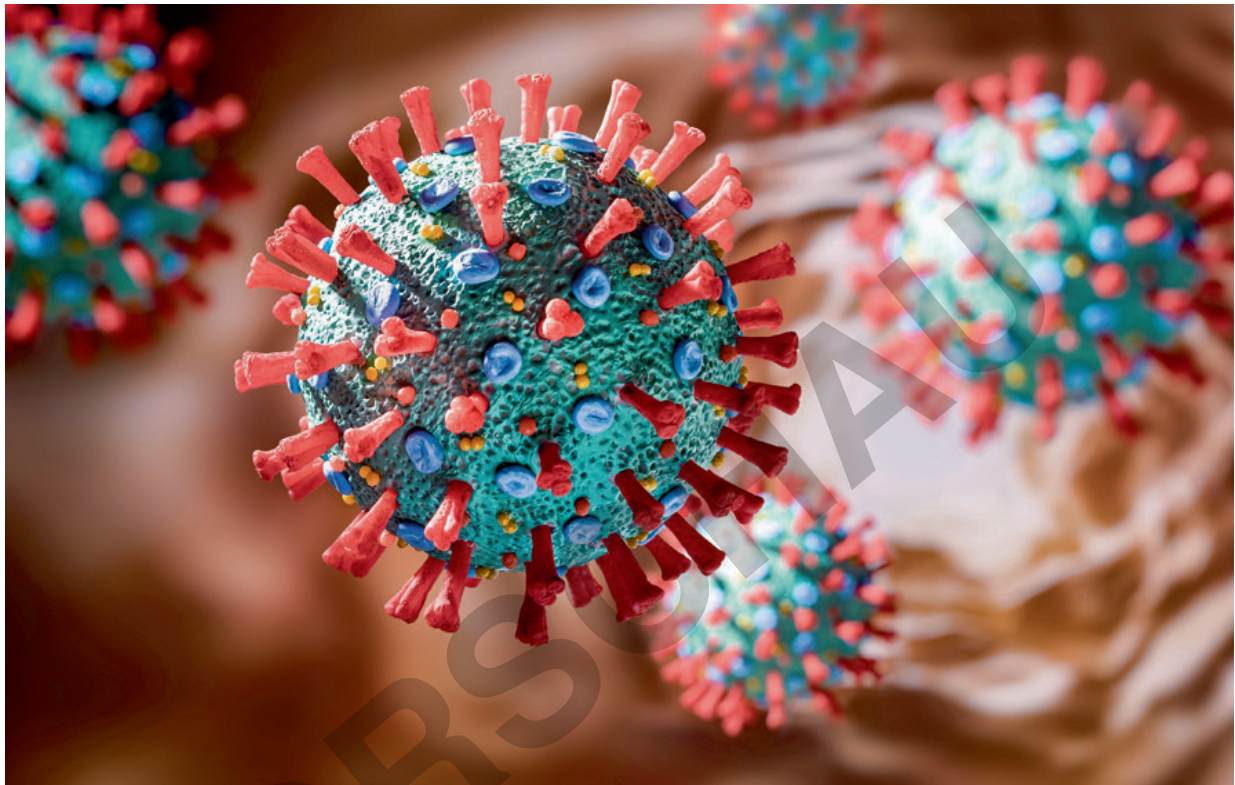


SARS-CoV-2 – Zoonose oder Biowaffe?

Autor: Dr. Horst Lohrer



© Grafissimo/E+

Im Jahr 2000 waren vier Coronaviren bekannt, die beim Menschen milde Erkältungskrankheiten auslösen. 2002 erschien SARS-CoV, 2012 folgte MERS-CoV, die beide zahlreiche Todesopfer forderten. Ende 2019 trat SARS-CoV-2 erstmalig in China auf. Innerhalb von zwei Monaten hatte sich das Virus weltweit verbreitet und Ende Oktober 2020 sind bereits mehr als eine Million Menschen weltweit der Krankheit COVID-19 erlegen. In dieser Einheit erfahren die Schüler mehr über die Familie der Coronaviren und deren Verwandtschaft und beschäftigen sich intensiv mit verschiedenen Aspekten von SARS-CoV-2 von dessen Aufbau über Hypothesen seiner Entstehung bis hin zum molekularbiologischen Hintergrund des Virusnachweises sowie der Möglichkeit von Sequenzvergleichen inklusive derer Analysen. Die Frage, ob die Entstehung von SARS-CoV-2 das Ergebnis einer zufälligen natürlichen Rekombination war oder ob künstliche Methoden seine bewusste Erzeugung befördert haben, beschäftigt nach wie vor viele Menschen. Die Lernenden erfahren, dass eine genaue Betrachtung des Genoms von SARS-CoV-2 nur eine natürliche Entstehung als Erklärung zulässt.

SARS-CoV-2 – Zoonose oder Biowaffe

Niveau: Weiterführend.

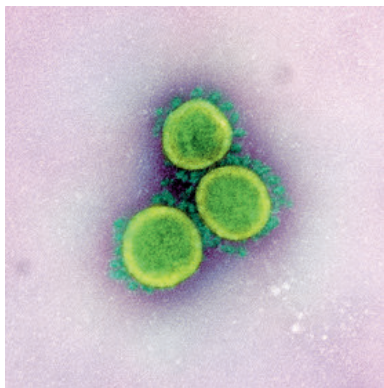
Autor: Dr. Horst Lohrer

Methodisch-didaktische Hinweise	1
M 1 Coronaviren – ein Überblick	3
M 2a Epidemiologie und ihre charakteristischen Daten	6
M 2b Pathologie und Symptome von COVID-19	12
M 2c Aufbau, Replikation und Mutation von SARS-CoV-2	14
M 2d Nachweis des Virus	22
M 3 Stammbaum der Coronaviren	25
M 4 Zoonose oder Biowaffe	30
Glossar	38
Lösungen	40
Literaturverzeichnis	50

VORSCHAU

M 1 Coronaviren – ein Überblick

Die Coronaviren des Menschen wurden 1965 von David A. J. Tyrrell entdeckt. Die ersten beiden genauer untersuchten Coronaviren des Menschen (HCV, *Human Corona Virus*) waren HCV-229E und HCV-OC43. Wenig später wurden Coronaviren auch in Rindern, Schweinen, Katzen, Hunden und Mäusen gefunden. Sie alle lösen Erkältungssymptome aus, nur bei Katzen kann es gelegentlich zu einer tödlichen Organschädigung kommen. Viele Wirbeltiere beherbergen Coronaviren ohne Symptome zu zeigen. Insbesondere Fledermäuse sind solche natürlichen Wirte von Coronaviren und verteilen sie weltweit.



wikimedia commons/National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)/CC BY 2.0

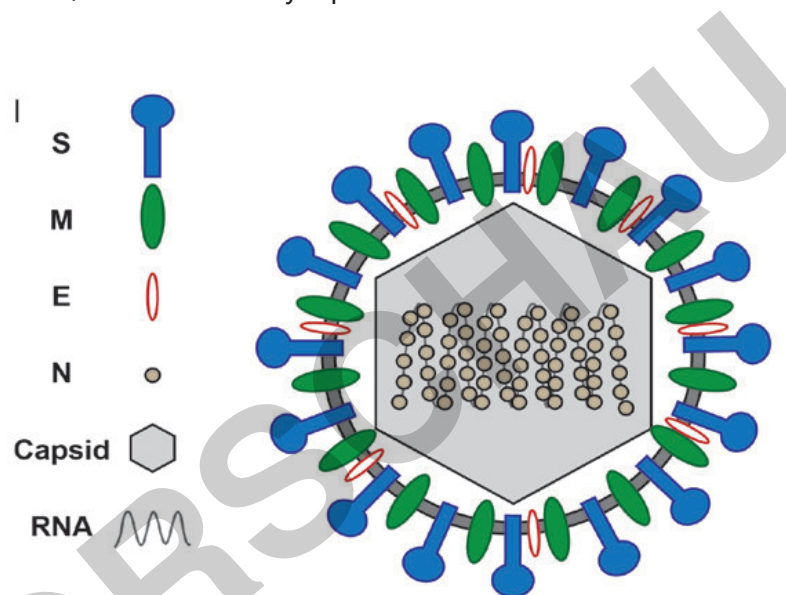
„Coronavirus“ leitet sich von elektronenmikroskopischen Bildern des kugelförmigen Virus ab, dessen Oberfläche von langstieligen pilzförmigen Proteinen besetzt ist, die einen hell-leuchtenden Ring (Krone, lat.: *corona*) erzeugen. 2002 kam es in China und Hongkong zum Ausbruch einer ersten Erkrankung der Atemwege (SARS, *Severe Acute Respiratory Syndrome*) mit häufig tödlichem Ausgang. Das auslösende Virus wurde als Coronavirus identifiziert und **SARS-CoV** genannt. Es infizierte weltweit ca. 8000 Personen, wovon 774 starben. Sequenzvergleiche mit damals bekannten

Coronaviren ergaben, dass SARS-CoV durch spontane Mutationen eines Fledermaus-Coronavirus entstand und über Civet Katzen als Zwischenwirt auf den Menschen übersprungen war. Eine Epidemie und folgende Pandemie konnten entstehen, weil SARS-CoV von Mensch zu Mensch übertragen wurde. Nach etwa vier Monaten waren die ersten tausend Menschen infiziert. Dies gab den Gesundheitsbehörden Zeit die verschiedenen Ausbruchs-Cluster zu isolieren und das Virus zu beseitigen. Kaum zehn Jahre später entstand ein Coronavirus, das im Mittleren Osten eine ernste Lungenentzündung (ARDS, *Acute Respiratory Distress Syndrome*) auslöste. Es wurde **MERS-CoV** (*Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus*) genannt und infizierte in drei Jahren ca. 2000 Personen, wovon über 700 starben. Es stammte ebenfalls aus Fledermäusen und wurde über Kamele als Zwischenwirt auf den Menschen übertragen. Es war nicht sehr infektiös, erst nach mehr als 2,5 Jahren waren die ersten tausend Personen infiziert. Bei einer Todesrate von 40 % war die langsame Ausbreitung ein Glücksfall.

© RAABE 2020

M 2c Aufbau, Replikation und Mutation von SARS-CoV-2

Die SARS-CoV-2-Viruspartikel sind rundliche Gebilde, deren äußerste Schicht von einer Biomembran gebildet wird. In der Membranhülle befinden sich pilzförmige S-Glycoproteine (S für *spike*), M-Proteine (M für *membrane*) und eine geringe Zahl E-Proteine (E für *envelope*). Innerhalb der Hülle befindet sich das Erbmateriale aus einem RNA-Einzelstrang positiver Orientierung ((+)RNA) mit einer Länge von ca. 30.000 Nukleotiden. Das virale Genom bildet mit N-Phosphoproteinen (N für *nukleocapsid*) eine helikale Struktur und ist in einer Kernstruktur (Capsid) eingebunden, die durch M-Glycoproteine mit der Hülle eine stabile Struktur bilden.



Schema eines Coronavirus. (Grafik: Sylvana Timmer; verändert nach Knipe, S 643).

Die Aufgaben der einzelnen Strukturproteine sind:

Das **S-Glycoprotein** (CDS (*coding sequence*) Position im Genom 21.563 – 25.384; 1273 Aminosäuren (aa)) bildet lange blütenblätterartige Ausläufer auf der Hülle. Der N-Terminus außerhalb der Hülle bildet eine globuläre Struktur und enthält eine Sequenz von ca. 200 Aminosäuren, die spezifisch an den ACE2-Rezeptor der Wirtszelle binden (RBD, *receptor binding domain*). Mutationen in diesem Bereich wurden mit Änderungen der Wirtsspezifität und der Pathogenität in Verbindung gebracht. Funktionell ist das S-Protein nur als Komplex aus drei Molekülen (Trimer). Das S-Protein ist daneben noch für die Fusion der Virushülle mit der Cytoplasmamembran des Wirtes verantwortlich und leitet damit die

M 2d Nachweis des SARS-CoV2-Virus

Die Existenz des SARS-CoV-im Patienten kann durch zwei Methoden nachgewiesen werden:

Nachweis eines Antigens aus der Virushülle:

Der Nachweis des Antigens wird durch den enzymgekoppelten Immunsorptionsstest (**ELISA**, *enzyme-linked immunoabsorbent assay*) durchgeführt. Dabei wird das virale Antigen durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen, der kovalent mit einem Enzym einer Farbreaktion verknüpft ist. Zur Durchführung des Tests werden Proteine aus dem Blut eines Patienten an die Oberfläche eines Reaktionsgefäßes gebunden. In das Reaktionsgefäß wird nun eine Lösung des spezifischen Antikörpers gegeben und die Bedingungen so gewählt, dass der Antikörper nur an das virale Antigen bindet. Die überschüssigen Antikörper werden ausgewaschen. Die gebundenen spezifischen Antikörper gegen das virale Antigen lassen sich durch eine Farbreaktion nachweisen. ELISA kann abgewandelt werden, indem nicht die viralen Antigene, sondern spezifische vom Immunsystem des Infizierten gebildete Antikörper gegen das SARS-CoV-2 nachgewiesen werden. Dieser Test hat den Vorteil auch Monate nach der überstandenen Krankheit bei Infizierten mit milden oder keinen Symptomen, die Infektion nachweisen zu können. Der Nachteil von ELISA liegt generell in seiner relativen Unempfindlichkeit.

Nachweis des viralen RNA-Genoms:

Mithilfe von **real-time RT-PCR** kann das Virusgenom nachgewiesen werden. „Real time“, weil der Nachweis des Virus während des Tests erfolgt und nicht durch ein angeschlossenes Testverfahren. „RT“, weil das Genom von SARS-CoV-2 aus RNA besteht und durch das Enzym Reverse-Transkriptase (RT) erst in DNA umgeschrieben werden muss, damit der Prozess der PCR (*polymerase chain reaction*) ablaufen kann. Der Test erlaubt eine eindeutige Diagnose auch bei komplexen Symptomen. Bei der PCR werden die Teströhrchen in einem sogenannten Thermo-Cycler in Sekundenschnelle durch eine Abfolge von Temperaturschritten geführt. Zunächst erfolgt bei 95 °C für etwa 45 Sekunden die Denaturierung. In dieser Phase wird die Doppelstrang-DNA durch die Trennung der Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen in eine einzelsträngige Form

M 4 Zoonose oder Biowaffe?

Zu Beginn der SARS-CoV-2-Pandemie im Februar 2020 schien die Herkunft dieses neuen Virus eindeutig: Auf dem Fisch- und Tiermarkt Huanan in Wuhan wurde eine Person von einem Virus infiziert. Das Virus wurde von Mensch-zu-Mensch und letztlich weltweit verbreitet. Ende Oktober 2020 war die Zahl der weltweit Infizierten auf 43 Millionen angestiegen von denen 1,2 Millionen verstorben waren.. Alle von Patienten isolierten SARS-CoV-2 waren bis auf wenige Mutationen identisch. Der Vergleich von SARS-CoV-2 mit anderen menschlichen oder tierischen Coronaviren zeigte große Unterschiede der RNA-Sequenz. Nur ein Coronavirus aus Fledermäusen war ausreichend ähnlich, um als Ausgangspunkt für SARS-CoV-2 gelten zu können.

Für eine Infektion des Menschen muss das Erkennungsmolekül des Fledermausvirus (S-Protein mit RBD) an den menschlichen ACE2-Rezeptor binden können, damit die Fusion der Virushülle mit der Cytoplasmamembran der Wirtszelle geschehen kann. Die RBD der Fledermaus passt nicht auf den ACE2-Rezeptor des Menschen, wodurch eine Infektion fast unmöglich ist. Doch die RBD des Schuppentieres (Pangolin) würde auf den menschlichen ACE2-Rezeptor passen. Der Pangolin ist in China fast ausgerottet, wird aber illegal aus Südostasien eingeführt, da seine Schuppen in der traditionellen chinesischen Medizin vielfältig eingesetzt werden. Ein natürlicher Austausch der Fledermaus-RBD mit derjenigen des Schuppentieres kann bei Doppelinfektionen eines Tieres bei gemeinsamer Haltung dieser Tiere in engen Verhältnissen geschehen. Die Tatsache, dass ein Tiger im Zoo von New York mit SARS-CoV-2 infiziert wurde, zeigt, dass das Virus auch andere Arten infizieren kann und somit Doppelinfektionen verschiedener Viren möglich sind.

Wird eine Genomsequenz durch Rekombination von einer Art in eine andere übertragen, ist in der betreffenden Region die Identität mit der Herkunftsspezies höher als mit dem Genom des Empfängers. Das Programm SimPlot 3.5.15 streicht mit einem Fenster von 400 Nukleotiden über ein Alignment und bestimmt alle 50 Nukleotide die Ähnlichkeit der Sequenzen in dem Fenster. Dieser Wert kann in ein Diagramm abhängig von der Position der *Query*-Sequenz eingetragen werden. Dadurch werden Inhomogenitäten entlang des Alignments sichtbar, die Folge von Rekombination von genetischem Material sein können. Der Vergleich verschiedener Coronaviren ergibt eine Karte möglicher Rekombinationen ihres Genoms.

Glossar

Alignment – Grundlage jeder Sequenzanalyse; Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen werden untereinander angeordnet, sodass möglichst viele identische Positionen entstehen.

Antigen – Meist ein Protein, das vom Immunsystem als körperfremd erkannt wird.

CAP – Nach der Transkription wird an den 5'-Anfang der RNA eine Modifikation aus einem 7-Methylguanotin-Nukleotid angefügt.

Capsid – Eine aus Proteinen und Nukleinsäuren aufgebaute ikosaedrische oder helikale Struktur von Viren.

Epitop – Eine dem Immunsystem zugängliche Struktur im Antigen (Antigene Determinante).

homolog – DNA- oder Proteinsequenzen, die sich auf ein Ur-Gen eines gemeinsamen Vorfahren zurückführen lassen, sind homolog; sinkt die Ähnlichkeit zwischen zwei Sequenzen unter 20 %, liegt keine Homologie vor.

Inzidenz – Anzahl neuer Erkrankungsfälle in einer Zeiteinheit.

Leader – (engl. führen, leiten) Sequenz am Anfang von Proteinen oder Transkripten.

Leserahmen – (*reading frame*) Bereich eines Gens, der in eine Proteinsequenz übersetzt wird; beginnend mit AUG für Methionin werden immer Codons aus 3 Basen abgearbeitet bis ein Stopp-Codon kommt.

Leseraster – Eine von drei Möglichkeiten eine Nukleinsäuresequenz in Codons zu ordnen und in eine Aminosäuresequenz zu übersetzen.

Letalität – Zahl der Todesfälle im Verhältnis zur Zahl aller Erkrankungen.

Morbidität – Anzahl von Erkrankungen bezogen auf die Gesamtzahl der Bevölkerung in einem bestimmten Zeitraum.

Mortalität – Anzahl der Todesfälle auf Grund einer bestimmten Krankheit bezogen auf die Gesamtzahl der Bevölkerung in einem bestimmten Zeitraum.

Nukleocapsid – Komplex aus Capsidproteinen und dem Virus-Genom.

Parsimonie – das Prinzip der geringsten Zahl evolutionsbiologischer Veränderungen zur Ableitung eines Stammbaumes heranzuziehen.

Pathogenität – Fähigkeit von Viren (Bakterien, Parasiten) eine Krankheit auszulösen.