

Wenn Sie auf dieser Seite weitersurfen, stimmen Sie der Verwendung von Cookies zu, wie in unserer [Cookie-Richtlinie](#) beschrieben. [×](#)

Wiley Online Library

 BioEssays

PROBLEME & PARADIGMEN
Offener Zugang

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

Die chimäre Struktur von SARS-COV-2 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>

Zitate: [6](#)

Für diese Arbeit wurde keine externe Finanzierung erhalten.
Rossana Segreto und Yuri Deigin haben gleichermaßen zu dieser Studie beigetragen.

SEKTIONEN



PDF

WERKZEUGE

AKTIE

Abstrakt

Die Herkunft des schweren akuten respiratorischen Syndroms - Coronavirus (SARS-CoV)-2 ist immer noch umstritten. Genomanalysen zeigen, dass es sich bei SARS-CoV-2 wahrscheinlich um ein chimäres Virus handelt, dessen Sequenz dem Fledermaus-CoV RaTG13 am nächsten kommt, während seine Rezeptorbindungsdomäne (RBD) fast identisch mit der eines Schuppentier-CoV ist. Chimäre Viren können *durch* natürliche Rekombination oder menschliche Eingriffe entstehen. Die Furin-Spaltstelle im Spike-Protein von SARS-CoV-2 verleiht dem Virus die Fähigkeit, Spezies- und Gewebesbarrieren zu überwinden, war aber bisher in anderen SARS-ähnlichen CoVs nicht zu finden. Könnten genetische Manipulationen vorgenommen worden sein, um Pangoline als mögliche Zwischenwirte für von Fledermäusen abgeleitete CoVs zu evaluieren, die ursprünglich nicht in der Lage waren, an menschliche Rezeptoren zu binden? Sowohl die Spaltstelle als auch die spezifische RBD könnten durch ortsgerichtete Mutagenese entstanden sein, ein Verfahren, das keine Spuren hinterlässt. In Anbetracht der verheerenden Auswirkungen von SARS-CoV-2 und der Wichtigkeit, zukünftige Pandemien zu verhindern, haben Forscher die Verantwortung, eine gründliche Analyse aller möglichen Ursprünge von SARS-CoV-2 durchzuführen.

EINLEITUNG

Seit dem Ausbruch des schweren akuten respiratorischen Syndroms - Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in Wuhan, China, ist fast ein Jahr vergangen, und der Ursprung ist immer noch umstritten. Trotz der internationalen Forschungsanstrengungen konnte ein natürlicher Wirt, entweder direkt oder als Zwischenwirt, noch nicht identifiziert werden. Die Hypothese, dass der Wuhan Huanan Seafood Wholesale Market die erste Quelle für die Übertragung des Virus vom Tier auf den Menschen war, wurde inzwischen endgültig verworfen und die wenigen Marktproben, die gesammelt wurden, zeigten nur an den Menschen angepasstes SARS-CoV-2, ohne Spuren von zoonotischen Vorgängerstämmen. Fast alle bisher veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten behaupten, 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 die 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 bei anderen CoVs derselben Gruppe fehlt, und (2) eine Rezeptorbindungsdomäne (RBD), die für die Bindung an menschliche Zellen optimiert ist^[2], das Ergebnis von Labormanipulationstechniken wie der ortsgerichteten Mutagenese sein könnten. Der Erwerb beider einzigartigen Merkmale durch SARS-CoV-2 mehr oder weniger gleichzeitig ist weniger wahrscheinlich natürlich oder nur durch serielle Passage von Zellen/Tieren verursacht.

SARS-COV-2'S ENGSTE VERWANDTE SIND FLEDERMAUS- UND SCHUPPENTIER-CORONAVIREN

Zhou et al. ^[3] vom Wuhan Institute of Virology (WIV) waren die ersten, die ein neues Coronavirus (CoV), SARS-CoV-2, identifizierten und charakterisierten. Die genomischen Sequenzen, die aus frühen Fällen gewonnen wurden, hatten eine 79%ige Sequenzidentität mit den CoVs, die 2002-2003 das schwere akute respiratorische Syndrom (SARS-CoV) verursachten, und eine 96,2%ige Sequenzidentität mit RaTG13 (MN996532),

einer CoV-Sequenz, die bei einer *Rhinolophus affinis*-Fledermaus nachgewiesen wurde. RaTG13 ist derzeit der nächste gefundene phylogenetische Verwandte von SARS-CoV-2,^[4] aber seine vollständige genomische Sequenz wurde nicht vor dem Ausbruch von SARS-CoV-2 veröffentlicht und die ursprüngliche Probe wurde 2013 von derselben Gruppe von WIV-Forschern in der Provinz Yunnan (China) gesammelt. 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 vollständig, die sie RaTG13 nannten.

Wir entdeckten, dass das RdRp von RaTG13 eine 100%ige Nukleotididentität mit der Sequenz BtCoV/4991 (KP876546) aufweist, die von Ge et al. ^[5] in einer *Rhinolophus affinis*-Fledermaus in der Provinz Yunnan im Jahr 2013 identifiziert wurde, demselben Ort und Jahr wie RaTG13. BtCoV/4991 wurde in einer von Fledermäusen besiedelten Mine bei Tongguanzen, Mojiang, Yunnan, gesammelt. Die WIV-Forscher wurden eingeladen, das Bergwerk zu untersuchen, nachdem sechs Bergleute dort im Jahr 2012ⁱⁱⁱ an einer schweren Lungenentzündung erkrankt waren und drei der Bergleute gestorben sind. ^[6] Die Bergleute waren mit der Beseitigung von Fledermauskot in der Mine beauftragt worden, und der Schweregrad ihrer Lungenentzündung korrelierte mit der Dauer der Exposition in der Mine. ^[7] Die Proben von vier Bergleuten wurden anschließend am WIV getestet, wo in allen Proben Immunglobulin G (IgG) Antikörper gegen SARS nachgewiesen wurden. ^[8] Wenn man bedenkt, dass während des SARS-Ausbruchs 2002-2004 nur etwa 5300 Menschen auf dem chinesischen Festland infiziert waren, von denen die meisten in Guangdong wohnten, ist die Wahrscheinlichkeit, dass vier Bergleute in Yunnan Antikörper vom SARS-Ausbruch 2002-2004 behalten haben, verschwindend gering. 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 sich deutlich von allen zu diesem Zeitpunkt bekannten alpha- und beta-CoVs abgrenzte. Auch in der phylogenetischen Analyse von Wang et al. aus dem Jahr 2019 unterschied sich BtCoV/4991 von anderen Fledermaus-CoVs.^[9] Chen et al. ^[10] identifizierten BtCoV/4991 als die nächstgelegene Sequenz zu SARS-CoV-2, da RaTG13 zu diesem Zeitpunkt noch nicht veröffentlicht war. BtCoV/4991 und RaTG13 wurden später als zwei verschiedene kodierende Namen desselben Stammes behauptet, da ihre ursprünglichen Autoren am WIV die beiden Stämme als einen Eintrag in der Database of Bat-associated Viruses (DBatVir) registrierten. [iv](#)

Ende Juli 2020 behauptete Zhengli Shi, der führende CoV-Forscher der 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 und nicht erst nach dem SARS-CoV-2-Ausbruch durchgeführt wurde, wie in Zhou et al. ^[3] Die Kehrtwende in der Haltung der 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 von der WIV am 19. Mai 2020v hinterlegten Rohsequenzierungs-Reads darauf hindeuten scheinen, dass die Sequenzierung für RaTG13 in den Jahren 2017 und 2018

durchgeführt wurde. [vi Es](#) ist jedoch noch kein formelles Erratum über das Jahr der Sequenzierung und die Umbenennung der Proben von den Autoren von Zhou et al. ^[2] erschienen bzw. wurde, soweit derzeit bekannt, eingereicht.

Die zweite nicht-menschliche RdRp-Sequenz, die BtCoV/4991 am nächsten kommt (91,89 % Nukleotid-Identität), ist die CoV-Sequenz MP789 (MT084071), die 2019 in einem Schuppentier (*Manis javanica*) aus der Provinz Guangdong (GD), China, isoliert wurde. ^[12] Das Hüllprotein von MP789 zeigt überraschenderweise 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-Isolaten (z.B. YP_009724392). ^[13] Das Hüllprotein von CoVs ist an kritischen Aspekten des viralen Lebenszyklus beteiligt, wie z. B. dem viralen Eintritt, der Replikation und der Pathogenese. ^[14]

FLEDERMAUS-COVs WURDEN GRÜNDLICH UNTERSUCHT UND GENETISCH MANIPULIERT

Viele Studien haben berichtet, dass Fledermäuse natürliche Reservoirs für eine große Vielfalt an potenziell pathogenen SARS-ähnlichen CoVs sind. ^{15, 16]} Einige dieser Viren können potenziell direkt Menschen infizieren^[17], während andere ihr Spike-Protein mutieren müssen, um effektiv an den menschlichen Angiotensin-1-Converting-Enzyme-2 (hACE2)-Rezeptor zu binden und den Viruseintritt zu vermitteln. ^{18]} Um das Emergenzpotenzial neuartiger CoVs zu bewerten, haben Forscher eine Reihe chimärer CoVs geschaffen, die aus Fledermaus-CoV-Rückgraten bestehen, die normalerweise nicht in der Lage sind, menschliche Zellen zu infizieren, und deren Spike-Proteine durch solche von CoVs ersetzt wurden, die mit menschlichem ACE2 kompatibel sind. Diese Chimären sollten Rekombinationsereignisse simulieren, die in der Natur vorkommen könnten. ^{19, 20]} Solche gain-of-function-Experimente haben eine Reihe von Bedenken hinsichtlich der biologischen Sicherheit aufgeworfen und Kontroversen unter Forschern und in der Öffentlichkeit ausgelöst. Eines der Hauptargumente für Gain-of-Function-Studien ist die Notwendigkeit, mit einem Arsenal an Medikamenten und Impfstoffen für die nächste Pandemie gerüstet zu sein. ^[21] Im Gegensatz dazu ist eines der Hauptargumente gegen sie, dass die nächste Pandemie selbst durch diese Experimente verursacht werden könnte, aufgrund des Risikos eines Laborausbruchs. ^[22, 23]

In den letzten Jahren hatte sich das Feld der Koronavirologie auf Pan-CoV-Therapien und -Impfstoffe konzentriert, wie aus den Forschungsarbeiten der letzten 5 Jahre^[24-27] sowie aus Medienberichten hervorgeht. [vii](#) Die synthetische Generierung diverser Panels potenzieller präemergenter CoVs wurde zu einem erklärten Ziel aktiver Förderungen der EcoHealth Alliance, die einige solcher Forschungen am WIV in Zusammenarbeit mit Labors in den USA und anderen internationalen Partnern finanzierte. [viii](#)

DIE HERSTELLUNG VON CHIMÄREN COVS MIT NEUARTIGEN RBDS IST SEIT JAHRZEHNEN IM GANGE

Forscher haben schon seit über zwei Jahrzehnten chimäre CoVs erzeugt, lange vor dem Aufkommen moderner Sequenzierungs- oder Gentechnik-Techniken. Zum Beispiel verwendete eine Gruppe der Universität Utrecht 1999 gezielte RNA-Rekombination, um eine "Katze-und-Maus"-CoV-Chimäre zu erzeugen: Die RBDs eines Katzen- und eines Maus-CoVs wurden vertauscht, und es konnte gezeigt werden, dass dieser Austausch auch den Spezies-Tropismus während *in vitro*-Experimenten vertauscht. ^[28]

Im Jahr 2007 erstellte die Shi-Gruppe am WIV eine Reihe von "Fledermaus-Mensch" CoV chimären Spike-Proteinen, während sie versuchte zu bestimmen, was genau CoVs die Fähigkeit verleiht, von einer Spezies zur anderen zu springen. Die Forscher verwendeten verschiedene Segmente des Spike-Proteins des menschlichen SARS-Virus, um entsprechende Segmente im Spike-Protein eines Fledermaus-Virus-Rückgrats zu ersetzen. Sie kamen zu dem Schluss, dass eine relativ kurze Region (aa 310 bis 518) des Spike-Proteins "notwendig und ausreichend war, um Rp3-S in ein huACE2-bindendes Molekül umzuwandeln" ²⁹-d. h. das Fledermaus-CoV-Spike-Protein mit einer neuartigen Fähigkeit zur Bindung an einen menschlichen ACE2-Rezeptor auszustatten.

Im Jahr 2008 ging die Baric-Gruppe an der University of North Carolina (UNC) bei der WIV-Forschung noch einen Schritt weiter: Anstatt humane Immunschwächereviren (HIV) Pseudoviren mit Fledermaus-CoV-Spike-Proteinen zu verwenden, wurde ein lebendes chimäres CoV geschaffen. In Anlehnung an die Experimente ihrer WIV-Kollegen von 2007 verwendete die Baric-Gruppe ein Fledermaus-SARS-ähnliches CoV als Backbone und ersetzte dessen RBD durch die RBD von humanem SARS. ^[30]

Im Jahr 2015 schlossen sich die Gruppen Shi und Baric zusammen und veröffentlichten die wohl berühmteste Gain-of-Function-Virologie-Arbeit, in der die Schaffung eines weiteren synthetischen chimären Virus beschrieben wurde. Diesmal wurde die RBD eines an die Maus angepassten SARS-Backbones (SARS-MA15) durch die RBD von RsSHC014 ersetzt, einem Fledermausstamm, der zuvor 2011 von der Shi-Gruppe aus Yunnan-Fledermäusen isoliert wurde. Im Jahr 2016 wiederholte die Baric-Gruppe ihr Experiment von 2015 unter Verwendung desselben SARS-MA15-Backbones und der RBD von Rs3367, ^[31] einem nahen Verwandten von RsSHC014, der ebenfalls zuvor in Yunnan von WIV gefunden und nach der Lebendkultivierung in "WIV1" umbenannt wurde. ^[17]

Die wahrscheinlich größte Anzahl neuartiger chimärer Viren wurde 2017 in einer Arbeit der Shi-Gruppe am WIV beschrieben, ^[15] in der die Autoren berichteten, dass sie acht chimäre Viren unter Verwendung von WIV1 als Grundgerüst und durch Transplantation verschiedener RBDs von

Fledermaus-SARS-ähnlichen Viren erzeugten. Diese Viren wurden über einen Zeitraum von 5 Jahren aus der gleichen Höhle in der Nähe von Kunming, Provinz Yunnan, gesammelt, in der die Gruppe Shi ursprünglich Rs3367 und RsSHC014 gefunden hatte. Nur zwei der acht lebenden chimären Viren konnten erfolgreich gerettet werden, und bei diesen beiden Stämmen wurde festgestellt, dass sie die Fähigkeit besitzen, an den menschlichen ACE2-Rezeptor zu binden, wie durch Experimente in hACE2-exprimierenden HeLa-Zellen und RT-PCR-Quantifizierung der viralen RNA bestätigt wurde.

SARS-COV-2 TEILT SEIN RBD MIT EINEM PANGOLIN COV

Die Möglichkeit, dass Pangoline der Zwischenwirt für SARS-CoV-2 sein könnten, wird schon lange diskutiert. ^[32-34] Die größte Divergenz zwischen SARS-CoV-2 und RaTG13 wird in der RBD ihrer Spike-Proteine beobachtet. Obwohl seine Gesamtgenom-Ähnlichkeit zu SARS-CoV-2 geringer ist als die von RaTG13, hat der aus GD-Schuppentieren isolierte MP789-Stamm ein fast identisches RBD zu dem von SARS-CoV-2. Tatsächlich 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 ACE2-Sequenzähnlichkeit ist zwischen Menschen und Schuppentieren höher als zwischen Menschen und Fledermäusen. Interessanterweise hat das Spike-Protein von SARS-CoV-2 eine höhere vorhergesagte Bindungsaffinität zum menschlichen ACE2-Rezeptor als zu dem von Schuppentieren und Fledermäusen. ix Vor dem Ausbruch von SARS-CoV-2 waren Schuppentiere die einzigen Säugetiere außer Fledermäusen, bei denen eine Infektion mit dem mit SARS-CoV-2 verwandten CoV nachgewiesen wurde. ^[12] Rekombinationsereignisse zwischen der RBD von CoV aus Schuppentieren und dem RaTG13-ähnlichen Rückgrat könnten SARS-CoV-2 als chimären Stamm hervorgebracht haben. Damit eine solche Rekombination auf natürliche Weise stattfinden kann, müssen die beiden Viren die gleiche Zelle im gleichen Organismus gleichzeitig infiziert haben, ein eher unwahrscheinliches Ereignis, wenn man die geringe Populationsdichte von Schuppentieren und das seltene Vorkommen von CoVs in ihren natürlichen Populationen bedenkt. x Darüber hinaus zeigten Rezeptorbindungsstudien von rekonstituiertem RaTG13, dass es nicht an ACE2 von Schuppentieren bindet. xi

DIE FURIN-SPALTSTELLE: DER ENTSCHEIDENDE UNTERSCHIED ZWISCHEN SARS-COV-2 UND SEINEM NÄCHSTEN VERWANDTEN RATG13

SARS-CoV-2 unterscheidet sich von seinem engsten Verwandten RaTG13 durch einige Schlüsselmerkmale. Der auffälligste Unterschied ist der Erwerb einer Spaltstelle im Spike-Protein von SARS-CoV-2, die durch ein Wirtszellenenzym Furin aktiviert wird, das zuvor in anderen beta-CoVs der Linie b nicht identifiziert wurde ^[36] und der des Coronavirus des Middle East Respiratory Syndrome (MERS) ähnelt. ^[35] Die Verarbeitung von

Wirtsproteasen 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 ubiquitäre 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 im Körper führt. [38] Zellkultiviertes SARS-CoV-2, dem die oben erwähnte Spaltstelle fehlte, verursachte bei infizierten Hamstern abgeschwächte Symptome, [39] und Mutagenesestudien haben bestätigt, dass die polybasische Furinstelle essentiell für die Fähigkeit von SARS-CoV-2's ist, menschliche Lungenzellen zu infizieren. [40]

Die polybasische Furinstelle in SARS-CoV-2 wurde durch ein 12-Nukleotid-Insert TCCTCGGCGGGC geschaffen, das für eine PRRA-Aminosäuresequenz an der S1/S2-Verbindung kodiert (Abbildung 1). Interessanterweise werden die beiden gemeinsamen Arginine durch zwei CGGCGG-Codons kodiert, was für diese Viren selten ist: Nur 5 % der Arginine werden in SARS-CoV-2 oder RaTG13 durch CGG kodiert, und CGGCGG im neuen Insert ist die einzige doppelte Instanz dieses Codons in SARS-CoV-2. Das CGGCGG-Insert enthält eine *Faul*-Restriktionsstelle, von der es sechs Instanzen in SARS-CoV-2 und vier Instanzen in RaTG13 (und zwei in MP789) gibt. Die zufällige Lage der *Faul*-Stelle könnte die Verwendung von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP)-Techniken [41] zum Klonen [42] oder Screening auf Mutationen [43] ermöglichen, da die neue Furin-Stelle *in vitro* zu Deletionen neigt. [39, 44]

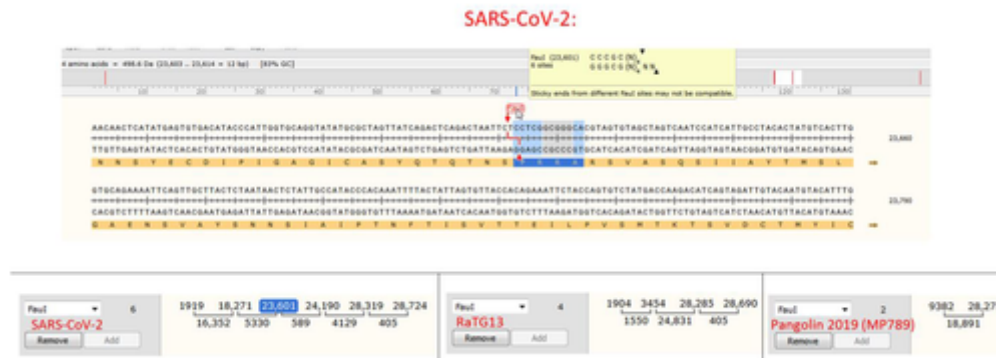


ABBILDUNG 1
[Im Bildbetrachter öffnen](#) PowerPoint

Nukleotidsequenz des S-Proteins an der S1/S2-Kreuzung in SARS-CoV-2 (NC045512.2), die die Furin-Spaltstelle (in blau) zeigt, die eine Restriktionsstelle des Enzyms *Faul* enthält

Eine Studie von Zhou et al. [45] berichtete über die Entdeckung eines neuen CoV-Stammes RmYN02, der nach Angaben der Autoren natürliche PAA-Aminosäure-Insertionen an der S1/S2-Spaltstelle aufweist, wo SARS-CoV-2 die PRRA-Insertion hat. Bei näherer Betrachtung der zugrundeliegenden

Nukleotidsequenz von RmYN02 im Vergleich zu seinen nächsten Vorfahren bat-SL-CoVZC45 und bat-SL-CoVZXC21 sind jedoch keine Insertionen zu erkennen, sondern nur Nukleotidmutationen (Abbildung 2).



ABBILDUNG 2
[Im Bildbetrachter öffnen PowerPoint](#)

Alignment von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des S-Proteins aus Fledermaus-SL-CoVZC45 (MG772933.1) und RmYN02 an der S1/S2-Kreuzungsstelle. Es sind keine Insertionen von Nukleotiden zu erkennen, die sich möglicherweise in einer Furin-Spaltstelle entwickeln (in blau)

Daher bleibt SARS-CoV-2 unter seinen beta-CoV-Verwandten nicht nur aufgrund einer polybasischen Furinstelle an der S1/S2-Kreuzung einzigartig, sondern auch aufgrund der vier Aminosäuren umfassenden Insertion PRRA, die es geschaffen 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).

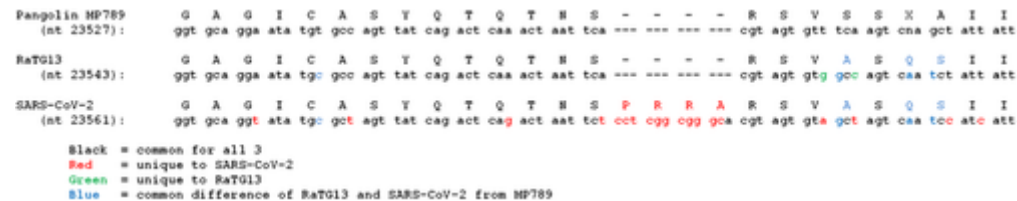


ABBILDUNG 3
[Im Bildbetrachter öffnen PowerPoint](#)

Alignment 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, die einzigartigen Nukleotide und Aminosäuren von SARS-CoV-2 in rot, die einzigartigen Nukleotide und Aminosäuren von RaTG13 in grün und die gemeinsamen Nukleotide und Aminosäuren von SARS-CoV-2 und RaTG13, die sich von MP789 unterscheiden, in blau. Das Codon Forserin (TCA) in RaTG13 und MP789 wird in SARS-CoV-2 aufgespalten, um einen Teil eines neuen Codons Forserin (TCT) und einen Teil der Aminosäure Alanin (GCA) zu erhalten

Die Insertion der Furin-Spaltstelle in SARS-CoV-2 befindet sich im Vergleich zu den Sequenzen MP789 und RaTG13 nicht im Leseraster mit dem Rest der Sequenz (Abbildung 3). Daher kann ausgeschlossen werden, dass diese Insertion durch Polymerase-Slippage oder durch Freisetzung und Reiming entstanden sein könnte, da durch diese Mechanismen erzeugte Insertionsmutationen postuliert wurden, um das Leseraster der viralen Sequenz zu erhalten.^{46]} Die Möglichkeit, dass die Furin-Spaltstelle durch Rekombination erworben worden sein könnte, wurde kürzlich von Seyran et

al. in Frage gestellt,^[47] da das SARS-CoV-2-Spike-Protein im Gegensatz zum Rekombinationsmodell anderer CoVs kein weiteres Rekombinationsereignis zu enthalten scheint.

KRITIK AN "DEM PROXIMALEN URSPRUNG VON SARS-COV-2"

Aufgrund des breiten Spektrums der seit fast 20 Jahren durchgeführten Forschungen zu Fledermaus-SARS-CoVs, die mit ihrem Potenzial zum Übergreifen vom Tier auf den Menschen begründet werden,^[48] kann ein möglicher synthetischer Ursprung durch Labortechnik von SARS-CoV-2 nicht ausgeschlossen werden. Der viel zitierte Artikel von Andersen et al. ^[2] stellt fest, 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 durch Modelle, die auf der RBD von SARS-CoV basieren, nicht vorhergesagt werden konnte. Basierend auf der von Wan et al. durchgeführten Strukturanalyse^[49] hat SARS-CoV-2 das Potenzial, hACE2 effizienter zu erkennen als das 2002 entstandene SARS-CoV. Darüber hinaus hat die Generierung von chimären CoV-Stämmen kürzlich gezeigt, dass Fledermaus-CoV-Spikes mit größerer Plastizität an den hACE2-Rezeptor binden können als bisher vorhergesagt. ^[5] Alle Aminosäuren in der RBD wurden ausgiebig analysiert und neue Modelle zur Vorhersage der ACE2-Affinität sind verfügbar. ^[50] In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass BatCoV Rs3367 (99,9 % Identität mit WIV1) vier von sechs kritischen Resten in der RBD mit SARS-CoV-2 gemeinsam hat. In Anbetracht der Tatsache, dass für WIV1 gezeigt wurde, dass es direkt an hACE2 bindet, hätte die gleiche Annahme auch für die RBD von SARS-CoV-2 getroffen werden können. ^[51]

Wie oben beschrieben, wurden im Laufe der Jahre chimäre Viren geschaffen, um die mögliche Pathogenität von Fledermaus-CoVs für den Menschen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang hätte SARS-CoV-2 synthetisiert werden können, indem man ein RaTG13 ähnliches Rückgrat mit der RBD von CoV kombiniert hätte, die derjenigen ähnelt, die kürzlich aus Schuppentieren isoliert wurde^[12], da letztere durch eine höhere Affinität zum hACE2-Rezeptor gekennzeichnet ist. Diese Untersuchungen hätten darauf abzielen können, Schuppentiere als mögliche Zwischenwirte für das für den Menschen potentiell pathogene Fledermaus-CoV zu identifizieren. Eine anschließende serielle Zell- oder Tierpassage, wie von Sirotkin & Sirotkin [1] beschrieben, hätte die perfekte Adaption des RBD an den hACE2 liefern können.

Bezüglich der Furin-Spaltstelle stellen Andersen et al. ^[2] fest, dass "die funktionelle Konsequenz der polybasischen Spaltstelle in SARS-CoV-2 unbekannt ist." Neue Studien von mehreren Gruppen haben in letzter Zeit diese Aktivierungsstelle als eine Möglichkeit identifiziert, die es dem Virus ermöglicht, sich effizient zwischen Menschen zu verbreiten und mehrere Organe anzugreifen. ^[52] Experimente zur proteolytischen Spaltung von CoV-Spike-Proteinen wurden kürzlich als zukünftige Schlüsselstudien vorgeschlagen, um die Übertragbarkeit des Virus in verschiedenen Wirten zu verstehen. ^[50]

Auch Andersen et al. [2] stellen in Anlehnung an die Arbeit von Almazan et al. [53] fest, dass "die genetischen Daten unwiderlegbar zeigen, dass SARS-CoV-2 von keinem bisher verwendeten Virusrückgrat abstammt." In den letzten 6 Jahren vor dem Ausbruch von SARS-CoV-2 hat sich die Zahl der möglichen Fledermaus-Rückgrate durch mehrere Fledermaus-CoV-Screenings unbestreitbar erhöht, nicht zuletzt durch RaTG13, das im Januar 2020 die wissenschaftliche Aufmerksamkeit auf sich zog. Weitere mögliche Backbones könnten ebenfalls noch auf eine Veröffentlichung warten.

Andersen et al. [2] bekräftigen, dass "der Erwerb sowohl der polybasischen Spaltstelle als auch der vorhergesagten O-gebundenen Glykane auch gegen kulturbasierte Szenarien spricht." Die Methoden zur Einfügung einer polybasischen Spaltstelle in das CoV der infektiösen Bronchitis sind in Cheng et al. [54] beschrieben und führten zu einer erhöhten Pathogenität. Bezüglich der vorhergesagten O-verknüpften Glykane um die neu eingefügte polybasische Stelle ist anzumerken, dass diese Vorhersage durch eine Cryo-EM-Untersuchung des SARS-CoV-2-Spike-Glykoproteins nicht bestätigt wurde. [55] Nichtsdestotrotz ist es zwar richtig, dass O-verknüpfte Glykane viel wahrscheinlicher unter Immunselektion entstehen, sie könnten aber auch im Labor durch ortsgerichtete Mutagenese [56] hinzugefügt werden oder im Verlauf von In-vivo-Experimenten entstehen, z. B. in BLT-L-Mäusen mit menschlichen Lungenimplantaten und autologem menschlichen Immunsystem [57] oder in Mäusen, die den hACE2-Rezeptor exprimieren. [31] Um die Probleme der Isolierung von Fledermaus-CoV zu überwinden, wurden Experimente durchgeführt, die auf der direkten Inokulation von Fledermaus-CoV in Saugratten basieren. [58] Humanisierte Mäuse, Frettchen, Primaten und/oder andere Tiere mit ähnlicher ACE2-Konformation konnten alle für serielle Passageexperimente verwendet werden, wie von Sirotkin und Sirotkin ausführlich beschrieben. [4]

Andersen et al. [2] stellen außerdem fest, dass "die anschließende Generierung einer polybasischen Spaltstelle dann eine wiederholte Passage in Zellkultur oder Tieren mit ACE2-Rezeptoren ähnlich denen des Menschen erfordert hätte, aber auch solche Arbeiten sind bisher nicht beschrieben worden." Es ist nicht auszuschließen, dass solche Experimente aufgrund des SARS-CoV-2-Ausbruchs vor einer möglichen Veröffentlichung der Ergebnisse abgebrochen wurden oder dass die Ergebnisse nie zur Veröffentlichung vorgesehen waren.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass RaTG13 und die Schuppentier-CoV-Sequenzen von geschmuggelten Schuppentieren, die im März 2019 in der Provinz GD beschlagnahmt wurden und auf die sich die meisten veröffentlichten Arbeiten, die einen natürlichen Ursprung von SARS-CoV-2 unterstützen, beziehen, [2] kürzlich hinsichtlich der Genauigkeit ihrer Assemblierungsdaten in Frage gestellt wurden und weitere Analysen erfordern, um ihre Korrektheit zu beweisen. [xiii, xiv] Es sollte auch angemerkt werden, dass *in vitro* Rezeptorbindungsstudien von rekonstituiertem RaTG13 einige merkwürdige Ergebnisse lieferten. Die überraschendste Beobachtung war, dass RaTG13, anders als SARS-CoV-2, nicht in der Lage ist, ACE2 in Fledermäusen von *R. macrotis* zu binden, einem nahen Verwandten des angeblichen Wirts von RaTG13, *R. affinis* [59] (dessen ACE2-Rezeptor noch nicht getestet wurde). Gleichzeitig wurde beobachtet, dass RaTG13 hACE2 [60] bindet, allerdings nicht so gut wie ACE2 von Ratten und Mäusen, an das SARS-CoV-2 überhaupt nicht bindet. Ist es möglich, dass, so wie SARS-Ma15 ein an die Maus angepasster SARS-Stamm war, RaTG13

tatsächlich eine an die Maus angepasste Version eines CoV ist, das aus der Mojiang-Höhle extrahiert wurde, und nicht ein Stamm, der aus einem Fledermauskotabstrich gewonnen wurde? Leider ist die RaTG13-Probe erschöpft und steht nicht mehr für externe Untersuchungen zur Verfügung,^[11] was angesichts einer Reihe von Ungereimtheiten in den Sequenzier-Rohdaten bedauerlich ist. Auch der Status und die Verfügbarkeit der Proben der Mojiang-Bergleute bleibt eine offene und höchst relevante Frage. Mehrere Proben der Bergleute wurden 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 WIV-eigenen Virusdatenbank. Im Mai 2020 berichteten mehrere Medien, dass das Änderungsverfolgungssystem der internen Datenbank der WIV zeigte, dass die Datenbank von "Wildtier-übertragene virale Erregerdatenbank" in "Fledermaus- und Nagetier-übertragene virale Erregerdatenbank" umbenannt wurde und ihre Beschreibung bearbeitet wurde, um Instanzen von "Wildtier" durch "Fledermaus und Nagetier" zu ersetzen; außerdem wurde die Erwähnung von "Arthropoden-Vektoren" gelöscht. [xv](#) Die Beschreibung der Datenbank gab an, dass sie über 60 MB Daten im SQL-Format (Structured Query Language) enthielt, aber Anfang Mai 2020 funktionierte der Download-Link nicht mehr. [xvi](#) Anschließend wurde die Datenbank-Seite in ihrer Gesamtheit entfernt, aber ihr Schnappschuss ist immer noch im Webarchiv verfügbar. [xvii](#) Es ist möglich, dass andere internationale CoV-Labore das SQL-Archiv der WIV-Datenbank heruntergeladen haben, bevor es entfernt wurde; in diesem Fall sollten diese Gruppen diese Daten öffentlich zugänglich machen.

WIE KONNTE DAS VIRUS AUS EINEM LABOR ENTKOMMEN?

Der Austritt von hochgefährlichen Krankheitserregern aus Laboren ist kein seltenes Ereignis und Vorkommnisse sind in mehreren Ländern dokumentiert worden. Das bemerkenswerteste bekannte Laborleck ist der H1N1-Laborausbruch von 1977 aus China, der eine weltweite Pandemie auslöste. ^[61] Der jüngste Fall ist der Ausbruch von Brucellose im November 2019, der in zwei Forschungszentren in Lanzhou, China, auftrat und über 100 Studenten und Mitarbeiter infizierte. ^[62] Es wurden auch mehrere Laborausbrüche 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](#)

Bedenken über die Laborsicherheit des WIV wurden 2018 von Beamten der US-Botschaft geäußert, nachdem sie das Institut besucht und ein Gespräch mit Zhengli Shi geführt hatten. Die Labor-Auditoren fassten ihre Sorgen in anschließenden diplomatischen Kabeln nach Washington zusammen. [xx](#) Chinesische Experten haben auch Bedenken über die Laborsicherheit in ihrem eigenen Land geäußert und beklagt, dass "Laborabfälle künstliche Viren, Bakterien oder Mikroben enthalten können" und dass "einige Forscher Labormaterialien nach Experimenten in die Kanalisation entsorgen, ohne einen speziellen biologischen Entsorgungsmechanismus zu haben". [xxi](#)

Auch amerikanische Labore haben ihren Anteil an Sicherheitsproblemen gehabt. Kürzlich wurde der Forschungsbetrieb in der Einrichtung der Biosicherheitsstufe (BSL)-4 des United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID) in Fort Detrick im August 2019 aufgrund von Sicherheitsverstößen, insbesondere im Zusammenhang mit der Entsorgung von infektiösem Material, unterbrochen. [xxii Auch](#) andere US-Labore wurden wegen Sicherheitsproblemen zitiert. ²²¹

Es kann eine Reihe von Szenarien angenommen werden, die zu einem Austritt von SARS-CoV-2 aus einem Labor führen. Zum Beispiel könnte ein infiziertes Tier aus einem Labor entkommen sein oder es könnte einen Mitarbeiter gekratzt oder gebissen haben (eine Sorge, die 2017 im Zusammenhang mit der Einrichtung einer BSL-4-Primatenimpfstoff-Testanlage in Kunming, Yunnan, geäußert wurde⁶⁴¹), oder ein Forscher könnte sich versehentlich mit dem Impfstoff gestochen haben (wie in zwei Fällen in Russland^{xxiii} geschehen). Bis 2020 galten CoVs nicht als besonders tödlich oder virulent. SARS-ähnliche CoVs erforderten nicht BSL-4 und konnten unter BSL-2- und BSL-3-Bedingungen⁴²¹ manipuliert werden, was ein versehentliches Austreten wahrscheinlicher machte. Aerosol-Experimente mit CoVs⁶⁵¹ könnten ebenfalls zu einem Leck im Labor führen, da ein Versagen der verwendeten Geräte lange Zeit unbemerkt bleiben könnte, bevor eine Infektion von Laborarbeitern entdeckt wird. Schließlich könnte das Virus möglicherweise durch das Abwassersystem ausgetreten sein, wenn keine ordnungsgemäße Abfallentsorgung und/oder Dekontaminationsverfahren eingehalten wurden.

SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Auf der Grundlage unserer Analyse ist ein künstlicher Ursprung von SARS-CoV-2 keine haltlose Verschwörungstheorie, die zu verurteilen ist⁶⁶¹ und Forscher haben die Verantwortung, alle möglichen Ursachen für die Entstehung von SARS-CoV-2 in Betracht zu ziehen. Die Einfügung der an den Menschen angepassten Schuppentier-CoV-RBD, die durch serielle Passage von Zellen/Tieren und Furin-Spaltstelle erhalten wurde, könnte aus ortsgerichteten Mutagenese-Experimenten, im Rahmen von Evolutionsstudien oder der Entwicklung von Pan-CoV-Impfstoffen oder Medikamenten stammen. Ein aktueller Artikel in Nature⁶⁷¹ bestätigt, dass ein Laborursprung für SARS-CoV-2 nicht ausgeschlossen werden kann, da Forscher versehentlich infiziert worden sein könnten, und dass Gain-of-Function-Experimente, die zu SARS-CoV-2 führten, am WIV durchgeführt worden sein könnten. Die genetische Manipulation von SARS-CoV-2 hätte in jedem Labor auf der Welt mit Zugang zur Backbone-Sequenz und der notwendigen Ausrüstung durchgeführt werden können und würde keine Spuren hinterlassen. Moderne Technologien, die auf Plattformen der synthetischen Genetik basieren, ermöglichen die Rekonstruktion von Viren auf der Grundlage ihrer Genomsequenz, ohne dass ein natürliches Isolat benötigt wird.

⁶⁸¹

Eine gründliche Untersuchung der Stammsammlungen und Forschungsaufzeichnungen in allen Laboren, die vor dem Ausbruch von SARS-CoV-2 an der CoV-Forschung beteiligt waren, ist dringend erforderlich. Besonderes Augenmerk sollte auf CoV-Stämme gelegt werden, die in virologischen Laboren generiert, aber noch nicht veröffentlicht wurden, wie die möglicherweise in der gelöschten WIV-Datenbank beschriebenen. Da die Suche nach einem möglichen natürlichen Wirt Jahre dauern könnte, wie beim ersten SARS,^[67] oder nie gelingen wird, sollte der Untersuchung natürlicher und labortechnischer Ursprünge von SARS-CoV-2 gleiche Priorität eingeräumt werden.

Xiao Qiang, ein Forscher in Berkeley, erklärte kürzlich: "Genau zu verstehen, wie dieses Virus entstanden ist, ist ein entscheidendes Wissen, um dies in Zukunft zu verhindern."^[xxi]

DANKSAGUNGEN

Wir sind Prof. Allan Krill (NTNU) sehr dankbar für das Korrekturlesen des Manuskripts, alle wertvollen Kommentare und die Aufgeschlossenheit gegenüber kontroversen Hypothesen; Prof. Heribert Insam (Leiter des Departments für 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 mit Research Gate. Wir sind René Bergelt sehr dankbar, dass er die Datenbank entdeckt hat, die unsere Feststellung bestätigte, dass sich BtCoV4991 und RaTG13 auf die gleiche Probe beziehen. Schließlich sind wir den Mitgliedern der D.R.A.S.T.I.C.-Gruppe (Decentralised Radical Autonomous Search Team Investigating COVID-19) auf Twitter sehr dankbar für ihre Arbeit bei der Aufdeckung vieler bisher unveröffentlichter Fakten über SARS-CoV-2 und seine verwandten Stämme. Insbesondere danken wir Luigi Warren für die kontinuierliche Untersuchung des möglichen Zusammenhangs des Mojiang-Pneumonie-Ausbruchs von 2012 mit WIV und SARS-CoV-2, @TheSeeker268 für das Auffinden von chinesischsprachigen 2013 Xu MSc und 2016 Huang PhD-Thesen, die die SARS-ähnliche virale Natur des Mojiang-Pneumonie-Ausbruchs von 2012 bestätigt und die Rolle der WIV bei der Untersuchung dieses Ausbruchs aufgeklärt haben,^{xxiv} einschließlich der Sammlung des 4991/RaTG13-Stammes durch die WIV aus der Mojiang-Mine, und an Francisco de Asis de Ribera Martin für die Bereitstellung der englischen Übersetzung der beiden Thesen und die Entdeckung der RaTG13-Amplikondaten.

INTERESSENKONFLIKT

Rossana Segreto und Yuri Deigin haben keine Interessenkonflikte.

Forschung öffnen

REFERENZEN

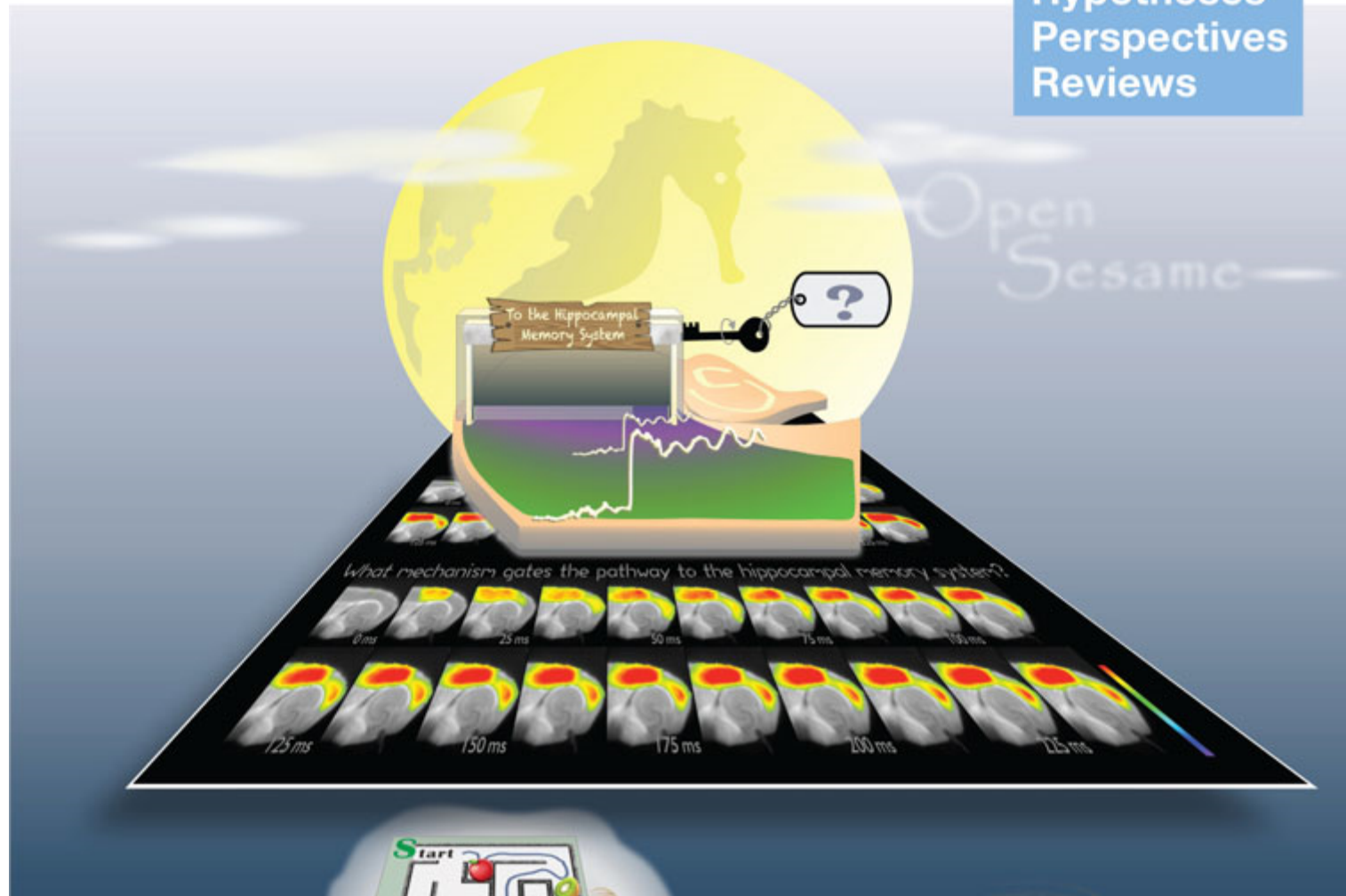
Literatur zitieren

BioEssays

Ideas that Push the Boundaries

3/21

Hypotheses
Perspectives
Reviews



Jahrgang43, Ausgabe3

März 2021

2000240

**Zitierangaben
beta**

•

Unterstützen

0

•

Erwähnung von

11

•

Kontrastierend

0

Erkunden Sie die Zitierangaben dieses Artikels auf scite.ai

[angetrieben durch](#)

•

Abbildungen

•
Referenzen

•
Zugehörig

•
Informationen

Metriken

Zitate:6

Details

© 2020 Die Autoren. *BioEssays* veröffentlicht von Wiley Periodicals LLC

Dies ist ein Open-Access-Artikel unter den Bedingungen der Creative-Commons-Attributionslizenz, die die Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium erlaubt, sofern das Originalwerk ordnungsgemäß zitiert wird.

Stichwörter

[BtCov/4991](#)

[Furin-Spaltstelle](#)

[Gain-of-function-Studien](#)

[Schuppentier CoV](#)

[RaTG13](#)

[Rezeptorbindungsdomäne](#)

[SARS-CoV-2](#)

Geschichte der Veröffentlichung

Ausgabe Online:19. Februar 2021

Version der Aufzeichnung online:17. November 2020

Manuskript angenommen:22. Oktober 2020

Manuskript überarbeitet:16. Oktober 2020

Manuskript erhalten:02 September 2020

[PDF herunterladen](#)

[Zurück](#)

Zusätzliche Links

Über Wiley Online Bibliothek

- [Datenschutzrichtlinie](#)
- [Nutzungsbedingungen](#)
- [Cookies](#)
- [Erreichbarkeit](#)

Hilfe & Unterstützung

- [Kontakt](#)
- [Schulung und Support](#)
- [DMCA & Raubkopien melden](#)

Möglichkeiten

- [Abonnement-Agenten](#)
- [Werbekunden & Unternehmenspartner](#)

Mit Wiley verbinden

- [Das Wiley-Netzwerk](#)
- [Wiley-Presseraum](#)

Copyright © 1999-2021 [John Wiley & Sons, Inc.](#) Alle Rechte vorbehalten

WILEY