wo die Shi-Gruppe ursprünglich Rs3367 und RsSHC014 gefunden hatte. Nur zwei der acht lebenden chimären Viren wurden erfolgreich gerettet, und es wurde festgestellt, dass diese beiden Stämme die Fähigkeit besitzen, an den menschlichen ACE2-Rezeptor zu binden, was durch Experimente in hACE2-exprimierenden HeLa-Zellen und RT-PCR-Quantifizierung von viraler RNA bestätigt wurde.

SARS-COV-2 TEILT SEINE RBD MIT EINEM PANGOLIN-CORONAVIRUS

Die Möglichkeit, dass Pangoline der Zwischenwirt für SARS-CoV-2 sein könnten, wird seit langem diskutiert. [32-34] Die größte Divergenz zwischen SARS-CoV-2 und RaTG13 wird in der RBD ihrer Spike-Proteine beobachtet. [4] Obwohl die Ähnlichkeit des Gesamtgenoms mit SARS-CoV-2 geringer ist als die von RaTG13, weist der aus GD-Pangolinen isolierte MP789-Pangolin-Stamm eine nahezu identische RBD wie SARS-CoV-2 auf. In der Tat besitzen Pangolin-CoVs und SARS-CoV-2 identische Aminosäuren an den fünf kritischen Resten der RBD, während RaTG13 nur eine Aminosäure mit SARS-CoV-2 teilt. [35] Die Ähnlichkeit der ACE2-Sequenzen ist zwischen Menschen und Pangolinen höher als zwischen Menschen und Fledermäusen. Interessanterweise weist das Spike-Protein von SARS-CoV-2 eine höhere vorhergesagte Bindungsaffinität zum menschlichen ACE2-Rezeptor auf als zu Pangolinen und Fledermäusen. ^{ix} Vor dem Ausbruch von SARS-CoV-2 waren Pangoline die einzigen Säugetiere außer Fledermäusen, von denen dokumentiert wurde, dass sie mit SARS-CoV-2 verwandtes CoV tragen und infiziert sind. [12] Rekombinationsereignisse zwischen der RBD von CoV aus Pangolinen und dem RaTG13-ähnlichen Rückgrat könnten SARS-CoV-2 als chimären Stamm erzeugt haben. Damit eine solche Rekombination auf natürliche Weise stattfinden kann, müssen die beiden Viren gleichzeitig dieselbe Zelle im selben Organismus infiziert haben. Dies ist angesichts der geringen Populationsdichte von Pangolinen und des geringen Vorhandenseins von CoVs in ihren natürlichen Populationen ein eher unwahrscheinliches Ereignis. ^x Darüber hinaus zeigten Rezeptorbindungsstudien von rekonstituiertem RaTG13, dass es nicht an Pangolin ACE2 bindet. ^{xi}

DIE FURIN CLEAVAGE-WEBSITE: DER WESENTLICHE UNTERSCHIED ZWISCHEN SARS-COV-2 UND SEINER NÄCHSTEN RELATIVEN RATG13

SARS-CoV-2 unterscheidet sich von seinem nächsten relativen RaTG13 durch einige Schlüsselmerkmale. Der auffälligste Unterschied ist der Erwerb einer durch ein Wirtszellenzym Furin aktivierten Spaltstelle im Spike-Protein von SARS-CoV-2, die zuvor in anderen Beta-CoVs der Linie b nicht identifiziert wurde [36] und der von Middle ähnlich ist Coronavirus des East Respiratory Syndroms (MERS). [35] Die Verarbeitung von Wirtspoteasen spielt eine zentrale Rolle als Spezies- und Gewebearriere, und das Engineering der Spaltstellen von CoV-Spike-Proteinen modifiziert den Virustropismus und die Virulenz. [37] Die allgegenwärtige Expression von Furin in verschiedenen Organen und Geweben hat SARS-CoV-2 die Fähigkeit verliehen, Organe zu infizieren, die normalerweise für andere CoVs unverwundbar sind, was zu einer systemischen Infektion des Körpers führt. [38] Zellkultiviertes SARS-CoV-2, dem die oben genannte Spaltstelle fehlte, verursachte bei infizierten Hamstern abgeschwächte Symptome. [39] Mutagenesestudien haben bestätigt, dass die polybasische Furinstelle für SARS-CoV-2 essentiell ist Fähigkeit, menschliche Lungenzellen zu infizieren. [40]

Die polybasische Furinstelle in SARS-CoV-2 wurde durch ein 12-Nucleotid-Insert TCCTCGGCGGGC erzeugt, das für eine PRRA-Aminosäuresequenz am S1 / S2-Übergang codiert (Abbildung 1). Interessanterweise werden die beiden gemeinsamen Arginine von zwei CGGCGG-Codons codiert, die für diese Viren selten sind: Nur 5% der Arginine werden von CGG in SARS-CoV-2 oder RaTG13 codiert, und CGGCGG im neuen Insert ist die einzige doppelte Instanz von diesem Codon in SARS-CoV-2. Das CGGCGG-Insert enthält eine *FauI*-Restriktionsstelle, von der es sechs Instanzen in SARS-CoV-2 und vier Instanzen in RaTG13 gibt (und zwei in MP789). Die serendipitöse Lage der *FauI*-Stelle könnte unter Verwendung von Restriktionsfragmentlängen - Polymorphismus (RFLP) Techniken erlaubt [41] für die Klonierung [42] oder Screening auf Mutationen, [43] da die neue Furinstelle *in vitro* zu Deletionen neigt. [39, 44]

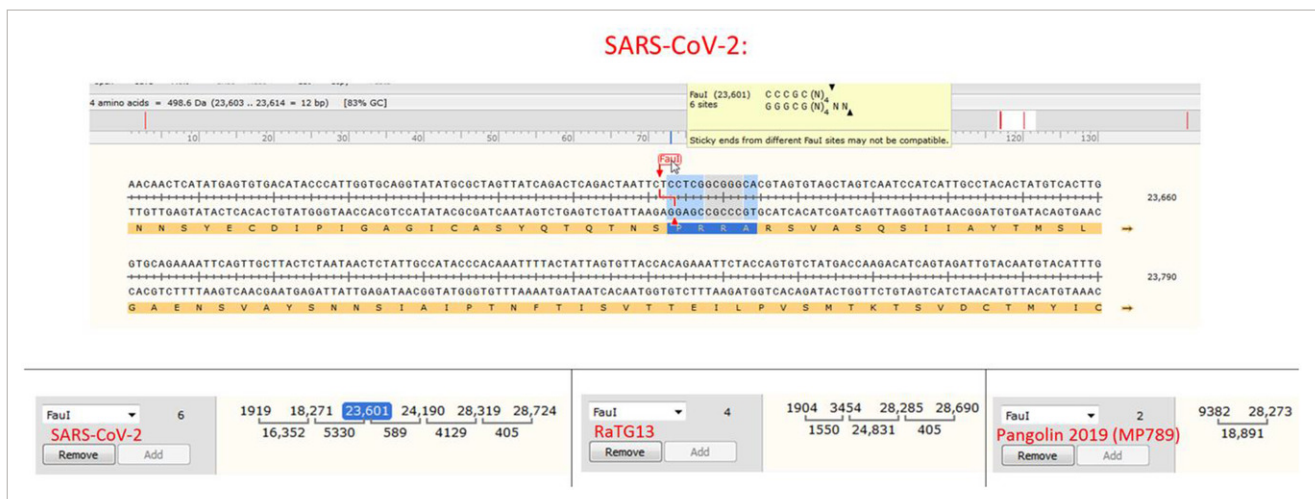


ABBILDUNG 1

[Im Figure Viewer öffnen](#) | [Power Point](#)

Nucleotid-Sequenz des S-Proteins an dem S1 / S2-Übergang in SARS-CoV-2 (NC04512.2) die die Furin-Spaltstelle darstellt (in blau), die eine beinhaltet *FauI* Enzymrestriktionsstelle

Eine Studie von Zhou et al. [45] berichteten über die Entdeckung eines neuen CoV-Stammes RmYN02, von dem die Autoren behaupten, dass er natürliche PAA-Aminosäure-Insertionen an der S1 / S2-Spaltstelle aufweist, an der SARS-CoV-2 die PRRA-Insertion aufweist. Bei genauer Untersuchung der zugrunde liegenden Nucleotidsequenz von RmYN02 im Vergleich zu seinen engsten Vorfahren bat-SL-CoVZC45 und bat-SL-CoVZXC21 sind jedoch keine Insertionen erkennbar, sondern nur Nucleotidmutationen (Abbildung 2).



FIGUR 2

[Im Figure Viewer öffnen](#) | [Power Point](#)

Ausrichtung von Nucleotid- und Aminosäuresequenzen des S-Proteins aus bat-SL-CoVZC45 (MG772933.1) und RmYN02 an der S1 / S2-Verbindungsstelle. Es können keine Insertionen von Nucleotiden beobachtet werden, die sich möglicherweise an einer Furin-Spaltstelle entwickeln (in blau).

Daher bleibt SARS-CoV-2 unter seinen Beta-CoV-Verwandten einzigartig, nicht nur aufgrund einer polybasischen Furinstelle an der S1 / S2-Verbindung, sondern auch aufgrund des PRRA mit vier Aminosäuren, das es erzeugt hat. Die Insertion bewirkt eine Spaltung des ursprünglichen Codons für Serin (TCA) in MP789 oder RaTG13, um einen Teil eines neuen Codons für Serin (TCT) und einen Teil der Aminosäure Alanin (GCA) in SARS-CoV-2 zu erhalten (Abbildung 3).

Pangolin MP789 (nt 23527):	G A G I C A S Y Q T Q T N S - - - - R S V S S X A I I
	ggt gca gga ata tgt gcc agt tat cag act caa act aat tca --- --- --- --- cgt agt gtt tca agt cna gct att att
RaTG13 (nt 23543):	G A G I C A S Y Q T Q T N S - - - - R S V A S Q S I I
	ggt gca gga ata tgc gcc agt tat cag act caa act aat tca --- --- --- --- cgt agt gtg gcc agt caa tct att att
SARS-CoV-2 (nt 23561):	G A G I C A S Y Q T Q T N S P R R A R S V A S Q S I I
	ggt gca ggt ata tgc gct agt tat cag act cag act aat tct cct cgg cgg gca cgt agt gta gct agt caa tcc atc att
	Black = common for all 3
	Red = unique to SARS-CoV-2
	Green = unique to RaTG13
	Blue = common difference of RaTG13 and SARS-CoV-2 from MP789

FIGUR 3

[Im Figure Viewer öffnen](#) | [Power Point](#)

Ausrichtung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des S-Proteins aus RaTG13 (MN996532), MP789 (MT084071) und SARS-CoV-2 (NC045512.2) an der S1 / S2-Stelle. Die gemeinsamen Nukleotide und Aminosäuren sind in Schwarz angegeben, SARS-CoV-2-eindeutige Nukleotide und Aminosäuren in Rot, RaTG13-eindeutige Nukleotide und Aminosäuren in Grün und gemeinsame Nukleotide und Aminosäuren in SARS-CoV-2 und RaTG13, die sich in MP789 unterscheiden in Blau. Das Codon-Forserin (TCA) in RaTG13 und MP789 wird in SARS-CoV-2 aufgeteilt, um einen Teil eines neuen Codon-Forserins (TCT) und einen Teil des Aminosäurealanins (GCA) zu erhalten.

Die Insertion der Furin-Spaltstelle in SARS-CoV-2 steht im Vergleich zu den Sequenzen MP789 und RaTG13 nicht im Rahmen des Restes der Sequenz (Abbildung 3). Daher kann ausgeschlossen werden, dass eine solche Insertion durch Polymeraseschlupfen oder durch Freisetzung und Reimbildung entstanden sein könnte, da durch diese Mechanismen erzeugte Insertionsmutationen postuliert wurden, um den Leserahmen der Virussequenz aufrechtzuerhalten. [46] Die Möglichkeit, dass die Furinspaltungsstelle durch Rekombination erworben worden sein könnte, wurde kürzlich von Seyran et al. In Frage gestellt. [47] weil dem SARS-CoV-2-Spike-Protein im Gegensatz zum Rekombinationsmodell anderer CoVs kein weiteres Rekombinationsereignis zu fehlen scheint.

KRITIK DES „PROXIMALEN URSPRUNGS VON SARS-COV-2“

Aufgrund des breiten Forschungsspektrums, das über fast 20 Jahre an SARS-CoVs von Fledermäusen durchgeführt wurde und durch deren Potenzial gerechtfertigt ist, vom Tier auf den Menschen überzugehen, [48] kann ein möglicher synthetischer Ursprung von SARS-CoV-2 durch Labortechnik nicht ausgeschlossen werden. Der vielzitierte Artikel von Andersen et al. [2] gaben an, dass SARS-CoV-2 höchstwahrscheinlich einen natürlichen Ursprung hat. Das Hauptargument der Autoren ist, dass die hochaffine Bindung des SARS-CoV-2-Spike-Proteins an hACE2 nicht durch Modelle vorhergesagt werden konnte, die auf der RBD von SARS-CoV basieren. Basierend auf der Strukturanalyse von Wan et al. [49] SARS-CoV-2 hat das Potenzial, hACE2 effizienter zu erkennen als das 2002 entstandene SARS-CoV. Darüber hinaus hat die Erzeugung von chimären CoV-Stämmen kürzlich gezeigt, dass Fledermaus-CoV-Spikes mit mehr Plastizität als zuvor vorhergesagt an den hACE2-Rezeptor binden können. [15] Alle Aminosäuren in der RBD wurden ausführlich analysiert, und es stehen neue Modelle zur Vorhersage der ACE2-Affinität zur Verfügung. [50] In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass BatCoV Rs3367 (99,9% Identität zu WIV1) vier von sechs kritischen Resten in der RBD mit SARS-CoV-2 teilt. In Anbetracht der Tatsache, dass gezeigt wurde, dass WIV1 direkt an hACE2 bindet, könnte die gleiche Annahme leicht für SARS-CoV-2-RBD gemacht worden sein. [51]

Wie oben beschrieben, wurde im Laufe der Jahre die Erzeugung von chimären Viren durchgeführt, um die potenzielle Pathogenität von Fledermaus-CoVs für den Menschen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang könnte SARS-CoV-2 durch Kombination eines RaTG13-ähnlichen Rückgrats mit der RBD von CoV ähnlich dem kürzlich aus Pangolinen isolierten synthetisiert worden sein [12], da letzteres durch eine höhere Affinität zum hACE2-Rezeptor gekennzeichnet ist. Diese Forschung hätte darauf abzielen können, Pangoline als mögliche Zwischenwirte für Fledermaus-CoV zu identifizieren, die möglicherweise für den Menschen pathogen sind. Eine nachfolgende serielle Zell- oder Tierpassage, wie von Sirotkin & Sirotkin [1] beschrieben, hätte die perfekte Anpassung der RBD an die hACE2 ermöglichen können.

In Bezug auf die Furinspaltungsstelle haben Andersen et al. [2] geben an, dass „die funktionelle Konsequenz der polybasischen Spaltstelle in SARS-CoV-2 unbekannt ist“. Neue Studien aus mehreren Gruppen haben kürzlich festgestellt, dass diese Aktivierungsstelle möglicherweise die effiziente Ausbreitung des Virus zwischen Menschen und den Angriff auf mehrere Organe ermöglicht. [52] Experimente zur proteolytischen Spaltung von CoV-Spike-Proteinen wurden kürzlich als zukünftige Schlüsselstudien vorgeschlagen, um die Übertragbarkeit von Viren in verschiedenen Wirten zu verstehen. [50]

Andersen et al. [2] geben auch an, basierend auf der Arbeit von Almazan et al. [53] dass "die genetischen Daten unwiderlegbar zeigen, dass SARS-CoV-2 nicht von einem zuvor verwendeten Virus-Backbone abgeleitet ist." In den letzten 6 Jahren vor dem Ausbruch von SARS-CoV-2 wurde die Anzahl potenzieller Fledermaus-Rückgrate unbestreitbar durch mehrere Fledermaus-CoV-Screenings erhöht, was nicht zuletzt RaTG13 im Januar 2020 wissenschaftlich bekannt machte. Andere mögliche Rückgrate könnten dies ebenfalls sein Warten Sie noch auf die Veröffentlichung.

Andersen et al. [2] bestätigen, dass "der Erwerb sowohl der polybasischen Spaltstelle als auch der vorhergesagten O-verknüpften Glykane auch gegen kulturbasierte Szenarien spricht". Verfahren zur Insertion einer polybasischen Spaltstelle bei infektiöser Bronchitis CoV sind in Cheng et al. [54] und führte zu einer erhöhten Pathogenität. In Bezug auf die vorhergesagten O-verknüpften Glykane um die neu eingefügte polybasische Stelle sollte beachtet werden, dass diese Vorhersage durch eine Cryo-EM-Untersuchung des SARS-CoV-2-Spike-Glykoproteins nicht bestätigt wurde. [55] Obwohl es wahr ist, dass O-verknüpfte Glykane bei der Immunselektion viel wahrscheinlicher auftreten, könnten sie durch ortsgerichtete Mutagenese im Labor hinzugefügt werden [56] oder im Verlauf von *In-vivo*-Experimenten auftreten, beispielsweise bei BLT-L-Mäusen mit menschlichen Lungenimplantaten und autologem menschlichem Immunsystem [57] oder bei Mäusen, die den hACE2-Rezeptor exprimieren. [31] Um die Probleme der Fledermaus-CoV-Isolierung zu überwinden, wurden Experimente durchgeführt, die auf der direkten Inokulation von Fledermaus-CoV bei säugenden Ratten beruhen. [58] Humanisierte Mäuse, Frettchen, Primaten und / oder andere Tiere mit ähnlicher ACE2-Konformation könnten alle für serielle Passageexperimente verwendet worden sein, wie von Sirotkin und Sirotkin ausführlich beschrieben. [1]

Andersen et al. [2] geben auch an, dass "die nachfolgende Erzeugung einer polybasischen Spaltstelle dann eine wiederholte Passage in Zellkultur oder Tieren mit ACE2-Rezeptoren ähnlich denen von Menschen erfordert hätte, aber solche Arbeiten wurden auch bisher nicht beschrieben." Es sollte nicht ausgeschlossen werden, dass solche Experimente aufgrund des SARS-CoV-2-Ausbruchs vor einer möglichen Veröffentlichung der Ergebnisse abgebrochen wurden oder dass die Ergebnisse niemals veröffentlicht werden sollten.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass RaTG13 und die Pangolin-CoV-Sequenzen von geschmuggelten Pangolinen, die im März 2019 in der GD-Provinz beschlagnahmt wurden und auf die sich die meisten veröffentlichten Artikel beziehen, die einen natürlichen Ursprung von SARS-CoV-2 belegen, [2] kürzlich in Frage gestellt wurden [hinsichtlich](#) der Genauigkeit ihrer Baugruppendaten ^{xii} und erfordern weitere Analysen, um ihre Richtigkeit zu beweisen. ^{xiii, xiv} Es sollte auch beachtet werden, dass *In-vitro*-Rezeptorbindungsstudien von rekonstituiertem RaTG13 einige besondere Ergebnisse erbrachten. ^{xij} Die überraschendste Beobachtung

war, dass RaTG13 im Gegensatz zu SARS-CoV-2 nicht in der Lage ist, ACE2 in *R. macrotis* zu binden. Fledermäuse, ein enger Verwandter von RaTG13s angeblichem Wirt *R. affinis* ^[59] (dessen ACE2-Rezeptor noch nicht getestet wurde). Gleichzeitig wurde beobachtet, dass RaTG13 hACE2 bindet ^[60], jedoch nicht so gut wie ACE2 von Ratten und Mäusen, an die SARS-CoV-2 überhaupt nicht bindet. Ist es möglich, dass RaTG13 genau wie SARS-MA15 ein mausangepasster SARS-Stamm ist, tatsächlich eine mausangepasste Version eines aus der Mojiang-Höhle extrahierten CoV und kein Stamm, der aus einem Fledermaus-Kotabstrich gewonnen wurde? Leider ist die RaTG13-Probe erschöpft und steht nicht mehr zur externen Untersuchung zur Verfügung ^[11]. Dies ist unglücklich angesichts einer Reihe von Inkonsistenzen bei der Sequenzierung der Rohdaten. Auch der Status und die Verfügbarkeit der Proben der Bergleute in Mojiang bleiben eine offene und hochrelevante Frage. Es wurden mehrere Proben von Bergleuten gesammelt ^[7, 8] und wahrscheinlich gelagert, und es wäre von großem Wert, sie auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2-ähnlichen CoVs zu testen.

Eine weitere offene Frage ist der Grund für die Änderung und anschließende Löschung der eigenen Virendatenbank von WIV. Im Mai 2020 berichteten mehrere Medien, dass das Änderungsverfolgungssystem der internen Datenbank von WIV zeigte, dass die Datenbank von „Datenbank für wild lebende Virenpathogene“ in „Datenbank für virale Krankheitserreger von Fledermäusen und Nagetieren“ umbenannt und ihre Beschreibung bearbeitet wurde. Fälle von „wildem Tier“ durch „Fledermaus und Nagetier“ zu ersetzen; Außerdem wurde die Erwähnung von „Arthropodenvektoren“ gestrichen. ^{xv} In der Datenbankbeschreibung wurde angegeben, dass mehr als 60 MB Daten im SQL-Format (Structured Query Language) enthalten waren. Ab Anfang Mai 2020 funktionierte der Download-Link jedoch nicht mehr. ^{xvi} Anschließend wurde die Datenbankseite vollständig entfernt, der Snapshot ist jedoch weiterhin im Webarchiv verfügbar. ^{xvii} Es ist möglich, dass andere internationale CoV-Labors das SQL-Archiv der WIV-Datenbank heruntergeladen haben, bevor es heruntergefahren wurde. In diesem Fall sollten solche Gruppen diese Daten öffentlich verfügbar machen.

WIE KÖNNTE DER VIRUS AUS EINEM LABOR ENTSTEHEN?

Das Austreten hochgefährlicher Krankheitserreger aus Laboratorien ist kein seltenes Ereignis, und in mehreren Ländern wurden Vorkommen dokumentiert. Das bemerkenswerteste bekannte Laborleck ist die H1N1-Laborflucht von 1977 aus China, die eine weltweite Pandemie auslöste. ^[61] Der jüngste ist der Ausbruch der Brucellose im November 2019, der in zwei Forschungszentren in Lanzhou, China, auftrat und über 100 Studenten und Mitarbeiter infizierte. ^[62] Es wurden auch mehrere Laborfluchten des ersten SARS-Virus gemeldet: im Sommer 2003 in Singapur, ^[63] dann im Dezember 2003 in Taiwan, ^{xviii} und im Frühjahr 2004 zweimal in China. ^{xix}

Die Beamten der US-Botschaft äußerten 2018 Bedenken hinsichtlich der Laborsicherheit von WIV, nachdem sie das Institut besucht und ein Interview mit Zhengli Shi geführt hatten. Die Laborprüfer fassten ihre Sorgen in nachfolgenden diplomatischen Kabeln nach Washington zusammen. ^{xx} Chinesische Experten haben auch Bedenken hinsichtlich der Laborsicherheit in ihrem eigenen Land geäußert und beklagt, dass „Laborabfälle künstliche Viren, Bakterien oder Mikroben enthalten können“ und dass „einige Forscher nach Experimenten ohne einen spezifischen biologischen Entsorgungsmechanismus Labormaterial in den Abwasserkanal einleiten.“ ^{xxi}

Amerikanische Labore hatten auch ihren Anteil an Sicherheitsproblemen. Vor kurzem wurden im August 2019 die Forschungsarbeiten in der Einrichtung des US-amerikanischen medizinischen Forschungsinstituts für Infektionskrankheiten (USAMRIID) der Biosicherheitsstufe (BSL) -4 in Fort Detrick unterbrochen, insbesondere im Zusammenhang mit der Entsorgung infektiöser Materialien. ^{xxii} Andere US-Labors wurden ebenfalls aus Sicherheitsgründen angeführt. ^{22]}

Es kann eine Reihe von Szenarien angenommen werden, die dazu führen, dass SARS-CoV-2 aus einem Labor austritt. Zum Beispiel könnte ein infiziertes Tier aus einem Labor entkommen sein oder einen Arbeiter zerkratzt oder gebissen haben (eine 2017 geäußerte Besorgnis über die Einrichtung einer BSL-4-Testanlage für Primatenimpfstoffe in Kunming, Yunnan ^[64]) oder ein Forscher hätte sich versehentlich mit Impfungen festhalten können (wie in zwei Fällen in Russland ^{xxiii}). Bis 2020 galten CoVs nicht als besonders tödlich oder virulent. SARS-ähnliche CoVs erforderten kein BSL-4 und konnten unter BSL-2- und BSL-3-Bedingungen ^[42] manipuliert werden, wodurch ein versehentliches Leck wahrscheinlicher wurde. Aerosolexperimente mit CoVs ^[65] Dies kann ebenfalls zu einem Leck im Labor führen, da ein Ausfall der verwendeten Geräte lange Zeit unbemerkt bleiben kann, bevor eine Infektion der Laboranten festgestellt wird. Schließlich könnte das Virus möglicherweise durch das Abwassersystem gelangt sein, wenn die ordnungsgemäße Entsorgung und / oder Dekontamination nicht befolgt worden wäre.

SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Auf der Grundlage unserer Analyse ist ein künstlicher Ursprung von SARS-CoV-2 keine grundlose Verschwörungstheorie, die verurteilt werden muss ^[66], und die Forscher haben die Verantwortung, alle möglichen Ursachen für die Entstehung von SARS-CoV-2 zu berücksichtigen. Die Insertion von menschlich angepasstem Pangolin-CoV-RBD, das durch serielle Passage von Zellen / Tieren und Furin-Spaltstelle erhalten wurde, könnte aus ortsgerichteten Mutageneseexperimenten im Rahmen von Evolutionsstudien oder der Entwicklung von Pan-CoV-Impfstoffen oder Arzneimitteln resultieren. Ein neuer Artikel in Nature ^[67] bestätigt, dass ein Laborursprung für SARS-CoV-2 nicht ausgeschlossen werden kann, da Forscher versehentlich infiziert worden sein könnten, und dass Funktionsgewinn-Experimente, die zu SARS-CoV-2 führten, an der WIV durchgeführt worden sein könnten. Die genetische Manipulation von SARS-CoV-2 wurde möglicherweise in jedem Labor der Welt mit Zugang zur Backbone-Sequenz und den erforderlichen Geräten durchgeführt und hinterließ keine Spuren. Moderne Technologien, die auf synthetischen Genetikplattformen basieren, ermöglichen die Rekonstruktion von Viren basierend auf ihrer Genomsequenz, ohne dass ein natürliches Isolat erforderlich ist. ^[68]

Eine gründliche Untersuchung der Stammsammlungen und Forschungsaufzeichnungen in allen an der CoV-Forschung beteiligten Labors vor dem Ausbruch von SARS-CoV-2 ist dringend erforderlich. Besondere Aufmerksamkeit sollte CoV-Stämmen gewidmet werden, die in Virologielabors erzeugt, aber noch nicht veröffentlicht wurden, wie sie möglicherweise in der gelöschten WIV-Datenbank beschrieben sind. Da die Suche nach einem möglichen natürlichen Wirt wie beim ersten SARS Jahre dauern kann ^[67] oder niemals erfolgreich sein kann, sollte der Untersuchung der natürlichen und labortechnischen Herkunft von SARS-CoV-2 die gleiche Priorität eingeräumt werden.

Xiao Qiang, ein Wissenschaftler in Berkeley, erklärte kürzlich: „Um genau zu verstehen, wie dieses Virus entstanden ist, ist es entscheidend, dies in Zukunft zu verhindern.“ ^[xxi]

Danksagung

Wir danken Prof. Allan Krill (NTNU) sehr für das Korrekturlesen des Manuskripts, all die wertvollen Kommentare und die Offenheit für kontroverse Hypothesen. Prof. Heribert Insam (Leiter der Abteilung Mikrobiologie; Universität Innsbruck) für seine Unterstützung und Dr. Lawrence Sellin für alle nützlichen Informationen. Ein besonderer Dank geht an Dr. Fernando Castro-Chavez (ehemaliger Post-Doc am New York Medical College) für seine Unterstützung bei Research Gate. Wir sind René Bergelt sehr dankbar, dass er die Datenbank entdeckt hat, die unsere Feststellung bestätigt hat, dass sich BtCoV4991 und RaTG13 auf dasselbe Beispiel beziehen. Schließlich sind wir den Mitgliedern der DRASTIC sehr dankbar (Dezentrales Team für radikale autonome Suche, das COVID-19 untersucht) Twitter-Gruppe für all ihre Arbeit bei der Aufdeckung vieler bisher unveröffentlichter Fakten über SARS-CoV-2 und seine relativen Stämme.

Insbesondere danken wir Luigi Warren für die kontinuierliche Prüfung des möglichen Zusammenhangs des Ausbruchs der Mojiang-Lungenentzündung 2012 mit WIV und SARS-CoV-2 sowie @ TheSeeker268 für die Suche nach bestätigten Abschlussarbeiten in chinesischer Sprache 2013 Xu MSc und 2016 Huang die SARS-ähnliche virale Natur des Mojiang-Lungenentzündungsausbruchs 2012 und haben die Rolle von WIV bei der Untersuchung dieses Ausbruchs aufgeklärt.^{xiv} einschließlich der WIV-Sammlung des 4991 / RaTG13-Stammes aus der Mojiang-Mine und an Francisco de Asis de Ribera Martin für die englische Übersetzung der beiden Thesen und die Entdeckung der RaTG13-Amplikondaten.

INTERESSENKONFLIKT

Rossana Segreto und Yuri Deigin haben keine Interessenkonflikte.

Offene Forschung

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

VERWEISE

- 1 Sirotkin, K., & Sirotkin, D. (2020). Might SARS-CoV-2 have arisen *via* serial passage through an animal host or cell culture? A potential explanation for much of the novel coronavirus' distinctive genome. *BioEssays*, **42**, 1- 7. <https://doi.org/10.1002/bies.202000091>
Web of Science® | Google Scholar

- 2 Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C., & Garry, R. F. (2020). The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.*, **26**, 450- 452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar

- 3 Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, **579**, 270- 273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar

- 4 Cagliani, R., Forni, D., Clerici, M., & Sironi, M. (2020). Computational inference of selection underlying the evolution of the novel coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J. Virol.*, **94**, 1- 11. <https://doi.org/10.1128/jvi.00411-20>
Web of Science® | Google Scholar

- 5 Ge, X. Y., Wang, N., Zhang, W., Hu, B., Li, B., Zhang, Y. Z., ... Shi, Z. L. (2016). Coexistence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Viol. Sin.*, **31**, 31- 40. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3713-9>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar

- 6 Wu, Z., Yang, L., Yang, F., Ren, X., Jiang, J., Dong, J., ... Jin, Q. (2014). Novel henipa-like virus, mojiang paramyxovirus, in rats, China, 2012. *Emerg. Infect. Dis.*, **20**, 1064- 1066. <https://doi.org/10.3201/eid2006.131022>
Crossref | PubMed | Web of Science® | Google Scholar

- 7 Xu, L. (2013). The analysis of 6 patients with severe pneumonia caused by unknown viruses (Master's Thesis). Kunming Medical University, Emergency Medicine (professional degree). <http://eng.oversea.cnki.net/Kcms/detail/detail.aspx?filename=1013327523.nh&dbcode=CMFD&dbname=CMFD2014>
Google Scholar

- 8 Huang, C. (2016). Novel virus discovery in bat and the exploration of receptor of bat coronavirus HKU9 (PhD Thesis). Chinese Center for Disease Control and Prevention. <http://eng.oversea.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CDFD&dbname=CDFDLAST2018&filename=1017118517.nh>
Google Scholar

- 9 Wang, N., Luo, C., Liu, H., Yang, X., Hu, B., Zhang, W., ... Shi, Z. (2019). Characterization of a new member of alphacoronavirus with unique genomic features in *Rhinolophus* bats. *Viruses*, **11**(4), 379. <https://doi.org/10.3390/v11040379>
Crossref | CAS | Google Scholar

- 10 Chen, L., Liu, W., Zhang, Q., Xu, K., Ye, G., Wu, W., ... Liu, Y. (2020). RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerg. Microbes Infect.*, **9**, 313- 319. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1725399>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar

- 11 Cohen, J. (2020). Wuhan coronavirus hunter Shi Zhengli speaks out. *Science*, **369**, 487- 488. <https://doi.org/10.1126/science.369.6503.487>
CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar

- 12 Liu, P., Chen, W., & Chen, J. P. (2019). Viral metagenomics revealed sendai virus and coronavirus infection of malayan pangolins (*Manis javanica*). *Viruses*, **11**(11), 979. <https://doi.org/10.3390/v11110979>
Crossref | CAS | Google Scholar

- 13 Bianchi, M., Benvenuto, D., Giovanetti, M., Angeletti, S., Ciccozzi, M., & Pascarella, S. (2020). Sars-CoV-2 envelope and membrane proteins: Structural differences linked to virus characteristics? *Biomed. Res. Int.*, **2020**. <https://doi.org/10.1155/2020/4389089>
Web of Science® | Google Scholar

- 14 Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: Current knowledge. *Virol. J.*, **16**, 1- 22. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar

- 15 Hu, B., Zeng, L. P., Yang, X., Lou, Ge, X. Y., Zhang, W., Li, B., ... Shi, Z. L. (2017). Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.*, **13**, 1-27. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698>
CAS | Web of Science® | Google Scholar
- 16 Fan, Y., Zhao, K., Shi, Z. L., & Zhou, P. (2019). Bat coronaviruses in China. *Viruses*, **11**(3), 210-. <https://doi.org/10.3390/v11030210>
Crossref | CAS | Google Scholar
- 17 Ge, X. Y., Li, J. L., Yang, X., Lou, Chmura, A. A., Zhu, G., Epstein, J. H., ... Shi, Z. L. (2013). Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*, **503**, 535- 538. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 18 Graham, R. L., & Baric, R. S. (2010). Recombination, reservoirs, and the modular spike: Mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.*, **84**, 3134- 3146. <https://doi.org/10.1128/jvi.01394-09>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 19 Menachery, V. D., Yount, B. L., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L. E., Plante, J. A., ... Baric, R. S. (2015). A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.*, **21**, 1508- 1513. <https://doi.org/10.1038/nm.3985>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 20 Johnson, B. A., Graham, R. L., & Menachery, V. D. (2018). Viral metagenomics, protein structure, and reverse genetics: Key strategies for investigating coronaviruses. *Virology*, **517**, 30- 37. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.12.009>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 21 Racaniello, V. (2016). Moving beyond metagenomics to find the next pandemic virus. *PNAS*, **113**, 2812- 2814. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601512113> .
CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 22 Weiss, S., Yitzhaki, S., & Shapira, S. C. (2015). Lessons to be learned from recent biosafety incidents in the United States. *Isr. Med. Assoc. J.*, **17**, 269- 273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601512113>
PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 23 Casadevall, A., & Imperiale, M. J. (2014). Risks and benefits of gain-of-function experiments with pathogens of pandemic potential, such as influenza virus: A call for a science-based discussion. *MBio*, **5**, 1- 5. <https://doi.org/10.1128/mBio.01730-14>
Crossref | Web of Science® | Google Scholar
- 24 Agostini, M. L., Andres, E. L., Sims, A. C., Graham, R. L., Sheahan, T. P., Lu, X., ... Denison, M. R. (2018). Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exonuclease. *MBio*, **9**, 1- 15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00221-18>
Crossref | Web of Science® | Google Scholar
- 25 Xia, S., Liu, M., Wang, C., Xu, W., Lan, Q., Feng, S., ... Lu, L. (2020). Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res.*, **30**, 343- 355. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0305-x>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 26 Totura, A. L., & Bavari, S. (2019). Broad-spectrum coronavirus antiviral drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, **14**, 397- 412. <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1581171>
Crossref | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 27 Wang, Y., Sun, Y., Wu, A., Xu, S., Pan, R., Zeng, C., ... Guo, D. (2015). Coronavirus nsp10/nsp16 Methyltransferase can be targeted by nsp10-derived peptide in vitro and in vivo to reduce replication and pathogenesis. *J. Virol.*, **89**, 8416- 8427. <https://doi.org/10.1128/jvi.00948-15>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 28 Kuo, L., Godeke, G. J., Raamsman, M. J. B., Masters, P. S., & Rottier, P. J. M. (2000). Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: Crossing the host cell species barrier. *J. Virol.*, **74**, 1393- 1406. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.3.1393-1406.2000>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 29 Maier, H. J., Bickerton, E., & Britton, P. (2015). *Coronaviruses – Methods and protocols*. London: Humana Press.
Google Scholar
- 30 Becker, M. M., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Rockx, B., Sims, A. C., Sheahan, T., ... Denison, M. R. (2008). Synthetic recombinant bat SARS-like coronavirus is infectious in cultured cells and in mice. *PNAS*, **105**, 19944- 19949. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808116105>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 31 Menachery, V. D., Yount, B. L., Sims, A. C., Debbink, K., Agnihothram, S. S., Gralinski, L. E., ... Baric, R. S. (2016). SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *PNAS*, **113**, 3048- 3053. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517719113>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 32 Li, X., Zai, J., Zhao, Q., Nie, Q., Li, Y., Foley, B. T., & Chaillon, A. (2020). Evolutionary history, potential intermediate animal host, and cross-species analyses of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.*, **92**, 602- 611. <https://doi.org/10.1002/jmv.25731>
Wiley Online Library | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 33 Lam, T. T. Y., Jia, N., Zhang, Y. W., Shum, M. H. H., Jiang, J. F., Zhu, H. C., ... Cao, W. C. (2020). Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*, **583**, 282- 285. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
- 34 Xiao, K., Zhai, J., Feng, Y., Zhou, N., Zhang, X., Zou, J. J., ... Shen, Y. (2020). Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature*, **583**, 286- 289. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2313-x>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar

- 35 Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. (2020). Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Curr. Biol.*, **30**, 1346- 1351.E2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 36 Coutard, B., Valle, C., de Lamballerie, X., Canard, B., Seidah, N. G., & Decroly, E. (2020). The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antivir. Res.*, **176**, 104742. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 37 Letko, M., Marzi, A., & Munster, V. (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.*, **5**, 562- 569. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0688-y>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 38 Wang, Q., Qiu, Y., Li, J. Y., Zhou, Z. J., Liao, C. H., & Ge, X. Y. (2020). A unique protease cleavage site predicted in the spike protein of the novel pneumonia coronavirus (2019-nCoV) potentially related to viral transmissibility. *Virolog. Sin.*, **35**, 337- 339. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00212-7>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 39 Lau, S., Wang, P., Mok, B. W., Zhang, A. J., Chu, H., Lee, A. C., ... Chen, H. (2020). Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the S1 / S2 junction. *Emerg. Microbes Infect.*, **9**, 837- 842. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1756700>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 40 Hoffmann, M., & Kleine-Weber, H. (2020). A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol. Cell.*, **78**, 779- 784.E5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.022>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 41 Kaundun, S. S., Marchegiani, E., Hutchings, S. J., & Baker, K. (2019). Derived polymorphic amplified cleaved sequence (dPACS): A novel PCR-RFLP procedure for detecting known single nucleotide and deletion – insertion polymorphisms. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**(13), 3193. <https://doi.org/10.3390/ijms20133193>
Crossref | CAS | Web of Science® | Google Scholar
-
- 42 Zeng, L. P., Gao, Y. T., Ge, X. Y., Zhang, Q., Peng, C., Yang, X. L., ... Shi, Z. L. (2016). Bat severe acute respiratory syndrome-like coronavirus WIV1 encodes an extra accessory protein, ORFX, involved in modulation. *J. Virol.*, **90**, 6573- 6582. <https://doi.org/10.1128/JVI.03079-15>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 43 Khan, S. G., Muniz-Medina, V., Shahlavi, T., Baker, C. C., Inui, H., Ueda, T., ... Kraemer, K. H. (2002). The human XPC DNA repair gene: Arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3624- 3631. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC134237/> .
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 44 Liu, Z., Zheng, H., Lin, H., Li, M., Yuan, R., Peng, J., ... Lu, J. (2020). Identification of common deletions in the spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *J. Virol.*, **94**, e00790- 20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00790-20>
CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 45 Zhou, H., Chen, X., Hu, T., Li, J., Song, H., Liu, Y., ... Shi, W. (2020). A Novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Curr. Biol.*, **30**, 2196- 2203.E3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.023>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 46 Steinhauer, D. A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, **258**, 1- 20. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9716>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 47 Seyran, M., Pizzol, D., Adadi, P., El-Aziz, T. M. A., Hassan, S. S., Soares, A., ... Brufsky, A. M. (2020). Questions concerning the proximal origin of SARS-CoV-2. *J. Med. Virol.*, **03**. <https://doi.org/10.1002/jmv.26478>
PubMed | Google Scholar
-
- 48 Wang, L. F., & Anderson, D. E. (2019). Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. *Curr. Opin. Virol.*, **34**, 79- 89. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.12.007>
Crossref | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 49 Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S., & Li, F. (2020). Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.*, **94**(7), 1- 9. <https://doi.org/10.1128/jvi.00127-20>
Web of Science® | Google Scholar
-
- 50 Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, **17**, 181- 192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 51 Fraguas Bringas, C., & Booth, D. (2020). Identification of a SARS-like bat coronavirus that shares structural features with the spike glycoprotein receptor-binding domain of SARS-CoV-2. *Access Microbiol.*, **10**- 17. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000166> .
Google Scholar
-
- 52 Mallapati, S. (2020). Why does the coronavirus spread so easily between people? *Nature*, **579**, 183. <https://www.nature.com/articles/d41586-020-00660-x> .
Google Scholar
-
- 53 Almazán, F., Sola, I., Zuñiga, S., Marquez-Jurado, S., Morales, L., Becares, M., & Enjuanes, L. (2014). Coronavirus reverse genetic systems: Infectious clones and replicons. *Virus Res.*, **189**, 262- 270. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.05.026>
Crossref | CAS | PubMed | Web of Science® | Google Scholar
-
- 54 Cheng, J., Zhao, Y., Xu, G., Zhang, K., Jia, W., Sun, Y., ... Zhang, G. (2019). The S2 subunit of QX-type infectious bronchitis coronavirus spike protein is an essential determinant of neurotropism. *Viruses*, **11**(10), 972. <https://doi.org/10.3390/v11100972>
CAS | Google Scholar

- 55 Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O., ... McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, **367**, 1260-1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
[Crossref](#) | [CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)
- 56 Du, L., Tai, W., Yang, Y., Zhao, G., Zhu, Q., Sun, S., ... Li, F. (2016). Introduction of neutralizing immunogenicity index to the rational design of MERS coronavirus subunit vaccines. *Nat. Commun.*, **7**, 1-9. <https://doi.org/10.1038/ncomms13473>
[Crossref](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)
- 57 Wahl, A., De, C., Abad Fernandez, M., Lenarcic, E. M., Xu, Y., Cockrell, A. S., ... Garcia, J. V. (2019). Precision mouse models with expanded tropism for human pathogens. *Nat. Biotechnol.*, **37**, 1163-1173. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0225-9>
[Crossref](#) | [CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)
- 58 Hu, D., Zhu, C., Ai, L., He, T., Wang, Y., Ye, F., ... Wang, C. (2018). Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerg. Microbes Infect.*, **7**, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0155-5>
[Crossref](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)
- 59 Hron, T., Farkašová, H., Gifford, R. J., Benda, P., Hulva, P., Görföl, T., ... Elleder, D. (2018). Remnants of an ancient deltaretrovirus in the genomes of horseshoe bats (Rhinolophidae). *Viruses*, **10**(4), 185-. <https://doi.org/10.3390/v10040185>
[Crossref](#) | [Google Scholar](#)
- 60 Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., ... Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, **581**, 221-224. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
[Crossref](#) | [CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)
- 61 Wertheim, J. O. (2010). The re-emergence of H1N1 influenza virus in 1977: A cautionary tale for estimating divergence times using biologically unrealistic sampling dates. *PLoS ONE*, **5**, 2-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011184>
[Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)
- 62 Cyranoski, D. (2019). Chinese institutes investigate pathogen outbreaks in lab workers. *Nature*, <https://www.nature.com/articles/d41586-019-03863-z>
[Google Scholar](#)
- 63 Lim, P. L., Kurup, A., Gopalakrishna, G., Chan, K. P., Wong, C. W., & Leo, Y. S. (2004). Laboratory-acquired severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **350**, 1740-1745. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032565>
[Crossref](#) | [CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)
- 64 Cyranoski D. (2017). Inside the Chinese lab poised to study world's most dangerous pathogens. *Nature*, **542**, 399-401 <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21487>
[CAS](#) | [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
- 65 Totura, A., Livingston, V., Frick, O., Dyer, D., Nichols, D., & Nalca, A. (2020). Small particle aerosol exposure of African Green Monkeys to MERS-CoV as a model for highly pathogenic coronavirus infection. *Emerg. Infect. Dis.*, **26**. <https://doi.org/10.3201/eid2612.201664> .
[Google Scholar](#)
- 66 Calisher, C., Carroll, D., Colwell, R., Corley, R. B., Daszak, P., Drosten, C., ... Turner, M. (2019). Statement in support of the scientists, public health professionals, and medical professionals of China combatting COVID-19. *The Lancet*, **395**, E42- E43. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30418-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30418-9)
[PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)
- 67 Cyranoski, D. (2020). The biggest mystery: What it will take to trace the coronavirus source. *Nature*, <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01541-z> .
[Google Scholar](#)
- 68 Thao, T. T. N., Labrousseau, F., Ebert, N., V'kovski, P., Stalder, H., Portmann, J., ... Thiel, V. (2020). Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature*, **582**, 561-565. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2294-9>
[PubMed](#) | [Google Scholar](#)

[PDF Herunterladen](#)

Über die Wiley Online Library

Datenschutz-Bestimmungen
 Nutzungsbedingungen
 Kekse
 Barrierefreiheit

Hilfe Unterstützung

Kontaktiere uns

Chancen

Abonnenten

Werbetreibende & Unternehmenspartner

Verbinde dich mit Wiley

Das Wiley-Netzwerk
 Wiley Presserraum

