

# SARS-CoV-2'nin Orijini

## Origin of SARS-CoV-2

 Bülent ÇAKAL<sup>a</sup>

<sup>a</sup>İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, İstanbul, TÜRKİYE

**ÖZET** Şiddetli akut solunum sendromu ilişkili bir koronavirüsün [severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV-2)] etiyolojik etkeni olduğu koronavirüs 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 koronavirüsdür. Koronavirüslerin yüksek sıklıkta mutasyon ve homolog RNA rekombinasyon kabiliyetleri, yeni viral genotiplerin oluşmasına, yeni çevrelere adaptasyon sağlama ve doku tropizmlerinin değişmesine imkân sağlayabilmektedir. İnsan SARS-CoV-2 ve yarası koronavirüs sekansları arasındaki yüksek benzerlik nedeni ile SARS-CoV'nin doğadaki rezervuarının yarasalar olduğu kabul edilmektedir. Buna karşın, SARS-CoV-2'nin yarasalardan insana bulaşında rolü olan bir ara konağın varlığı ya da olası moleküler mekanizmalar henüz tanımlanmamıştır. Diğer yandan, özellikle SARS-CoV-2'nin RaTG13'ten farklı olarak viral spike proteinini kodlayan genomda bir polibazik (furin) kesim alanı içeren insersiyon içermesi ve reseptör ACE2'ye bağlanma afinitesindeki 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 çalışmada, SARS-CoV-2'nin orijinine 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 21<sup>st</sup> 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 ACE2. 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:** Koronavirüs; SARS-CoV-2; COVID-19; orijin; doğal seleksiyon

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

Koronavirüsler [coronaviruses (CoVs)], vertebralların sitopatik, zarflı, pozitif polariteli, tek zincirli RNA virüsleridir.<sup>1</sup> Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi Koronavirüs Çalışma Grubu tarafından COVID-19'un etiyolojik etkeni olarak kabul edilen şiddetli akut solunum sendromu ile ilişkili koronavirüs [severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV-2)]ün *Betacoronavirus* cinsi ve *Sarbecovirus* alt cinsi içerisinde SARS ilişkili CoV olarak adlandırılması önerilmiştir.<sup>2</sup>

Uygun deney hayvanı modelleri bulunmadığı için klasik Koch postulatları ya da Fredricks ve Relman'ın modifikasyon 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 insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 [human angiotensin-converting

**Correspondence:** Bülent ÇAKAL

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD, İstanbul, TÜRKİYE/TURKEY

**E-mail:** bulentcakal@yahoo.com



Peer review under responsibility of Türkiye 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/>).

enzyme 2 (hACE2)] eksprese eden transgenik farelerde bu ilişki tam olarak konfirme edilebildiği rapor edilmiştir.<sup>3-6</sup>

Şimdiye kadar yapılan filogenetik analizlerden (biyoinformatik/sekans) elde edilen verilere göre SARS-CoV-2'ye en yakın CoV'nin 2013 yılında Çin'in Yunnan bölgesindeki yarasalardan (*Rhinolophus affinis*) elde edilen Betacoronavirus RaTG13 olduğu, iki virüs arasında tüm genom bazında %96,4, S genleri arasında %92,9 nükleotit benzerliği, reseptör bağlayan domain (RBD)'ler arasında ise amino asit (aa) düzeyinde %89,2 oranında benzerlik tespit edildiği, dolayısıyla SARS-CoV-2'in muhtemel orijininin yarasalar olabileceği öne sürülmektedir.<sup>7</sup> Çin'in Guangdong (GD) Guangxi (GX) bölgelerinde yaşayan Malayan pangolinlerden (*Manis javanica*) izole edilen ve izole edildikleri bölgelere atfen CoV-pangolin (GD) ve CoV-pangolin (GX) olarak adlandırılan CoV'lerin 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 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.<sup>8,9</sup>

SARS-CoV-2 genomu, yaklaşık 14 açık okuma çerçevesi [open reading frame (ORF)] içerir, ORF'ler tarafından ise 16 adet yapısal olmayan [non-structural protein (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.<sup>10,11</sup> CoV'lerin 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.<sup>12</sup>

CoV'lerin spike proteinini, 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 RBD olarak işlev görür, S1-CTD bir kor yapı ile reseptör bağlama motifi [receptor-binding motif (RBM)]'nden oluşan iki alt domain içerir. S2 içerisinde heptad tekrar N [heptad repeat (HR-N)] ve heptad tekrar C'den [heptad repeat (HR-C)]'den 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.<sup>12-14</sup>

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 proteinini (viral ligand) aracılığıyla insan ACE2'yi SARS-CoV'lere benzer şekilde hücre giriş reseptörü olarak kullandığı gösterilmiştir.<sup>7,15-19</sup> hACE2 yüzeyinde SARS-CoV'nin 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 insanlar arası bulaşı ile patogenezi ve infektivitesini düzenleyebilir.<sup>20,21</sup>

SARS-CoV-2'nin alfa ve *Betacoronavirus*'ler 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 imkân veren 12 nükleotidin insersiyonu sonucu fonksiyonel bir polibazik (furin) kesim alanına sahip olmasıdır.<sup>7,15-19</sup>

CoV'lerin spike proteinlerinin RBD'leri, CoV genomunun en değişken bölgesidir. RBD'nin RBM'de yer alan 6 aa ise ayrıca SARS-CoV benzeri virüslerin reseptör ACE2'ye bağlanması ile konak aralığının belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. SARS-CoV RBM üzerinde ACE2'ye bağlanmadan sorumlu 6 kritik aa rezidüsü (Y442, L472, N479, D480, T487 ve Y491 aa) ile SARS-CoV-2'de ikame eden aa rezidülerinin (L455, F486, Q493, S494, N501 ve Y505 aa) 5'nin farklı olduğu belirlenmiş-

tir.<sup>16</sup> SARS-CoV-2 ile RaTG13'ün RBD'leri arasında aa düzeyinde %85 oranında benzerliğe rağmen ACE2'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'deki kritik 6 aa rezidüsünün ortak olduğu tespit edilmiştir.<sup>16</sup>

Yapısal çalışmalar ve biyokimyasal deneylerden elde edilen veriler, SARS-CoV-2'nin insan, gelincik ve kedi ile yüksek reseptör homolojisi gösteren diğer türlerin ACE2 reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanabilen RBD'ye sahip olduğuna işaret etmektedir.<sup>7,16-19</sup>

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, Orta Doğu solunum sendromu [Middle East respiratory syndrome (MERS)]-CoV ve CoV 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 inserisyonlar içermediğini, SARS-CoV-2 ile insan, miks kedisi ve yarasa SARS-CoV'lerin RBD'leri içinde ACE2 reseptörü ile teması sağlayan 14 rezidünün 9'unun tam korunmuş 4'ünün ise kısmi korunmuş olduğu, dolayısıyla bu verilerin SARS-CoV-2'nin ACE2'yi reseptör olarak kullandığına dair güçlü kanıtlar teşkil ettiği, özetle; SARS-CoV-2 RBM üzerindeki ACE2'ye bağlanmadan sorumlu 5 kritik aa'nın da mutasyona uğradığı buna karşın bu mutasyonların SARS-CoV-2'nin ACE2'ye sterik ve elektrostatik düzeyde bağlanması için uyumlu olduğu belirtilmekle birlikte SARS-CoV-2'nin SARS-CoV'a (2012 yılı) oranla ACE2'yi daha az etkin, buna karşın SARS-CoV (2013 yılı) oranla ise daha etkili kullandığını, ayrıca SARS-CoV-2'de gelişebilecek N501T mutasyonunun ACE2'ye bağlanma afinitesini artırma potansiyeli nedeni ile hastalardan elde edilen izolatların bu aa rezidüsünde belirtilen olası mutasyon yönünden yakından izlenmesi gerektiğini ve ACE2 reseptörü taşıyan domuz, gelincik ve kedi gibi insan dışı primatların SARS-CoV-2'nin insanlara sıç-

ramasında rol olabilecek potansiyel ara konaklar olabileceği rapor edilmiştir.<sup>16</sup>

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 benzerliğe 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'yi 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'nin de 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 CoV Rs3367'de prolin-prolin-alanin motifi içerirken, SARS-CoV-2 ve yarasa CoV RaTG13'ün ise bu halkanın formasyonunda farklılaşmaya neden olan glisin-valin/glutamin-glutamat/treonin-glisin içeren 4 rezidüden oluştuğunu, bu yapısal farklılıklar ve ayrıca SARS-CoV-2 RBM'deki Asn487 ve Ala475 arasındaki ek bir hidrojen zinciri bağının varlığının bu bölgenin daha kompakt bir formasyona ve Ala475'in de ACE2'ye daha fazla yakınlaşmasına imkân 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'ye karşılık gelen SARS-CoV-2 RBM'deki Leu486'nın hACE2'deki Met82, Leu79 ve Tyr83 ile hidrofobik bir cep aracılığıyla da etkileşebilir olmasına imkân veren yapısal değişikliklerin SARS-CoV ile karşılaştırıldığında SARS-CoV-2'nin ACE2'ye bağlanmasını daha elverişli hâle getirdiği belirlenmiştir.<sup>15</sup>

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.<sup>20</sup> ACE2 Lys31 rezidüsü ile RBM'de Lösin455 (Leu) içeren SARS-CoV-2'lerin, Tirozin442 (Tyr) içeren SARS-CoV'ye göre benzer şekilde ACE2 Lys353 rezidüsü ile RBM'de Asparajin 501 (Asn;N) içeren SARS-CoV-2'nin, Tyr487 içeren SARS-CoV'ye göre bağlanma etkileşimlerinin kısmen daha zayıf olduğu ama yine de stabilitesini koruduğunu, ayrıca SARS-CoV-2 benzeri yarasalar RaTG13'de hACE'ye bağlanabildiği ve hACE'yi bir giriş reseptörü olarak kullanabildiği de rapor edilmiştir.<sup>15</sup>

SARS-CoV-2'nin RBM'nin 482-485 (Glisin-Valin-Glutamik asit-Glisin; Gly-Val-Glu-Gly) rezidülerinde meydana gelen 4 mutasyonun SARS-CoV'ye 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 imkân verdiği, SARS-CoV-2 RBM'nin 486 rezidüsünde [Fenilalanin (Phe, F486)] mutasyonun da bu bölgeye daha küçük bir yan zincir ile bağlanan SARS-CoV'ye (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 nötralizasyonunun CoV'lerin RBD'leri aracılığıyla hACE'ye bağlanması için kritik öneme sahip olduğu, bu açıdan SARS-CoV-2'nin hACE'de Lys31 ile etkileşimini sağlayan iki rezidüsünün (Gln493 ve Leu455) de 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'ye 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 desteklediği, sonuç olarak gerek biyokimyasal gerekse yapısal analiz verilerinin SARS-CoV-2 RBD'nin hACE2'yi SARS-CoV RBD'den daha iyi tanıdığına işaret etmekte olduğu vurgulanmıştır.<sup>15</sup>

Yarasa RaTG13'ün hACE'yi reseptör olarak kullanabildiğinin gösterildiği, dolayısıyla RaTG13'ün insanları enfekte edebileceği, ayrıca SARS-CoV-19 benzeri yarasalar 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 yarasalar CoV'den evrilmiş olabileceğini desteklediği, RaTG13'teki 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'nin geçişini kolaylaştırmış olabileceği, SARS-CoV'lerin taşıdığı L479K (SARS-CoV-2'deki karşılığı Q493) mutasyonunun SARS-CoV'lerin insan popülasyonuna girmesine imkân tanıdığı, L455 ve N501'nin her ikisinin de hACE2'yi tanıma olumlu katkısı ve ayrıca RaTG13 ve SARS-CoV-2 arasında korunmuş olmaları dolayısıyla SARS-CoV-2 RBM'deki varlıklarının yarasalardan insana SARS-CoV-2'nin geçişi için önemli olabileceği, reseptör tanımının dışında konak ve viral faktörlerin de CoV'lerin türler arası geçişinde önemli olmasına karşın SARS-CoV-2 RBM'nin tanımlanan reseptör bağlanma özelliklerinin SARS-CoV-2'nin yarasalardan insanlara geçişini olanaklı hâle getirmiş olabileceği belirtilmiştir.<sup>15</sup>

RaTG13'ün hACE2'ye zaten bağlanabilmesi nedeni ile ara konak gereksinimi olmayabileceği, bir ara konak alternatifi olarak önerilen ve Çin'in Guangdong (GD) Guangxi (GX) bölgelerinde yaşayan pangolinlerden izole edilen ve izole edildikleri bölgelere atfen CoV-pangolin (GD) ve CoV-pangolin (GX) olarak adlandırılan CoV'lerin 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 nedeni ile GX pangolinlerden ziyade GD pangolinlerin CoV'leri insana geçirme potansiyeli taşıdığı, buna karşın tüm veri ve analizlerin virolojik esaslı fonksiyonel analizlerinin gerçekleştirilerek doğrulanması gerektiği belirtilmiştir.<sup>15</sup>

Çin'de Mart-Ağustos 2019 tarihleri arasında bir hayvan kurtarma merkezine getirilen 25 Malayan pangolin (*Manis javanica*)'den 17'sinin solunum sistemi hastalık belirtileri tespiti sonrası ölen 14'ünden

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 aa benzerliği tespit edilmiş olup, bu verilerden hareketle SARS-CoV-2'nin orijininin pangolin CoV benzeri virüsler ile yarasa SARS-CoV RaTG13 benzeri CoV'ler arasındaki rekombinasyon kaynaklı olabileceği hipotez edilmiş, buna karşın verilerin ve hipotezin doğrulanması için sağlıklı pangolinlerde deneysel çalışmalar yapılması gerektiği ise ayrıca vurgulanmıştır.<sup>22</sup>

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

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.<sup>23,24</sup> SARS-CoV-2'deki polibazik kesim alanının fonksiyonel sonuçları henüz net olarak bilinmemekle birlikte, insan organizmasının neredeyse her yerinde bulunabilen furin benzeri proteazların ekspresyonunun, SARS-CoV-2'nin SARS-CoV'e göre nispeten hücre ve doku tropizminin genişlemesi ile bulaştırıcılığının artabileceği veya patojenitesinin değişmesine katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir.<sup>18</sup>

MERS-CoV'lerin yarasalardan insanlara bulaşında "spike"nin etkin kesiminin önemli rolü olduğu, bu açıdan spike protein kesiminin zoonatik CoV yayılımı için bariyer teşkil ettiği, avian influenza virüs-

lerin hemaglutinin (HA) proteininde yer alan polibazik kesim alanının da virüse replikasyon ve bulaş 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.<sup>25,26</sup> Bununla birlikte, influenza virüs HA'nın hücre kültürü ve hayvan deneylerinde tekrarlayan pasajlar sonrası polibazik kesim alanı kazandığı de gözlemlenmiştir.<sup>27</sup>

CoV'ler, enfekte konağın immün sisteminin tanıma mekanizmalarından kaçınmak için yapısal maskeleymeyi ve glikan kılıflarını kullanır.<sup>28,29</sup> 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 imkân tanıyabileceği öngörülmesine karşın bu insersiyonun özellikle immün tanımadan kaçınmada fonksiyonel olup olmadığı henüz açık değildir.<sup>30</sup>

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

Yarasa SARS-CoV RaTG13 ve SARS-CoV-2, insanları ve pangolinleri enfekte edebilen, yakın genetik soy ilişkisi olan yarasa CoV'lerdir. SARS-CoV-2'nin de dâhil olduğu *Sarbecovirus*'larda yeni allel kombinasyonlarına imkân 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.<sup>34</sup>

Yukarıda veri ve analizler baz alınarak yapılan öncü değerlendirmelerde: SARS-CoV-2 RBD'nin insan, kedi, gelincik ve reseptör homolojisi gösteren diğer hayvanlarda ACE2'ye bağlanabildiği; insan ACE2'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 orijininin bir laboratuvar konstriksiyonu olmasından ziyade zoonotik bulaş öncesi bir hayvan konak ya da zoonotik bulaş sonrası insanlarda doğal seçim ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.<sup>30</sup>

Bu açıdan pangolin CoV RBD'deki kritik aa rezidüleri ile SARS-CoV-2 RBD'deki aa rezidülerinin benzerliğinin bir ara konak olasılığına, özellikle yarasalar 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-insan bulaş 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 veya 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'nin orijini ve adaptasyonunda belirleyici temel doğal biyolojik süreçler olduğu ifade edilmekle birlikte, veri ve gözlemlerin her ne kadar virüsün bir laboratuvar konstriksiyonu olmadığını göstermesine karşın diğer yaklaşımları da en azından bu dönemde kanıtlama-

nın ya da çürütmenin imkânsız olduğu da belirtilmektedir.<sup>30,35</sup>

Yarasalardan izole edilen RaTG13 ve RmYN02 CoV'lerin her ne kadar SARS-CoV-2 ile aralarında filogenetik benzerlik olduğu gösterilse de bu yarasalar CoV'lerin salgının başlangıç merkezi olan Çin'in Wuhan bölgesinden yaklaşık 1.600 km mesafedeki bir lokasyondan izole edilmiş olmasının, SARS-CoV-2'nin orijinininde yarasaların rolünü tam açıklayamadığı, dolayısıyla hem bu açıdan hem de gerek kritik RBD mutasyonları gerekse polibazik kesim alanı içeren insersiyonun yarasalar veya diğer hayvan CoV'lerinde olup olmadığı ile olası ara konağın belirlenebilmesi için çoklu çalışmalar yapılması gerektiği de belirtilmektedir.<sup>36</sup>

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 imkân veren hem RBD hem de furin kesim alanı 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 incelenmesi veya dışlanması amacıyla retrospektif serolojik ve metagenomik bazlı çalışmaların yapılması gerektiği de ayrıca ifade edilmektedir.<sup>36</sup>

CoV'lerin yüksek sıklıkta mutasyon ve homolog RNA rekombinasyon kabiliyetleri, yeni genotiplerin oluşmasına, yeni çevrelere adapte olmaya ve doku tropizmlerinin değişmesine imkân sağlayabilmektedir.<sup>37,38</sup> SARS-CoV-2'nin bir rekombinant virüs olup olmadığı ve bu rekombinasyonun virüsün ortaya çıkışındaki rolünün de aydınlatılması gerektiği, buna karşın doğadaki CoV'ler arasında geniş rekombinasyon yetkinliğinin olmasının SARS-CoV-2'ye özgü rekombinasyon paterninin ortaya çıkarılmasını zorlaştırabileceği de belirtilmektedir.<sup>36</sup>

SARS ilişkili CoV ilk kez 2004 yılında Çin'de nalburunlu yarasalardan (horseshoe bats) izole edilmiş, sonraki yıllarda da bu izolasyonlar devam etmiştir.<sup>39</sup> Buna karşın 2003-2004 yıllarından sonra (SARS-CoV-2, 2019-2020 hariç) insan ve miks kedilerini içeren SARS ilişkili CoV vakası rapor edil-

memiş, 2004-2018 yılları arasında Çin’de yaşayan, 30’u nalburunlu yarasalardan olmak üzere farklı yarasalar türlerinden 47 adet SARS ilişkili CoV izolasyonu rapor edilmiştir; SARS ilişkili CoV genomlarının büyük bir kısmı (20’si) ise Çin’in Yunan bölgesinden izole edilen COV ihtiva etmektedir. 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 nedeni ile atasal orijinine dair veriler içermemektedir.<sup>40</sup>

Mevcut bilimsel ve teknolojik kaynaklar, laboratuvar ortamında farklı bilimsel veya tıbbi ya da farklı nedenlere dayalı virolojik araştırma ve uygulamalar amacıyla kimerik (hibrid, melez) virüslerin üretilebilmesine imkân sağlayabilmektedir. Çin’de sirküle eden yarasalardan izole edilen bir yarasa CoV’nin (SCOH14) spike proteini ile SARS-CoV’ye ait viral biyogenezin temel makinelerini içeren genomik yapıların (backbone) revers genetik sistemler kullanılarak in vitro düzeyde farelere adapte olabilen kimerik bir CoV elde edilmiştir, dolayısıyla bu çalışmanın sonuçları, sirkülasyondaki yarasalar CoV’lerin direkt olarak ACE2’yi kullanarak insanlarda enfeksiyon oluşturmak için taşıdıkları potansiyeli işaret etmesi yanında CoV spike proteinlerinin genetik manipülasyonunun, SARS-CoV’leri reseptör ACE2’nin çoklu ortologlarını içeren hayvan türlerinde enfeksiyonuna, solunum yollarında replikasyonuna ve akciğerlerde patolojik değişiklikler oluşturmaya olanak tanıdığı da göstermektedir.<sup>41</sup> 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 CoV’lerin izole edilerek genomik düzeyde analizlerinin yapılması gerektiği açıktır. Bununla birlikte genomik, yapısal ve biyokimyasal veriler tek başına SARS-CoV-2’nin orijini 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 nedeni ile çok üst düzey güvenlik, laboratuvar ekipmanı ve donanımı ile deneyimli personel ve araştırmacı gerektiren 4. derece biyogüvenlik düzeyine sahip laboratuvarlarda gerçekleştirilebilmektedir.<sup>42</sup> Bu laboratuvarların sayıca az ve dünyanın sayılı merkezlerinde bulunması gerçeğinden hareketle, SARS-CoV-2’nin orijini-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 taşıyalar da bilimsel bir hipotez veya bir yaklaşım/bir öngörü olmanın ötesinde bilimsel bir değerliliğe sahip olamayacakları açıktır.

Özetle, COVID-19 pandemisi öncesi doğada ana konağı yarasalar olan çok sayıda SARS-CoV ilişkili CoV’nin 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 edindiğini, dolayısıyla bu virüslerin tekrarlayan insan yayılımlarının gelecekte de CoV kaynaklı zoonotik salgınlara neden olabileceği potansiyeli taşıdığına yönelik bilimsel veri ve bulgular ile yaşanan pandeminin etkeni olan SARS-CoV-2’nin doğal kaynaklı olduğunu destekler niteliktedir.<sup>41,43-48</sup> Buna karşın SARS-CoV-2’nin belki de sonsuza kadar aydınlatılamayabilecek veya ispatı güç olan olasılığı çok zayıf olmasına rağmen hayatın doğal akışı içerisinde meydana gelmiş bir talihsizlikten (laboratuvardan 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 nedeni ile giriştiği biyolojik etkileşimlerinde en azından bilinen tarihsel veriler uyarınca zaman zaman büyük kayıplara uğramasına rağmen doğadaki varlığını daha da sağlıklı olarak devam ettirmesine olanak sağlayan bir biyolojik öğreti ve bellek (immünogenetik) edinerek çıkmayı başarmıştır. Dolayısıyla 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 yıl kadar sürecek bir yayılım sonucunda diğer CoV'ler (HKU1, NL63, OC43, 229E) ile birlikte insan popülasyonunda sirküle edecek beşinci endemik CoV olması ise kaçınılmaz görünmektedir.<sup>36</sup>

Sonuç olarak, toplum sağlığını koruyucu ve önleyici sağlık uygulama ve yaklaşımlarının öncelenmesinin, orta ve uzun vadede 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

- Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus, *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(4):635-64. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al; Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536-54. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- 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. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Fredricks DN, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(1):18-33. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Gralinski LE, Menachery VD. Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses.* 2020; 12(2):135. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- 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. [Crossref]
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang WA, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-3. [PubMed]
- Lam TTY, Shum MHH, Zhu HC, Tong YG, Ni XB, Liao Y, et al. Identification of 2019-nCoV related coronaviruses in Malayan pangolins in Southern China. *bioRxiv.* 2020. [Crossref]
- Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, et al. Isolation and characterization of 2019-nCoV-like Coronavirus from alayan Pangolins. *bioRxiv.* 2020. [Crossref]
- Masters PS. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res.* 2006;66:193-292. [Crossref] [PubMed]
- Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol.* 2020;92(4):418-23. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol.* 2016;29; 3(1):237-61. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, Wang C, Li Z, Koerhuis D, et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. *Nat Struct Mol Biol.* 2019;26(6): 481-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Walls AC, Tortorici MA, Bosch BJ, Frenz B, Rottier PJM, DiMaio F, et al. Cryo-electron microscopy structure of a coronavirus spike glycoprotein trimer. *Nature.* 2016;531(7592): 114-7. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature.* 2020;581:221-4. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- 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;94(7):e00127-20. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- 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(6483):1260-3. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veerler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell.* 2020;181(2):281-92.e6. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- 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):562-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Li F, Li W, Farzan M, Harrison SC. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science.* 2005;309(5742):1864-8. [Crossref] [PubMed]
- Li WH, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003;426(6965): 450-4. [Crossref] [PubMed] [PMC]
- Xiao K, Zhai J, Feng Y, Zhou N, Zhang X, Zou JJ, et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. *Nature.* 2020. [Crossref] [PubMed]



23. Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.* 1994;2(2):39-43. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
24. Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology.* 1999;258(1):1-20. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
25. Menachery VD, Dinnon 3rd KH, Yount Jr BL, McAnarney ET, Gralinski LE, Hale A, et al. Trypsin treatment unlocks barrier for zoonotic bat coronavirus infection. *J Virol.* 2020;94(5):e01774-19. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
26. Alexander DJ, Brown IH. History of highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech.* 2009;28(1):19-38. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
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. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
28. Walls AC, Tortorici MA, Frenz B, Snijder J, Li W, Rey FA, et al. Glycan shield and epitope masking of a coronavirus spike protein observed by cryo-electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(10):899-905. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
29. Walls AC, Xiong X, Park YJ, Tortorici MA, Snijder J, Quispe J, et al. Unexpected receptor functional mimicry elucidates activation of coronavirus fusion. *Cell.* 2019;176(5):1026-1039.e15. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
30. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2020;26(4):450-2. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
31. Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, Pallen J, Yassine HM, Turner HL, et al. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature.* 2016;531:118-21. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
32. Tortorici MA, Veasler D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv Virus Res.* 2019;105:93-116. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
33. Li Z, Tomlinson AC, Wong AH, Zhou D, Desforges M, Talbot PJ, et al. The human coronavirus HCoV-229E S-protein structure and receptor binding. *Elife.* 2019;8:e51230. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
34. Boni MF, Lemey P, Jiang X, Lam TTY, Perry B, Castoe T, et al. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *bioRxiv.* 2020. [[Crossref](#)]
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. [[Crossref](#)]
36. Zhang YZ, Holmes EC. A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2. *Cell.* 2020;181(2):223-7. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
37. Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol.* 2010;84(7):3134-46. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
38. Li F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus. *Antiviral Res.* 2013;100(1):246-54. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
39. Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, Wong BH, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(39):14040-5. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
40. Luk HKH, Li X, Fung J, Lau SKP, Woo PCY. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of SARS coronavirus. *Infect Genet Evol.* 2019;71:21-30. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
41. Menachery VD, Yount Jr BL, Sims AC, Debbink K, Agnihothram SS, Gralinski LE, et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(11):3048-53. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
42. Chosewood LC, Wilson DE, Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), National Institutes of Health (U.S.). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.* 5th ed. US: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health; 2009.
43. Anthony SJ, Gilardi K, Menachery VD, 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(2):e00373-17. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
44. Ge XY, Li JL, Yang XL, Chmura AA, Zhu G, Epstein JH, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 2013;503:535-8. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
45. Hu B, Zeng LP, Yang XL, Ge XY, 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. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
46. Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005;310(5748):676-9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
47. Menachery VD, Yount Jr BL, Debbink K, Agnihothram S, Gralinski LE, Plante JA, et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nat Med.* 2015;21(12):1508-13. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]
48. Yang XL, Hu B, Wang B, Wang MN, 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(6):3253-6. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)] [[PMC](#)]