



Facultad de Biología
Universidad de Sevilla



Grado Bioquímica

Bases celulares de la infección por SARS-CoV-2

Trabajo Fin de Grado

Yolanda Orta Enríquez

Sevilla, julio 2023



Resumen

La emergencia sanitaria que ha supuesto la pandemia de COVID-19 ha sido un desafío para la sociedad en todos los ámbitos y un obstáculo a contrarreloj a superar por la comunidad científica. SARS-CoV-2, virus causante de esta enfermedad, ha sido ampliamente estudiado en estos últimos años ante la inminente necesidad de la búsqueda de tratamientos y vacunas. Gran parte de la literatura científica se ha centrado, con criterio, en la descripción exhaustiva de la proteína spike (S) y las mutaciones que dan lugar a las diferentes variantes. Además, hay múltiples estudios sobre el mecanismo de entrada de SARS-CoV-2 y la unión de la proteína S al receptor celular ACE2. En este trabajo se describe la estructura del patógeno y cómo sus proteínas interactúan con la maquinaria celular para ponerla a su disposición y producir nuevos virus. En concreto, se detalla la síntesis de proteínas víricas mediante la vía secretora de la célula hospedadora y cómo el patógeno moldea esta maquinaria, altamente conservada a lo largo de la evolución, para el adecuado plegamiento, ensamblaje y transporte de proteínas. Las interacciones entre las proteínas del virus y los componentes celulares de esta ruta presentan posibles dianas terapéuticas antivirales para frenar o bloquear la biogénesis de SARS-CoV-2 y otros virus en posibles estudios futuros debido a la importancia de la vía secretora en el ensamblaje, maduración y liberación de nuevas partículas víricas con capacidad infectiva.

Palabras clave: COVID-19, SARS-CoV-2, vía secretora, diana terapéutica antiviral.

Abstract

The health emergency caused by the COVID-19 pandemic has posed a challenge to society in all areas and has been a race against time for the scientific community to overcome. SARS-CoV-2, the virus responsible for this disease, has been extensively studied in recent years due to the imminent need for treatments and vaccines. A significant portion of the scientific literature has wisely focused on the comprehensive description of the spike (S) protein and the mutations that give rise to different variants. Moreover, there are numerous studies on the entry mechanism of SARS-CoV-2 and the binding of the S protein to the cellular receptor ACE2. This work describes the structure of the pathogen and how its proteins interact with the cellular

machinery to make it available and produce new viruses. Specifically, the synthesis of viral proteins through the host cell's secretory pathway and how the pathogen shapes this highly conserved machinery throughout evolution for proper folding, assembly, and protein transport are detailed. The interactions between the viral proteins and the cellular components of this pathway present potential therapeutic targets for antiviral intervention to inhibit or block the biogenesis of SARS-CoV-2 and other viruses in future studies due to the importance of the secretory pathway in the assembly, maturation, and release of new infectious viral particles.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
CoV	Coronavirus
HCoV	Coronavirus humano
gRNA	Genoma de RNA
ORF	Marco de lectura abierto
S	Proteína spike
M	Proteína de membrana
E	Proteína de envoltura
N	Proteína de nucleocápside
Nsp	Proteína no estructural
Orf	Proteína accesoria
RTC	Complejo de replicación-transcripción
RBD	Dominio de unión al receptor
FP	Péptido fusión
FPPR	Región proximal del péptido fusión
HR	Región heptamérica
TM	Segmento transmembrana
CT	Cola citosólica
CTD	Dominio C-terminal
NTD	Dominio N-terminal
ACE2	Enzima convertidora de angiotensina 2
ER	Retículo endoplasmático
ERGIC	Compartimento intermedio ER-Golgi
GC	Aparato de Golgi

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ESTRUCTURA DE SARS-COV-2.....	9
Taxonomía.....	9
Genoma y transcripción de SARS-CoV-2	10
Proteínas estructurales de SARS-CoV-2	13
Proteína de membrana (M).....	13
Proteína de envoltura (E)	14
Proteína de la nucleocápside (N)	14
Proteína spike (S)	14
3. MECANISMO DE INFECCIÓN DE SARS-COV-2	16
Receptor de SARS-CoV-2: ACE2	16
Entrada del virus a la célula	17
Vía secretora	21
Interacción de las proteínas de SARS-CoV-2 con la vía secretoria.....	22
Alteraciones celulares por SARS-CoV-2	23
4. POSIBLES DIANAS FRENTE A SARS-COV-2	25
5. CONCLUSIONES.....	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

INTRODUCCIÓN

SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) es un β -Coronavirus (β -CoV), patógeno zoonótico responsable de la enfermedad COVID-19, patología respiratoria inusual que surgió en Wuhan (China) a finales de 2019. El 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la situación como “Emergencia de Salud Pública de Importancia Internacional” (ESPII) y el 11 de marzo se anunció que el brote de COVID-19 había alcanzado un nivel global de propagación y, oficialmente, se consideró como pandemia (Bhat et al., 2021).

Esta enfermedad se transmite entre humanos por las gotas respiratorias y, en menor medida, a través de aerosol, transmisión fecal-oral y el contacto directo con superficies contaminadas (Figura 1) (Harrison et al., 2020). El virus entra en el organismo por el tracto respiratorio y causa síntomas similares a la gripe, tales como fiebre, tos, disnea, dolor de cabeza, además de problemas gastrointestinales. Los casos más graves evolucionan a neumonía, fallo renal y muerte. Asimismo, pueden aparecer síntomas menos comunes entre las enfermedades provocadas por otros SARS como la inflamación del miocardio, encefalitis, coágulos o sarpullidos, entre otros (Jadaun and Chatterjee, 2022).

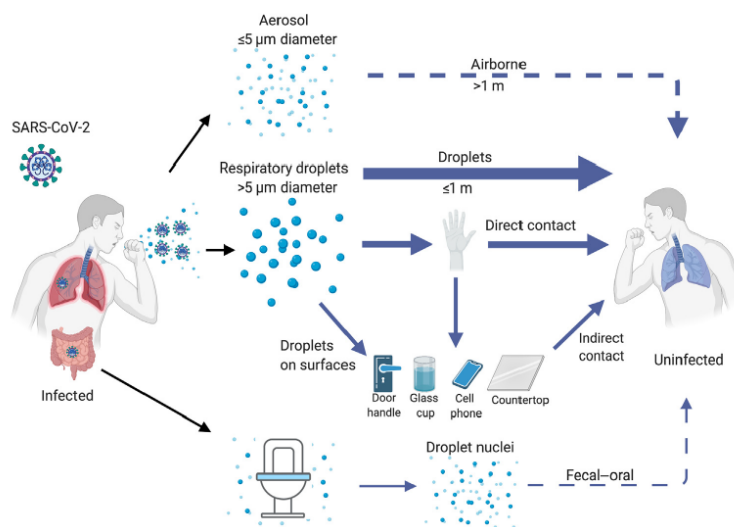


Figura 1: Mecanismos de transmisión de SARS-CoV-2 entre humanos mediante gotas respiratorias, contacto con superficies contaminadas, aerosoles y transmisión fecal-oral (Harrison et al., 2020).

COVID-19 es la tercera epidemia grave causada por coronavirus. La primera ocurrió en 2002 por SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) y la segunda, en 2012, por MERS (Middle East Respiratory Syndrome). Hay que destacar que el patógeno SARS-CoV-2 es menos letal que SARS-CoV-1 y MERS-CoV, su severidad se debe a la facilidad y rapidez de transmisión, a los largos periodos de incubación y la existencia de variantes asintomáticas de COVID-19 que dificultan el seguimiento de la enfermedad (Gusev et al., 2022).

En la biogénesis de cualquier virus de RNA el primer paso es la adsorción y penetración en la célula hospedadora. SARS-CoV-2 reconoce el receptor ACE2 en las membranas plasmáticas celulares a través de la proteína spike (S), una glicoproteína transmembrana ampliamente distribuida sobre la superficie de la envoltura del virión (Mironov et al., 2023). Una vez en el interior celular, se procede al desnudamiento, el genoma del virus se libera en el citoplasma. Este tipo de patógenos reprograma todos los mecanismos celulares para la expresión y replicación de su material genético. A través de los procesos celulares se sintetizan las diferentes proteínas víricas y mediante la ruta de exocitosis se procede al ensamblaje y maduración de las partículas virales para, posteriormente, liberar nuevos virus que propaguen la infección.

Ante la emergencia sanitaria del COVID-19 que nos ha sacudido en estos últimos años, la bibliografía científica sobre este microorganismo patógeno se ha desarrollado extensamente. En este trabajo se describe la estructura de SARS-CoV-2 y las interacciones entre sus proteínas y los elementos de la vía secretora celular. Debido a la relevancia que tiene esta ruta en el ciclo viral es posible estudiar diferentes dianas terapéuticas viables para nuevos tratamientos frente a SARS-CoV-2 y otros virus (Jackson et al., 2022; Sicari et al., 2020).

ESTRUCTURA DE SARS-COV-2

Taxonomía

El patógeno SARS-CoV-2 se clasifica dentro de la taxonomía de virus en el reino *Riboviria*, orden *Nidovirales*, suborden *Cornidovirineae*, en la familia *Coronaviridae* y la subfamilia *Orthocoronavirinae* (Kirtipal et al., 2020). Esta subfamilia la conforman los denominados coronavirus (CoVs). Se caracterizan por ser virus con envoltura que infectan a diversos mamíferos y aves, con un genoma entre 27-32 kb de RNA de cadena simple y sentido positivo (+ssRNA), siendo así de los genomas más largos entre los virus de RNA. Pueden tener forma esférica, oval o pleomórfica y su diámetro oscila entre 60-140 nm (Kadam et al., 2021). Reciben ese nombre porque, observando al microscopio electrónico, la gran cantidad de glicoproteínas spike que están embebidas en su envoltura le dan la impresión de una corona solar (Bhat et al., 2021; Ravi et al., 2022).

En función de sus características genóticas y serológicas los CoVs se dividen en cuatro géneros: AlphaCoV, BetaCoV, GammaCoV y DeltaCoV. Dentro de esta clasificación se encuentran los coronavirus humanos (HCoVs) que originan diferentes enfermedades respiratorias. Se han identificado 7 coronavirus que pueden infectar a humanos: HCoV-229E y HCoV-NL63 son AlphaCoV, mientras que, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, SARS-CoV y MERS-CoV pertenecen al género BetaCoV (Kirtipal et al., 2020) (Figura 2).

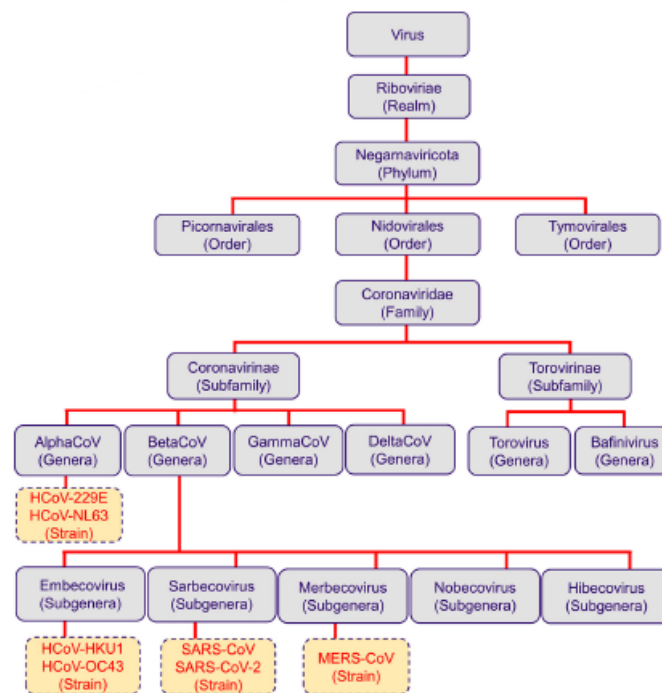


Figura 2. Taxonomía de los virus, señalizadas en naranja la posición de los siete HCoVs conocidos (Kirtipal et al., 2020).

Genoma y transcripción de SARS-CoV-2

Como sugiere el estudio de Zhu (2020), citado por Kadam et al. (2021), el genoma de SARS-CoV-2 (gRNA) tiene una longitud aproximada de 29,9 kb. Presenta una estructura con caperuza en el extremo 5' y una cola de poliA en el extremo 3'. Tiene 14 marcos de lectura abierto (ORFs) y en total codifica 29 proteínas virales conocidas. Contiene dos ORFs principales, ORF1a y ORF1b, que se superponen con un cambio de marco ribosomal (-1) y que, aproximadamente, constituyen dos tercios del genoma en el extremo 5'. ORF1a y ORF1b se traducen, respectivamente, en las poliproteínas pp1a (440-500 kDa) y pp1b (740-810 kDa) utilizando directamente como patrón la cadena de sentido positivo que es el genoma. Las proteasas virales nsp3, que contiene un dominio proteasa tipo papaína (PL^{pro}); y nsp5, con un dominio proteasa tipo 3C (M^{pro}) digieren estas dos proteínas, pp1a y pp1b, dando 16 proteínas no estructurales (Nsps 1-16) (Kim et al., 2020; Sabbah et al., 2020). Hay otros cuatro ORFs superpuestos en el extremo 3' del gRNA que codifican proteínas estructurales: proteína de la membrana (M),

proteína de la nucleocápside (N), proteína spike (S) y proteína de la envoltura (E). Entre los genes estructurales se encuentran una serie de genes que codifican proteínas accesorias: ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8b, ORF9b, ORF14 (Arya et al., 2021; Yang and Rao, 2021) (Figura 2).

En los virus de RNA, por selección natural, se producen rápidas tasas de sustitución de nucleótidos, lo que significa una elevada tasa de error. Esto junto a una evolución rápida de las poblaciones de virus causa la acumulación de mutaciones en los aminoácidos que afectan de forma directa a la transmisibilidad, el tropismo celular y la patogenicidad. En concreto los CoVs tienen un mecanismo de corrección de errores durante el proceso de replicación, por lo que son bastante estables. A pesar de ello, se han registrado diversos cambios en su genoma. La aparición de mutaciones adaptativas en el genoma de SARS-CoV-2 alteran su potencial patogénico y son responsables de la dificultad encontrada en el desarrollo de vacunas y tratamientos (Giovanetti et al., 2021).

Los vertebrados a los que infectan los CoVs tienen una proteína antiviral de dedos de zinc llamada ZAP que identifica las secuencias CpG en el genoma viral y promueven su degradación. Es por esto que el genoma de SARS-CoV-2 suprime las islas CpG. El ORF que codifica la proteína E es el que presenta mayor cantidad de motivos CpG (Kadam et al., 2021).

En la replicación y transcripción del gRNA de SARS-CoV-2 está implicada la proteína no estructural nsp12, que contiene el sitio activo de la polimerasa dependiente de RNA (RdRp) (Kim et al., 2020). Dentro de los *Nidovirales*, el proceso de transcripción está muy conservado y recibe el nombre de transcripción anidada de RNAm subgenómicos. Para la síntesis de estos RNAm, la formación de la caperuza 5' y la corrección de errores, las proteínas no estructurales se agrupan formando el complejo de replicación-transcripción (RTC). En el centro de este complejo se encuentra nsp12 y necesita nsp7 y nsp8 para ser activa enzimáticamente. Se piensa que al complejo RTC también se unen subunidades adicionales como nsp13, con actividad helicasa; nsp14, metiltransferasa con capacidad de corrección de errores y exonucleasa; nsp16, otra metiltransferasa; nsp9 y nsp10 (Figura 3). Los RNAm subgenómicos anidados que se sintetizan tienen diferentes tamaños porque son productos de una transcripción discontinua.

Estos RNAm subgenómicos presentan una secuencia líder igual a la del extremo 5' del genoma y una secuencia codificante principal procedente del extremo 3'. En esta transcripción discontinua la polimerasa salta de un extremo a otro. Estos transcritos del virus tienen, al igual que los RNAm celulares, una caperuza de metil-guanosina N⁷ en el extremo 5' para protegerlo de la degradación, facilitar la traducción y, además, mediar el escape del sistema inmune del individuo infectado. Para la formación de esta caperuza se ha sugerido que nsp13 podría actuar como TPasa y que nsp16 y nsp14 podrían metilar el OH-2' de la ribosa y N⁷ de la guanosina, pero hasta la fecha no se ha registrado actividad GTasa en el virus necesaria también en el proceso de formación de esta caperuza (Hillen, 2021).

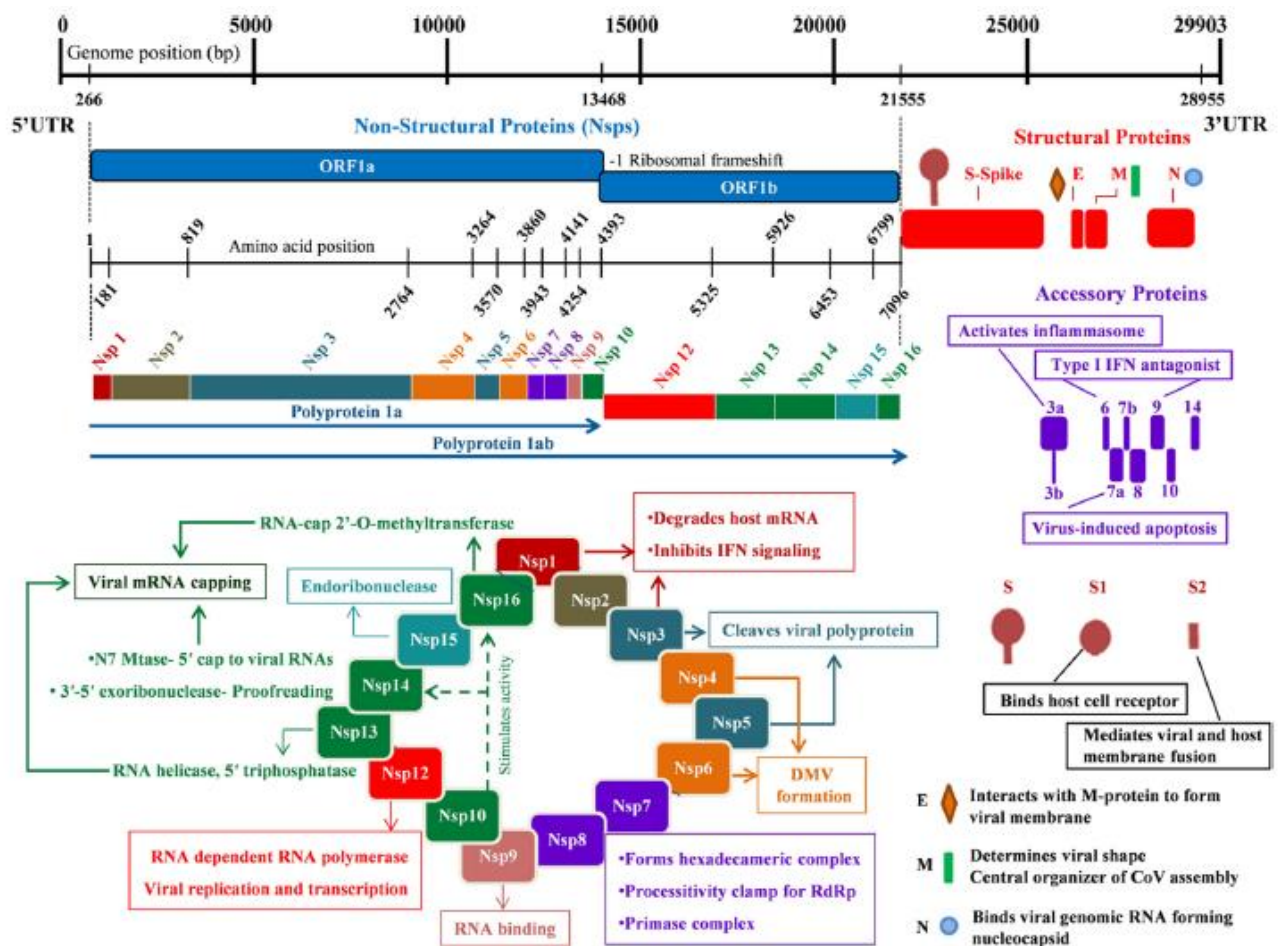


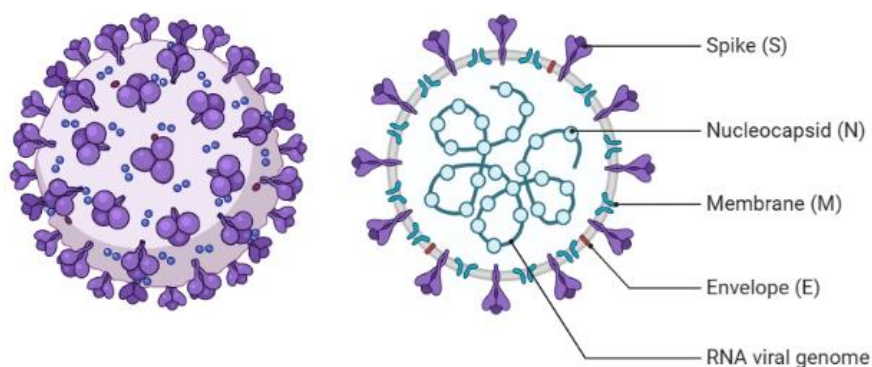
Figura 3. Esquema representativo del genoma de SARS-CoV-2. Señalizadas las regiones codificantes para cada una de las proteínas virales y una breve descripción de sus funciones (Arya et al., 2021).

Proteínas estructurales de SARS-CoV-2

En el virión de SARS-CoV-2 la proteína N forma la nucleocápside con simetría helicoidal que rodea al genoma, éste se encuentra muy empaquetado por la proteína E, asociada a la envoltura y a otras dos proteínas estructurales: M y S (Figura 4).

Proteína de membrana (M)

La proteína M es la más abundante entre las proteínas estructurales. Es una glicoproteína transmembrana de tipo III con 222 aminoácidos. Tiene tres dominios principales: el ectodominio N-terminal, tres hélices transmembranas (TMH1-TMH3) y el endodominio C-terminal. Esta proteína tiene dos tipos de interacciones esenciales para la fusión entre las membranas del virus y la célula hospedadora y como punto de control para ensamblar nuevos virus. Una de esas interacciones es homotípica, pues interacciona consigo misma; la otra interacción es heterotípica, interacciona a través del dominio C-terminal con otras proteínas estructurales. Hay dos residuos importantes para el empaquetamiento de la nucleocápside: L218 y L219 (Arya et al., 2021).



Created in BioRender.com 

Figura 4. Representación de la estructura del virus SARS-CoV-2. Created with BioRender.com

Proteína de envoltura (E)

Esta proteína es la más pequeña de las proteínas estructurales, con 75 aminoácidos. Es una proteína transmembrana con tres dominios: un ectodominio hidrofílico N-terminal, un dominio transmembrana hidrofóbico (TMD) y un endodominio hidrofílico C-terminal. Mediante NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy) se ha observado que la estructura del dominio TMD está formada por hélices pentaméricas que rodean un poro central catiónico hidrofílico que se asemeja a las viroporinas. La proteína E se sitúa en las membranas del retículo endoplasmático (ER) y el aparato de Golgi gracias a un residuo conservado, P54, y regula el bombeo de Ca^{2+} fuera del ER, esto provoca la pérdida del potencial de membrana y activa el inflammasoma del huésped (Arya et al., 2021; Yang and Rao, 2021).

Proteína de la nucleocápside (N)

La proteína N tiene 419 aminoácidos. Presenta dos dominios que se pliegan de forma independiente, N-NTD que se encuentra como monómero y tiene forma de puño diestro, en este dominio los bucles que sobresalen están cargados positivamente para unir RNA; y N-CTD, que se encuentra en forma de dímero y forma rectangular. En la estructura primaria, N-NTD y N-CTD están conectados por LKR (región de unión central flexible rica en Ser/Arg) y están flanqueadas por las regiones denominadas N-arm y C-tail. Su función principal es proteger el gRNA viral y empaquetarlo en un complejo de ribonucleocápside helicoidal (RNP), además de participar en el ensamblaje de partículas víricas mediante la interacción con el genoma y la proteína M (Bai et al., 2021).

Proteína spike (S)

La proteína S es una proteína de membrana de tipo I formada por 1230 aminoácidos. Se ensambla formando homotrímeros sobre la superficie del virus aportándole la representativa apariencia de corona. Está compuesta por dos subunidades: S1 se encarga de la unión al receptor celular y S2 se ancla a la membrana vírica e interviene en la fusión de membranas cuando penetra en la célula (Jackson et al., 2022). Esta proteína está altamente glicosilada, en concreto

cada protómero tiene 22 sitios de glicosilación asociados al extremo N-terminal. Estos residuos glicosilados son importantes en diversos procesos como son el plegamiento o la neutralización de anticuerpos.

La subunidad S1 presenta 4 dominios: un dominio N-terminal (NTD); un dominio de unión al receptor (RBD) que contiene 6 aminoácidos que son importantes durante el proceso de entrada a la célula (L455, F486, Q493, S494, N501 e Y505) (Sanches et al., 2021); y dos dominios carboxiterminales (CTD1 y CTD2). La subunidad S2 está formada por el péptido fusión (FP), la región proximal del péptido fusión (FPPR), HR1 y HR2 (secuencia de aminoácidos que se repiten en un patrón de siete residuos), un segmento transmembrana (TM) y una cola citoplasmática (CT) (Figura 5).

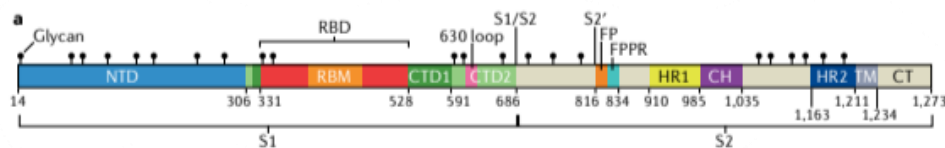


Figura 5. Representación de la proteína spike (S) de SARS-CoV-2 (Jackson et al., 2022).

En la conformación de prefusión S1 y S2 permanecen sin unión covalente (Wang et al., 2020). S1 adquiere una estructura en V, con los dominios NTD en un brazo y los dominios RBD, CTD1 y CTD2 en el otro, envolviendo la hélice central que forma la subunidad S2. Además, la región HR1 se orienta hacia la membrana viral. Los tres dominios RBD forman la cúspide del homotrímero y podemos encontrarlo en dos conformaciones: “up”, es un estado accesible al receptor y “down”, como estado inaccesible al receptor (Figura 6). En la periferia del trímero se encuentran los tres NTD conectando los dominios RBD con el resto de protómeros. CTD1 y CTD2 intervienen en los cambios estructurales que son necesarios para la fusión de las membranas.

En la conformación de postfusión, S1 sufre cambios conformacionales que disocian las dos subunidades. S1 queda como monómero, mientras que, S2 sufre una serie de cambios estructurales adoptando la forma de trímero rígido y alargado (Jackson et al., 2022; Zhang et al., 2021).

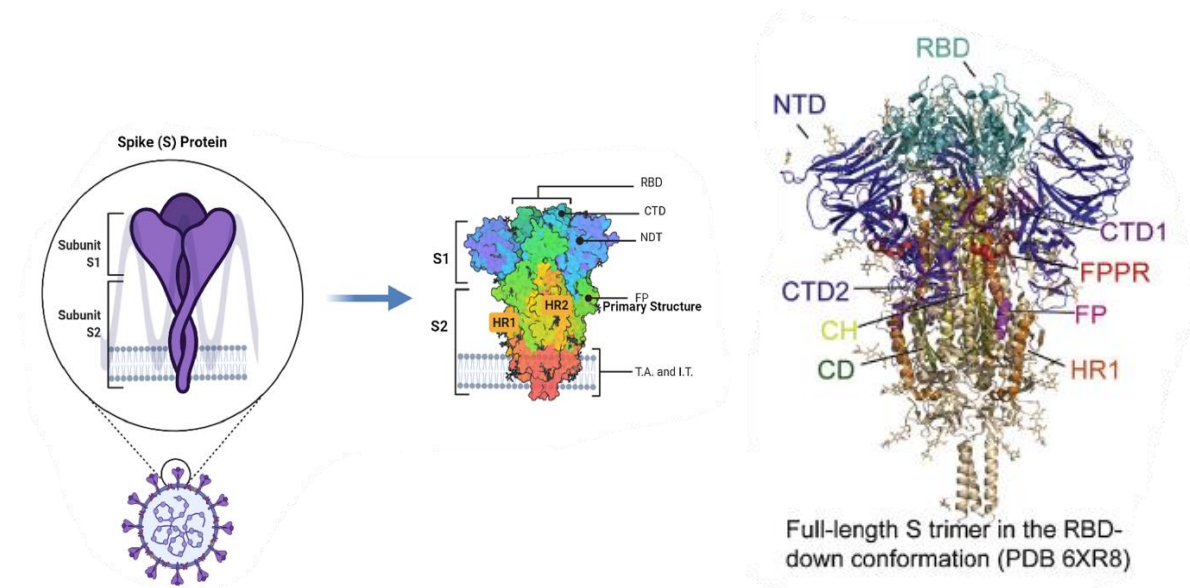


Figura 6. Izquierda: Estructura de la proteína spike (S) representando su disposición en el virión y cada uno de sus dominios (RBD: dominio de unión al receptor; NTD: dominio N-terminal; FP: proteína fusión; T.A.: anclaje transmembrana; I.T.: cola intracelular) (Cosar et al., 2022). **Derecha:** representación de la estructura completa del homotrímero S de SARS-CoV-2 en la conformación “down” de RBD, obtenida mediante cryo-EM (PDB ID: 6XR8) (Zhang et al., 2021).

MECANISMO DE INFECCIÓN DE SARS-COV-2

Receptor de SARS-CoV-2: ACE2

El paso inicial de la infección viral es la unión del virus al receptor de la célula hospedadora. SARS-CoV-2 reconoce el receptor ACE2 (enzima convertidora de angiotensina 2) a través de la glicoproteína S. Este paso de entrada de las partículas virales determina la severidad de la infección y la transmisibilidad al huésped.

Algunos de los síntomas que sufren los pacientes y los lugares de infección pueden explicarse por la distribución de los receptores ACE2 en los tejidos. Algunos de ellos son la disfunción olfatoria que provoca la pérdida transitoria de las sensaciones de olor y sabor debido al daño temporal en el epitelio olfativo. Se pueden justificar las complicaciones gastrointestinales y cardiovasculares por la presencia de receptores en el intestino, el riñón y el endotelio. La fiebre, la mialgia, el dolor de cabeza y los síntomas respiratorios son una consecuencia de la multiplicación del virus en las células pulmonares (Ravi et al., 2022). Existe una diferencia en los niveles de expresión de ACE2 a lo largo del tracto respiratorio, de manera que, en las células ciliadas nasales se produce el mayor nivel de expresión y es por eso que en la etapa inicial de infección éstas sean el principal objetivo de replicación de SARS-CoV-2, seguido por el epitelio bronquial superior y, por último, en el pulmón inferior donde la expresión de receptor se limita a las células alveolares tipo II.

El receptor ACE2 es una proteína transmembrana constituida por 805 aminoácidos. Presenta un dominio metalopeptidasa con motivo de unión al zinc en su centro activo (HEXXH) y otro dominio transmembrana. El sustrato habitual de este receptor es la enzima convertidora de angiotensina (ACE), una carboxipeptidasa que actúa eliminando un solo aminoácido del sustrato y se expresa en los capilares pulmonares. Forma parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona convirtiendo la angiotensina I en angiotensina II. Su función fisiológica es regular la presión arterial y la inflamación, ya que la angiotensina II estimula a las células de la capa glomerular de la corteza suprarrenal para que liberen aldosterona (Jackson et al., 2022).

La interacción del homotrímero y el receptor se produce a través del dominio RBD de la proteína S en su conformación “up”.

Entrada del virus a la célula

Además de la entrada principal mediante la fusión de la membrana vírica con la membrana de la célula hospedadora, se puede dar una ruta alternativa por vía endosomal. En este caso la proteína S se activa en el entorno ácido del endosoma para la fusión de la membrana vírica y la endosomal por la acción de proteasas como la catepsina L (Figura 7). Esto es posible para SARS-CoV-2 porque se ha observado que otras moléculas pueden actuar como receptores no

específicos que aumentan la entrada de virus a la célula, pero no suponen una infección eficiente en el caso de que esté ausente ACE2. Algunas de estas moléculas son las lectinas tipo C que reconocen los glucanos de la superficie del virión, TIM1 y AXL que pertenecen a la familia de receptores de fosfatidilserina o CD147 expresada en células epiteliales y del sistema inmune (Gusev et al., 2022; Jackson et al., 2022).

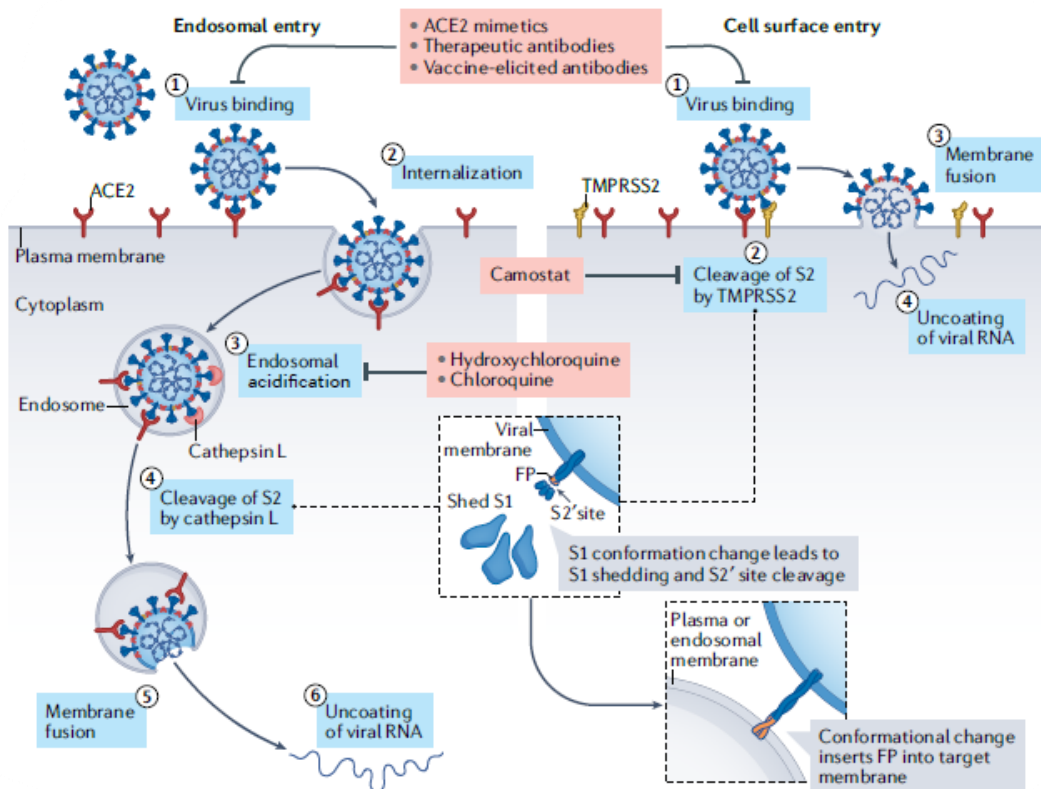


Figura 7. Mecanismos de entrada de SARS-CoV-2 a la célula hospedadora (Jackson et al., 2022).

Durante el proceso de entrada de SARS-CoV-2 a la célula, tras la interacción RBD-ACE2, la proteína S debe pasar a un estado metaestable con suficiente energía para superar la repulsión natural entre el virus y las membranas celulares. Esta transición se lleva a cabo por la escisión proteolítica, en primer lugar, en el límite S1-S2 por una furina y, posteriormente, en el sitio S2' de la subunidad S2 por proteasas del huésped. El sitio S2' puede ser escindido en la superficie celular por la proteína transmembrana de tipo II con actividad serina proteasa (TMPRSS2) o en los endosomas por la cathepsina L (Figura 7).

La fusión de las membranas sigue los siguientes pasos: en el estado de prefusión, la proteína S fluctúa entre la conformación con los tres dominios RBD “down” y una conformación en la que presenta uno de los dominios RBD “up”. Cuando adquiere esta segunda conformación FPPR y el bucle 630 se desplazan y exponen S2’ cerca del péptido fusión (FP). La escisión de S2’ libera el FP y se produce la liberación completa de S1 que provoca una cascada de cambios estructurales en S2 hasta alcanzar el estado de postfusión. Al mismo tiempo, HR1 se pliega y provoca que el FP se inserte en la membrana celular, mientras que, HR2 se repliega colocando FP y los segmentos transmembrana (TM) en el mismo extremo de la molécula. Esto provoca el pliegue de las membranas que forman el poro de fusión y facilitan la entrada del virus en la célula hospedadora (Figura 8) (Jackson et al., 2022).

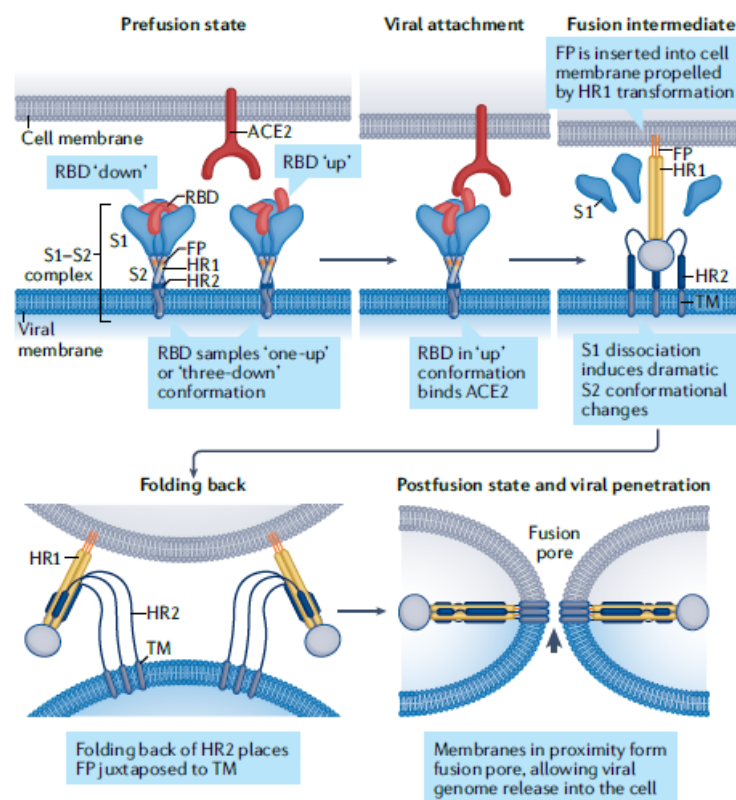


Figura 8. Modelo de fusión de las membranas a través de la proteína Spike (S) de SARS-CoV-2 y el receptor celular ACE2 (Jackson et al., 2022).

El siguiente paso en el proceso de infección vírica es el desnudamiento de las partículas virales. Una vez en el citosol, el gRNA vírico se traduce en las poliproteínas pp1a y pp1b que mediante proteólisis generan las diferentes proteínas no estructurales (nsps). Como ya se ha descrito, estas proteínas forman el complejo de replicación-transcripción (RTC) que se encarga de replicar el genoma viral y de producir los RNAm subgenómicos. Posteriormente, utilizando la maquinaria de la célula hospedadora, se traducen las cuatro proteínas estructurales y las proteínas accesorias. Al igual que muchas proteínas celulares, las proteínas estructurales de SARS-CoV-2 se someten a modificaciones postraduccionales en el retículo endoplasmático (ER), tales como la formación de puentes disulfuro o la glucosilación para su correcto plegamiento y posterior ensamblaje y liberación por la vía secretora de nuevas partículas virales (Figura 9) (Sicari et al., 2020).

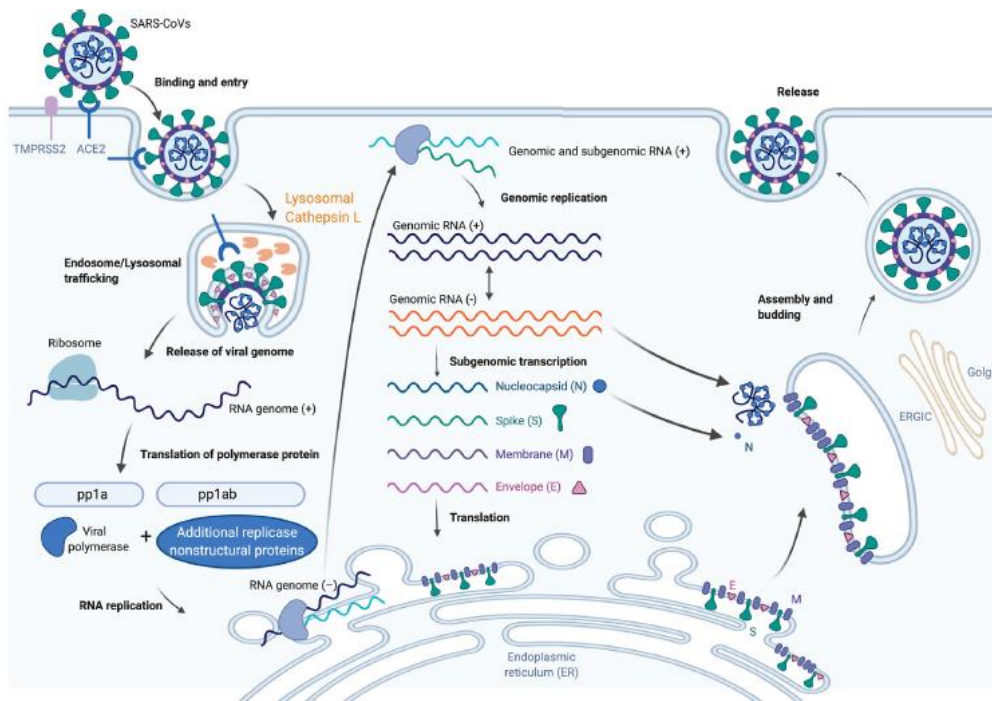


Figura 9. Representación del ciclo de vida de SAR-CoV-2. De forma esquemática están representados los procesos de adsorción en la superficie celular, penetración, desnudamiento en el citosol del genoma vírico, expresión, replicación, ensamblaje y maduración de las nuevas partículas virales y, por último, la liberación de los nuevos viriones al exterior celular (Harrison et al., 2020).

Vía secretora

Las proteínas estructurales M, S y E de SARS-CoV-2 tienen una secuencia señal para el transporte y acumulación en el ER que es reconocida por el complejo proteico SRP (partícula de reconocimiento del péptido señal). Cuando el ribosoma de la célula hospedadora empieza la síntesis de las proteínas víricas, SRP reconoce el péptido señal y se une al ribosoma ralentizando la traducción. El complejo ribosoma-polipéptido-SRP se dirige a la membrana del ER e interacciona con el receptor de SRP. La unión de SRP a su receptor transfiere el complejo al translocón y libera al ribosoma, permitiendo que la síntesis de la proteína alcance su velocidad. Se abre el canal de translocación y se inserta la cadena de crecimiento del polipéptido a través de la membrana del ER continuando su elongación. Las proteínas estructurales de SARS-CoV-2 sufren un proceso de traslocación co-traduccional donde quedan insertadas en la membrana del ER, para eso presentan una secuencia stop que hace que la traducción de la proteína se detenga, los ribosomas se desprenden y queda encajada en la membrana (Figura 10). El dominio que permanece en el lumen del ER se somete a la formación de puentes disulfuro y la glicosilación entre otras modificaciones postraduccionales importantes para el tropismo viral y la especificidad de la célula hospedadora (Alberts et al., 2019).

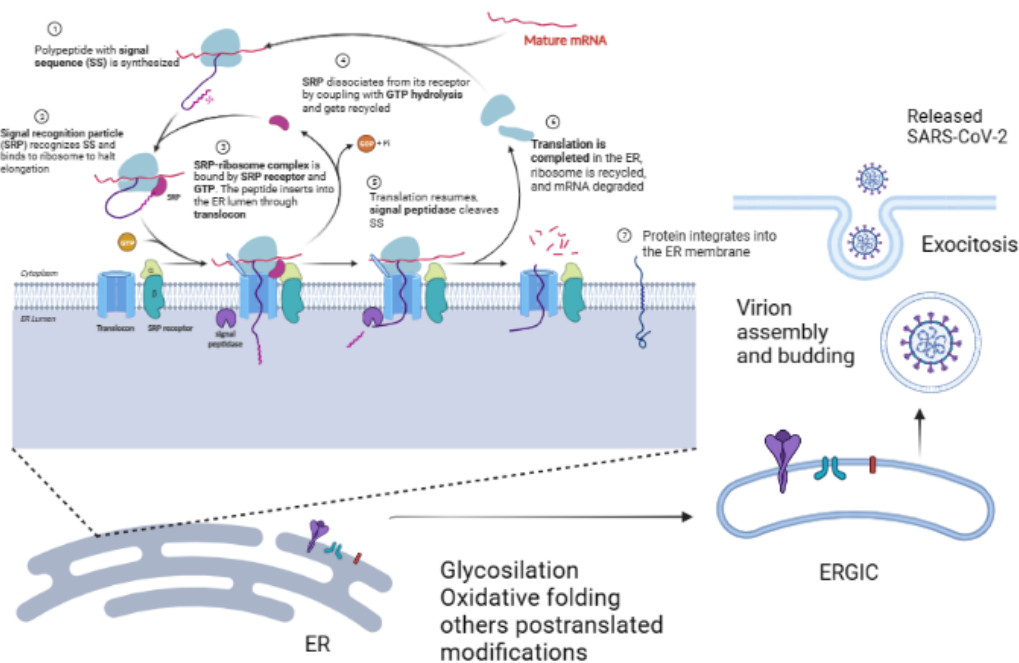


Figura 10: Translocación co-traducciona de las proteínas de SARS-CoV-2 y posterior maduración, ensamblaje y liberación. Created with BioRender.com

Interacción de las proteínas de SARS-CoV-2 con la vía secretoria

La proteína S presenta un motivo citosólico KxHxx que es importante para su acumulación en el compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC) y para su interacción con la proteína M y correcto ensamblaje. Se han observado dos proteínas que interaccionan con este motivo y que se localizan en la membrana del aparato de Golgi (GC) formando un complejo. Estas proteínas son ZDHHC5, una aciltransferasa que puede localizarse tanto en el GC, el ER o en la membrana plasmática y controla el tráfico del GC; y GOLGA7, pertenece a la subfamilia golgina y contribuye a la actividad de ZDHHC5 en la membrana y la unión entre las cisternas de Golgi. Por tanto, el complejo de estas dos proteínas podría contribuir a que la proteína S llegue a ERGIC y se facilite su ensamblaje (Mironov et al., 2023; Sicari et al., 2020).

La proteína orf8 interacciona con múltiples proteínas endógenas de la vía secretoria. Por un lado, interviene en procesos de glicosilación en el ER, interacciona con dos O-glicosiltransferasas, POGLUT2 y POGLUT3, y con una O-fucosiltransferasa, POFUT1. Estas enzimas no solo se encargan de la glicosilación, sino también de la presentación del receptor NOTCH en la membrana plasmática, regulador clave en los procesos de comunicación intercelular y de la expresión génica. Además, se puede unir a dos peptidil-prolil cis-trans-isomerasas, FKBP10 y FKBP7; y a una proteína importante en el control de calidad de glicoproteínas, UGGT2. Por otra parte, está implicada en la formación de puentes disulfuro esenciales para el correcto plegamiento de las proteínas del virus, el ensamblaje y reconocimiento de la proteína S por parte de los receptores ACE2 de la célula. En este caso interacciona con la oxidasa Ero1 β . Otro proceso en el que queda evidente la intervención de proteína vírica orf8 es la proteostasis u homeostasis proteica. Se produce la interacción entre orf8 y EDEM3, que retiene proteínas mal plegadas y actúa sobre la vía de regulación ERAD (degradación asociada al ER). En esta ruta de degradación, cuando se detecta una proteína mal plegada en el ER, se marca con señales específicas que van a determinar su destino de degradación. Las proteínas marcadas que se han liberado al citosol se capturan y se empaquetan

en vesículas de transporte retrógrado procedentes del ER liso que se fusionan con el GC donde se separan y terminan en el proteasoma para su degradación. Durante la infección por SARS-CoV-2 esas vesículas se utilizan para la formación de DMVs (vesículas de doble membrana) donde reclutan a RTC y protegen el genoma viral. Dentro de la homeostasis proteica, orf8 interacciona con el complejo de proteínas de membrana del ER, sobre EMC1. Esta proteína actúa junto a EMC4 y EMC7 sobre los endosomas tardíos, posiblemente uniéndose a la GTPasa Rab7.

También se ha visto que las proteínas orf8, orf9 y M interaccionan, respectivamente, con ERp44, SLC30A6 y SLC30A7. Los transportadores residentes de Golgi SLC30A6/znt6 y SLC30ZnT7 aportan suficiente zinc para activar ERp44, que se encarga de devolver ciertos polipéptidos al ER en un proceso regulado por el gradiente de zinc y el pH. Además, puede interactuar con ERGIC53/ LMAN1, ésta reconoce proteínas con una estructura concreta de manosa en la región luminal de ERGIC y las retiene en el compartimento permitiendo que las proteínas sufran las modificaciones postraduccionales necesarias para su correcto procesamiento. VIP36 y ERGIC1 tiene una función similar reconociendo secuencias de manosa y reteniendo a las proteínas en ERGIC, en este caso interaccionan orf7 y nsp10, respectivamente (Sicari et al., 2020).

Alteraciones celulares por SARS-CoV-2

El estrés por el exceso de trabajo de la maquinaria de plegamiento y transporte celular debido a la gran cantidad de síntesis de proteínas víricas activa un programa transcripcional denominado UPR a través de 3 rutas paralelas, estas estimulan la transcripción de genes para aumentar la capacidad del ER en el plegamiento de proteínas. Una de esas rutas activa IRE1 (proteína quinasa transmembrana en el ER). Otra de las rutas activa ATF6 (factor activador de la transcripción 6) y la tercera ruta activa a PERK (una segunda quinasa transmembrana que se localiza en el ER) (Alberts et al., 2019) (Sicari et al., 2020).

SARS-CoV-2 altera estos procesos mediante la interacción de diferentes proteínas virales con la maquinaria celular. La proteína S presenta un dominio activador de UPR. Orf3 puede activar

a PERK, en esta ruta se fosforila eIF2 α (factor de la iniciación de la traducción eucariota 2 α), esto inhibe la traducción de la mayoría de RNAm, pero sí permite la traducción de ciertos genes clave como ATF4 (factor activador de la transcripción 4) promoviendo la supervivencia celular a situaciones de estrés.

Parece ser que la infección por SARS-CoV-2 mantiene inactiva la ruta IRE1. Sin embargo, nsp6 se une a un receptor de membrana del ER denominado Sigma 1, que junto con SR2 (TMEM97), interacciona con la proteína orf9, modula el flujo de Ca²⁺ que bombea el ER y activa a IRE1. En la activación de esta ruta, la molécula se oligomeriza y se autofosforila presentando actividad endorribonucleasa en su dominio citosólico, puede cortar y degradar moléculas de RNA (RIDD). IRE1 quita un intrón del factor de transcripción XBP1 y lo activa, se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes involucrados en la ruta ERAD, biogénesis de lípidos y tráfico de vesículas. También, se produce la fosforilación de JNK que desencadena inflamación y apoptosis (Sicari et al., 2020).

El estrés inducido por la replicación del virus sobre el ER provoca la fusión de las mitocondrias (Mironov et al., 2023).

Se ha observado una relación entre la regulación de la estructura y homeostasis del ER y la infección por SARS-CoV-2 con el objetivo de limitar la inducción de estrés y la apoptosis de la célula. Las proteínas M, nsp7 y orf3 (Miller et al., 2023) interaccionan con Rab7 y YIF1A. Rab7 es una GTPasa que regula el transporte desde ER temprano hacia los endosomas tardíos y los lisosomas. YIF1A actúa bloqueando a Rab7 e inhibiendo la fusión de las vesículas de transporte con otros compartimentos. También, se produce la interacción entre orf9 y SCAP, que permite la expansión del ER según las necesidades de la célula. Cuando la demanda de síntesis es alta, SCAP libera a las proteínas SREBP (proteínas de unión a elementos reguladores de esteroles), factores de transcripción que, una vez liberados van al aparato de Golgi para ser activados y regular la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de lípidos (Sicari et al., 2020).

La proteína nsp13 interactúa con GORASP1 y GOLGA2, dos proteínas que se sitúan en el extremo medial y cis, respectivamente, del aparato de Golgi y actúan como factores de anclaje para mantener las cisternas apiladas.

Otra alteración causada por la infección por SARS-CoV-2 y relacionada con el aparato de Golgi es el aumento de la expresión de TGN46 y la disminución de la expresión de GRASP55 que conlleva la fragmentación del aparato de Golgi (Zhang et al., 2022).

POSIBLES DIANAS FRENTE A SARS-COV-2

Como parásitos intracelulares obligados, los virus hackean la maquinaria celular para su replicación y liberación de nuevas partículas virales. Este hecho se refleja con claridad en la vía secretoria de la célula hospedadora durante la infección de SARS-CoV-2. De manera que, es plausible considerar ciertos componentes celulares tanto de la vía secretoria como de UPR como posibles dianas contra el virus.

Ya existen inhibidores de los receptores de estrés del ER que se utilizan en cáncer y algunas enfermedades metabólicas. Entre ellos hay inhibidores de PERK/eIF2 α , de la actividad RNasa de IRE1 o el bloqueo indirecto de ATF6.

Otra manera de luchar contra la infección sería ralentizar el ritmo de replicación del virus actuando sobre la maquinaria del control de calidad de las nuevas proteínas, tales como enzimas implicadas en la glicosilación, en la formación de puentes disulfuro en el ER o que se encuentran en el aparato de Golgi.

Algunas de las proteínas del huésped implicadas en el control de calidad y homeostasis de ER-Golgi que interactúan con el virus y pueden ser diana de tratamientos son: GOLGB1, una proteína importante en la comunicación intercisternal y la organización del aparato de Golgi. Podría tratarse con catequinas, que son antioxidantes y antiinflamatorias, alteran la membrana viral afectando a la maduración de los nuevos virus. La cetirizina es un antihistamínico que reduce en las células epiteliales nasales la expresión del receptor de molécula de adhesión intercelular 1 de leucocitos, disminuyendo la unión de SARS-CoV-2 a estos receptores.

Además, se podría utilizar ganciclovir, un medicamento anti-*Herpesviridae*. Otra posible diana es PDE4D1P, esta proteína está implicada en la migración de sacos de Golgi mediante el anclaje de componentes de la ruta dependiente de AMPc, por lo que ayuda a la liberación de las partículas virales. Frente a esta proteína se puede utilizar estrona. Estas dos proteínas se saben que interaccionan con nsp13 del virus. La tercera diana que se propone es TOR1, ATPasa AAA+ que ayuda a la formación de la envoltura vírica. Por último, HMOX1 y HYOU1 son proteínas del ER que interaccionan con orf8 y orf3a de SARS-CoV-2 para evitar la apoptosis y que pueden ser diana de radicicol. Este compuesto natural de algunos hongos inhibe a HSP90 y la replicación vírica.

Aunque estas proteínas no son las más importantes en el proceso de replicación de SARS-CoV-2, sí intervienen en el ensamblaje, maduración y liberación de las nuevas partículas virales por lo que son interesantes de estudiar para bloquear el proceso.

CONCLUSIONES

Aunque el tratamiento ideal en cualquier ámbito de la salud es siempre el preventivo, evitar en la medida de lo posible las causas de enfermedad o daño en el organismo, es igual de importante la búsqueda de herramientas para combatir las una vez los pacientes han sido afectados y aumentar las tasas de supervivencia y/o disminuir los posibles efectos adversos que conllevan.

En el caso de SARS-CoV-2, conocer en detalle las etapas del proceso de infección y las interacciones que se producen entre los componentes celulares y las proteínas del virus ofrece una ventana de estudio muy amplia para la búsqueda de diferentes tratamientos.

Como se ha visto, la vía secretora es esencial para la replicación del virus y se producen numerosas interacciones entre las proteínas víricas y la maquinaria celular. La proteína accesoria orf8 interactúa con proteínas implicadas en la glicosilación y la formación de puentes disulfuro. Además, interviene en la proteostasis para el mantenimiento del equilibrio entre la síntesis, transporte y degradación de las proteínas, así como la formación de DMVs importantes para proteger el gRNA del virus y permitir el proceso de transcripción. La proteína S contiene

un motivo KxHxx por el que se une a proteínas del aparato de Golgi que aseguran su localización en ERGIC para su correcto ensamblaje.

La infección por SARS-CoV-2 no solo interviene en la síntesis y maduración de proteínas, sino que inducen estrés en el ER activando las rutas mediadas por IRE1, PERK y ATF6 a través de las proteínas S, orf3 y orf9.

Por otro lado, interaccionan con la ruta de regulación de la estructura del ER ampliando la red de membranas para mayor volumen de síntesis de proteínas y se conoce que nsp13 actúa sobre factores de anclaje en el aparato de Golgi provocando la fragmentación del orgánulo.

El estudio sobre cómo las proteínas del virus se relacionan con los componentes celulares y ponen a su disposición toda la maquinaria celular puede ayudar a caracterizar dianas terapéuticas contra moléculas de la vía secretora y UPR para activar respuestas antivirales de la célula hospedadora y, de esta manera, no solo desarrollar tratamientos anti-CoV sino también esclarecer futuros estudios sobre la biogénesis de virus.

BIBLIOGRAFÍA

Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol* 2021;433. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.11.024>.

Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The sars-cov-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses* 2021;13. <https://doi.org/10.3390/v13061115>.

Bhat EA, Khan J, Sajjad N, Ali A, Aldakeel FM, Mateen A, et al. SARS-CoV-2: Insight in genome structure, pathogenesis and viral receptor binding analysis – An updated review. *Int Immunopharmacol* 2021;95. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107493>.

Cosar B, Karagulleoglu ZY, Unal S, Ince AT, Uncuoglu DB, Tuncer G, et al. SARS-CoV-2 Mutations and their Viral Variants. *Cytokine Growth Factor Rev* 2022;63:10–22. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.06.001>.

Giovanetti M, Benedetti F, Campisi G, Ciccozzi A, Fabris S, Ceccarelli G, et al. Evolution patterns of SARS-CoV-2: Snapshot on its genome variants. *Biochem Biophys Res Commun* 2021;538:88–91. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.102>.

Gusev E, Sarapultsev A, Solomatina L, Chereshnev V. Sars-Cov-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>.

Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* 2020;41:1100–15. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>.

Hillen HS. Structure and function of SARS-CoV-2 polymerase. *Curr Opin Virol* 2021;48:82–90. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.010>.

Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2022;23:3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.

Jadaun PK, Chatterjee S. COVID-19 and dys-regulation of pulmonary endothelium: implications for vascular remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2022;63:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.10.003>.

Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol* 2021;61:180–202. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>.

Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell* 2020;181:914–921.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.011>.

Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution* 2020;85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>.

Miller AN, Houlihan PR, Matamala E, Cabezas-bratesco D, Lee GY, Cristofori-armstrong B, et al. Title: The SARS-CoV-2 accessory protein Orf3a is not an ion channel, but does interact with trafficking proteins. *Elife* 2023;12. <https://doi.org/10.7554/eLife.84477>.

Mironov AA, Savin MA, Beznoussenko G V. COVID-19 Biogenesis and Intracellular Transport. *Int J Mol Sci* 2023;24. <https://doi.org/10.3390/ijms24054523>.

Ravi V, Saxena S, Panda PS. Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian J Med Microbiol* 2022;40:182–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2022.02.005>.

Sabbah DA, Hajjo R, Bardaweel SK, Zhong HA. An Updated Review on SARS-CoV-2 Main Proteinase (MPro): Protein Structure and Small-Molecule Inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2020;21:442–60. <https://doi.org/10.2174/1568026620666201207095117>.

Sanches PRS, Charlie-Silva I, Braz HLB, Bittar C, Freitas Calmon M, Rahal P, et al. Recent advances in SARS-CoV-2 Spike protein and RBD mutations comparison between new variants Alpha (B.1.1.7, United Kingdom), Beta (B.1.351, South Africa), Gamma (P.1, Brazil) and Delta (B.1.617.2, India). *J Virus Erad* 2021;7. <https://doi.org/10.1016/j.jve.2021.100054>.

Sicari D, Chatziioannou A, Koutsandreas T, Sitia R, Chevet E. Role of the early secretory pathway in SARS-CoV-2 Infection. *Journal of Cell Biology* 2020;219. <https://doi.org/10.1083/JCB.202006005>.

Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>.

Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol* 2021;19:685–700. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00630-8>.

Zhang J, Kennedy A, Xing L, Bui S, Reid W, Joppich J, et al. SARS-CoV-2 triggers Golgi fragmentation via down-regulation of GRASP55 to facilitate viral trafficking. *BioRxiv* 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.03.04.483074>.

Zhang J, Xiao T, Cai Y, Chen B. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr Opin Virol* 2021;50:173–82. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010>.