

[Centro de Información de COVID \(CIC\): Charlas científicas de relámpago](#)

Transcripción de una presentación de Ruth Serra-Moreno (Universidad de Rochester), 19 de mayo de 2021



Título: [Dinámica de remodelación de membranas por SARS-CoV-2](#)

[Perfil de Ruth Serra Moreno en la base de datos de CIC](#)

Subvención de La Fundación Nacional de Ciencias (NSF, por sus siglas en inglés) #: [2032518](#)

[Grabación de YouTube con diapositivas](#)

[Mayo 2021 CIC Webinar Información](#)

Editora de la Transcripción: Macy Moujabber

Editora de la Traducción: Isabella Graham Martínez

Transcripción

Ruth Serra-Moreno:

Diapositiva 1

En primer lugar, quiero agradecerles a todos por invitarnos a participar en las charlas relámpago.

Diapositiva 2

No creo que este virus necesite presentación. Sólo quiero llamar su atención sobre la simplicidad de este agente infeccioso. Consiste solo en una capa o bicapa de lípidos que está incrustada en varias glicoproteínas, incluyendo la S o pico que se une al receptor ACE2 en las células epiteliales de las vías respiratorias humanas y que permite que el virus entre en las células. Debajo de esta envoltura hay una nucleocápsida que consiste en una sola hebra de ARN de alrededor de 30 kilobases de largo. Ese es el genoma del virus y está envuelto en la proteína N o ácido nuclear.

Diapositiva 3

Tan similar a otros coronavirus que infectan a los seres humanos, SARS-CoV-2 es el resultado de un evento de desbordamiento de un coronavirus infectar murciélagos que se transmitió a un huésped intermedio y luego a la población humana.

Diapositiva 4

La exposición a virus que infectan a otras especies es común. Sin embargo, en la mayoría de esas ocasiones, las interacciones conducen a callejones sin salida. En algunas ocasiones, sin embargo, esas interacciones pueden resultar en una infección productiva debido al fracaso de la barrera de especies que contiene el patógeno. Si debido al crecimiento de la población humana, hay una superposición

con el hábitat del huésped natural, esto aumenta la probabilidad de eventos de exposición potenciales futuros que pueden establecer el escenario para la adaptación donde el virus puede acumular mutaciones, sufrir eventos de recombinación, y finalmente opera la selección natural. Una indicación de tal adaptación es la presencia de transmisión de humano a humano donde la interacción con el huésped directo ya no es necesaria.

Diapositiva 5

Así que desde el comienzo del siglo, tres coronavirus altamente patógenos han surgido en la población humana: el original SARS Coronavirus uno, MERS Coronavirus, y SARS Coronavirus 2. Todos ellos son el resultado de eventos de derrame de coronavirus beta que infectan a los murciélagos que fueron transmitidos a otros mamíferos y luego finalmente llegan a los humanos. Algo característico de estas infecciones es que la transmisión de humano a humano aparece muy rápidamente, lo que indica que estos virus encuentran un ambiente celular ideal para la replicación en el huésped natural, intermedio y final.

Diapositiva 6

Y suponemos que la autofagia es uno de esos varios procesos que el coronavirus se utiliza para la replicación ya que la autofagia se conserva altamente en los mamíferos.

Diapositiva 7

La autofagia consiste tan en la formación de las vesículas dobles de la membrana también llamadas autophagosomes para la colección de la carga tal como organelos del malfuncionamiento de las proteínas que necesitan ser entregados en el lisosoma para su eliminación. Si miramos este esquema del ciclo de vida de los coronavirus, podemos ver que algo peculiar en estas infecciones es la remodelación activa de las membranas celulares para generar vesículas de doble membrana o DMVs que funcionan como fábricas de replicación viral. Esta es la ubicación donde tiene lugar la replicación del genoma de los coronavirus. Y la estructura de estos DMV se parece mucho a la de los autophagosomes, por lo que suponemos que los coronavirus, y en particular, el SARS-CoV-2, pueden secuestrar la maquinaria de la autofagia como fuente de estas vesículas de doble membrana.

Diapositiva 8

Así que este NSF RAPID consiste en dos objetivos diferentes. Por el bien del tiempo, solo voy a discutir el Objetivo 2 que se relaciona con esta interacción entre la autofagia y los coronavirus.

Diapositiva 9

Así que para estos experimentos, diseñamos un conjunto de líneas celulares que expresan un marcador de autofagia LC3 fusionado con GFP para que podamos monitorear la formación de autofagia en el flujo de autofagia. Las líneas celulares que diseñamos son la célula Vero E6, que es una línea celular prototipo para la investigación de coronavirus ACE2 expresada en células pulmonares de Ferret, células pulmonares de murciélagos y ACE2 expresadas en células pulmonares humanas, en particular las células A549.

Diapositiva 10

Además de estas células, también adquirimos una biblioteca de los diferentes marcos de lectura abiertos que están codificados en el genoma del coronavirus del SARS para poder evaluar cómo la expresión individual de estos genes afecta la formación de autofagia y el flujo de autofagia. Y pudimos ver algunos candidatos, como el marco de lectura abierto 3a, 7a, la proteína estructural M, y las proteínas no estructurales 6 y 14. Y esto fue muy emocionante porque esto indica que estas proteínas

se activan en autofagia. Sin embargo, debemos tomar esta información con precaución ya que estos experimentos se realizaron bajo condiciones de transfección en ausencia del resto del genoma SARS-CoV-2 que también puede ayudar a modular la expresión de estas proteínas.

Diapositiva 11

Así que el siguiente paso es conciliar esta información en el contexto de una infección. Así que mientras esperábamos la autorización de BSL3 y recibíamos el PPE, el equipo de protección personal, realizamos algunos de estos ensayos usando otro coronavirus, un nivel de bioseguridad dos coronavirus que infecta a los humanos OC43, y también afecta el tracto respiratorio.

Diapositiva 12

Así que lo primero que hicimos fue evaluar en qué momento después de la infección estamos detectando ya la replicación del genoma porque para entonces, la remodelación de las membranas solares ya debe haber sucedido. Y podemos ver un aumento exponencial en la cantidad de copias de ARN genómico acumuladas entre cuatro y ocho horas después de la infección. Y esto es consistente con el hecho de que ya estamos detectando el [nuevo virión?] partículas ocho horas después de la infección.

Diapositiva 13

Así que lo siguiente que hicimos fue infectar nuestras células ingenieriles con OC43 en una multiplicidad de infección de una y esto significa que cada célula está recibiendo una partícula viral. Y realizamos imágenes en vivo por lapso de tiempo durante ocho horas para ver si había alguna fluctuación en la formación del autofagosom.

Diapositiva 14

Así que estas son algunas imágenes representativas de este estudio donde tuvimos tres condiciones experimentales diferentes. La primera fue células tratadas con rapamicina en la parte superior. La rapamicina es una droga que desencadena la autofagia y estas nos permiten usarla como un control positivo, simulacro de células tratadas en el medio, y luego en la parte inferior tenemos las células infectadas por OC43. Lo primero que quiero que vean es que en el tiempo cero sin exposición, sin estímulos, ya estamos detectando todos los autofagosomas que son representados por este [pante?], estos puntos brillantes. Esto es normal y se espera. La autofagia es muy importante para la homeostasis solar y siempre va a haber algún grado de activación de la autofagia - células MADRE incluso más que otros. Lo siguiente que quiero que note es que dos horas después de estimular las células con rapamicina, vemos un aumento significativo en todos los miles de formación, incluso en la célula que ya tenía una gran cantidad de autofagia en marcha, pero aún más en la otra que apenas vimos en la imagen anterior. Con el tiempo, estos autofagosomas aumentan no solo en número sino también se agrandan. Aumentan de tamaño y luego de ocho horas después del tratamiento, empezamos a ver una disminución en el número de autofagosomas que es una indicación de la resolución de esta vía de fusión con lisosomas resultará en la eliminación de estas estructuras. En las células tratadas simuladas no vemos muchas fluctuaciones en el número de autofagosomas a lo largo del tiempo. Y luego, en las células infectadas con OC43 vemos un aumento de los autofagosomas particularmente a las seis horas de la infección, pero a diferencia de las células tratadas con rapamicina, no vemos el aumento en los autofagosomas y el número parece permanecer más estable.

Diapositiva 15

Así que estas son las cuantificaciones del estudio cinético para todas las células que imaginamos y cuantificamos una vez más las células tratadas simuladas no hay mucha fluctuación en el tiempo, células tratadas con rapamicina gran aumento en los autofagosomas, plateado, y luego la resolución, y

las células infectadas OC43, vemos un aumento en la formación de autofagosomas, no tanto como con la rapamicina, pero no vemos la ampliación de los autofagosomas y la resolución de esa vía. Esto es muy alentador. Esto puede indicar que este coronavirus en particular está aprovechando de alguna manera la maquinaria de la autofagia, pero esto también podría interpretarse de manera diferente. Sabemos que la autofagia no solo es importante para la homeostasis celular, también es un mecanismo de defensa antiviral muy importante. Tan en este punto no estamos seguros si este autophagosome creciente es virus inducido o es la célula que responde a la infección.

Diapositiva 16

Así que una manera de que podamos responder a esta pregunta y me disculpo porque estos experimentos están en curso esta semana y todavía no tengo los datos, pero la única manera de responder a esta pregunta es ver si la maquinaria de replicación del virus se coloca con estas estructuras autofágicas. Por un lado las réplicas- la polimerasa del ARN dependiente del ARN pero también los productos de la réplica del genoma, las nuevas copias de los biproductos genómicos del ARN de la réplica como ARN de doble cadena. Lo siguiente que tenemos que hacer es repetir estos experimentos con el SARS-CoV-2. Ahora tenemos la autorización de bioseguridad. Tenemos el stock de virus por lo que estamos listos para ir. Una pregunta que estamos muy interesados en responder es si vemos diferencias entre las diferentes variantes del SARS-CoV-2, particularmente aquellas variantes que son altamente transmisibles como la variante del U.K. y la variante sudafricana. Así que estad atentos. Te mantendré informado de esto.

Y con esto, me gustaría agradecer a aquellos que han contribuido a este trabajo, especialmente a mi estudiante de posgrado Yuxuan Chen. Es una brillante estudiante de posgrado, súper motivada, muy entusiasta. Es la verdadera líder de este proyecto y es un privilegio tenerla en el laboratorio así que no podría estar más feliz. El resto del equipo Yuhang, Sydney, Jared, y Sergio que recientemente se trasladó para una beca postdoctoral en Suecia y por supuesto NSF para la financiación y el apoyo. Y gracias. Estaré encantado de responder preguntas en el chat.