

SARS-CoV-2'nin Orjini

Origin of SARS-CoV-2

 Bülent ÇAKAL^a

^aİstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Tıbbi Genetik ABD, İstanbul, TÜRKİYE

ÖZET Şiddetli akut solunum sendromu ilişkili bir coronavirüsün (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus; SARS-CoV-2) etiyolojik etkeni olduğu coronavirüs hastalığı 19 (coronavirus disease 19; COVID-19) pandemisi mevcut ve olası sonuçları açısından tüm dünyayı etkisi altına almıştır. SARS-CoV-2 21. yüzyılın başından beri reseptör bağlanma ve proteoliz gibi kritik tür bariyerlerini aşarak salgınlara neden olabilen üçüncü coronavirüstür. Coronavirüslerin yüksek sıklıkta mutasyon ve homolog RNA rekombinasyon kabiliyetleri yeni viral genotiplerin oluşmasına yeni çevrelere adaptasyon sağlama ve doku tropizmlerinin değişmesine imkan sağlayabilmektedir. İnsan SARS-CoV-2 ve yarası coronavirüs sekansları arasındaki yüksek benzerlik nedeniyle SARS-CoV-2'nin doğadaki rezarvarının yarasalar olduğu kabul edilmektedir. Buna karşın, SARS-CoV-2'nin yarasalardan insana bulaşında rol olan bir ara konağın varlığı ya da olası moleküler mekanizmalar henüz tanımlanmamıştır. Diğer yandan özellikle SARS-CoV-2'nin RaTG13'den farklı olarak viral spike proteinini kodlayan genomda bir polibazik (furin) kesim alanı içeren insersiyon içerme ve reseptör ACE-2'ye bağlanma afinitesinde artış dikkat çekici olarak yorumlanmaktadır. Dolayısıyla, SARS-CoV-2'nin yarasadan insana bulaşma mekanizmaları henüz net olarak tanımlanmadığından, virüsün kökeni hakkında bazı tartışmalar devam etmektedir. Bu derlemede SARS-CoV-2'nin orjinine ilişkin bilimsel verilerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

ABSTRACT The Coronavirus disease 19 (COVID-19) pandemic which is the etiological agent of severe acute respiratory syndrome-associated a coronavirus (SARS-CoV-2) has influenced the whole world with the current and possible results. SARS-CoV-2 is the third coronavirus causing outbreaks by overcome critical species barriers such as receptor binding and proteolysis since the beginning of the 21st century. Capabilities of coronaviruses high frequency mutation and homologous RNA recombination can support that is formation of new viral genotypes, adapt to new environments, change tissue tropisms. It is considered that reservoir in natural of SARS-CoV-2 is bats because between sequence of human SARS-CoV-2 and bat coronavirus RaTG13 is similar at high level. However, existence of an intermediate host that plays a role in the transmission of SARS-CoV-2. However from bats to human or possible molecular mechanisms have not been identified yet. On the other hand, It is interpreted as remarkable that unlike RaTG13, especially SARS-CoV-2 contains a polybasic (furin) cleavage site insertion in genome encoding viral spike protein and increased affinity of binding to receptor ACE-2. Therefore, there is some of discussions continues about origin of the virus because mechanisms of bat-to-human transmission of SARS-CoV-2 has not been clearly identified yet. In this review, it is aimed to examination scientific data about the origin of SARS-CoV-2.

Anahtar Kelimeler: Coronavirus; SARS-CoV-2; COVID-19; orjin; doğal seleksiyon

Keywords: Coronavirus; SARS-CoV-2; COVID-19; origin; natural selection

Coronavirüsler vertabralıların sitopatik, zarflı, pozitif polariteli, tek zincirli, RNA virüsleridir.¹ Uluslararası virüs taksonomi komitesi coronavirüs çalışma grubu tarafından COVID-19'un etiyolojik etkeni olarak kabul edilen SARS-CoV-2'nin (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus) *Betacoronavirüs* cinsi ve *Sarbecovirus* alt cinsi içerisinde şiddetli akut solunum sendromu ilişkili coronavirüs türü olarak adlandırılması önerilmiştir.²

Uygun deney hayvanı modelleri bulunmadığı için klasik Koch postulatları ya da Fredricks ve Relman'ın modifasyon kriterleri uyarınca, SARS-CoV-2 ile COVID-19 arasındaki hastalık ve etiyolojik etken ilişkisi henüz tam olarak konfirme edilememiştir, şimdiye kadar sadece virüsün spesifik deneyler ile hastalardan izolasyonu konak hücrede kültürü ve pasajı yapılan izolatların sekans analizleri gerçekleştirilebilmiştir, buna karşın hACE2 (İnsan anjiyotensin

Correspondence: Bülent ÇAKAL

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Tıbbi Genetik ABD, İstanbul, TÜRKİYE/TURKEY

E-mail: bulentcikal@yahoo.com



Peer review under responsibility of Turkiye Klinikleri Journal of Medical Ethics, Law and History.

Received: 13 May 2020 **Accepted:** 18 May 2020 **Available online:** 19 May 2020

2146-8982 / Copyright © 2020 by Türkiye Klinikleri. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

dönüştürücü enzim-2; Human angiotensin-converting enzyme 2) eksprese eden transgenik farelerde bu ilişki tam olarak konfirme edilebildiği rapor edilmiştir.³⁻⁶

Şimdiye kadar yapılan filogenetik analizlerden (biyoinformatik/sekans) elde edilen verilere göre SARS-CoV-2'e en yakın coronavirüsün 2013 yılında Çin'in Yunnan bölgesindeki yarasalardan (*Rhinolophus affinis*) elde edilen betacoronavirüs RaTG13 olduğu iki virüs arasında tüm genom bazında %96.4, S genleri arasında %92.9 nükleotit benzerliği, RBD'leri arasında ise aa (aminoasit) düzeyinde %89.2 oranında benzerlik tespit edildiği dolayısıyla SARS-CoV-2'in muhtemel orjininin yarasalar olabileceği öne sürülmektedir.⁷ Çin'in Guangdong (GD) Guangxi (GX) bölgelerinde yaşayan Malayan pangolinlerden (*Manis javanica*) izole edilen ve izole edikleri bölgelere atfen CoV-pangolin (GD) ve CoV-pangolin (GX) olarak adlandırılan coronavirüslerin tüm genom düzeyinde yapılan sekans analizleri uyarınca SARS-CoV-2'ye %85.5-92.4 oranında benzer olduğu bu benzerliğin RaTG13'e göre daha uzak olduğu buna karşın ACE2 reseptörüne bağlanmadan sorumlu spike (S) protein RBD (reseptör bağlama domaini) ile ise aa düzeyinde %97.4 gibi oldukça yakın benzerliğe sahip olduğu dolayısıyla pangolinlerin SARS-CoV-2'in insanlara adaptasyonu sürecinde aktif rol oynamış olabileceği öne sürülmesine karşın henüz SARS-CoV-2 için bir ara konak olup olmadıkları ise açık değildir.^{8,9}

SARS-CoV-2 genomu yaklaşık 14 açık okuma çerçevesi (open reading frames; Orf) içerir, ORF'ler tarafından ise 16 adet yapısal olmayan (non-structural proteins; nsp), 9 adet aksesuar protein ile yüzey protein (spike;S), membran (membrane; M), zarf (envelope; E), ve nükleokapsid (nucleocapsid; N) proteinlerinden oluşan 4 adet yapısal protein kodlanır.^{10,11} Coronavirüslerin spike (S) proteinleri reseptör tanıma ve membran füzyonunu içeren iki kritik fonksiyona sahiptirler. Spike proteinin konak hücre reseptörünü tanıma, tutunma ve bağlanması ile konak hücre ve viral membranların füzyonu enfeksiyonun başlamasında rol alan en temel virolojik süreçlerdir.¹²

Coronavirüslerin spike proteini reseptör bağlayan alt birim (S1) ve membran füzyonu ile ilişkili alt birim (S2)'den oluşur, S1'de N-terminal domain (S1-NTD) ve C-terminal domain (S1-CTD) olmak üzere

iki önemli domain tanımlanmıştır, S1 domainlerinden biri ya da ikisi potansiyel olarak reseptörleri bağlar ve reseptör bağlayan domaini (RBD) olarak işlev görür, S1-CTD bir kor yapısı ile reseptör bağlama motifinden (receptor-binding motif ;RBM) oluşan iki alt domain içerir, S2 içerisinde heptad tekrar N (heptad repeat; HR-N) ve heptad tekrar C'den (heptad repeat; HR-C) oluşan tekrar bölgeleri ve internal füzyon proteini yer alır, S1/S2 sınır bölgesi ile internal füzyon proteininin N terminalinde ise iki proteoliz bölgesi, S1/S2 arasındaki kesime ek olarak S2 içinde internal füzyon peptidinin N terminal bölgesinde yer alan ikinci bir kesim alanı olarak S2' tanımlanmıştır.¹²⁻¹⁴

SARS-CoV ve SARS-CoV-2 S proteinleri arasındaki sekans benzerliğinin varlığı ile yapılan yapısal çalışmalar ve biyokimyasal deneylerde SARS-CoV-2'nin yüzey spike proteini (viral ligand) aracılığıyla insan ACE2'yi SARS-CoV'lere benzer şekilde hücre giriş reseptörü olarak kullandığı gösterilmiştir.^{7,15-19} İnsan ACE2 (Human; hACE2) yüzeyinde SARS CoV'ün bağlanmasında kritik öneme sahip iki adet etkin bağlanma noktası içerir. Bu bağlanma noktaları ile etkileşimde olan SARS-CoV RBD'de doğal seçim yoluyla oluşabilen bazı mutasyonlar ise SARS-CoV'lerin türler arası ve İnsanlar arası bulaşı ile patogenezi ve infektivitesini düzenleyebilir.^{20,21}

SARS-CoV-2'nin alfa ve betacoronavirüsler ile karşılaştırıldığında dikkat çeken iki genomik özelliği tanımlanmıştır. İlki yapılan yapısal çalışmalar ve biyokimyasal analizler temelinde SARS-CoV-2'nin insan reseptör ACE2'ye bağlanmak için optimize olması ikincisi ise SARS-CoV-2 spike proteininin S1-S2 proteoliz alanına 3 adet O-bağlantılı glikan bağı kurulmasına imkan veren 12 nükleotidin insersiyonu sonucu fonksiyonel bir polibazik (furin) kesim alanına sahip olmasıdır.^{7,15-19}

Coronavirüslerin spike proteinlerinin RBD'leri coronavirüs genomunun en değişken bölgesidir. RBD'nin RBM'de yer alan 6 aminoasit ise ayrıca SARS-CoV benzeri virüslerin reseptör ACE-2'ye bağlanması ile konak aralığının belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. SARS-CoV RBM üzerinde ACE-2'ye bağlanmadan sorumlu 6 kritik aa rezidüsü (Y442, L472, N479, D480, T487 ve Y 491 aa) ile SARS-CoV-2'de ikame eden aa rezidülerinin (L455,

F486, Q493, S494, N501 ve Y505 aa) 5'nin farklı olduğu belirlenmiştir.¹⁶ SARS-CoV-2 ile RaTG13'ün RBD'leri arasında aa düzeyinde %85 oranında benzerliğe rağmen ACE-2'ye bağlanmadan sorumlu RBM'de yer alan 6 kritik aa rezidüsünden yalnızca tek bir aa rezidüsünün ortak olduğu buna karşın SARS-CoV-2 ile CoV-pangolin/GD'nin RBD'leri arasında aa düzeyinde %97 oranında benzerlik ve RBM'ndeki kritik 6 aa rezidüsünün ortak olduğu tespit edilmiştir.¹⁶

Yapısal çalışmalar ve biyokimyasal deneylerden elde edilen veriler SARS-CoV-2'nin İnsan, gelincik ve kedi ile yüksek reseptör homolojisi gösteren diğer türlerin ACE2 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanabilen RBD'ne sahip olduğuna işaret etmektedir.^{7,16-19}

Bu amaçla yapılan hesaplamalı ve yapısal analizlerde insan, miks kedisi ve yarasalardan izole edilen SARS-CoV'lerin spike proteinleri arasında sırasıyla %76-78, RBD'leri arasında %73-76, RBM'leri arasında ise %50-53 arasında aa düzeyinde sekans benzerliği olduğu, MERS-CoV ve Coronavirüs HKU4'le ise bu benzerlik oranlarının daha düşük düzeylerde olduğu, SARS-CoV-2 ve SARS-CoV RBM'lerinin ise reseptör bağlanma bölgesi dışındaki bir rezidü haricinde delesyon ve insersiyonlar içermediğini, SARS-CoV-2 ile İnsan, mix kedisi ve yarasa SARS-CoV'lerin RBD'leri içinde ACE-2 reseptörü ile teması sağlayan 14 rezidünün 9'unun tam korunmuş 4'ünün ise kısmi korunmuş olduğu, dolayısıyla bu verilerin SARS-CoV-2'nin ACE-2'yi reseptör olarak kullandığına dair güçlü kanıtlar teşkil ettiği özetle; SARS-CoV-2 RBM üzerindeki ACE2'ye bağlanmadan sorumlu 5 kritik aminoasitin de mutasyona uğradığı (Tablo 1) buna karşın bu mutasyonların SARS-CoV-2'nin ACE-2'ye sterik ve elektrostatik düzeyde bağlanması için uyumlu olduğu belirtmekle birlikte SARS-CoV-2'nin SARS-CoV (2012 yılı) oranla ACE-2'yi daha az etkin buna karşın SARS-CoV (2013 yılı) oranla ise daha etkili kullandığını, ayrıca SARS-CoV-2'de gelişebilecek N501T mutasyonun ACE-2'ye bağlanma afinitesini artırma potansiyeli nedeniyle hastalardan elde edilen izolatların bu aa rezidüsünde belirtilen olası mutasyon yönünden yakından izlenmesi gerektiğini ve ACE-2 reseptörü taşıyan domuz, gelincik ve kedi gibi

insan dışı primatların SARS-CoV-2'nin insanlara sıçramasında rol olabilecek potansiyel ara konaklar olabileceği rapor edilmiştir.¹⁶

X ışını kristalografisi metodu kullanarak SARS-CoV-2 ile ACE2 arasındaki etkileşimi atomik düzeyde belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda; SARS-CoV ve SARS-CoV-2'nin hACE2'ye bağlanmada yapısal benzerliğine sahip olduğu dolayısıyla bu bulgunun iki virüs arasındaki evrimsel yakınlığı desteklediği, yüzey plazmon rezonans (SPR) kullanılarak ölçülen ACE2'ye bağlanma afinitelerinin, kullanılan ölçüm metoduna bağlı olarak değişmekle birlikte kimerik RBD için (SARS-CoV'im RBD'nin kor bölgesini, SARS-CoV-2'nin ise RBM'sini içeren) en yüksek, SARS-CoV-2 RBD'nin de SARS-CoV RBD'den daha yüksek düzeyde olduğu, SARS-CoV ve SARS-CoV-2 RBM'leri arasındaki önemli yapısal farklılığın hACE2'ye bağlanma bölgesindeki halkanın (ilmek) konformasyonu ile ilişkili olduğu, her iki RBM'inde halkasal döngülerden birinin kritik disülfid bağı içerdiği ve sisteinlerin oluşturduğu disülfid bağlarının bölgesel farklılık içerdiği, spesifik olarak bu halka insan ve miks kedisi SARS-CoV'leri ile yarasa coronavirüs Rs3367'de prolin-prolin-alanin motifi içerirken SARS-CoV-2 ve yarasa coronavirüs RATG13'ün ise bu halkanın formasyonunda farklılaşmaya neden olan glisin-valin/glutamin-glutamamat/theronin-glisin içeren 4 rezidüden oluştuğunu, bu yapısal farklılıklar ve ayrıca SARS-CoV-2 RBM'deki Asn487 ve Ala475 arasındaki ek bir hidrojen zinciri bağının varlığı bu bölgenin daha kompakt bir formasyona ve Ala475'nde ACE2'ye daha fazla yaklaşmasına imkan tanıdığını, örneğin Ala475 hACE2'nin N terminal bölgesindeki Ser19 rezidüsü ile ek bir hidrojen bağının oluşması ve Gln24 ile etkileşime girmesine olanak sağladığı, ayrıca SARS-CoV RBM Leu472'ne karşılık gelen SARS-CoV-2 RBM'deki Leu486'nın hACE2'deki Met82, Leu79 ve Tyr83 ile hidrofobik bir cep aracılığıyla da etkileşebilir olmasına imkan veren yapısal değişikliklerin SARS-CoV ile karşılaştırıldığında SARS-CoV-2'nin ACE2'ye bağlanmasını daha elverişli hale getirdiği belirlenmiştir.¹⁵

ACE2; ilki Glutamik asit 35 (Glu) ile arasında tuz köprüsü içeren Lizin31 (Lys), ikincisi ise Asparajin38 (Asp) ile arasında tuz köprüsü içeren Lys353

pozisyonunda virüsler için iki kritik bağlanma noktası içerir.²⁰ ACE2 Lys31 rezidüsü ile RBM'de Lösin455 (Leu) içeren SARS-CoV-2'lerin, Tirozin442 (Tyr) içeren SARS-CoV'e göre benzer şekilde ACE2 Lys353 rezidüsü ile RBM'de Asparajin 501 (Asn;N) içeren SARS-CoV-2'nin, Tyr487 içeren SARS-CoV'e göre bağlanma etkileşimlerinin kısmen daha zayıf olduğu ama yine de stabilitesini koruduğunu ayrıca SARS-CoV-2 benzeri yarasa RATG13'de hACE'ye bağlanabildiği ve hACE'yi bir giriş reseptörü olarak kullanabildiği de rapor edilmiştir.¹⁵

SARS-CoV-2'nin RBM'nin 482-485 (Glisin-Valin-Glutamik asit-Glisin; Gly-Val-Glu-Gly) rezidülerinde meydana gelen 4 mutasyonun SARS-CoV'e göre ACE2'ye bağlanma bölgesinde yapısal değişikliğe sebep olduğu bu değişikliğin ise SARS-CoV-2'nin ACE2'nin N-terminal heliks bölgesi ile daha güçlü etkileşime imkan verdiği, SARS-CoV-2 RBM'nin 486 rezidüsünde Fenilalanin (Phe, F486)) mutasyonun da bu bölgeye daha küçük bir yan zincir ile bağlanan SARS-CoV'e (L472) göre ACE2'ye bağlanma afinitesini artırdığı, ACE2'nin virüsün bağlanma noktasında içerdiği iki etkin rezidünün (Lys31 ve Lys353) de bazik (pozitif yük) ve hidrofobik özellik gösteren Lizin içermesi dolayısıyla Lizin yükünün nötralizasyonun koronavirüslerin RBD'leri aracılığıyla hACE'ye bağlanması için kritik öneme sahip olduğu, bu açıdan SARS-CoV-2'nin hACE'de Lys31 ile etkileşimini sağlayan iki rezidüsünde (Gln493 ve Leu455) sırasıyla Glutamin (Gln) ve Lösin (Leu/L) içermesi ve yine hACE'de Lys353 ile etkileşimini sağlayan rezidünün Asn501 içermesinin SARS-CoV-2 RBM'nin hACE'nin iki etkin rezidüsünü stabilize etme yönünde bir evrilme stratejisi geliştirdiğini nihayetinde elde edilen biyokimyasal verilerin SARS-CoV-2 RBD'nin SARS-CoV RBD'ne göre hACE2'ye bağlanma afinitesinin daha yüksek olduğunu, SARS-CoV-2 RBM'nin yapısal analizlerin de SARS-CoV-2'nin hACE2'ye bağlanma afinitesinin yüksek olduğunu desteklediğini, sonuç olarak gerek biyokimyasal gerekse yapısal analiz verilerinin SARS-CoV-2 RBD'nin hACE2'yi SARS-CoV RBD'den daha iyi tanıdığına işaret etmekte olduğunu vurgulanmıştır.¹⁵

Yarasa RATG13'ün hACE'yi reseptör olarak kullanabildiğinin gösterildiğini, dolayısıyla RATG13'ün İnsanları enfekte edebileceğini, ayrıca

SARS-CoV-19 benzeri yarasa RATG13 RBM'nin de ACE2'ye bağlanma bölgesinde benzer 4 rezidüel motif içerdiği dolayısıyla bu bulguların SARS-CoV-2'nin RATG13 veya RATG13 ilişkili bir yarasa koronavirüsten evrilmiş olabileceğini desteklediğini, RaTG13'deki L486 ve Y493 rezidülerinin SARS-CoV-2'de L486F ve Y493Q yönünde değişmesinin SARS-CoV-2'nin hACE'yi tanımasını artırdığı bu değişikliğin yarasalardan insanlara SARS-CoV-2'in geçişini kolaylaştırmış olabileceğini, SARS-CoV'lerin taşıdığı L479K (SARS-CoV-2'deki karşılığı Q493) mutasyonunun SARS-CoV'lerin İnsan popülasyonuna girmesine imkan tanıdığını, L455 ve N501'nin her ikisinin de hACE2'yi tanımadada olumlu katkısı ve ayrıca RATG13 ve SARS-CoV-2 arasında korunmuş olmaları dolayısıyla SARS-CoV-2 RBM'deki varlıklarının yarasalardan İnsana SARS-CoV-2'nin geçişi için önemli olabileceği, reseptör tanımının dışında konak ve viral faktörlerin de koronavirüslerin türler arası geçişinde önemli olmasına karşın SARS-CoV-2 RBM'nin tanımlanan reseptör bağlanma özelliklerinin SARS-CoV-2'nin yarasalardan İnsanlara geçişini olanaklı hale getirmiş olabileceği belirtilmiştir.¹⁵

RATG13'ün hACE2'ye zaten bağlanabilmesi nedeniyle ara konak gereksinimi olmayabileceği, bir ara konak alternatifi olarak önerilen ve Çin'in Guangdong (GD) Guangxi (GX) bölgelerinde yaşayan pangolinlerden izole edilen ve izole edikleri bölgelere atfen CoV-pangolin (GD) ve CoV-pangolin (GX) olarak adlandırılan koronavirüslerin RBM'leri değerlendirildiğinde, CoV-pangolin/GD'nin RBM'nin Leu455, 482-485 ilmeği, Phe486, Gln493 ve Asn501 içerdiği dolayısıyla hACE2'ye bağlanma için uygunluk taşıdığı, CoV-pangolin/GX'in RBM'nin de uygun olan Leu455 ve 482-485 ilmeği içerdiği buna karşın hACE2'ye bağlanmak için daha az elverişli olan Leu486, Glu493 ve Thr501 içermesi nedeniyle GX pangolinlerden ziyade GD pangolinlerin koronavirüsleri insana geçirme potansiyeli taşıdığı buna karşın tüm veri ve analizlerin virolojik esaslı fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilerek doğrulanması gerektiği belirtilmiştir.¹⁵

Çin'de Mart ve Ağustos 2019 tarihleri arasında bir hayvan kurtarma merkezine getirilen 25 Malayan pangolin'den (Manis javanica) 17'sinin solunum sis-

temi hastalık belirtileri tespiti sonrası ölen 14'nün elde edilen akciğer doku biyopsi ve kan örneklerinden izole edilen SARS-CoV'lerin yapılan sekans (genom) analizlerinde SARS-CoV-2'nin E,M,N ve S aralarında sırasıyla; %100, %98.6, %97.8 ve %90.8 oranında amino asit benzerliği tespit edilmiş bu verilerden hareketle SARS-CoV-2'nin orjininin pangolin CoV benzeri virüsler ile yarasa SARS-CoV RaTG13 benzeri coronavirüsler arasındaki rekombinasyon kaynaklı olabileceği hipotez edilmiş buna karşın verilerin ve hipotezin doğrulanması için sağlıklı pangolinlerde deneysel çalışmalar yapılması gerektiği ise ayrıca vurgulanmıştır.²²

Coronavirüslerin spike proteinlerinin S1/S2 sınır bölgesi ile internal füzyon proteininin N terminalinde yer alan İki proteoliz bölgesi viral ve hücrel membranların füzyonun gerçekleştirilmesi için gerekli olan S2'nin yapısal konformasyonunun yeniden düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir.¹² SARS-CoV-2'nin spike proteini S1/S2 kesim alanında şimdiye kadar genom düzeyinde sekans analizleri gerçekleştirilen betacoronavirüslerin hiçbirinde olmayan virüsün biyogenez aşamasında furin ve benzeri proteazlar tarafından tanınarak proteolizine olanak tanıyan, viral infektivitenin artışı ve konak aralığının belirlenmesi gibi viral patojenitenin artmasına katkıda bulunan sırasıyla RRAR'den oluşan 4 aminositi kodlayan 12 nükleotitik insersiyonunun varlığı viral genomu oluşturan en dikkat çekici mutasyondur.¹⁸

Furin benzeri proteazlar için fonksiyonel olan polibazik bir kesim alanının varlığı yüksek patojenik avian influenza virüsler ve patojenik Newcastle disease virüslerinde tanımlanmış özgün bir proteolitik paterndir.^{23,24} SARS-CoV-2'deki polibazik kesim alanının fonksiyonel sonuçları henüz net olarak bilinmemekle birlikte, insan organizmasının neredeyse her yerinde bululabilen furin benzeri proteazların ekspresyonunun SARS-CoV-2'nin SARS-CoV'e göre nispeten hücre ve doku tropizminin genişlemesi ile bulaştırıcılığının artması ve/ya patojenitesinin değişmesine katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir.¹⁸

MERS-CoV'lerin yarasalardan İnsanlara bulaşında spikenin etkin kesiminin önemli rolü olduğu, bu açıdan spike protein kesiminin zoonatik coronavirüs yayılımı için bariyer teşkil ettiği, avian influenza

virüslerin hemaglatünin (HA) proteininde yer alan polibazik kesim alanının da virüse replikasyon ve bulaşma hızı kazandırarak yüksek patojenik özellik kazandırdığı bilinmektedir, bu açıdan viral genoma eklenen polibazik kesim alanının SARS-CoV-2'ye yukarıdaki virüslere benzer bir fonksiyon kazandırmış olabileceği öngörülmektedir.^{25,26} Bununla birlikte influenza virüs HA'nin hücre kültürü ve hayvan deneylerinde tekrarlayan pasajlar sonrası polibazik kesim alanı kazanabildiği de gözlemlenmiştir.²⁷

Coronavirüsler infekte konağın immün sisteminin tanıma mekanizmalarından kaçınmak için yapısal maskeleyi ve glikan kılıflarını kullanır.^{28,29} Bu açıdan RRAR insersiyonu önüne ayrıca bir prolin eklenmesi de S673, T678 ve S686 pozisyonlarında O-bağlı glikan bağlarının kurulmasına ve dolayısıyla SARS-CoV-2'ye özgü bir kesim alanı oluşmasına imkan tanıyabileceği öngörülmesine karşın bu insersiyonun özellikle immün tanımadan kaçınmada fonksiyonel olup olmadığı ise henüz açık değildir.³⁰

Coronavirüslerin RBD'nin reseptöre bağlanması için S1-CTD'nin (trimerik) konformasyonel olarak açık (up) pozisyonda olması gereklidir, bilimsel veriler yüksek patojenik coronavirüslerde (SARS-CoV-2, SARS-CoV ve MERS-CoV) S protein trimerlerinin kısmen açık pozisyonda (spontan olarak kapalı ve açık), İnsanlarda genel soğuk algınlığı ile ilişkili düşük patojenik coronavirüslerde (HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU, HCoV-229E) ise genel olarak kapalı pozisyonda olduğu yönündedir.^{28,31-33} Dolayısıyla SARS-CoV-2 S protein trimerlerinin de kısmen açık pozisyonda olması SARS-CoV-2'nin SARS-CoV ve MERS-CoV gibi yüksek patojeniteye sahip olduğunu destekleyen bir bulgu olduğu ifade edilmektedir.¹⁸

Yarasa SARS-CoV RaTG13 ve SARS-CoV-2 insanları ve pangolinleri enfekte edebilen yakın genetik soy ilişkisi olan yarasa coronavirüslerdir, SARS-CoV-2'nin de dahil olduğu sarbecovirüslerde yeni allel kombinasyonlarına imkan veren rekombinasyonlar doğada sıklıkla görülebilir olmasına karşın en azından şimdiye kadar izole edilebilen yarasa ve pangolin örneklerinde SARS-CoV-2 genomu ile ilişkili rekombinasyon tespit edilmemiştir, dolayısıyla zoonotik enfeksiyonlar için bir ara konağın varlığı

göz ardı edilemez olmakla birlikte, RaTG13 ve SARS-CoV-2'in 40-70 yıl kadar önce pangolin ve insan hücrelerini enfekte edebilir (her iki türün üst solunum sisteminde viral genomun replikasyonunu/biyogenezini gerçekleştirebilen) bir genetik soy olarak ayrılarak, insanlara yayılımı için evrilme sürecini nalburunlu yarasalarda (horseshoe bats) gerçekleştirmiş olabileceği de öne sürülmektedir.³⁴

Yukarıda veri ve analizler baz alınarak yapılan öncü değerlendirmelerde; SARS-CoV-2 RBD'nin insan, kedi, gelincik ve reseptör homolojisi gösteren diğer hayvanların ACE2'ye bağlanabildiği; insan ACE-2'ye yüksek afinite ile bağlanabilir olmasına karşın bu etkileşimin ideal olmadığı yönündeki bulgular ile SARS-CoV-2 genomunun revers genetik sistemlerin kullanılması için gerekli olan bir başka virüse ait viral biyogenezin temel makinelerini içeren genomik yapıları ihtiva etmediği dolayısıyla SARS-CoV-2'nin orjininin bir laboratuvar konstrüksiyonu olmasından ziyade zoonotik bulaş öncesi bir hayvan konak ya da zoonotik bulaş sonrası insanlarda doğal seçilim ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.³⁰

Bu açıdan pangolin koronavirüs RBD'indeki kritik aa rezidüleri ile SARS-CoV-2 RBD'deki aa rezidülerinin benzerliğinin bir ara konak olasılığına, özellikle yarasa ve pangolin SARS-CoV'lerde polibazik kesim alanı varlığı gösterilmemiş olmasına karşın bunun analiz edilen hayvan örnek sayısının yetersiz olmasından kaynaklanmış olabileceği, dolayısıyla polibazik kesim alanının bu ara süreçte kazanılmış olabileceği ya da SARS-CoV-2'nin insanlara zoonotik transferi sonrası tanımlanamayan insan-İnsan bulaşı sürecinde belirtilen genomik özellikleri kazanmış (virülansın artışı) olabileceği, şimdiye kadar elde edilen SARS-CoV-2 genomlarının benzerliğinin ortak bir kökene işaret ettiği dolayısıyla SARS-CoV-2'lerin ortak bir kökenden önce pangolin ve/ya benzeri ara konak sonrası insanlara geçerek sırasıyla RBD ve polibazik kesim alanı edinmiş olabileceği dolayısıyla rekombinasyon ve mutasyonlar aracılığı ile gerçekleşen doğal seçilimin SARS-CoV-2'orjini ve adaptasyonunda belirleyici temel doğal biyolojik süreçler olduğu ifade edilmekle birlikte, veri ve gözlemlerin her ne kadar virüsün bir laboratuvar konstrüksiyonu olmadığını göstermesine karşın diğer

yaklaşımların da en azından bu dönemde kanıtlanmanın yada çürütmenin de imkansız olduğu da belirtilmektedir.^{30,35}

Yarasalardan izole edilen RaTG13 ve RmYN02 koronavirüslerin her ne kadar SARS-CoV-2 ile aralarında filogenetik benzerlik olduğu gösterilmesine karşın bu yarasa koronavirüslerin salgının başlangıç merkezi olan Çin'in Wuhan bölgesinden yaklaşık 1600 km mesafedeki bir lokasyondan izole edilmiş olmasının, SARS-CoV-2'nin orjininde yarasaların rolünü tam açıklayamadığı, dolayısıyla hem bu açıdan hem de gerek kritik RBD mutasyonları gerekse polibazik kesim alanı içeren insersiyonun yarasa ve/ya diğer hayvan koronavirüslerinde olup olmadığı ile olası ara konağın belirlenebilmesi için çoklu çalışmalar yapılması gerektiği de belirtilmektedir.³⁶

Zoonotik viral enfeksiyonların oluşması için bir ara konak gerekliliği genel bir prensip olmasına karşın SARS-CoV-2'nin aralık 2019 öncesinde tanımlanamayan bir periyodik zaman içinde insanlara optimal adaptasyonuna imkan veren hem RBD hem de furin kesim sitesi insersiyonunu da içeren bazı kritik mutasyonları edinmiş olabileceği ihtimalinin de dışlanamayabileceği bu açıdan tanımlanamayan döneme ilişkin SARS-CoV-2 ilişkili enfeksiyonların rutin surveyans sistemi denetiminden kaçırıldığı için bu olasılıkların çek edilmesi veya dışlanması amacıyla retrospektif serolojik ve metagenomik bazlı çalışmalar yapılmasının gerektiği de ayrıca ifade edilmektedir.³⁶

Coronavirüslerin yüksek sıklıkta mutasyon ve homolog RNA rekombinasyon kabiliyetleri, yeni genotiplerin oluşmasına, yeni çevrelere adaptasyon sağlama ve doku tropizmlerinin değişmesine imkan sağlayabilmektedir.^{37,38} SARS-CoV-2'nin bir rekombinant virüs olup olmadığı ve bu rekombinasyonun virüsün ortaya çıkışındaki rolünün de aydınlatılması gerektiği buna karşın doğadaki koronavirüsler arasında geniş rekombinasyon yetkinliğinin olmasının SARS-CoV-2'ye özgü rekombinasyon paterninin ortaya çıkarılmasını zorlaştırabileceği de belirtilmektedir.³⁶

SARS ilişkili CoV ilk defa 2004 yılında Çin'de nalburunlu yarasalardan (horseshoe bats) izole edilmiş, sonraki yıllarda da bu izolasyonlar devam et-

miştir.³⁹ Buna karşın 2003-2004 yılından sonra (SARS-CoV-2, 2019-2020 hariç) İnsan ve miks kedilerini içeren SARS ilişkili CoV vakası rapor edilmiş, 2004-2018 yılları arasında Çin’de yaşayan, 30’u nalburunlu yarasalardan olmak üzere farklı yarasalar türlerinden 47 adet SARS ilişkili CoV izolasyonu rapor edilmiş, rapor edilen SARS ilişkili CoV genomlarının büyük bir kısmı (20’si) ise Çin’in Yunan bölgesinden izole edilen COV ihtiva etmekte, Çin dışında ayrıca; Tayland, İtalya, Lüksemburg, Bulgaristan, Slovenya, Macaristan, Japonya ve Kenya gibi ülkelerden SARS ilişkili CoV izolasyonları rapor edilmiş fakat bu raporlar virüsün kısmi sekans verilerine dayalı olması nedeniyle atasal orjinine dair veriler içermemektedir.⁴⁰

Mevcut bilimsel ve teknolojik imkanlar laboratuvar ortamında farklı bilimsel ve/ya tıbbi ya da farklı nedenlere dayalı virolojik araştırma ve uygulamalar amacıyla kimerik (hibrid, melez) virüslerin üretilebilmesine imkan sağlayabilmektedir. Bu açıdan Çin’de sirküle eden yarasalardan izole edilen bir yarasa coronavirüsün (SCOV14) spike proteini ile SARS-CoV’e ait viral biyogenezin temel makinelelerini içeren genomik yapıların (backbone) revers genetik sistemlerin kullanılarak in vitro düzeyde farelere adapte olabilen kimerik bir coronavirüs elde edilmiştir, dolayısıyla bu çalışmanın sonuçları sirkülasyondaki yarasa coronavirüslerin direkt olarak ACE-2’yi kullanarak insanlarda enfeksiyon oluşturmak için taşıdıkları potansiyele işaret etmesi yanında coronavirüs spike proteinlerinin genetik manipülasyonunun, SARS-CoV’leri reseptör ACE-2’nin çoklu ortologlarını içeren hayvan türlerinde enfeksiyonuna, solunum yollarında replikasyonuna ve akciğerlerde patolojik değişiklikler oluşturmaya olanak tanıdığını da göstermektedir.⁴¹ Bu açıdan SARS-CoV-2’nin doğal kaynaklı olduğuna dair daha olası yaklaşımın desteklenmesi amacıyla çok sayıda yarasa ve ara konak olma potansiyeli taşıyan hayvan coronavirüslerin izole edilerek genomik düzeyde analizlerinin yapılması gerektiği açıktır. Bununla birlikte genomik, yapısal ve biyokimyasal veriler tek başına SARS-CoV-2’nin orjinini açıklamak için yeterli bilimsel kanıtları oluşturamayabilir dolayısıyla verilerin doğrulanması için fonksiyonel analizlerinin yapılması gerekli ve şarttır.

SARS-CoV’lerin moleküler biyolojisinin araştırılması ve fonksiyonel analizlerinin yapılmasına yönelik bilimsel çalışmalar ise virüsün bulaş yükü ve patojenitesinin yüksek olması ile spesifik tedavisinin ve özellikle koruyucu bir aşısının da olmaması nedeniyle çok üst düzey güvenlik, laboratuvar ekipmanı ve donanımı ile deneyimli personel ve araştırmacı gerektiren 4. derece biyogüvenlik düzeyine (Biosafety Level 4; BSL-4) sahip laboratuvarlarda gerçekleştirilebilmektedir.⁴² Bu laboratuvarların sayıca az ve dünyanın sayılı merkezlerinde bulunması gerçeğinden hareketle, SARS-CoV-2’nin orjinini ve virolojisine dair bilimsel veri ve söylemlere dikkatli ve temkinli yaklaşılması toplum sağlığı ve bilimsel etik açısından da ayrıca önem arz etmektedir keza bu laboratuvarlar dışında elde edilen veri ve bulgular her ne kadar bilimsel bir değer taşımalarına karşın bilimsel bir hipotez ve/ya bir yaklaşım/bir öngörü olmanın ötesinde bilimsel bir değerliliğe sahip olamayacakları açıktır.

Özetle COVID-19 pandemisi öncesi doğada ana konağı yarasalar olan çok sayıda SARSCoV ilişkili coronavirüsün tespiti ve 21. yüzyılın başında tanımlanabilen ilk SARS-CoV salgını sonrası yoğunlaşan bilimsel veri ve gözlemler SARS-CoV’lerin doğal seleksiyonlar aracılığıyla zaten tür bariyerini aşabilecek virolojik özellikler edindiği dolayısıyla bu virüslerin tekrarlayan insan yayılımlarının gelecekte de coronavirüs kaynaklı zoonotik salgınlara neden olabileme potansiyeli taşıdığına yönelik bilimsel veri ve bulgular ile mevcutları yaşanan pandeminin etkeni olan SARS-CoV-2’nin doğal kaynaklı olduğunu destekler niteliktedir.^{41,43-48} Buna karşın SARS-CoV-2’nin belki de sonsuza kadar aydınlatılamayabilecek ve/ya ispatı güç olan olasılığı çok zayıf olmasına karşın hayatın doğal akışı içerisinde meydana gelmiş bir talihsizlikten (laboratuardan sızma) kaynaklanmış olabileceği ihtimalinin de görmezden gelinemeyeceği bugün için ifade edilebilir.

Nihayetinde virüsler başta olmak üzere insanoğlu doğada var olduğu günden beri doku bütünlüğünü korumak amacıyla mikroorganizmaların kendine yabancı ve veya tehlikeli olma algısı ve evrimsel öğretisi nedeniyle giriştiği biyolojik etkileşimlerinde en azından bilinen tarihsel veriler uyarınca zaman zaman büyük kayıplara uğramasına rağmen, doğadaki varlığını daha da sağlıklı olarak devam et-

mesine olanak sağlayan bir biyolojik öğreti ve bellek (immünogenetik) edinerek çıkmayı başarmıştır. Doğayısıyla yaşamakta olduğumuz COVID-19 pandemisinin de telafisi zor kayıplarına rağmen sürecin insanoğlunun yeni bir biyolojik adaptasyon ve yeni bir immün bellek kazanımı ile sonlanması beklenir. Bununla birlikte SARS-CoV-2'nin tüm dünyada duyarlı insan popülasyonu üzerinde olasılıkla üç yıla kadar bir sürecek yayılım sonucunda diğer coronavirüsler (HKU1, NL63, OC43, 229E) ile birlikte insan popülasyonunda sirküle edecek beşinci endemik coronavirüs olması ise kaçınılmaz görünmektedir.³⁶

Sonuç olarak toplum sağlığını koruyucu ve önleyici sağlık uygulama ve yaklaşımların öncelenmesi orta ve uzun vade de toplumun çok yönlü refahı ve güvenliğinin korunması için elzem olduğu ifade edilebilir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Bu çalışma tamamen yazarın kendi eseri olup başka hiçbir yazar katkısı alınmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Weiss S.R, Navas-Martin S., Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005; 69: 635–664.
2. Gorbalenya A.E, Baker S.C, Baric R.S, Groot R.J, Drosten C et al. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying. Nat Microbiol. 2020; 5(4):536-54.
3. Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: the mystery and the miracle. J Med Virol. 2020;92(4):401–2.
4. Fredricks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. Clin Microbiol Rev. 1996;9:18–33.
5. Gralinski L.E., Menachery V.D. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. Viruses. 2020;12:35-45.
6. Bao L, Deng W, Huang B, Gaon H, Liu J, Ren L. et.al. The Pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 Transgenic Mice. bioRxiv 2020; doi:10.1101/2020.02.07.939389.
7. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W. A. et.al. pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 2020; 579:270-273.
8. Lam, T. T.-Y. et al. Identification of 2019-nCoV related coronaviruses in Malayan pangolins in southern China. bioRxiv, 2020; doi:10.1101/2020.02.13.945485.
9. Xiao, K. et al. Isolation and Characterization of 2019-nCoV-like Coronavirus from alayan Pangolins. bioRxiv, 2020; doi:10.1101/2020.02.17.951335.
10. Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. Adv Virus Res. 2006;66:193-292.
11. Chen Y, Qianyun Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. J Med Virol. 2020;92(4):418-423.
12. Li F. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. Annu Rev Virol. 2016; 29;3(1):237-26.
13. Tortorici, M.A., Walls, A.C., Lang, Y., Wang, C., Li, Z., Koerhuis, D., Velesler, D. et.al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. Nat. Struct. Mol. Biol. 2019; 26, 481–489.
14. Walls, A.C., Tortorici, M.A., Bosch, B.J., Frenz, B., Rottier, P.J.M., DiMaio, et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. Nature 2016; 531, 114–117.
15. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, , Li F. et.al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. Nature. 2020.
16. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. J Virol. 2020;17;94(7). e00127-20.
17. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et.al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science. 2020;367:1260-1263.
18. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Velesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. Cell. 2020;180:1-12.
19. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. Nat Microbiol. 2020; 5(4):562-569.
20. Li, F., Li, W. H., Farzan, M. & Harrison, S. C. Structure of SARS coronavirus spike receptor binding domain complexed with receptor. Science 2005; 309, 1864-1868.
21. Li, W. H. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. Nature 2003 426, 450-454.
22. Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou J-J. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. Nature 2020.
23. Klenk, H.D., and Garten, W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. Trends Microbiol. 1994; 2, 39–43.
24. Steinhauer, D.A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. Virology 1999; 258:1-20.
25. Menachery VD, Dinno KH, Yount BL, McNamee ET, Gralinski LE, Hale A, et.al. Trypsin Treatment Unlocks Barrier for Zoonotic Bat Coronavirus Infection. J Virol. 2020 Feb 14;94(5).
26. Alexander DJ, Brown IH. History of highly pathogenic avian influenza. Rev Sci Tech. 2009;28(1):19-38.

27. Ito T, Goto H, Yamamoto E, Tanaka H, Takeuchi M, Kuwayama M. et al. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J Virol.* 2001;75(9):4439-43.
28. Walls, A.C., Tortorici, M.A., Frenz, B., Snijder, J., Li, W., Rey, F.A., DiMaio, F., Bosch, B.J., and Veeler, D. Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016; 23, 899–905.
29. Walls, A.C., Xiong, X., Park, Y.J., Tortorici, M.A., Snijder, J., Quispe, J., Cameroni, E., Gopal, R., Dai, M., Lanzavecchia, A., et al. (2019). Unexpected Receptor Functional Mimicry Elucidates Activation of Coronavirus Fusion. *Cell* 2019;176, 1026–1039.
30. Andersen K.G, Lipkin A.R.W, Edward C. Holmes E.C, Garry R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature Medicine* 2020.
31. Kirchdoerfer, R.N., Cottrell, C.A., Wang, N., Pallesen, J., Yassine, H.M., Turner, H.L. et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*, 2016; 531, 118–121.
32. Tortorici, M.A., and Veeler, D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv. Virus Res.* 2019; 105, 93–116.
33. Li, Z., Tomlinson, A.C., Wong, A.H., Zhou, D., Desforges, M., Talbot, P.J., Benlekber, S. et al. The human coronavirus HCoV-229E S-protein structure and receptor binding. *eLife*, 2019; 8, e51230.
34. Boni M.F, Lemey P, Jiang X, Lam T.T-Y., B5, Castoe T. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Biorxiv*, 2020; doi:10.1101/2020.03.30.015008.
35. Zhou H, Chen X, Hu T, Li J, Song H, Liu Y. et al. A novel bat coronavirus reveals natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the Spike protein and a possible recombinant origin of HCoV-19. *Biorxiv*, 2020; doi: 10.1101/2020.03.02.974139
36. Zhang YZ, Holmes E.C. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2. *Cell* 2020; doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.035.
37. Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J. Virol.* 2010; 84:3134–46.
38. Li F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antivir. Res.* 2013;100:246–54.
39. Lau, S.K., Woo, P.C., Li, K.S., Huang, Y., Tsoi, H.W., Wong, B.H. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102, 14040–14045.
40. Luk H.K.H, Li X, Fung J, Lau S.K.P, Woo P.C.Y. et al. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect Genet Evol.* 2019;71:21-30.
41. Menachery, V.D., Yount, B.L., Jr., Sims, A.C., Debbink, K., Agnihothram, S.S., Gralinski, L.E., et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016; 113, 3048–3053.
42. Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th Edition, 2009.
43. Anthony, S.J., Gilardi, K., Menachery, V.D., Goldstein, T., Ssebide, B., Mbabazi, R., et al. Further Evidence for Bats as the Evolutionary Source of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus. *MBio* 2017; 8, e00373-17.
44. Ge, X.Y., Li, J.L., Yang, X.L., Chmura, A.A., Zhu, G., Epstein, J.H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 2013; 503: 535–538.
45. Hu, B., Zeng, L.P., Yang, X.L., Ge, X.Y., Zhang, W., Li, B., et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 2017; 13, e1006698.
46. Li, W., Shi, Z., Yu, M., Ren, W., Smith, C., Epstein, J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science* 2005; 310, 676–679.
47. Menachery, V.D., Yount, B.L., Jr., Debbink, K., Agnihothram, S., Gralinski, L.E., Plante, et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat. Med.* 2015; 21:1508–1513.
48. Yang, X.L., Hu, B., Wang, B., Wang, M.N., Zhang, Q., Zhang, W., et al. Isolation and Characterization of a Novel Bat Coronavirus Closely Related to the Direct Progenitor of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *J. Virol.* 2015; 90: 3253–3256.