

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE
VALÈNCIA**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



**“Análisis funcional de las
proteínas ORF3a, ORF6 y
Orf7a del SARS-CoV-2 en
levadura”**

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA
BIOMÉDICA

José Luis Garrido Huarte

TUTORA UPV: María Desamparados Pascual-Ahuir Giner

Tutor IBV: Markus Proft

Curso Académico: 2020-2021

VALENCIA, 3 de Septiembre del 2021

Índice General:

Introducción	1
1. Relevancia epidemiológica del SARS-CoV-2	1
2. Estructura y función de los genomas del SARS-CoV-2 y del SARS-CoV	2
3. Funciones de las proteínas accesorias del SARS-CoV-2.....	5
3.1. ORF3a – Inducción de la apoptosis celular.....	5
3.2. ORF3a – Papel en la inhibición del proceso de autofagia	6
3.3. ORF6 - Interacción con el poro nuclear e inhibición del transporte citoplasmático-nuclear.....	8
3.4. ORF7a – Inhibición de la respuesta mediada por IFN	9
Objetivos	11
Materiales y métodos	12
1. Cepas de bacterias y levadura.....	12
2. Cebadores utilizados.....	15
3. Plásmidos utilizados	16
4. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR.....	17
5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	18
6. Construcción de plásmidos por Gateway®	18
7. Transformación de bacterias	20
8. Transformación de levaduras.....	20
9. Obtención de extractos de proteína total de levadura	21
10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferencia a membrana PVDF y detección inmunológica	22
11. Análisis cuantitativo del crecimiento de cultivos de levadura (Tecan)	23
12. Microscopía confocal.....	24
Resultados y Discusión	26
1. Construcción y verificación de plásmidos para la expresión constitutiva e inducible de ORF3a, ORF6 y ORF7a.....	26
2. Verificación de la expresión estable de ORF3a – 3xFlag, ORF6 – 3xFlag y ORF7a – 3xFlag en levadura.....	28
3. Efecto de la sobreexpresión de ORF3a, ORF6 y ORF7a en el crecimiento celular.....	32
4. Localización celular de ORF3a-GFP	37
5. Localización celular de ORF6-GFP:.....	41
5.1. ORF6: Inhibición del transporte nuclear.....	43
6. Localización celular de ORF7a-GFP.....	46
Conclusiones	49
Bibliografía	50

Índice de figuras:

Figura 1. Representación esquemática de la organización genómica del SARS-CoV-2, los diferentes mRNAs subgenómicos y el RNA genómico completo	3
Figura 2. Estructura del SARS-CoV-2 y su interacción con ACE2	3
Figura 3. Esquema de la organización genómica del SARS-CoV.....	4
Figura 4. La expresión de ORF3a bloquea la formación de autolisosomas	7
Figura 5. Estructura del tetrámero SARS-CoV-2 ORF3a	8
Figura 6. Detección inmunológica de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a procedentes de las construcciones realizadas en este trabajo.....	29
Figura 7. Detección inmunológica de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a procedentes de las construcciones realizadas en este trabajo.....	30
Figura 8. Detección inmunológica de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a procedentes de las construcciones de Addgene.....	31
Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de ORF3a-3xFlag en cultivos de levadura.....	33
Figura 10. Las cepas ORF3a-eGFP tanto centroméricas como multicopia presentan un retraso en el crecimiento importante en comparación con la cepa WT al cultivarlas en SGal.....	34
Figura 11. Ensayo de crecimiento de las cepas que sobreexpresan ORF6-3xFlag.....	35
Figura 12. Ensayo de crecimiento de las cepas que sobreexpresan ORF7a-3xFlag.....	36
Figura 13. Ensayo de crecimiento de las cepas transformadas con los plásmidos de Addgene que sobreexpresan ORF3a-3xFlag, ORF6-3xFlag y ORF7a-3xFlag	37
Figura 14. Microscopía confocal de cepas de levadura transformadas con pAG-423-GPD-ORF3a-eGFP, crecidas en medio SD	38
Figura 15. Microscopía fluorescente confocal de levaduras transformadas con pAG-426-GDP-ORF3a-eGFP.....	39
Figura 16. Microscopía fluorescente confocal de levaduras transformadas con pAG-413-GAL1-ORF3a-3xFlag.....	40
Figura 17. Microscopía confocal de cepas de levadura silvestre BY4741 transformadas con pAG-413-GAL1-ORF6-eGFP (CEN) y con pAG-423-GAL1-ORF6-eGFP (2 μ).....	42
Figura 18. Microscopía confocal de cepas transformadas con pAG-413-GAL1-ORF6-eGFP (CEN) o con pAG-423-GAL1-ORF6-eGFP (2 μ).	43
Figura 19. Efecto de la sobreexpresión de ORF6 a la adaptación a estrés oxidativo.....	44
Figura 20. Efecto de la sobreexpresión de ORF6 a la adaptación a estrés osmótico.	45
Figura 21. Localización de ORF7a-GFP en células de levadura.	46
Figura 22. Co-localización de ORF7a y ER tracker Blue/White.....	47

Índice de Tablas:

Tabla 1. Conjunto de cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 empleadas en este trabajo.....	13
Tabla 2. Cebadores empleados en este trabajo para las clonaciones por Gateway®.	15
Tabla 3. Cebadores empleados para las diferentes secuenciaciones realizadas a lo largo de este trabajo.	16
Tabla 4. Plásmidos empleados en este trabajo.....	17
Tabla 5. Construcciones plasmídicas creadas en este trabajo con el objetivo de poder analizar la expresión de nuestras proteínas de interés y estudiar sus funciones.....	26
Tabla 6. Corte de las construcciones creadas en este trabajo con las endonucleasas correspondientes y los fragmentos que visualizamos en geles de agarosa tras este corte.	27

Introducción

1. Relevancia epidemiológica del SARS-CoV-2

Un nuevo coronavirus humano descubierto en Wuhan (China) en 2019, denominado *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), es el agente causal de la enfermedad COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) y ha infectado alrededor de 200 millones de personas en todo el mundo, ocasionando la muerte de más de 4 millones de personas, dando lugar a una crisis mundial a nivel económico y social. La COVID-19 se manifiesta principalmente con fiebre, tos seca, disnea, dolor de cabeza y neumonía. En un pequeño subconjunto de casos graves, la enfermedad progresa rápidamente a insuficiencia respiratoria e incluso a la muerte [1].

Los coronavirus (CoVs) son una familia de virus envueltos cuyo material genético es una sola hebra de RNA de polaridad positiva, que infectan vertebrados. Son denominados de esta manera por la forma en corona de las espículas de su superficie. Pertenecen a la familia *Coronaviridae* y al orden *Nidovirales*. Estos virus pueden difundirse ampliamente en humanos, otros mamíferos y aves causando enfermedades respiratorias, intestinales, afecciones hepáticas y a nivel del sistema nervioso [2].

Desde comienzos del siglo XXI ha habido tres brotes importantes causados por coronavirus humanos, el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) que estalló en 2003, el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS) en 2012 y la actual pandemia de COVID-19 [3].

El SARS-CoV-2 se trata de un β -coronavirus, envuelto, con RNA de cadena simple de polaridad positiva (Clase IV) con una alta tasa de morbilidad y elevada mortalidad [4].

Las proteínas accesorias codificadas por el SARS-CoV-2 juegan un papel crítico en la interacción virus-hospedador y en la modulación de la respuesta inmune, contribuyendo en la patogenicidad a través de diferentes estrategias. Sin embargo, las funciones de estas proteínas accesorias no son del todo conocidas [5]. Por este motivo, es de especial interés ver como estas proteínas accesorias, algunas no conservadas en

otros coronavirus, interactúan con el hospedador. Esto es crucial para entender la patogenia y su alta efectividad de infección, así como para desarrollar tratamientos potenciales para COVID-19 [6]. Debido a que actualmente no hay medicamentos antivirales que prueben una eficacia clínica para el tratamiento de COVID-19 y el escaso conocimiento acerca del mecanismo de este virus ha obstaculizado el desarrollo de las diferentes vacunas [7].

2. Estructura y función de los genomas del SARS-CoV-2 y del SARS-CoV

El SARS-CoV-2 ha experimentado varias vías de evolución, por este motivo, la genotipificación de los aislados víricos es de gran importancia para entender la evolución y la transmisión de este virus. Un método de gran eficacia para la genotipificación se basaba en el alineamiento de las secuencias de los aislados víricos con el genoma de referencia del SARS-CoV-2. Se vio que las múltiples mutaciones específicas son el tipo de mutación predominante durante la actual pandemia. Este método constituye una herramienta eficaz para monitorear y rastrear las diferentes variantes genéticas globales y locales [8].

El genoma del coronavirus SARS-CoV-2 consiste en una secuencia líder de 29.903 nucleótidos que juega un papel crítico en la expresión génica durante su replicación subgenómica discontinua, dando lugar a 9 mRNAs subgenómicos diferentes (Figura 1). Los segmentos ORF1ab codifican las proteínas encargadas de la replicación y transcripción del RNA, además de proteínas no estructurales (nsp) [9]. La replicación del RNA del SARS-CoV es única, involucrando dos polimerasas dependientes de RNA. La primera RNA polimerasa es la proteína no estructural 12 (nsp12) siendo primer-dependiente. Mientras que la segunda polimerasa (nsp8) tiene la capacidad primasa, para así iniciar la replicación sin necesidad de primers [10].

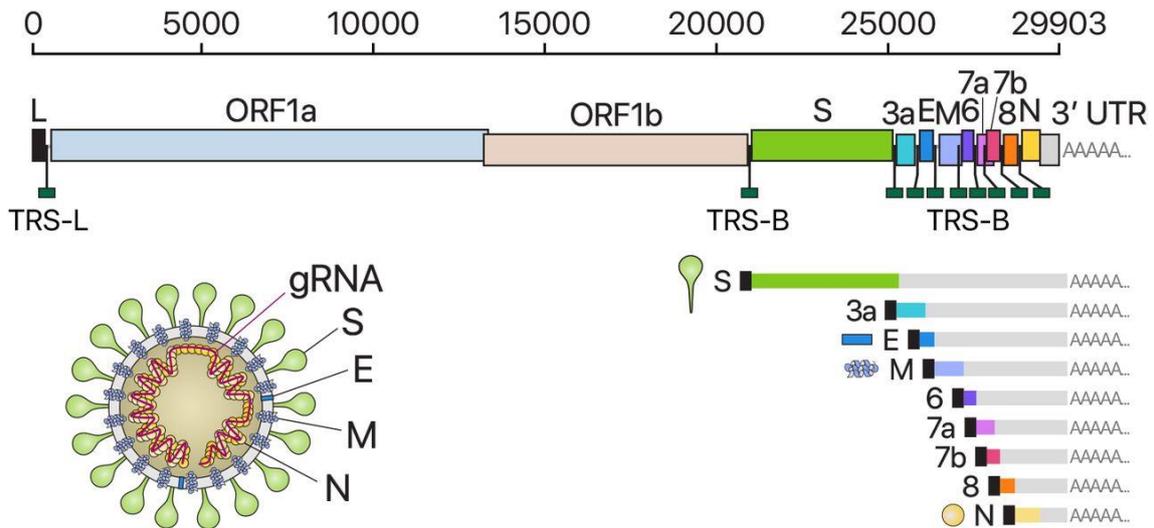


Figura 1. Representación esquemática de la organización genómica del SARS-CoV-2, los diferentes mRNAs subgenómicos y el RNA genómico completo (29.903 nt). Además de este RNA genómico, 9 mRNAs subgenómicos son producidos (3a, E, M, 6, 7a, 7b, 8, 9 (N) y 10) aunque no se vio expresión del ORF10 [11].

Cuatro proteínas estructurales son codificadas, las cuales poseen una mayor inmunogenicidad para la respuesta mediada por células T que las no estructurales. Estas proteínas son comunes a todos los coronavirus y son la proteína de la espícula (S), la proteína de la envoltura (E), la proteína de la membrana (M) y la nucleoproteína (N, ORF9a). Estas están involucradas en varios procesos virales, como la formación de la partícula viral (Figura 2) [12].

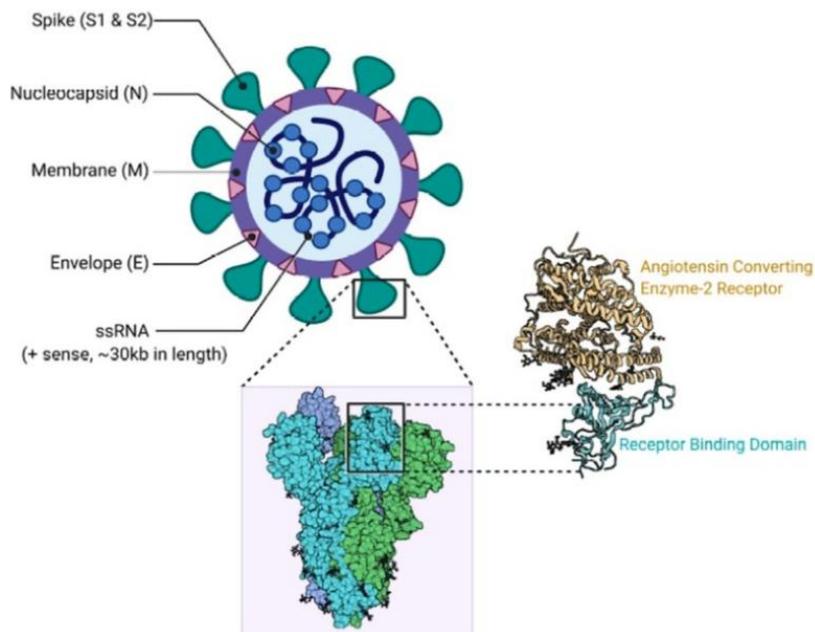


Figura 2. Estructura del SARS-CoV-2 y su interacción con ACE2 [13].

La proteína de la espícula (S) es una glicoproteína que tiene dos dominios, S1 y S2. El dominio S1 ancla el virion a la membrana celular mediante la interacción con el receptor ACE2, iniciándose la infección. Después de su internalización en los endosomas de la célula hospedadora, se producen cambios conformacionales en la proteína S. Esta será cortada por la catepsina CTSL, lo que permitirá la fusión de S2 con las membranas del endosoma.

Por otro lado, la proteína de la envoltura (E) interactuará con la proteína de la membrana (M). La nucleoproteína (N, ORF9a) empaqueta el RNA viral en una ribonucleocápside helicoidal gracias a su interacción con la proteína M durante el ensamblado del virion [8].

Cabe destacar que SARS-CoV-2 tiene una mayor transmisibilidad que el SARS-CoV y una menor patogenicidad. El SARS-CoV tiene una patogenicidad única porque infecta tanto el tracto respiratorio superior como el inferior, además del tracto gastrointestinal superior. Mediante inmunohistoquímica e hibridación in situ de órganos de pacientes fallecidos a causas del SARS se vio que también se encontraba el virus en hígado, túbulos renales, glándulas sudoríparas, páncreas, pituitaria, glándula adrenal y cerebro. Este virus presentaba una homología de secuencia limitada con el resto de los coronavirus, presentando menos de un 80% de homología con el SARS-CoV-2.

El SARS-CoV codifica 23 proteínas, incluyendo las 4 proteínas estructurales típicas; la espícula (S), nucleocápside (N), membrana (M) y envoltura (E). También codifican la replicasa 1a (ORF-1a) la replicasa 1b (ORF-1b) y 8 nuevos ORFs, algunos de los cuales también se encuentran en el SARS-CoV-2, como ORF3a, ORF6 y ORF7a sobre las cuales centraremos este trabajo [14].



Figura 3. Esquema de la organización genómica del SARS-CoV. Codifica 8 proteínas accesorias (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b) [15].

3. Funciones de las proteínas accesorias del SARS-CoV-2

3.1. ORF3a – Inducción de la apoptosis celular

Generalmente se ha considerado que las proteínas accesorias de los coronavirus eran secundarias a la hora de la replicación viral *in vitro*. Sin embargo, algunas de estas proteínas accesorias desempeñan funciones cruciales en la interacción virus-célula hospedadora durante la infección *in vivo*, además de actuar modulando la respuesta inmune del hospedador, constituyendo una ventaja biológica al virus que le permite tener una mayor patogénesis [15].

Previamente se vio que la proteína accesoria ORF3a de SARS-CoV era capaz de inducir apoptosis, por lo que se investigó si ORF3a de SARS-CoV-2, que tiene un 73% de homología de secuencia con la de SARS-CoV, también era capaz de inducir este proceso.

La apoptosis es un mecanismo fisiológico para controlar el número de células durante el desarrollo y la respuesta a infecciones extrañas, como infecciones virales o bacterianas. Los virus han desarrollado estrategias tanto para inhibir como para estimular la apoptosis de las células hospedadoras, dependiendo de interacciones particulares virus – célula hospedadora. Muchos virus codifican proteínas anti y pro apoptóticas como BRLF-A, LMP-1, Crm, p35 y E1A que pueden inhibir o retrasar las vías apoptóticas, dando una mayor producción viral. La apoptosis en estadios tardíos de infección puede ser ventajosa a la hora de diseminar el virus y limitar la respuesta inflamatoria del hospedador. La apoptosis normalmente muestra cambios morfológicos típicos como hinchazón celular, condensación nuclear, fragmentación del DNA y la activación de las caspasas [16].

Para estudiar este mecanismo, se examinó mediante citometría de flujo la actividad caspasa-3, un marcador de apoptosis, dando como resultado una mayor activación de caspasa-3 en células que sobreexpresaban ORF3a. Además, se analizó la capacidad inductora de apoptosis mediante un doble marcaje con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) e IP (Yoduro de propidio) en cultivos celulares HEKT293T, HepG2 y Vero E6. Habiendo un mayor marcaje en células que sobreexpresaban ORF3a. Estos resultados indicaban que ORF3a es capaz de inducir apoptosis en cultivos celulares [17].

Las células que sobreexpresan ORF3a inducen la apoptosis mediante la vía extrínseca. En esta vía, la caspasa-8 es activada y corta Bid, transformándolo en tBid, lo que conlleva la liberación de citocromo c mitocondrial al citoplasma, dando lugar a la formación del apoptosoma y a la activación de la caspasa-9. Esto se comprobó viendo como en células que sobreexpresaban ORF3a presentaban niveles elevados de caspasa-8 activada, tBid y de citocromo c, mientras que la expresión de los inhibidores de caspasa-8 y caspasa-9 estaba suprimida [17].

Por otro lado, ORF3a es una proteína transmembrana que posee una serie de dominios que regulan su localización intracelular. Se ha visto que ORF3a del SARS-CoV-2 necesita esta asociación a la membrana para inducir su actividad pro-apoptótica, mientras que ORF3a de SARS-CoV puede llevar esta actividad sin estos motivos de asociación a la membrana, aunque con menor eficacia. Esto pone de manifiesto que siguen diferentes mecanismos a la hora de desencadenar la apoptosis. Además, ORF3a de SARS-CoV tiene una actividad pro-apoptótica más fuerte. Esta menor actividad apoptótica del ORF3a de SARS-CoV-2 puede estar estrechamente relacionada con una menor defensa antiviral mediada por apoptosis de las células infectadas [17].

3.2. ORF3a – Papel en la inhibición del proceso de autofagia

La autofagia es un mecanismo crucial para renovar los componentes celulares en una gran variedad de condiciones. Desempeña una función homeostática esencial, a la vez que puede degradar selectivamente material celular, incluidos orgánulos, como mitocondrias dañadas o redundantes [18, 19]. También actúa como un mecanismo de supervivencia celular combatiendo las invasiones de patógenos. Este proceso consiste en englobar una porción del citoplasma en un autofagosoma, que consta de una doble membrana, y su posterior liberación en los lisosomas para ser degradado [20]. Los virus han desarrollado diversas estrategias para bloquear la autofagia e incluso emplear estos mecanismos en favor de su replicación y liberación [21].

La proteína accesoria ORF3a del SARS-CoV 2 inhibe la actividad autofágica mediante el bloqueo de la fusión de autofagosomas con los lisosomas. El ORF3a localizado en el endosoma interactúa directamente con VPS39 y lo secuestra, evitando que el complejo HOPS (Homotypic fusion and protein sorting) interactúe con la proteína autofagosomal SNARE STX17. Esto impide que se constituya el complejo formado por STX-17-SNAP29-VAMP8 SNARE, que media la fusión autofagosoma/anfisosoma con los

lisosomas. La expresi3n de ORF3a tambi3n daña los lisosomas e impide su funci3n. La infecci3n con SARS-CoV-2 bloquea la autofagia, dando lugar a la acumulaci3n de autofagosomas/anfisosomas y provoca el secuestro de VPS39 (Figura 4). Sorprendentemente, ORF3a del SARS – CoV no tiene la capacidad de interactuar con HOPS o de bloquear la autofagia. Este mecanismo por el cual SARS-CoV-2 puede evadir la destrucci3n lisosomal puede ser de gran inter3s a la hora de desarrollar nuevas estrategias para tratar la COVID-19 [22].

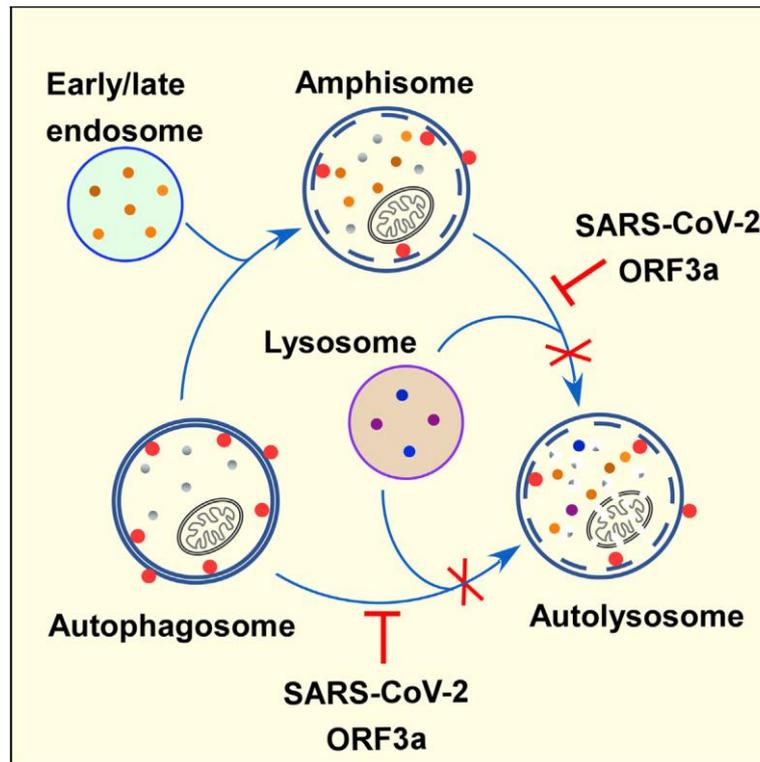


Figura 4. La expresi3n de ORF3a bloquea la formaci3n de autolisosomas. Actúa secuestrando VPS39 en los endosomas tard3os, impidiendo la formaci3n del complejo STX-17 – SNAP-29 -VAMP8 – SNARE [22].

La reciente resoluci3n de la estructura del ORF3a del SARS-CoV-2 indica que forma canales i3nicos (viroporinas) que pueden estar involucrados en el ensamblaje viral, la formaci3n de ampollas en la membrana y en la modulaci3n de la liberaci3n del virus [23]. Esto lo consigue al ensamblarse en homotetr3meros que son estabilizados por el residuo C133. Estos tetr3meros est3n formados por dos d3meros dispuestos uno al lado del otro. Cada prot3mero que constituye el d3mero contiene tres h3lices transmembrana, formando un dominio transmembrana de seis h3lices y una cavidad citos3lica polar formada por m3ltiples hebras β (Figura 5). Esta cavidad polar se llena r3pidamente con iones K^+ y Cl^- , aunque con diferentes din3micas. Mientras que los iones K^+ son capaces de moverse libremente dentro de la cavidad, los iones Cl^- pueden

coordinarse de forma estable mediante una red de aminoácidos cargados positivamente, lo que hace que el potencial electrostático de la cavidad central sea electronegativo [24].

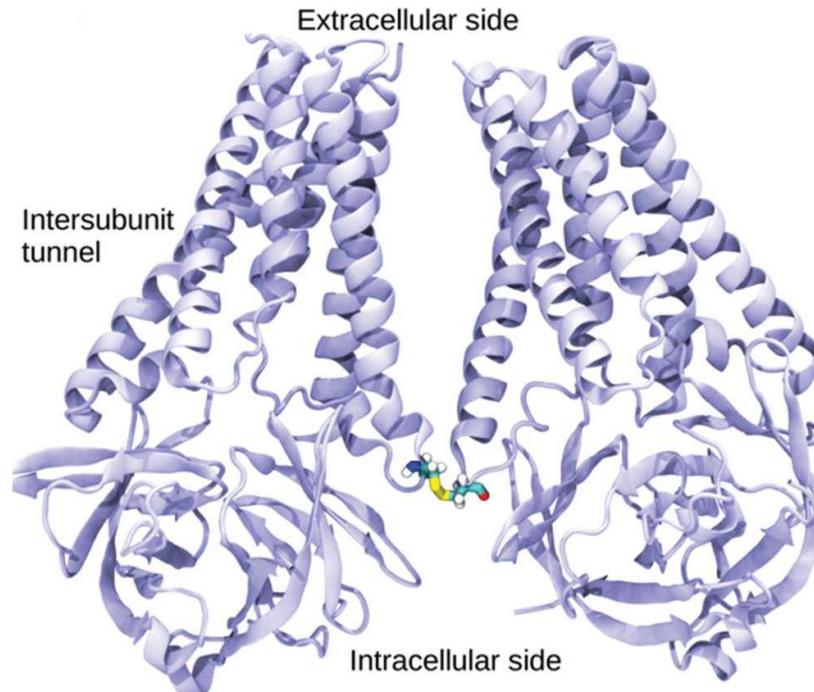


Figura 5. Estructura del tetrámero SARS-CoV-2 ORF3a. Cada dímero posee seis hélices transmembrana y un dominio citoplasmático con una estructura secundaria predominantemente β . Los dos dímeros del tetrámero están unidos covalentemente por un enlace disulfuro formado por residuos homólogos de Cys133 en cada monómero [25].

3.3. ORF6 - Interacción con el poro nuclear e inhibición del transporte citoplasmático-nuclear.

La evasión de la señalización antiviral mediada por IFN es una estrategia de defensa común utilizada por virus patógenos para replicarse y propagarse en su anfitrión. Los interferones (IFNs) son citocinas secretadas con actividad antiviral, constituyendo un componente esencial en la defensa contra patógenos invasores. Se clasifican en tres grupos (tipo I, II y III) dependiendo de la estructura de sus receptores de la superficie celular. La señalización mediada por IFN a su vez induce la transcripción de cientos de genes estimulados por IFN (ISGs) que promueven la respuesta inmune contra la infección [26].

Las carioferinas son proteínas involucradas en el transporte de moléculas entre el citoplasma y el núcleo de una célula eucariota, siendo las importinas un tipo de carioferina. Estas proteínas interactúan con las proteínas del complejo del poro nuclear (NPC), también denominadas nucleoporinas o Nups.

El SARS-CoV-2 es capaz de bloquear la translocación nuclear de STAT1 y STAT2, perjudicando la inducción transcripcional de los genes estimulados por IFN (ISGs). Las proteínas de la familia STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) son un grupo de proteínas que actúan como transductoras de señales y activadoras de la transcripción. La proteína accesoria viral ORF6 ejerce esta actividad anti-IFN. Se trata de una proteína pequeña de tan solo 7 kDa que sólo comparte un 69% de homología con la propia de SARS-CoV. Encontramos que ORF6 se localiza en el complejo de poros nucleares (NPC) e interactúa directamente con Nup98-Rae1 a través de su dominio C-terminal para impedir el acoplamiento del complejo del receptor de carga (carioferina/importina) e interrumpen la importación nuclear de STAT1 y STAT2. Además, se vio que una sustitución de metionina por arginina en el residuo 58 altera la unión de Orf6 al complejo Nup98-Rae1 y suprime su función antagonista de IFN. Esto pone de manifiesto que esta proteína accesoria desempeña un mecanismo de antagonismo viral en el que un virus secuestra el complejo Nup98-Rae1 para evitar la acción antiviral del IFN [27].

Cabe destacar que la proteína ORF6 de SARS-CoV es capaz de inducir apoptosis celular. Esta inducción es caspasa-3 dependiente y vía JNK dependiente. Además, también inducía estrés en el retículo endoplasmático (ER) cuando se encontraba sobreexpresada. En esta situación las funciones del ER están afectadas, incluyendo la inhibición de la glicosilación, reducción de los enlaces disulfuro, agotamiento del calcio del lumen del ER, expresión de proteínas mutantes en el ER y la alteración el transporte de proteínas hacia el aparato de Golgi [14]. Sin embargo, estas funciones no han sido reportadas aún en ORF6 de SARS-CoV-2.

3.4. ORF7a – Inhibición de la respuesta mediada por IFN

La ubiquitinación proteica es un tipo de modificación postraduccional que regula muchos aspectos de la biología de las células eucariotas, incluyendo las infecciones virales, al jugar un importante papel en la modulación de la respuesta inmune. Los virus han evolucionado para evadir esta respuesta inmunitaria mediante la manipulación de este sistema de ubiquitinación [28].

El SARS-CoV-2 es capaz de usurpar el sistema de ubiquitinación de la célula hospedadora para poli-ubiquitar ORF7a en Lys119. Esta poli-ubiquitinación permite que ORF7a inhiba la vía de señalización del IFN tipo I mediante la fosforilación de STAT2, lo que impide su translocación nuclear. Esto se comprobó viendo que ORF7a con el sitio de ubiquitinación mutado no era capaz de inhibir la respuesta mediada por IFN-I, al no ser capaz de producir la fosforilación de STAT2, mientras que si se encontraba ubiquitinada si era capaz de producir la fosforilación de STAT2, lo que impedía su transporte al núcleo y la activación de los genes ISGs [29]. De esta forma ORF7a desempeña un papel clave en la modulación de la respuesta inmune del hospedador.

Objetivos

Se plantean los siguientes objetivos específicos en este trabajo:

- 1) Crear herramientas biotecnológicas para la expresión y el estudio funcional de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a del SARS-CoV-2 en levadura.
- 2) Determinar la localización intracelular de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a del SARS-CoV-2 en levadura.
- 3) Caracterizar las funciones biológicas de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a del SARS-CoV-2 en levadura.

Materiales y métodos

1. Cepas de bacterias y levadura

La cepa bacteriana que se empleó en este trabajo para la propagación y aislamiento de plásmidos, fue DH5 α (F⁻ Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ) de *Escherichia coli* (*E. coli*).

Los medios de cultivo que se emplearon para estas bacterias fueron los siguientes:

LB (Luria Bertani) líquido: 0,5% extracto de levadura, 1% triptona y 1% cloruro sódico mezclado en agua MiliQ. Se autoclavó a 121°C durante 20-30 minutos.

LB (Luria Bertani) sólido: 0,5% extracto de levadura, 1% triptona, 1% cloruro sódico y 2% de agar bacteriológico mezclado en agua MiliQ. Se autoclavó a 121°C durante 20-30 minutos.

Para la selección de plásmidos, se suplementaba con ampicilina (50 μ g/ml) o kanamicina (100 μ g/ml) según fuera necesario y se cultivaban a 37°C.

Las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizaron en este trabajo se muestran a continuación (Tabla 1):

Nombre	Genotipo relevante	Fuente
BY4741	<i>MATa; his3 Δ1; leu2 Δ0; met15 Δ0; ura3 Δ0</i> (cepa silvestre laboratorio)	Euroscarf, colección de cepas de laboratorio
BY4741 GAL1-Orf3a-3Flag	BY4741 con pGBW-m4046526 GAL1-Orf3a-3xFlag; URA3	Este trabajo
BY4741 GAL1-Orf6-3Flag	BY4741 con pGBW-m4046349 GAL1-Orf6-3xFlag; URA3	Este trabajo
BY4741 GAL1-Orf7a-3Flag	BY4741 con pGBW-m4046349 GAL1-Orf7a-3xFlag; URA3	Este trabajo
BY4741 413-GAL1-Orf3a-3Flag	BY4741 con pAG413-GAL1-Orf3a-3xFlag; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GAL1-Orf3a-3Flag	BY4741 con pAG423-GAL1-Orf3a-3xFlag; HIS3	Este trabajo
BY4741 413-GAL1-Orf6-3Flag	BY4741 con pAG413-GAL1-Orf6-3xFlag; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GAL1-Orf6-3Flag	BY4741 con pAG423-GAL1-Orf6-3xFlag; HIS3	Este trabajo
BY4741 413-GAL1-Orf7a-3Flag	BY4741 con pAG413-GAL1-Orf7a-3xFlag; HIS3	Este trabajo

BY4741 423-GAL1-Orf7a-3Flag	BY4741 con pAG423-GAL1-Orf7a-3xFlag; HIS3	Este trabajo
BY4741 413-GAL1-Orf3a-eGFP	BY4741 con pAG413-GAL1-Orf3a-eGFP; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GAL1-Orf3a-eGFP	BY4741 con pAG423-GAL1-Orf3a-eGFP; HIS3	Este trabajo
BY4741 413-GAL1-Orf6-eGFP	BY4741 con pAG413-GAL1-Orf6-eGFP; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GAL1-Orf6-eGFP	BY4741 con pAG423-GAL1-Orf6-eGFP; HIS3	Este trabajo
BY4741 413-GAL1-Orf7a-eGFP	BY4741 con pAG413-GAL1-Orf7a-eGFP; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GAL1-Orf7a-eGFP	BY4741 con pAG423-GAL1-Orf7a-eGFP; HIS3	Este trabajo
BY4741 426-GPD-Orf3a-eGFP	BY4741 con pAG426-GPD-ORF3a-eGFP; URA3	Este trabajo
BY4741 423-GPD-Orf3a-3Flag	BY4741 con pAG423-GPD-Orf3a-3xFlag; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GPD-Orf3a-eGFP	BY4741 con pAG423-GPD-Orf3a-eGFP; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GPD-Orf6-3Flag	BY4741 con pAG423-GPD-Orf6-3xFlag; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GPD-Orf6-eGFP	BY4741 con pAG423-GPD-Orf6-eGFP; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GPD-Orf7a-3Flag	BY4741 con pAG423-GPD-Orf7a-3xFlag; HIS3	Este trabajo
BY4741 423-GPD-Orf7a-eGFP	BY4741 con pAG423-GPD-Orf7a-eGFP; HIS3	Este trabajo
BY4741 pAG413 mtRosella	BY4741 con pAG413-GAL1-ccdB y pVT100-mtRosella	Este trabajo
BY4741 pAG423 mtRosella	BY4741 con pAG423-GAL1-ccdB y pVT100-mtRosella	Este trabajo
BY4741 413-GAL1-Orf3a-3Flag mtRosella	BY4741 con pAG413-GAL1-Orf3a-3xFlag y pVT100-mtRosella	Este trabajo
BY4741 423-GAL1-Orf3a-3Flag mtRosella	BY4741 con pAG423-GAL1-Orf3a-3xFlag y pVT100-mtRosella	Este trabajo

Tabla 1. Conjunto de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 empleadas en este trabajo.

Los medios empleados para los cultivos de levadura *S. cerevisiae* fueron los siguientes:

Medio YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose) líquido: 1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa (dextrosa) disuelto en agua MiliQ. Se autoclavó a

121°C durante 20-30 minutos. Los cultivos de levaduras en este medio se incubaron en 28°C en agitación (180-200 rpm).

Medio YPD (Yeast extract – Peptone – Dextrose) sólido: 1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa (dextrosa) y 2% de agar bacteriológico disuelto en agua MiliQ. Se autoclavó a 121°C durante 20-30 minutos. Los cultivos de levaduras en este medio fueron incubados a 28°C.

Medio SD (Synthetic Dextrose) líquido: Se disuelve en agua MiliQ 6,7g/l de YNB (Yeast Nitrogen Base without aminoacids) y 20g/l de glucosa (desxtrosa). Se autoclava a 121°C durante 20-30 minutos y posteriormente se añade ácido succínico 50 mM a pH 5,5. El medio se puede suplementar con los aminoácidos requeridos (2,5 g/l de uracilo 100x, 10 g/l de histidina 100x, 10 g/l de leucina 100x y 10 g/l de metionina 100x). Los cultivos de levadura en este medio fueron incubados a 28°C en agitación (180-200 rpm).

Medio SD (Synthetic Dextrose) sólido: Se disuelve en agua MiliQ 6,7 g/l de YNB (Yeast Nitrogen Base without aminoacids), 20 g/l de glucosa (desxtrosa) y 20 g/l de agar bacteriológico. Se autoclava a 121°C durante 20-30 minutos y posteriormente se añade ácido succínico 50 mM a pH 5,5. El medio se puede suplementar con los aminoácidos requeridos (2,5 g/l de uracilo 100x, 10 g/l de histidina 100x, 10 g/l de leucina 100x y 10 g/l de metionina 100x). Los cultivos de levadura en este medio fueron incubados a 28°C.

Medio SGal (Synthetic Galactose) líquido: Se disuelve en agua MiliQ 6,7g/l de YNB (Yeast Nitrogen Base without aminoacids) y 20g/l de galactosa. Se autoclava a 121°C durante 20-30 minutos y posteriormente se añade ácido succínico 50 mM a pH 5,5. El medio se puede suplementar con los aminoácidos requeridos (2,5 g/l de uracilo 100x, 10 g/l de histidina 100x, 10 g/l de leucina 100x y 10 g/l de metionina 100x). Los cultivos de levadura en este medio fueron incubados a 28°C en agitación (180-200 rpm).

Medio SGal (Synthetic Galactose) sólido: Se disuelve en agua MiliQ 6,7 g/l de YNB (Yeast Nitrogen Base without aminoacids), 20 g/l de galactosa y 20 g/l de agar bacteriológico. Se autoclava a 121°C durante 20-30 minutos y posteriormente se añade ácido succínico 50 mM a pH 5,5. El medio se puede suplementar con los aminoácidos requeridos (2,5 g/l de uracilo 100x, 10 g/l de histidina 100x, 10 g/l de leucina 100x y 10 g/l de metionina 100x). Los cultivos de levadura en este medio fueron incubados a 28°C.

Medio de ayuno (SN) líquido: Mezclamos en agua MiliQ 20 g/l de glucosa (dextrosa) y 1,25 g/l de YNB (Yeast Nitrogen Base) sin aminoácidos y sin sulfato de amonio. Autoclavamos a 121°C durante 20-30 minutos. Los cultivos en este medio fueron incubados a 28°C en agitación (180-200 rpm).

2. Cebadores utilizados

En este trabajo hemos empleado diferentes cebadores con dos fines principalmente, realizar clonaciones mediante el sistema Gateway® de los diferentes ORFs y para secuenciación.

A continuación, se muestran los distintos cebadores empleados para la clonación de los distintos ORFs mediante el sistema Gateway® y sus correspondientes secuencias (Tabla 2).

Nombre	Secuencia 5´-3	Aplicación
Orf3aGwFw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTATGGATTTGTTTATGAGAATCTTC	clonar Orf3a en pDONR221 (Gateway®)
Orf3aGwRev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTTCAAAGGCACGCTAGTAGTCGT	clonar Orf3a en pDONR221 (Gateway®)
Orf3aGwRevFlag	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTAGAATTCTCGACTATTTATCG	clonar Orf3a-3xFlag en pDONR221 (Gateway®)
ORF6GwFw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTATAATGTTTCATCTCGTTGAC	clonar Orf6 en pDONR221 (Gateway®)
ORF6GwRev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTGATCAATCTCCATTGGTTGCTC	clonar Orf6 en pDONR221 (Gateway®)
ORF7aGwFw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTATAATGAAAATTATTCTTTTCTTG	clonar Orf7a en pDONR221 (Gateway®)
ORF7aGwRev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTGTCTGTCTTTCTTTTGAGTGTC	clonar Orf7a en pDONR221 (Gateway®)
ORF6- 7aGwRevFlag	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG GGTTTATTTATCATCATCATCTTTAT	clonar Orf6-3xFlag y Orf7a-3xFlag en pDONR221 (Gateway®)

Tabla 2. Cebadores empleados en este trabajo para las clonaciones por Gateway®.

Por otro lado, los cebadores empleados para realizar las diferentes secuenciaciones fueron los siguientes (Tabla 3).

Nombre	Secuencia 5' – 3'	Aplicación
ORF3aFw2	CACTTCAGACTATTACCAGGTG	secuenciar C-term ORF3a SARS CoV 2
ORF6Fw	GAATCTTGATTACATCATAAACCTC	secuenciar C-term ORF6 SARS CoV 2
ORF7aFw	CAGTTACGTGCCAGATCAGTTTC	secuenciar C-term ORF7a SARS CoV 2
GAL1Seq	AATATACCTCTATACTTTAACGTC	secuenciar N-term de plásmidos pAG413- y pAG423-GAL1-Orfx
M13Fw	GTAAAACGACGGCCAG	secuenciar derivados de plásmidos pDONR221, pAG413, pAG423
M13Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	secuenciar derivados de plásmidos pDONR221, pAG413, pAG423

Tabla 3. Cebadores empleados para las diferentes secuenciaciones realizadas a lo largo de este trabajo.

3. Plásmidos utilizados

En la siguiente tabla (Tabla 4) queda reflejado el listado de plásmidos empleados en este trabajo.

Nombre	Características	Aplicación
pDONR221	attP1-ccdB/CamR- attP2; KanR (Gateway®)	Vector de entrada (“entry vector”) para subclonaciones de ORF3a, ORF6 y ORF7a
pGBW-m4046526	GAL1p-Orf3a-3xFlag; AmpR; URA3; 2micron (Addgene)	Expresión inducible por Gal de Orf3a-3xFlag en levadura
pGBW-m4046349	GAL1p-Orf6-3xFlag; AmpR; URA3; 2micron (Addgene)	Expresión inducible por Gal de Orf6-3xFlag en levadura
pGBW-m4046465	GAL1p-Orf7a-3xFlag; AmpR; URA3; 2micron (Addgene)	Expresión inducible por Gal de Orf7a-3xFlag en levadura
pAG413-GAL1p-ccdB-no tag	GAL1p-attR1- ccdB/CamR-attR2; AmpR; HIS3; CEN (Gateway®)	Expresión inducible por Gal de Orf3a,6,7a-3xFlag en levadura en copia única
pAG423-GAL1p-ccdB-no tag	GAL1p-attR1- ccdB/CamR-attR2; AmpR; HIS3; 2micron (Gateway®)	Expresión inducible por Gal de Orf3a,6,7a-3xFlag en levadura en multicopia

pAG413-GAL1p-ccdB-eGFP	GAL1p-attR1-ccdB/CamR-attR2-eGFP; AmpR; HIS3; CEN (Gateway®)	Expresión inducible por Gal de Orf3a,6,7a-eGFP en levadura en copia única
pAG423-GAL1p-ccdB-eGFP	GAL1p-attR1-ccdB/CamR-attR2-eGFP; AmpR; HIS3; 2micron (Gateway®)	Expresión inducible por Gal de Orf3a,6,7a-eGFP en levadura en multicopia
pAG423-GPD-ccdB-eGFP	TDH3p-attR1-ccdB/CamR-attR2-eGFP; AmpR; HIS3; 2micron (Gateway®)	Expresión constitutiva de Orf3a,6,7a-eGFP en levadura en multicopia
pAG426-GPD-ccdB-eGFP	TDH3p-attR1-ccdB/CamR-attR2-eGFP; AmpR; URA3; 2micron (Gateway®)	Expresión constitutiva de Orf3a-eGFP en levadura en multicopia
pVT100-Rosella	ADH1p-mtRosella; AmpR; URA3; 2micron	Expresión de indicador dual Rosella para visualizar mitofagia
pAG423-GPD-ccdB- no tag	TDH3p-attR1-ccdB/CamR-attR2; AmpR; HIS3; 2micron (Gateway®)	Expresión constitutiva de Orf3a,6,7a- 3xFlag en levadura en multicopia

Tabla 4. Plásmidos empleados en este trabajo.

4. Amplificación de fragmentos de DNA por PCR

La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica de biología molecular que permite la amplificación de un fragmento específico de DNA al emplear unos cebadores específicos.

Las reacciones diseñadas tenían un volumen final de 50 μ l. Para cada una de ellas, se añadió 5 μ l de tampón de PCR 10X comercial (DreamTaq DNA polymerase, Thermo Scientific TM), 1 μ l de Taq polimerasa a 1 U/ μ l (DreamTaq DNA polymerase, Thermo Scientific TM), 5 μ l de dNTPs a 2 mM, 1 μ l de cada uno de los cebadores (100 μ M), 1 μ l de ADN molde y 36 μ l de H₂O.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C; 30 ciclos de amplificación (30 segundos a 95°C para la desnaturalización, 30 segundos a 53°C para el alineamiento y 2,5 minutos a 72°C para la extensión); el paso final fue la elongación a 72°C durante 10 minutos.

5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para comprobar la calidad del DNA obtenido en las diferentes reacciones de PCR, se realizaron geles de agarosa al 1%. Para realizar estos geles se empleó tampón 1XTAE (50XTAE: 57,1 ml de ácido acético glacial, 100 ml de EDTA 0,5M pH 8 y agua destilada hasta 1 litro). Para el marcaje de los ácidos nucleicos se empleó 1 μ l GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) que consiste en dos subunidades de eitidio unidas por un espaciador oxigenado lineal, siendo una tinción de ácido nucleico intercalante.

Como patrón para el gel usamos MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (Thermo Scientific™). Las muestras que íbamos a analizar tenían un volumen final de 24 μ l, de los cuales 4 μ l eran de DNA Loading Buffer 6X (Thermo Scientific™). Finalmente, los geles se corrían en una cámara de electroforesis horizontal a una corriente constante de 100 V.

Este procedimiento también se empleó para analizar las digestiones de fragmentos de DNA mediante enzimas de restricción o endonucleasas. Estas enzimas reconocen secuencias específicas de DNA y producen cortes en lugares específicos. Normalmente reconocen secuencias palindrómicas, dejando como producto de la digestión extremos cohesivos o extremos romos. Son de gran utilidad para comprobar la correcta inserción de un fragmento en un plásmido o la correcta transformación de una cepa con un plásmido determinado.

6. Construcción de plásmidos por Gateway®

El sistema Gateway® (Invitrogen) se trata de un método molecular que permite transferir fragmentos de ADN entre plásmidos diferentes de forma que se mantenga la pauta de lectura. Este procedimiento utiliza secuencias de recombinación conocidas como “Gateway att” y dos preparados enzimáticos llamados LR Clonase TM y BP Clonase TM II. Este método de clonación es más rápido y eficiente que las técnicas basadas en enzimas de restricción y ligasas.

En este sistema se producen dos reacciones consecutivas de clonación. La primera de ellas es la reacción de clonación BP. Esta se basa en la subclonación del gen de interés en el vector plasmídico pDONR TM 221, para constituir el “Entry clone” o clon de entrada. En esta reacción, la cantidad de producto de PCR que debe utilizarse depende del tamaño del gen correspondiente. Es decir, para genes de 0,5 kb, utilizamos

16,5 ng; para 1 kb, 33 ng; para 1,5 kb, 50 ng; para 2 kb, 66 ng; para 2,5 kb, 82,5 ng; y para 3 kb, 100 ng. Para clonar ORF3a, ORF6 y ORF7a utilizamos 33 ng al tener un tamaño próximo a 1 kb.

Se mezcló en un tubo eppendorf la cantidad correspondiente del producto PCR de nuestro gen de interés con el vector pDONR TM 221 (150 ng/ μ l), el tampón TE (2 μ l) y la enzima BP Clonase TM II (1 μ l). Se realizó una incubación de 1 hora a 25°C. Posteriormente, se añadió 0,5 μ l de proteinasa K (2 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 10 minutos para inactivar la Clonasa, RNasas y DNasas presentes. En esta reacción se consigue catalizar la recombinación e inserción de los productos de PCR con las secuencias attB en los sitios de recombinación del vector pDONR TM 221, denominados attP. El vector de entrada está constituido una vez insertado el fragmento en el plásmido pDONR TM 221 y las secuencias de recombinación de este nuevo plásmido se denominan attL.

La segunda reacción que se produce se conoce como reacción de clonación LR. En esta segunda reacción del procedimiento Gateway® (Invitrogen), se pretende transferir el fragmento génico contenido en el clon de entrada, a otro vector conocido como Destination Vector (Invitrogen) o vector de destino. Este nuevo vector contiene secuencias específicas de recombinación conocidas como attR, las cuales permiten la transferencia del fragmento de interés al nuevo vector. Para realizar esta reacción, se mezcló en un tubo eppendorf el producto PCR procedente del vector de entrada (amplificado con cebadores M13fw y M13rev) con nuestro gen de interés (150 ng/ μ l), el vector de destino pAG (150 ng/ μ l), el tampón TE (2 μ l) y la preparación enzimática LR Clonase TM (1 μ l). La mezcla se agitó empleando vórtex y se incubó 1 hora a 25°C. Tras esta incubación se añadió proteinasa K (2 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

Con este procedimiento construimos vectores de expresión para ORF3a, 6 y 7a empleando los siguientes plásmidos: pAG426-GPD-ccdB-eGFP, pAG423-GPD-ccdB-eGFP, pAG423-GAL1p-ccdB-eGFP, pAG413-GAL1p-ccdB-eGFP, pAG423-GAL1p-ccdB-no tag, pAG413-GAL1p-ccdB-no tag [30].

Todos estos plásmidos fueron comprobados por restricción y purificados. La eficiencia de purificación se comprobó mediante la medida de la concentración del plásmido purificado. Para esto se empleó NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™). Estos plásmidos se emplearon para transformar levadura (*Saccharomyces cerevisiae* BY471) y así permitir su posterior estudio.

7. Transformación de bacterias

Para la transformación de bacterias se empleó la cepa competente DH5 α (F Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r $_{k}^{-}$, m $_{k}^{+}$) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1* λ^{-}) de *Escherichia coli* (*E. coli*) almacenadas en el laboratorio a -80°C . Estas células bacterianas competentes tienen la capacidad de incorporar DNA exógeno del ambiente.

A la hora de llevar a cabo la transformación, mezclamos 100 μl de estas células bacterianas con 3 μl del producto obtenido de cada reacción Gateway $^{\circledR}$. Se dejaba 10 minutos en hielo y a continuación se sometían a un shock térmico para poder producir la entrada del DNA plasmídico al interior de la célula. Este shock consiste en incubar a 42°C durante 1 minuto y después introducirlas 5 minutos en hielo. Tras este shock térmico, se añade 1ml de medio LB líquido y se deja incubando 1 hora a 37°C en leve agitación. Posteriormente, centrifugamos 1 minuto a 13.000 rpm y se desecha el sobrenadante. Finalmente, cultivamos las células en medio sólido selectivo (LB Kan para la reacción BP y LB Amp para la reacción LR). Las placas sembradas se dejan incubando 1 día a 37°C hasta obtener colonias de interés

Una vez obtenidas las colonias de interés estas serán subcultivadas para posteriormente realizar la extracción del plásmido de interés. Para dicha extracción utilizaremos el kit de extracción NucleoSpin Plasmid, Mini kit for plasmid DNA (Macherey-Nagel $^{\text{TM}}$). La eficacia de la extracción será evaluada midiendo la concentración de DNA con NanoDrop $^{\circledR}$ ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific $^{\text{TM}}$) y se comprobará la correcta inserción de nuestro ORF de interés mediante secuenciación del plásmido y el análisis de su corte con endonucleasas.

8. Transformación de levaduras

Para realizar la transformación en levadura se empleó el método LiAc/SS carrier DNA/PEG [31] con algunas modificaciones.

En primer lugar, cultivamos las células de levadura hasta una densidad óptica (OD) adecuada de 0,7-1,2. Para esto cultivamos 2-5 μl de células de levadura en 50 ml de YPD durante un día en agitación. Posteriormente, centrifugamos a 3000 g durante 5 minutos y resuspendemos el pellet resultante en 25 ml de agua estéril. Repetimos las centrifugaciones y los lavados con agua estéril tres veces. Finalmente, resuspendemos

el pellet en 1 ml de agua estéril y utilizaremos 0,1 ml por cada reacción de transformación que vayamos a realizar.

Para que la reacción de transformación se desarrolle es necesario mezclar 240 μ l de PEG 3350 (50%(w/v)), 36 μ l de LiAc 1.0 M (Acetato de Litio), 50 μ l de SS DNA (Salmon Sperm DNA, 10 mg/ml), 2 - 3 μ l del plásmido de interés (al control solo se le añade agua) y 31 – 32 μ l de agua estéril. Este mix se añade a los 100 μ l de células de levadura y se deja incubando 40 minutos a 42°C. Una vez transcurrido este tiempo, centrifugamos a 13000 g durante 1 minuto y descartamos el sobrenadante. Volvemos a resuspender con agua estéril para eliminar los restos del mix anterior que puedan quedar y volvemos a centrifugar. Finalmente, plaqueamos el pellet resultante en medio sólido con deficiencia de algún aminoácido esencial. De esta forma hacemos una selección protótrofa. Incubamos las placas a 30°C durante 3-4 días y contamos el número de transformantes obtenidos.

9. Obtención de extractos de proteína total de levadura

Realizamos la obtención de extractos de proteína total de las cepas de levadura obtenida mediante Gateway®, para posteriormente medir su concentración mediante Bradford Protein Assay y realizar geles de poliacrilamida de electroforesis de proteínas, para finalmente realizar una detección inmunológica de los ORFs de interés.

Para llevar a cabo la obtención de los extractos de proteína total tenemos que crecer las cepas durante un día en un volumen de 10-100 ml. Una vez crecidas centrifugamos el cultivo (3000rpm, 3 minutos) y realizamos dos lavados, uno con agua y otro con Extraction Buffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 15 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 y 2 mM DTE). Después de estos lavados añadimos otra vez Extraction Buffer y Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Las muestras son pasadas a tubos eppendorf y añadimos la misma cantidad de bolas de vidrio (glass beads, 0,5 mm de diámetro). Para llevar a cabo la ruptura de las células utilizamos el Homogeneizador 3D Precellys® 24. Realizamos 5 ciclos de 1 minuto, manteniendo las muestras en hielo entre ciclo y ciclo. Posteriormente, centrifugamos las muestras a 4°C durante 5 minutos a 10000 rpm y transferimos el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.

Una vez obtenidos los extractos es necesario cuantificar la concentración proteica que tienen cada uno, para ello realizamos un ensayo Bradford Protein Assay en Spark® Multimode Microplate Reader de Tecan.

En primer lugar, preparamos 5 diluciones de BSA (albúmina de suero bovino) a diferentes concentraciones (1 – 0,5 – 0,25 – 0,1 – 0,05 mg/ml) para confeccionar nuestra recta patrón. Pipeteamos 10 µl de cada una de nuestras muestras y de las de BSA en una placa de 96 pocillos. Añadimos 200 µl de Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent y dejamos incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente medimos la absorbancia de las muestras a 595 nm. De esta forma podemos conocer la concentración proteica de cada extracto al compararlo con la recta patrón confeccionada con los datos de las muestras de BSA.

10. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferencia a membrana PVDF y detección inmunológica

Los geles de poliacrilamida que emplearemos para la separación proteica constan de dos partes: el resolving gel, donde las proteínas se separan en función de su peso molecular, y el stacking gel, donde las proteínas se concentran en una fina línea antes de pasar al resolving gel.

El resolving gel que usaremos será al 15% (para separar proteínas en un rango de 10 – 100 kDa). Para ello mezclaremos 4,5 ml de 2X Resolving Buffer (0,75 M Tris/HCl pH 8,8 + 0,2% SDS), 3,375 ml de acrilamida – bis 29:1, 1,125 ml de agua MiliQ, 60 µl de APDS (peroxidosulfato de amonio, al 10% en agua) y 3 µl de TEMED (tetrametiletilendiamina).

El stacking gel estará al 3% y lo confeccionamos mezclando 1,8 ml de 2X Stacking Buffer (0,25M Tris/HCl pH 6,8 + 0,2% SDS) 0,3 ml de acrilamida – bis 29:1, 1,5 ml de agua MiliQ, 30 µl de APDS y 60 µl de TEMED.

Una vez polimerizados los geles los introducimos en la celda de electroforesis (Mini Protean II, BioRad) y la llenamos con 1X SDS PAGE Running buffer (1,92 M glicerina, 1% SDS pH 8,3). Inyectamos las muestras de los extractos proteicos ajustadas a la misma concentración proteica y preparadas en 1X Laemli Buffer (5X Laemli Buffer: 0,3 M Tris/HCl pH 6,8 – 7,5% SDS – 0,1M DTE – 10 Mm EDTA – 30% Sacarosa – 0,25 mg/ml Azul de Bromofenol). Corremos las muestras a 100V hasta que llegan al final del resolving gel.

Una vez terminada la electroforesis, nos quedamos con el resolving gel que contiene nuestras muestras proteicas y preparamos un “sándwich” de transferencia proteica constituido de la siguiente manera:

(+) esponja – papel de filtro – membrana PVDF – gel – papel de filtro – esponja (-).

Todos los componentes, excepto el gel, tienen que ser incubados brevemente en 1X Transfer Buffer (1X SDS PAGE Running buffer + 20% metanol). La membrana PVDF tiene que ser incubada en primer lugar en metanol (30 segundos). Este “sándwich” se coloca en el casete de transferencia y se llena con 1X Transfer Buffer y dejamos transfiriéndose las proteínas a la membrana 1 día aproximadamente (15-20 V). Las proteínas serán visualizadas usando la tinción Direct Blue 71 (DB71).

Para la detección inmunológica incubamos la membrana en 1xTBS (1,5M NaCl + 0,2M Tris/HCl pH 7,6) + 0,1% Tween 20 + 2% leche en polvo, durante 30 minutos para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente, incubamos la membrana 1 hora con el anticuerpo primario (anti-Flag M2 mouse monoclonal, 1:10000 en 1xTBS + 0,1% Tween 20 + 2% leche en polvo). Después de esta incubación lavamos la membrana 3x 5 minutos con 1xTBS + 0,1% Tween 20 + 2% leche en polvo. Posteriormente, incubamos 1 hora con el anticuerpo secundario (anti-mouse HRP 1:10000 en 1xTBS + 0,1% Tween 20). Finalmente, realizamos tres lavados de 5 minutos de la membrana con 1xTBS + 0,1% Tween 20 y detectamos nuestras proteínas de interés mediante fluorescencia usando el kit ECL para Western Blot.

11. Análisis cuantitativo del crecimiento de cultivos de levadura (Tecan)

El análisis cuantitativo del crecimiento de cultivos de levadura lo realizaremos en Spark® Multimode Microplate Reader de Tecan.

Para ello crecemos previamente las cepas de levadura con los plásmidos de interés (obtenidas por Gateway®) en medio líquido SD suplementado con los aminoácidos correspondientes. Ajustamos estos cultivos a OD 1 y ponemos 27 µl de cada cultivo y 243 µl de medio. Utilizamos tanto medio SD como SGal para comparar el crecimiento de las cepas en ambos medios, ya que nuestras proteínas de interés (ORF3a, ORF6 y ORF7a) se expresan de forma inducible en presencia de galactosa. Una vez elaborada la placa de 96 pocillos con nuestras cepas, las dejamos crecer durante 72 horas en Spark® Multimode Microplate Reader de Tecan, midiendo cada 30

minutos la absorbancia de cada pocillo. De esta forma, podemos elaborar gráficas de crecimiento de cada cepa de levadura tanto en medio SD como en medio SGal.

12. Microscopía confocal

La microscopía confocal permite realizar secciones ópticas de muestras con marcaje fluorescente y posteriormente realizar una imagen tridimensional en base a las secuencias ópticas detectadas. Tiene el mismo fundamento que la microscopía de fluorescencia, pero se diferencia en la presencia de un láser que excita la muestra con la longitud de onda que deseamos. Además, presenta un diafragma o “*pinhole*” localizado delante del detector para poder detectar un único plano focal. Este microscopio hace que sea más sencillo analizar muestras *in vivo* a lo largo de una secuencia temporal.

Para el análisis de levaduras con GFP, estas levaduras fueron crecidas en medio SD y SGal hasta fase exponencial y fueron analizadas por microscopía confocal (Leica TCS SP8 con objetivo 60x). Se empleó una longitud de onda de excitación de 488 nm y 509 nm de emisión.

Para analizar levaduras con GFP + tinción CMAC (Cell Tracker Blue, Invitrogen, tinción vacuolar) crecemos las levaduras hasta fase exponencial y aplicamos dicha tinción (1µl CMAC (1 mg/ml) / 100 µl medio). Se empleó una longitud de onda de excitación de 493 nm y 532 nm de emisión para GFP. Para CMAC utilizamos 353 nm de excitación y 466 nm de emisión.

Para realizar el análisis de levaduras con GFP + tinción DAPI (tinción nuclear) crecemos las levaduras hasta fase exponencial y aplicamos la tinción DAPI (1 ml PBS + 1,25 µl DAPI a 1 mg/ml). Para ello fijamos previamente las células en etanol incubando media hora a temperatura ambiente 333 µl del cultivo celular con 666 µl de etanol. Una vez fijadas, lavamos y resuspendemos las células con 1x PBS y aplicamos la tinción DAPI. Se empleó una longitud de onda de excitación de 493 nm y 532 nm de emisión para GFP. Para DAPI utilizamos 350 nm de excitación y 470 nm de emisión.

El análisis de levaduras con GFP + tinción ER Tracker Blue (Invitrogen) se llevó a cabo creciendo las levaduras hasta fase exponencial y añadimos el ER Tracker Blue a una concentración de 5 µM. Se empleó una longitud de onda de excitación de 493 nm

y 532 nm de emisión para GFP. Para ER Tracker Blue usamos 374 nm de excitación y 430 nm de emisión.

Por último, también analizaremos levaduras transformadas con el plásmido pVT100ROS, además de con el plásmido con nuestra proteína de interés fusionada con GFP y con la tinción vacuolar CMAC. Este plásmido contiene el reportero *Rosella* que presenta una proteína fluorescente roja (DsRed) estable al pH unida a una proteína verde sensible al pH (pHluorina GFP). Su funcionamiento se basa en las diferencias de pH que hay entre la vacuola (5,0 - 5,5) y las mitocondrias (8,2). En condiciones de crecimiento las células muestran una fluorescencia verde y roja distribuida de una manera característica de las mitocondrias. Las vacuolas no tendrán fluorescencia asociada. Cuando se dan situaciones de ayuno de nitrógeno, se induce el proceso de mitofagia (se transportan las mitocondrias a la vacuola donde se degradan y reciclan) las células muestran fluorescencia roja en la luz vacuolar. De esta forma se puede medir la actividad mitofágica en las células [32].

Creceremos las células en medio SGal (control) y en medio SN- (ayuno) hasta fase exponencial. Aplicaremos la tinción CMAC y las visualizamos por microscopía confocal. Se empleó una longitud de onda de excitación de 488 nm y 509 nm de emisión para GFP. Para CMAC utilizamos 353 nm de excitación y 466 nm de emisión. Para Rosella se empleó una longitud de onda de excitación de 545 nm y una longitud de onda de emisión de 572 nm.

Resultados y Discusión

1. Construcción y verificación de plásmidos para la expresión constitutiva e inducible de ORF3a, ORF6 y ORF7a.

Para poder evaluar la expresión y realizar un estudio funcional de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a del SARS-CoV-2 en levadura es necesario crear herramientas biotecnológicas adecuadas que permitan su estudio (objetivo específico 1).

Mediante el sistema Gateway® creamos una serie de plásmidos (Tabla 5) que posteriormente fueron transformados, según el método LiAc/SS carrier DNA/PEG [31] con algunas modificaciones, en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. De esta forma obtenemos una colección de cepas que nos permite evaluar la expresión de las proteínas de interés ORF3a, ORF6 y ORF7a y realizar un estudio funcional de estas.

Construcción	Expresión	Número de copias
pAG413-GAL1p– ORF3a – 3xFlag	Inducible	Centromérico
pAG413-GAL1p– ORF6 – 3xFlag	Inducible	Centromérico
pAG413-GAL1p– ORF7a – 3xFlag	Inducible	Centromérico
pAG423-GAL1p– ORF3a – 3xFlag	Inducible	Multicopia
pAG423-GAL1p– ORF6 – 3xFlag	Inducible	Multicopia
pAG423-GAL1p– ORF7a- 3xFlag	Inducible	Multicopia
pAG413-GAL1p– ORF3a - eGFP	Inducible	Centromérico
pAG413-GAL1p– ORF6 - eGFP	Inducible	Centromérico
pAG413-GAL1p– ORF7a - eGFP	Inducible	Centromérico
pAG423-GAL1p– ORF3a - eGFP	Inducible	Multicopia
pAG423-GAL1p– ORF6 - eGFP	Inducible	Multicopia
pAG423-GAL1p– ORF7a - eGFP	Inducible	Multicopia
pAG423-GPD– ORF3a - eGFP	Constitutiva	Multicopia
pAG423-GPD– ORF6 - eGFP	Constitutiva	Multicopia
pAG423-GPD- ORF7a - eGFP	Constitutiva	Multicopia
pAG423-GPD– ORF3a – 3xFlag	Constitutiva	Multicopia
pAG423-GPD– ORF6 – 3xFlag	Constitutiva	Multicopia
pAG423-GPD– ORF7a – 3xFlag	Constitutiva	Multicopia
pAG426-GPD– ORF3a - eGFP	Constitutiva	Multicopia

Tabla 5. Construcciones plasmídicas creadas en este trabajo con el objetivo de poder analizar la expresión de nuestras proteínas de interés y estudiar sus funciones.

Una vez obtenidas estas construcciones es necesario verificar que son correctas. Esto lo haremos mediante el uso de endonucleasas específicas y el posterior análisis de los fragmentos resultantes (Tabla 6).

Construcción	Endonucleasas empleadas	Tamaño de los fragmentos
pAG413-GAL1p- ORF3a – 3xFlag	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	2 fragmentos 5,6 + 1,1 kb
pAG413-GAL1p- ORF6 – 3xFlag	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	2 fragmentos 5,6 + 0,9 kb
pAG413-GAL1p- ORF7a – 3xFlag	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	2 fragmentos 5,6 + 0,9 kb
pAG423-GAL1p- ORF3a – 3xFlag	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	3 fragmentos 3,65 + 2,8 + 1,1kb
pAG423-GAL1p- ORF6 – 3xFlag	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	3 fragmentos 3,65 + 2,8 + 0,9 kb
pAG423-GAL1p- ORF7a- 3xFlag	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	3 fragmentos 3,65 + 2,8 + 0,9 kb
pAG413-GAL1p- ORF3a-eGFP	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	2 fragmentos 6,3 + 1,1 kb
pAG413-GAL1p- ORF6-eGFP	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	2 fragmentos 6,3 + 0,9 kb
pAG413-GAL1p- ORF7a-eGFP	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	2 fragmentos 6,3 + 0,9 kb
pAG423-GAL1p- ORF3a-eGFP	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	3 fragmentos 3,65 + 3,5 + 1,1 kb
pAG423-GAL1p- ORF6-eGFP	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	3 fragmentos 3,65 + 3,5 + 0,9 kb
pAG423-GAL1p- ORF7a-eGFP	Xba I / EcoRV (Tango 2x)	3 fragmentos 3,65 + 3,5 + 0,9 kb
pAG423-GPD- ORF3a-eGFP	Sac I / Hind III (Tango 1x)	4 fragmentos 4,4 + 2,1 + 1,5 + 0,2 kb
pAG423-GPD- ORF6-eGFP	Sac I / Hind III (Tango 1x)	4 fragmentos 4,4 + 2 + 1 + 0,2 kb
pAG423-GPD- ORF7a-eGFP	Sac I / Hind III (Tango 1x)	4 fragmentos 4,4 + 2 + 1 + 0,2 kb
pAG423-GPDORF3a-3xFlag	Sac I / Hind III (Tango 1x)	4 fragmentos 4,4 + 1,4 + 1,2 + 0,2 kb
pAG423-GPD- ORF6-3xFlag	Sac I / Hind III (Tango 1x)	4 fragmentos 4,4 + 1,4 + 1 + 0,2 kb
pAG423-GPD- ORF7a- 3xFlag	Sac I / Hind III (Tango 1x)	4 fragmentos 4,4 + 1,4 + 1 + 0,2 kb
pAG426-GPD- ORF3a-eGFP	Sac I / Hind III (Tango 1x)	2 fragmentos 6,6 + 1,6 kb

Tabla 6. Corte de las construcciones creadas en este trabajo con las endonucleasas correspondientes y los fragmentos que visualizamos en geles de agarosa tras este corte.

Mediante secuenciación, con los primers GAL1seq, M13fw y M13rev según sea conveniente, comprobamos que nuestra construcción se ha ensamblado correctamente y presenta la secuencia que nos interesa. De esta forma descartamos construcciones que presenten inserciones o deleciones que alteren el marco de lectura de la proteína de interés y también evitamos seleccionar construcciones con alteraciones en pares de bases que no nos interesen.

2. Verificación de la expresión estable de ORF3a – 3xFlag, ORF6 – 3xFlag y ORF7a – 3xFlag en levadura.

Realizamos un análisis por electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y detección inmunológica para verificar la correcta expresión estable de nuestras proteínas de interés ORF3a, ORF6 y ORF7a.

Para esto cultivamos las cepas BY4741 413-GAL1, BY4741 423-GAL1, BY4741 413-GAL1-Orf3a-3Flag, BY4741 413-GAL1-Orf7a-3Flag, BY4741 413-GAL1-Orf6-3Flag, BY4741 423-GAL1-Orf3a-3Flag, BY4741 423-GAL1-Orf6-3Flag y BY4741 413-GAL1-Orf6-3Flag tanto en medio SD (no induce la expresión de nuestras proteínas) como en SGal (medio inductor). Además de estas cepas, también analizaremos la expresión de estas proteínas en cepas transformadas con los plásmidos pGBW-M4046526, pGBW-M4046349 y pGBW-M4046465 (Addgene). Estos plásmidos producen la expresión inducible por galactosa de ORF3a-3xFlag, ORF6-3xFlag y ORF7a-3xFlag respectivamente.

Una vez crecidas, realizamos la extracción proteica para posteriormente llevar a cabo la electroforesis proteica (SDS-PAGE), la transferencia a membrana PVDF y la detección inmunológica de nuestras proteínas con los anticuerpos primario y secundario (anti-Flag M2 mouse monoclonal y anti-mouse HRP). Finalmente, detectamos nuestras proteínas de interés mediante fluorescencia usando el kit ECL para Western Blot.

De esta forma podemos analizar la correcta expresión de nuestras proteínas de interés en las construcciones obtenidas mediante el sistema Gateway® (Figura 6 y 7), comparándolas con la expresión obtenida en las construcciones de Addgene (Figura 8).

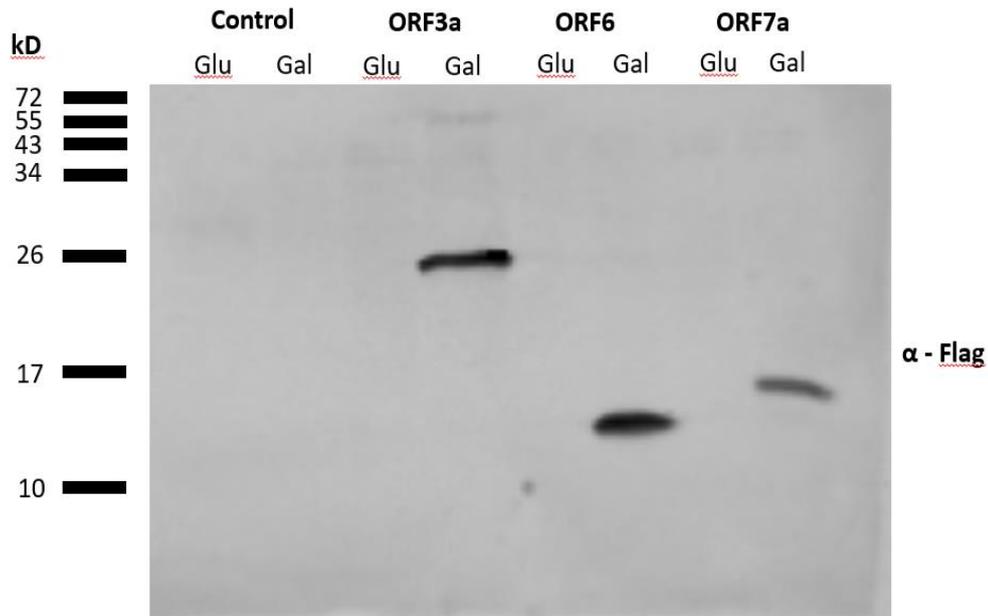


Figura 6. Detección inmunológica de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a procedentes de las construcciones realizadas en este trabajo. Se utilizaron las construcciones multicopia de estas proteínas. Se realizaron extractos proteicos tanto en medio SD (Glu) como en medio SGal (Gal).

En la imagen anterior vemos como no hay expresión proteica al cultivarlas en medio SD, mientras que al cultivarlas en medio SGal si observamos la expresión de nuestras proteínas de interés. Esto indica que la expresión e inducción de nuestras proteínas de interés es adecuada. Cabe destacar que el tamaño de las bandas obtenido se corresponde con los tamaños esperados de nuestras proteínas de interés, siendo de 30 kb para ORF3a, 11kb para ORF6 y 14 kb para ORF7a.

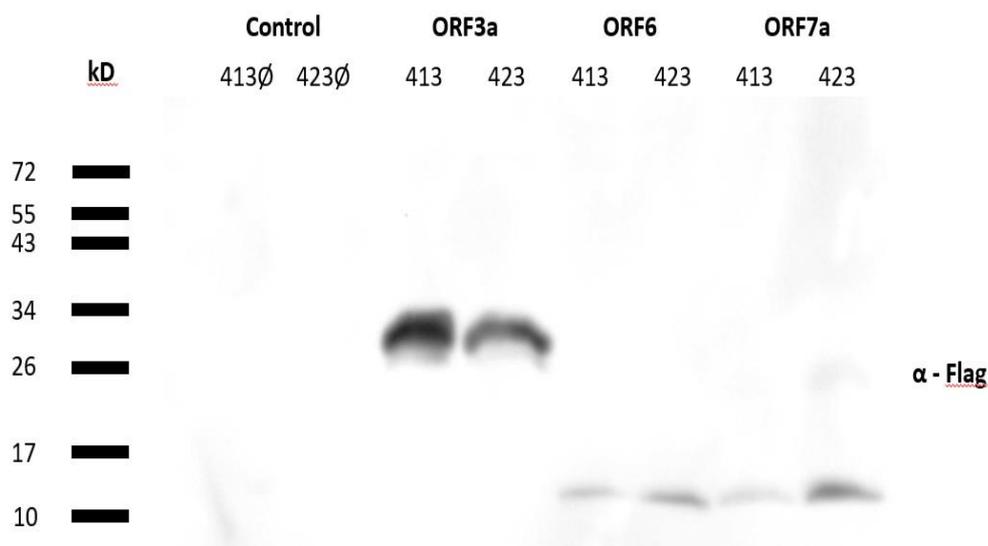


Figura 7. Detección inmunológica de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a procedentes de las construcciones realizadas en este trabajo. Se realizaron extractos proteicos tanto de las construcciones multicopia (423) como centroméricas (413) de nuestras proteínas. Fueron cultivadas todas ellas en medio SGal para lograr la correcta inducción de nuestra proteína.

Vemos como en el caso de las cepas BY4741 con los plásmidos centromérico y multicopia vacíos (413∅ y 423 ∅, respectivamente) no presentan ninguna banda al no expresar nuestras proteínas de interés, mientras que en las cepas con nuestras construcciones observamos en todas ellas expresión de la proteína correspondiente. En el caso de ORF6 y ORF7a, se puede apreciar ligeramente una mayor expresión proteica en aquellas construcciones que poseen el plásmido multicopia (423) en comparación con la expresión de las cepas con los plásmidos centroméricos (413).

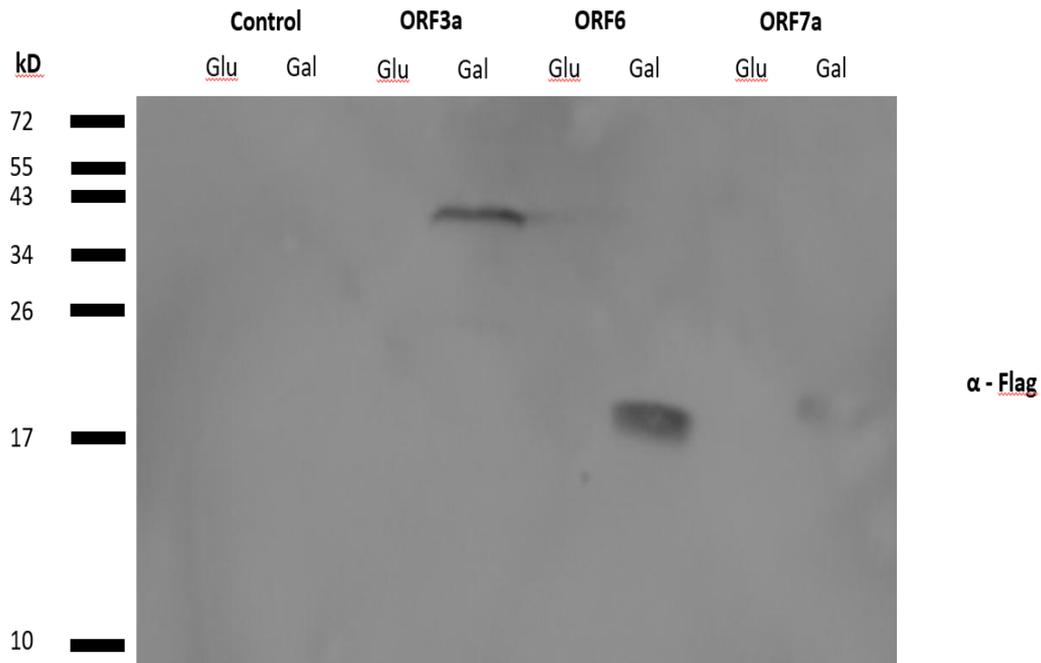


Figura 8. Detección inmunológica de las proteínas ORF3a, ORF6 y ORF7a procedentes de las construcciones de Addgene.

En este caso, también podemos ver como la inducción funciona correctamente al solo verse expresión de la proteína de interés en los extractos procedentes de medio SGal. El tamaño de cada banda obtenido también se corresponde al obtenido en las anteriores construcciones.

Con estos resultados vemos que las construcciones que hemos realizado anteriormente en este trabajo presentan una expresión de las proteínas de interés correcta y estable, siendo eficaz el mecanismo de inducción por galactosa al no observar expresión en los extractos crecidos en SD, pero si en los extractos con SGal. También comprobamos que tanto las construcciones centroméricas como las multicopia presentan esta expresión adecuada.

3. Efecto de la sobreexpresión de ORF3a, ORF6 y ORF7a en el crecimiento celular.

Es posible monitorizar el crecimiento de los cultivos de levadura de forma continua mediante un análisis cuantitativo del crecimiento estos cultivos en Spark® Multimode Microplate Reader de Tecan.

En el presente trabajo se empleó este método para comparar el crecimiento de diferentes cepas tanto en medio no inductor (SD) como en un medio que induce la expresión de nuestras proteínas de interés (SGal). Se compararon con la cepa BY4741(WT) las cepas BY4741 GAL1-Orf3a-3Flag, BY4741 GAL1-Orf6-3Flag, BY4741 GAL1-Orf7a-3Flag, BY4741 413-GAL1-Orf3a-3Flag, BY4741 423-GAL1-Orf3a-3Flag, BY4741 413-GAL1-Orf6-3Flag, BY4741 423-GAL1-Orf6-3Flag, BY4741 413-GAL1-Orf7a-3Flag, BY4741 423-GAL1-Orf7a-3Flag, BY4741 413-GAL1-Orf3a-eGFP y BY4741 423-GAL1-Orf3a-eGFP.

El retraso en el crecimiento en las cepas que presentan las construcciones con las proteínas procedentes del SARS-CoV-2 con respecto a la cepa WT implica que estas proteínas podrían estar implicadas en determinados procesos celulares que interfieren en el crecimiento celular.

En este trabajo comparamos todas las cepas con nuestras construcciones con la cepa BY4741 como control. Todas ellas fueron cultivadas tanto en medio SD como en medio SGal.

Con respecto a las cepas ORF3a – 3xFlag, tanto las que presentaban el plásmido centromérico (pAG-413-GAL1-ORF3a-3xFlag) como el multicopia (pAG-423-GAL1-ORF3a-3xFlag), presentan un retraso en el crecimiento importante con respecto a la cepa WT al ser cultivadas en medio SGal, mientras que no se observa ninguna diferencia significativa al cultivarlas en medio SD (Figura 9). Cabe destacar que este retraso es mayor en las cepas con el plásmido multicopia, que presenta una mayor expresión de ORF3a-3xFlag, siendo el crecimiento un 46% menor con respecto al control en la cepa centromérica y un 68% menor en la cepa multicopia.

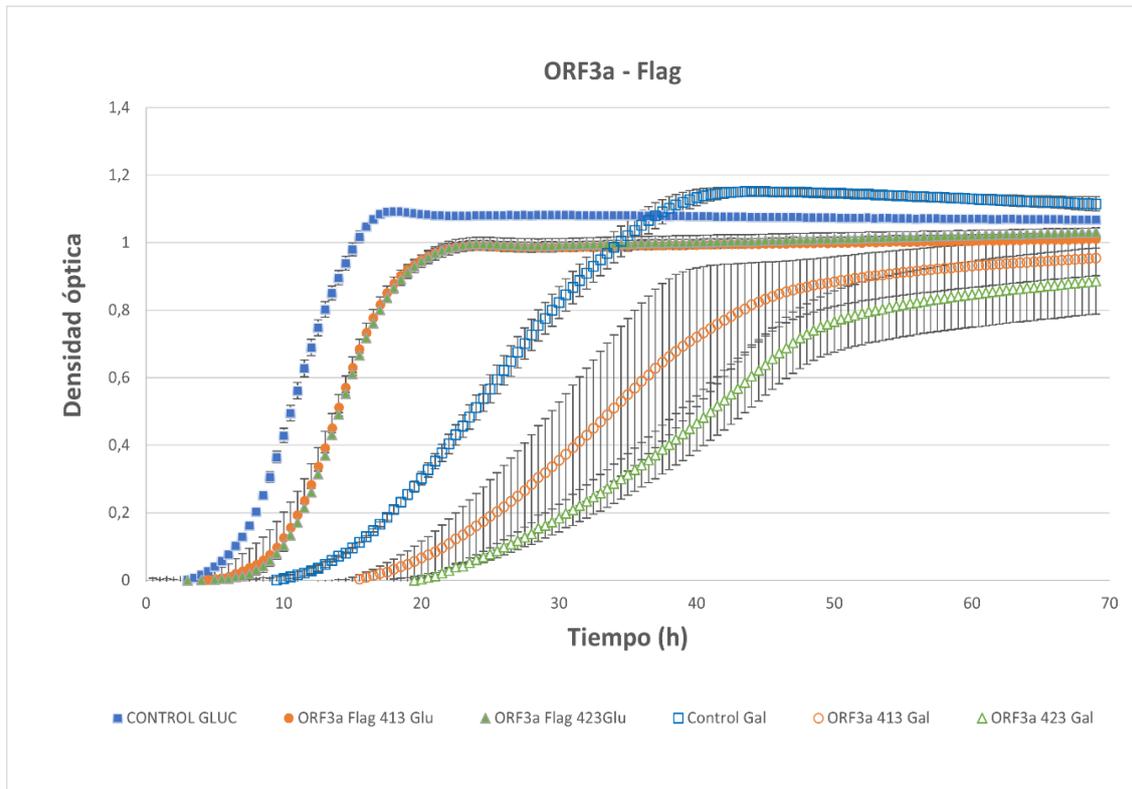


Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de ORF3a-3xFlag en cultivos de levadura. Se analizaron 6 muestras paralelas para cada cepa y para cada condición. Los valores representados son la media de las 6 réplicas. Las barras de error representan la desviación estándar de cada serie. Las cepas que sobreexpresan ORF3a-3xFlag presentan un retraso en el crecimiento en comparación con la cepa WT al ser cultivadas en SGal.

También se realizó este análisis en las cepas ORF3a-eGFP, tanto las que presentaban el plásmido centromérico como el multicopia. Al igual que en el análisis anterior, también se compararon con la cepa WT tanto en medio SD como en medio SGal. Los resultados obtenidos fueron similares a los que presentan las cepas ORF3a-3xFlag, habiendo un retraso en el crecimiento en medio SGal con respecto al WT. En este caso, la centromérica (pAG-413-GAL1-ORF3a-eGFP) presentaba un crecimiento un 56% menor que el control, mientras que en la cepa multicopia (pAG-423-GAL1-ORF3a-eGFP) presentaba un crecimiento un 70% menor que al control (Figura 10).

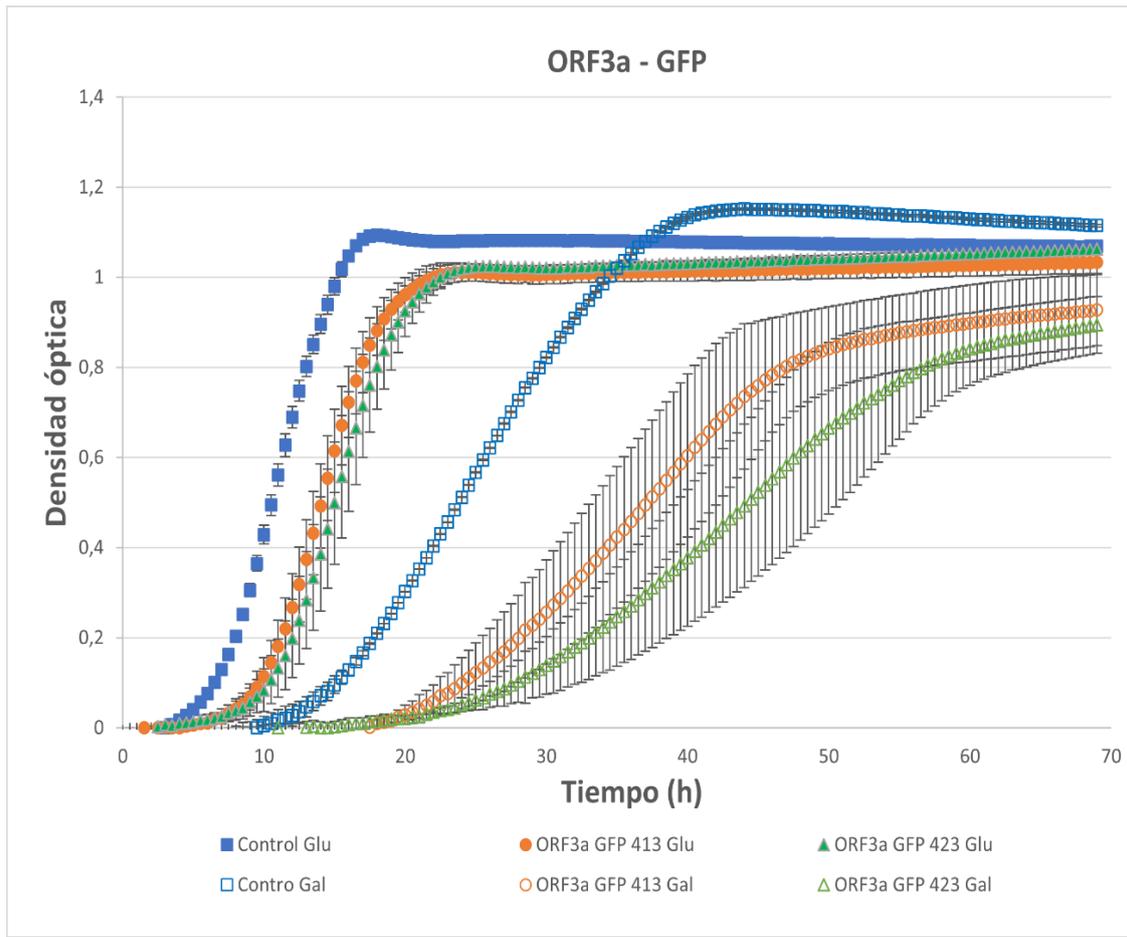


Figura 10. Efecto de la sobreexpresión de ORF3a-GFP en cultivos de levadura. Se analizaron 6 muestras paralelas para cada cepa y para cada condición. Los valores representados son la media de las 6 réplicas. Las barras de error representan la desviación estándar de cada serie. Las cepas ORF3a-eGFP tanto centroméricas como multicopia presentan un retraso en el crecimiento importante en comparación con la cepa WT al cultivarlas en SGal.

Este ensayo de crecimiento también fue realizado en las cepas transformadas con ORF6-3xFlag (centromérico o multicopia). Se vio que al cultivarlas en medio SD no presentaban diferencias en el crecimiento con respecto a la cepa WT. Mientras que al cultivarlas en medio SGal, las cepas que sobreexpresaban ORF6 veían alterado su crecimiento. De hecho, las que presentaban el plásmido centromérico (pAG-413-GAL1-ORF6-3xFlag) tenían un crecimiento un 12% menor que el control (BY4741), mientras que las que presentaban el multicopia (pAG-423-GAL1-ORF6-3xFlag) tenían un crecimiento un 28% menor que el control (Figura 11).

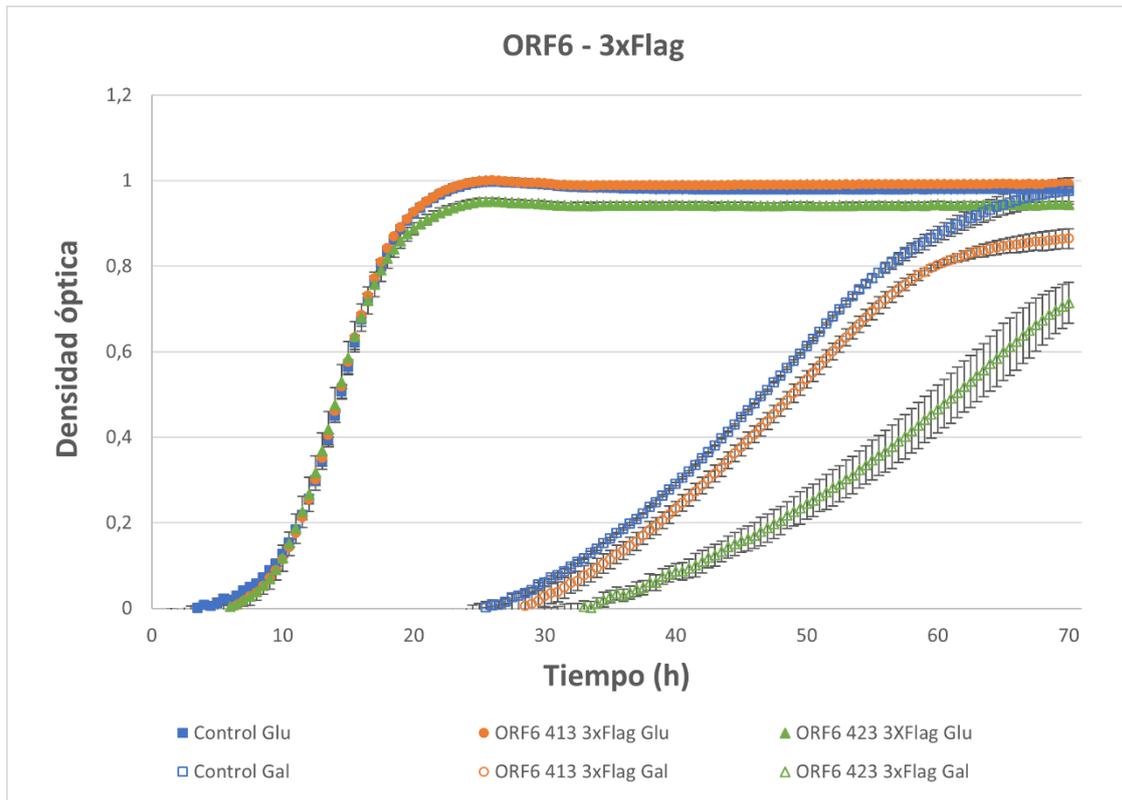


Figura 11. Ensayo de crecimiento de las cepas de levadura que sobreexpresan ORF6-3xFlag. Se analizaron 6 muestras paralelas para cada cepa y para cada condición. Los valores representados son la media de las 6 réplicas. Las barras de error representan la desviación estándar de cada serie.

Finalmente, también se realizó este ensayo de crecimiento en las cepas que sobreexpresaban ORF7a-3xFlag, tanto las que tenían el plásmido centromérico (pAG-413-GAL1-ORF7a-3xFLag) como el multicopia (pAG-423-GAL1-ORF7a-3xFLag). Al igual que los ensayos anteriores, se cultivaron tanto en medio SD como SGal y se compararon los resultados obtenidos con los del control (BY4741). En este caso no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre la cepa con el plásmido centromérico y el control, tanto en medio SD como en medio SGal. Sin embargo, en la que presentaba el plásmido multicopia sí se observaban diferencias claras, siendo el crecimiento un 26% menor en comparación con el control (Figura 12). Esto puede ser debido a que la cepa que presenta el plásmido multicopia tiene una mayor expresión de ORF7a, por lo que puede afectar al crecimiento en mayor medida que la cepa que presenta el plásmido centromérico.

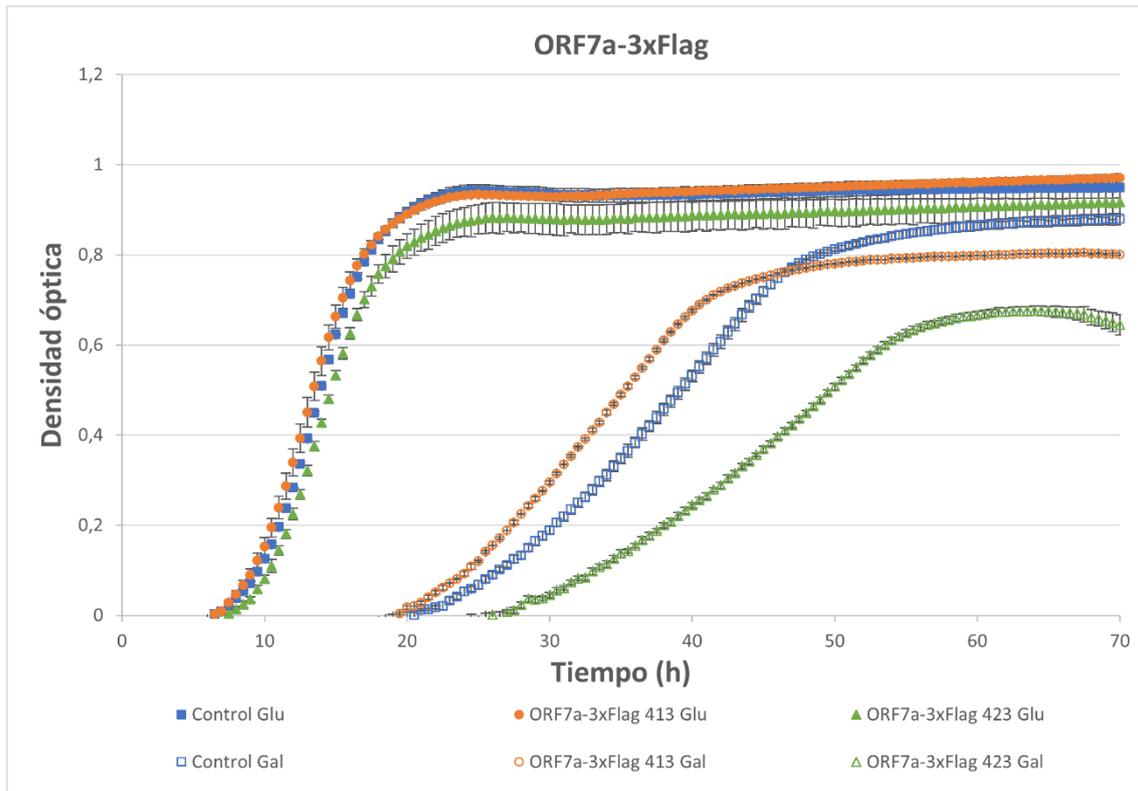


Figura 12. Ensayo de crecimiento de las cepas que sobreexpresan ORF7a-3xFlag. Se analizaron 3 muestras paralelas para cada cepa y para cada condición. Los valores representados son la media de las 3 réplicas. Las barras de error representan la desviación estándar de cada serie.

Además de las cepas transformadas con los plásmidos centroméricos / multicopia obtenidos por el sistema Gateway®, también realizamos este ensayo de crecimiento con las cepas de levadura transformadas con los plásmidos de Addgene (BY4741 GAL1-Orf3a-3Flag, BY4741 GAL1-Orf6-3Flag y BY4741 GAL1-Orf7a-3Flag) que también permiten la expresión inducible por galactosa de ORF3a-3xFlag, ORF6-3xFlag y ORF7a-3xFlag. El ensayo de crecimiento fue idéntico a los anteriores y vimos que todas estas cepas también producían un retraso en el crecimiento al compararlo con la cepa WT, al ser cultivadas en SGal (Figura 13). Este retraso en el crecimiento fue bastante similar entre las diferentes cepas, presentando un crecimiento un 35% menor en la cepa que expresaba ORF3a, un 37,5% menor en la que expresaba ORF6 y un 30% menor en la que expresaba ORF7a.

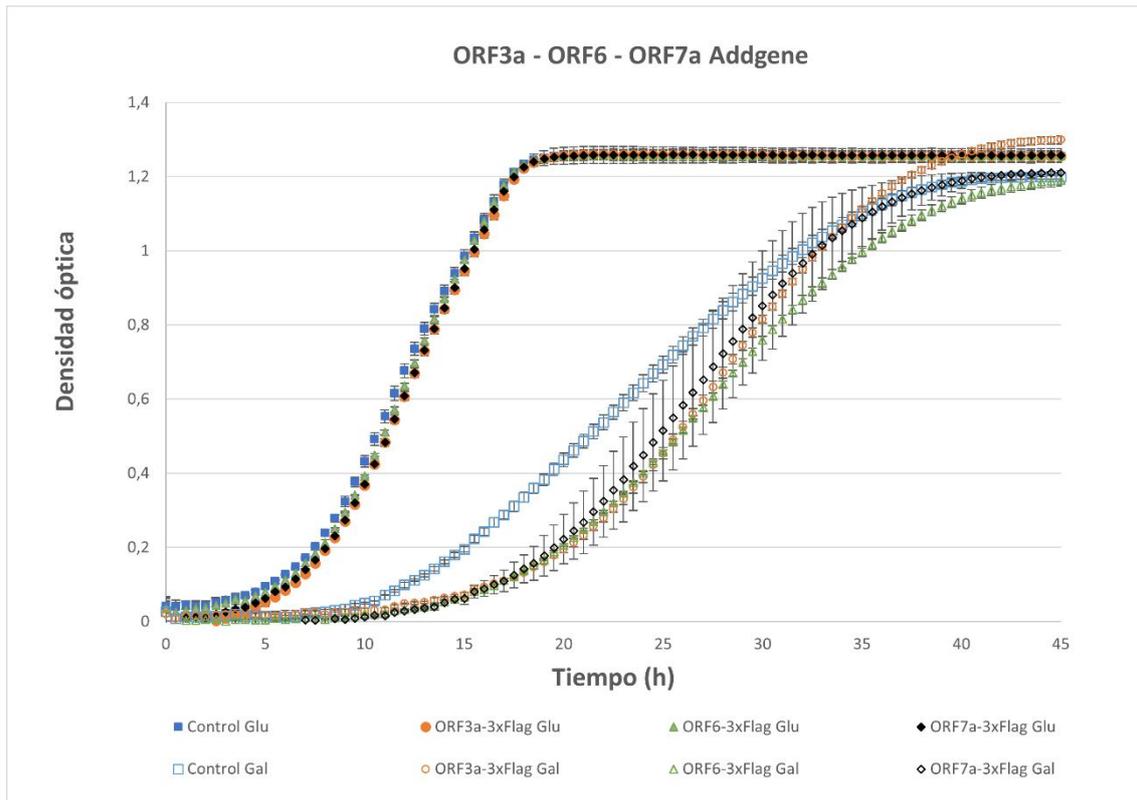


Figura 13. Ensayo de crecimiento de las cepas transformadas con los plásmidos de Addgene que sobreexpresan ORF3a-3xFlag, ORF6-3xFlag y ORF7a-3xFlag. Se analizaron 6 muestras paralelas para cada cepa y para cada condición. Los valores representados son la media de las 6 réplicas. Las barras de error representan la desviación estándar de cada serie.

Al igual que en los anteriores ensayos, vemos que en medio SGal, las cepas que sobreexpresan ORF3a, ORF6 y ORF7a presentan un crecimiento menor que en el control. Estos resultados apoyan la hipótesis de que tanto ORF3a, ORF6 y ORF7a son proteínas que comprometen el crecimiento celular en el modelo de levadura. Esto puede ser debido a que interfieran en determinados procesos celulares que impidan el desarrollo de la célula que expresa estas proteínas del SARS-CoV-2.

4. Localización celular de ORF3a-GFP

Para poder determinar en qué procesos celulares está implicada la proteína ORF3a, es importante determinar su localización intracelular. Para ello utilizamos la cepa silvestre de levadura BY4741 transformada con ORF3a-eGFP para observar, por microscopía confocal, dónde se localiza esta proteína.

En primer lugar, realizamos un análisis por microscopía confocal de ORF3a-eGFP sin aplicar ninguna tinción, solo visualizamos GFP. Vimos que ORF3a parecía localizarse en la membrana vacuolar y en pequeñas vesículas que podrían ser autofagosomas, al estar implicada esta proteína en el proceso de autofagia en células humanas (Figura 14).

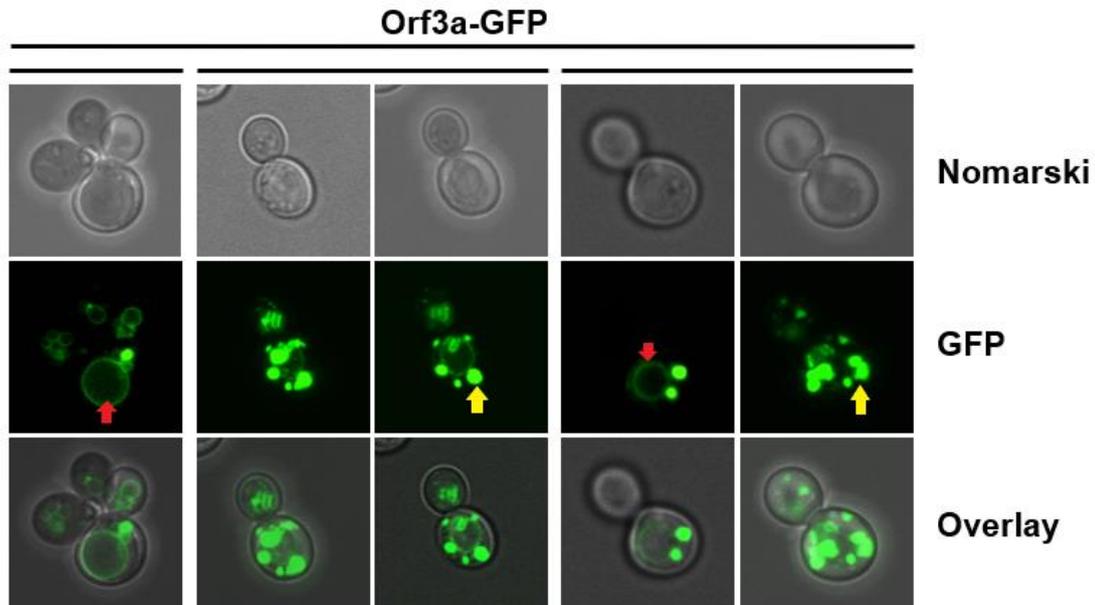


Figura 14. Microscopía confocal de cepas de levadura transformadas con pAG-423-GPD-ORF3a-eGFP, crecidas en medio SD. En la fila denominada Nomarski se muestran las imágenes de las levaduras en campo claro, en GFP las imágenes resultantes de la fluorescencia de nuestras proteínas fusionadas a GFP. Overlay constituye el solapamiento de las dos primeras filas de imágenes. ORF3a se localiza en la membrana vacuolar (flechas rojas) y en pequeñas vesículas que podrían ser autofagosomas (flechas amarillas).

Con el objetivo de verificar la localización de ORF3a en la membrana vacuolar, hicimos otro ensayo por microscopía confocal con ORF3a-eGFP, pero esta vez aplicamos la tinción CMAC (tinción vacuolar). Vimos que ORF3a al menos una fracción de ORF3a co-localiza con la envuelta vacuolar, lo que confirma que ORF3a se encuentra en la membrana vacuolar (Figura 15). Además, ORF3a se encuentra en otras vesículas celulares diferentes de la vacuola, ya que no hay solapamiento en estas vesículas de la tinción CMAC con el verde de GFP. Estas vesículas podrían tratarse de autofagosomas.

ORF3a - GFP

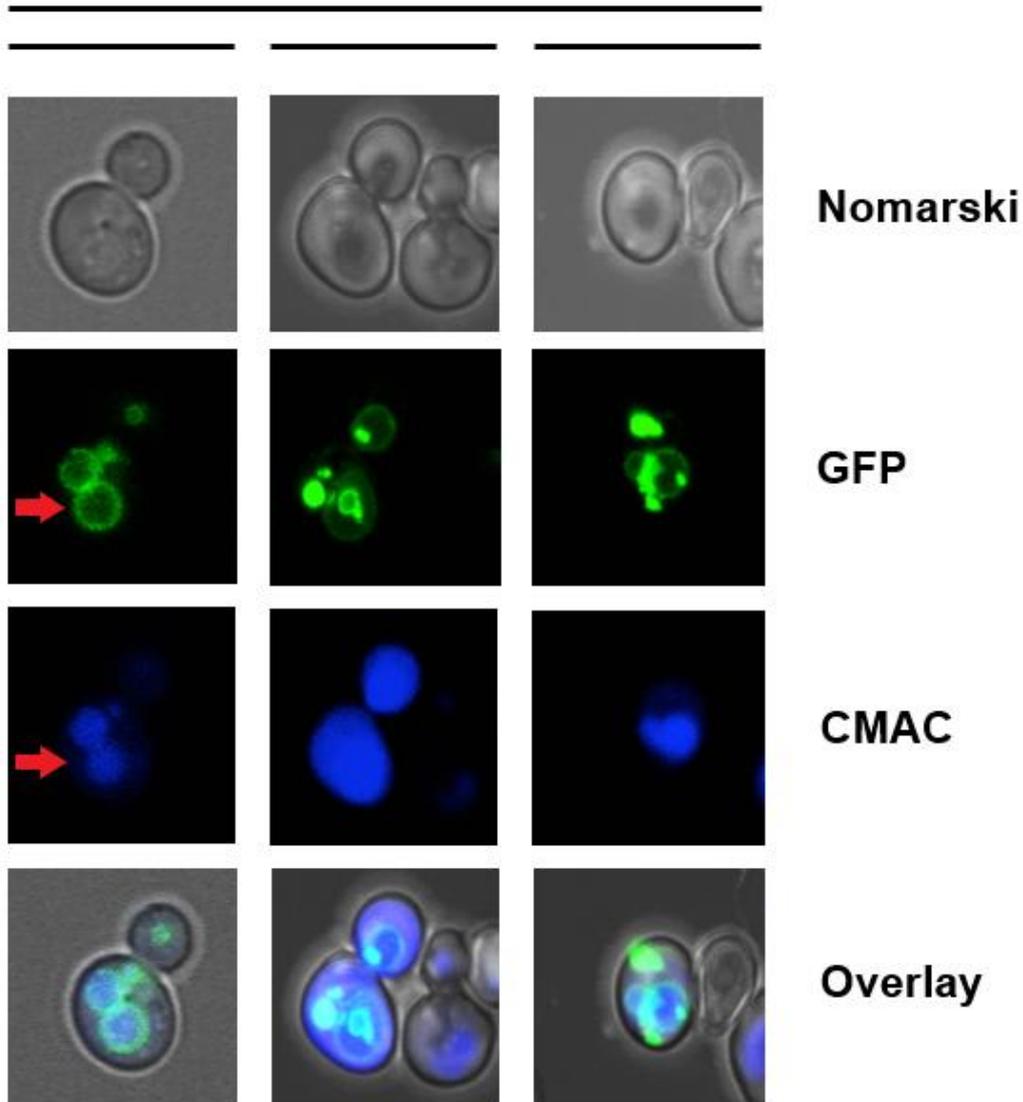


Figura 15. Microscopía fluorescente confocal de levaduras transformadas con pAG-426-GDP-ORF3a-eGFP (verde) teñidas con la tinción vacuolar CMAC (azul). Fueron crecidas en medio SD. ORF3a se encuentra en la membrana vacuolar (flechas rojas). Co-localiza el verde con el azul en el borde de la estructura redondeada.

Se ha visto en células de mamífero que la proteína accesoria ORF3a del SARS-CoV-2 inhibe la actividad autofágica mediante el bloqueo de la fusión de autofagosomas con los lisosomas. Con el objetivo de comprobar que en levaduras ORF3a también actúa inhibiendo la autofagia, realizamos un análisis por microscopía confocal de cepas de levadura transformadas con pAG413-GAL1-ORF3a-3xFlag y con el plásmido pVT100ROS (contiene el reportero Rosella, que permite visualizar el proceso de mitofagia), aplicándole la tinción vacuolar CMAC (Figura 16).

El objetivo de este análisis es ver si las cepas que expresan ORF3a ven inhibido el proceso de autofagia. Este proceso se visualiza con una señal fluorescente roja (mitochondria tanto intacta como degradándose en la vacuola), que no co-localiza con la verde (mitochondria intacta), pero sí se localiza en la vacuola (co-localiza con la fluorescencia azul). Utilizamos como control cepas de levadura transformadas con pVT100ROS, pero sin ORF3a. Fueron cultivadas en medio SGal (control) y en medio SD-N (induce el proceso de mitofagia).

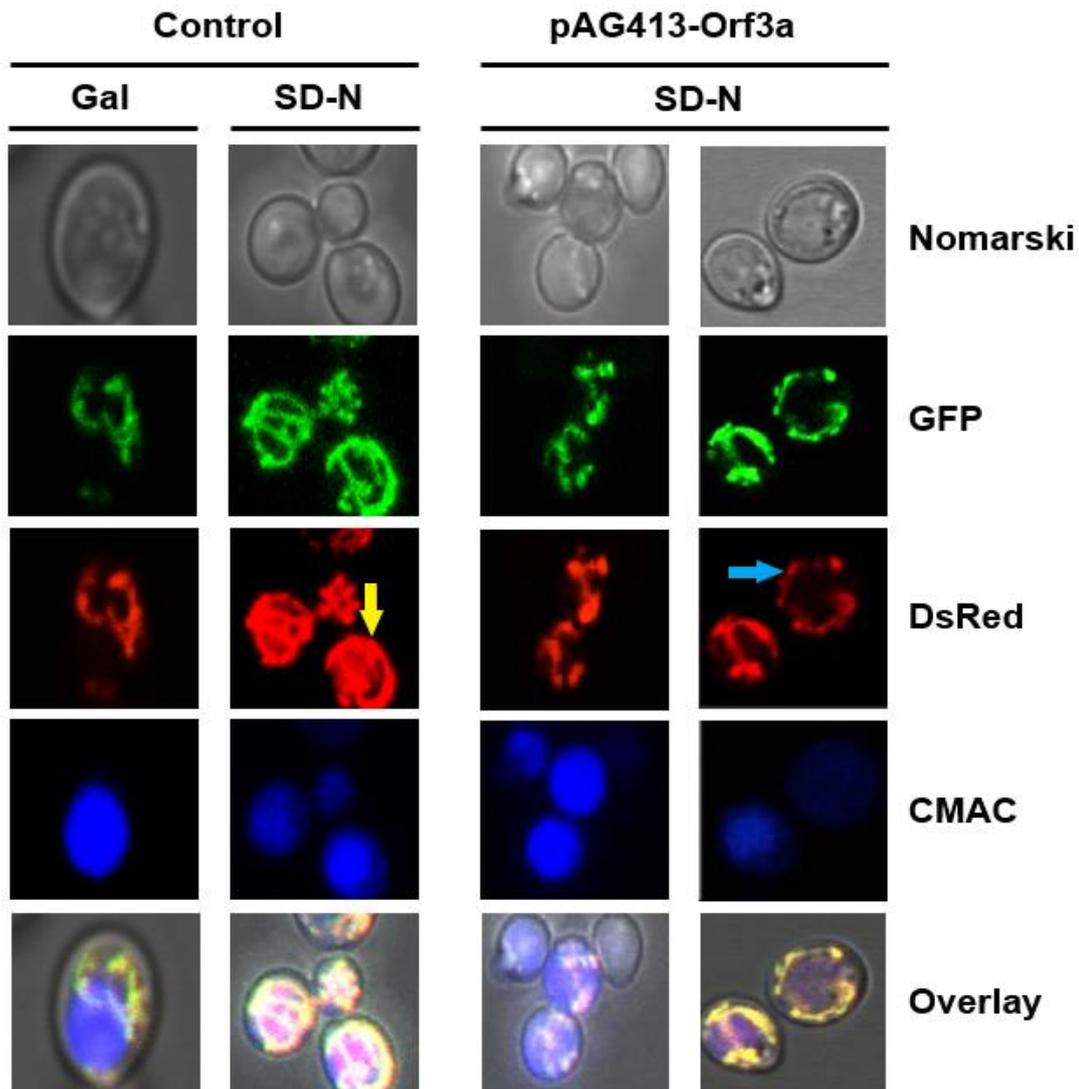


Figura 16. Microscopía fluorescente confocal de levaduras transformadas con pAG-413-GAL1- ORF3a-3xFlag, Rosella (rojo y verde) y la tinción vacuolar CMAC (azul). Las levaduras control no expresan ORF3a. Se observa una reducción en el número de células positivas en mitofagia al expresar ORF3a, en comparación con el control. Esto se aprecia en el canal DsRed como fluorescencia roja que no co-localiza en el canal de GFP (verde). La flecha amarilla marca una célula mitofagia positiva y la flecha azul una célula mitofagia negativa.

Uno de los inconvenientes de este análisis es que no podemos visualizar las células que efectivamente expresan ORF3a para valorar de forma cuantitativa el efecto de ORF3a al proceso de mitofagia.

Sería interesante realizar ensayos adicionales, como analizar la tasa de supervivencia en condiciones de ayuno en presencia o ausencia de ORF3a, donde se induce la autofagia. También se podría visualizar el número de autofagosomas, que podrían acumularse en células que sobreexpresan ORF3a. Esto se podría realizar con *ATG11*, *ATG-5* o *ATG-16* (codifican proteínas residentes en autofagosomas), marcados con fluorescentes distinguibles de GFP, por ejemplo, DsRed o mCherry. De hecho, estas cepas han sido pedidas para poder realizar futuros experimentos y poder visualizar estos autofagosomas en presencia de ORF3a-GFP.

5. Localización celular de ORF6-GFP:

En células de mamíferos, ORF6 se localiza en el complejo de poros nucleares (NPC) e interrumpe la importación nuclear de factores de transcripción necesarios para la respuesta inmune. Queremos ver si la localización de esta proteína en levaduras es la misma, o si por el contrario presenta otra distribución.

Para comprobar su localización celular, realizamos un ensayo por microscopía confocal de las cepas de levadura transformadas con ORF6-eGFP, ya sea con el plásmido centromérico (CEN) o el multicopia (2μ) (Figura 17). Vemos como su localización no coincide con el núcleo como ocurre en mamíferos. Por la distribución que observamos, puede ser que se localice en acúmulos citoplasmáticos y en la vacuola.

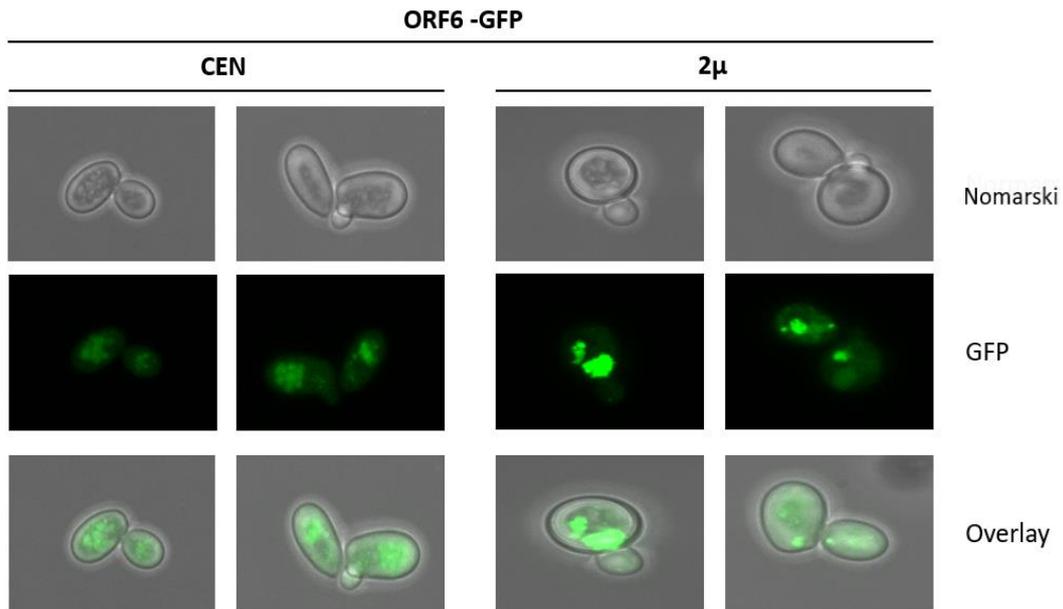


Figura 17. Microscopía confocal de cepas de levadura silvestre BY4741 transformadas con pAG-413-GAL1-ORF6-eGFP (CEN) y con pAG-423-GAL1-ORF6-eGFP (2 μ) crecidas en medio SGal. Su distribución no parece coincidir con el núcleo de la célula. Por su distribución, puede ser que se traten de acúmulos citoplasmáticos y que se localicen también en la vacuola.

Para comprobar si esta proteína co-localiza con la vacuola como sospechamos, aplicaremos a estas células la tinción vacuolar CMAC (azul), de esta forma podremos ver la localización de ORF6-GFP (verde) y si coincide su localización con la vacuola celular (azul) (Figura 18).

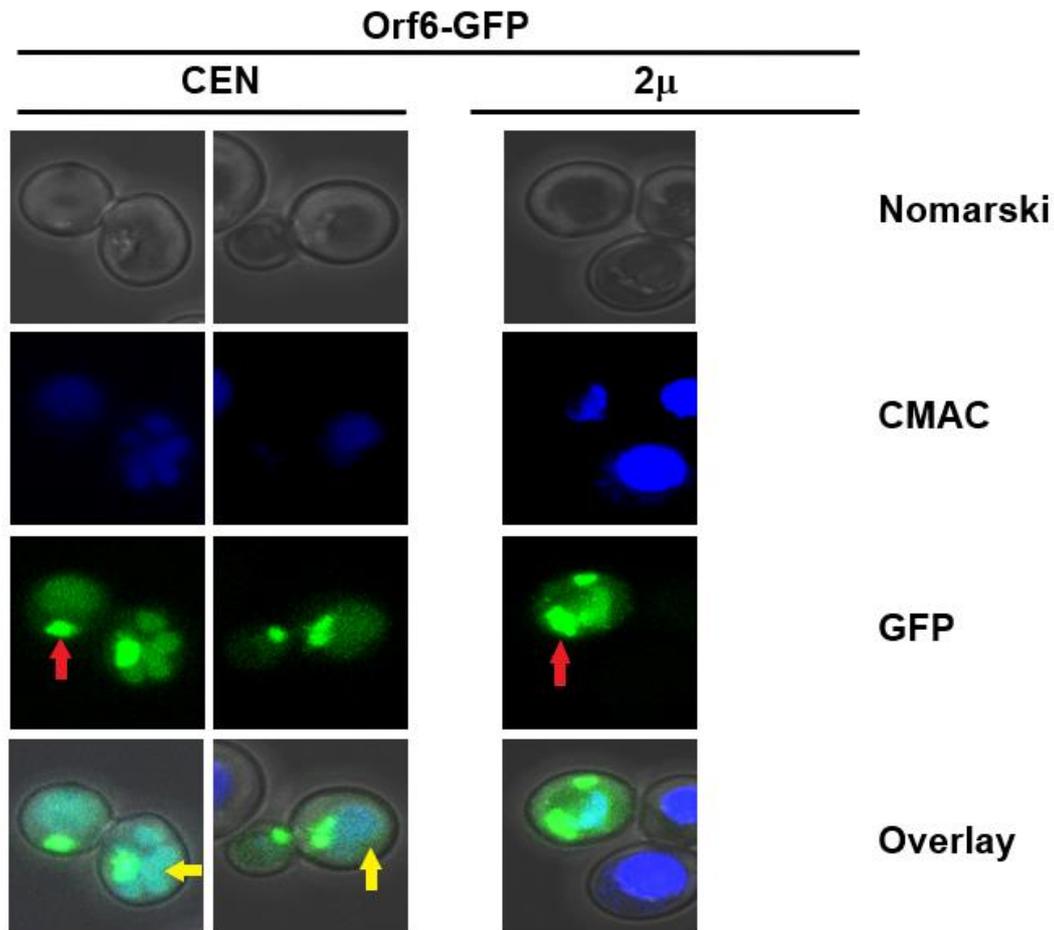


Figura 18. Microscopía confocal de cepas transformadas con pAG-413-GAL1-ORF6-eGFP (CEN) o con pAG-423-GAL1-ORF6-eGFP (2 μ). Fueron crecidas en medio SGal. Se representa en verde la distribución de ORF6, en azul la vacuola celular y Overlay representa la fusión de todos los canales. Las flechas amarillas indican la co-localización de ORF6-GFP con la vacuola. Las flechas rojas indican cúmulos intracelulares.

ORF6 co-localiza con la vacuola, como vemos en la imagen anterior al co-localizar la señal verde (ORF6-GFP) con la señal azul (vacuola). Además, una fracción de ORF6 se localiza uno o varios cúmulos intracelulares.

5.1. ORF6: Inhibición del transporte nuclear

Como se ha visto que en mamíferos ORF6 actúa inhibiendo el transporte de proteínas al núcleo, si en levaduras actuase de la misma manera causaría sensibilidad la expresión de ORF6 a determinadas condiciones de estrés que requieren el importe de proteínas al núcleo. En situaciones de estrés osmótico o estrés oxidativo es necesario el importe de proteínas como Hog1 (MAP quinasa y factor de transcripción) o

Yap1 (factor de transcripción). Analizamos si la expresión de ORF6 causaba sensibilidad en condiciones de estrés osmótico y oxidativo. Para esto, cultivamos cepas que expresaban ORF6-3xFlag en presencia y en ausencia de NaCl (situación de estrés osmótico) y de H₂O₂ (estrés oxidativo).

Para estudiar el efecto de ORF6 bajo condiciones de estrés oxidativo, cultivamos las cepas transformadas con pAG413-GAL1-Orf6-3xFlag y pAG423-GAL1-Orf3a-3xFlag en medio SGal (induce la expresión de ORF6) y añadimos 0,5 mM o 1 mM H₂O₂. Como controles usamos la cepa BY4741 transformada con el plásmido pAG413-GAL1 o pAG423-GAL1 vacíos (Figura 19). Vimos que al suplementar con 0,5 mM H₂O₂ no observamos ninguna diferencia entre los controles y las cepas que expresaban ORF6, mientras que al suplementar el medio SGal con 1mM de H₂O₂ si veíamos ligeras diferencias en la cepa multicopia de ORF6 con respecto al control.

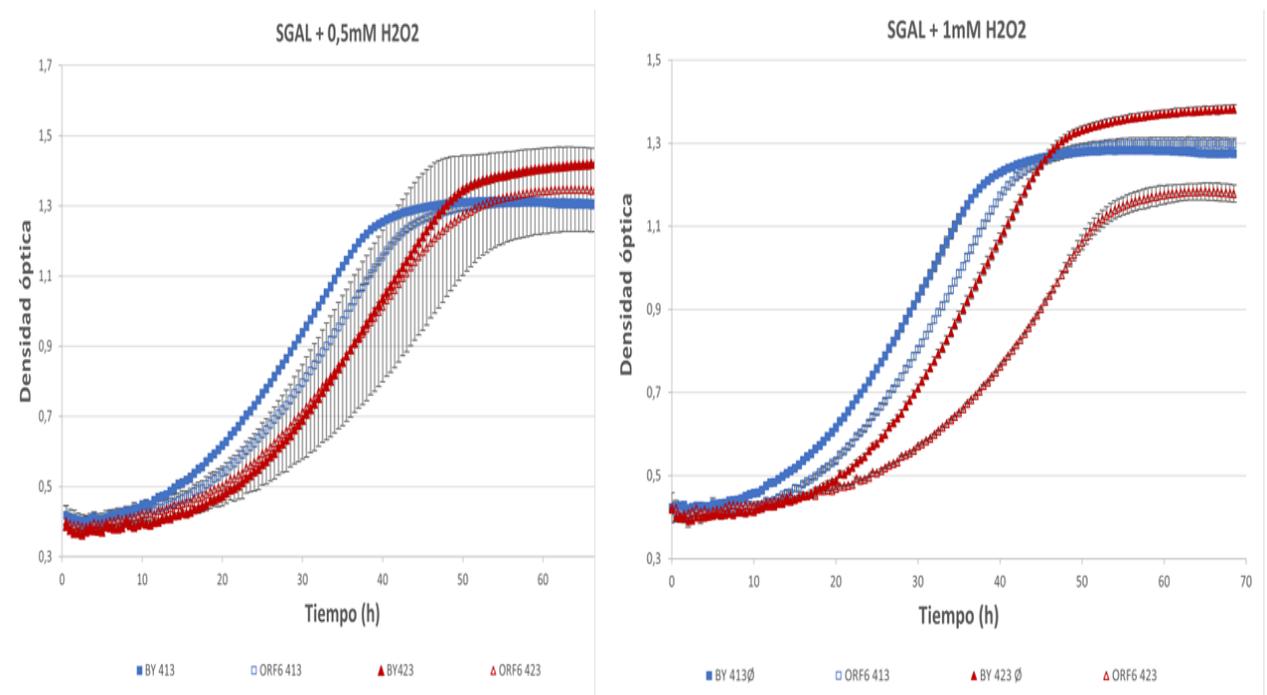


Figura 19. Efecto de la sobreexpresión de ORF6 a la adaptación a estrés oxidativo. Ensayo de crecimiento de las cepas transformadas con pAG-413-GAL1-ORF6-3xFlag y con pAG-423-GAL1-ORF6-3xFlag, crecidas en medio SGal bajo condiciones de estrés oxidativo (0,5mM / 1mM H₂O₂). Los controles usados fueron la cepa silvestre BY4741 transformada con los plásmidos pAG-413-GAL1 y pAG-423-GAL1 vacíos. Se emplearon tres muestras paralelas para cada cepa y condición. Los valores representados son la media de las tres réplicas. Las barras de error representan la desviación estándar de cada serie.

Solo se aprecian ligeras diferencias en el crecimiento en la cepa transformada con el plásmido pAG-423-GAL1-ORF6-3XFlag al suplementar el medio SGal con 1 mM H₂O₂. La cepa transformada con pAG-413-GAL1-ORF6-3XFlag no presenta diferencias

significativas con respecto al control en ninguna de las dos condiciones. Esto puede deberse a que el plásmido multicopia (pAG-423-GAL1-ORF6-3XFlag) presenta una mayor expresión proteica y por este motivo si podamos ver el efecto en dicha cepa.

Para estudiar el efecto de ORF6 bajo condiciones de estrés osmótico, cultivamos las cepas transformadas con pAG413-GAL1-Orf6-3xFlag y pAG423-GAL1-Orf3a-3xFlag en medio SGal (induce la expresión de ORF6) y añadimos 0,6 M o 0,8 M NaCl. Como controles usamos la cepa BY4741 transformada con el plásmido pAG413-GAL1 o pAG423-GAL1 vacíos (Figura 20). Vimos que, en ambas condiciones, tanto la cepa transformada con el plásmido multicopia, como la transformada con el plásmido centromérico no presentaban grandes diferencias con respecto a los controles.

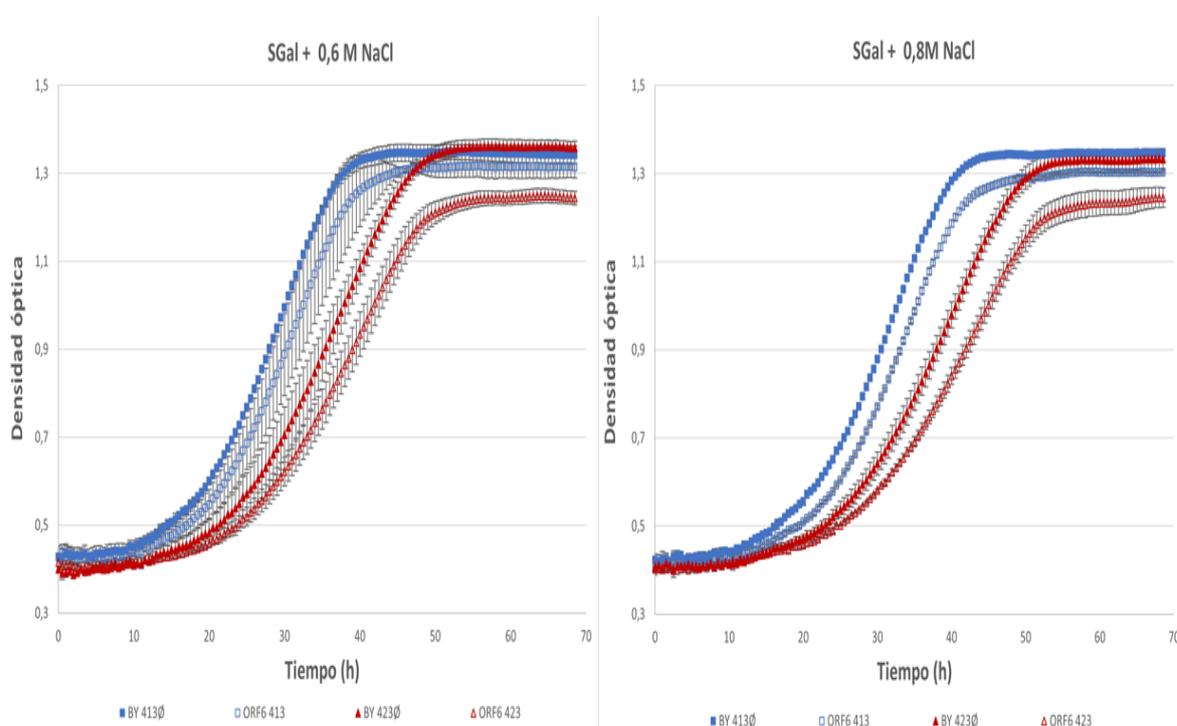


Figura 20. Efecto de la sobreexpresión de ORF6 a la adaptación a estrés osmótico. Ensayo de crecimiento de las cepas transformadas con pAG-413-GAL1-ORF6-3xFlag y con pAG-423-GAL1-ORF6-3xFlag, crecidas en medio SGal bajo condiciones de estrés osmótico (0,6M / 0,8M NaCl). Los controles usados fueron la cepa silvestre BY4741 transformada con los plásmidos pAG-413-GAL1 y pAG-423-Gal1 vacíos. Se emplearon tres muestras paralelas para cada cepa y condición. Los valores representados son la media de las tres réplicas. Las barras de error muestran la desviación estándar de cada serie.

Con estos resultados vemos que no se aprecian grandes diferencias en ninguna de las dos cepas transformadas con ORF6-3xFlag bajo condiciones de estrés osmótico con respecto a los controles. Por este motivo, ORF6 parece no estar implicada en la

sensibilidad a estos estreses (osmótico y oxidativo) en células de levadura. Esto puede ser debido a que no presenta una localización nuclear en levaduras, lo que no le permitirá inhibir el importe nuclear proteico.

6. Localización celular de ORF7a-GFP

Para poder determinar en qué procesos celulares está implicada la proteína ORF7a, es importante determinar su localización intracelular. Para ello utilizamos las cepas transformadas con ORF7a-eGFP para observar, por microscopía confocal, dónde se localiza esta proteína.

Realizamos un ensayo por microscopía confocal de las cepas de levadura transformadas con ORF7a-eGFP, ya sea con el plásmido centromérico (CEN) o el multicopia (2 μ) (Figura 21). Observamos una distribución en una red difusa intracelular que podría corresponder al retículo endoplasmático.

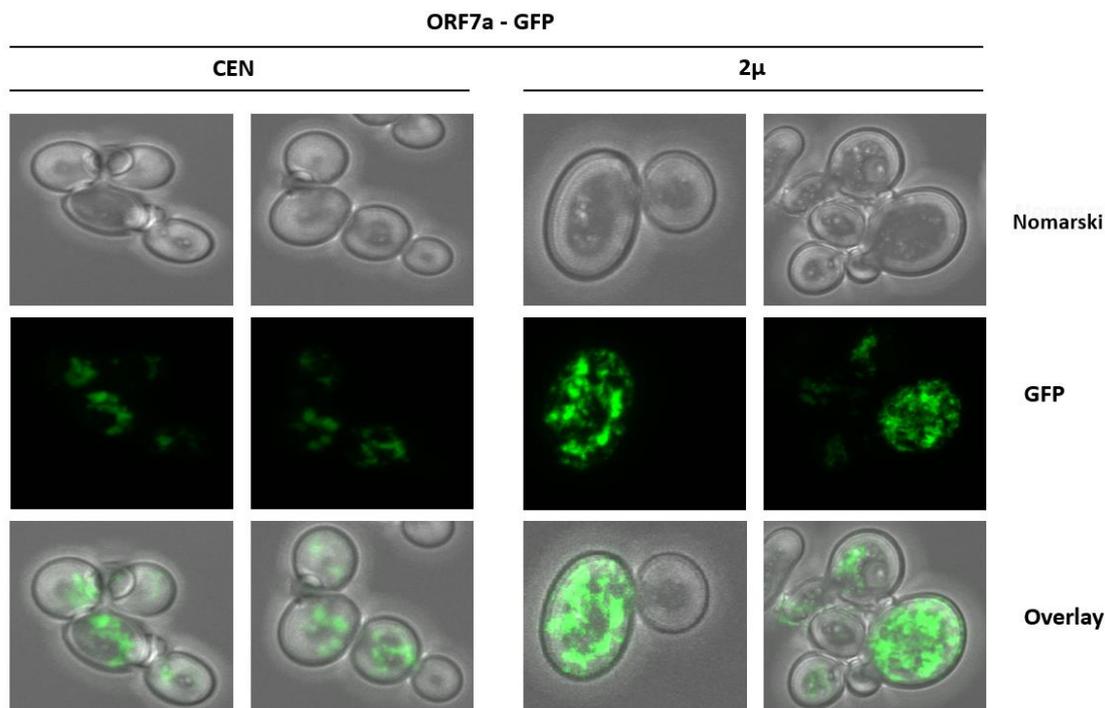


Figura 21. Localización de ORF7a-GFP en células de levadura. Microscopía confocal de las cepas BY4741 transformadas con pAG-413-GAL1-ORF7a-eGFP (CEN) y con pAG-423-GAL1-ORF7a-eGFP (2 μ). Fueron crecidas en medio SGal. En la fila denominada Nomarski se representan las imágenes de las levaduras en campo claro, en GFP las imágenes resultantes de la fluorescencia de ORF7a-GFP. Overlay constituye el solapamiento de las dos primeras filas de imágenes.

Vemos como ORF7a se localiza en una red difusa intracelular que podría constituir el retículo endoplasmático de la levadura. Para confirmar que esta distribución intracelular se corresponde con el retículo endoplasmático, realizamos un análisis por microscopía confocal, aplicándoles a las células que expresan ORF7a la tinción ER Tracker Blue/White. En este ensayo utilizamos la cepa transformada con el plásmido pAG423-GPD-ORF7a-eGFP, que produce una expresión constitutiva de ORF7a. En el Co-staining con ER Tracker Blue/White y GFP vemos que sólo las células con una localización dominante de ORF7a en la vacuola o células sin expresión de ORF7a-GFP muestran tinción con ER Tracker. El análisis de un elevado número de células nos indicaba que no se presentaba la tinción dual (verde/azul). Esto puede indicar que ORF7a compite con ER Tracker y por este motivo no podemos ver estas son tinciones simultáneamente (Figura 22).

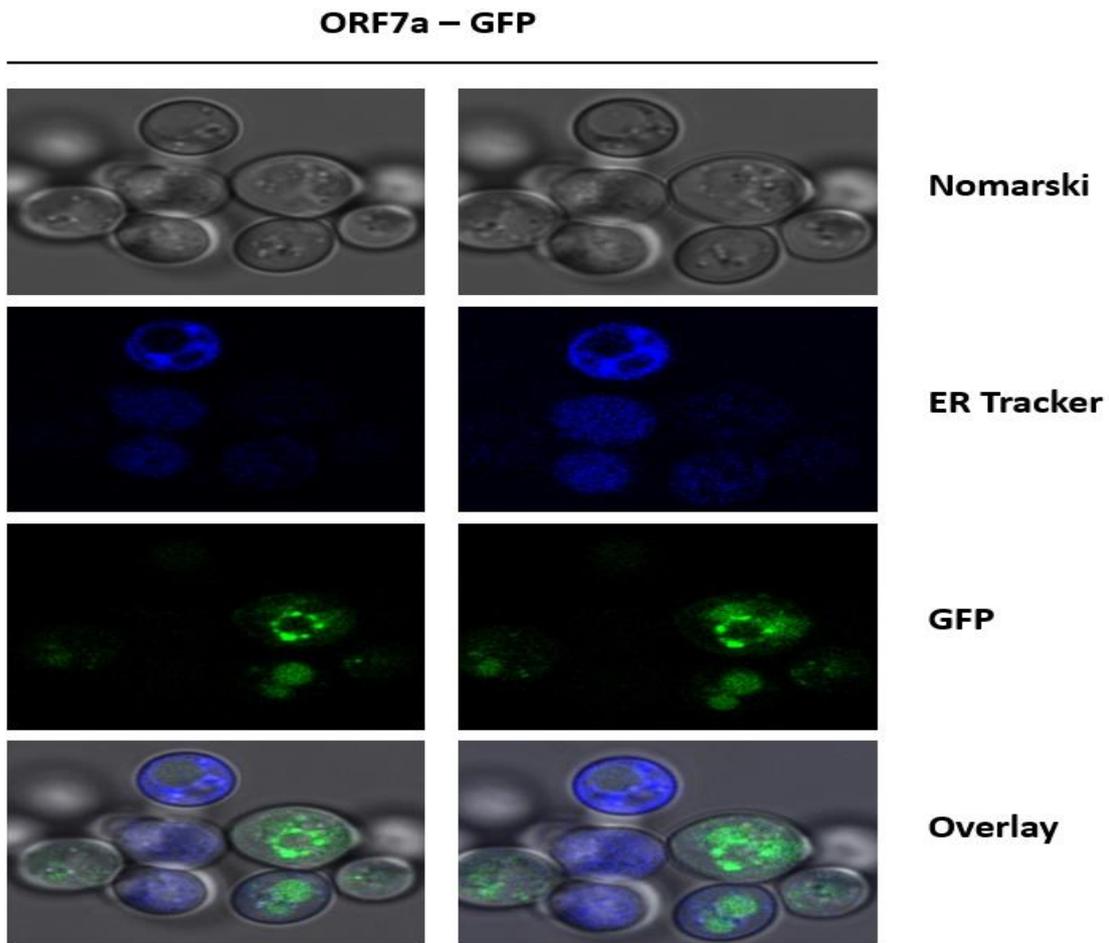


Figura 22. Co-localización de ORF7a y ER tracker Blue/White. Microscopía confocal de las cepas transformadas con pAG423-GPD-ORF7a-eGFP. En la fila denominada Nomarski se muestran las imágenes de las levaduras en campo claro, en ER Tracker las imágenes resultantes de la fluorescencia de la tinción reticular, en GFP las imágenes resultantes de la fluorescencia de ORF7a-GFP y Overlay constituye el solapamiento de las imágenes anteriores.

En la imagen anterior, vemos que no coinciden la fluorescencia de ORF7a-GFP (verde) con la tinción reticular (azul). Esto puede deberse a que ORF7a compita con ER Tracker e impida poder ver las dos fluorescencias simultáneamente. Para verificar la posible localización de ORF7a en el retículo endoplasmático serán necesarios otros estudios. Como alternativa a la tinción ER Tracker, se podría expresar ORF7a-GFP en células de levadura que presentan proteínas residentes del retículo marcadas con fluoróforos compatibles con GFP, por ejemplo, DsRed o mCherry. Así se podría ver el grado de co-localización de ambas proteínas y avanzar en la caracterización de posibles funciones de ORF7a en levadura.

Conclusiones

- Se han creado varias herramientas biotecnológicas para la expresión inducible y constitutiva y el análisis funcional de ORF3a, ORF6 y ORF7a del SARS-CoV-2 en levadura, tanto en copia única como en multicopia.
- La sobreexpresión de cada una de estas proteínas en cepas de levadura BY4741 compromete el crecimiento de estas.
- ORF3a se localiza en la membrana vacuolar y posiblemente en autofagosomas de levadura. ORF6 se localiza en la vacuola celular, además de localizarse en uno o varios cúmulos intracelulares. ORF7a podría localizarse en el retículo citoplasmático de las levaduras, para verificar esta localización son necesarios otros estudios de localización.
- ORF3a parece participar en la inhibición de la autofagia en cultivos de levadura, en concreto en la inhibición del proceso de mitofagia. Es necesario realizar otros ensayos para confirmar esta actividad. ORF6 no comparte la localización nuclear típica en células de mamíferos al expresarla en cultivos de levadura y no podemos determinar si participa en la inhibición del importe nuclear en levadura.

Bibliografía

- 1- Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol.* 2021 Mar;19(3):141-154. doi: 10.1038/s41579-020-00459-7. Epub 2020 Oct 6. PMID: 33024307; PMCID: PMC7537588.
- 2- Chen J. Pathogenicity and transmissibility of 2019-nCoV-A quick overview and comparison with other emerging viruses. *Microbes Infect.* 2020 Mar;22(2):69-71. doi: 10.1016/j.micinf.2020.01.004. Epub 2020 Feb 4. PMID: 32032682; PMCID: PMC7102641.
- 3- Ye ZW, Jin DY. [Diagnosis, treatment, control and prevention of SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: back to the future]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2020 Apr 25;36(4):571-592. Chinese. doi: 10.13345/j.cjb.200115. PMID: 32347053.
- 4- Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020 Apr;42(1):3-11. PMID: 32342926.
- 5- Redondo N, Zaldívar-López S, Garrido JJ, Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol.* 2021 Jul 7;12:708264. doi: 10.3389/fimmu.2021.708264. PMID: 34305949; PMCID: PMC8293742.
- 6- DiMaio D. Viral miniproteins. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:21-43. doi: 10.1146/annurev-micro-091313-103727. Epub 2014 Apr 10. PMID: 24742054; PMCID: PMC4430842.
- 7- Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, White KM, O'Meara MJ, Rezelj VV, Guo JZ, Swaney DL, Tummino TA, Hüttenhain R, Kaake RM, Richards AL, Tutuncuoglu B, Foussard H, Batra J, Haas K, Modak M, Kim M, Haas P, Polacco BJ, Braberg H, Fabius JM, Eckhardt M, Soucheray M, Bennett MJ, Cakir M, McGregor MJ, Li Q, Meyer B, Roesch F, Vallet T, Mac Kain A, Miorin L, Moreno E, Naing ZZC, Zhou Y, Peng S, Shi Y, Zhang Z, Shen W, Kirby IT, Melnyk JE, Chorba JS, Lou K, Dai SA, Barrio-Hernandez I, Memon D, Hernandez-Armenta C, Lyu J, Mathy CJP, Perica T, Pilla KB, Ganesan SJ, Saltzberg DJ, Rakesh R, Liu X, Rosenthal SB, Calviello L, Venkataramanan S, Liboy-Lugo J, Lin Y, Huang XP, Liu Y, Wankowicz SA, Bohn M, Safari M, Ugur FS, Koh C, Savar NS, Tran QD, Shengjuler D, Fletcher SJ, O'Neal MC, Cai Y, Chang JCJ, Broadhurst DJ, Klippsten S, Sharp PP, Wenzell NA, Kuzuoglu-Ozturk D, Wang HY, Trenker R, Young JM, Cavero DA, Hiatt J, Roth TL, Rathore U, Subramanian A, Noack J, Hubert M, Stroud RM, Frankel AD, Rosenberg OS, Verba KA, Agard DA, Ott M, Emerman M, Jura N, von Zastrow M, Verdin E, Ashworth A, Schwartz O, d'Enfert C, Mukherjee S, Jacobson M, Malik HS, Fujimori DG, Ideker T, Craik CS, Floor SN, Fraser JS, Gross JD, Sali A, Roth BL, Ruggero D, Taunton J, Kortemme T, Beltrao P, Vignuzzi M, García-Sastre A, Shokat KM, Shoichet BK, Krogan NJ. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature.* 2020 Jul;583(7816):459-468. doi: 10.1038/s41586-020-2286-9. Epub 2020 Apr 30. PMID: 32353859; PMCID: PMC7431030.

- 8- Yin C. Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications. *Genomics*. 2020 Sep;112(5):3588-3596. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.04.016. Epub 2020 Apr 27. PMID: 32353474; PMCID: PMC7184998.
- 9- Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. *J Med Virol*. 2020 Apr;92(4):418-423. doi: 10.1002/jmv.25681. Epub 2020 Feb 7. Erratum in: *J Med Virol*. 2020 Oct;92(10):2249. PMID: 31967327; PMCID: PMC7167049.
- 10- te Velthuis AJ, van den Worm SH, Snijder EJ. The SARS-coronavirus nsp7+nsp8 complex is a unique multimeric RNA polymerase capable of both de novo initiation and primer extension. *Nucleic Acids Res*. 2012 Feb;40(4):1737-47. doi: 10.1093/nar/gkr893. Epub 2011 Oct 29. PMID: 22039154; PMCID: PMC3287201.
- 11- Kim D, Lee JY, Yang JS, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020 May 14;181(4):914-921.e10. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.011. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32330414; PMCID: PMC7179501.
- 12- Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattra J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, Vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Krajden M, Petric M, Skowronski DM, Upton C, Roper RL. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*. 2003 May 30;300(5624):1399-404. doi: 10.1126/science.1085953. Epub 2003 May 1. PMID: 12730501.
- 13- Hasöksüz M, Kiliç S, Saraç F. Coronaviruses and SARS-COV-2. *Turk J Med Sci*. 2020 Apr 21;50(SI-1):549-556. doi: 10.3906/sag-2004-127. PMID: 32293832; PMCID: PMC7195990.
- 14- Ye Z, Wong CK, Li P, Xie Y. A SARS-CoV protein, ORF-6, induces caspase-3 mediated, ER stress and JNK-dependent apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Dec;1780(12):1383-7. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.07.009. Epub 2008 Jul 28. PMID: 18708124; PMCID: PMC7115782.
- 15- Liu DX, Fung TS, Chong KK, Shukla A, Hilgenfeld R. Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Res*. 2014 Sep;109:97-109. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.06.013. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24995382; PMCID: PMC7113789.
- 16- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 2001 Nov 15;15(22):2922-33. PMID: 11711427.
- 17- Ren Y, Shu T, Wu D, Mu J, Wang C, Huang M, Han Y, Zhang XY, Zhou W, Qiu Y, Zhou X. The ORF3a protein of SARS-CoV-2 induces apoptosis in cells. *Cell Mol Immunol*. 2020 Aug;17(8):881-883. doi: 10.1038/s41423-020-0485-9. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32555321; PMCID: PMC7301057.

- 18- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. A fluorescence microscopy assay for monitoring mitophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vis Exp*. 2011 Jul 18;(53):2779. doi: 10.3791/2779. PMID: 21788936; PMCID: PMC3196187.
- 19- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011 Nov 11;147(4):728-41. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026. PMID: 22078875.
- 20- Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Oct;13(10):722-37. doi: 10.1038/nri3532. PMID: 24064518; PMCID: PMC5340150.
- 21- Choi Y, Bowman JW, Jung JU. Autophagy during viral infection - a double-edged sword. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jun;16(6):341-354. doi: 10.1038/s41579-018-0003-6. PMID: 29556036; PMCID: PMC6907743.
- 22- Miao G, Zhao H, Li Y, Ji M, Chen Y, Shi Y, Bi Y, Wang P, Zhang H. ORF3a of the COVID-19 virus SARS-CoV-2 blocks HOPS complex-mediated assembly of the SNARE complex required for autolysosome formation. *Dev Cell*. 2021 Feb 22;56(4):427-442.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2020.12.010. Epub 2020 Dec 16. PMID: 33422265; PMCID: PMC7832235.
- 23- Kern DM, Sorum B, Mali SS, Hoel CM, Sridharan S, Remis JP, Toso DB, Kotecha A, Bautista DM, Brohawn SG. Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 ORF3a in lipid nanodiscs. *Nat Struct Mol Biol*. 2021 Jul;28(7):573-582. doi: 10.1038/s41594-021-00619-0. Epub 2021 Jun 22. Erratum in: *Nat Struct Mol Biol*. 2021 Jul 20; PMID: 34158638.
- 24- Marquez-Miranda V, Rojas M, Duarte Y, Diaz-Franulic I, Holmgren M, Cachau RE, Gonzalez-Nilo FD. Analysis of SARS-CoV-2 ORF3a structure reveals chloride binding sites. *bioRxiv [Preprint]*. 2020 Oct 22:2020.10.22.349522. doi: 10.1101/2020.10.22.349522. PMID: 33106803; PMCID: PMC7587776.
- 25- Barrantes FJ. Structural biology of coronavirus ion channels. *Acta Crystallogr D Struct Biol*. 2021 Apr 1;77(Pt 4):391-402. doi: 10.1107/S2059798321001431. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33825700.
- 26- Mesev EV, LeDesma RA, Ploss A. Decoding type I and III interferon signalling during viral infection. *Nat Microbiol*. 2019 Jun;4(6):914-924. doi: 10.1038/s41564-019-0421-x. Epub 2019 Apr 1. PMID: 30936491; PMCID: PMC6554024.
- 27- Miorin L, Kehrer T, Sanchez-Aparicio MT, Zhang K, Cohen P, Patel RS, Cupic A, Makio T, Mei M, Moreno E, Danziger O, White KM, Rathnasinghe R, Uccellini M, Gao S, Aydililo T, Mena I, Yin X, Martin-Sancho L, Krogan NJ, Chanda SK, Schotsaert M, Wozniak RW, Ren Y, Rosenberg BR, Fontoura BMA, García-Sastre A. SARS-CoV-2 Orf6 hijacks Nup98 to block STAT nuclear import and antagonize interferon signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Nov 10;117(45):28344-28354. doi: 10.1073/pnas.2016650117. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33097660; PMCID: PMC7668094.
- 28- Rajsbaum R, García-Sastre A. Viral evasion mechanisms of early antiviral responses involving regulation of ubiquitin pathways. *Trends Microbiol*. 2013 Aug;21(8):421-9. doi: 10.1016/j.tim.2013.06.006. Epub 2013 Jul 11. PMID: 23850008; PMCID: PMC3740364.



- 29- Cao Z, Xia H, Rajsbaum R, Xia X, Wang H, Shi PY. Ubiquitination of SARS-CoV-2 ORF7a promotes antagonism of interferon response. *Cell Mol Immunol*. 2021 Mar;18(3):746-748. doi: 10.1038/s41423-020-00603-6. Epub 2021 Jan 20. PMID: 33473190; PMCID: PMC7815971
- 30- Alberti S, Gitler AD, Lindquist S. A suite of Gateway cloning vectors for high-throughput genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2007 Oct;24(10):913-9. doi: 10.1002/yea.1502. PMID: 17583893; PMCID: PMC2190539.
- 31- Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*. 2007;2(1):31-4. doi: 10.1038/nprot.2007.13. PMID: 17401334.
- 32- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. A fluorescence microscopy assay for monitoring mitophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vis Exp*. 2011 Jul 18;(53):2779. doi: 10.3791/2779. PMID: 21788936; PMCID: PMC3196187.