
WERKDOCUMENT 26 MEI 2020: Kritische analyse van Andersen et al. De proximale oorsprong van SARS-CoV-2.**CDR Jean-Paul Chretien & Dr. Greg Cutlip (DIA/NCMI)**

1. Achtergrond. De oorsprong van SARS-CoV-2 blijft onzeker. Sommige van de kenmerken zijn uniek onder de meest nauw verwante bekende coronavirussen, en een stamvadervirus is niet geïdentificeerd. In februari 2020 schreven verschillende experts in virologie uit de VS, het VK en Australië samen een beoordeling, gepost op een virologieblog, van de opvallende kenmerken van SARS-CoV-2 en wat deze suggereren over de oorsprong ervan (Andersen et al., 2020a). Het bericht werd vervolgens gepubliceerd als een brief aan de redacteur in Nature Medicine, een prestigieus wetenschappelijk tijdschrift (Andersen et al., 2020b). Andersen et al. concludeerden dat het virus waarschijnlijk op natuurlijke wijze is ontstaan, niet door enige vorm van laboratoriummanipulatie. Prominente wetenschappers hebben hun artikel aangehaald als doorslaggevende ondersteuning voor een natuurlijk oorsprongsscenario (Calisher et al., 2020; Collins, 2020).

Wij pleiten hier niet voor een bepaald scenario over de oorsprong van SARS-CoV-2 en we zijn het niet oneens met de conclusies van Andersen et al. Wij onderzoeken het bewijs dat zij presenteren en vinden dat het niet bewijst dat het virus op natuurlijke wijze is ontstaan. In feite zijn de kenmerken van SARS-CoV-2 die Andersen et al. hebben opgemerkt consistent met een ander scenario: dat SARS-CoV-2 is ontwikkeld in een laboratorium, door middel van methoden die vooraanstaande coronavirusonderzoekers gewoonlijk gebruiken om te onderzoeken hoe de virussen cellen infecteren en ziekte veroorzaken, om te beoordelen in hoeverre dierlijke coronavirussen kunnen overspringen op mensen, en om medicijnen en vaccins te ontwikkelen.

1. Overzicht van coronavirussen en SARS-CoV-2. SARS-CoV-2 is het zevende coronavirus waarvan bekend is dat het mensen infecteert. Vier van de andere veroorzaken meestal een milde ziekte, zoals een gewone verkoudheid, terwijl twee SARS-CoV- en MERS-CoV-coronavirussen ziekte veroorzaken met een sterftecijfer van respectievelijk ongeveer 10% en 34% {vergeleken met 1% of minder bij infectie met SARS-CoV-2}. Andere coronavirussen infecteren alleen dieren, en van bijna alle coronavirussen wordt gedacht dat ze hun oorsprong vinden in vleermuizen {Fiorni et al., 2017}, die honderden of duizenden coronavirussen herbergen. Zowel SARS-CoV als MERS-CoV zijn waarschijnlijk ontstaan in vleermuizen, waarbij ze via tussengastheren zijn gegaan voordat ze mensen infecteerden. Als RNA-virussen muteren coronavirussen relatief snel (hoewel minder snel dan andere RNA-virussen vanwege een proofreading-mechanisme). Coronavirussen evolueren ook door recombinatie, wanneer verschillende virussen die dezelfde cel infecteren genetische elementen uitwisselen.

Het dichtstbijzijnde bekende familielid van SARS-CoV-2 is het vleermuiscoronavirus RaTG13. Wetenschappers van het Wuhan Institute of Virology (WIV) meldten het virus voor het eerst in januari 2020, maar schreven dat het in 2013 was bemonsterd in de provincie Yunnan, als onderdeel van een poging om een coronavirus te ontdekken (Zhou et al., 2020). In het algemeen is RaTG13 genetisch 96% identiek aan SARS-CoV-2 {nog steeds te verschillend om het directe stamvadervirus te zijn; bovendien zijn er geen voorlopers of takken van evolutie gemeld die voortkomen uit een minder aan de mens aangepast SARS-CoV-2-achtig virus [Zhan et al., 2020]}. In de regio's die coderen voor het spike-eiwit, dat toegang tot gastheercellen bemiddelt, deelt RaTG13 echter slechts 1 van de 5 belangrijkste aminozuren voor binding aan de SARS-CoV-2-receptor, ACE2. Het spike-eiwit dat het meest overeenkomt met SARS-CoV-2 werd geïdentificeerd in maart-augustus 2019 (gerapporteerd in 2020) van Maleise schubdieren die werden gered

in China. Hoewel het schubdiercoronavirus niet zo dicht bij SARS-CoV-2 ligt als RaTG13 in het algemeen, is het receptorbindingsdomein van het spikeiwit in het schubdiercoronavirus bijna identiek aan dat van SARS-CoV-2, waarbij alle 5 belangrijkste aminozuren worden gedeeld (Xiao et al., 2020).

Naast de nieuwe combinatie van kenmerken die lijken op die van het vleermuis- en schubdiercoronavirus, is SARS-CoV ook uniek onder zijn naaste bekende verwanten {Betacoronavirus lineage b virussen, zoals SARS-CoV, RaTG13, en andere vleermuis SARS-gerelateerde coronavirussen) door de aanwezigheid van een bepaald type doelwit voor gastheerenzymen in het spikeiwit. Als een coronavirus gastheercellen wil infecteren, moet het spikeiwit worden geactiveerd door enzymen die door de gastheer worden geleverd (Hoffman et al., 2018). Deze proteasen variëren in de mate van priming die ze bewerkstelligen en in hun distributie binnen de gastheer en tussen gastheersoorten. De specifieke proteasen die een coronavirus kan kapen, bepalen mede de potentiële gastheersoort en de ernst van de infectie.

Het spike-eiwit van SARS-CoV-2 bevat een invoeging van 4 aminozuren die een splitsingsplaats creëert voor furine, dat alomtegenwoordig tot expressie komt bij mensen (Braun et al., 2018). Proteolytische splitsing op deze plaats is vereist voor SARS-CoV-2 infectie van menselijke longcellen (Hoffman et al., 2020), en zal naar verwachting vooral effectief zijn bij het primen van het virus omdat de plaats 2 opeenvolgende basische aminozuren bevat. Van dergelijke "polybasische" splitsingsplaatsen is bekend dat ze de virulentie van aviaire influenzavirussen verhogen en hoogpathogene van laagpathogene aviaire influenza onderscheiden (Nao et al., 2017; Xu et al. 2019). Consistent met dit effect resulteerde versterking van de locatie in celgekweekte SARS-CoV-2 in verzwakte symptomen in hamsters (Lau et al., 2020), wat suggereert dat de novel furin splitsingsplaats kan bijdragen aan de pathogeniciteit of overdraagbaarheid van SARS-CoV-2 (Coutard et al., 2019; Walls et al., 2020; Wang et al., 2020).

1. **Bespreking van de analyse van Andersen et al.** Andersen et al. stellen dat de hierboven genoemde opvallende kenmerken van SARS-CoV-2 - de aanwezigheid van belangrijke aminozuren in het receptorbindingsdomein die niet gevonden worden in SARS-verwante CoV's en de furine-splitsingsplaats - waarschijnlijk op natuurlijke wijze zijn ontstaan en niet door laboratoriummanipulatie. We beschouwen deze argumenten hieronder, samen met het derde argument voor natuurlijke oorsprong gebaseerd op de globale dissimilariteit van SARS-CoV-2 met coronavirussen die zijn gebruikt in gepubliceerde laboratoriumexperimenten.

1.1. Receptor bindend domein. Andersen et al.: *Terwijl de bovenstaande analyses suggereren dat SARS-CoV-2 menselijk ACE2 kan binden met hoge affiniteit, voorspellen computationele analyses dat de interactie geen idee is en dat de RBD-sequentie anders is dan die waarvan is aangetoond dat die optimaal is voor receptorbinding in SARS-CoV. Dus, de hoge-affiniteit binding van het SARS-CoV-2 spike-eiwit aan menselijke ACE2 is hoogstwaarschijnlijk het resultaat van natuurlijke selectie op een menselijke of mens-achtige ACE2 die het mogelijk maakt dat een andere optimale bindingsoplossing ontstaat. Dit is een sterk bewijs dat SARS-CoV-2 niet het product is van doelbewuste manipulatie.*

Het argument is dat als iemand een coronavirus wilde ontwerpen dat bindt met een hoge affiniteit voor menselijk ACE2, hij SARS-CoV-2 niet zou hebben ontworpen, omdat de computationele analyse die hij zou hebben uitgevoerd in de planningsfase een lagere affiniteit voor ACE2 zou hebben voorspeld dan wat in werkelijkheid is waargenomen.

Dit is geen wetenschappelijk argument, maar eerder een aanname van de intentie en methodologie van

een veronderstelde wetenschapper. In plaats van te proberen een virus te ontwerpen dat met hoge affiniteit bindt aan ACE2, kan een onderzoeker ervoor gekozen hebben om empirisch het effect van een of meer varianten van het receptorbindingsdomein op de receptorbinding of infectiviteit te onderzoeken. Toonaangevende laboratoria voor coronavirusonderzoek doen dit al jaren om het potentieel van vleermuis-coronavirussen om mensen te infecteren te bestuderen, zoals hieronder beschreven.

Een typische aanpak is het synthetiseren van een chimeer coronavirus, meestal met spike-eiwit en de rest van het virus ("backbone") van verschillende vleermuis-, menselijke of andere bronnen, waarbij recombinatiegebeurtenissen worden gesimuleerd die van nature kunnen voorkomen. Hieronder staan enkele voorbeelden van deze en andere coronavirusmanipulaties om infectiviteit en virulentie te onderzoeken:

- In 2007 onderzochten wetenschappers van het WIV het menselijke ACE2-bindingspotentieel door het spike-eiwit van SARS-CoV en SARS-achtige-CoV's van vleermuizen te manipuleren en chimera's te construeren met verschillende sequenties van het SARS-CoV spike-eiwit ingevoegd in een backbone van SARS-achtige-CoV van vleermuizen (Ren et al., 2008). Ze identificeerden een minimale sequentie die het SARS-like-CoV spike-eiwit van vleermuizen omzette van niet-ACE2-bindend naar ACE2-bindend, wat aangeeft dat het verwerven van deze sequentie een soortsprong naar de mens mogelijk zou kunnen maken.
- Ook in 2007 pasten onderzoekers van de Universiteit van North Carolina, de National Institutes of Health en de Centers for Disease Control and Prevention SARS-CoV aan muizen aan door seriële passage, wat resulteerde in een stam die dodelijk was voor muizen (Roberts et al., 2007). Ze identificeerden 6 coderende mutaties die verband houden met aanpassing en virulentie en toonden hun effect aan door deze in SARS-CoV in te brengen en het fenotype opnieuw te creëren.
- In 2015 genereerde een samenwerking tussen de Universiteit van North Carolina en het WIV een chimeer virus met het spike-eiwit van een SARS-achtig-coronavirus in een (aan de muis aangepaste) SARS-CoV backbone en toonde aan dat de chimera menselijke luchtwegcellen kon infecteren (Menachery et al., 2015). Op basis van deze resultaten hebben ze ook het volledige vleermuis SARS-achtig coronavirus synthetisch opnieuw afgeleid en aangetoond dat het levensvatbaar was in menselijke luchtwegcellen en muizen. (Onderzoekers van de Universiteit van North Carolina kregen in 2018 patent op chimere coronavirus spike-eiwitten methoden [Barie et al., 2015]).
- In 2016 leidden onderzoekers van het WIV een samenwerking die een reeks chimere coronavirussen construeerde met de ruggengraat van het SARS-achtige vleermuis-CoV en varianten van het spike-eiwit van 8 andere SARS-achtige vleermuis-CoV's (die voor het eerst in deze studie werden gerapporteerd) (Hu et al., 2017). Al deze virussen konden de menselijke ACE2-receptor gebruiken om cellen binnen te dringen.

In de context van dit onderzoek zou SARS-CoV-2 gesynthetiseerd kunnen zijn door het combineren van een backbone van een coronavirus dat lijkt op RaTG 13 met het receptorbindingsdomein van een coronavirus dat lijkt op het coronavirus dat onlangs geïsoleerd is uit schubdieren. Dergelijk onderzoek zou gericht kunnen zijn geweest op het onderzoeken van schubdieren als mogelijke tussengastheren voor coronavirussen van vleermuizen die mogelijk pathogeen zijn voor mensen, en zou consistent zijn geweest met de langdurige lijn van onderzoeken die hierboven is beschreven.

1.2. Furine-splitsingsplaats

Andersen et al.: De verwerving van zowel de polybasische splitsingsplaats als de voorspelde O-gekoppelde glycanen pleit ook tegen scenario's op basis van kweek. Nieuwe polybasische splitsingsplaatsen zijn alleen waargenomen na langdurige passage van laagpathogene vogelgriepvirussen in vitro of in vivo. Bovendien zou een hypothetische generatie van SARS-CoV-2 door celkweek of passage door dieren de voorafgaande isolatie van een progenitorvirus met een zeer hoge genetische gelijkenis vereisen, wat niet is beschreven. De daaropvolgende generatie van een polybasische splitsingsplaats zou dan herhaalde passage in celkweek of dieren met ACE2-receptoren vergelijkbaar met die van mensen vereisen, maar dergelijk werk is ook niet eerder beschreven. Tot slot is het ook onwaarschijnlijk dat het genereren van de voorspelde O-gekoppelde glycanen heeft plaatsgevonden door passage in een celcultuur, omdat dergelijke kenmerken de betrokkenheid van een immuunsysteem suggereren.

Het centrale argument is dat voor het genereren van de furinesplitsingsplaats een stamvadervirus nodig zou zijn geweest, dat niet is gepubliceerd. Net als het eerste argument is ook dit niet gebaseerd op wetenschappelijke analyse, maar op de aanname dat het eerdere werk gepubliceerd zou zijn als het gedaan was. Het ontbreken van een publicatie betekent echter niet dat het onderzoek niet is gedaan. Misschien werden de experimenten afgebroken of niet gerapporteerd vanwege de uitbraak van SARS-CoV-2? Misschien waren de resultaten nooit bedoeld voor publicatie? In een recent voorbeeld van vertraagde publicatie van de COVID-19 pandemie meldden WIV-onderzoekers RaTG13 voor het eerst in januari 2020, maar ze verklaarden dat ze het virus in 2013 hadden ontdekt (Zhou et al., 2020).

Andersen et al. erkennen dat polybasische splitsingsplaatsen zijn ontstaan tijdens in vitro of in vivo passage met aviaire influenza. Daarom kan de mogelijkheid dat de SARS-CoV-2-furinesite is ontstaan tijdens passage in het laboratorium niet worden uitgesloten.

Dit is echter niet de enige mogelijke methode om een nieuwe furine-splitsingsplaats te genereren. Laboratoria hebben ook direct furine-splitsingsplaatsen in coronavirussen ingebracht. Bijvoorbeeld:

- Wetenschappers in de Verenigde Staten (Belouzard et al., 2009; Follis et al., 2006) en Japan (Watanabe et al., 2008) hebben furinesplitsingsplaatsen ingevoegd in het spikeiwit van SARS-CoV met behulp van pseudotypesystemen (een relatief veilige manier om gevaarlijke ziekteverwekkers te bestuderen, waarmee het spikeiwit van het coronavirus of envelopeiwitten van andere virussen kunnen worden geëvalueerd in de context van een ander virus zonder nakomelingen van het chimere virus te produceren).
- In 2015 onderzocht een samenwerking tussen de Universiteit van North Carolina en het WIV mutaties die HKU4, een MERS-CoV-gerelateerd vleermuis coronavirus, in staat zouden kunnen stellen mensen te infecteren. Omdat ze een furine-splitsingsplaats zagen die wel aanwezig was in MERS-CoV maar niet in HKU4, brachten ze een mutatie aan in het spike-eiwit van HKU4 die er een creëerde (in een pseudotypesysteem), en toonden ze aan dat het daardoor in staat was om gastheerprotease te gebruiken om menselijke cellen binnen te dringen (Yang et al., 2015).
- In 2019 construeerden onderzoekers van de China Agricultural University een infectieus bronchitisvirus (een vogel coronavirus) met een polybasische splitsingsplaats in het spikeiwit, en

toonden aan dat dit gemuteerde virus leidde tot een hogere mortaliteit bij kippen (Cheng et al., 2019).

Voortbouwend op het mogelijke oorsprongscenario beschreven aan het einde van paragraaf 3.1 hierboven, zou SARS-CoV-2 gesynthetiseerd kunnen zijn door het genereren van een polybasische splitsingsplaats in een chimeer virus met RaTG 13-achtige backbone en pangolin coronavirus-achtig receptor bindend domein (met aanvullende mutaties die ontstaan tijdens celcultuur of dierlijke aanpassing, zoals gebeurde met toenemende virulentie na passage van SARS-CoV in een muismodel [Roberts et al., 2007]).

Andersen et al. merken op dat de O-gekoppelde glycanen die worden voorspeld om de polybasische splitsingsplaats te flankeren, pleiten tegen een op celweek gebaseerd laboratoriumscenario. O-gekoppelde glycanen kunnen helpen bij het afschermen van een brede verzameling virussen, waaronder coronavirussen, tegen het immuunsysteem van de gastheer en ontstaan gewoonlijk onder immuunselectie, wat niet zou gebeuren in celweek. De glycanen zouden echter kunnen zijn ontstaan in dierproeven in plaats van celweekproeven. Er is een ruim precedent voor het gebruik van diermodellen in coronavirusonderzoek, zoals de inoculatie van ratten met vleermuis SARS-achtige CoV's, geleid door China's Derde Militaire Medische Universiteit (Hu et al., 2018), en verschillende van de eerder genoemde inspanningen. Schubdieren, of andere dieren met een vergelijkbare ACE2-conformatie, hadden gebruikt kunnen worden in dergelijke in vivo experimenten. (We merken ook op dat sommige vooronderzoeken bewijs hebben gevonden voor de O-gekoppelde glycanen voorspeld door Andersen et al. [Shajahan et al., 2020], terwijl anderen dat niet hebben [Walls et al., 2020]).

1.3. Systeem voor omgekeerde genetica

Andersen et al.: *Als er genetische manipulatie was uitgevoerd, zou waarschijnlijk een van de verschillende reverse-genetische systemen voor betacoronavirussen zijn gebruikt. De genetische gegevens tonen echter onweerlegbaar aan dat SARS-CoV-2 niet is afgeleid van een eerder gebruikte virusbackbone.*

Benaderingen met omgekeerde genetica proberen de fenotypische effecten van een genotype te begrijpen (in tegenstelling tot voorwaartse genetica, die begint met een fenotype en de genetische basis ervan onderzoekt). Wetenschappers hebben reverse genetics systemen ontwikkeld voor SARS-CoV, vleermuis SARS-achtige-CoV's en andere menselijke en dierlijke coronavirussen (Almazan et al., 2014). Deze systemen worden gebruikt om coronavirussen te synthetiseren zodat specifieke genoomsequenties en -regio's kunnen worden gemanipuleerd, en hebben veel van de eerder genoemde onderzoeken mogelijk gemaakt.

Het is duidelijk dat SARS-CoV-2 niet afkomstig is van een gepubliceerd coronavirus reverse genetics systeem, aangezien het virus niet goed overeenkomt met een CoV backbone die gebruikt is in een gepubliceerde studie. Zoals opgemerkt in paragraaf 3.2 betekent het ontbreken van een gepubliceerd rapport echter niet dat de studie niet is uitgevoerd. In de 6 jaar voor de COVID-19 uitbraak is het aantal potentiële vleermuis SARS-achtige CoV backbones toegenomen door coronavirus ontdekkingsinspanningen, zoals die van het WIV (Ge et al., 2013; Ge et al., 2016; Hu et al., 2017). Sommige reverse genetics-systemen voor coronavirussen leveren synthetische virussen op die genetisch

identiek zijn aan het originele virus (Almazan et al., 2014), zoals het systeem dat in 2002 is ontwikkeld aan de Universiteit van North Carolina (Yount et al., 2002).

Recente technologische innovaties maken het voor wetenschappers gemakkelijker dan ooit om nieuwe reverse genetics systemen te ontwikkelen. Zo gebruikten onderzoekers van de Huazhong Agricultural University in april 2019 CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) gene editing technologie bij de eerste directe in vitro manipulatie van full-length coronavirus cDNA (waaruit het virus is reverse-engineered) (Wang et al., 2019). De auteurs merkten op dat hun reverse genetics-platform "de constructie van mutante besmettelijke klonen zal vereenvoudigen en de vooruitgang in coronavirusonderzoek zal helpen versnellen."

Een andere illustratie van de moderne mogelijkheden komt van de COVID-19 pandemie: verschillende laboratoria hebben al SARS-CoV-2 gesynthetiseerd met behulp van reverse genetics-systemen die ze ontwikkelden binnen enkele weken na publicatie van de eerste genoomsequentie (Thao et al., 2020; Xie et al., 2020).

2. **Conclusie.** De argumenten die Andersen et al. gebruiken om een natuurlijk oorsprongscenario voor SARS CoV-2 te ondersteunen zijn niet gebaseerd op wetenschappelijke analyse, maar op ongerechtvaardigde aannames. Een lange reeks onderzoeken toont aan dat toonaangevende coronaviruslaboratoria niet werken zoals beschreven in het laboratoriumoorsprongscenario dat Andersen et al. overwegen en verwerpen. SARS-CoV-2 - een vleermuis-coronavirus met een pangolin coronavirus receptor bindend domein - komt overeen met de chimere constructen die deze laboratoria hebben ontwikkeld en bestudeerd gedurende meer dan een decennium. Hoewel belangrijke onderdelen van een laboratoriuminspanning die resulteerde in SARS-CoV-2, zoals het genereren van de furin splitsingsplaats en de ontwikkeling van een nieuw reverse genetics systeem, niet zijn gerapporteerd, bewijst dit niet dat ze niet hebben plaatsgevonden. Coronavirusonderzoekers hebben deze studies uitgevoerd voor andere coronavirussen; technisch gezien zouden ze niet moeilijk zijn geweest. Het recente RaTG13 rapport toont aan dat coronavirusonderzoekers niet al hun onderzoek publiceren op het moment dat het wordt uitgevoerd.

Deze kritiek op de argumenten van Andersen et al. is niet bedoeld om aan te tonen dat SARS-CoV-2 in een laboratorium is ontstaan, laat staan om een specifieke laboratoriumbron te identificeren of om de doelen van het onderzoek dat het virus zou kunnen hebben voortgebracht te karakteriseren.

Wij benadrukken dat de kenmerken van SARS-CoV-2, die Andersen et al. hebben opgemerkt, consistent zijn met langdurige en lopende laboratoriumexperimenten; het bewijs dat Andersen et al. presenteren doet niets af aan de aannemelijkheid van de oorsprong in een laboratorium.

3. Referenties

- Almazan F, GonzalezJM, Penzes Z. Coronavirus reverse genetic systems: Infectious clones and replicons. *Virus Res.* 2014; 189: 262-270. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4727449/>
- Andersen KG, RambautA, Lipkin WI, Holmes, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Virological.org* 2020a. <http://virological.org/t/the-proximal-origin-of-sars-cov-2/398>
- Andersen KG, RambautA, Lipkin WI, Holmes, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med.* 2020b; 26: 450-452. <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0820-9>
- Barie R, Agnihothram S, Yount B. Methods and compositions for chimeric coronavirus spike proteins. US Patent US9884895B2. 2018. <https://patentimages.storage.googleapis.com/ba/78/39/b9581f7e428f61/US9884895.pdf>
- Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:5871-5876. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2660061/>
- Braun E, Sauter D. Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer. *Clin Transl Immunology* 2018; 8:e1073. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6682551/>
- Calisher C, Carroll D, Colwell R, Corley RB, Daszak P, Drosten C, et al. Statement in support of the scientists, public health professionals, and medical professionals of China combatting COVID-19. *Lancet* 2020; 295:E42-E43. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30418-9/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30418-9/fulltext)
- ChengJ, Zhao Y, Xu G. The S2 Subunit of QX-type infectious bronchitis coronavirus spike protein is an essential determinant of neurotropism. *Viruses* 2019; 11: 10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6832359/>
- Collins F. Genomic study points to natural origin of COVID-19. *NIH Director's Blog* 2020. <https://directorsblog.nih.gov/2020/03/26/genomic-research-points-to-natural-origin-of-covid-19/>
- Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020; 176: 104742. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7114094/>
- Fiorni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Molecular evolution of human coronavirus genomes. *Trends Microbiol* 2017; 25:35-48. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7111218/>
- Follis KE, York J, NunbergJH. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect viral entry. *Virology* 2006; 350:358-369. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7111780/>
- Ge XY, Li JL, Yang XL, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature* 2013; 503:535-538. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5389864/>

Ge XV, Wang N, Zhang W et al. Coexistence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Viral Sin.* 2016; 31: 31-40.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7090819/>

Hoffman M, Hoffman-Winkler H, Pohlmann S. Priming time: how cellular proteases arm coronavirus spike proteins. *Activation of Viruses by Host Proteases* 2018 Feb 16:71-98.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7122371/>

Hoffman M, Kleine-Weber H, Pohlmann S. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection in human lung cells. *Molecular Cell* 2020.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276520302641>

Hu B, Zeng L-P, Yang X-L, 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.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5708621/>

Hu D, Zhu C, Ai L, et al. Genomic characterization and infectivity of a novel SARS-like coronavirus in Chinese bats. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7: 154.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6135831/>

Lau SY, Wang P, Mok B W-Y, et al. Attenuated SARS-CoV-2 variants with deletions at the SI/S2 junction. *Emerg Microbes Infect.* 2020. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1756700>

Menachery VD, Yount BL, Debbink K, et al., A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature Medicine.* 2015; 21: 12.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4797993/>

Nao N, Yamagishi J, Miyamoto H, et al. Genetic predisposition to acquire a polybasic cleavage site for highly pathogenic avian influenza virus hemagglutinin. *mBio* 2017; 8:e02298-16.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5312086/>

Ren W, Qu X, Li W, et al., Difference in Receptor Usage between Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) Coronavirus and SARS-Like Coronavirus of Bat Origin. *J Viral*, 2008 Feb; 82(4): 1899-1907.

<https://jvi.asm.org/content/82/4/1899>

Roberts A, Deming D, Paddock CD, et al. A mouse-adapted SARS-coronavirus causes disease and mortality in BALB/cmise. *PLoS Pathog* 2007; 3:e5.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1769406/>

Shajahan A, Supekar N, Gleinich A, Azadi P. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *bioRxiv* 2020.

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.01.020966v1>

Thao TT, Labroussa F, Ebert N, et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* 2020. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2294-9>

Walls A, Park Y-J, Tortorici M, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. Cell 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102599/>

Wang G, Liang R, Liu Z, et al. The N-terminal domain of spike protein is not the enteric tropism determinant for transmissible gastroenteritis virus in piglets. Viruses 2019; 11:313. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6520731/>

Wang Q, Qiu Y, Li J-Y, et al. A unique protease cleavage site predicted in the spike protein of the novel pneumonia Coronavirus (2019-nCoV) potentially related to viral transmissibility. Viral Sin. 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7091172/>

Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, et al. Entry from the cell surface of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein. J Virol 2008; 82:11985-11991. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2583654/>

Xiao K, Zhai J, Feng Y, et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. Nature 2020. <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2313-x>

Xie X, Murata A, Lokugamage K, et al. An infectious cDNA clone of SARS-CoV-2. Cell Host Microbe 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7153529/>

Xu S, Li X, Yang J, et al. Comparative Pathogenicity and Transmissibility of Pandemic H1N1, Avian H5N1, and Human H7N9 Influenza Viruses in Tree Shrews. Front. Microbiol 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6933948/>

Yang Y, Liu C, Du L, et al. Two mutations were critical for bat-to-human transmission of Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. J Virol 2015; 89:9119-9123. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4524054/>

Yount B, Denison MR, Weiss SR, Barie RS. Systematic assembly of full-length infectious cDNA of mouse hepatitis virus strain A59. J Virol 2002; 76:11065-11078. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC136593/>

Zhan SH, Deverman BE, Chan YA. SARS-CoV-2 is well adapted for humans. What does this mean for re-emergence? bioRxiv 2020. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.05.01.073262v1>

Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature 2020; 579:270-273. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7095418/>