



TESIS DOCTORAL

**AVANCES DIAGNÓSTICOS Y ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES
PARA LA COVID-19: “FUNCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE ATF4 EN EL EPITELIO
RESPIRATORIO”**

**JUAN FRANCISCO BARRERA
LÓPEZ**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR, BIOMEDICINA
Y BIOTECNOLOGÍA**

CONFORMIDAD DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL

José María Carvajal González

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y coautor/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2024

FINANCIACIÓN

La realización del presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación procedente de:

Proyecto de Investigación **BFU2014-54699-P**, obtenido en la convocatoria de 2014 dentro del plan de ayudas a proyectos de I+D, correspondiente al Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia, Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016. 8 de agosto de 2014 (BOE num.192). Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Gobierno de España.

Proyecto de Investigación **BFU2017-85547-P** obtenido en la convocatoria de 2017 dentro del plan de ayudas a proyectos de I+D correspondientes al Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia, Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento, en el marco del Plan Estatal de I+D+I 2013-2016. 13 de junio de 2017 (BOE núm.140). Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Gobierno de España.

Proyecto de Investigación **TED2021-130560B-I00** obtenido en la convocatoria de 2021 de proyectos Estratégicos orientados a la Transición Ecológica y a la Transición Digital, dentro del Plan Estatal de Investigación Científica, Técnica y de Innovación 2021-2023, en el marco del Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia. 6 de diciembre de 2021 (BOE núm.291). Ministerio de Ciencia e Innovación. Gobierno de España.

Proyecto de Investigación **PID2021-126905NB-I00** obtenido en la convocatoria de 2021 de Proyectos de Generación de Conocimiento en el marco del Programa Estatal de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del sistema de I+D+i del Plan Estatal de Investigación Científico, Técnico y de Innovación 2017-2020. 21 de marzo de 2019 (BOE núm.69). Ministerio de Ciencia e Innovación.

Proyecto de Investigación **COV20_00429** obtenido en la convocatoria de 2020 del Instituto de Salud Carlos III, enmarcada dentro de Fondos COVID19 del Real Decreto-Ley 8/2020, de 17 de marzo, de medidas urgentes extraordinarias para hacer frente al impacto económico y social del COVID-19. 18 de marzo de 2020 (BOE núm.73). Ministerio de Ciencia e Innovación. Gobierno de España.

Toda la financiación española está copatrocinada por el programa FEDER de la Unión Europea.

Proyecto de Investigación **IB18014** obtenido en la convocatoria de 2018 dentro del plan de ayudas destinadas a la realización de proyectos de investigación en los Centros Públicos de I+D+i de la Comunidad Autónoma de Extremadura. Cofinanciada por la

Consejería de Economía, Competitividad e Innovación de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Decreto de 20 de marzo de 2018 (DOE núm.86, de 4 de mayo de 2018).

Proyecto de Investigación **GR21140** obtenido en la convocatoria de 2021 dentro del plan de ayudas para la realización de actividades de investigación y desarrollo tecnológico, de divulgación y de transferencia del conocimiento por los Grupos de Investigación de Extremadura. Cofinanciada por la Consejería de Economía, Competitividad e Innovación de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Decreto de 4 de junio de 2021 (DOE núm. 131, 9 de julio de 2021).

Conceder, además, una mención especial a los pacientes y al Biobanco del Área de Salud de Badajoz por su colaboración.



RECONOCIMIENTO

La realización de los experimentos de microscopía confocal fueron llevados a cabo en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la Universidad de Extremadura. Los experimentos de microscopía electrónica de barrido (SEM) fueron realizados en el Servicio de Análisis y Caracterización de Sólidos y Superficies (SACSS) de la Universidad de Extremadura. Los plásmidos empleados para la transducción lentiviral fueron amablemente proporcionados por el laboratorio del Dr. Miguel Ángel Fidalgo Pérez.

ÍNDICE

TABLA DE ABREVIATURAS	5
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	11
1. INVESTIGACIÓN ASOCIADA AL SARS-CoV2	13
2. GENOMA DEL SARS-CoV2	15
2.1. ORF1a y ORF1b	16
2.2. Proteínas Accesorias.	16
2.3. Proteínas estructurales	17
3. SARS-CoV2, MECANISMOS DE PATOGÉNESIS	21
3.1. Infección de células huésped por SARS-CoV2	21
3.2. Traducción del genoma y transcripción de las proteínas de SARS-CoV2 22	
3.3. Replicación del RNA, ensamblaje de proteínas y salida del SARS-CoV2 23	
4. PRUEBAS DE DIAGNOSTICOS FRENTE AL SARS-CoV2	24
4.1. Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT).	25
4.2. Diagnósticos basados en antígenos para SARS-CoV2	28
4.3. Detección basada en anticuerpos para SARS-CoV2	29
5. MUTACIONES Y VARIANTES DEL SARS-CoV2	30
5.1. Principales mutaciones del SARS-CoV2	31
5.2. Variantes del SARS-CoV2	33
5.2.2. Variante Beta	35
5.2.3. Variante Gamma	35
5.2.4. Variante Delta	36
6. VIAS DE INFECCIÓN EN VERTEBRADOS	36
7. RESPUESTA INMUNE FRENTE A SARS-CoV2	39

8. ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	41
OBJETIVOS CAPÍTULO I	53
RESULTADOS CAPÍTULO I	57
1. Hipótesis del funcionamiento del Kit de detección de variantes del SARS-Cov2.....	60
2. Estrategia para el diseño del KIT de RT-Qpcr.....	61
3. Comprobación del Kit de detección de variantes.....	65
3.1. Selección de las parejas de cebadores para RT-qPCR, en función de la posición del nucleótido mutado.....	65
3.2. Selección de las parejas de cebadores para RT-qPCR, en función de la temperatura de anillamiento.....	70
3.3. Determinación del límite de detección del Kit RT-qPCR.	71
4. Prueba del kit con ARN procedentes de aguas residuales de diferentes pueblos	73
DISCUSIÓN CAPÍTULO I	77
CONCLUSIONES CAPÍTULO I	83
OBJETIVOS CAPÍTULO II	87
RESULTADOS CAPÍTULO II	91
1. Análisis in silico de factores de transcripción y sus interactores.	93
2. La expresión de Atf4 es esencial para la diferenciación de las células secretoras (SC).	98
3. El programa transcripcional de la respuesta inmune innata está sobreexpresado en los epitelios de las vías respiratorias deficientes en Atf4.....	104
4. La deficiencia de ATF4 provoca un retraso en el ensamblaje de los cilios, pero no afecta el funcionamiento de las células ciliadas.	108
5. La señalización PERK/ATF4 es necesaria para la diferenciación de las células secretoras.....	113

6. ATF4 se une directamente a elementos reguladores transcripcionales de genes relacionados con la diferenciación celular importantes para el desarrollo epitelial de las vías respiratorias.	121
7. Papel de PERK/ATF4 en la respuesta inmune.....	128
DISCUSIÓN CAPÍTULO II.....	131
CONCLUSIONES CAPÍTULO II.....	139
MATERIALES Y MÉTODOS	143
1. Desarrollo del kit de detección	145
1.1. Diseño de los vectores para el kit de detección.....	145
1.2. Diseño de las pajeras de cebadores.....	146
1.3. RT-PCR en un paso.....	147
2. Modelo murino (Mus Musculus).....	148
2.1. Obtención de las células progenitoras de tráquea de ratón.....	149
2.2. Cultivo primario de células de tráquea. Expansión y diferenciación.....	151
2.3. Cultivos 3D: Organoides de tráquea de ratón.....	152
3. Células de bronquio humano.....	153
3.1. Obtención y cultivo de células progenitoras de bronquio humano.	154
4. Tratamientos en cultivos celulares.	155
5. Silenciamiento genético.	155
5.1. Generación del vector lentiviral. Clonación.....	156
5.2. Producción de partículas lentivirales.	159
5.3. Transducción de lentivirus y selección de los cultivos celulares.	161
6. Inmunofluorescencias en células de las vías respiratorias.	162
6.1. Adquisición y análisis de imágenes de microscopía.	163
7. Análisis de proteínas mediante <i>Inmunoblotting</i> (Western-blot).	164

7.1. Preparación de los extractos proteicos lisado.....	164
7.2. Cuantificación de la concentración de proteínas.	165
7.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).	165
7.4. Electrotransferencia en húmedo.	166
7.5. Marcaje con anticuerpos y revelado de las membranas.	166
8. Análisis de los niveles de expresión por PCR cuantitativa.	168
8.1. Extracción de ARN.....	168
8.2. Retrotranscripción.....	168
8.3. PCR cuantitativa.	169
9. Secuenciación masiva de transcritos.....	171
10. Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación (ChIP sequencing).....	172
11. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	174
12. Ensayo de Doubling Time.	175
13. Medida de la resistencia eléctrica Transepitelial.	175
14. Medida del batido de los cilios.	175
15. Análisis estadísticos.....	176
BIBLIOGRAFÍA	177

TABLA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	Ct	Ciclo umbral
ADNc	ADN complementario	CoV	Coronavirus
Ag	Antígeno	CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
ALI	<i>Air-Liquid Interface</i>	DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
APS	Persulfato amónico	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ARN	Ácido ribonucleico	DMSO	Dimetilsulfóxido
ARNm	ARN mensajero	DNasa	Desoxirribonucleasa
BSA	Albumina de suero bovino	dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
CD	Dominio conector	EDTA	Etilendiaminotetraacético
CDT	Dominio C-terminal	EGTA	Ácido egtazico
CH	Hélice central	FBS	Suero Fetal Bovino
CMB	Célula Madre basal	FP	Péptido de fusión
CMC	Célula Multiciliada	FT	Factores de transcripción
CS	Célula Secretora	GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
CT	Cola citoplasmática	HCoV	Coronavirus humano

HRP	<i>Horseadish peroxidase</i> Peroxidasa de rábano	PBS	Tampón salino fosfato
HR1	Héptada repetida 1	PBS-t	PBS tritón
HR2	Héptada repetida 2	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
IG	Inmunoglobulina	PEI	Polietilenimina
IF	Inmunofluorescencia	P/S	Penicilina/Estreptomicina
KD	<i>Knock Down</i>	p/v	Peso/Volumen
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>	qPCR	PCR cuantitativa
Luc	Luciferasa	RBD	Dominio de unión al receptor
MTECs	<i>Mouse tracheal epithelial cells</i>	RE	Reticulo endoplasmatico
NCBI	National Center for Biotechnology Information	RNasa	Ribonucleasa
NTD	Dominio N-terminal	RT	Retrotranscripción
O.N.	<i>Over-Night</i>	RTC	Complejo transcriptasa replicasa
OMS	Organización Mundial de la salud	SDS	Dodecilsulfato Sódico
ORF	<i>open reading frame</i> Marco de lectura abierto	SEM	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning Electron Microscope</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida	scRNA-seq	<i>Single cell RNA sequence</i>

ssRNA	ARN de cadena única	TGS	Tampón Tris-Glicina-SDS
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA	UPR	Respuesta a proteína desplegada
TBS	Tampón salino de tris	VOC	Variante de preocupación
TBS-T	Tampón salino de Tris con Tween	VOI	Variante de interés
TEER	Resistencia Eléctrica Transepitelial	v/v	Volumen/volumen
TEMED	Tetrametiletilendiamina,	WB	Western-Blot
TG	Tampón Tris-Glicina	WT	<i>Wild type</i>

RESUMEN

El SARS-CoV2 (síndrome respiratorio agudo severo 2), es un virus de ARN de cadena sencilla (ssRNA) no segmentado, en sentido positivo, que taxonómicamente pertenecen a la familia *Coronaviridae* y la subfamilia *Coronavirinae*, el cual provocó la pandemia denominada COVID19, causando más de 350 millones de contagios y más de 5,5 millones de fallecidos.

En el presente trabajo, se desarrolló un Kit de RT-qPCR para la detección de las diferentes variantes existentes en el momento, pudiendo adaptarse a las nuevas variantes que puedan surgir, debido a que el virus SARS-CoV-2 ha cambiado constantemente a lo largo del tiempo mediante mutaciones, lo que ha dado lugar a nuevas variantes. Varias variantes del SARS CoV-2 han surgido y se han extendido globalmente durante la pandemia, con la evidencia de una mayor transmisibilidad, gravedad de la enfermedad y efectividad terapéutica reducida.

Por otro lado, se ha demostrado que ATF4 es un impulsor clave de la respuesta inmune innata, provocada por la infección del SARS-CoV2. La principal vía de entrada del SARS-CoV2 son las vías respiratorias superiores, en concreto el epitelio que tapiza las misma. En este epitelio se ha relacionado ATF4 con otros factores de transcripción involucrados en la diferenciación y homeostasis del mismo. En base a esto, en este trabajo se analiza el papel que ATF4 desempeña en el epitelio respiratorio, mostrando un importante papel en la diferenciación de las células secretoras, y una relación directa en la respuesta inmune.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. INVESTIGACIÓN ASOCIADA AL SARS-CoV2

En todo el mundo, se han notificado a la OMS más de 250 millones de casos confirmados de enfermedad por coronavirus 2019 (COVID19), incluidas más de cinco millones de muertes. La alta tasa de transmisión y la capacidad mutagénica del SARS-CoV2, contribuyen a la evolución de la pandemia y al enorme impacto negativo en la salud y la economía (Khachfe et al., 2020). El control de esta pandemia depende en gran medida de unos métodos sólidos que combinen la detección temprana, el aislamiento o distanciamiento social, y los enfoques terapéuticos y epidemiológicos. Debido a que las manifestaciones clínicas (neumonía, disnea, fiebre, tos, entre otras) no son siempre específicas (H. Zhu et al., 2020), y la historia de contacto con otras personas posiblemente infectadas, no están fácilmente disponibles, la verificación clínica y diagnóstico epidemiológico son difíciles (Sun et al., 2020).

Como para cualquier otro patógeno nuevo o variante de los existentes, la investigación asociada a los mismo se inicia y desarrolla a lo largo de los años siguiendo tres principales líneas de trabajo. Estas líneas son en primer lugar, conocer la biología del organismo que se pretende combatir. En segundo lugar, desarrollar técnicas de diagnóstico certero. Por último, generar terapias que bien, alivien los efectos de la infección, la eliminen o la reduzcan (Figura 1). Todas estas líneas, de igual importancia a nivel global, están muy relacionadas entre sí. De modo que sería imposible desarrollar pruebas diagnósticas sin saber la biología del agente infeccioso.



Figura 1: Esquema de las líneas de investigación. Las tres líneas de investigación se encuentran relacionadas entre sí, y constan de igual importancia. Estas tres líneas de investigación son el estudio de la biología del virus, desarrollo de técnicas diagnósticas y desarrollo de terapias.

Si bien es cierto que no es necesario conocer la biología completa del agente infeccioso para desarrollar de manera efectiva, por ejemplo, pruebas diagnósticas. Este precisamente es el caso del SARS-CoV2, cuya secuenciación en enero de 2020 (B. Hu et al., 2021) supuso el inicio en la carrera del desarrollo de técnicas de detección. Esto permitió en primer lugar clasificar el virus como un nuevo miembro de los coronavirus y nombrarlo SARS-CoV2 (Gorbalenya et al., 2020).

Los coronavirus (CoV), son virus de ARN de cadena sencilla (ssRNA) no segmentado, en sentido positivo, que taxonómicamente pertenecen a la familia *Coronaviridae* y la subfamilia *Coronavirinae* (Kadam et al., 2021a). De ellos, destacan los coronavirus humanos (HCoV), responsables de múltiples enfermedades respiratorias de diversa gravedad, tales como el resfriado común, la bronquitis y la neumonía (Pene et al., 2003). Los HCoV poseen una gran capacidad evolutiva, debido a la alta tasa de sustitución y recombinación de nucleótidos (Vijgen et al., 2005) y han aparecido periódicamente en diferentes

lugares del mundo, provocando importantes brotes de neumonía mortal en humanos desde principios del siglo XXI (C. Wu et al., 2020). El primer brote se inició en noviembre de 2002 en Foshan, China, provocado por el coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV). Afectó a 28 países del mundo con 8096 casos y 774 muertes (Ge et al., 2015), llegando a considerarse infección global en 2003 con una tasa de letalidad del 10% (Lee et al., 2003). Tras una década, el segundo brote de HCoV fue causado por el coronavirus del síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) en junio de 2012 en Jeddah, Arabia Saudita (Ge et al., 2015), con una tasa de mortalidad del 35% (de Groot et al., 2013) y afectando a 27 países. El último brote importante de HCoV, ocurrió en diciembre de 2019 en la provincia china de Wuhan, causada por una cepa altamente homóloga de SARS-CoV, clasificada como síndrome respiratorio agudo severo 2 (SARS-CoV2), que se denominó pandemia COVID19 (enfermedad por coronavirus 2019) (N. Zhu et al., 2020). Esta pandemia, ha provocado más de 350 millones de contagios y 5,5 millones de fallecidos por la COVID19.

2. GENOMA DEL SARS-CoV2

El genoma del SARS-Cov2, secuenciado recientemente, es de aproximadamente 29,9kb (Lu et al., 2020). Su organización genómica consta de seis marcos de lectura abiertos (ORF) funcionales, dispuestos en orden 5' a 3': replicasa (ORF1a/ORF1b), espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N), (Chan et al., 2020) además, de once ORF putativos que codifican proteínas accesorias, ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c y ORF10, y están intercalados entre los genes estructurales (Shang et al., 2021) (Figura 2). SARS-CoV2, al igual que otros CoV, presenta un menor número de islas CpG, ya que los huéspedes, en este caso, los humanos, poseen proteína antiviral con dedos de zinc (ZAP), que identifican los motivos CpG del genoma viral, y los procesa para su degradación. En todo el genoma del SARS-CoV2, el ORF que codifica la proteína E, es el que muestra un mayor contenido en estos motivos CpG (Digard et al., 2020).

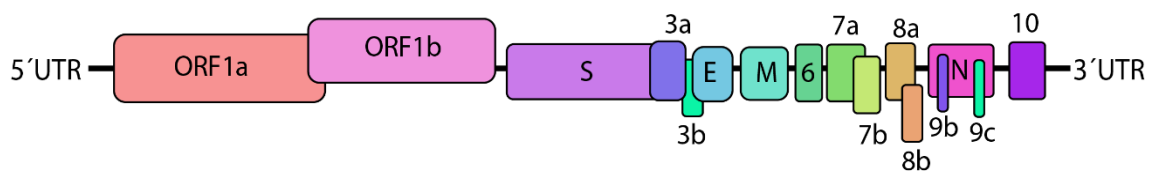


Figura 2: Genoma del SARS-CoV2. Consta de las regiones 5' y 3' UTR (regiones no traducidas), 6 ORF funcionales, ORF1a/ORF1b, espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N), y ORF putativos que codifican las proteínas accesorias, ORF3a, ORF3b, ORF3c, ORF3d, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF9b, ORF9c y ORF10.

2.1. ORF1a y ORF1b

La región genómica ORF1a/ORF1b, que ocupa los primeros dos tercios del genoma SARS-CoV2, producen poliproteína replicasa/transcriptasa. Esta experimenta actividad autoproteolítica con la ayuda de la proteinasa similar a papaína (PLpro) y la proteasa principal similar a 3C (3CLpro o Mpro), dando lugar a 16 proteínas no estructurales, proteínas (nsp del inglés *non structural protein*). PLpro, realiza la escisión en el extremo N de la poliproteína replicasa, produciendo nsp1, nsp2 y nsp3, necesarias para la replicación viral. Por otro lado, Mpro, separa proteolíticamente la poliproteína replicasa 1ab para producir enzimas virales maduras. Posteriormente realiza la escisión en 11 sitios para liberar el resto de las proteínas no estructurales, que van de nsp4 a nsp16 (L. Zhang et al., 2020), las cuales son necesarias para el ciclo de vida del virus en las células huéspedes (Kirtipal et al., 2020).

2.2. Proteínas Accesorias.

Las proteínas accesorias se han caracterizado menos que otras proteínas contenidas en el genoma del SARS-CoV2, y gran parte de su comprensión se basa en estudios funcionales sobre el SARS-CoV y otros virus relacionados como el MERS-CoV. Los genes que codifican las proteínas accesorias están presentes entre los genes estructurales, aunque se agrupan predominantemente

en el extremo 3' del genoma, y deben desempeñar un papel esencial en el ciclo de vida del virus, ya que han conservado muy bien su posición en el genoma de todos los coronavirus (Kadam et al., 2021a).

Recientes estudios, han demostrado que estas proteínas no son esenciales para la replicación del virus, pero algunas han mostrado ser importantes en las interacciones virus-huésped (Rohaim et al., 2021). Además, el análisis evolutivo indica que algunas de estas proteínas accesorias han dominado las primeras tendencias evolutivas del SARS-CoV2 (Velazquez-Salinas et al., 2020), y se han observado mutaciones en proteínas accesorias, como, por ejemplo, en ORF3, ORF6, ORF7a, ORF8 u ORF10 en las principales variantes que circulan actualmente, por lo que estas proteínas podrían contribuir a aumentar la patogénesis y la transmisibilidad en estas cepas de SARS-CoV2 (Redondo et al., 2021).

También, se ha visto que estas proteínas están relacionadas con mecanismos de evasión inmunitaria, como la inhibición de la secreción de citoquinas por ORF9c, o contrarrestar la acción de IFN tipo I mediante ORF3b, ORF6, ORF7, ORF8 u ORF9b (Mariano et al., 2020). Por otro lado, existen otros mecanismos celulares importantes alterados por estas proteínas accesorias, como la autofagia o apoptosis por ORF3a, la función mitocondrial por ORF3d o la activación del inflamósoma por ORF9b (Redondo et al., 2021).

2.3. Proteínas estructurales

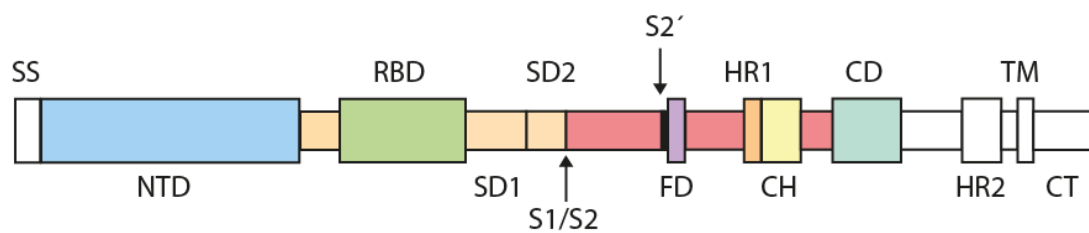
El genoma del SARS-CoV2 codifica para cuatro proteínas estructurales:

- **Proteína de espiga (S)**

La proteína S del SARS-CoV2, es una glicoproteína transmembrana tipo I. Estas proteínas triméricas están divididas en 4 regiones: un dominio peptídico único (residuo de 12 aminoácidos), una región extracelular, la región transmembrana y el dominio intracelular (Wrapp et al., 2020). Hay entre 15 y 30 proteínas S, que giran o se mueven libremente en la envoltura del virus (Yuan et al., 2020).

La región extracelular está compuesta por dos subunidades S1 y S2. La subunidad S1 consiste en un dominio N-terminal (NTD), y un dominio C-terminal (CDT) que actúa como dominio de unión a receptor (RBD), cuya función es unirse al receptor de la célula huésped. S2 es una subunidad de fusión de membrana que contiene el péptido de fusión (FP), la heptada repetida 1 (HR1), la hélice central (CH), el dominio conector (CD), la heptada repetida 2 (HR2), el dominio transmembrana (TM) y la cola citoplasmática (CT). La función de esta subunidad S2 es fusionar las membranas de los virus y de las células huésped (Walls et al., 2020) (Figura 3A).

A)



B)

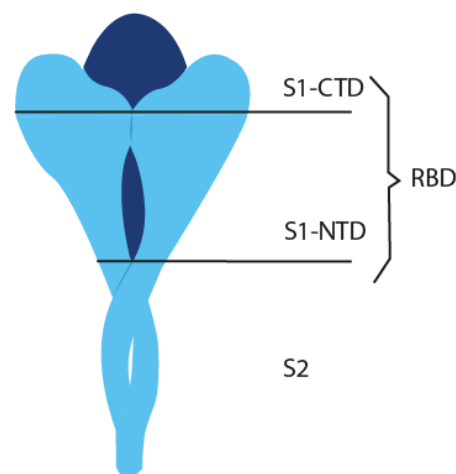


Figura 3: Proteína S. (A) Esquema de la estructura primaria de la proteína S del SARS-CoV-2. Los diferentes dominios se muestran con diferentes colores. SS, secuencia única; NTD, dominio N-terminal; RBD, dominio de unión al receptor; SD1, subdominio 1; SD2, subdominio 2; S1/S2, sitio de escisión de proteasa S1/S2; S2', sitio de escisión de la proteasa S2'; FP, péptido de fusión; HR1, heptada repetida 1; CH, hélice central; CD, dominio conector; HR2, heptada repetida 2; TM, dominio transmembrana; CT, cola citoplasmática. El sitio de escisión de la proteasa se indica mediante flechas. (B) Estructura terciaria de la proteína S. en la parte apical

se encuentran el dominio C-terminal de la subunidad S1, justo seguido del dominio N-terminal de la misma subunidad. Dicha subunidad participa en la unión de los viriones con la membrana de la célula huésped. En la parte inferior, encontramos la subunidad S2, la cual actúa como proteína de fusión.

La subunidad S1, como nombramos anteriormente, participa en la unión de los viriones con la membrana de la célula huésped, al interactuar con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), y posteriormente, se inicia el proceso de infección del SARS-CoV2 (Hoffmann et al., 2020). Durante este proceso, la proteína S sufre cambios conformacionales inducidos al entrar en los endosomas de la célula huésped (Hwang et al., 2020). La otra subunidad de la proteína S, S2, funciona como la proteína de fusión, pasando por diferentes estados conformacionales (Figura 3B).

- **Proteína E.**

De las cuatro proteínas estructurales, la proteína E es la más pequeña. Tiene el número de copias más bajo de las proteínas de membrana que se encuentran en la envoltura lipídica en las partículas de virus maduros y, sin embargo, el ARN subgenómico (sgARN) que codifica dicha proteína, es uno de los transcritos más expresados. Codifica un polipéptido de 75 aminoácidos, con un peso molecular de unos 8 kDa aproximadamente (Duart et al., 2020).

La proteína E consta de tres dominios: un dominio transmembrana (TDM), un dominio helicoidal intermedio y dominios N y C terminal. (Nieto-Torres et al., 2014). Esta proteína está altamente conservada en los diferentes subtipos de CoV, sin embargo, aún no está completamente claro su papel en la invasión, replicación y liberación viral. Se ha visto, que la proteína E en la envoltura de la partícula viral, funciona interactuando con otras proteínas estructurales, por ejemplo, interacciona con la proteína M, manteniendo la forma de la partícula viral y promoviendo su liberación (Alsaadi et al., 2020). Estudios recientes han indicado que varias proteínas del SARS-CoV2, incluida la proteína E, pueden autoensamblarse en oligómeros y generar canales iónicos (CI), por lo que puede desempeñar un papel importante en la regulación del equilibrio iónico y el microambiente de las células huésped (Kern et al., 2021).

- **Proteína M.**

La glicoproteína M, es la proteína estructural más abundante del SARS-CoV2. Atraviesa la bicapa de la membrana, siendo una proteína transmembrana de múltiples extensiones que se caracteriza por tres dominios, dejando un dominio amino-terminal corto fuera del virus, y un dominio carboxilo-terminal largo dentro del virión (Mousavizadeh & Ghasemi, 2021), y un tercer dominio transmembrana con una región anfipática al final.

La proteína M juega un papel importante, tanto, en el ensamblaje viral como en su homeostasis interna, a través de interacciones proteína-proteína. El dominio transmembrana y el endodominio (C-terminal) de la proteína M, participan en esta interacción proteína-proteína (Bianchi et al., 2020). La proteína M puede unirse a las demás proteínas estructurales, por ejemplo, se ha observado recientemente que se une a la proteína N, promoviendo la finalización del ensamblaje viral, estabilizando el complejo proteína N-ARN dentro del virión (Astuti & Ysrafil, 2020), además de la interacción con la proteína E anteriormente mencionada.

- **Proteína N.**

La proteína de la nucleocápside (N) del SARS-CoV2, tiene una longitud de 419 aminoácidos con un peso molecular de 45,6 KDa. Esta proteína tiene dos regiones principales intrínsecamente desordenadas (IDR) en los extremos N- y C- terminal. Además, hay tres dominios conservados en la estructura de la proteína N, un dominio de unión a ARN en N-terminal (NTD), un dominio de dimerización en C-terminal (CTD) y una región enlazadora rica en Ser-Arg (SR).(Kadam et al., 2021a)

La proteína N es una proteína multifuncional que desempeña un papel crucial en el ensamblaje del virus y en la transcripción de ARN. La proteína N es imprescindible en la formación de ribonucleoproteínas helicoidales durante el empaquetamiento del genoma de ARN, regulando la síntesis de ARN viral durante la replicación y la transcripción. Esta proteína, también es capaz de regular las células huéspedes infectadas y a sus mecanismos celulares,

regulando el ciclo de la célula huésped, incluyendo la apoptosis, facilitando así la multiplicación y propagación del virus (McBride et al., 2014). Sin embargo, las funciones principales de la proteína N son unirse al genoma del ARN viral y empaquetarlo en una estructura de nucleocápside helicoidal larga o complejo de ribonucleoproteína (RNP) (Kadam et al., 2021a).

3. SARS-CoV2, MECANISMOS DE PATOGÉNESIS

3.1. Infección de células huésped por SARS-CoV2

Para el inicio de la infección, es necesario, la interacción del virus con las células huésped, a través de un receptor de superficie celular. En el caso de infección por SARS-CoV2, esta interacción tiene lugar entre, la proteína espiga (S) del virus y el receptor de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2). Esta unión, presenta la especificidad y el tropismo del virus hacia un tejido o tipos de células en particular (Mousavizadeh & Ghasemi, 2021). El receptor ACE2 se expresa principalmente en el aparato respiratorio, en concreto, en células alveolares tipo 2 en el pulmón (tracto respiratorio inferior) (Prompetchara et al., 2020), y en las células epiteliales del tracto respiratorio superior (Xu et al., 2020); además de en el corazón, riñón, estómago, vejiga, esófago e intestino (Kadam et al., 2021b).

La proteína S, como ya se indicó anteriormente, consta de dos subunidades (S1 y S2), la subunidad S1 es la que interacciona y se une al receptor ACE2 por medio del dominio de unión al receptor (RBD), mientras que la subunidad S2 juega un papel fundamental en la fusión de la membrana del virus con la de la célula huésped (Y.-R. Guo et al., 2020). La proteína S debe ser cortada, para completar la entrada del virus en la célula huésped, y esta escisión es mediada por una enzima proteasa (TMPRSS2). La escisión tiene lugar en dos posiciones diferentes de la subunidad S2, provocando la separación de la unión RBD y el receptor ACE2, y posteriormente, la fusión de las membranas, produciéndose así, la entrada del virus mediante endocitosis (Figura 4) (Rabaan et al., 2020).

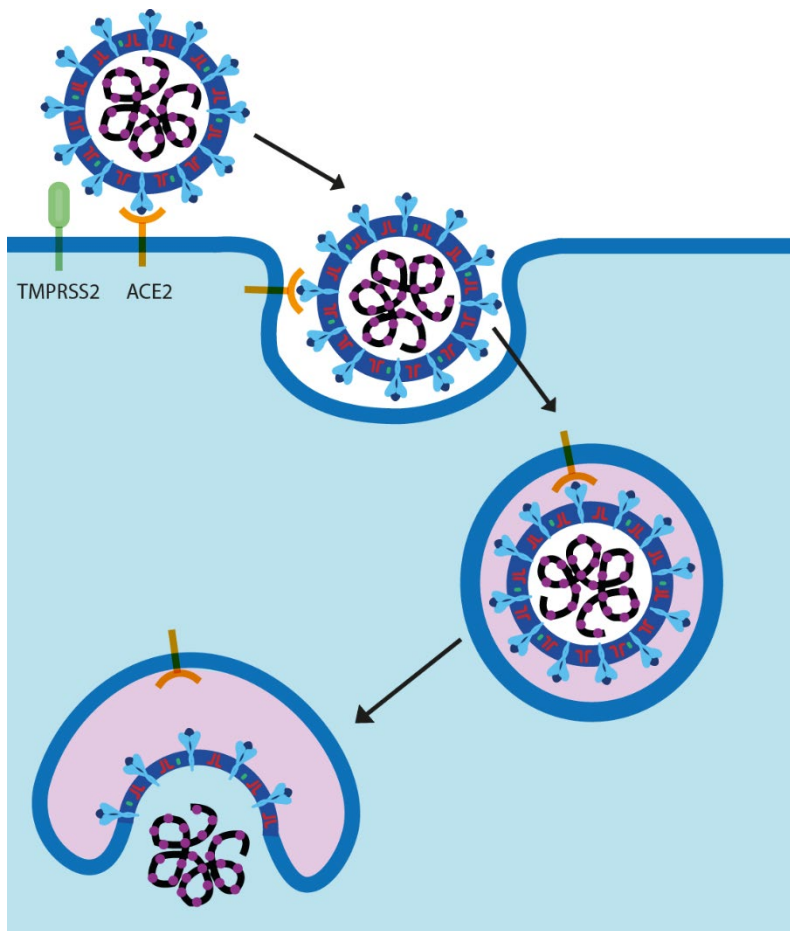


Figura 4: Infección del SARS-CoV2. El virión se une por su glicoproteína S (subunidad S1) al receptor celular (enzima convertidora de angiotensina 2), lo que induce la endocitosis. El pH ácido y las proteasas endosomales escinden las subunidades S1 y S2 y modifican S2 para que actúe promoviendo la fusión de la envoltura viral y la membrana de la vesícula endocítica, produciendo así la liberación del ARN vírico.

3.2. Traducción del genoma y transcripción de las proteínas de SARS-CoV2

Una vez completada la entrada del virus al citoplasma celular, la nucleocápside del virus es liberada, lo que permite la salida del ARN genómico viral, actuando como ARNm, transcribiéndose el gen de la replicasa viral y traduciéndose en las glicoproteínas pp1a y pp1ab (Mousavizadeh & Ghasemi, 2021). Posteriormente son procesadas proteolíticamente por enzimas proteasas como, quimiotripsina codificada viralmente (3CLpro), proteasa principal (Mpro) y

proteasas similares a la papaína, dando lugar a las proteínas no estructurales (NSP, del inglés *non structural proteins*), implicadas principalmente en la replicación y transcripción genómica del virus. Como indicamos en apartados anteriores, realizan actividades enzimáticas de tipo proteasa, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), helicasa, exorribunucleasa, entre otras (Rokni et al., 2020). Adicionalmente, estas proteínas no estructurales son necesarias para formar el complejo transcriptasa replicasa (RTC), el cual, es ensamblado en el retículo endoplasmático (RE) (Y.-R. Guo et al., 2020), y su papel principal es replicar y sintetizar un conjunto de ARNm subgenómico (sgARN) que codifica para las proteínas estructurales principales (S), (M), (E), (N) y para las proteínas accesorias (Ahn et al., 2020).

3.3. Replicación del RNA, ensamblaje de proteínas y salida del SARS-CoV2

En la replicación, el RNA monocatenario de polaridad positiva (+ssARN), sirve de molde para la síntesis de una copia de ARN monocatenario de polaridad negativa (-ssARN) (X. Li et al., 2020), a partir de la cual se dan las polipoproteínas que se procesan y conforman el complejo RTC. El complejo RTC, mediante su actividad enzimática replicativa, crea una nueva copia del genoma +ssARN a partir del molde -ssARN. El +ssARN se asocia con la proteína (N) formando la nucleocápside, mientras, las proteínas estructurales (S, M y E), y las proteínas accesorias, son elaboradas en las membranas del RE y posteriormente, transportadas al complejo de Golgi, para ser ensambladas junto con la nucleocápside, dando lugar a nuevas partículas víricas. Estas son transportadas a la membrana plasmática celular en forma de vesículas, produciendo así la liberación del virus (Y.-R. Guo et al., 2020).

4. PRUEBAS DE DIAGNOSTICOS FRENTE AL SARS-CoV2

Con el conocimiento adquirido, a menudo actualizado casi a tiempo real, en el inicio de 2020 la comunidad científica centró, y sigue centrado el esfuerzo en el diseño y la fabricación de kits de diagnósticos, simples, rápidos, precisos y asequibles. El diagnóstico de infecciones por SARS-CoV2 se realiza, en una variedad de muestras del tracto respiratorio superior (garganta, nasal, frotis/lavado nasofaríngeo, saliva, esputo) e inferior (líquido de lavado broncoalveolar), así como, aunque generalmente de manera menos fiable, en sangre, orina y heces (Iliescu et al., 2021). El diagnóstico tiene como objetivo la detección directa de ácidos nucleicos, antígenos virales o la respuesta inmunitaria del huésped (anticuerpos específicos o células T). Dependiendo del objetivo, es importante el momento de recolección de la muestra y su preparación, independientemente de la eficacia de los métodos utilizados (Loeffelholz & Tang, 2020).

Por tanto, las técnicas de detección se basan en la detección directa del genoma del virus. O de forma indirecta, mediante la detección de la respuesta del organismo a la presencia del virus, la respuesta inmune en forma de anticuerpos generados en respuesta al virus o células productoras de los mismos (Figura 5). Esta misma estrategia ya se ha usado frente a otros patógenos como son el virus sincicial respiratorio (RSV), hepatitis, gripe (influenza), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), entre otros.

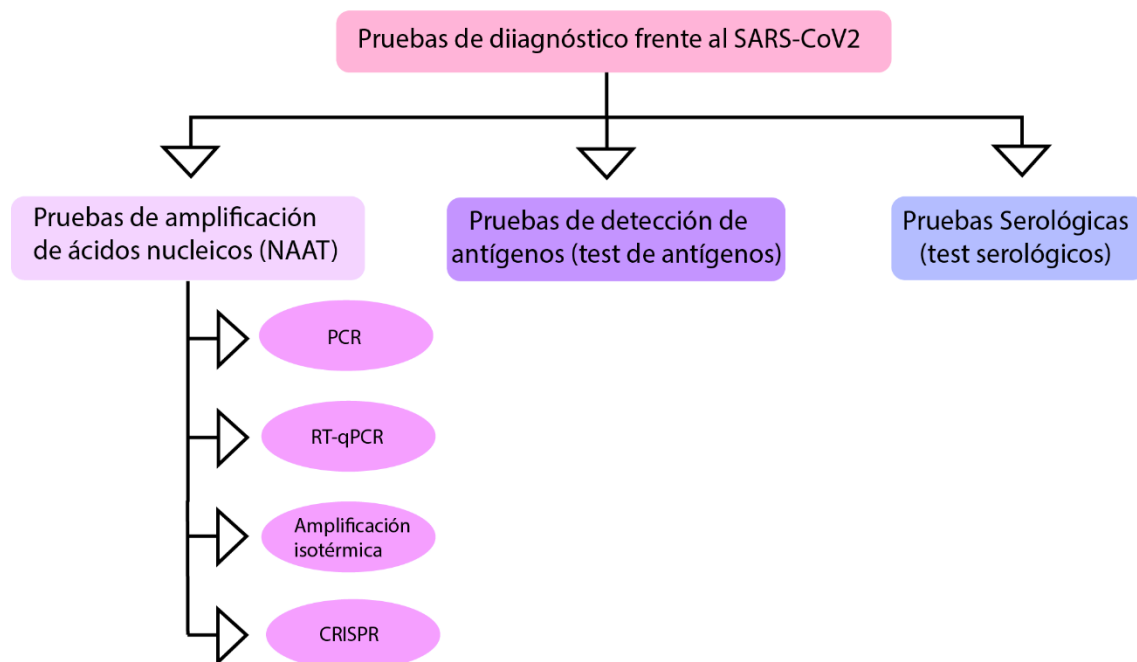


Figura 5: Esquema de pruebas diagnósticas. Resumen esquematizado de las principales pruebas de diagnóstico frente al SARS-CoV2.

En cuanto a la detección directa del genoma del virus, los ácidos nucleicos virales, se pueden aislar directamente de la saliva o tras la concentración de células epiteliales. Los métodos basados en la detección de ácidos nucleicos virales son más sensibles, y también más seguros debido a la inactivación de los viriones durante los pasos preliminares de purificación de las muestras (Bokelmann et al., 2021). Estos métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos pueden ser tanto cuantitativos como cualitativos, y comprenden un paso previo, que consiste en el aislamiento de ARN.

4.1. Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT).

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT), son pruebas diagnósticas basadas en la amplificación de ARN/ADN, hasta un punto en el que se vuelva detectable. Se basa en una prueba de reacción en cadena de la

polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), dirigida a detectar el ARN del virus en muestras respiratorias como hisopos nasofaríngeos o aspirados bronquiales (Böger et al., 2021). La COVID19 se diagnostica, en su mayor medida, mediante PCR cuantitativa en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR). Esta técnica emplea métodos de detección fluorométricos con sondas específicas o colorantes que se intercalan en moléculas de ADN, que se sintetizan de *novo* en cada ciclo de amplificación. Sin embargo, la necesidad de pruebas más rápidas, fiables y económicas para COVID19, han impulsado diferentes alternativas a las pruebas RT-qPCR (C. Y. Yu et al., 2021).

- **Amplificación isotérmica.**

La amplificación isotérmica se lleva a cabo sin ciclos térmicos, es decir, amplifica el ADN a una temperatura constante de entre 60°C-65°C, utilizando una polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena, presentando una alta especificidad y eficacia además de una mayor rapidez que la detección basada en PCR. Algunas pruebas de amplificación isotérmicas son, la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP del inglés *Loop-mediated isothermal amplification*) (H. Zhang et al., 2019), y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA del inglés *Strand-Displacement Amplification*). Ambas técnicas utilizan una polimerasa de ADN con actividad de desplazamiento en cadena, y realizan a la misma temperatura, tanto la desnaturalización de la doble hélice, como la elongación de la hebra sintetizada, dando amplicones de ADN de doble hebra largos (LAMP) o cortos (SDA) (Iliescu et al., 2021).

Las NAAT isotérmicas tienen la ventaja de generar los resultados más rápidos que los basados en PCR (menos de 30 minutos), y pueden generar resultados de punto final o lecturas en tiempo real (RT-LAMP) al igual que las PCR (Yan et al., 2020). Además, en cuanto a la sensibilidad de RT-LAMP, es ligeramente menor, pero aun así comparables con las pruebas basadas en RT_qPCR (75-90,5% frente a, 78-98,5%) (Mustafa Hellou et al., 2021).

- **Pruebas basadas en secuenciación**

Se han desarrollado otras pruebas basadas en secuenciación para la detección del SARS-CoV2, usando tecnologías de secuenciación Sanger. La prueba basada en la secuenciación Sanger, es muy similar a la secuenciación tradicional de amplicones de PCR de transcripción inversa, pero en esta prueba, se incluye la adición de un ADN de inserción de COVID-19 sintético con marco desplazado en la mezcla de la reacción. Por otro lado, esta prueba admite la transcripción inversa RT-PCR en un solo paso directamente de las muestras, sin el paso previo de purificación de ARN. Los productos amplificados se purifican, y posteriormente se realiza la secuenciación Sanger, mediante una electroforesis capilar automatizada. El ADN sintético incluido en la muestra antes de la amplificación sirve como control interno y permite identificar las muestras como positivas o negativas para la COVID-19 (Chandler-Brown et al., 2020). Sin embargo, no son tan accesibles y requieren personal especializado, tanto para la recopilación como interpretación de datos, aunque, actualmente son esenciales para la detección y vigilancia de nuevas variantes (Bhoyar et al., 2021). Estas pruebas ofrecen una importante información para el seguimiento y gestión de la pandemia, pero debido a su complejidad son descartadas como test de diagnósticos.

- **Detección mediante CRISPR**

La tecnología CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) ha ayudado al desarrollo de ensayos de diagnóstico avanzado. Los sistemas CRISPR tiene la capacidad de reconocer ácidos nucleicos en función de su secuencia y eliminarlos a través de la actividad endonucleasa de la enzima asociada a CRISPR (Cas). Esta propiedad se ha aprovechado en el campo diagnóstico. La detección mediada por CRISPR, ha sido adaptada para detectar una secuencia específica de ácidos nucleicos, y es considerado un método de detección sensible, específico y fiable (L. Guo, Sun, et al., 2020). Los biosensores basados en CRISPR-Cas se dirigen a una secuencia específica del genoma, haciendo uso del complejo proteico ARN CRISPR-Cas como biorreceptor, para el reconocimiento específico de la secuencia (Uygun et al.,

2020). Una de las desventajas es la falta de automatización con protocolos operados manualmente, por lo que aumenta el riesgo de contaminación. Además, si el virus muta en la región diana, es posible que el SARS-CoV2 no se detecte o lo haga de forma menos fiable (Broughton et al., 2020).

Mediante la combinación de este método con diferentes tipos de amplificación, se consiguió la obtención de pruebas más optimizadas. Un ejemplo es la combinación de detección mediada por LAMP y CRISPR. RT-LAMP realiza una transcripción inversa del ARN genómico del SARS-CoV2, y una ADN polimerasa lo amplifica. La transcripción de ADN amplificado provoca la actividad de escisión colateral de un complejo CRISPR, programado para la secuencia diana. Esta escisión de ácidos nucleicos hace posible una lectura fluorescente detectada por un lector de placas (Iliescu et al., 2021).

En cuanto a la identificación de antígenos del SARS-CoV2, se emplean muestras de saliva, hisopos bucofaríngeos o aspirados nasofaríngeos, empleando diferentes enfoques metodológicos, y depende de la densidad del virión en la muestra, que a su vez depende de la respuesta inmune del huésped (Iliescu et al., 2021). Se ha demostrado que la sensibilidad puede variar considerablemente, sin embargo, la detección de antígeno es lo más apropiado para desarrollar métodos de diagnósticos rápidos, tempranos y sencillos. Por otro lado, la detección de anticuerpos mediante pruebas serológicas, de anticuerpos específicos, pueden confirmar una infección actual o pasada por SARS-CoV2 (Deeks et al., 2020).

4.2. Diagnósticos basados en antígenos para SARS-CoV2

Dirigirse a un antígeno (Ag) específico producido por un patógeno extraño, ya sea secretado en el sistema circulatorio o en la superficie del patógeno, es un método altamente específico para la detección de ese patógeno. Dado que los resultados obtenidos son rápidos, a menudo se utilizan para una primera detección de laboratorio en un caso sospechoso. El Ag de superficie o secretor del SARS-CoV-2 se puede detectar en muestras clínicas dentro de los 2 días posteriores a la infección, incluso cuando la carga viral es baja antes de la

manifestación de los síntomas y, por lo tanto, puede ayudar en el diagnóstico temprano, especialmente en comparación con las pruebas diagnósticos basados en la detección de anticuerpos, ya que los anticuerpos se desarrollan más tarde (Roberts et al., 2021).

Estos dispositivos rápidos generalmente comprenden un pocillo poco profundo y una tira de prueba porosa impregnada con anticuerpos (test antígenos) donde se incluye un indicador colorimétrico. Se colocan entre 10 y 15 uL de la muestra biológica, la cual se absorberá en la tira porosa; si la muestra es de un paciente con SARS-CoV2, los antígenos se unirán a los anticuerpos que se encuentran en la tira porosa inmovilizados, desencadenando la reacción colorimétrica. Esta interacción conduce a la formación de una estrecha banda visible a simple vista (Zhao et al., 2020).

4.3. Detección basada en anticuerpos para SARS-CoV2

Los linfocitos B del sistema inmunitario adaptativo producen y secretan anticuerpos durante la invasión de patógenos extraños. Dado que estos anticuerpos se producen específicamente contra un antígeno específico, la reacción antígeno-anticuerpo es muy específica y, por lo tanto, se puede utilizar como biomarcador específico para el diagnóstico de enfermedades. Se desencadena una respuesta inmunitaria contra el SARS-CoV-2, y después de una semana, aumenta la producción de inmunoglobulinas IgG/IgM en la sangre para luchar contra el virus, y la detección de estos anticuerpos puede ayudar a diagnosticar la infección. IgM es el primer anticuerpo en responder que ayuda a eliminar los patógenos, mientras que IgG proporciona la segunda inmunidad basada en anticuerpos, más robusta (Roberts et al., 2021).

Las pruebas de detección basadas en anticuerpos son una parte importante del diagnóstico y control del COVID19, para determinar la prevalencia de la infección por SARS-CoV2 y medir las respuestas inmunitarias individuales, tanto a la infección como a la vacunación (H. Ma et al., 2020). Estudios recientes, han mostrado que la progresión natural de la COVID19 y la cinética de los anticuerpos anti-SARS-CoV2 revelan una ventana de 10 a 21 días entre el

inicio de los síntomas y la detección de los anticuerpos (Okba et al., 2020). Estas pruebas presentan algunas ventajas, como la rapidez de extracción de datos cualitativos (5 a 20 minutos) y la capacidad de identificar infecciones previas incluso sin realizar pruebas en la fase activa de la enfermedad. A pesar de estas ventajas, su precisión es baja y pueden presentar reacciones cruzadas con otros coronavirus (Sidiq et al., 2020), por lo que las pruebas serológicas deben complementarse con pruebas moleculares para identificar la presencia de ARN (L. Guo, Ren, et al., 2020).

Inmunoensayos de flujo lateral (LFIA) o inmunocromatografía (LFIC), son actualmente los únicos dispositivos rápidos disponibles para el diagnóstico del SARS-CoV2, detectando IgM e IgG relacionados. Estas pruebas proporcionan tiempo de respuestas cortos (15 minutos) y no dependen de laboratorios especializados. También es un método rentable, y se utilizan para la detección del virus sin necesidad de pasos de amplificación mediante RT-PCR o LAMP (Iliescu et al., 2021).

Los dispositivos para los tests serológicos, al igual que los tests de antígenos, constan de un pocillo poco profundo y una tira de prueba porosa impregnada en este caso con antígenos frente a los anticuerpos contra el SARS-CoV2. El funcionamiento de ambas pruebas es similar (Zhao et al., 2020).

5. MUTACIONES Y VARIANTES DEL SARS-CoV2

Los virus son propensos a mutaciones rápidas que les permiten evadir la inmunidad del huésped, aunque *Coronaviridae* posee un proceso de corrección único (distinto de otros virus) para la síntesis de ARN. Esta función es atribuida a nsp14, una enzima exonucleasa que reduce la tasa de error de replicación, lo que da como resultado una tasa de mutación 10 veces menor con respecto a otros virus (Tao et al., 2021). Sin embargo, acumulan mutaciones, y estas se producen por errores durante la replicación, daño de ácidos nucleicos y edición del genoma del virus inducida por la defensa antiviral del huésped (Di Giorgio et al., 2020). Se ha visto recientemente, que los mecanismos de edición de ARN del huésped provocan mutaciones en el genoma del SARS-CoV2. Estos

mecanismos de edición son llevados a cabo por dos familias de desaminasas, la adenosina desaminasa y la enzima editora de ARNm de la apolipoproteína B (ADAR y APOBEC) respectivamente. ADAR edita ARN de doble cadena, mientras APOBEC puede editar cadenas simples de ARN y ADN, ambas involucradas en la defensa del huésped frente a virus y dicha actividad contribuye a la mutación y evolución del genoma viral (Simmonds, 2020).

5.1. Principales mutaciones del SARS-CoV2

Las principales mutaciones pertenecen a un repertorio de mutaciones recurrentes, la mayoría de las cuales se encuentran en el gen de la proteína espiga (S). Estas mutaciones recurrentes son: D614G, mutación RBD N501Y, mutación RBD E484K, otras mutaciones en RBD, mutaciones NTD, mutaciones próximas al sitio de escisión de furina S1/S2, y mutaciones fuera del gen de la proteína espiga (Tao et al., 2021).

- D614G: está mutación, que es una sustitución de un aspártico por una glicina en la posición 614, apareció a finales de febrero de 2020, y en pocos meses alcanzó una prevalencia global entorno al 100%. Los virus con D614G se replicaron a niveles más altos en las vías respiratorias humanas, además de presentar una mayor transmisión, ya que esta mutación promueve la posición abierta del RBD, favoreciendo la unión al receptor ACE2 (Yurkovetskiy et al., 2020).
- N501Y: Esta mutación conlleva la sustitución de una asparagina por una tirosina en la posición 501. La mutación N501Y aumenta la afinidad para ACE2 y la replicación del virus en las células de las vías respiratorias superiores humanas (Laffeber et al., 2021), pero no afecta a la unión y neutralización de la mayoría de anticuerpos monoclonales (Rees-Spear et al., 2021), ni a la susceptibilidad frente plasma de individuos que han superado el virus o plasma de personas con una de las dosis de las vacunas de ARNm y de subunidad de proteínas autorizadas (Xie et al.,

2021). Esta mutación conlleva la sustitución de una asparragina por una tirosina en la posición 501.

- E484K: esta mutación produce un cambio de glutámico a lisina en la posición 484, lo que produce una pérdida de sensibilidad o susceptibilidad frente a anticuerpos monoclonales, y frente a tratamientos con plasma de personas que han superado el virus y plasma de personas inmunizadas con alguna dosis de las vacunas autorizadas (Tada et al., 2021).
- Otras mutaciones en RBD: en este apartado encontramos, L452R, que reduce la susceptibilidad ha anticuerpos monoclonales y mejora la entrada del virus en células pulmonares, pero en niveles más bajos que los que contienen la mutación N501Y(Deng et al., 2021); K417N/T, aunque parece que disminuye la afinidad por ACE2, reduce la susceptibilidad frente a los anticuerpos monoclonales unas 100 veces, sin embargo, esta susceptibilidad las conserva frente al plasma convaleciente y al plasma de personas inmunizadas(R. E. Chen et al., 2021); y N439K que aumenta la afinidad por ACE2, pero al igual que K17N/T, reduce la sensibilidad frente a los anticuerpos monoclonales y no contra los plasmas (Thomson et al., 2021).
- Mutaciones en NTD: en NTD se dan tanto deleciones como sustituciones de aminoácidos. Las deleciones en las posiciones 69-70 están asociadas con una mayor replicación del virus (Kemp et al., 2021), mientras que aquellas que se dan en las posiciones 141-146 y 242-244, interfieren con la actividad neutralizantes de los anticuerpos (Chi et al., 2020). En cuanto a las mutaciones L18F y D253Y, reducen la sensibilidad frente a anticuerpos neutralizantes de NTD (Grabowski et al., 2021).
- Mutaciones próximas al sitio de escisión de furina S1/S2: estas mutaciones se encuentran justo antes del sitio de escisión de furina, provocando un aumento de carga positiva, que influye en el tropismo del virus aumentando la escisión S1/S2 en las células epiteliales de las vías respiratorias (Johnson et al., 2021).

- Mutaciones fuera de la proteína S: las mutaciones fuera la proteína espiga, suelen aumentar la transmisibilidad del SARS-CoV2 al antagonizar la respuesta del huésped, causando niveles más bajos de interferón (Thorne et al., 2021).

5.2. Variantes del SARS-CoV2

Una variante, es un genoma viral que puede incluir una o más mutaciones, es decir, aquella que presentan cualquier cambio en la secuencia del genoma (Cantón et al., 2021). Una variante del SARS-CoV2, es aquella que posee mutaciones en su genoma y le confieren modificaciones en su fenotipo, diferentes antígenos, cambios en la transmisibilidad o virulencia (Fauver et al., 2020). Desde el punto de vista de la salud pública, las diferentes variantes del SARS-CoV2 se agrupan en tres categorías, dependiendo del análisis de riesgo. Estas categorías son: variantes de interés (VOI), variantes de importancia para la salud pública o variantes de preocupación (VOC) y variantes de alta consecuencia (Cantón et al., 2021).

- Variantes de interés (VOI): se detectan de forma esporádica y posteriormente se han asociado con un aumento de casos. Suelen presentar mutaciones en los receptores de unión, por lo que estos cambios genéticos sugieren, que pueden ser más contagiosas o escapar a la inmunidad conferida por la infección natural o la vacunación.
- Variantes de importancia o preocupación para la salud pública (VOC): suelen ser más contagiosas y generalmente, más virulentas que las VOI, ya que pueden dar lugar a una enfermedad más grave, aumentando las hospitalizaciones y la mortalidad. Pueden reducir la eficacia de los tratamientos y escapar al efecto de los anticuerpos adquiridos tras una infección natural con variantes previas o por vacunación. En este grupo encontramos las variantes Alpha, Beta, Gamma o Delta.

- Variantes de alta consecuencia: son aquellas que provocarían manifestaciones clínicas más graves, e incluiría a variantes asociadas con una pérdida total de la eficacia preventiva de las vacunas y terapias con anticuerpos monoclonales. Ninguna de las variantes del SARS-Cov2 descritas hasta el momento ha sido clasificada en esta categoría.

La primera indicación de aparición de una variante del SARS-CoV2 se dio a principios de 2020. Contenía una mutación D614G y alcanzó una prevalencia de casi el 100% en junio de ese mismo año (Korber et al., 2020). A finales de 2020 y principios de 2021, se informaron de varias variantes con mutaciones que ocurren principalmente, pero no exclusivamente, en la proteína S. En diciembre de 2020 se vio una variante de rápido crecimiento en el Reino Unido. Poco después aparecieron otras dos variantes de rápido crecimiento con un gran número de mutaciones en Sudáfrica y Brasil (Buss, Prete, et al., 2021). Posteriormente, una nueva variante aumentó su prevalencia en la India. Desde entonces todas estas variantes se propagaron ampliamente a varios países. La OMS clasificó a estas variantes como VOC y fueron designadas como Alpha, Beta, Gamma y Delta respectivamente (Tao et al., 2021).

5.2.1. Variante Alpha

La variante Alpha presenta diversas mutaciones en comparación con el virus de Wuhan (considerada la variante original). Dos deleciones, una en la posición 69-70, y otra en la posición 144. También, siete sustituciones de aminoácidos denominadas N501Y, P681H, A540D, D614G, T716I, S982A y D1118H. Estas mutaciones afectan a la estructura de la proteína S favoreciendo su transmisibilidad (Hoffmann et al., 2021). Además, presenta mutaciones fuera de la proteína S, como son las mutaciones que afectan a las secuencias de aminoácidos de la nucleocápside (D3L, R201K y G204R), que también favorecen la transmisión (Thorne et al., 2021).

En cuanto al impacto clínico, esta variante parece estar asociada a un mayor riesgo de mortalidad, y su mayor transmisibilidad está asociada a una mayor carga viral en las vías respiratorias superiores (un 70% más alto) (Kidd et al., 2021). A pesar de ello, sigue siendo sensible a los anticuerpos generados por una infección previa y a los producidos contra la proteína S por las vacunas aprobadas actualmente (Hall et al., 2021).

5.2.2. Variante Beta

La variante Beta apareció entre octubre de 2020 y enero de 2021 en Sudáfrica. Presenta tres mutaciones en el RBD (N501Y, E484K y K417N), y cinco mutaciones en NTD, incluida una deleción en la posición 242-244 (Tegally et al., 2021). Esta variante muestra una susceptibilidad reducida a muchos anticuerpos monoclonales, debido a las mutaciones E484K y K417N, además, al igual que la variante Alpha aumenta su transmisibilidad por la mutación N501Y.

Según recientes estudios, carece de una mayor tasa de infección que la variante Alpha, pero presenta un mayor escape inmunológico a la respuesta inmune adquirida después de la infección natural con otras variantes, y frente a las vacunas (Zhou et al., 2021). Sin embargo, frente al plasma de pacientes agudos y convalecientes infectados y vacunados mantiene la sensibilidad (Madhi et al., 2021).

5.2.3. Variante Gamma

La variante Gamma es la variante con más mutaciones en la proteína S (12 mutaciones), destacando las mutaciones en RBD (N501Y, E483K y K417T), y en NTD (L18F) (McCallum et al., 2021). Otras mutaciones en esta variante se encuentran en ORF1ab, ORF8 y en la proteína N. La variante Gamma muestra una transmisibilidad entre 1,4 y 2,2 veces mayor que otras variantes, y se asocia con un aumento del riesgo de hospitalización y de ingreso en UCI, lo que conlleva un riesgo de mortalidad más elevado (Sabino et al., 2021).

En vista de los últimos estudios, esta variante presenta un impacto moderado en la eficacia de los anticuerpos monoclonales, disminuye moderadamente la eficacia de los anticuerpos generados por una infección previa o por las vacunas actuales, pero debido al gran número de mutaciones, puede verse afectada la función neutralizante de las vacunas, aun que se ha demostrado que la respuesta inmune celular no se ve afectada (Buss, Prete Jr, et al., 2021).

5.2.4. Variante Delta

La variante Delta se describió inicialmente en la India, y se le nombro como doble mutante, ya que presenta 2 mutaciones en la proteína S (E484Q y L452R), aunque posteriormente se vio que presentaba 11 mutaciones. Al igual que las otras variantes, muestra un mayor potencial patogénico y una elevada tasa de transmisibilidad, al verse afectada su afinidad por el receptor ACE2, a causa de la mutación P681R.(Starr et al., 2021).

En referencia a la susceptibilidad frente a los anticuerpos monoclonales, esta se ve reducida, al igual que frente al plasma convaleciente y al plasma de receptores de la vacuna, aunque la efectividad de estas vacunas seguía siendo de entre el 70 -85% (Sheikh et al., 2021).

6. VIAS DE INFECCIÓN EN VERTEBRADOS

Como ya se mencionó anteriormente, la infección por SARS-CoV2, comienza a mediante la interacción del virus con las células huésped, a través de la proteína S del virus y el receptor de la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2). El receptor ACE2 se encuentra expresado principalmente en el aparato respiratorio, tanto en el tracto respiratorio inferior, como en las células epiteliales del tracto respiratorio superior.

El epitelio del tracto respiratorio de vertebrados es el principal punto de entrada para los *Beta-coronaviridae*, entre los que se encuentra el SARS-Cov2 (Astuti & Ysrafil, 2020). El contacto viral inicial tiene lugar en las mucosas del

tracto respiratorio proximal, donde se produce la interacción entre la proteína viral S, y el receptor ACE2, seguido de la escisión de la proteína S por TPRS2 como se describió anteriormente.

En el sistema respiratorio de vertebrados, el epitelio pseudoestratificado que tapiza las vías respiratorias cumple un papel esencial en la defensa frente a patógenos, partículas inhaladas o polución. El sistema respiratorio de vertebrados se divide en dos zonas bien diferenciadas. Por un lado, la región proximal, donde se encuentra la zona conductora, compuesta por los orificios nasales, senos paranasales, laringe y tráquea; por otro lado, la región distal, en la cual la tráquea se divide en dos bronquios que se ramifican en cientos de vías cada vez más pequeñas, dando lugar a los bronquiolos, que tras sucesivas ramificaciones forman los alveolos. La zona conductora, es la encargada de transportar el aire hacia los pulmones, además de filtrar partículas y patógenos en suspensión, calentar y humedecer el aire; mientras que en la región distal o zona de intercambio o respiratoria, tiene lugar el intercambio entre el oxígeno atmosférico y el dióxido de carbono del sistema circulatorio (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017).

Los tipos celulares que están presentes en cada una de las regiones del sistema respiratorio, así como su abundancia, difieren y cumplen diversas funciones específicas, en función de la zona en la cual nos encontremos. La tráquea y los bronquios principales, están tapizados por un epitelio pseudoestratificado, en el que se encuentran presente las tres principales poblaciones mayoritarias nombradas en el párrafo anterior: las células basales, que se encuentran cerca de la lámina basal, son progenitoras del resto de tipos celulares e imprescindibles en el recambio celular y en la respuesta a daño; las células secretoras, encargadas de secretar hacia el lumen de las vías respiratorias una capa mucosa, compuesta por proteínas altamente glicosiladas, y cuya función es atrapar partículas en suspensión; y las células multiciliadas, encargadas de mover esta capa mucosa para su eliminación. En cuanto a la región más distal, los alveolos se encuentran tapizados por dos tipos celulares fundamentalmente, las células alveolares tipo I (AEC I), que recubren entorno al 95% de la superficie pulmonar, y se encargan del intercambio de gases; y las células alveolares tipo II (AEC II), cuya actividad consiste en la secreción de

proteínas que componen el surfactante pulmonar y actuar como progenitoras de las tipo I (Bertalanffy, 1964). (Figura 6).

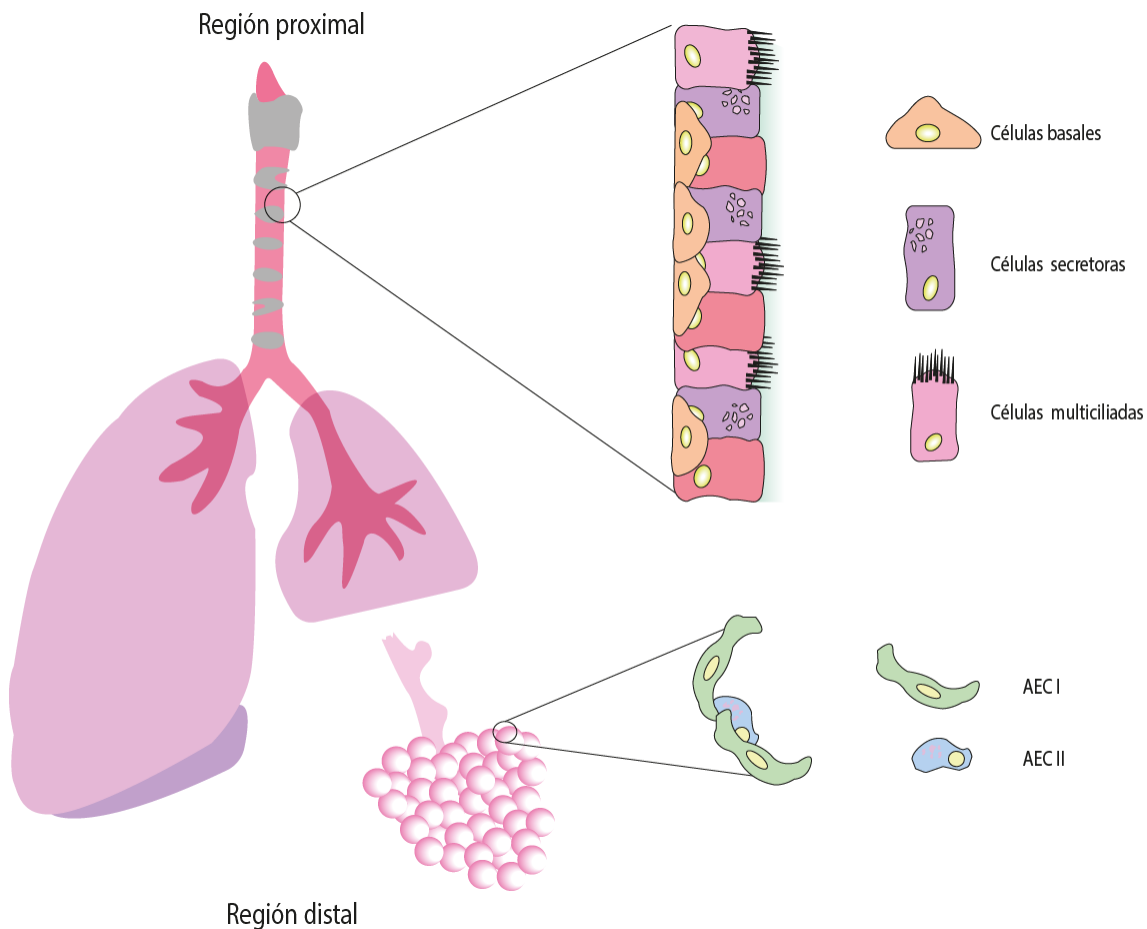


Figura 6: Esquema de las células que componen el epitelio de las vías respiratorias. Se muestran las células que tapizan las vías respiratorias, tanto la región proximal, como la región distal. En esta última en concreto, los sacos alveolares. AEC: Alveolar Epithelial Cells

El tracto respiratorio es el primer punto de entrada para el SARS-CoV2, y es vital identificar que tipos de células son las principales dianas de la infección. En cuanto al tracto respiratorio inferior, presenta una baja expresión de ACE2, sin embargo, las células alveolares de tipo 2 muestran una alta expresión tanto de, ACE2 como de TMPRSS2, por lo que es una principal diana de SARS-CoV2 (Hikmet et al., 2020). Por otro lado, en cuanto al tracto respiratorio inferior, hay estudios que han mostrado que el virus infecta principalmente a las células multiciliadas, y durante la infección a otras células (basales y club) (H. Zhang et al., 2020).

En este trabajo nos centramos en las vías respiratorias superiores, ya que es donde se produce la primera interacción entre el SARS-CoV2 y el sistema respiratorio. Además, hay estudios que ha mostrado que las vías respiratorias superiores son más permisivas al SARS-CoV2 que el tejido alveolar distal (Tindle et al., 2021).

7. RESPUESTA INMUNE FRENTE A SARS-CoV2

Los casos graves de SARS-CoV2 están asociados con una respuesta inmunitaria desregulada, aunque se sabe poco sobre cómo responde el sistema inmunitario al virus. Estudios recientes han mostrado, a través de estudios de perfiles transcripcionales, que en cultivos epiteliales primarios de las vías respiratorias humanas, infectados con SARS-CoV2, predomina una fuerte respuesta de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, entre las que se encuentran interleucina 6 (IL6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y interleucina 8 (CXCL8), además de identificar el factor de transcripción Kappa B (NF- κ B) y al factor de transcripción activador 4 (ATF4) como impulsores clave de esta respuesta de citoquinas proinflamatorias (Vanderheiden et al., 2020a). Sin embargo, observaron una ausencia total de respuesta de interferón (INF) tipo I y III frente a dicha infección. El interferón tipo I es la primera línea de defensa y fundamental para bloquear la replicación temprana del virus, la propagación y el tropismo, así como para promover la respuesta inmune, y el tipo III actúa en barreras anatómicas y células inmunitarias específicas (Lazear et al., 2019)

En vertebrados, la respuesta antiviral por parte del sistema inmune comienza con la respuesta inmune innata, que conlleva la detección de la infección mediante receptores de reconocimientos de patrones (PRRs). Estos receptores identifican moléculas intrínsecas presentes en los patógenos, y estas moléculas intrínsecas se denominan, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Entre los principales receptores conocidos en la actualidad, se encuentran los receptores tipo toll (TLR), que corresponden a proteínas transmembranas con dos dominios, uno extracelular que se une a PAMP, y uno intracelular que dispara las vías o cascadas de señalización (X. Li et al., 2020). Entre los PAMP reconocidos por TLRs se encuentran, lípidos, lipoproteínas,

proteínas y ácidos nucleicos de virus. Este reconocimiento conlleva la activación de varias vías de señalización y de factores de transcripción, como el factor de transcripción Kappa B (NF- κ B), proteína activadora (AP-1), factor de regulación del interferón 3 (IRF3) y factor regulador del interferón 7 (IRF7). NF- κ B y AP-1 activan la expresión de genes que codifican las proteínas necesarias para la inflamación, tales como, factor de necrosis tumoral (TNF), citoquinas (IL-1, IL-6 e IL12 entre otras) y quimioquinas (CCL2 y CXCL8) (Rokni et al., 2020), por otro lado, IRF3 e IRF7 promueven la producción de interferón tipo I (INF-a e INF-b), esenciales frente a respuestas antivirales, debido a sus capacidades para la supresión de la replicación y diseminación viral en etapas tempranas, e inducción de una respuesta inmune adaptativa efectiva (Prompetchara et al., 2020).

En cuanto a la respuesta inmune innata frente al SARS-CoV2, se han observado 1039 genes expresados diferencialmente (DEG), con 458 regulados al alza y 581 regulados a la baja en cultivos epiteliales primarios de las vías respiratorias humanas, infectados por SARS-CoV2 (Zimmerman et al., 2019). NF- κ B regula gran parte de los DEG, con una red de 312 DEG, incluyendo algunos de los genes más regulados al alza, como IL-6 y CXCL8 relacionados con la respuesta proinflamatorias. ATF4, anteriormente nombrado junto con NF- κ B, como impulsores claves para la respuesta inmunitaria frente al SARS-CoV2, presenta una red más reducida de 219 DEG, entre el que destaca CHAC1, un marcador clave de la respuesta de la proteína desplegada (UPR), el cual, es un importante programa celular que se activa para promover la supervivencia celular o la apoptosis durante el estrés del retículo endoplasmático (RE) (Bettigole & Glimcher, 2015). Por consiguiente, estos estudios han mostrado que el SARS-CoV2, desencadena una respuesta proinflamatoria a través de NF- κ B y la respuesta al estrés del retículo endoplasmático mediante ATF4.

Los vínculos directos entre el estrés del retículo endoplasmático y la respuesta inmunitaria son evidentes, debido a que el estrés del RE contribuye de manera considerable a la patogenia de varias enfermedades, incluidas la obesidad, la diabetes, el cáncer, trastornos neurodegenerativos y la enfermedades inflamatorias y autoinmunes, pudiendo aumentar la gravedad de las mismas (So, 2018). Varios estudios indican que el estrés del RE induce

respuestas inflamatorias mediante, la activación de factores de transcripción UPR, como XBP1s, ATF6 y la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP H (CREBH) (Kaser et al., 2008). Por otro lado, el aumento de producción de citoquinas inflamatorias, activan la transcripción de genes relacionados con el estrés del RE, incluidos *Atf4*, *Xbp1s* y *Chop*, entre las cuales, *Chop* juega un papel clave en la apoptosis (Endo et al., 2005).

8. ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El retículo endoplásmico (RE) es un orgánulo, que es responsable del plegamiento, modificación y síntesis de proteínas. El proceso de síntesis y plegamiento de proteínas está altamente controlado y es sensible a la perturbación de la homeostasis del RE. La homeostasis del RE se ve afectada por múltiples procesos fisiológicos y patológicos, perturbaciones asociadas con una síntesis excesiva de proteínas, contenido anormal de calcio, sobrecarga de lípidos, hipoxia, estrés oxidativo, cáncer e infección, entre otros (Kaufman et al., 2002; Marciniak y Ron, 2006; Martins et al., 2016). Esta alteración de la homeostasis se denomina estrés del RE. En consecuencia, se produce una acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas en el RE, lo que desencadena un mecanismo de respuesta para evitar una mayor acumulación de estas, y esta vía de señalización se conoce como respuesta a proteína desplegada (UPR) (Chakrabarti et al., 2011).

La UPR es compleja y funciona a través de tres receptores transmembrana principales del RE: IRE1alfa (enzima 1 α que requiere inositol), PERK (la quinasa RE similar a PKR) y ATF6 (factor de transcripción activador 6 α)(Cao & Kaufman, 2012). La UPR, procesa la acumulación de proteínas desplegadas mediante la regulación negativa de la transcripción de proteínas, y aumenta la eliminación de proteínas mal plegadas o desplegadas, a través de la degradación asociada a RE (ERAD) o degradación lisosomal (Sidrauski & Walter, 1997). Si la adaptación de la célula a través de la UPR no es suficiente para hacer frente al aumento de la carga de proteína desplegadas, se produce la activación de rutas proapoptóticas (Urano et al., 2000). En condiciones de

homeostasis estos tres transductores de señales se unen a la proteína chaperona 78 regulada por glucosa (Grp 78, también conocida como BiP) (Pincus et al., 2010). Tras el estrés del RE, Grp78 se transloca a las proteínas desplegadas o plegadas incorrectamente en el RE y, por lo tanto, permite la activación de los transductores de señales UPR y la posterior señalización de las diferentes rutas (Ron & Walter, 2007).

IRE1 α : es una proteína transmembrana tipo I, que presenta una cola citoplasmática con un dominio serina/treonina quinasa y otro dominio endorribonucleasa (RNasa) (Tirasophon et al., 1998). Al liberarse de BiP, se produce la dimerización de IRE1 α y su activación, y su dominio endorribonucleasa inicia el procesamiento de ARNm que codifica el factor de transcripción XBP1 (proteína de unión a X-box 1) (Shen et al., 2001). XBP1 se transloca al núcleo donde induce la transcripción de una amplia variedad de chaperonas moleculares residentes en el RE y enzimas de plegamiento de proteínas, que juntas aumentan el tamaño y la función del retículo endoplasmático (Hassler et al., 2015). Por otro lado, IRE1 α induce la degradación de los ARNm asociados a la membrana del RE mediante la descomposición regulada dependiente de IRE1 α (RIDD), reduciendo así la cantidad de proteínas que ingresan en la vía secretora (Hollien & Weissman, 2006). Si se da un estrés prolongado del RE, los efectos beneficiosos o de supervivencia de la activación de IRE1 α a través de XBP1 pueden verse obstaculizados, por la dominancia de otras vías como la de PERK (Lin et al., 2007). Además, este estrés crónico o prolongado, aumenta el estado de oligomerización de IRE1 α para sobreactivar sus dominios RNasa citosólicos, conduciendo a la escisión de otros muchos ARNm a parte de XBP1, entre los que se incluyen precursores de micro ARN inhibidores de la apoptosis, promoviendo así la apoptosis (Ghosh et al., 2014; Upton et al., 2012). (Figura 7).

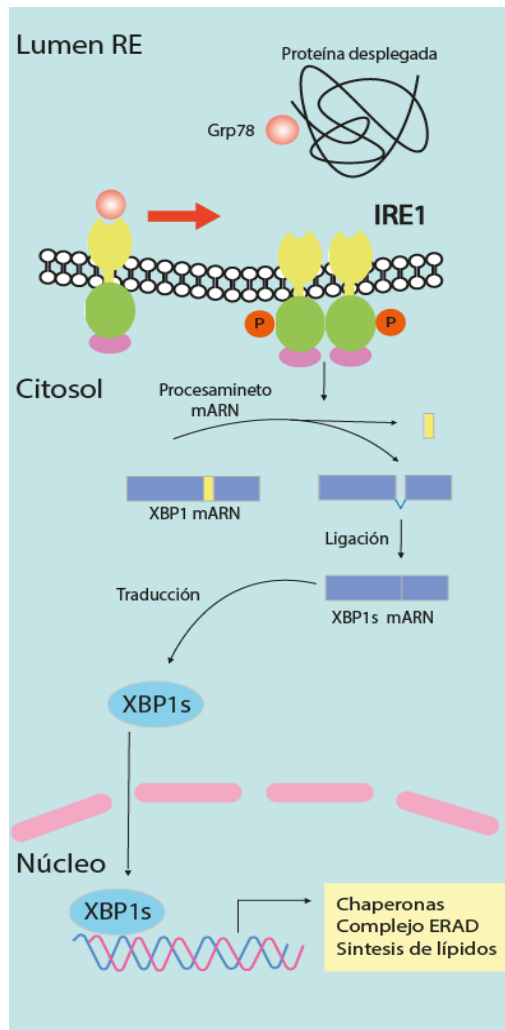


Figura 7: Vía IRE1. IRE1 posee Ser/Thr quinasa y dominio RNasa en la región citoplásmica, y el estrés de RE induce la oligomerización y autofosforilación de IRE1 del dominio quinasa. El dominio RNasa de IRE1 activado realiza empalmes no convencionales y escinde 26 nucleótidos trónicos del ARNm de XBP1 en células de mamífero. Este empalme induce un cambio de marco de traducción, y el ARNm de XBP1 truncado codifica XBP1s, que contiene un nuevo extremo carboxilo. Como factor de transcripción, XBP1s activa genes relacionados con UPR, incluidas las chaperonas RE, los componentes ERAD y las enzimas biosintéticas de lípidos.

ATF6: es una proteína transmembrana de tipo II, que requiere la disociación de BiP antes de que la cascada de señalización pueda activarse (Schröder & Kaufman, 2005). Tras la liberación de BiP la proteína transmembrana ATF6 se transporta al aparato de Golgi, donde es escindida proteolíticamente a través de las proteasas del sitio 1 y el sitio 2 (S1P y S2P) (Ye

et al., 2000). Posteriormente, el amino terminal de ATF6 (nATF6) se transloca al núcleo para unirse al elemento de respuesta a estrés del RE (ERSE), dando lugar a la transcripción de genes que codifican XBP1, componentes de ERAD (degradación asociada a RE) y chaperonas (X. Chen et al., 2010; Yamamoto et al., 2004) que aumentan la capacidad y el plegamiento del RE (Arguello & Hiscott, 2007; Kim et al., 2004). (Figura 8).

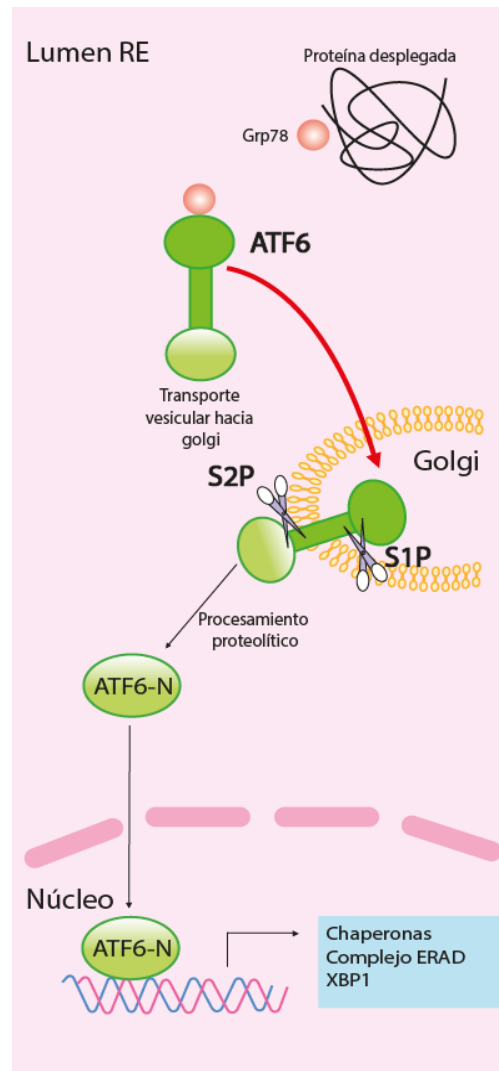


Figura 8: Vía ATF6. ATF6 tiene un dominio bZIP en el citosol y se transloca desde el RE al aparato de Golgi bajo estrés del ER. Luego, las proteasas S1P y S2P escinden ATF6 para producir el extremo amino de ATF6 (ATF6-N), que luego migra al núcleo y regula al alza los genes diana que codifican chaperonas RE, componentes ERAD y XBP1.

PERK: de manera similar a IRE1 α , la disociación de Bip permite la homodimerización y autofosforilación de PERK para su activación. PERK activado fosforila eiF2 α , lo cual inhibe transitoriamente la traducción global de ARNm, y permite a la célula manejar el estrés del RE de manera temporal (Takeuchi et al., 2006). Sin embargo, aunque la traducción de la mayoría de los ARNm se es inhibida en las células estresadas, la traducción de algunos ARNm se ve favorecida en estas condiciones estrés, entre ellos el ARNm que codifica el factor de transcripción activador 4 (ATF4), que es un mediador UPR crucial que activa genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos, resistencia a estrés oxidativo y autofagia (Sadler & Williams, 2008). ATF4 induce la expresión de PPP1R15A, que codifica GADD34, una subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 1 (PP1) que dirige la desfosforilación de eiF2 α para restaurar la traducción de ARNm, ya que un bloqueo sostenido de la traducción no es compatible con la supervivencia celular (Sadler & Williams, 2008). Sin embargo, ATF4 también activa la transcripción de la proteína homóloga C/EBP (CHOP) (Lenschow et al., 2007), implicada en la apoptosis mediada por el estrés del RE. En momentos tempranos después del estrés del RE, varios mecanismos como la expresión de microARN dependiente de PERK, reprimen la transcripción de CHOP a través de la metilación de histonas (Malakhova & Zhang, 2008). A pesar de estos mecanismos, en presencia de un estrés excesivo o crónico del RE, las proteínas ATF4 y CHOP funcionan juntas como un heterodímero para inducir la apoptosis mediante el aumento de la síntesis de proteínas, lo que aumenta el plegamiento incorrecto de las proteínas, el estrés oxidativo y la muerte celular (Chang et al., 2008). (Figura 9)

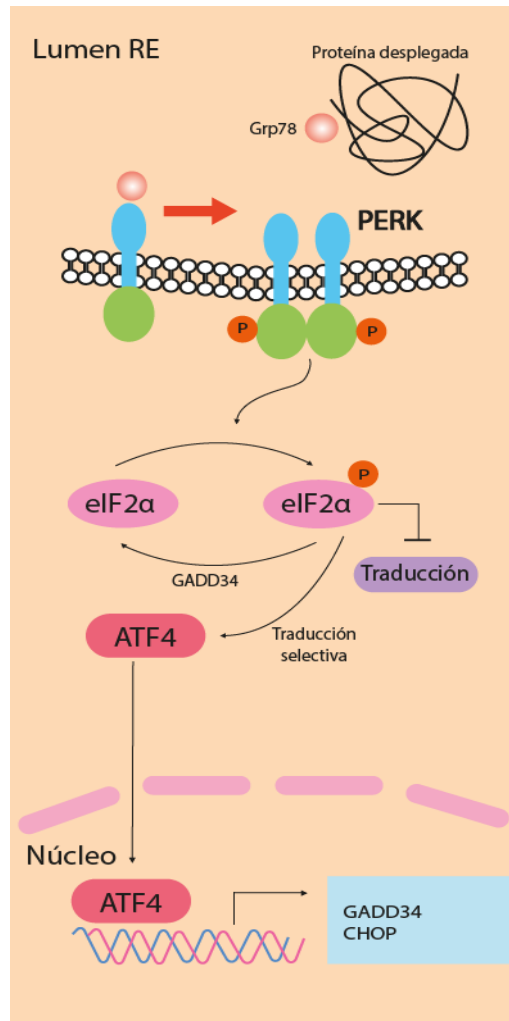


Figura 9: Vía PERK. PERK es una proteína Ser/Thr cinasa que sufre oligomerización y autofosforilación del dominio cinasa en condiciones de estrés del RE. PERK activado fosforila eIF2 α en la serina 51, lo que da como resultado una inhibición general de la traducción de proteínas. Sin embargo, el eIF2 α fosforilado aumenta selectivamente la traducción de ATF4, que regula al alza el ARNm de CHOP y GADD34. Como mecanismo de retroalimentación negativa, GADD34 promueve la desfosforilación de eIF2 α para restaurar la síntesis de proteínas tras la eliminación del estrés de RE. Sin embargo, el hecho de no aliviar el estrés del RE conduce a la apoptosis mediada por CHOP.

Como nombramos anteriormente, el epitelio de las vías respiratorias está tapizado por diferentes tipos celulares, siendo los principales, células basales, células secretoras y células multiciliadas. Mediante un análisis *in silico*, que se realizó en nuestro laboratorio, se observó la expresión de los factores de expresión e interactores, entre los diferentes tipos celulares presentes en el epitelio de las vías respiratorias. Para ello, se utilizaron datos de secuenciación

de RNA de células única (scRNA-seq) del epitelio respiratorio, recogidos en la base de datos *Gene expression Omnibus* (GSE102580) (Plasschaert et al., 2018), identificando factores de transcripción que se expresan en los diferentes tipos celulares anteriormente nombrados. Una vez identificados, se compara la expresión de estos factores de transcripción, junto a sus interactores (obtenidos mediante la herramienta de interacciones proteína-proteína STRING, y se denominan (redes de proteínas), en células basales, secretoras y multiciliadas (Figura 10A)

Entre las proteínas identificadas en este análisis, se encuentran factores de transcripción implicados en diferenciación celular como Foxj1 (Lewis & Stracker, 2021a). También encontramos redes de proteínas centradas en factores de transcripción relacionados con la respuesta inmune innata asociada a interferón como, Irf1, Irf2 e Irf3 (Vanderheiden et al., 2020b). Además, este análisis reveló una red de proteínas centrada en ATF4, que como describimos anteriormente, este factor de transcripción es un impulsor clave en la respuesta inmune frente al SARS-CoV2 (Figura 10).

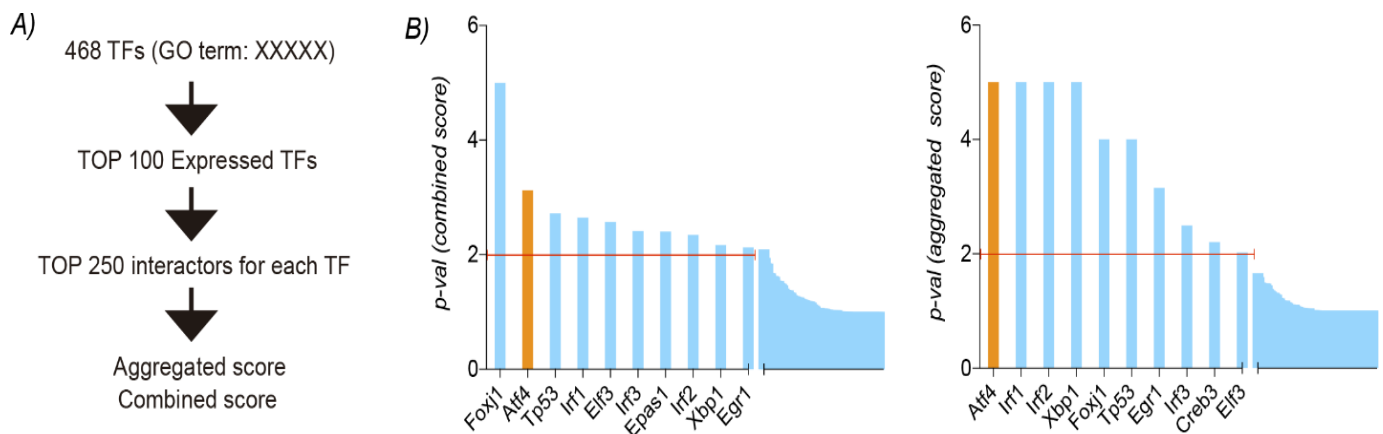


Figura 10: Análisis de los factores de transcripción e interactores que se expresan de forma diferencial en las células de la región distal de la vías respiratorias. (A) Se utilizaron los datos de secuenciación de célula única (GSE102580) y, (B) los interactores fueron identificados mediante la herramienta STRING.

El factor de transcripción activador 4 (ATF4), es una proteína reguladora de la transcripción multifuncional, perteneciente a la superfamilia básica de la cremallera de leucina (bZIP) (Ebert et al., 2022). ATF4 se puede expresar en la mayoría de los tipos celulares en mamíferos, y puede participar en una amplia variedad de respuestas celulares a estreses ambientales específicos, trastornos intracelulares o factores de crecimiento.

Los mamíferos poseen más de 50 proteínas bZIP, incluido ATF4 (Vinson et al., 2002). Las proteínas bZIP, forman factores de transcripción al ensamblarse en complejos homodiméricos o complejos heterodiméricos (Lamb & McKnight, 1991). Estos complejos son capaces de unirse a elementos reguladores de genes específicos, y tanto la dimerización como la unión al DNA están mediadas por los dominios bZIP, que son ligeramente diferentes entre los distintos miembros de la familia bZIP (Ebert et al., 2022). El dominio bZIP se encuentra cerca del extremo terminal COOH, y generalmente constituye una pequeña porción de la proteína total. La porción restante es muy variable entre los miembros de la familia bZIP y es crítica para la regulación y función de la proteína. En ATF4, esta porción variable contiene la mayoría de los sitios conocidos de modificación postraducciona l de ATF4, y media numerosas interacciones con proteínas que regulan la estabilidad, la localización y la capacidad de ATF4 de activar la transcripción de genes (Bagheri-Yarmand et al., 2015; Pakos-Zebrucka et al., 2016a).

Un dominio bZIP consta de una región básica y una cremallera de leucina. La región básica media la unión al DNA, y el par de regiones básicas en un factor de transcripción bZIP (homodimérico o heterodimérico), determinan qué elementos reguladores genéticos pueden ser el objetivo de dicho factor de transcripción. Por otro lado, la cremallera bZIP media la homo o heterodimerización. En concreto, la región de cremallera de leucina de ATF4, es estructuralmente inadecuada para la homodimerización, por lo que no puede dar homodimeros estables (Podust et al., 2001). Sin embargo, es muy susceptible de formar heterodímeros con otros miembros de la familia bZIP. ATF4 puede coexistir con múltiples heterodímeros distintos en un solo tipo celular (Ebert et al., 2020), por lo que la cremallera bZIP ATF4 aporta versatilidad y

multifuncionalidad al permitir la heterodimerización con diferentes miembros de la familia bZIP.

En condiciones de homeostáticas, el ARNm de ATF4 se traduce mal, incluso cuando el ARNm de ATF4 es abundante, sin embargo, la traducción de ATF4 aumenta drásticamente en respuesta a ciertas condiciones de estrés celular, lo que conduce a la formación de los heterodímeros explicados en el párrafo anterior. Las condiciones de estrés celular aumentan principalmente la traducción de ATF4, mediante la activación de las quinasas de la subunidad α del factor 2 de iniciación de la traducción eucariota (eIF2 α). Los mamíferos poseen 4 quinasas eIF2 α : control general no depresible 2 (GCN2), quinasa inhibidora regulada por hemo (HRI), quinasa del retículo endoplasmático similar a RNA de proteína quinasa (PERK) y ARN activado de proteína quinasa (PKR). Los mecanismos por los cuales se activan estas quinasas de eIF2 α incluyen, privación de aminoácidos y radiación ultravioleta (que activan a GCN2); estrés oxidativo, mitocondrial y deficiencia de hemo (activan HRI), estrés del retículo endoplasmático (activa PERK); y la acumulación de ARN de doble cadena en ciertas infecciones virales (que activa la PKR) (Fessler et al., 2020; X. Guo et al., 2020). (Figura 11)

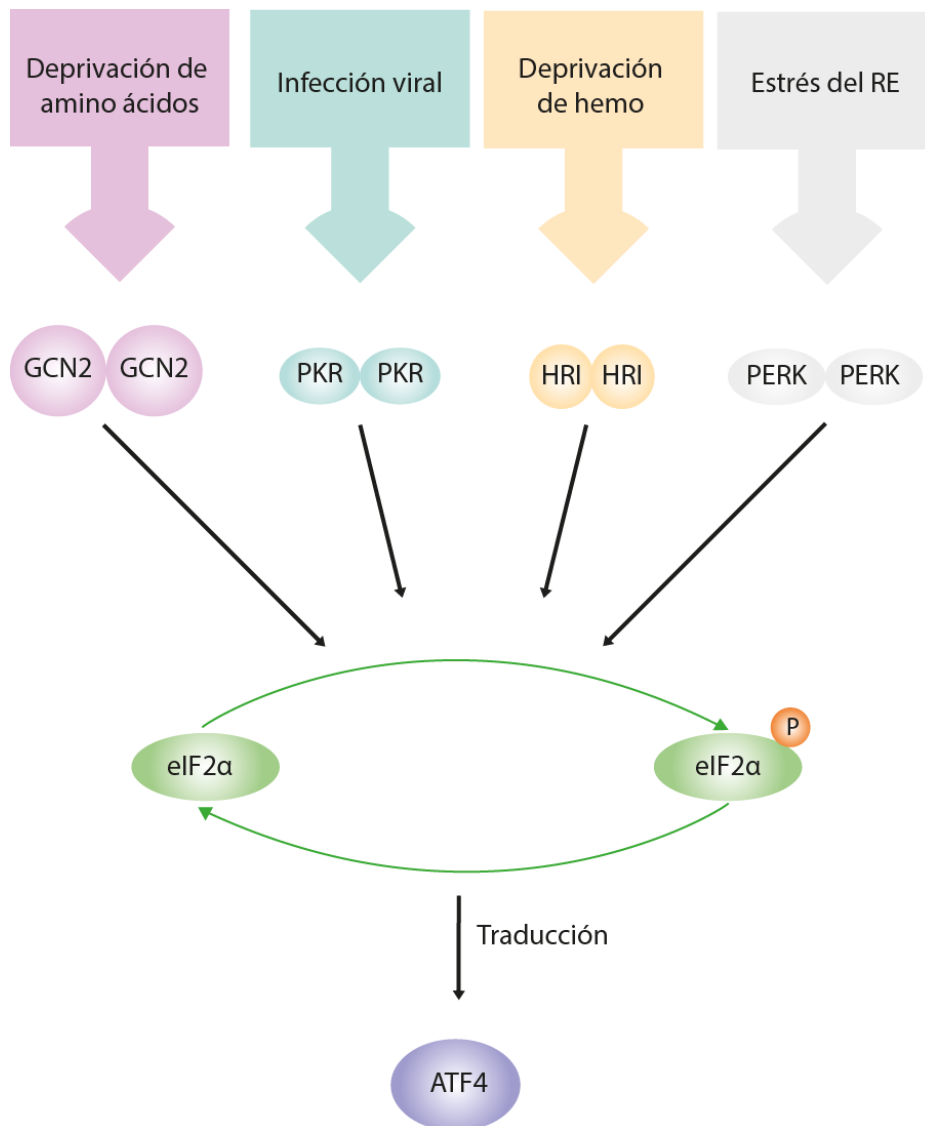


Figura 11: Quinasas de eIF2 α . El estrés de ER, la infección viral y otras señales de estrés celular activan las quinasas PERK, PKR, HRI y GCN2 que convergen en la fosforilación de eIF2 α . Esto conduce a la atenuación global de la traducción, mientras que a su vez, inicia la traducción preferencial de ARNm específicos, como ATF4. ATF4 forma heterodímeros que se unen a objetivos de ADN para controlar la expresión de genes implicados en la adaptación celular.

Las quinasas eIF2 α aumentan la traducción del RNAm de ATF4, fosforilando el factor de iniciación de la traducción eIF2 α (Pakos-Zebrucka et al., 2016a; Wek, 2018). Cuando eIF2 α es fosforilado, inhibe la actividad del factor de iniciación de la traducción eucariota 2 β (eIF2 β), cuya actividad se requiere para altos niveles de síntesis de proteínas (Wek et al., 2006). Por otro lado, la

inhibición de eIF2 β aumenta la traducción del RNAm de ATF4, pero disminuye la traducción simultáneamente de casi todos los demás RNAm celulares (Gordon et al., 2013). En este contexto, los heterodímeros ATF4 recién generados activan genes de respuesta al estrés que codifican, entre otras cosas, transportadores de aminoácidos, aminoacil-tRNA sintetasas, enzimas para la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, proteínas de choque térmico y otras chaperonas moleculares, enzimas que alivian la oxidación. estrés, proteínas que inhiben el crecimiento y la división celular, y miembros adicionales de la familia bZIP que pueden heterodimerizarse con ATF4 y amplificar la respuesta al estrés. Al activar este tipo de genes, los heterodímeros ATF4 ayudan a la célula a intentar sobrevivir y corregir el estrés celular provocado (Ebert et al., 2022).

OBJETIVOS CAPÍTULO I

OBJETIVOS CAPÍTULO I

Las principales herramientas para el control de esta pandemia, fueron la detección temprana de la infección, para evitar o controlar así su propagación y la generación de terapias para la eliminación de la infección, o alivio de los efectos de esta. Sin embargo, el virus SARS-CoV-2 ha cambiado constantemente a lo largo del tiempo mediante mutaciones, lo que ha dado lugar a nuevas variantes. Varias variantes del SARS CoV-2 han surgido y se han extendido globalmente debido a una mayor transmisibilidad, gravedad de la enfermedad, y una efectividad terapéutica reducida.

Dada la importancia de la detección de dichas variantes en el menor tiempo posible, en este capítulo **planteamos el desarrollo de un kit de RT-qPCR en un solo paso, para la detección de las diferentes variantes del SARS-CoV2**, a la vez que se detecta su presencia o ausencia en el paciente, y así mejorar el aislamiento del individuo y evitar su propagación. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Diseño de la estrategia para el Kit de RT-qPCR.
2. Discriminación de las diferentes variantes.
3. Puesta a punto del Kit de RT-qPCR.
4. Comprobación del Kit de RT-qPCR con muestras de aguas residuales.

RESULTADOS CAPÍTULO I

RESULTADOS CAPÍTULO I

Como se describe en la introducción, los genomas de virus en general, son propensos a sufrir mutaciones rápidas que les permiten evadir la inmunidad del huésped, aumentar la transmisibilidad, y reducir la protección ofrecida por las actuales vacunas (Simmonds, 2020). El virus SARS-CoV2, al igual que el resto de virus presenta estas características, y por ello, es imprescindible un seguimiento preciso de la incidencia de las principales variantes del SARS-CoV2 en la población, entre las que se encuentran, la variante Alpha, la variante Beta y la variante Delta.

La aparición de estas variantes se produjo entre, finales de 2020 y principios de 2021. La primera variante del SARS-CoV2 apareció en China a finales del 2019, y no fue hasta septiembre del 2020 cuando se produjo la aparición de más variantes, siendo la primera la Alpha, seguida de la Beta y la Gamma (Buss, Prete Jr, et al., 2021), y ya en 2021 se detectó la presencia de otras, como la Delta , Kappa y Omicron (Figura RI.1). En ese momento, el cribado se realizaba con un reducido muestreo de la población positiva para SARS-CoV2, mediante secuenciación, lo que hacía este procedimiento de escaso valor estadístico, lento y económicamente costoso. En España se reflejaba, en un bajo reporte de estas variantes por las diferentes comunidades autónomas, llegando a ser nulo en el caso de Extremadura. En base a estos datos e información, en este capítulo nos propusimos desarrollar un método alternativo, que permitiera mejorar y avanzar en el análisis del impacto de estas variantes en la población. Para ello, se realiza el diseño de un kit de RT-qPCR para la detección y diagnóstico in vitro de las variantes, Alpha, Delta, Gamma y el SARS-CoV2 original, ya que en ese momento (finales de 2020, principios de 2021) aún no habían aparecido más variantes.

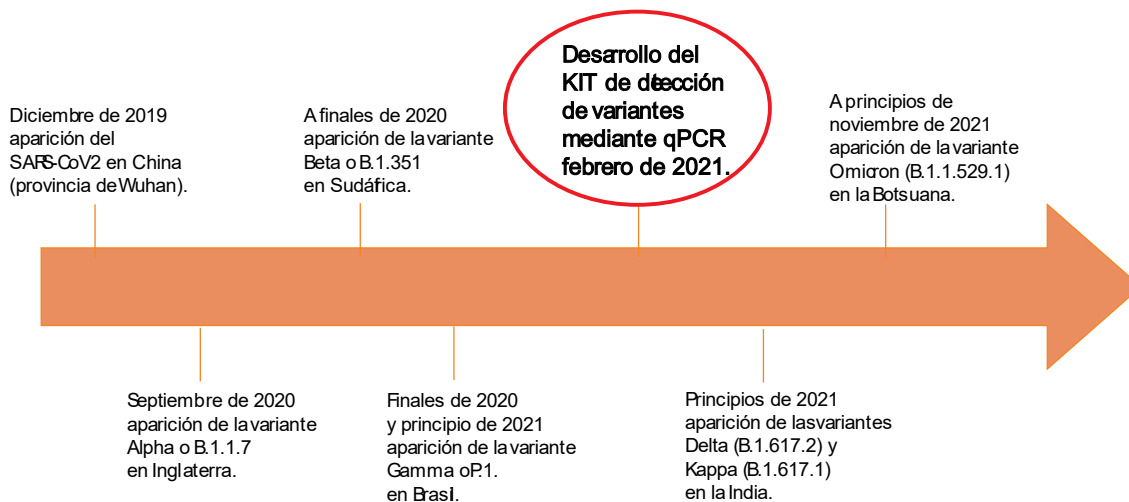


Figura RI.1: Cronograma de las variantes del SARS-CoV2. Representación temporal de la aparición de las diferentes variantes del SARS-CoV2, desde la detección de la primera variante en China posicionada en la parte izquierda, indicando el momento del desarrollo del Kit rodeado en rojo, hasta la aparición de la variante Omicron.

1. Hipótesis del funcionamiento del Kit de detección de variantes del SARS-Cov2.

En base a los conocimientos descritos hasta ese momento, tanto de pruebas de detección, como de las mutaciones presentes en las diferentes variantes, se realizó el diseño de diferentes cebadores que contienen las diversas mutaciones de dichas variantes. Mediante el empleo de la técnica de detección de RT-qPCR, se identificaron directamente tanto la presencia del SARS-CoV2 en caso de que estuviese, como de la variante presente en la muestra.

Estas variantes se identificaron a través del análisis del ciclo umbral (Ct), ciclo en el cual, la señal fluorescente representa un incremento estadísticamente significativo respecto al basal y se produce siempre y cuando el material genético del virus esté presente en la muestra analizada. Además, este Ct depende de la especificidad y eficiencia en la hibridación entre el cebador y el material genético del virus, y de la cantidad de RNA vírico. Mientras mayor sea la

especificidad y eficiencia de los cebadores en cuanto a la hibridación, menor será el Ct. Como se observa el primer cebador, hibrida completamente con la cadena molde, y presenta su ciclo umbral (Ct) en el ciclo 12, mientras que el último cebador, el cual no hibrida en la última base, presenta el ciclo umbral en el ciclo 28 (Figura Rl. 2), con lo que, analizando los valores de los Cts, podemos detectar la presencia del virus e identificar la variante presente en la muestra.

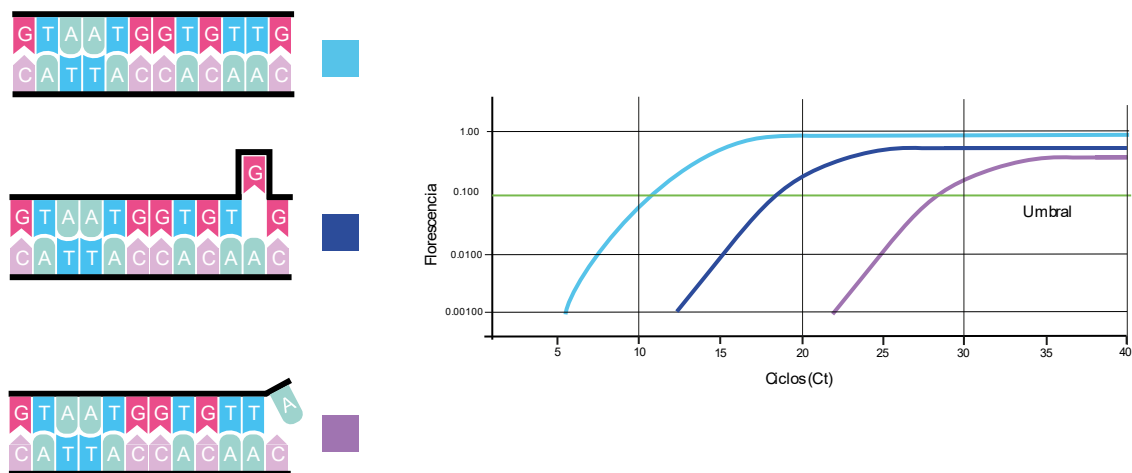


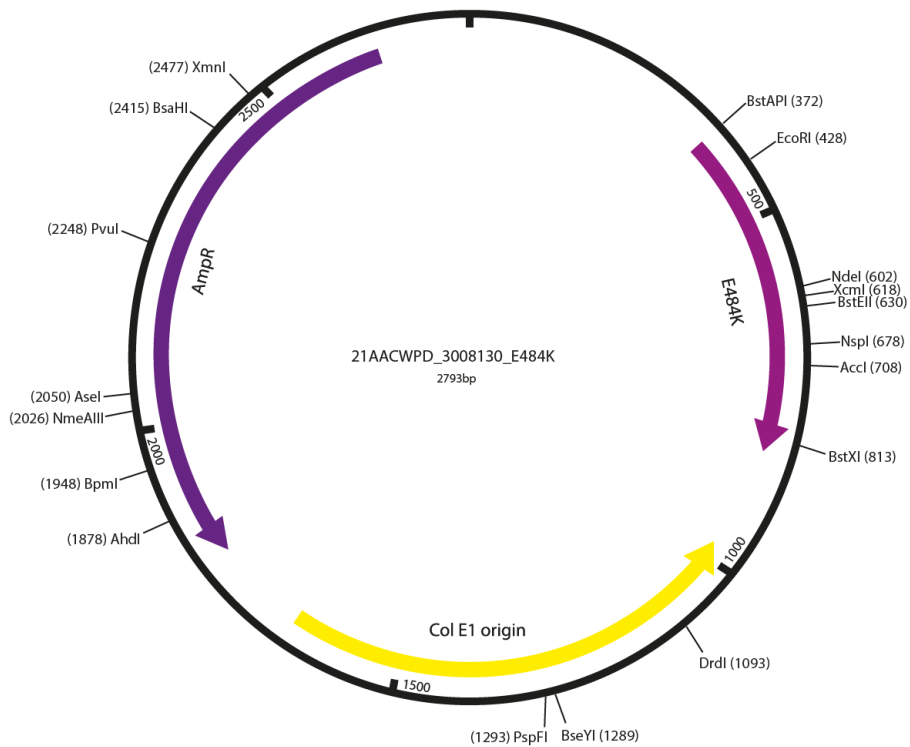
Figura R.I. 2: Representación de la relación entre la especificidad de la hibridación y los Cts. Representación de la especificidad de la hibridación de los cebadores en la parte izquierda de la figura, y la gráfica con la representación de los Cts obtenidos por cada uno de los cebadores a la derecha.

2. Estrategia para el diseño del KIT de RT-Qpcr

Para el diseño del Kit de RT-qPCR para el diagnóstico in vitro de las diferentes variantes anteriormente nombradas, se tomó como referencia la proteína *Spike*. En concreto, las mutaciones de esta proteína presentes en las diferentes variantes. La variante Alpha, muestra la mutación N501Y, ocasionada por un cambio de nucleótidos, adenina (A) por timina (T), en la posición 1501; la variante Gamma contiene la mutación E484K, lo que conlleva un cambio de guanina (G) por adenina (A) en la posición 1450; y en cuanto a la variante Beta, presenta ambas mutaciones de forma simultánea.

En base a estos datos, y las dificultades técnicas que supone trabajar con virus viables del SARS-CoV2, se utilizó una secuencia sintética del gen que codifica para la proteína S de la cepa original surgida en Wuham, y se realizó el diseño de dos construcciones que presentan, una la mutación E484K (Figura RI. 3, panel A), y la otra, la mutación N501Y (Figura RI. 3, panel B), y para ello usamos el plásmido pUC119.

A



B

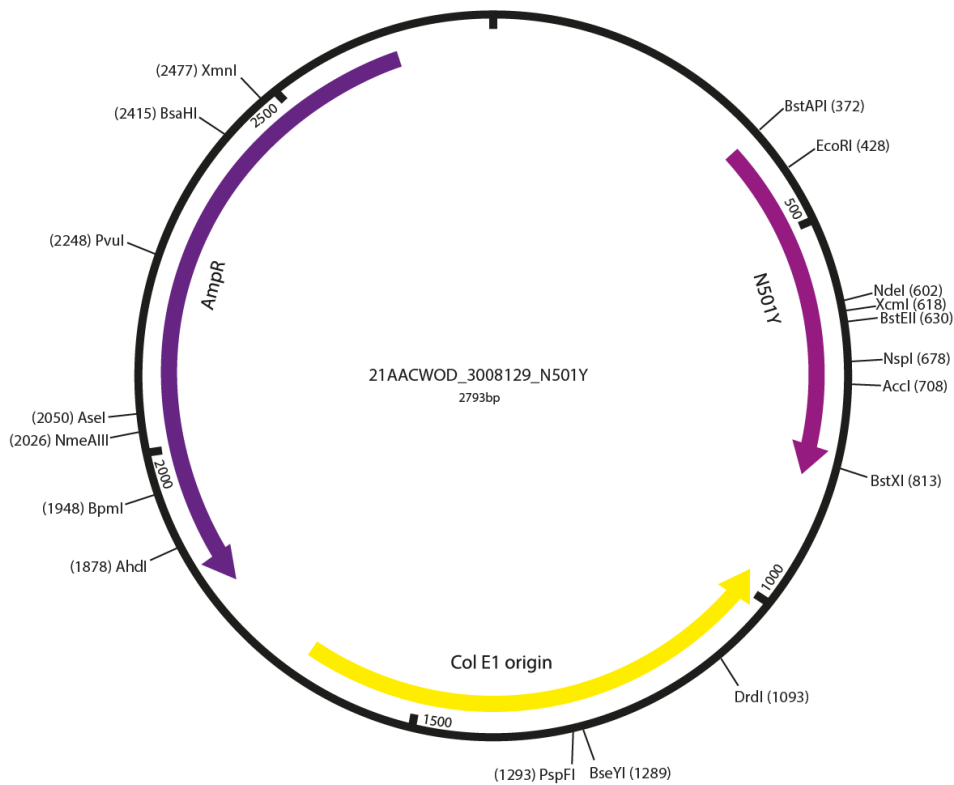


Figura RI. 3: Esquema de la secuencia sintética que codifica para la proteína *Spike*. A) Plásmido pUC119, con la secuencia que codifica la proteína *Spike*, con la mutación E484K, B) Plásmido pUC119, con la secuencia que codifica la proteína *Spike*, con la mutación N501Y.

Por otro lado, se diseñaron los cebadores específicos para cada mutación. Se diseñó un cebador *Reverse* común, y cuatro cebadores *Forwards* para cada mutación, dentro de los cuales, uno presenta la secuencia de la variante original de Wuhan, es decir, no presenta la mutación en la posición requerida, y otros 3 que presentan esa mutación en diferentes posiciones dentro del cebador, en la posición -1, -2 y -3 del extremo 3' y se denominan versión 1, 2 y 3, respectivamente (Figura RI. 4, paneles A y B). Dependiendo de que cebador *Forwards* se una al material genético del virus, si este se encuentra presente en la muestra, se identifica, tanto la presencia como la variante vírica del SARS-CoV2.

A



Cebadores Forwards:

- WT para E484K-F: GGTAGCACACCTTGAATGGTGTG
- E484K_Versión2_F: GTAGCACACCTTGAATGGTGTAA
- E484K_Versión1_F: GGTAGCACACCTTGAATGGTGTAA
- E484K_Versión3_F: TAGCACACCTTGAATGGTGTAA
- Reverse_común_R: CATTGAAGTTGAAATTGACACATTTGTTTTAACC

B



Cebadores Forwards:

- WT para N501Y-F: CTTTACAATCATATGTTTCCAACCCACTA
- N501Y_Versión2_F: TTTACAATCATATGTTTCCAACCCACTTA
- N501Y_Versión1_F: CTTTACAATCATATGTTTCCAACCCACTT
- N501Y_Versión3_F: TTACAATCATATGTTTCCAACCCACTTAT
- Reverse_común_R: CATTGAAGTTGAAATTGACACATTTGTTTTAACC

Figura RI. 4: Diseño de los cebadores para el desarrollo del Kit. A) Cuatro cebadores *Forwards* uno de ellos para la secuencia sin mutar, y otros tres con la mutación E484K en diferentes posiciones dentro del cebador, B) Cuatro cebadores *Forwards*, al igual que el anterior, uno de ellos para la secuencia sin mutar, y otros tres con la mutación N501Y en diferentes posiciones dentro del cebador. Un cebador *Reverse* común para todos los cebadores.

3. Comprobación del Kit de detección de variantes.

Una vez diseñadas las herramientas necesarias, se procedió a la comprobación de la hipótesis y puesta a punto del Kit. En primer lugar, se realizó la selección de las parejas de cebadores, tomando aquellas que presenten una mayor afinidad por el plásmido que posea la mutación para la cual han sido diseñados, y una menor afinidad frente a la construcción que no presenta dicha mutación. Para mejorar esta afinidad y fidelidad de las parejas de cebadores elegidas, también se seleccionó la temperatura óptima a la que realizar el proceso de qPCR. Y por último se comprobó el límite de sensibilidad de este Kit mediante diluciones de la secuencia molde.

3.1. Selección de las parejas de cebadores para RT-qPCR, en función de la posición del nucleótido mutado.

Para determinar las parejas de cebadores que mejor funcionan en esta discriminación o distinción de variantes, se llevó a cabo la realización de una qPCR, utilizando como DNA molde, las dos construcciones anteriormente nombradas, debido a, como se indicó anteriormente, la imposibilidad de trabajar con el genoma del virus real. Cada construcción o plásmido, actúa como versión sin mutar de la otra, es decir, la construcción con la mutación E484K, es la versión Wuhan u original de la mutación N501Y, y viceversa.

Como muestran los gráficos de las curvas de amplificación de los paneles A-D en la figura RI.5, las parejas de cebadores frente a la mutación E484K, no presentan diferencias respecto a la afinidad por la construcción que presenta la mutación E484K. Sin embargo, si hay una diferencia significativa, con respecto a la unión inespecífica, producida por las diferentes parejas frente a la construcción que no presenta dicha mutación, la construcción N501Y, la cual actúa como variante Wuhan en este caso. Como se puede observar en el panel B de la figura RI. 5, la pareja que presenta una menor unión inespecífica es la pareja de cebadores versión 1, que presenta la mutación en el último oligonucleótido, mientras que la versión 3 (figura RI. 5, panel D), es la pareja que

mayor inespecificidad presenta. Por ello, la pareja de cebadores elegida para el Kit es la “versión 1”.

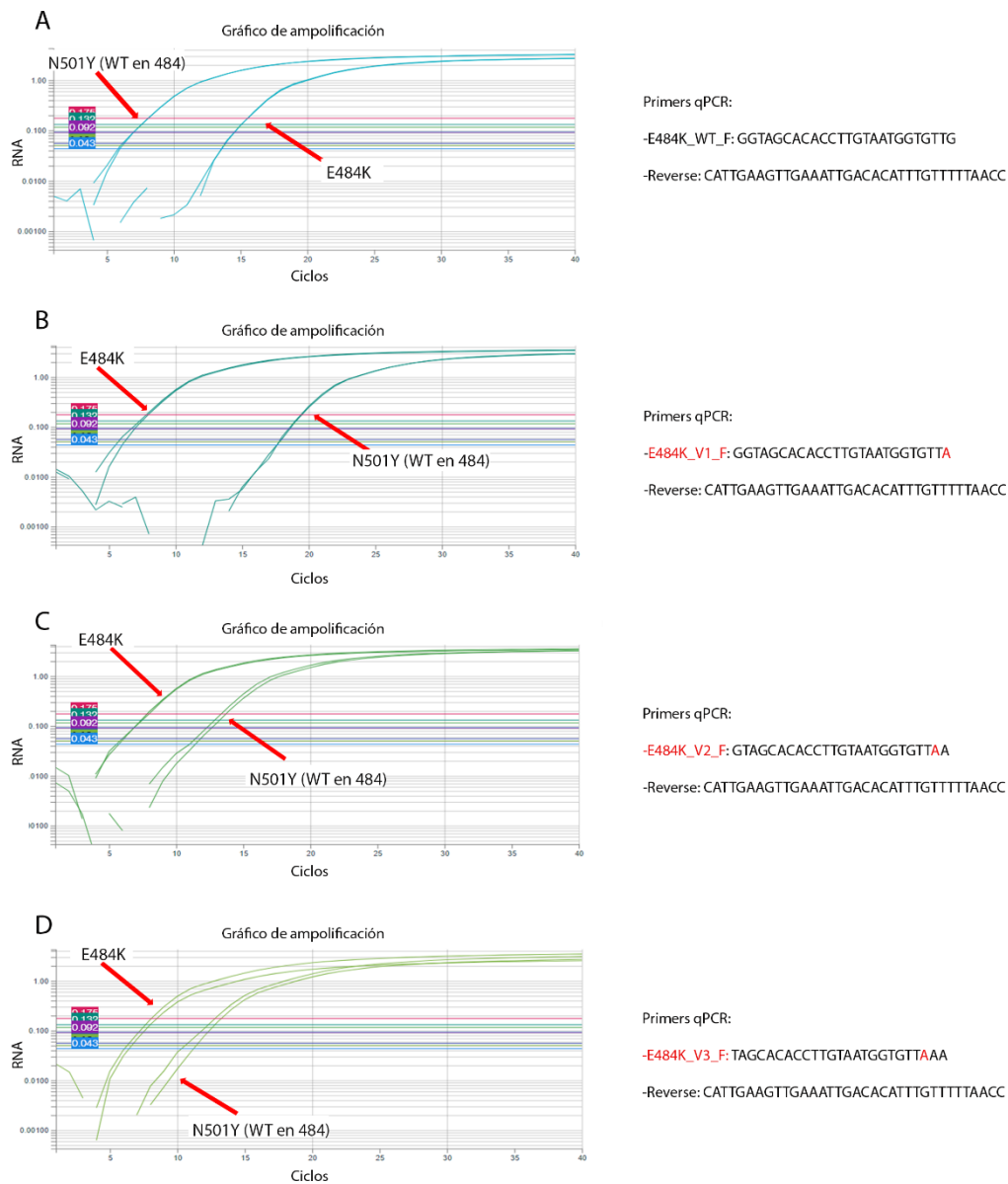


Figura RI. 5: Análisis de las curvas de amplificación de los cebadores frente a la mutación E484K. Mediante la realización de qPCR, se realiza la selección de la pareja de cebadores más óptimas para el Kit RT_qPCR. A) Versión Wt, B) Versión 1, con la mutación en la última posición, C) versión 2, que presenta la mutación en la posición -1 indicada en rojo y D) versión 3, con la mutación en la posición -2. A la derecha se presenta las curvas de amplificación y a la izquierda la secuencia de los cebadores utilizados.

En cuanto a los resultados que se observan referentes a las parejas de cebadores para la mutación N501Y (Figura RI. 6, paneles A-D), siguen el mismo

patrón visto en la figura RI.5, en cuanto a la afinidad por la construcción que presenta la mutación N501Y. Sin embargo, la unión inespecífica con la construcción control, es mayor por parte de los cebadores versión 2 y 3 (Figura RI.6, paneles C y D), llegando este último, a no mostrar una discriminación entre las dos construcciones, por lo que al igual que con los cebadores de E484K, nos quedamos con la versión 1 (panel B) de los cebadores para la mutación N501Y.

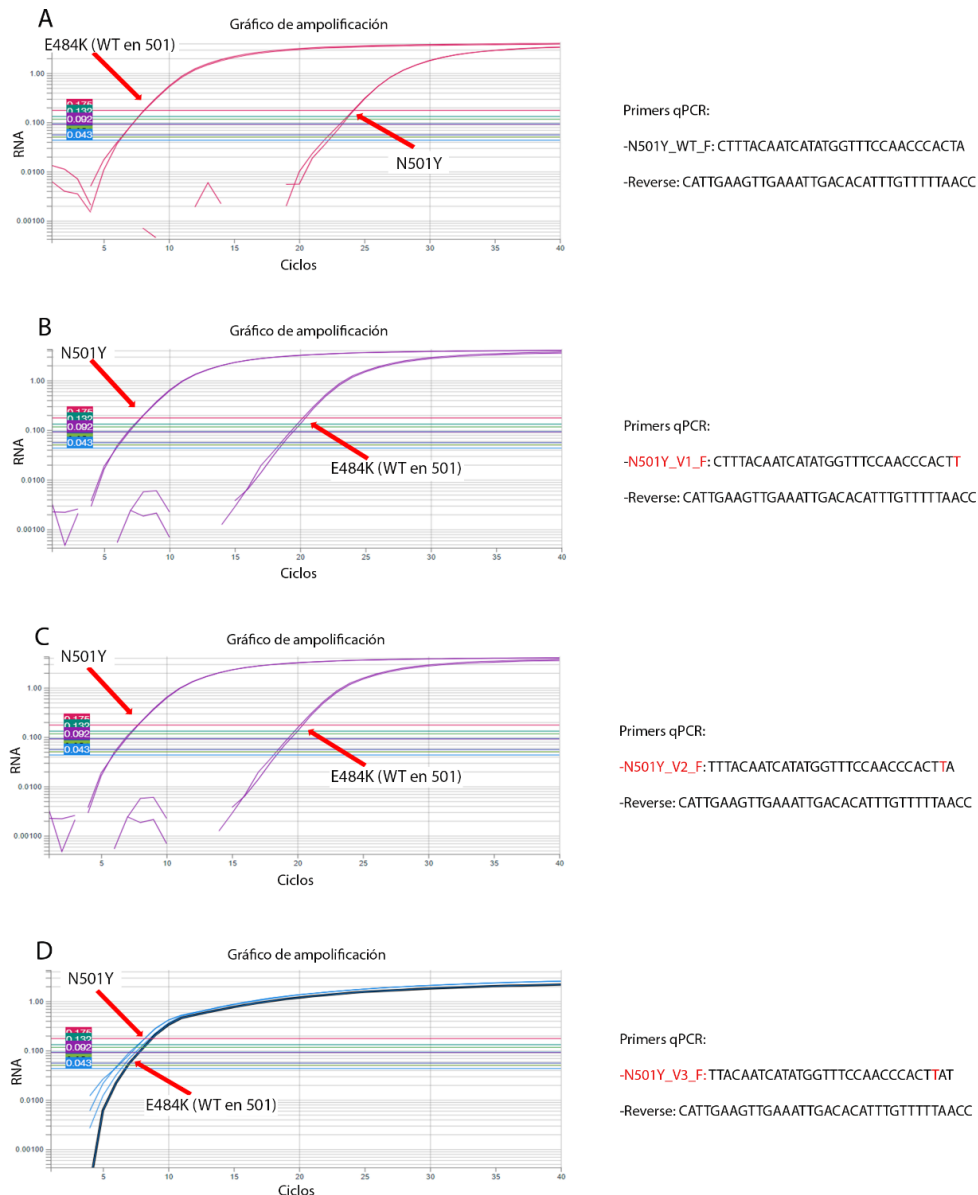


Figura RI. 6: Análisis de las curvas de amplificación de los cebadores frente a la mutación N501Y. Mediante la realización de qPCR, se realiza la selección de la pareja de cebadores más óptimas para el Kit RT_qPCR. A) Versión Wt, B) Versión 1, con la mutación en la última posición, C) versión 2, que presenta la mutación en la posición -1 indicada en rojo y D) versión 3, con la

mutación en la posición -2. A la derecha se presenta las curvas de amplificación y a la izquierda la secuencia de los cebadores utilizados.

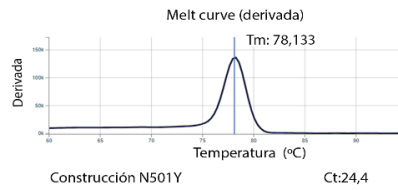
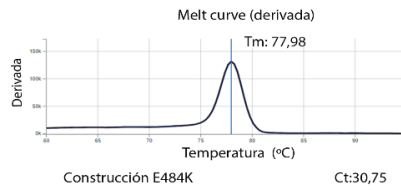
Además de comprobar la afinidad y especificidad de la unión de las parejas de cebadores a las diferentes construcciones, comprobamos las “*Melt Curve*” o curvas de disociación. Este análisis se basa en un aumento gradual de la temperatura en el termociclador, que va desde los 55°C hasta los 95°C. Conforme la temperatura va aumentando, el ADN bicatenario se va desnaturalizando, la doble cadena se separa y la fluorescencia va disminuyendo. Con estos datos se realiza las gráficas de nivel de fluorescencia y temperatura, obteniendo las curvas de *melting*, que muestran los productos que se han obtenido durante la qPCR. A partir de las curvas de *melting* se realiza su derivada, obteniendo las gráficas de las que se espera un solo pico o curva, asegurando que solamente se obtiene un único producto. En los resultados obtenido, se observó que las parejas de cebadores, tanto las parejas de cebadores control para ambas mutaciones (Figura RI. 7, paneles A y C), como las parejas de cebadores que identifican las variantes (Figura RI. 7, paneles B y D), mostraron un único pico o curva, lo que indica la amplificación de un único producto, por lo cual, siguieron siendo parejas de cebadores optimas para el Kit de RT-qPCR.

A

Primers qPCR:

-E484K_WT_F: GGTAGCACACCTTGTAAATGGTGTG

-Reverse: CATTGAAGTTGAAATTGACACATTTGTTTTAACC

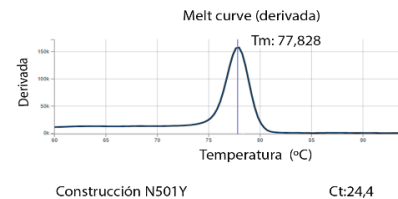
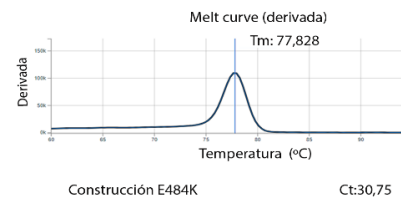


B

Primers qPCR:

-E484K_V1_F: GGTAGCACACCTTGTAAATGGTGTTA

-Reverse: CATTGAAGTTGAAATTGACACATTTGTTTTAACC

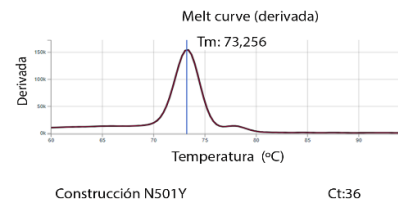
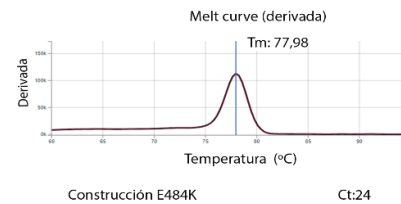


C

Primers qPCR:

-N501Y_WT_F: CTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTA

-Reverse: CATTGAAGTTGAAATTGACACATTTGTTTTAACC



D

Primers qPCR:

-N501Y_V1_F: CTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTT

-Reverse: CATTGAAGTTGAAATTGACACATTTGTTTTAACC

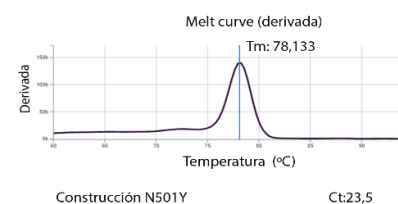
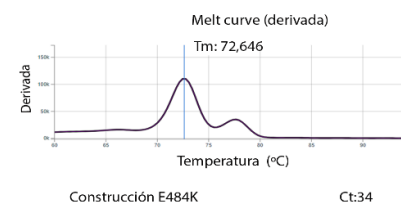


Figura RI. 7: Estudio de las *Melt Curve* de las parejas de cebadores seleccionadas para cada mutación. Análisis de las curvas de disociación de las parejas de cebadores para las mutaciones y sus controles. A) Pareja de cebadores control de la mutación E484K. B) Pareja de cebadores para la mutación E484K. C) Pareja de cebadores control para la mutación N501Y. D) Pareja de cebadores para la mutación N501Y.

3.2. Selección de las parejas de cebadores para RT-qPCR, en función de la temperatura de anillamiento.

Tras comprobar tanto las curvas de amplificación como las curvas de disociación, y elegir las parejas de primer óptimas para nuestro Kit, se continuó la puesta a punto probando en este caso, diferentes temperaturas de anillamiento para aumentar y mejorar la especificidad de los mismo. Las temperaturas de anillamiento que fueron elegidas son 60°C, 62°C y 64°C. En los resultados obtenidos, como se muestra en la Figura RI. 8, no se observan grandes diferencias entre las distintas temperaturas de anillamiento impuestas en las diferentes qPCRs, presentando una amplia distancia en cuanto al ciclo umbral (Ct) entre la unión específica e inespecífica, por consiguiente, se decidió tomar la temperatura intermedia como la idónea para el Kit de detección de RT-qPCR. En los paneles A y B, se muestran los resultados obtenidos por las parejas de cebadores control frente a la mutación E484K (A) y frente a la mutación E484K (B). Con respecto a los paneles C y D, es igual, pero frente a la mutación N501Y.

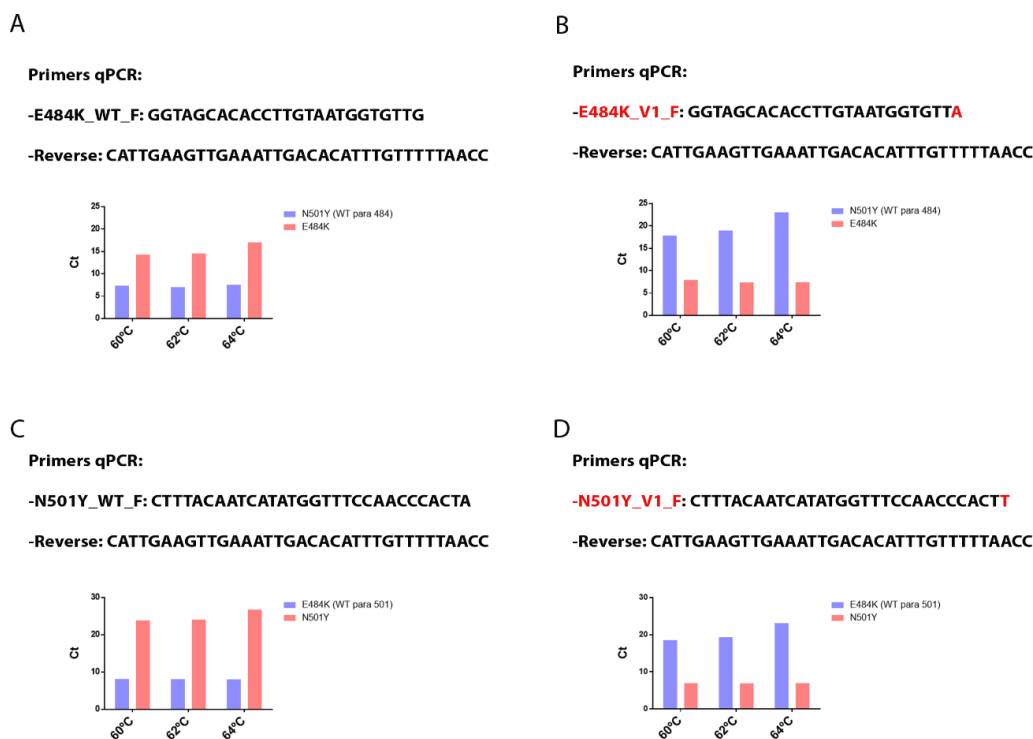


Figura RI. 8: Elección de la temperatura óptima de anillamiento de los cebadores. Análisis de las diferentes temperaturas de anillamiento (60°C, 62°C y 64°C) para las diferentes parejas de

cebadores. La pareja control de mutación E484K (A), la pareja de cebadores para la mutación E484K (B), La pareja control de mutación N501Y (C), la pareja de cebadores para la mutación E484K (D).

3.3. Determinación del límite de detección del Kit RT-qPCR.

Una vez seleccionadas las pajeras de cebadores tanto por su especificidad en cuanto a la unión, como por la generación de un solo producto y la temperatura de anillamiento, se continuó comprobando la sensibilidad que presenta el Kit de detección de variantes, debido a la gran importancia de la detección del SARS-CoV2 en los primeros momentos de la infección, para disminuir sus posibilidades de propagación. Para ello se realizó un proceso de diluciones seriadas, variando la cantidad de DNA molde de cada construcción. La ventana de estas cantidades va de 2ng a 0,2fg de DNA molde, usando un control, que en este caso es agua. Con esto consiguió detectar el límite, en el cuál, se puede seguir diferenciando las distintas variantes, además de ver cómo van variando las Cts con las diferentes cantidades, como se muestra en (Tabla RI. 1).

Tabla RI. 1: Cantidades de DNA molde, frente a los Cts en los cuales, son detectadas estas cantidades por parte de las diferentes parejas de cebadores

	Ct	Ct	Ct	Ct
2ng	Wt 501	Mut 501	Wt 484	Mut 484
MUT 501	24,115	6,876	7,05	18,99
MUT 484	8,1	19,4	14,56	7,4
0,2ng	Wt 501	Mut 501	Wt 484	Mut 484
MUT 501	25,214	9,092	9,52	20,377
MUT 434	10,866	21,25	16,911	9,98
0,02ng	Wt 501	Mut 501	Wt 484	Mut 484
MUT 501	28,42	12,55	12,69	23,5
MUT 434	13,31	23,54	19,137	12,408
2pg	Wt 501	Mut 501	Wt 484	Mut 484
MUT 501	31,38	15,695	16,257	26,845
MUT 434	17,04	26,966	22,805	16,58
0,2pg	Wt 501	Mut 501	Wt 484	Mut 484
MUT 501	33,71	18,717	18,655	29,933
MUT 434	20,525	26,966	22,805	16,58
0,02pg	Wt 501	Mut 501	Wt 484	Mut 484
MUT 501	34,71	22,42	22,91	34,265
MUT 434	23,525	32,14	29,084	22,699
2fg	Wt 501	Mut 501	Wt 484	Mut 484
MUT 501	35,64	26,445	26,36	38,94
MUT 434	27,145	33,05	32,045	26,12
0,2fg	Wt 501	Mut 501	Wt 484	Mut 484
MUT 501	35,666	30,83	30,791	-
MUT 434	31,522	35,335	37,99	32,7
0 g	Wt 501	Mut 501	Wt 484	Mut 484
H2O	36,54	37,185	34,405	-

- Cantidad de DNA
- Hibridación Completa
- Hibridación no Completa
- Amplificación inespecífica
- Ciclo umbral

Además, estos resultados obtenidos con las diluciones seriadas permiten calcular el número mínimo de copias necesarias, para la detección y diferenciación de variantes, ya que la representación gráfica es lineal, y nos permitiría detectar la cantidad exacta según el ciclo umbral (Ct), y por consiguiente poder calcular en número de copias presente en la muestra (Figura RI. 9) ya que un $1\mu\text{g}$ de N501/E484K= $3'49 \times 10^{11}$ moléculas.

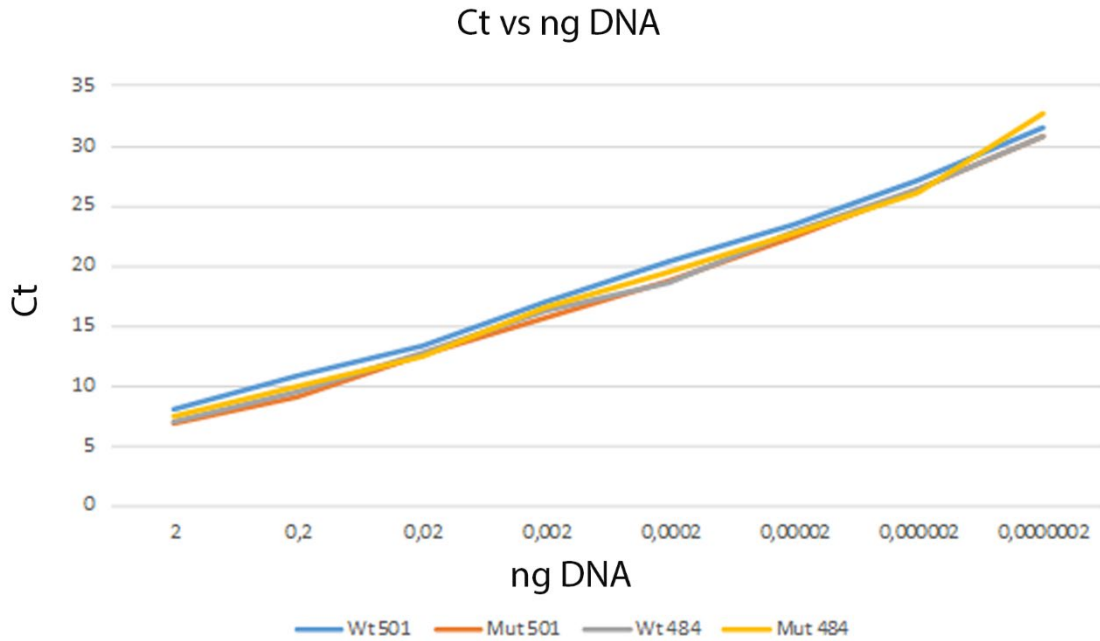


Figura RI. 9: Representación grafica de los Cts frente a la cantidad de DNA.

4. Prueba del kit con ARN procedentes de aguas residuales de diferentes pueblos

El siguiente paso, tras la puesta a punto de nuestro Kit de detección de variantes (elección de las parejas de cebadores, temperatura optima de fusión y sensibilidad de detección), fue comprobar su eficacia frente a muestras reales, en este caso, RNA procedente de aguas residuales, provenientes de diferentes pueblos de Extremadura, a los cuales se nombraron como pueblo 1, pueblo 2, pueblo 3, y sucesivos.

Inicialmente, se midió la concentración de RNA presente en cada muestra, y estas concentraciones oscilan entre 100-220ng/ul. Una vez medida la concentración de RNA presente en cada muestra, se llevó a cabo un proceso de RT-PCR en un solo paso, usando el kit (Taq Platinum HiFi One Step III), la pareja de cebadores *E484K-WT-Forward* y *Reverse-común*; y 1 ug de RNA como molde por cada muestra. Para corroborar este primer proceso, se realiza una electroforesis en gel de agarosa y se observa el fragmento amplificado, en el

caso de haber presencia de SARS-CoV2 en la muestra, como se presenta en la (Figura RI.10), que muestra la presencia de RNA del SARS-CoV2 en ambas muestras, ya que aparece el fragmento amplificado.

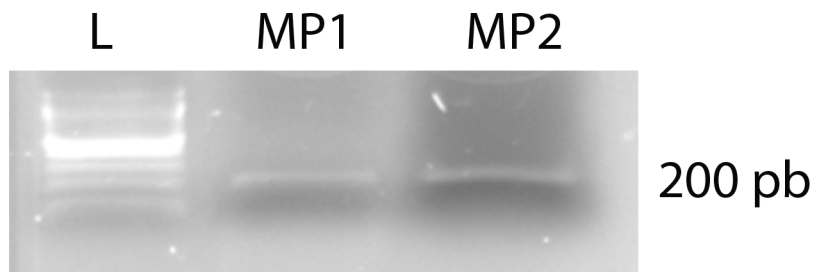


Figura RI. 10: Comprobación de la amplificación de las muestras. Gel de electroforesis en el que se observan los fragmentos generados mediante RT-PCR para la detección del SARS-CoV2, en las muestras de agua. Gel de agarosa al 1%.

Una vez realizada la RT-PCR, se obtiene el cDNA, del cual se midió la concentración, obteniendo entrono 420-520ng/ul. Con el cDNA de todas las muestras de aguas residuales, se realizó la qPCR con las herramientas del Kit de detección de variantes diseñado. Según las herramientas del Kit, se podrían obtener 4 resultados diferentes, con los cuales se discrimina cual de las variantes estaría presente. Para la variante Wuhan, amplificarían correctamente ambas parejas de cebadores control para ambas mutaciones (N501Y-Wt y E484K-Wt), para la variante Alpha amplificaría los cebadores N501Y-V1 y E484K-Wt, en cuanto a la variante Gamma se identificaría por la amplificación por parte de los cebadores E484K-V1 y N501Y, y por último la amplificación por parte de los cebadores N501Y-V1 y E484K-V1 mostraría la presencia de la variante Beta (Tabla RI. 2).

Tabla RI.2: Posibles resultados de la RT-qPCR con muestras positivas, e identificación de las variantes.

	N501Y-Wt	N501Y-V1	E484K-Wt	E484K-V1
Wuham	+	-	+	-
Alpha	-	+	+	-
Gamma	+	-	-	+
Betta	-	+	+	-

Los resultados de las muestras de agua de los diferentes pueblos mostraron en primer lugar, la presencia del virus al producirse amplificación en todas las muestras. Por otro lado, se observó una clara presencia de la mutación N501Y, ya que se obtuvo unas curvas de amplificación con unos ciclos umbral bajos con los cebadores N501Y-V1, con respecto los Cts con los cebadores N501-Wt (Figura RI. 11, paneles A-F), aunque el pueblo 3 presenta además, la variante Wuham ya que mostró unos Cts bajos con los cebadores N501Y-Wt (Figura RI. 11, panel C). Con respecto a la mutación E484K no se observó amplificación, por lo cual no había presencia de la misma, por lo que se concluyó claramente que hay una predominancia de la mutación N501Y, es decir, de la variante Alpha.

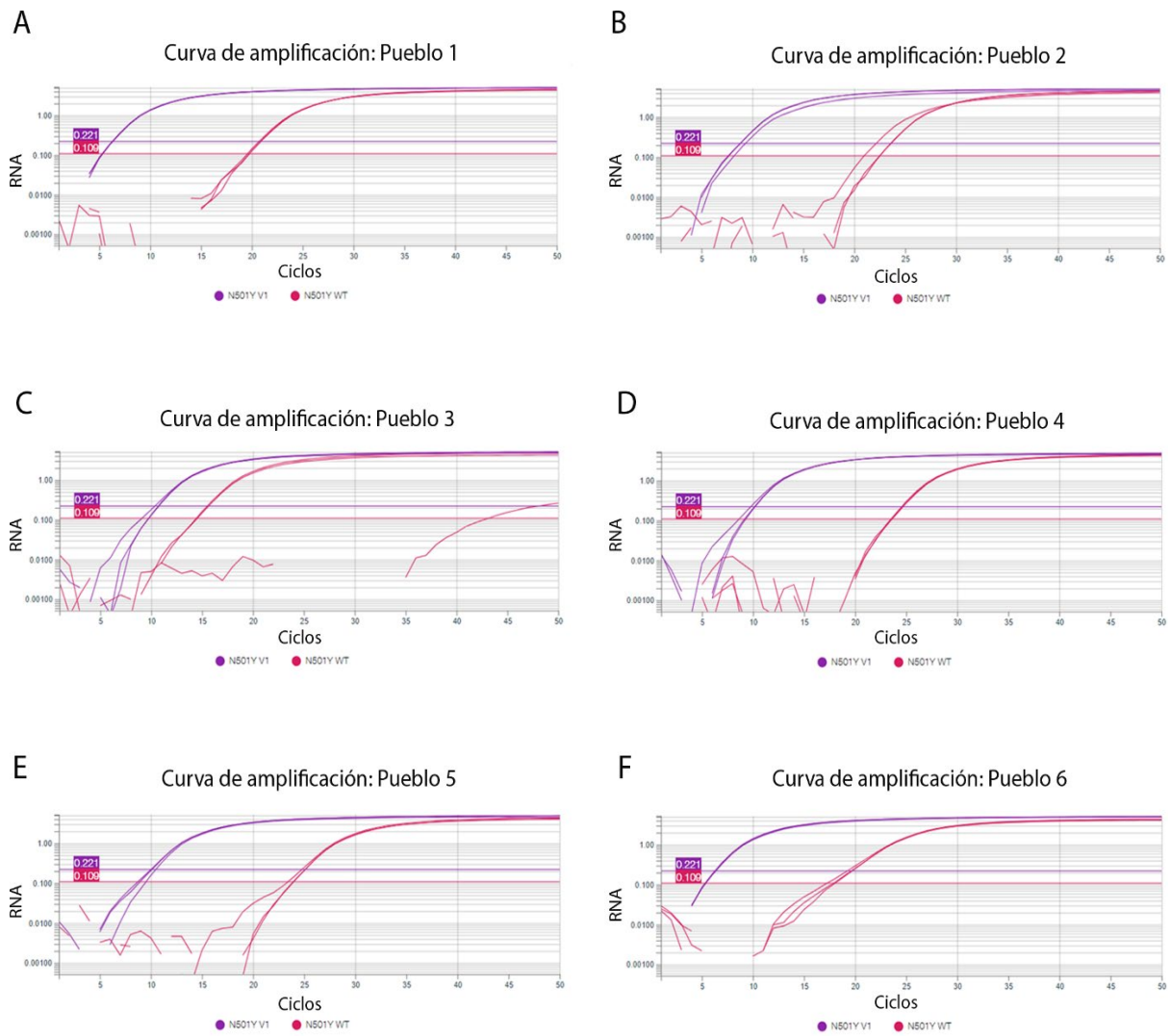


Figura RI. 11: Análisis de las curvas de amplificación de las diferentes aguas residuales
 Mediante la realización de qPCR, se realiza la identificación de la variante presente en la muestra . En todas predomina la variante Alfa, con la mutación N501Y, excepto en la C donde se observa también presencia de la variante Wuham.

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

DISCUSIÓN CAPÍTULO I

Los coronavirus (CoV), son virus de ARN de cadena sencilla (ssRNA) no segmentado, en sentido positivo, que taxonómicamente pertenecen a la familia *Coronaviridae* y la subfamilia *Coronavirinae* (Kadam et al., 2021a). De ellos, destacan los coronavirus humanos (HCoV), responsables de múltiples enfermedades respiratorias de diversa gravedad, tales como el resfriado común, la bronquitis y la neumonía (Pene et al., 2003). Los HCoV poseen una gran capacidad evolutiva, debido a la alta tasa de sustitución y recombinación de nucleótidos (Vijgen et al., 2005) y han aparecido periódicamente en diferentes lugares del mundo, provocando importantes brotes de neumonía mortal en humanos desde principios del siglo XXI (C. Wu et al., 2020). Entre estos HCoV, se encuentran coronavirus del síndrome agudo severo 2 (SARS-CoV2).

El SARS-CoV2, ha causado más de cinco millones de muertes, y posee una alta tasa de transmisión y de capacidad mutagénica, lo que contribuye a una rápida evolución de la pandemia, además de un enorme impacto negativo en la salud mundial (Khachfe et al., 2020). Las principales herramientas para el control de esta pandemia fueron la detección temprana de la infección, para evitar o controlar así su propagación y la generación de terapias para la eliminación de la infección, o alivio de los efectos de esta.

Sin embargo, el virus SARS-CoV-2 ha cambiado constantemente a lo largo del tiempo mediante mutaciones, lo que ha dado lugar a nuevas variantes. Varias variantes del SARS CoV-2 han surgido y se han extendido globalmente durante la pandemia (Neopane et al., 2021). Con base en la evidencia de una mayor transmisibilidad, gravedad de la enfermedad y efectividad terapéutica reducida, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) han definido tres niveles diferentes de amenaza asociada con variantes. Estas incluyen variantes de interés (VOI), variantes preocupantes (VOC) y variantes de alta consecuencia. En este trabajo nos centramos en las variantes VOC, en concreto en la variante Alfa, la Beta y la Gamma.

Hasta ese momento todas las pruebas y métodos de detección, se basaban en la presencia o ausencia del SARS-CoV2, para el aislamiento del individuo y evitar la propagación del virus, sin embargo, no tenían la capacidad

de detectar la variante presente en el paciente en el momento de la detección (Korber et al., n.d.). Los linajes del SARS-CoV-2 se determinaban mediante secuenciación del genoma completo (WGS) de muestras positivas de SARS-CoV-2, y detectaban nuevas variantes emergentes y cualquier cambio nuevo en los genomas virales (Paul et al., 2021). La WGS se consideró el método de referencia para a identificación de nuevas variantes circulantes del SARS-CoV-2 en todo el mundo. Sin embargo, la disponibilidad limitada hizo inviable la detección oportuna de variantes para la respuesta de salud pública, como el rastreo de contactos y la determinación de la prevalencia de variantes preocupantes en la comunidad (Lind et al., 2021). Además, WGS requiere recursos y equipos relativamente grandes, experiencia técnica y un tiempo más prolongado para el procesamiento de datos para la secuenciación sin medidas de control de calidad estandarizadas establecidas. La mayoría de los laboratorios de todo el mundo no cuentan con los recursos necesarios para desarrollar y respaldar la secuenciación a gran escala. Por lo tanto, para la detección temprana y el seguimiento de la propagación de determinadas cepas, era deseable utilizar métodos alternativos de detección en unas pocas horas(Lind et al., 2021). Además, los métodos rápidos y eficientes para rastrear la transmisión de ciertos linajes podrían ser más valiosos en situaciones en las que las mutaciones están asociadas con una mayor transmisión o mortalidad(Neopane et al., 2021).

En base a esto, en este trabajo se realizó el desarrollo de un Kit RT-qPCR, técnica ya empleada en el diagnóstico del SARS-CoV2, para la detección de las diferentes variantes, para así poder detectar a la vez, la presencia del virus, y la variante presente en cada paciente, sin necesidad de realizar una secuenciación del genoma completo. Este Kit se centra en las mutaciones del gen de la proteína S, en concreto en las mutaciones N501Y y E484K, con las cuales se pueden identificar las variantes Alfa, Beta y Gamma.

Este Kit presenta diversas ventajas, la metodología empleada es la de RT-qPCR, la misma técnica que se utiliza para detectar la presencia o ausencia del virus, es decir, no precisa de nuevo equipamiento, conocimientos ni formación adicional del personal. Puede determinar la variante para la cual es positiva la muestra en un tiempo de entre 45-60 minutos, y es significativamente más

económico que la secuenciación. Además, puede ampliarse a nuevas variantes. Su límite de detección se encuentra en 69,8 copias del virus por reacción por reacción.

Diversos estudios presentan otros métodos alternativos para la resolución de estos problemas, en cuanto a la identificación de las diferentes variantes presente en aquellas muestra positivas para el SARS-CoV2, sin necesidad de usar el método de secuenciación del genoma completo.

Un estudio ha desarrollado unos ensayos de genotipado simples que utilizan un panel de mutaciones TaqMan para SARS-Cov2, mediante el cual se puede monitorear una o varias mutaciones del SARS-CoV2, mediante un proceso que combina la metodología de genotipado TaqMAN SNP (*single nucleotide polymorphism*) con una reacción de RT-PCR en tiempo real de un solo paso, para detectar mutaciones en una muestra de manera rápida y eficiente a partir de muestra de RNA (Neopane et al., 2021).

Otro estudio ha desarrollado una metodología basada en un ortólogo de Cas9 denominado *Francisella novicina* (FnCas9), la cual puede adaptarse para identificar con precisión secuencias de nucleótidos o cualquier variante de nucleótido único, y por consiguiente detectar e identificar las diferentes variantes. Ha esta metodología la denominaron “ensayo de detección uniforme vinculado al editor FnCas9” (FEDULA). Presenta un diagnóstico basado en la capacidad de FnCas9, para la detección de una amplia gama de variante de nucleótido único y secuencias de nucleótidos. Muestra además una precisión similar a la de las pruebas basadas en RT-qPCR. Sin embargo, este método necesita de la combinación de un analizador de fragmentos basado en microfluidos y máquinas de PCR portátiles. En resumen, FELUDA es un ensayo de diagnóstico basado en CRISPR, preciso y de bajo costo para detectar ácidos nucleicos y sus variaciones, presentándose como una alternativa atractiva a las tecnologías actuales (Azhar et al., 2021).

Otra de las metodologías desarrolladas para la solución de este problema emergente, fue la de medir la respuesta de anticuerpos frente al SARS-CoV2, herramienta ya fundamental previamente para fines diagnósticos, monitorear la prevalencia de la infección y medir la eficacia de la vacunación. Los ensayos serológicos cuantitativos multiplexados, que permiten tanto la determinación de los niveles de anticuerpos en respuesta a la infección y la vacunación como la capacidad de evaluar la capacidad relativa de neutralización de anticuerpos, proporcionan una solución de diagnóstico atractiva. En este estudio, usaron un ensayo plasmónico fluorescente acoplado a rejilla (GC-FP), basado en un microchip para medir los niveles de anticuerpos que resultan de la infección. Realizaron una modificación de los microchips de detección GC-FP para incluir antígenos adicionales de cepas variantes del SARS CoV2, a través de los cuales, pudieron monitorear simultáneamente los niveles de anticuerpos contra múltiples antígenos del SARS CoV2, evaluando así la unión relativa de los anticuerpos a las cepas originales y variantes. Por lo que demuestran que GC-FP es un método eficaz y sensible para controlar los niveles de anticuerpos en respuesta a la vacunación y puede determinar los niveles relativos de unión de anticuerpos a los antígenos originales y variantes del SARS CoV2 2019, todo en una única prueba rápida (Taubner et al., 2021).

CONCLUSIONES CAPÍTULO I

CONCLUSIONES CAPÍTULO I

- 1. Metodología eficiente y accesible.** Emplea la misma técnica que se utiliza para detectar la presencia o ausencia del virus, por lo que no precisa de nuevo equipamiento, conocimientos ni formato adicional del personal.
- 2. Rapidez en los resultados.** Puede determinar la variante para la cual es positiva la muestra en un tiempo de entre 45-60 minutos.
- 3. Limite de detcción preciso.** Presenta un limite de detección de 69,8 copias del virus por reacción.
- 4. Adaptabilidad a nuevas variantes.** Puede ampliarse a las nuevas variantes que pudieran aparecer, para hacer así un seguimiento exhaustivo de la incidencia de cada una de las nuevas variantes.

OBJETIVOS CAPÍTULO II

El factor de transcripción activador 4 (ATF4), se ha relacionado como un impulsor clave de la respuesta inmune innata, provocada por la infección del SARS-CoV2 (Vanderheiden et al., 2020a).

Un análisis in silico de factores de transcripción e interactores que presentan una expresión diferencial entre células basales, secretoras y multiciliadas reveló que el factor de transcripción Atf4 podría jugar un papel importante en el epitelio de las vías respiratorias

En base a estos datos, en este capítulo nos propusimos **analizar el papel de ATF4 en la homeostasis y la diferenciación del epitelio pseudoestratificado de las vías respiratorias**. Además, decidimos abordar el papel de la ruta PERK-eIF2 α -ATF4 y su implicación en estos procesos. Y también estudiar el papel de ATF4 en la respuesta inmune del epitelio de las vías respiratorias. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos

1. Caracterizar los niveles de expresión de Atf4 durante la diferenciación de las células basales del epitelio respiratorio.
2. Analizar el papel de ATF4 en la diferenciación del epitelio de las vías respiratorias a través de la modulación de sus niveles de expresión.
3. Estudiar el papel de la ruta PERK-eIF2 α -ATF4 en la proliferación y la diferenciación celular mediante el uso de fármacos que bloquean la ruta en diferentes puntos.
4. Analizar el papel de ATF4 en la respuesta inmunitaria de las vías respiratorias.

RESULTADOS CAPÍTULO II

RESULTADOS CAPÍTULO II

1. Análisis in silico de factores de transcripción y sus interactores.

Como se describió en la introducción, mediante un análisis *in silico*, se observó la expresión de los factores de transcripción e interactores, entre los diferentes tipos celulares presentes en el epitelio de las vías respiratorias. El desarrollo reciente de la tecnología de secuenciación de RNA de célula única, ha proporcionado una gran cantidad de datos que son fundamentales para vincular las proteínas y sus funciones. Este estudio, se enfoca en proteínas que actúan como factores de transcripción (FT), para explorar nuevos programas transcripcionales relevantes para la biología del epitelio de las vías respiratorias. Se identificaron 100 FT relevantes expresados en al menos una de las tres clases principales de células epiteliales de las vías respiratorias: células madre basales (CMB), células multiciliadas (CMC) y células secretoras (CS), basado en términos de ontología de genes relacionados con FT (GO) (unión de ADN específica de secuencia, GO: 0043565). Posteriormente, se evaluó la expresión génica diferencial de los 250 interactores principales para cada proteína FT en las tres clases principales de células en el epitelio de las vías respiratorias. Este enfoque tuvo como objetivo identificar las vías de señalización asociadas con los FT que pueden tener funciones distintas en diferentes tipos de células (Figura RII.1, panel A).

A través de la utilización de este análisis bioinformático, fueron identificadas 11 vías o interactomas de factores de transcripción expresadas diferencialmente entre células madre basales (CMB), células secretoras (CS) y células multiciliadas (CMC), entre las que aparece Atf4, anteriormente nombrado en el apartado de introducción, y el cual aparece en naranja (Figura RII.1, paneles B y C).

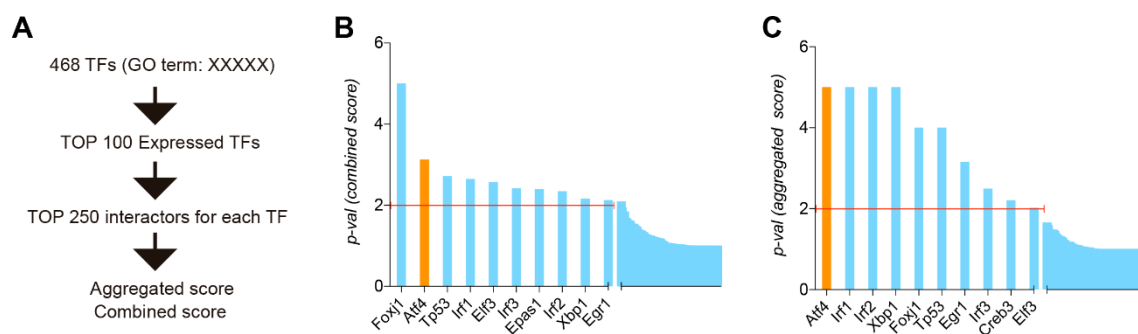


Figura RII. 1: Análisis *in silico* de los factores de transcripción y sus interactores. (A) Esquema del flujo de trabajo del análisis *in silico* desarrollado. Se analizaron 1.652 proteínas iniciales con la anotación GO:0043565 (unión de ADN específica de secuencia) para detectar interactores con puntuación alta relacionada con la diferenciación de las vías respiratorias. (B) Histograma de los valores p de la puntuación combinada (valor medio) obtenidos para los factores de transcripción candidatos. (C) Histograma de los valores p de la puntuación agregada (valor suma) obtenidos para los factores de transcripción candidatos.

Como ya se indicó anteriormente, estas vías incluían los interactomas Atf4, además de, Foxj1, Trp53, Irf1, Elf3, Irf3, Epas1, Irf2, Xbp1, Creb3 y Egr1. Previa investigación han demostrado la participación crucial de las vías Foxj1 y Trp53 en la diferenciación epitelial de las vías respiratorias (Garrido-Jimenez et al., 2021), destacando así el impacto potencial de otras vías de señalización en este proceso de diferenciación. Para evaluar más a fondo estos factores de transcripción, se examinaron sus conexiones utilizando la base de datos STRING. Como se muestra en la (Figura RII.2), se identificaron dos nodos: uno que comprende Trp53 junto con Egr1, Irf1, Irf2 e Irf3, y un segundo nodo que consta de Atf4, Xbp1 y Creb3. Sin embargo, no se observa ninguna conexión documentada entre estos dos nodos o con Foxj1 en la base de datos STRING con un valor de confianza de 0,9 (Figura RII.2).

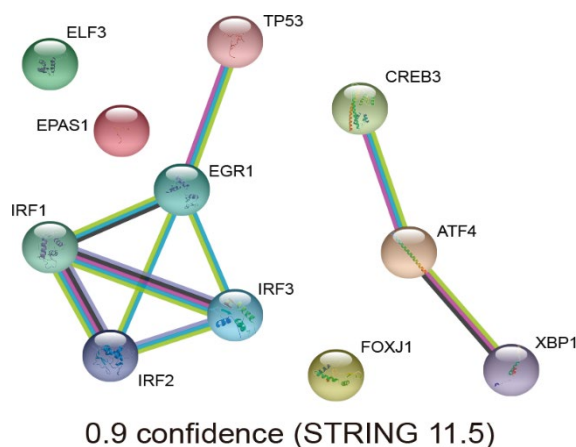


Figura RII. 2: Estudio de las redes de interacción proteína-proteína: Redes de interacción proteína-proteína de Atf4 y Trp53 mediante análisis STRING.

Posteriormente, se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de cada uno de estos factores de transcripción a lo largo del proceso de diferenciación de CMB. Se utilizaron cultivos de células epiteliales de tráquea de ratón (MTEC), en un sistema de interfaz aire-líquido, como se indica en el apartado materiales y métodos. Este método de cultivo celular permitió monitorear fácilmente la diferenciación de CMB en CS y CMC, al examinar los niveles de expresión de marcadores de tipo celular como *Krt5* para CMB, *Scgb1a1* para CS y *Foxj1* para CMC durante un período de 14 días (Figura RII.3).

Los resultados obtenidos mostraron un descenso de la expresión del marcador de células basales *Ktr5* a lo largo de la diferenciación, manteniéndose ciertos niveles de ARNm, lo que indica la presencia de estas células progenitoras en el cultivo diferenciado (Figura RII. 3, panel A). La población de células secretoras, atendiendo a la expresión del marcador *Scgb1a1*, se ve notablemente incrementado a partir del día 7 de diferenciación, como se muestra en el panel B de la figura RII.3. Por último, el marcador analizado para la población de células multiciliadas (*Foxj1*), reveló un claro incremento de la expresión a lo largo de la diferenciación, con respecto al inicio de la misma

(Figura RII.3, panel C). Estos resultados ponen de manifiesto la diferenciación de las distintas poblaciones celulares que componen el epitelio respiratorio a partir de las células basales cultivadas *in vitro*.

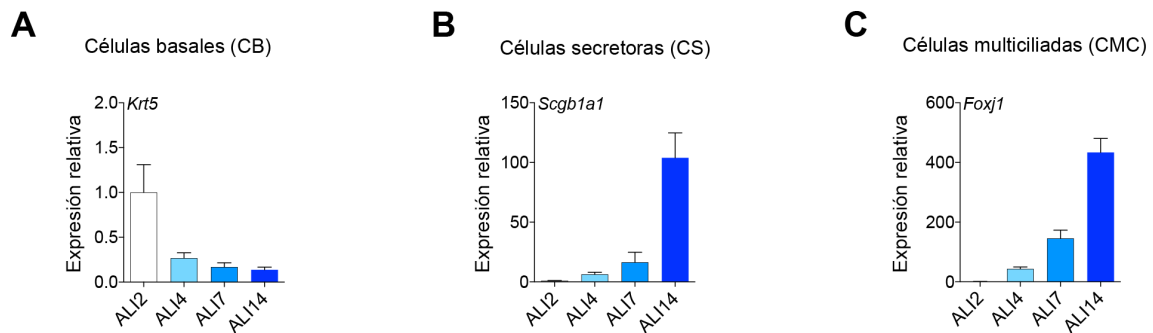


Figura RII. 3: Análisis de los niveles de expresión de los marcadores de poblaciones celulares del epitelio respiratorio durante el proceso de diferenciación. Niveles de ARN mensajero de los marcadores de poblaciones celulares, analizados mediante qPCR de muestras obtenidas en los días 2, 4, 7 y 14 del proceso de diferenciación. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=8. Se analizaron los marcadores de A) células basales (*Krt5*), B) células secretoras (*Scgb1a1*) y C) células multiciliadas (*Foxj1*).

En estas condiciones de cultivo celular, se estudiaron los niveles de expresión de ARN mensajero de los principales factores de transcripción candidatos, siendo observados a lo largo de la diferenciación, en los días 2, 4, 7 y 14 (Figura RII.4). En dichos resultados, se muestra como los niveles de seis de los nueve factores de transcripción se mantienen constantes a lo largo de la diferenciación (Figura RII.4, paneles A-F), mientras que los otros cuatro presentan una disminución de la expresión a lo largo de dicha diferenciación, siendo más significativos en día 7 (Figura RII.4, paneles G-I)

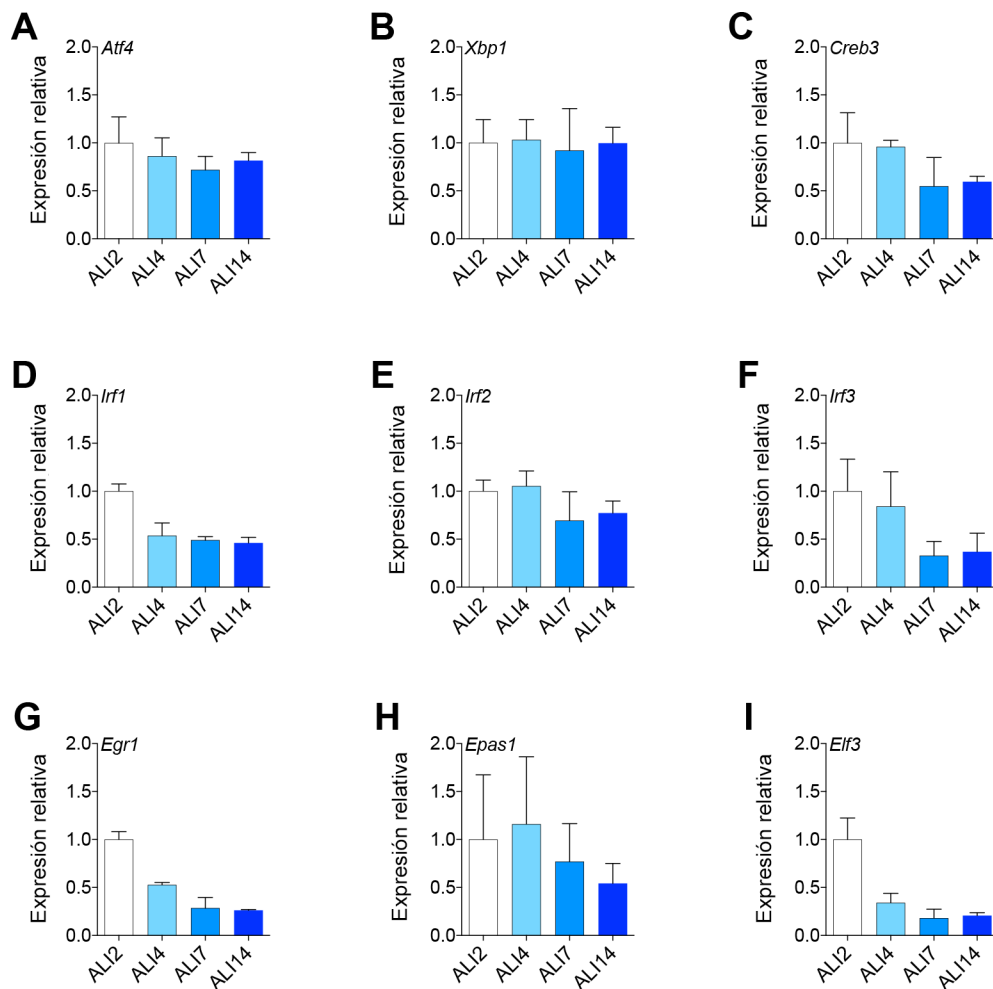


Figura RII. 4: Análisis de la expresión de los principales factores de transcripción candidatos del análisis *in silico*. A-I) niveles de expresión de ARN mensajero de *Atf4*, *Xbp1*, *Creb3*, *Irf1*, *Irf2*, *Irf3*, *Egr1*, *Epas1* y *Eif3*, analizados mediante qPCR. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión n=8.

2. La expresión de *Atf4* es esencial para la diferenciación de las células secretoras (SC).

ATF4 pertenece a la familia ATF/CREB de factores de transcripción de región básica/cremallera de leucina. Estos pueden funcionar como activadores o represores de la transcripción y sirven como reguladores maestros para la respuesta al estrés del retículo endoplásmico (RE) (Pakos-Zebrucka et al., 2016b), como ya se indicó en el apartado de la introducción. Sin embargo, queda por explorar el papel de ATF4 en la diferenciación celular. Para investigar el papel de ATF4 en el proceso de diferenciación de células madre basales (CMB) a células multiciliadas (CMC) y células secretoras (CS), se comenzó silenciando la expresión de esta proteína en cultivos primarios indiferenciados. Mediante transducción lentiviral, se generaron cultivos que contenían secuencias de ARN de interferencia (*Short Hairpin RNA*) para *Atf4* (sh-*Atf4*), y se usó como control el ARN de interferencia frente a la proteína Luciferasa (Luc). Se emplearon tres secuencias distintas para el silenciamiento de *Atf4*, que se infectaron de forma combinada para maximizar así el efecto *knock down* (KD). Para monitorizar la eficiencia de la infección, los vectores lentivirales utilizados contenían la secuencia codificante para la proteína roja fluorescente mCherry. Tras la transducción y la selección de las células progenitoras, se analizaron los niveles de expresión de *Atf4* mediante qPCR, y los resultados obtenidos muestran un descenso significativo de la expresión de *Atf4* en las células ATF4-KD con respecto a las células control (Figura RII.5).

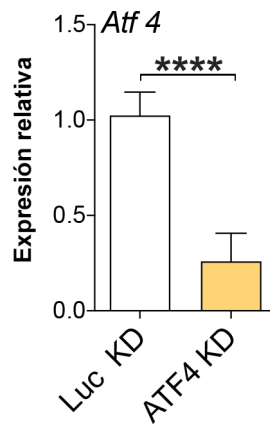


Figura RII. 5: Análisis de la expresión de *Atf4* tras la realización del KD. Niveles de expresión de ARNm de *Atf4* evaluados en MTEC diferenciadas, infectadas con virus de control (Luc-KD) o *Atf4*-shRNA (ATF4-KD). Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=8. Los valores de p para los experimentos de expresión génica relativa se obtuvieron mediante la prueba two-tailed t-test (**** representa $p < 0,0001$ y ns significa que no hay diferencias significativas).

A continuación, se observó que ATF4-KD no afectó la proliferación de CMB, la cual, fue medida por el tiempo de duplicación durante la expansión del cultivo celular, monitorizando el tiempo en el que un número determinado de células se duplicaba, parámetro conocido como *doubling time* (Figura RII. 6, panel A). Para ello los cultivos se mantuvieron varias semanas, cuantificando el número de células colectadas en cada uno de los pases realizados. También se evaluó la autorrenovación de CMB, mediante cultivos tridimensionales, dando la formación de organóides, que consisten en esferas procedentes de una única célula basal. Para la realización de este experimento, se individualizaron los cultivos de células basales control y ATF4-KD, y se crecieron en una matriz extracelular, como se detalla en el apartado 2 de materiales y métodos. Se observó, al igual que en el *doubling time*, que ATF4-KD no afectó a la

autorrenovación, y para ello fue cuantificando el porcentaje de organoides que se formaron y el área de los mismos. (Figura RII.6, paneles B-D).

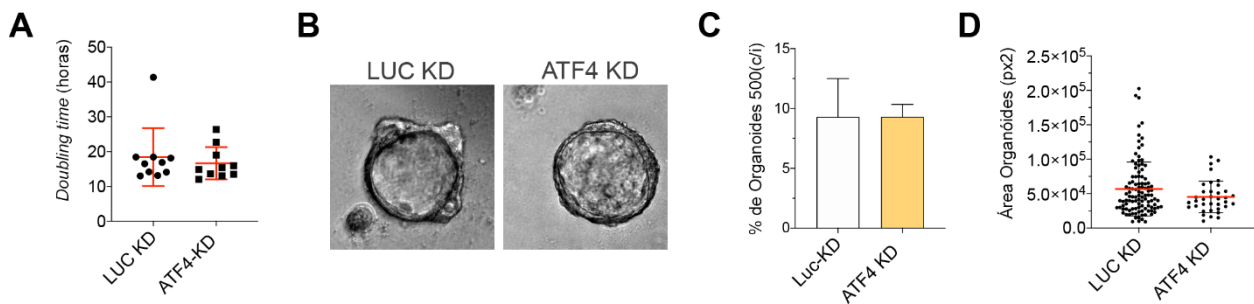


Figura RII. 6: Análisis del efecto del silenciamiento de ATF4 en la proliferación de células progenitoras del epitelio respiratorio. A) Cuantificación del tiempo de duplicación o doubling time en cultivos control (sh-Luc) o silenciados para Atf4 (sh-Atf4). B) Imágenes representativas de organoides cultivados a partir de células control y sh-Atf4 en día 5 de cultivo. C) Cuantificación del porcentaje de organoides generados a partir de 500 células, n>50. D) Cuantificación del tamaño de los organoides a partir de las imágenes de microscopía.

Una vez concluido que el *knock-down* de *Atf4* no afecta a la proliferación ni a la autorrenovación celular, se procedió a evaluar la integridad de la monocapa celular formada por las células epiteliales que carencias de *Atf4*. Para realizar esta evaluación, se midió la resistencia eléctrica transepitelial (*Trans epithelial Electrical Resistance, TEER*) a lo largo de la diferenciación de estas células en los días 0, 4, 7, 9 y 14. Para ello, se emplearon dos electrodos, uno colocado en la cámara inferior del pocillo, y otro en la cámara superior del *Transwell*, y posteriormente se aplicó una corriente eléctrica para comprobar la resistencia que ofrecía el cultivo al paso de esta. Los resultados obtenidos en este experimento muestran que, las células ATF4-KD pudieron formar una monocapa epitelial con una función de barrera normal en comparación con las condiciones de control (LUC-KD, eliminación de luciferasa) (Figura RII.7).

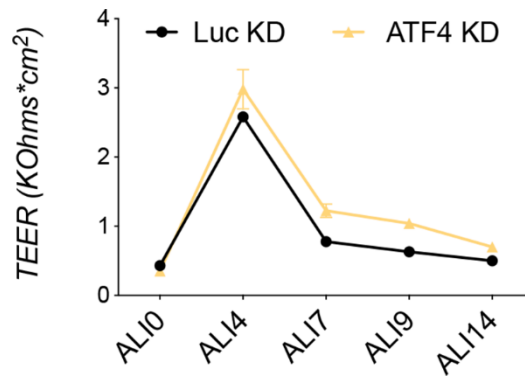


Figura 7: Análisis del efecto del silenciamiento de *Atf4* en la integridad de la monocapa de células del epitelio respiratorio. Resistencia eléctrica transepitelial (TEER) medida a lo largo de la diferenciación en células control (shLuc) o silenciadas (sh-*Atf4*).

Posteriormente se investigó si el *knock-down* de *Atf4* afectaría la diferenciación de CMB en diferentes tipos de células de las vías respiratorias. Para ello, fue evaluada la expresión de marcadores genéticos para CMB, CMC y CS en monocapas epiteliales ATF4-KD y LUC-KD después de 14 días de diferenciación usando RT-qPCR. Como era de esperar, los niveles de *Krt5* y *Trp63*, marcadores de CMB, fueron similares en ambas condiciones experimentales (Figura RII.8, paneles A y B). A su vez, los niveles de expresión de los marcadores CMC, *Foxj1* y *Mcidas*, fueron comparables en las células ATF4-KD y LUC-KD (Figura RII.8, paneles C y D). Sin embargo, al analizar los marcadores de CS, se observó una disminución significativa en la expresión de *Scgb1a1*, *Scgb3a2*, *Muc5ac* y *Spdef* en células ATF4-KD en comparación con las células de control (Figura RII.8, paneles E-H).

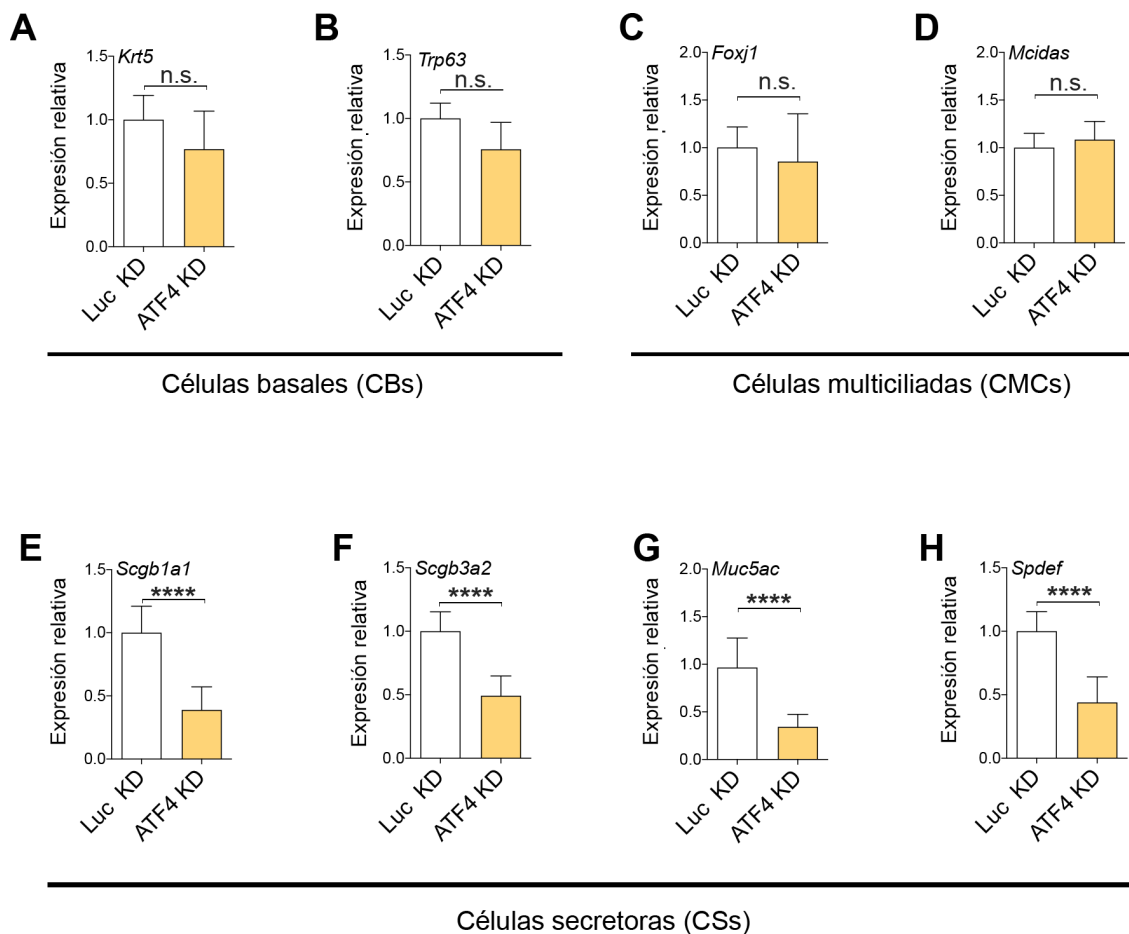


Figura RII. 8: Expresión relativa de los marcadores genéticos para las poblaciones celulares del epitelio respiratorio en cultivos silenciados para *Atf4*. Niveles de expresión de ARNm en células control (Luc) y ATF4-KD. *Krt5* y *Trp63* para células basales (A y B), *Foxj1* y *Mcidas* para MCMs (C y D), *Scgb1a1* y *Scgb3a2* para células club (E y F), y *Muc5ac* y *Spdef* para células caliciformes (G y H). Se trazaron la media relativa a las células de control y la desviación estándar como barras de error para cada marcador de linaje. Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=8. Los valores de p para los experimentos de expresión génica relativa se obtuvieron mediante la prueba t de dos colas (**** representa p <0,0001 y ns significa que no hay diferencias significativas).

Para validar aún más estos hallazgos, se realizó un inmunomarcaje de las monocapas epiteliales de las vías respiratorias de células control y ATF4-KD

utilizando anticuerpos contra *p63*, *Foxj1* y *Scgb1a1*. Como se puede observar en la figura RII.9, la cuantificación de las imágenes de inmunofluorescencia de células positivas para p63, no mostró diferencias significativas entre las células ATF4-KD y las células control (Paneles A y D). En cuanto a lo relativo a las células multiciliadas, cuyo marcador es Foxj1, tampoco presento diferencias significativas, al igual que el marcador de células basales (Paneles B y E). Sin embargo, en estos resultados también se observó un número reducido de células positivas para Scgb1a1 en células ATF4-KD en comparación con las condiciones de control (Figura RII.9, paneles C y F).

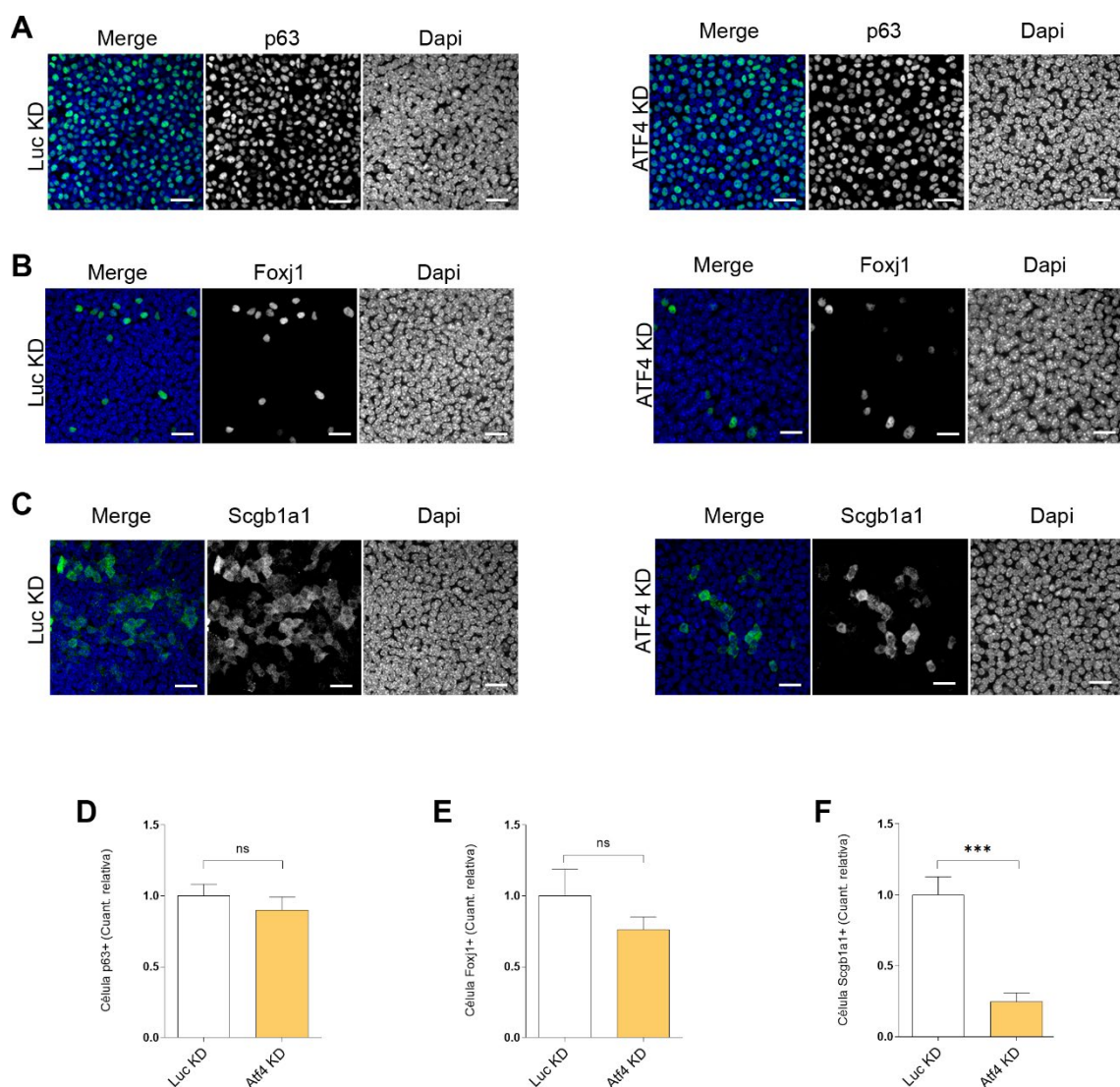


Figura RII. 9: Efecto del silenciamiento de *Atf4* en la abundancia relativa de las poblaciones celulares del epitelio respiratorio. Imágenes de inmunofluorescencia de los marcadores para (A) células basales (*p63*) , (B) multiciliadas (*FOXJ1*) y (C) secretoras

(SCGB1A1) en cultivos diferenciados silenciados para Luciferasa (control) y sh-Atf4. La barra de escala representa 20µm. (D-F) Cuantificación de la abundancia relativa de células basales, multiciliadas y secretoras en imágenes de microscopía confocal. Las columnas representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a las condiciones control (sh-Luciferasa, Luc). Los valores de p para los experimentos de expresión génica relativa se obtuvieron mediante la prueba t de dos colas (***) representa $p < 0,0001$ y ns significa que no hay diferencias significativas).

Los resultados obtenidos en este apartado sugieren que Atf4 juega un importante papel en el mantenimiento del balance de las poblaciones celulares que componen las vías respiratorias. Concretamente, *Atf4* promueve la diferenciación de células basales de las vías respiratorias hacia células secretoras.

3. El programa transcripcional de la respuesta inmune innata está sobreexpresado en los epitelios de las vías respiratorias deficientes en Atf4.

Para profundizar más en la función de ATF4 en el epitelio de las vías respiratorias, se realizó un análisis de expresión mediante ARN-seq en células de control y ATF4-KD durante la diferenciación de CMB. A través de este análisis, fueron identificados 180 genes significativamente regulados de forma negativa y 379 genes significativamente regulados de forma positiva en ausencia de ATF4 (Figura RII.10, paneles A y B). En el gráfico de volcano plot (panel A), se observan los genes regulados de forma negativa a la izquierda con puntos azules, muestras a la derecha y con puntos rojos los regulados de forma positiva. En cuanto a la representación gráfica de estos resultados en el panel B, mediante el gráfico MA, los genes que presentan una regulación positiva se observan en la parte superior, y los que muestran una regulación negativa en ausencia de *Atf4*, en la parte inferior. En particular, entre los genes regulados negativamente, se observa la regulación negativa del propio *Atf4* y su objetivo transcripcional *Chac1*. Además, se observó una regulación positiva de *Atf2* en células que carecen de ATF4.

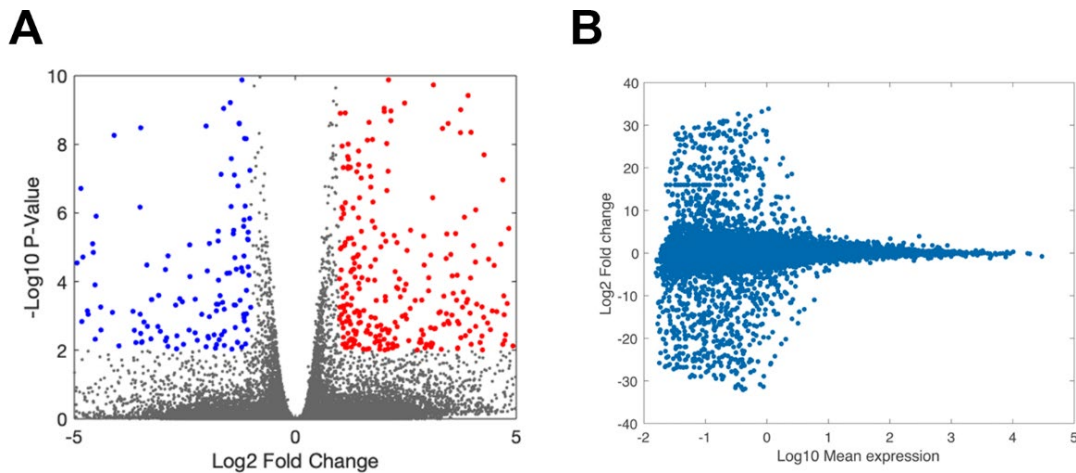


Figura RII.10: Análisis de la regulación de genes en ausencia de Atf4. A) Gráfico de volcano plot para ARN-seq (control contra Aft4-KD) en azul los genes regulados a la baja y en rojo los regulados al alza. B) Gráfico MA para ARN-seq (control frente a Atf4 deficiente)

Es importante destacar que todos los marcadores clásicos para las células secretoras, disminuyen su expresión en las monocapas de las vías respiratorias Atf4-KD. Como se observa en estos resultados, representados mediante un mapa de calor, tanto los genes de secretoglobinas (*Scgb1a1*, *Scgb3a2* y *Scgb3a1*) específicos de las células caliciformes, como los genes de mucinas (*Muc5ac*, *Muc5b*) y *Spdef*, marcadores de las células club, presentan una disminución de su expresión en las células Atf4-KD con respecto a las células control (Figura RII. 11). Estos resultados, junto a lo observado en el en las figuras RII. 8 y RII. 9, donde se apreciaba una disminución de la población de las células secretoras, confirma la relevancia de ATF4 en la diferenciación de las células basales de las vías respiratorias a células secretoras.

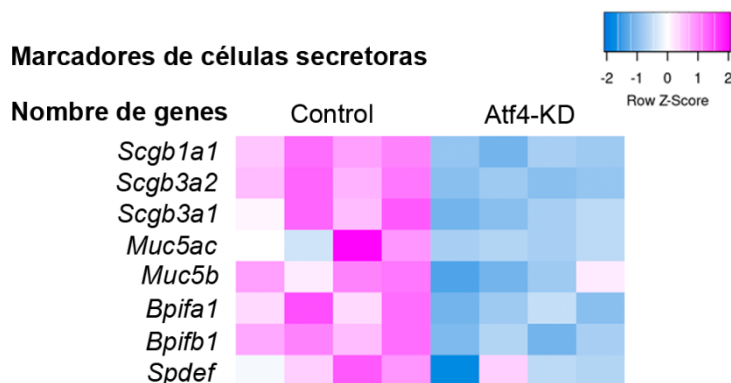


Figura RII. 11: Análisis de los genes marcadores de células secretoras (caliciformes y club) en ausencia de Atf4. Representación gráfica mediante mapa de calor de la expresión de genes marcadores de células secretoras que se encuentran diferencialmente expresados en células control y ATF4-KD de epitelios de las vías respiratorias. Se emplearon los datos de *counts* normalizadas de los RNA-seq generados en este estudio.

A continuación, se realizó un análisis de ontología génica utilizando el programa “DAVID” para estudiar más a fondo las implicaciones funcionales del *knock-down* de *Atf4*. Este análisis reveló que el programa de respuesta inmunitaria innata, incluida la respuesta a los virus y la respuesta celular al interferón, estaba sobreexpresado en las células ATF4-KD en comparación con las células de control, como se observa en la parte superior de la gráfica en amarillo. (Figura RII.12). Por el contrario, el análisis de genes regulados negativamente, no mostró una vía o categoría clara (Figura RII.12).

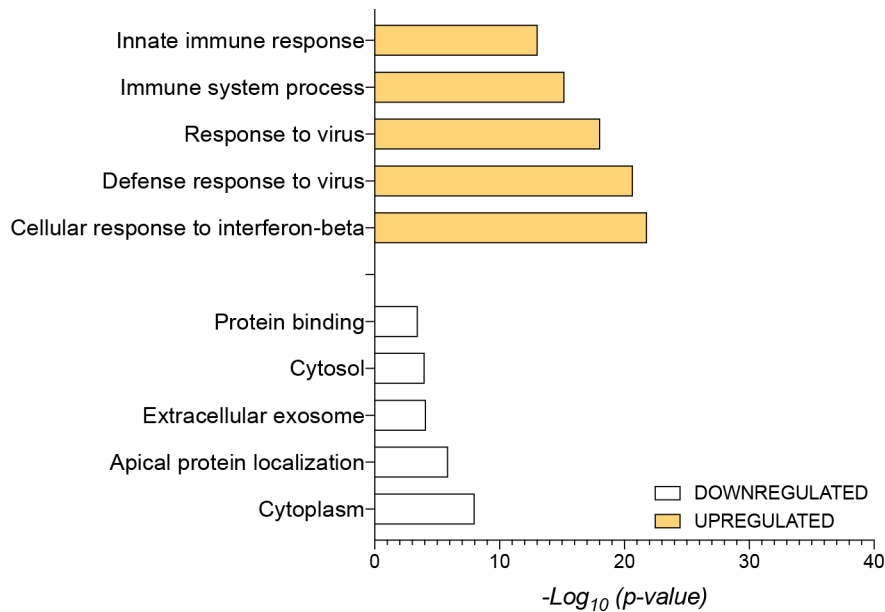


Figura RII. 12: Análisis de ontología génica (GO) de procesos biológicos en ausencia de Atf4. Se muestra el enriquecimiento en diversos términos a través de la significancia y el número de genes desregulados involucrados en cada proceso. En la parte superior, se observan los procesos biológicos regulados al alza en los cultivos Atf4-KD con respecto a las células control, y en la parte inferior, aquellos procesos regulados a la baja. Las barras representan el P valor.

Para validar estos resultados, se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA), con el que obtuvieron resultados similares que muestran un enriquecimiento de la respuesta inmunitaria innata, observándose una acumulación de genes sobreexpresados en las células *knock-down* de *Atf4*, con respecto a las células control (Figura RII.13). Además, el análisis mediante GSEA mostró dos programas transcripcionales cruciales para la diferenciación de CMBs en CS y CMC, como son la vía p53 y las vías IL6/JAK/STAT3 (Garrido-Jimenez et al., 2021; Tadokoro et al., 2014), las cuales estaban reguladas negativamente en las células ATF4-KD.

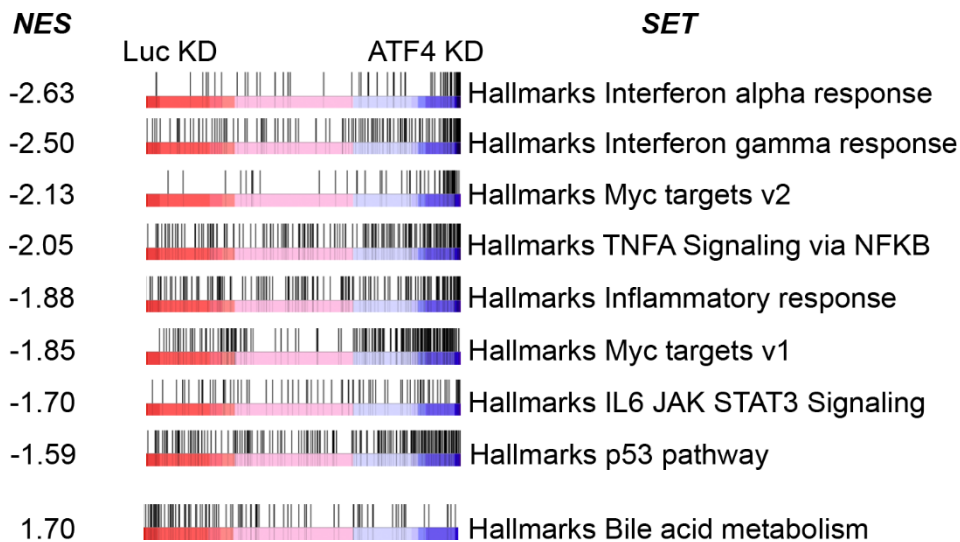


Figura RII. 13: Programas transcripcionales sobreexpresados en los epitelios de las vías respiratorias deficientes en *Atf4*. Análisis de GSEA de los datos de RNA-seq de células control (sh-Luc) y *Atf4*-KD (sh-*Atf4*) Se muestran los valores de la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES).

Nuestros datos de RNA-seq no solo confirmaron el papel de ATF4 en la diferenciación del epitelio de las vías respiratorias, sino que también revelaron una nueva función transcripcional potencial de ATF4 en la regulación de la respuesta inmune innata en el epitelio de las vías respiratorias. Y esto implica su papel en la respuesta inmune frente a virus, como ya han mostrado otros estudios, como por ejemplo en la infección por SARS-CoV2.

4. La deficiencia de ATF4 provoca un retraso en el ensamblaje de los cilios, pero no afecta el funcionamiento de las células ciliadas.

Estudios previos han demostrado la participación de la modulación de la expresión de p53 por parte de Mdm2 en la diferenciación de CMB en CS y CMC (Garrido-Jimenez et al., 2021). Además, Hogan et al. 2006 observaron que la señalización de IL6 a través de STAT3 desempeñaba un papel crucial en la promoción de la diferenciación de CMC (Tadokoro et al., 2014). En base a estos estudios, se decidió investigar más a fondo la diferenciación de CMC. Al analizar

la categoría de reactoma en la GSEA, se observó que dos subcategorías, el transporte intraflagelar y el anclaje del cuerpo basal a la membrana plasmática, se encontraban enriquecidas en las células control (sh-Luc), en comparación con las células ATF4-KD (Figura RII.14, paneles A y B).

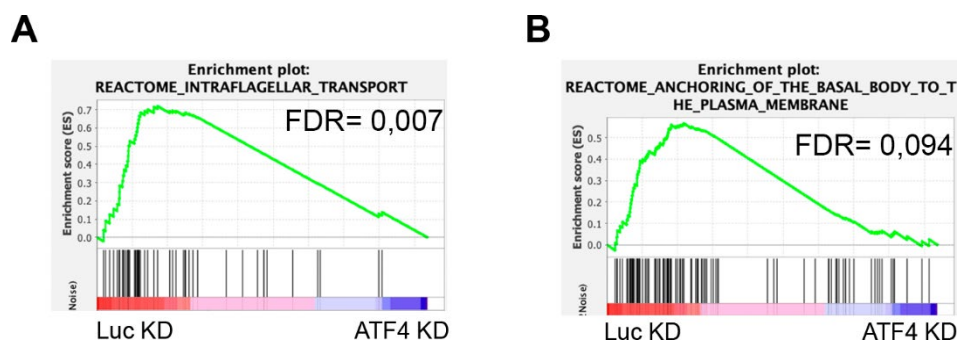


Figura RII.14: La ausencia de Atf4 afecta el transporte intraflagelar y el anclaje del cuerpo basal. Análisis de GSEA de los datos de RNA-seq de células control (Luc-KD) y células Atf4-KD contra la lista de dianas transcripcionales (A) del transporte intraflagelar y (B) del anclaje del cuerpo basal a la membrana plasmática. Se muestran los valores de la puntuación de enriquecimiento (ES).

Dado los resultados obtenidos por el GSEA, en cuanto al transporte intraflagelar y el anclaje del cuerpo basal, se decidió evaluar directamente el estado de los cilios, que se realizó mediante una inmunofluorescencia en nuestros cultivos primarios diferenciados. Para ello, se empleó el anticuerpo frente a tubulina acetilada, la cual, se encuentra localizada en el axonema de los cilios. Posteriormente, se tomaron imágenes de microscopía confocal de tubulina acetilada en células control y ATF4-KD. Los resultados obtenidos de las inmunofluorescencias mostraron que no hay cambios aparentes al comparar los cilios de las células multiciliadas entre las células control y las células ATF4-KD (Figura RII.15, paneles A y B)

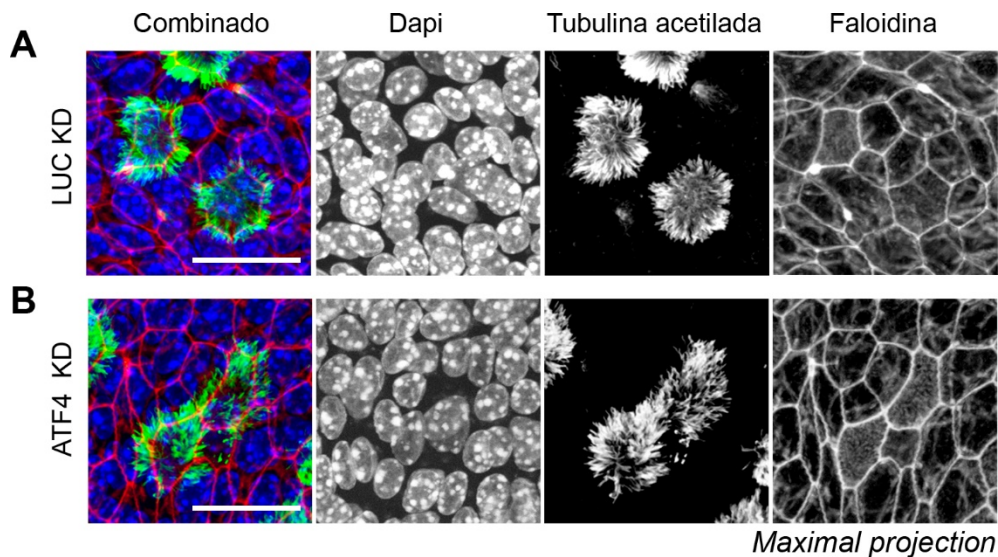


Figura RII. 15: Estudio del efecto del silenciamiento de *Atf4* en la morfología de los cilios en células diferenciadas del epitelio respiratorio. Imágenes de microscopía confocal de los núcleo (DAPI, en azul), los axonemas de los cilios (tubulina acetilada, en verde), y los filamentos de actina (faloidina, en rojo), A) en células control (sh-Luc), B) y células *Atf4*-KD (sh-*Atf4*). Las barras de escala representan 20 μm .

A continuación, se analizaron las posibles diferencias estructurales en los cilios en las células multiciliadas. Para ello se prepararon monocapas de células epiteliales de las vías respiratorias para ser observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados presentados en la (Figura RII.16, paneles A y B) mostraron que no existen diferencias estructurales importantes entre las células control y las células ATF4-KD. Sin embargo, en las imágenes SEM, se pudo observar una membrana apical menos desarrollada en las células ATF4-KD, y las células secretoras se identificaron más fácilmente en las células de control (Figura RII.16, paneles A' y B'). Estos últimos resultados con respecto a las células secretoras, siguen corroborando el importante papel de *Atf4* en la diferenciación de las células basales de las vías respiratorias a células secretoras.

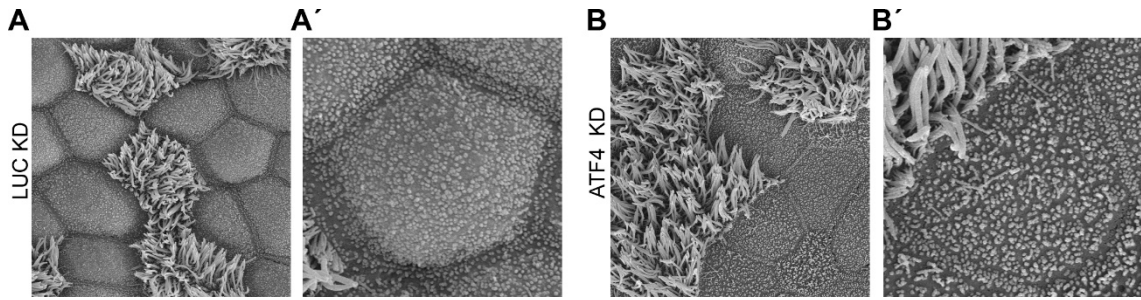


Figura RII. 16: Estudio del efecto del silenciamiento de *Atf4* en la estructura de los cilios en células diferenciadas. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para el análisis (A y B) de la estructura de los cilios de los cilios (5.000X), y (A' y B') la morfología de las células secretoras (8.000X).

Para seguir profundizando en el papel de *Atf4* en cuanto a las CMC, se decidió investigar las CMC a lo largo del proceso de diferenciación examinando el número de CMC, utilizando la proteína centriolina como marcador. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el número de CMC entre el control y las células ATF4-KD en ALI4, ALI5 o ALI6 (Figura RII.17, panel A). Además, la inmunofluorescencia con centriolina, también permitió categorizar las CMC en el en diferentes tipos que representan diferentes etapas de diferenciación (Vladar & Stearns, 2007). Estas etapas abarcan la síntesis de proteínas de la biogénesis del cuerpo basal (Etapa I), la biogénesis del cuerpo basal (Etapa II), la migración y el acoplamiento de los cuerpos basales en la membrana apical (Etapa III) y la generación de cilios móviles a partir de los cuerpos basales (Etapa IV) (Vladar & Stearns, 2007). Al analizar estas categorías y cuantificar el número de células que se encontraban en las diferentes categorías de ALI4 a ALI6, se observó un ligero retraso en el ensamblaje de los cilios en las células ATF4-KD. En ALI6, encontramos aproximadamente el 57 % de los CMC categorizados como Tipo IV/V en células ATF4-KD en comparación con el 75 % en las células de control (Figura RII.17, paneles B-E)

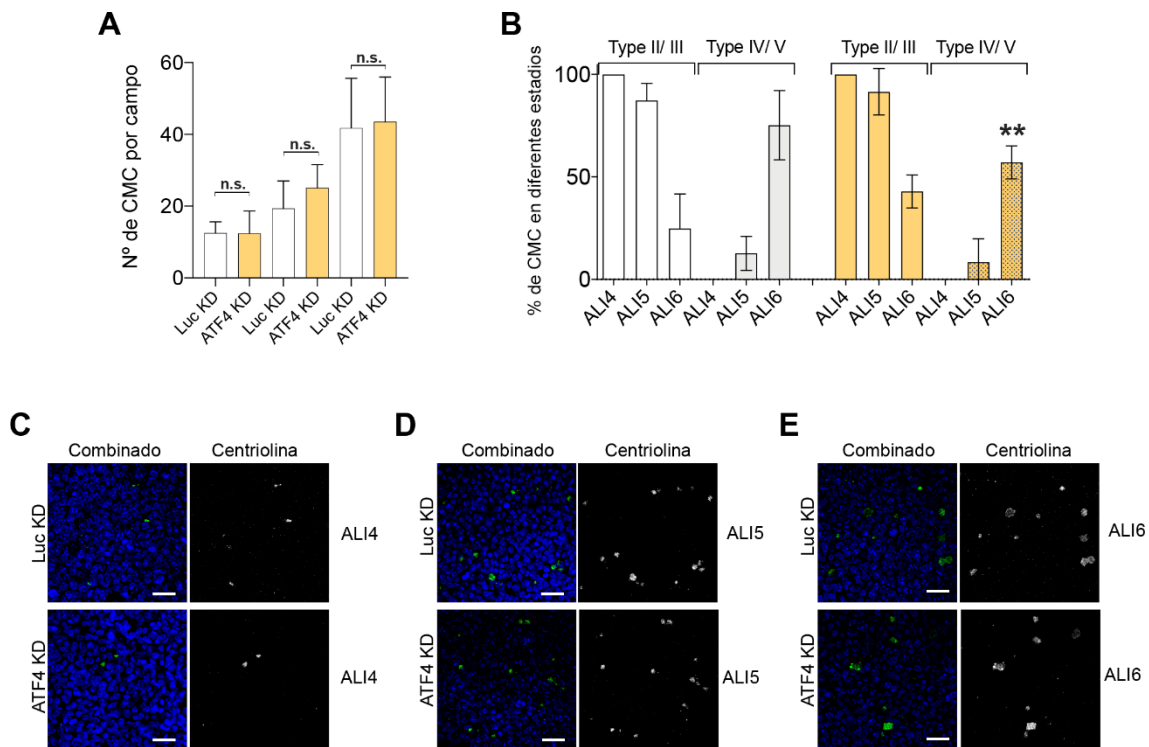


Figura RII. 17: El silenciamiento de *Atf4* no afecta al número de CMC, pero sí al ensamblaje de los cilios. A) Cuantificación del número total de deuterosomales/CMC durante las etapas iniciales de diferenciación. B) Cuantificación de deuterosomales/CMC en diferentes etapas de diferenciación en células control y ATF4-KD. El tipo II/III son aquellas células con tinción con centriolina en agregados, mientras que las de tipo IV/V son aquellas células con tinción con centriolina dispersas en la membrana apical. (C-D) Tinción con centriolina en control y células ATF4-KD en ALI 4 (C), ALI 5 (D) y ALI 6 (E). Las barras de escala en C, D y E representan 20 μ m. Los valores de P en todas las condiciones se obtuvieron mediante la prueba t de dos colas (** representa $p < 0,01$ y ns significa que no hay diferencias significativas).

Finalmente, se evaluó directamente el batido de los cilios en las células control y las células ATF4-KD en las monocapas epiteliales de las vías respiratorias, midiéndose la frecuencia del batido de los cilios por segundo (Figura RII.18). Es importante destacar que no se observó ninguna diferencia funcional significativa en los cilios entre las células ATF4-KD en comparación con las células de control (Figura 3, panel I). En resumen, este análisis de las CMC permitió concluir que, si bien la deficiencia de ATF4 regula de manera

negativa el programa transcripcional involucrado en el ensamblaje de los cilios, pero solo fue observado un leve retraso en la formación de los cilios. Sin embargo, los resultados muestran que este retraso no afecta la función de los cilios en el epitelio de las vías respiratorias ATF4-KD.

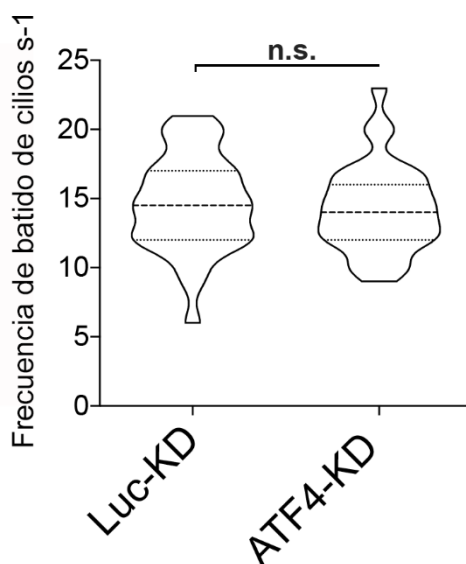


Figura RII. 18: Estudio del silenciamiento de Atf4 en la funcionalidad de los cilios. Cuantificación de la frecuencia de batidos por segundo de los cilios en células control (sh-Luc) y células Atf4-KD (sh-Atf4) n=32.

5. La señalización PERK/ATF4 es necesaria para la diferenciación de las células secretoras.

Atf4 es un factor de transcripción que se activa tras la fosforilación de eIF2 α en el residuo Ser-51. La fosforilación de eIF2 α puede estar mediada por varias quinasas, incluida la quinasa ER similar a PKR (PERK), la proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR), la quinasa eIF2 α regulada por hemo (HRI) y el control general no desreprezible 2 (GCN2), y cada uno activado por tensiones celulares específicas (Fessler et al., 2020) . Teniendo en

cuenta la observación de una defensa desregulada contra virus, y la disminución de los genes marcadores de la población de CS en los datos de RNA-seq, el objetivo fue investigar si PKR o PERK podrían ser responsables de la activación transcripcional de Atf4 durante la diferenciación de CMB. Para abordar esto, fue empleado un enfoque farmacológico utilizando el inhibidor de PERK (GSK2606414) y el inhibidor de PKR (C16) (Figura RII.19).

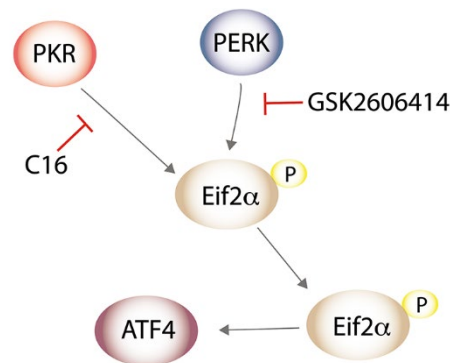


Figura RII. 19: Esquema de la ruta de señalización canónica de ATF4. La representación esquemática de la vía de señalización canónica que involucra a Atf4 y el enfoque farmacológico correspondiente empleado.

En este estudio, se utilizó Nutlin3a como control positivo, el cual afecta al proceso de diferenciación tanto de CS como de CMC (Garrido-Jimenez et al., 2021), y se empleó DMSO como control negativo ya que no afecta a la diferenciación. Después del tratamiento, tanto con Nutlin3a y DMSO, como los inhibidores de PERK y PKR durante los 14 días de diferenciación, se evaluaron los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de CMB, CMC y CS. Los resultados mostraron que el inhibidor de PKR (C16), no afectó significativamente los niveles de expresión de los marcadores *Foxj1* y *Mcidas* (CMC), *Scgb1a1*, *Scgb3a2* y *Spdef* (CS) (Figura RII.20, paneles A-G). Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de PERK (GSK2606414) dio como resultado una disminución significativa en la expresión de los tres marcadores de células secretoras en comparación con el tratamiento con DMSO (Figura RII.20, paneles

A-G). En particular, este fenotipo del inhibidor de PERK difirió del observado con Nutlin3a, donde la regulación positiva de p53, conduce a la supresión tanto de los marcadores de CS como de CMC (Figura RII.20, paneles A-G), mientras que el inhibidor de PERK solo afecta a la diferenciación de las CS.

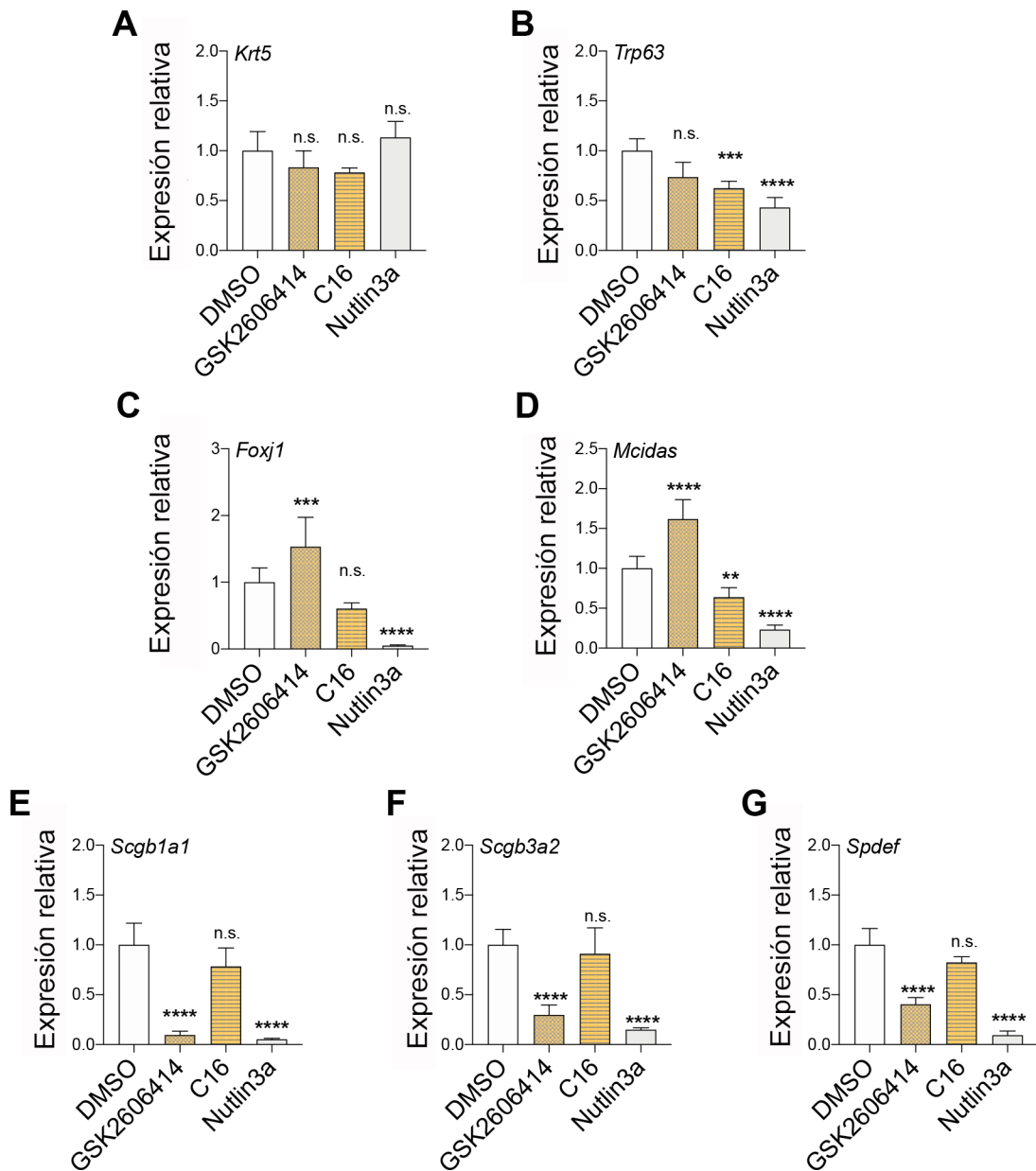


Figura RII. 20: Análisis de las poblaciones celulares del epitelio respiratorio tras la inhibición de PKR y PERK. Niveles de expresión de ARNm en células epiteliales de las vías respiratorias tratadas con DMSO, GSK2606414, C16 y Nutlin3a. *Krt5* y *Trp63* para células basales (A y B), *Foxj1* y *Mcidas* para MCC (C y D), *Scgb1a1* y *Scgb3a2* para células club (E y F) y *Spdef* para células caliciformes (G). Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=8.

Las columnas representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a las condiciones control (DMSO). Los valores de P en todas las condiciones se obtuvieron mediante la prueba t de dos colas (**** representa $p < 0,0001$, *** representa $p < 0,001$, ** representa $p < 0,01$ y ns significa que no hay diferencias significativas).

Para investigar más a fondo la vía de señalización de ATF4 aguas arriba, fueron examinados los niveles de expresión y fosforilación de eIF2 α en la serina 51 en células ATF4-KD y células tratadas con el inhibidor PERK, mediante *western blot*. En estas condiciones experimentales, las CMB tratadas con GSK2606414 durante los 14 días de diferenciación mostraron una mayor fosforilación de eIF2 α en comparación con las células tratadas con DMSO durante el mismo periodo de tiempo (Figura RII.21, panel A). De manera similar, las células ATF4-KD también exhibieron niveles elevados de eIF2 α fosforilado (Figura RII.21, panel B). El eIF2 α fosforilado (P-eIF2 α) funciona para reprimir la traducción general al inhibir el eIF2B, el factor de intercambio de nucleótidos de guanina responsable de reciclar el eIF2 inactivo a su forma activa (Figura RII.21, panel C).

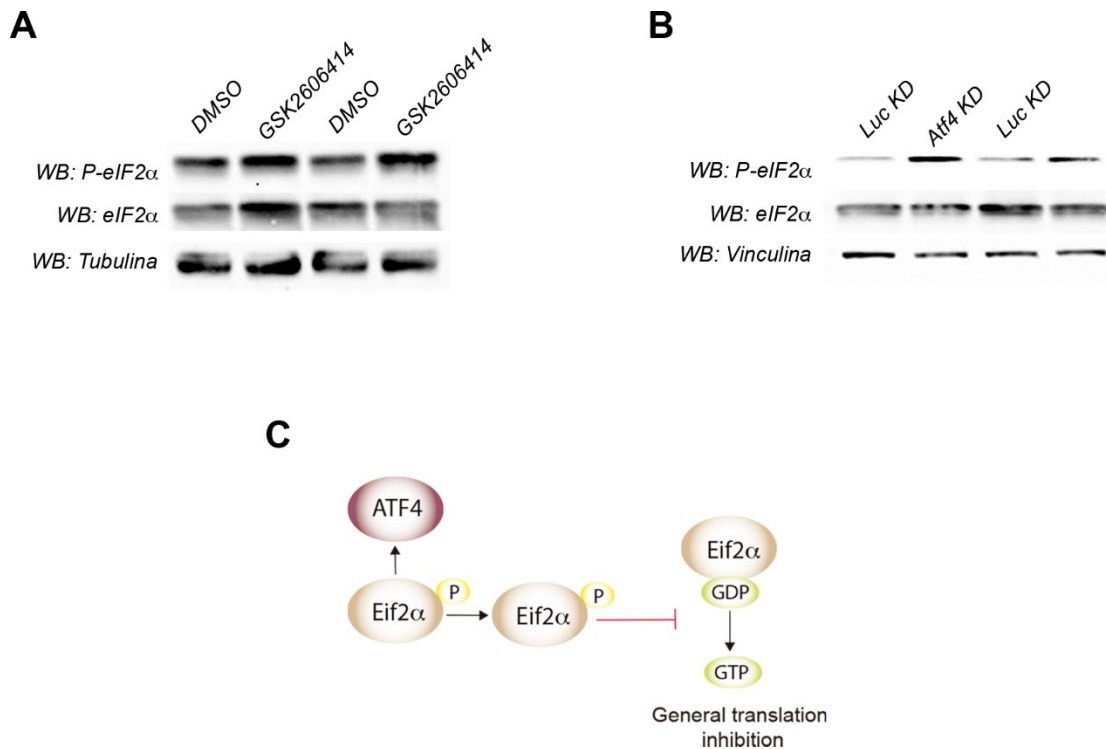


Figura RII.21: Estudio de la vía de señalización de Atf4 mediada por la fosforilación de eIF2α. (A y B) Imágenes de transferencias Western para eIF2α, eIF2α fosforilado y vinculina en células tratadas con DMSO o GSK2606414 (A) y células control Luc-KD y células ATF4-KD (B). (C) esquema de la ruta de activación de Atf4 a través de eIF2α.

En base a estos resultados, es posible que la inhibición de la traducción general en células ATF4-KD o células tratadas con inhibidor PERK pueda contribuir al fenotipo de diferenciación observado. Para estudiar esta posibilidad, se utilizó ISRIB, un inhibidor de molécula pequeña de la vía de respuesta integrada al estrés (ISR). Se sabe que ISRIB rescata la traducción general al facilitar el ensamblaje de eIF2B en su forma activa, incluso en presencia de eIF2α fosforilado (Rabouw et al., 2019; Zyryanova et al., 2018). Por lo tanto, se trataron células de control y ATF4-KD con ISRIB y se analizó el estado de diferenciación de las CMB. Se evaluó la expresión relativa de los genes marcadores de las diferentes poblaciones celulares (Krt5, Foxj1, Scgb1a1 y Muc5ac) y los resultados mostraron que el tratamiento con ISRIB no afectó significativamente a ninguno de estos marcadores (Figura RII.22, paneles A-D). Además, el tratamiento con ISRIB en las células ATF4-KD no alteró el fenotipo

de ATF4-KD, donde se observó una disminución de los marcadores de CS (Figura RII.22, paneles A-D). Estos resultados sugieren que el fenotipo de diferenciación asociado con la deficiencia de ATF4 no se rescata con el tratamiento con ISRIB, lo que indica que otros factores o vías posteriores a ATF4 pueden estar involucrados en este proceso.

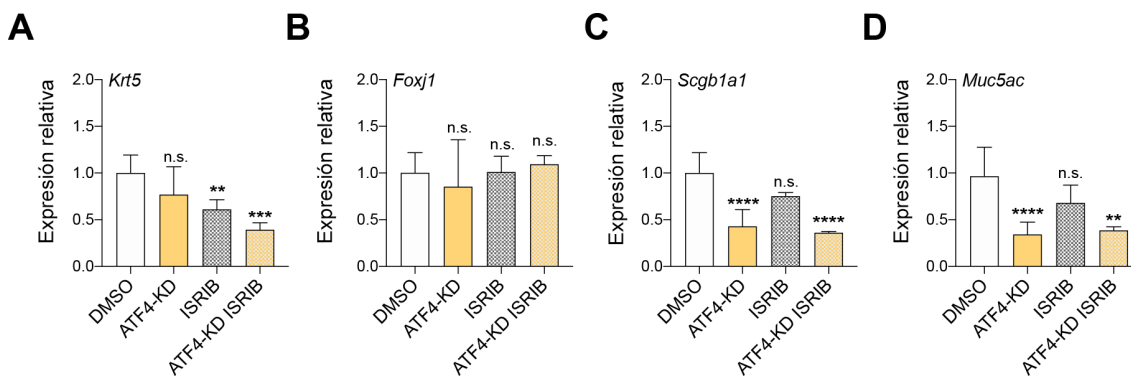
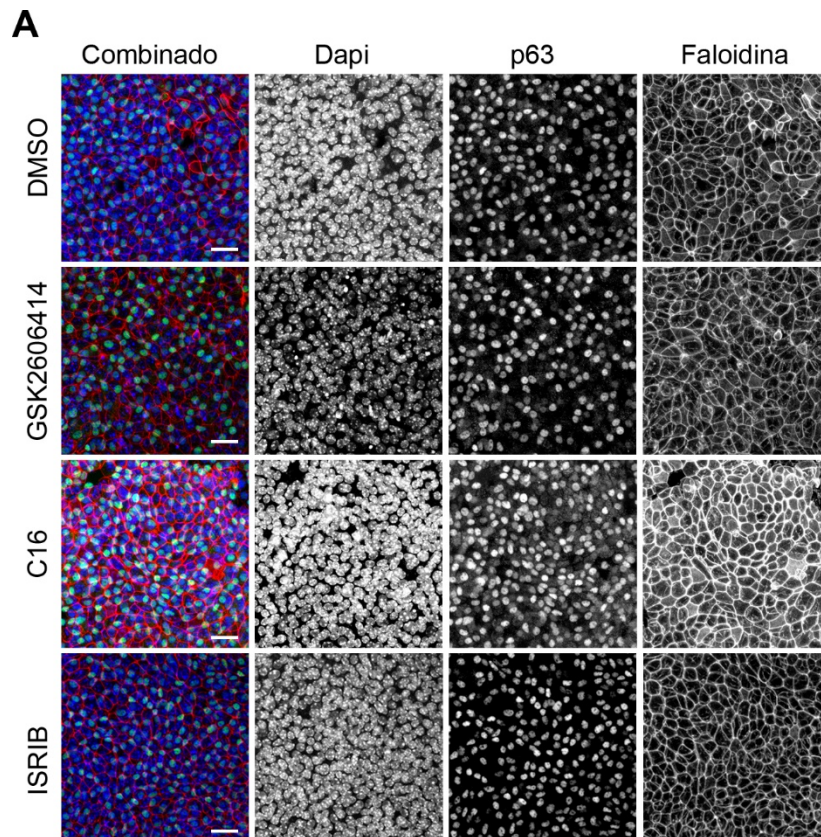


Figura RII. 22: Análisis de las poblaciones celulares del epitelio respiratorio tras el tratamiento con el inhibidor ISRIB. Niveles de expresión de ARNm en células epiteliales de las vías respiratorias tratadas con DMSO e ISRIB. *Krt5* para células basales (A), *Foxj1* para MCC (B), *Scgb1a1* para células club (C) y *Muc5ac* para células caliciformes (D). Se utilizó la expresión de *Eif1a* para normalizar los niveles de expresión, n=8. Las columnas representan la media, y las barras de error representan la desviación estándar para cada condición. Las cuantificaciones se hicieron relativas a las condiciones control (DMSO). Los valores de P en todas las condiciones se obtuvieron mediante la prueba t de dos colas (**** representa $p < 0,0001$, *** representa $p < 0,001$, ** representa $p < 0,01$ y ns significa que no hay diferencias significativas).

Para validar estos resultados, se realizó un inmunomarcaje, con anticuerpos para p63, *Scgb1a1* y *Foxj1* en las monocapas de células epiteliales de las vías respiratorias tratadas con DMSO, C16, GSK2606414 e ISRIB. De acuerdo con lo esperado y con los anteriores resultados, no se observó cambios

significativos en el marcaje de células positivas para p63 o Foxj1 entre las células tratadas con DMSO, C16, ISRIB o GSK2606414, es decir, el tratamiento con los inhibidores no afecta a la diferenciación de CMB a células MCM (Figura RII.23, paneles A y B), lo cual se corresponde con los resultados previos.



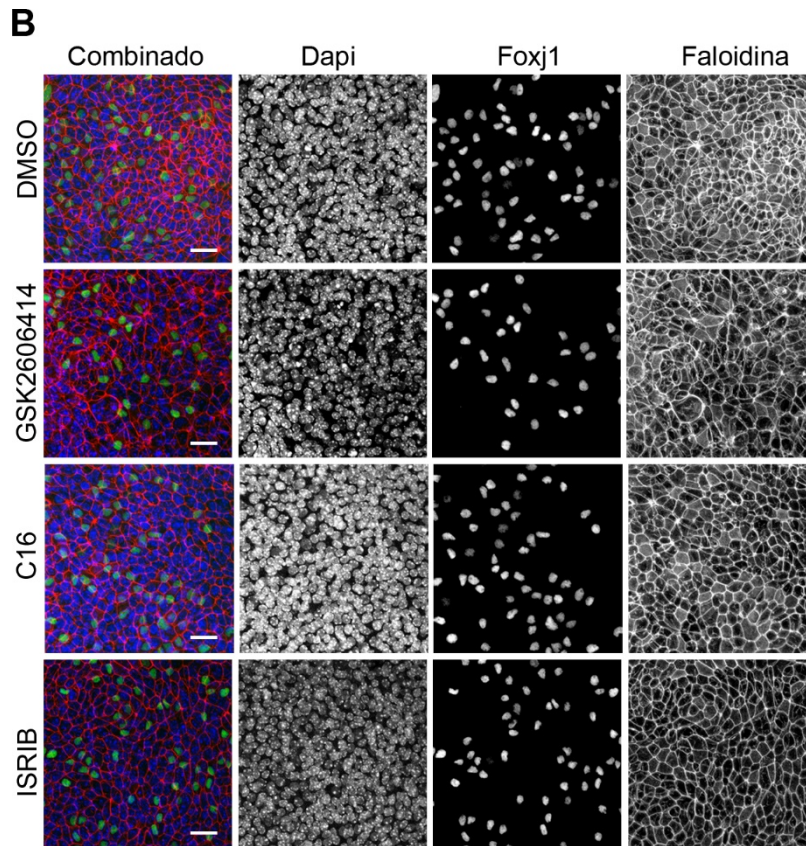


Figura RII. 23: Los inhibidores de la vía de señalización canónica de ATF4, no afecta a la diferenciación de las CMC en el epitelio de las vías respiratorias. (A) Inmunofluorescencia para p63 en MTEC en ALI14 tratados con DMSO, GSK2606414, C16 e ISRIB. (B) Inmunofluorescencia para Foxj1 (B) en MTEC en ALI14 tratados con DMSO, GSK2606414, C16 e ISRIB. Las barras de escala representan 20 μ m.

Sin embargo, si se observó que el tratamiento con GSK2606414 disminuía casi por completo el número de células positivas del marcaje con el anticuerpo para Scgb1a1, marcador de CS en el epitelio de las vías respiratorias en comparación con los tratamientos con DMSO, C16 e ISRIB (Figura RII.24, compare los paneles A y C). Estos resultados respaldan aún más el papel crucial de la señalización PERK/ATF4 en la diferenciación de células secretoras, independientemente de la traducción general.

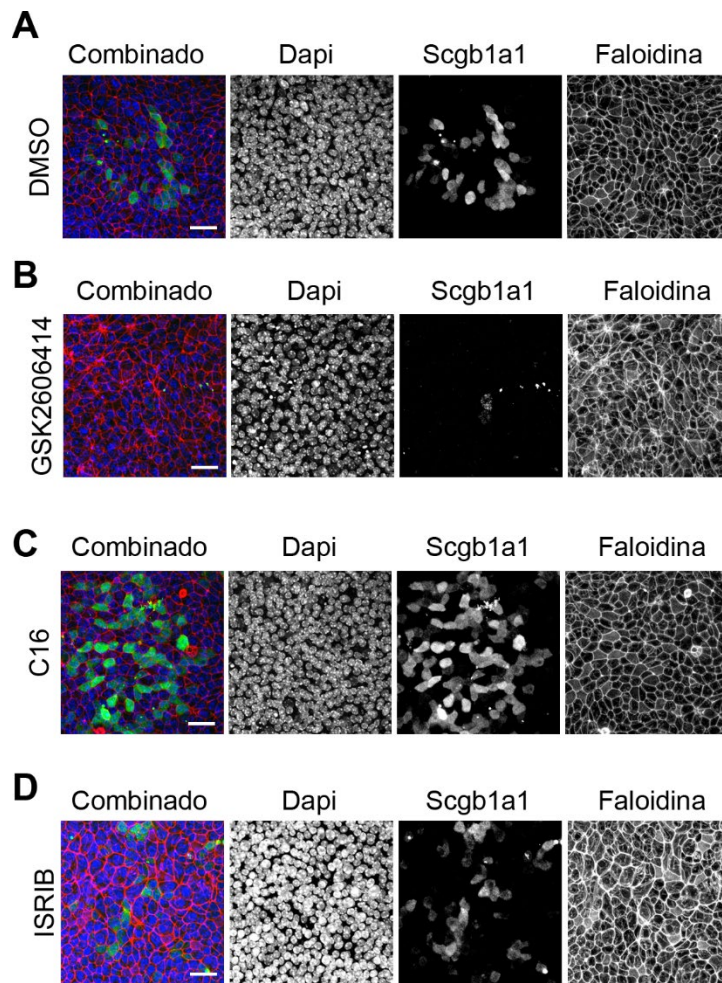


Figura RII. 24: Estudio del efecto de los inhibidores de la vía de señalización canónica de ATF4, sobre la diferenciación a CS. Inmunofluorescencia para Scgb1a1 en MTEC en ALI14 tratados con DMSO (A), GSK2606414 (B), C16 (C) e ISRIB (D). Las barras de escala representan 20 μm.

6. ATF4 se une directamente a elementos reguladores transcripcionales de genes relacionados con la diferenciación celular importantes para el desarrollo epitelial de las vías respiratorias.

En cuanto al epitelio de las vías respiratorias, Atf4 se ha asociado con condiciones patológicas del tracto respiratorio. Hay tres ejemplos notables de esta relación: i) los objetivos transcripcionales de Atf4 están regulados positivamente en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica

(EPOC) (Aggarwal et al., 2018), ii) la expresión de Atf4 en el epitelio de las vías respiratorias aumenta durante las infecciones virales, incluidas las causadas por el SARS-CoV-2 (Vanderheiden et al., 2020b), y iii) la vía de respuesta de la proteína desplegada, que involucra a Atf4 y PERK, se activa en un modelo de lesión pulmonar crónica en roedores. Curiosamente, en este modelo experimental, los ratones con expresión reducida de Atf4 (Atf4+/-) estaban protegidos contra la lesión pulmonar (Aggarwal et al., 2018). Con base en esta información y los datos de diferenciación, se decidió explorar los objetivos transcripcionales responsables de nuestros fenotipos Atf4.

Para hacer esto, se estudió el papel regulador transcripcional de Atf4 durante la diferenciación de las células de las vías respiratorias, realizando Atf4 chIP-seq en muestras de ALI6 MTEC. Con los datos resultantes, representados en un diagrama de sectores, se observó que Atf4 estaba unido a múltiples sitios ubicados en regiones distales (azul celeste) y promotoras (amarillo), así como intrónicas en un alto porcentaje (naranja). En menor medida se unen a regiones 3UTR y 5UTR (lila y azul oscuro respectivamente) (Figura RII.25).

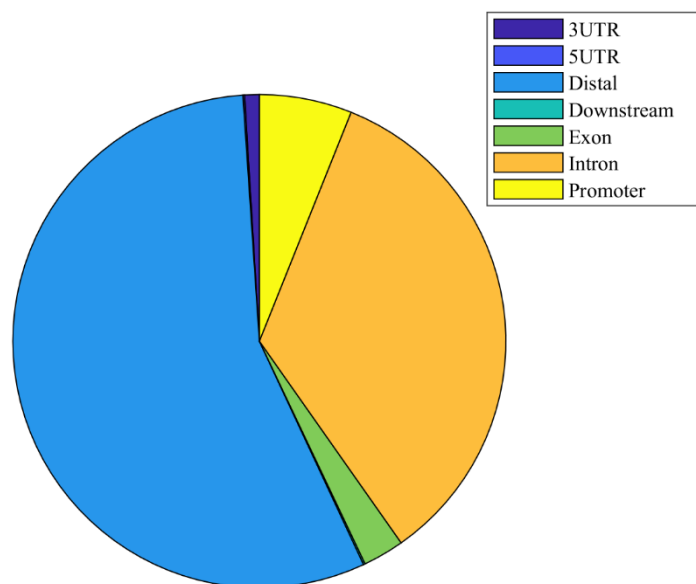


Figura RII. 25: Identificación de las regiones de los sitios de unión de Atf4. Representación mediante diagrama de sectores, de las regiones donde se encuentran los sitios de unión de Atf4.

También, estos resultados muestran que más del 30% de estas regiones incluían un sitio de unión a Atf4 canónico, lo que respalda la especificidad del chIP-seq (Figura RII.26, panel A). A pesar de estar ubicados preferentemente en regiones distales como se observa en el diagrama de sectores, la densidad de los picos fue mayor alrededor del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de los genes (Figura RII.26, panel B). Para profundizar aún más en este estudio, se realizó un chIP-seq de muestras en ALI6, tratadas con GSK2606414 para compararlas con las muestras sin tratamiento, en este caso con DMSO. Los resultados de este experimento revelaron que las lecturas en los picos de Atf4 detectados previamente se alteraron profundamente después del tratamiento farmacológico, mostrándose así que GSK2606414 provocó la liberación de Atf4 de sus sitios de unión (Figura RII.26, panel C).

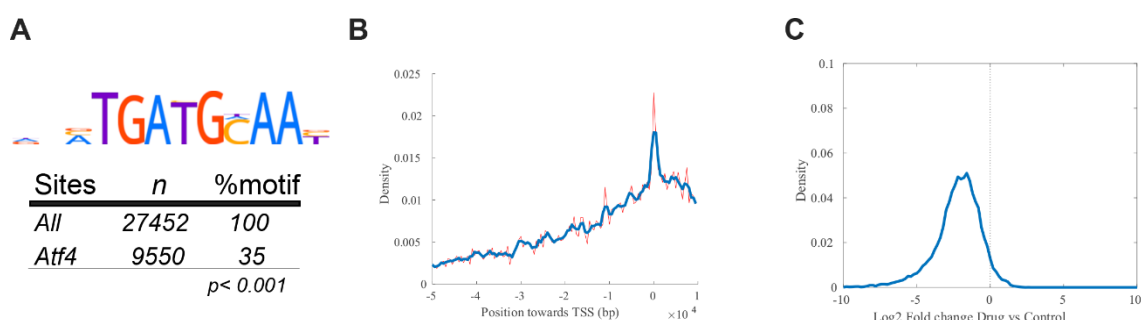


Figura RII. 26: Análisis de los sitios de unión de Atf4. (A) Logotipo del motivo Atf4 detectado en las regiones de los picos, con número de regiones y % de los picos. (B) Posición de los picos de Atf4 (en pares de bases) alrededor de los sitios de inicio de la transcripción (TSS) de genes conocidos. En rojo y azul se representa la señal cruda y suavizada, respectivamente. (C) Comparación de la profundidad de lectura en las regiones del pico Atf4 en muestras de control y tratadas con fármacos, representadas como un histograma de densidad.

Tras los resultados obtenidos mediante el chIP-seq, se recuperaron los principales genes candidatos para ser regulados por Atf4 (consulte la sección Materiales y métodos), y se realizó un análisis de ontología genética.

Curiosamente, se observó una representación excesiva de genes relacionados con el retículo endoplásmico, así como con la diferenciación de osteoblastos, como se observan en la figura RII. 27.

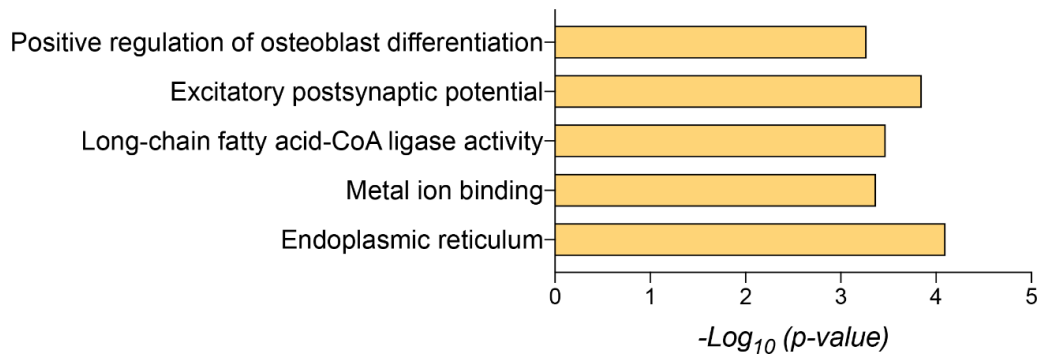


Figura RII. 27: Análisis de ontología génica (GO) de procesos biológicos en ausencia de Atf4. Se muestra el enriquecimiento en diversos términos a través de la significancia de genes desregulados involucrados en cada proceso. Las barras representan el P valor.

En cuanto a la diferenciación de osteoblastos, implica la transformación de osteoblastos inmaduros en osteoblastos maduros, que se encargan de sintetizar la matriz extracelular ósea durante la osteogénesis, como el colágeno tipo 1 alfa 1 (Col1 α 1) (Blair et al., 2017). Además, se ha demostrado que los osteoblastos secretan factores como osteopontina, osteocalcina y proteínas morfogenéticas óseas (BMP), que desempeñan funciones cruciales en la mineralización ósea, la homeostasis del calcio y las vías de señalización celular implicadas en la osteogénesis (Blair et al., 2017). En base a este conocimiento, se seleccionaron los genes candidatos de la categoría de diferenciación de osteoblastos debido a su relación funcional prevista con Atf4, que como se ha visto en apartados anteriores, juega un papel crucial en la diferenciación de las células secretoras (Figura RII. 28).

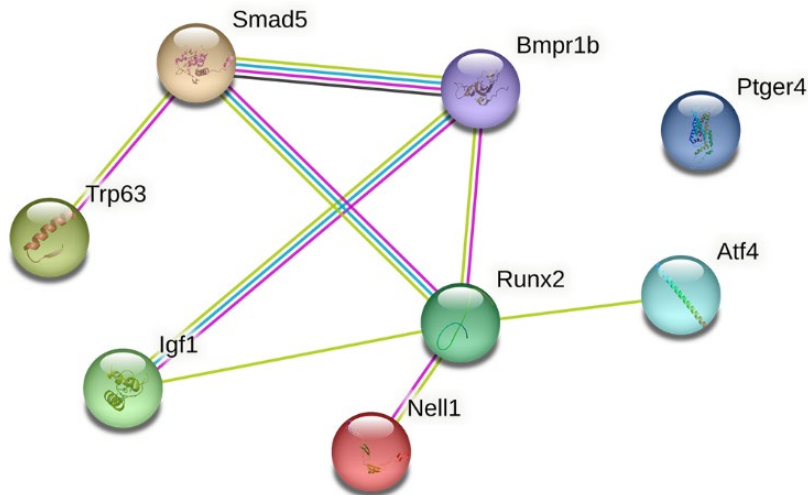


Figura RII. 28: Estudio de las redes de interacción proteína-proteína: Redes de interacción proteína-proteína de Atf4 y proteínas de la ruta de diferenciación de osteoblastos mediante análisis STRING.

A continuación, fueron analizados los sitios de unión del chip Atf de este conjunto de genes relacionados con la diferenciación de osteoblasto, así como su expresión después de GSK2606414. En cuanto a los picos de unión, los resultados muestran como en Smad5, Bmpr1b, Runx2 y Ptger4 bajaron, además de observarse esta liberación de atf4 en sus regiones promotoras (Figura RII. 29, paneles A, C, E y G). También se observó en estos resultados, que tanto Smad5 como Bmpr1b disminuyeron su expresión después del tratamiento con GSK2606414, de manera concomitante con la liberación de Atf4 de sus regiones promotoras (Figura RII. 29, paneles B y D). Sin embargo, se observó en Runx2 y Ptger4 una liberación de Atf4 de sus regiones promotoras, pero no una disminución de su expresión tras el tratamiento de GSK2606414 (Figura RII.29, paneles F y H).

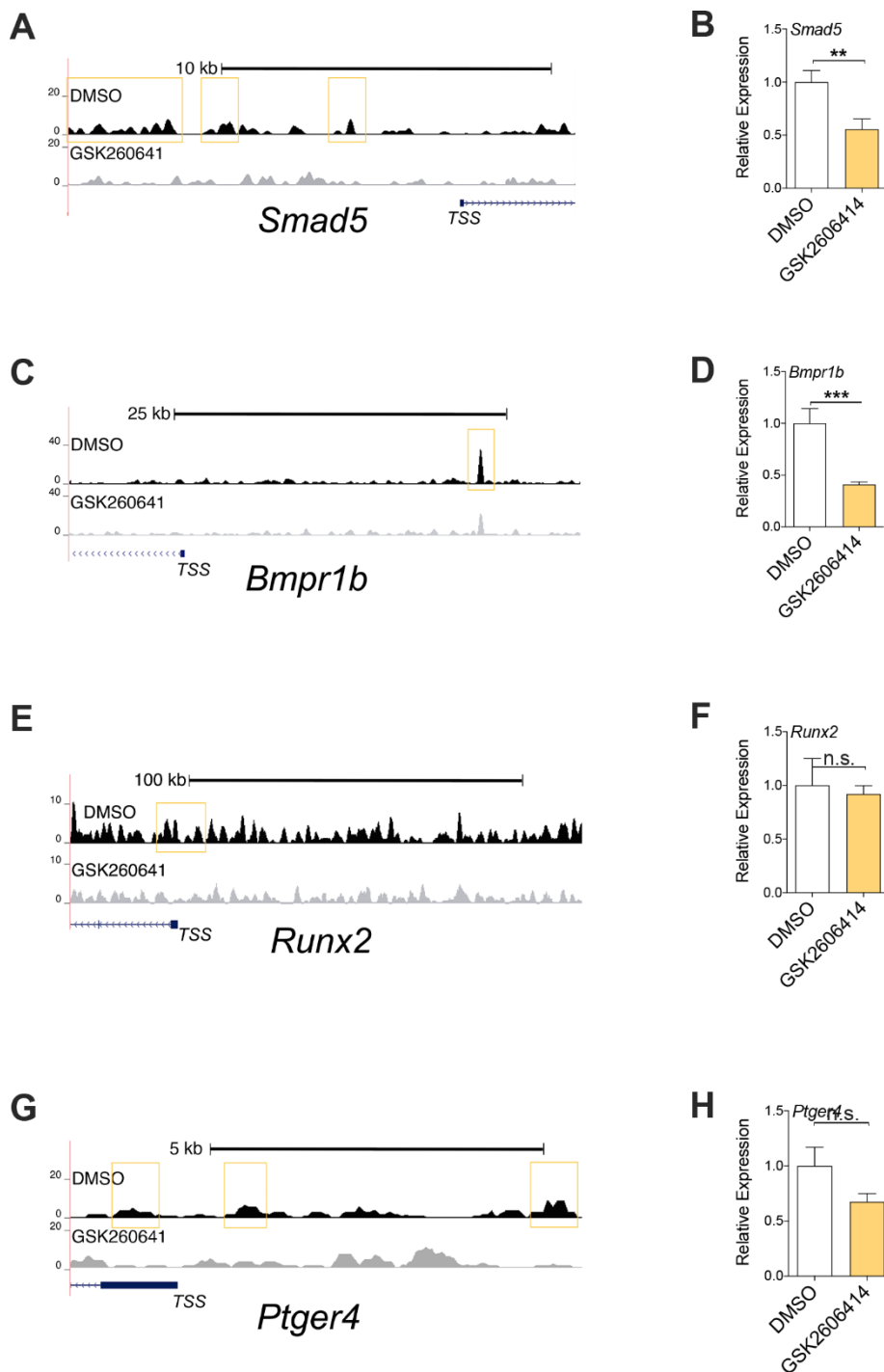


Figura RII. 29: La unión de Atf4 durante la diferenciación temprana está relacionada con las vías de diferenciación de osteoblastos descritas. Seguimiento genómico de lecturas alineadas en la región promotora A) *Smad5* C) *Bmpr1b*, E) *Runx2* y G) *Ptger4* para Atf4 chIP-seq en MTEC ALI6 tratados con DMSO (arriba) y GSK2606414 (abajo). El cuadro amarillo indica un pico de Atf4 detectado por MACS2. Niveles de expresión de ARNm en DMSO o GSK2606414 para B) *Smad5*, D) *Bmpr1b*, F) *Runx2* y H) *Ptger4*. Los valores de P en G e I se obtuvieron

mediante la prueba t de dos colas (***) representa $p < 0,001$, ** representa $p < 0,01$ y ns significa que no hay diferencias significativas).

La participación directa de Smad5 y Bmpr1B en la diferenciación de SC sigue siendo incierta (M. Wu et al., 2016). Así, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una posible conexión directa entre Atf4 y la diferenciación exitosa de SC, mediada en parte por Bmpr1b y Smad5 (Figura RII. 31). Además, aunque Atf4 y Runx2 han sido ampliamente reconocidos por sus importantes funciones en la diferenciación de osteoblastos, como lo demuestran los estudios de Dobrevá et al. 2006 y Xiao et al. 2005 no descubrimos el control directo de la expresión de Runx2 por parte de PERK/Atf4 en el contexto de la diferenciación de CS. Estos estudios previos proporcionan pruebas sólidas de la participación de Atf4 y Runx2 en la diferenciación de osteoblastos, pero su influencia directa en las CS de las vías respiratorias aún no se ha dilucidado (Dobrevá et al, 2006; Xiao et al, 2005).

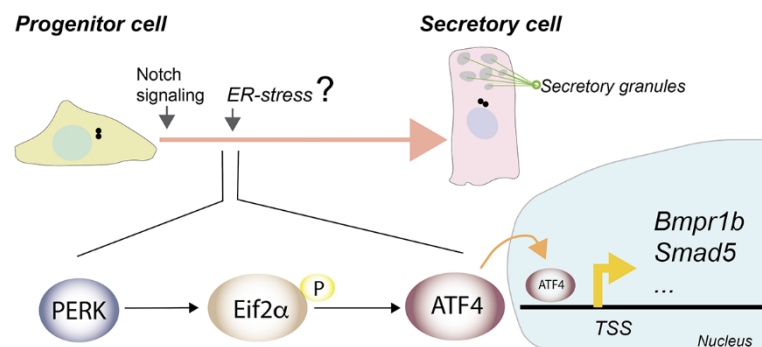


Figura RII. 30: Esquema de Atf4 durante el proceso de diferenciación. Representación esquemática que muestra la función PERK/Atf4 durante la diferenciación de las vías respiratorias.

7. Papel de PERK/ATF4 en la respuesta inmune.

Como muestran los resultados del apartado 3, mediante la realización de un análisis de expresión de RNA-seq en células control y ATF4-KD durante la diferenciación de BSC, se identificaron 180 genes significativamente regulados a la baja y 379 genes significativamente regulados al alza en ausencia de ATF4 (Figura RII.10, paneles A y B). Posteriormente, se realizó un análisis de ontología génica utilizando el programa “DAVID” para explorar más a fondo las implicaciones funcionales de ATF4, revelando este análisis que el programa de respuesta inmunitaria innata, incluida la respuesta a los virus y la respuesta celular al interferón, estaba regulado al alza en las células ATF4-KD en comparación con las células de control (Figura RII.12). Además, estudios recientes han identificado al factor de transcripción activador ATF4, como impulsor clave de la respuesta de citoquinas proinflamatorias y la respuesta inmunitaria frente al virus SARS-CoV2 (Vanderheiden et al., 2020a). En base a esto, se decidió realizar un estudio más exhaustivo de los genes involucrados en esta respuesta inmune innata, para obtener una mayor comprensión del papel que tiene ATF4. Para ello, se analizó la expresión de Mx1, Mx2, Oas1, Oas2, Oas3, Irf7, Ift1, Ift2 y Ift3. En los resultados obtenidos, se observó un aumento en la expresión de los Oas e Irf7 en las células ATF4-KD con respecto a la expresión de estos en las células control. Sin embargo, en el resto de los genes no se vio ninguna diferencia significativa. (Figura RII.32, paneles A-I). También, se evaluó la expresión de estos genes tras el tratamiento con GSK2606414, observándose una reversión de estos aumentos de expresión en las células ATF4-KD, volviendo a los niveles observados en las células control, (Figura RII.32, paneles A-I). Estos resultados, respaldan la relación directa de PERK/ATF4 con la respuesta inmune innata vista en los resultados anteriores.

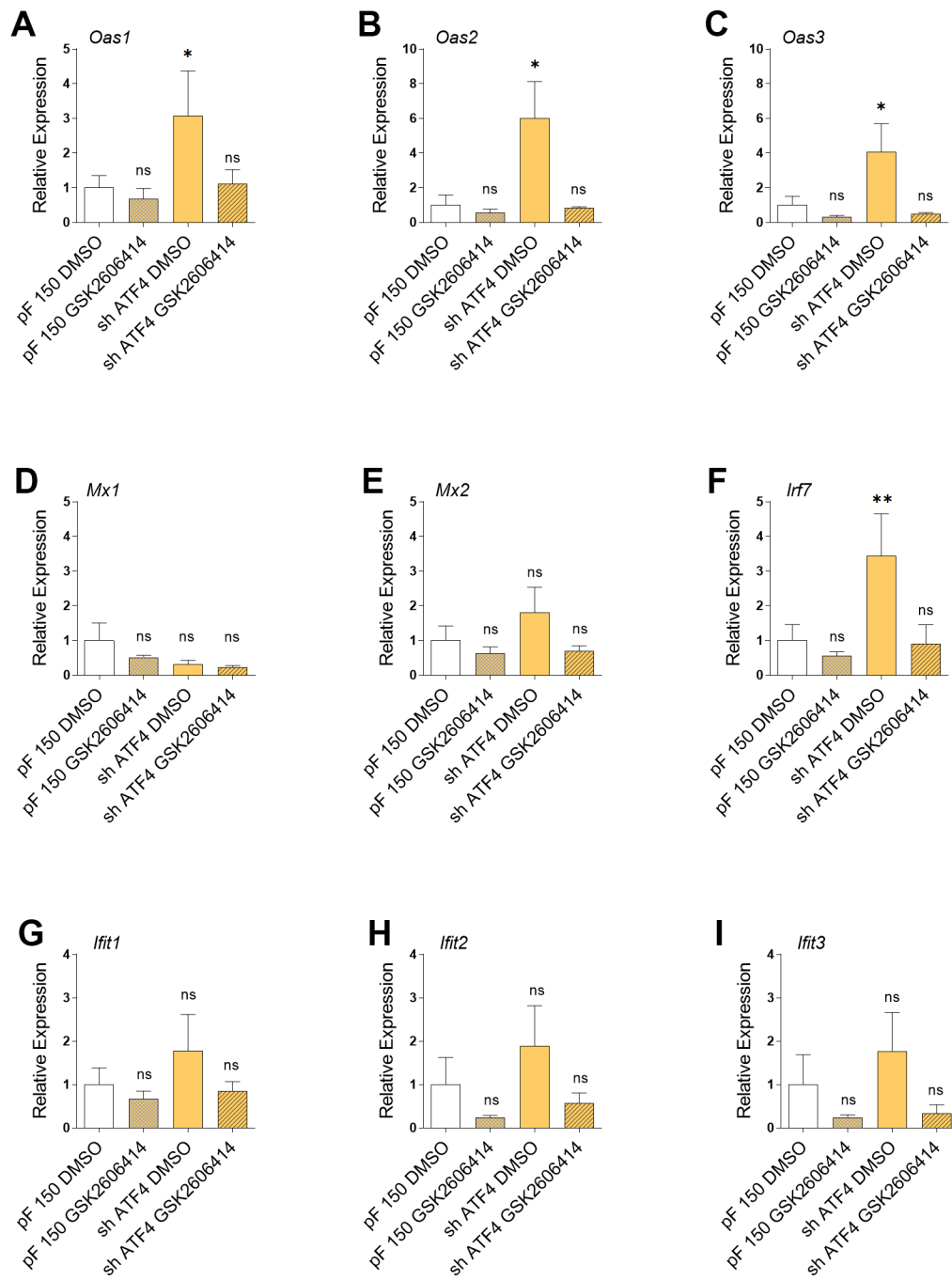


Figura RII. 32: Estudio del papel de Atf4 y el inhibidor de PERK sobre la señalización en la respuesta inmune innata. Niveles de expresión de ARNm en células epiteliales de las vías respiratorias control y ATF4-KD tratadas con DMSO y GSK2606414. Los valores de P en todas las condiciones se obtuvieron mediante la prueba t de dos colas (** representa $p < 0,01$, * representa $p < 0,1$ y ns significa que no hay diferencias significativas).

DISCUSIÓN CAPÍTULO II

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran que ATF4 juega un importante papel en el mantenimiento de las poblaciones celulares que componen las vías respiratorias, en concreto, en la diferenciación de células basales hacia células secretoras. Además, se relaciona ATF4 con la regulación de la respuesta inmune innata en el epitelio de las vías respiratorias. Sin embargo, se demostró que ATF4, no juega un papel clave en la diferenciación de las células multiciliadas, ni en la función de las mismas, viéndose relacionado únicamente en los tiempos de la formación del cilio.

En cuanto al papel relevante mostrado por Atf4 en la diferenciación de las células madres basales de las vías respiratorias hacia células secretoras, otros estudios han mostrado el papel de diferentes factores de transcripción relacionados con este proceso de diferenciación hacia células secretoras. El factor de transcripción proteína 1 de unión a X-box (XBP1) es fundamental para la diferenciación de las células B en células plasmáticas secretoras activas¹⁰¹. Ha sido descrito como un componente imprescindible de los programas de diferenciación activados a través del receptor de células B, mediante la inhibición de represores transcripcionales de la diferenciación de células plasmáticas, como el factor regulador de interferón 4 (IRF4) y la proteína de maduración inducida por linfocitos B 1 (BLIMP1)(C. C. A. Hu et al., 2009) . Otras investigaciones, han revelado una red transcripcional regulada por XBP1 que involucra genes de diferenciación clave, como la expresión 1 del músculo, el intestino y el estómago (MIST1)(Acosta-Alvear et al., 2007), mostrando que el eje XBP1-MIST1 es necesario para la maduración de las células zimógenas gástricas a fin de garantizar una biogénesis de gránulos eficiente para permitir la secreción de enzimas digestivas(Huh et al., 2010). Además, se ha mostrado también que IRE1 α presenta funciones adicionales en la diferenciación de células B en la etapa pre-células B, que están relacionadas con la recombinación de genes de inmunoglobulinas(K. Zhang et al., 2005).

Los factores de transcripción XBP1, IRE1 α y ATF4, son componentes principales de la respuesta a proteína desplegada (UPR), y se ha demostrado que la respuesta de proteína desplegada (UPR) juega un papel clave en el

proceso involucrado en la homeostasis del retículo endoplásmico (RE) y la diferenciación de las células secretoras. Esto concuerda con los resultados vistos en este trabajo donde ATF4 al igual que XBP1, juega un papel crucial en la diferenciación de células madre basales a células secretoras en el sistema respiratorio.

Además, los resultados de este trabajo, además de demostrar el papel de ATF4 en la diferenciación de las células secretoras, han mostrado una función transcripcional potencial de ATF4 en la regulación de la respuesta inmune innata en el epitelio de las vías respiratorias. En concreto se ha observado relación con la respuesta y defensa a virus, y respuesta a interferón beta.

Hay estudios que muestra esta relación entre ATF4 y la respuesta inmune. La infección con SARS-CoV2, predomina una fuerte respuesta de citoquinas proinflamatorias y citoquinas, entre las que se encuentran interleucina 6 (IL6), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y interleucina 8 (CXCL8), siendo los impulsores clave de esta respuesta de citoquinas proinflamatorias el factor de transcripción Kappa B (NF- κ B) y al factor de transcripción activador 4 (ATF4) (Vanderheiden et al., 2020a). Por otro lado, ATF4 es un elemento clave en la respuesta a estrés del retículo endoplasmático, el cual se ha relacionado con la respuesta inmune, debido a que contribuye a la patogenia de varias enfermedades, incluidas la obesidad, la diabetes, el cáncer, trastornos neurodegenerativos y la enfermedades inflamatorias y autoinmunes (So, 2018). Otros estudios han mostrado que el estrés del RE, induce una respuesta inflamatoria mediante los factores de transcripción de UPR, y que esta citoquinas inflamatorias aumentan la transcripción de genes relacionados con la respuesta al estrés del RE, incluido *Atf4*, *Xbp1* y *Chop*, que además son clave en la apoptosis (Endo et al., 2005).

Como se indicó anteriormente y muestran los resultados tanto ATF4 como PERK, ambos están involucrados en la diferenciación de las células secretoras en las vías del sistema respiratorio. Además, se ha visto que están relacionados

con otros procesos de diferenciación. Estudios recientes han demostrado que la ruta de señalización PERK-EIF2 α -ATF4 regula la diferenciación y proliferación de osteoblastos (K. Zhang et al., 2019). Los osteoblastos se componen de estructuras subcelulares típicas, como el retículo endoplásmico (RE) agrandado, que expresan muchas proteínas secretadas recientemente sintetizadas que están estrechamente relacionadas con la formación ósea, como la osteocalcina (Ocn) y el colágeno tipo I (Col1a1) (Long, 2011). Otros estudios han observado que la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) induce un estrés leve en el RE, relacionado con la señalización de PERK-EIF2 α en los osteoblastos, y regula la expresión de genes relacionados con la formación ósea, como Ocn, a través del factor de transcripción ATF4 (Saito et al., 2011a). ATF4 desempeña funciones clave en la proliferación y diferenciación de osteoblastos mediante su regulación transcripcional de genes clave implicados en la formación ósea (Ocn, Col1a1, Osterix, VEGF, etc.) (X. Yang et al., 2004; K. Zhu et al., 2013). Además, también se ha demostrado que la proteína PTH (hormona paratiroidea) aumenta la expresión de ATF4 en los osteoblastos. La PTH induce estrés en el RE y regula la expresión de ATF4 a través de la señalización PERK-EIF2 relacionada con el estrés del RE en los osteoblastos (K. Zhang et al., 2019).

Algunos investigadores han demostrado que la vía de señal PERK-eIF2 α -ATF4, además de estar involucrada en la diferenciación de los osteoblastos (Saito et al., 2011b), también lo está en la diferenciación de las células del ligamento periodontal (S. Y. Yang et al., 2016). Dados los efectos del estrés del RE sobre la osteogénesis, existen algunas similitudes entre la odontogénesis y la osteogénesis, y se ha visto que la vía PERK-eIF2 α -ATF4 está involucrada en la diferenciación odontoblástica de las DPC (células de la pulpa dental) (L. Li et al., 2022). ATF4 también ha sido relacionado con la diferenciación del tejido de las glándulas mamarias. En este caso se ha demostrado que ATF4 independiente de PERK, está involucrado en el mecanismo de diferenciación celular, ya sea directa o indirectamente, a través del control de la expresión de receptores de hormonas lactogénicas en el tejido de las glándulas mamarias (Yonekura et al., 2018).

Por último, en los resultados de este trabajo obtenidos mediante chIP-seq de ATF4, se observaron multitud de picos de unión de este factor de transcripción. A pesar de estar ubicados preferentemente en regiones distales, la densidad de los picos fue mayor alrededor del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de los genes, y mediante un análisis de ontología de estos genes candidatos a ser regulado por *Atf4*, se observó una representación excesiva de genes relacionados con el retículo endoplasmático y con la diferenciación de osteoblastos. En este estudio nos centramos en el conjunto de genes involucrados en la diferenciación de osteoblasto, mostrando una relación directa de *Atf4* con *Smad5* y *Bmpr1B* en el epitelio de las vías del sistema respiratorio.

Sin embargo, ATF4 es un factor de transcripción inducido por estrés que controla la expresión de una amplia gama de genes adaptativos que permiten a las células soportar períodos de estrés, como hipoxia o limitación de aminoácidos. Sin embargo, en condiciones de estrés persistente, ATF4 promueve la inducción de apoptosis (Wortel et al., 2017). Estas vías inducidas por el estrés son la respuesta de la proteína desplegada (UPR) activada por el estrés del RE (Y. Ma & Hendershot, 2004), la respuesta celular a la baja niveles de oxígeno (Harris, 2002) y la respuesta de aminoácidos (AAR) activada por la privación de aminoácidos (Kilberg et al., 2009). Curiosamente, cada una de estas vías comparte una proteína efectora común, ATF4. Este factor de transcripción es el regulador maestro de la respuesta celular al estrés. La mayoría de sus genes diana están implicados en diversas vías de recuperación que promueven la supervivencia celular, pero otros preparan la célula para la apoptosis (Wortel et al., 2017).

El factor de transcripción ATF4, como mencionamos anteriormente, se une directamente y controla la expresión de genes diana implicados en respuestas adaptativas o en la inducción de apoptosis. ATF4 induce GADD34, lo que conduce a un circuito de retroalimentación negativa que implica la desfosforilación de eIF2 α y la restauración de la traducción (Novoa et al., 2003). La señalización de ATF4 también se cruza con la vía del objetivo de la rapamicina (mTOR) en los mamíferos, que detecta la disponibilidad de aminoácidos y activa la síntesis de proteínas (Guan et al., 2014). ATF4 mejora la actividad de mTOR al aumentar la disponibilidad de aminoácidos a través de la

autofagia y al regular positivamente los genes adaptativos (X. Yu & Long, 2015). Por el contrario, ATF4 induce la expresión de los represores de mTOR, como SESN2, DDIT4 y REDD1 (Guan et al., 2014). Otros estudios han demostrado, que la dimerización de ATF4 con la proteína homóloga de C/EBP (CHOP) se asoció con el cambio a la señalización proapoptótica (Teske et al., 2013) regulando mediadores de la apoptosis como BCL2 y BIM. Sin embargo, también se ha visto que ATF4 puede inducir apoptosis en líneas celulares cancerosas independientemente de CHOP (Teske et al., 2013).

CONCLUSIONES CAPÍTULO II

1. La regulación de los niveles de Atf4 juega un importante papel en el mantenimiento del balance de las poblaciones celulares que componen las vías respiratorias. Concretamente, Atf4 actuaría en la diferenciación de células basales hacia células secretoras.
2. Atf4 presenta una importante función transcripcional en la regulación de la respuesta inmunitaria innata en el epitelio de las vías respiratorias.
3. La deficiencia de ATF4 regula a la baja el programa transcripcional involucrado en el ensamblaje de los cilios, causando un leve retraso en la formación de los cilios, pero no afecta la función de los cilios en el epitelio de las vías respiratorias.
4. La señalización PERK/ATF4 juega un papel crucial en la diferenciación de células secretoras.
5. La señalización de PERK/ATF4 muestra una relación directa con la respuesta inmune innata.

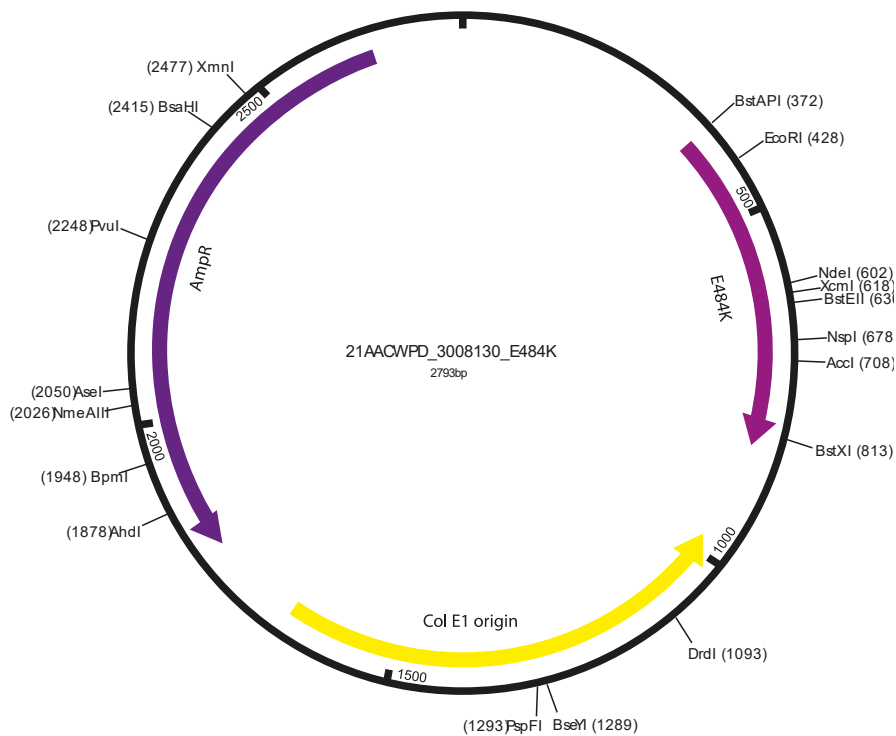
MATERIALES Y MÉTODOS

1. Desarrollo del kit de detección

1.1. Diseño de los vectores para el kit de detección.

Para el diseño de los vectores, en primer lugar, se buscó el transcrito de la proteína *spike*, que fue obtenida de la base de datos NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Una vez obtenida, se identificaron y localizaron dos de las principales mutaciones E484K y N501Y, tras lo cual mediante el programa *snappene* fueron introducidas en la secuencia del transcrito de *spike*, se introdujeron en un vector, los cuales fueron mandados a sintetizar a *ThermoFisher Science* (Figura M.1)

A



B

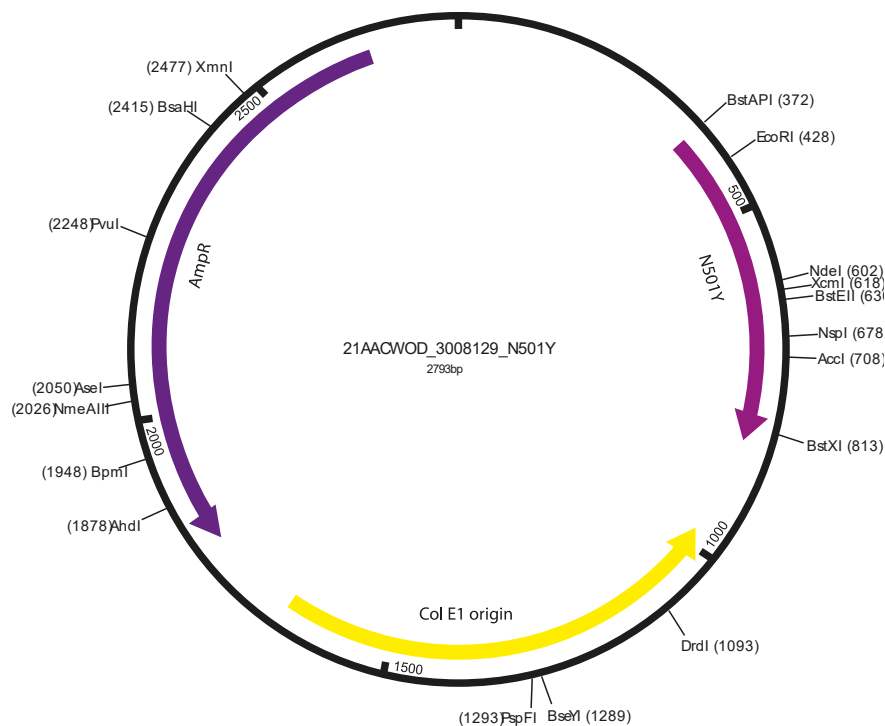


Figura M.1: Esquema de las construcciones para el kit. A) vector E484K, B) vector N501Y

1.2. Diseño de las pajeras de cebadores.

Las secuencias de los cebadores utilizados para la detección del SARS-CoV2 y sus variantes, se diseñaron con el programa de *snappgene*, añadiendo en estos cebadores las mutaciones en diferentes posiciones. Todos los oligonucleótidos fueron diseñados con una temperatura de hibridación de 60°C y un tamaño de entre 18 y 25 nucleótidos. Las secuencias diseñadas para este kit se recogen en la tabla M.1

Tabla M.1: : Listado de oligonucleótidos utilizados como cebadores en RT-qPCR

E484K-WT	GGTAGCACACCTTGTAAATGGTGTTG
E484K-V1	GGTAGCACACCTTGTAAATGGTGTTA
N501Y-WT	CTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTA
N501Y-V1	CTTTACAATCATATGGTTTCCAACCCACTT
Reverse-común	CATTGAAGTTGAAATTGACACATTTGTTTTTAACC

1.3. RT-PCR en un paso.

El análisis de los niveles de expresión del SARS-CoV2 y sus variantes se realizó mediante la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) presente en las muestras, en concreto, en muestras de aguas residuales. Para ello se sometió a una reacción de retrotranscripción para sintetizar el ADN complementario (ADNc), usado como molde para la PCR posterior. Todo este proceso se realizó en un único paso, usando el kit *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen, #12574-030)* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit consistió en un primer paso de “síntesis de ADNc y pre-desnaturalización” que consta de un ciclo compuesto por una incubación de 30 minutos a 45-60°C y 2 minutos 94°C. Posteriormente se realizaron 40 ciclos para la amplificación del fragmento de interés, y cada cual estaba compuesto por desnaturalización (15 segundos a 94°C), anillamiento (30 segundos a 55-66°C), y extensión (1 minuto/Kb a 68°C). Para esto se usó 1µg de ARN, 28µl de la *máster mix* del kit y hasta 50µl de agua destilada.

Tras este proceso de RT-PCR en un paso, se realizó la purificación del ADN, utilizando el kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, #740609.250)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Después de la purificación del ADN amplificado de las muestras, el análisis de la expresión se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), utilizando el kit *PowerUp SYBR Green*

Master Mix (Applied Biosystems #A25742), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Se usó 1µl de cada muestra del ADNc sintetizado en el paso anterior, que fue transferido a una placa de 96 pocillos (*MicroAmp EnduraPlate Optical 96-Well*, Applied Biosystems, #4483354). En un tubo a parte se preparó una mezcla de 2µl de agua mili-Q, 2µl de la mezcla de cebadores específicos para cada mutación, los cuales vienen de un stock a una concentración 100µM y 5µl de la *master mix* del kit, (9µl en total) que se añadieron sobre las muestras de ADNc. Se realizaron duplicados técnicos de cada muestra. El protocolo de qPCR utilizado consistió en un primer paso de desnaturalización a 95° durante 10 minutos, seguida de una repetición de 50 ciclos, cada uno de los cuales consistió en las tres etapas siguientes: desnaturalización de ADN a 95°C, hibridación de los cebadores al ADN molde a 60°C, y extensión de la nueva cadena de ADN, paso tras el cual es medida la señal fluorescente en cada pocillo. Una vez terminada la reacción, se incluyó un paso para analizar la temperatura de desnaturalización de cada producto de PCR, con el fin de comprobar la presencia de un único producto, validando así la especificidad de los cebadores. Para ello se mide la emisión de fluorescencia de *SYBR Green* durante el cambio paulatino de temperatura de 60°C a 95°C. el equipo empleado fue el termociclador *QuantStudio 3* de *Applied Biosystems*.

Para la cuantificación, se determinó el ciclo en el cual, cada muestra superó un determinado umbral de fluorescencia (Ct). Las secuencias de los cebadores utilizados en la qPCR son las mencionadas en el apartado anterior.

2. Modelo murino (*Mus Musculus*).

En este estudio, para ver el papel de ATF4 en el epitelio del sistema respiratorio de vertebrados, se utilizaron células progenitoras de la tráquea de ratón. Los ratones usados en esta tesis doctoral se obtuvieron del Centro Usuario de Animales de Experimentación de Cáceres. Estos ratones presentaban un fondo genético *wild-type* C57BL/6J, y las células se aislaron a partir de ejemplares adultos y sanos, tanto de hembras como de machos.

2.1. Obtención de las células progenitoras de tráquea de ratón.

Para la obtención de las células progenitoras de las vías respiratorias de ratón, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, sin dañar el tejido de la tráquea en este paso, prestando sumo cuidado. Una vez sacrificados, los ratones se inmovilizaron y rociaron con etanol 70% (*Panreac*, #131086.1211) para evitar y prevenir contaminaciones. A continuación, se realizó una pequeña incisión en la piel por debajo del esternón, y se separó la piel del tejido conjuntivo con ayudas de unas tijeras, para después cortarla longitudinalmente, dejando así visible la caja torácica y la región donde se sitúa la tráquea. Posteriormente, se realizó un corte en el tejido muscular que envuelve la tráquea, y una vez liberada, se separó mediante un corte transversal por encima de la laringe y otro por encima de los pulmones, obteniendo así una sección de 7.5mm aproximadamente. Estas secciones de tráqueas se transfirieron a un tubo con medio Ham's F12 (*Gibco*, #11765-054) suplementado con penicilina/estreptomicina (P/S, *Gibco*, #15140-122) al 1% a 4°C mientras se continuaba con el resto de las disecciones. Una vez aisladas, las tráqueas fueron transferidas a una placa de Petri con el mismo medio y se limpiaron bajo lupa con el fin de retirar los vasos sanguíneos y el tejido conectivo adherido a la tráquea. Después, se eliminó la laringe y se abrió la tráquea longitudinalmente.

Tras la extracción y limpieza de las tráqueas, las secciones fueron transferidas a un tubo estéril, e incubadas toda la noche en agitación en una solución de pronasa (*Roche*, #10165921001) a 1,5mg/ml diluida en medio Ham's F12 con P/S 1%, para disgregar el tejido (se utilizó 15 ml de medio para 20 tráqueas). Pasado este tiempo de incubación, se añadió a la suspensión del medio con las células el 10 % de suero fetal bobino (*Fetal Bovine Serum*, *FBS.Gibco*, #10500-064) para detener la digestión llevada a cabo por la pronasa. Después, se colectó el medio, y los restos de tejido de las tráqueas se lavaron con medio Ham's F12 para recuperar más células, transfiriendo todo el sobrenadante a un mismo tubo, y centrifugándolo a 1000xg durante 5 minutos. Tras la centrifugación, las células fueron resuspendidas en Ham's F12 con DNasa de páncreas bovino (*Sigma*, #DN25) a 0,5mg/ml, e incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos, para eliminar las hebras de ADN en

las que pueden quedar retenidas las células (se utilizaron 10 ml para las células obtenidas de las 20 tráqueas). Transcurridos los 10 minutos de la digestión, se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones, y se resuspendieron las células en medio de expansión de células respiratorias, *Pneumacult ExPlus* completo (*StemCell*, #05041). Se añadieron 3 ml por cada placa de cultivo utilizada, y este medio se suplementó con inhibidores de la ruta de TGF β /SMAD para inhibir la diferenciación de las células basales, además de para promover la proliferación celular: 1 μ M DMH-1 (*Tocris*, #4126) y 1 μ M A83-01 (*Tocris*, #2939). Además, se añadió el inhibidor de apoptosis Y-27632(*StemCell*, #72304) a una concentración 10 μ M.

La suspensión de células fue sembrada en placas de cultivo primario *Primaria plates* (*Corning*, #353802), las cuales favorecen la rápida adhesión de los fibroblastos procedentes del tejido conectivo, y de esta forma son retirados de la suspensión celular. Se utilizaron dos placas *Primaria plate* para las células procedentes de las 20 tráqueas. La suspensión celular se incubó en estas placas durante 4h, a una temperatura de 37°C y al 5% de CO₂. Pasado este tiempo de incubación, las células no adheridas fueron transferidas a placas de cultivo de 60mm (*Falcon*, #353004) previamente tratadas durante al menos 4h con una solución de colágeno (*Gibco*, #A10483-01) a 50 μ g/ml, preparada en ácido acético 0.02N (*Fluca*, #34254). Para la expansión celular, el cultivo fue pasado de las placas de cultivo primario a ocho placas de 60mm pretratadas, por lo que se añadió el medio de cultivo restante suplementado con los inhibidores de diferenciación y apoptosis anteriormente mencionados. Se dejó que las células de adhirieran durante toda la noche, y transcurrido este tiempo se realizó un lavado con PBS para retirar las células muertas y un cambio de medio (*Pneumacult Explus* completo, suplementado con los inhibidores de diferenciación y apoptosis). En este momento, se consideró que las células basales se encuentran en fase 0. El medio de estos cultivos fue renovado cada dos días, y las células se mantuvieron en el incubador a 37°C y al 5% de CO₂.

2.2. Cultivo primario de células de tráquea. Expansión y diferenciación.

Una vez que el cultivo de células basales alcanzó una confluencia del 70-80% de la placa, en aproximadamente 4-5 días, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante unos 15-20 minutos con PBS-EDTA 0,02% (*Fisher*, #010700153) a 37°C, para promover la separación de las uniones célula-célula. Transcurrido este tiempo, se retiró el PBS-EDTA 0,02% y se añadió acutasa (*Corning*, #25058051), la cual se incubó a temperatura ambiente hasta que las células se despegaron de la placa, obteniéndose una suspensión celular. Por último, se añadió medio *Pneumacult Explus*, y la suspensión fue centrifugada a 1000xg durante 5 minutos, resuspendiéndose después en el mismo medio y dejando así el cultivo preparado para la realización de los diferentes experimentos.

Para promover la diferenciación del epitelio pseudoestratificado a partir de las células progenitoras de las vías respiratorias de ratón, se usó el sistema de cultivo ALI (*Air-Liquid Interface*), en el cual las células se sembraron sobre unas membranas porosas fijadas a un soporte de plástico en forma de cesto, que se introduce en los pocillos de una placa de cultivo multipocillo. Las membranas porosas insertadas al soporte de plástico, denominadas *transwells* (*Corning*, #3460), fueron tratadas previamente con colágeno 50µg/ml en ácido acético 0.02N durante un tiempo mínimo de 4h, y después fueron lavadas con PBS antes de añadir la suspensión celular. Al comenzar este sistema de cultivo, la suspensión celular se añadió en la cámara superior. En la cámara inferior fue añadido *Pneumacult ExPlus*, hasta cubrir la base del soporte de plástico. Las células fueron sembradas a una confluencia de 9×10^4 células/cm², y tras incubarlas toda la noche se renovó el medio de la cámara superior, con el fin de retirar las células no adheridas. El medio de las dos cámaras se renovó cada dos días hasta que las células tapizaron por completo la membrana porosa (en torno a 4 días).

Transcurrido este tiempo, el medio de la cámara inferior se sustituyó por medio de diferenciación ALI (*Stemcell, #05002*), mientras que en la cámara superior el medio de cultivo se retiró para simular la organización del tejido en las vías respiratorias, donde las células se encuentran en contacto con el aire en su cara apical, y en contacto con la lámina basal del epitelio en su región basal. Este sistema de cultivo se esquematiza en la figura M.2. El cultivo en ALI se mantuvo durante 14 días, tiempo en el que las células progenitoras completaron la diferenciación del epitelio pseudoestratificado. Durante este proceso, el medio inferior fue renovado cada 2 días.

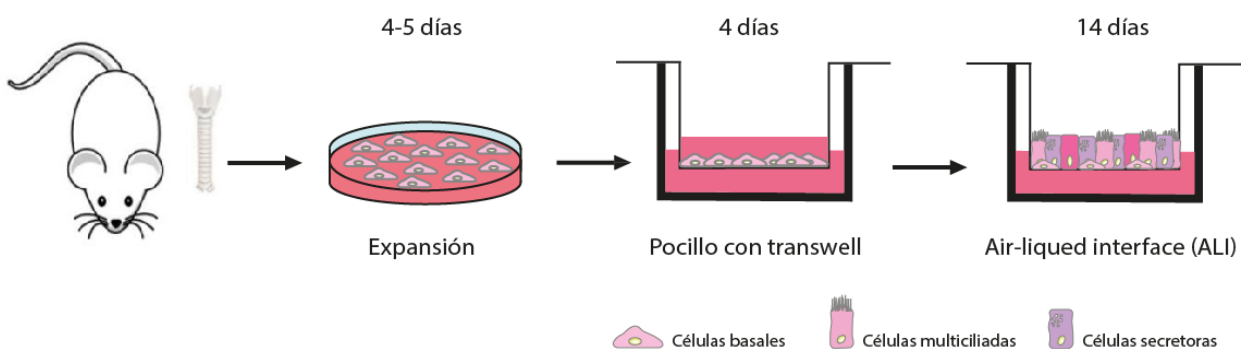


Figura M.2: Representación esquemática sistema de cultivo y diferenciación de las células progenitoras de las vías respiratorias de ratón.

2.3. Cultivos 3D: Organoides de tráquea de ratón.

Para la generación de cultivos 3D a partir de células progenitoras de las vías respiratorias de ratón, las células se expandieron previamente en *Pneumacult ExPlus* suplementado con los inhibidores de diferenciación y apoptosis como se detalla en el apartado anterior. Debido a que la matriz de gel utilizada en este proceso solidifica a temperatura ambiente, fue necesario enfriar previamente la placa multipocillo donde se sembraron las células, además de las puntas de pipetas y tubos Eppendorf. Antes de resuspender las células, se preparó una mezcla de matrigel reducido en factores de crecimiento (*Corning, #354230*) al 30% en medio de expansión frío. Una vez preparada la mezcla fue dispensada en los pocillos necesarios para cada experimento. Para un pocillo de

una placa de 96 pocillos, se utilizó un volumen total de 100µl (30µl de matrigel y 70µl de *Pneumacult ExPlus*). Tras dispensar todos los pocillos necesarios para el experimento, la placa fue incubada a 37°C durante 15 minutos, para dejar así que solidifique el matrigel.

Las células fueron despegadas de las placas de expansión y resuspendidas como se ha descrito anteriormente. Una vez contado el número de células, se preparó una suspensión celular en *Pneumacult* con matrigel al 2%, suplementada con el inhibidor de apoptosis Y-27632 a 20µM. Esta suspensión fue dispensada sobre los pocillos con el matrigel al 30%, y trascurridas 8-16h las células se sitúan dentro de esta fase más densa. En los experimentos realizados en esta tesis se plaquearon entre 300 y 500 células por cada pocillo de una placa de 96 pocillos. El medio superior se renovó cada 2 días, y las células se cultivaron durante 5 días, tomando imágenes del crecimiento de los organoides para su cuantificación a día 1,3 y 5 con el microscopio *EVOS Fluid Cell Imaging Station* (Invitrogen).

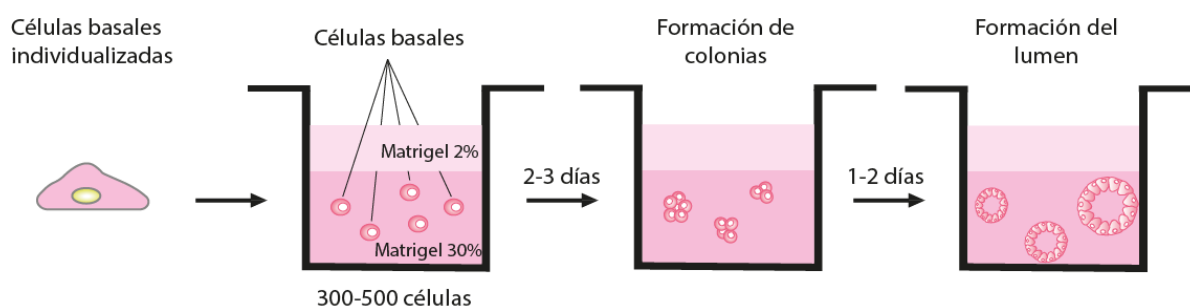


Figura M.3: Representación esquemática sistema de cultivo de organoides de las vías respiratorias de ratón.

3. Células de bronquio humano.

Las células humanas utilizadas en esta tesis proceden de biopsias de bronquio de donantes sanos, y fueron obtenidas a través del Biobanco de Área de Salud de Badajoz (ref.B.0001437).

3.1. Obtención y cultivo de células progenitoras de bronquio humano.

Las muestras de biopsias de bronquio humano fueron recibidas en PBS, y lavadas dos veces con el mismo tampón. Una vez se lavaron, se retiró el PBS y las muestras se resuspendieron en pronasa a 1mg/ml, preparada en medio Ham's F12 con P/S 1%, para disgregar el tejido y liberar las células progenitoras. A esta mezcla se añadió DNAsa 0,5mg/ml, la cual elimina las hebras de ADN procedentes de las células muertas. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en esta solución toda la noche a 4°C, y después se centrifugaron a 100xg durante 5 minutos. Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en *Pneumacult ExPlus* con los inhibidores de diferenciación y apoptosis DMH-1 1µM, A8301 1µM y Y-27632 10µM. A continuación, las células se sembraron en 2 placas de 60 mm tratadas con colágeno a 50µg/ml. El medio se fue renovando cada 2 días hasta que la monocapa de células se resuspendieron utilizando PBS-EDTA y acutasa, siguiendo el protocolo descrito para las células de ratón, quedando así listas para plaquiar en los diferentes experimentos.

Para los experimentos con células diferenciadas se lleva a cabo el mismo protocolo de cultivo ALI ya descrito para las células de tráquea de ratón. En el caso de las células humanas, en los *transwells* previamente tratados con colágeno, se sembraron 5×10^4 células/cm², y el cultivo se mantuvo en medio de expansión *Pneumacult ExPlus* suplementado con los inhibidores de diferenciación y apoptosis durante aproximadamente 7 días, tiempo en el cual, la monocapa tapizó por completo la membrana porosa. En ese momento, fue retirado el medio de la cámara superior, mientras que en la cámara inferior fue sustituido por medio de diferenciación ALI, y se renovó cada 2 días hasta que concluyó la diferenciación del cultivo, que en el caso de las humanas fueron 21 días. Para la eliminación del moco producido por el cultivo según avanzó la diferenciación, la cámara superior fue lavada cada 2 días con PBS, incubando 5 minutos a 37° y retirándolo después.

4. Tratamientos en cultivos celulares.

Los reactivos químicos empleados en esta tesis se prepararon siguiendo las indicaciones de cada fabricante. En el caso de los cultivos control, éstos fueron incubados con los volúmenes correspondientes del solvente. A continuación, se detallan los principales reactivos utilizados:

- **GSK2606414** (*Tocris*, #5107) Es un selectivo y potente inhibidor de la proteína quinasa PERK. Inhibe la fosforilación de dicha proteína. Fue utilizado en los cultivos de células del sistema respiratorio tanto en expansión como en diferenciación, así como en cultivos 3D.

- **Trans-ISRIB** (*Tocris*, #5284) Es un potente inhibidor de la respuesta integrada al estrés (ISR); revierte los efectos de la fosforilación de eIF2 α y restaura la capacidad de traducción celular. Actúa sobre las interacciones entre las quinasas eIF2 α y eIF2B, y bloquea la producción de ATF4 sin alterar las respuestas de IRE1 o ATF6 in vitro. Fue utilizado en los cultivos de células del sistema respiratorio tanto en expansión como en diferenciación, así como en cultivos 3D.

- **C16** (*Tocris*, #5382) Es un potente inhibidor de la quinasa PKR. Fue utilizado en los cultivos de células del sistema respiratorio tanto en expansión como en diferenciación, así como en cultivos 3D.

5. Silenciamiento genético.

Para estudiar el papel de ATF4 en las células epiteliales de las vías respiratorias, se generaron construcciones lentivirales que contenían las secuencias de ARN de interferencia (*short hairpin RNA*, *shRNA*), que median el silenciamiento de la expresión de estas proteínas a través de la degradación de su ARN mensajero. Para la generación de estas construcciones, se accedió a la secuencia de los transcritos de estos genes, se diseñaron las secuencias de

ARN de interferencia y se clonaron en el vector lentiviral, que posteriormente fue transfectado junto a otros dos vectores de empaquetamiento en la línea celular HEK293 para la producción de lentivirus. Una vez producidos, fueron concentrados y los cultivos primarios infectados para el silenciamiento específico de las proteínas.

5.1. Generación del vector lentiviral. Clonación.

La secuencia del transcrito *ATF4* fue obtenida de la base de datos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Una vez obtenidas, se usó la herramienta de diseño de secuencias de *shRNA* del *GPP Web Portal* (*Broad Institute*), mediante la cual se obtuvieron varias secuencias candidatas para el transcrito. Las secuencias fueron escogidas en función del nivel de silenciamiento que reportaron en la validación de éstas. Además de las regiones complementarias al transcrito, que comprenden los 21 pares de bases centrales y que generarán la horquilla de ARN, la colección del *GPP Web Portal* contiene secuencias para la clonación en el vector lentiviral comercial pLKO.1. Estas secuencias hibridan con los extremos generados por las enzimas de restricción Age I (*New England Biolabs*, #3552L) y EcoRI (*New England Biolabs*, #31015), que se utilizarán en este protocolo de clonación. Fueron seleccionadas tres secuencias de *shRNA* para el gen *ATF4*, que se detalla a continuación:

Tabla M.2: Secuencias para Atf4 (Código del transcrito: NM_ 001287180.1)

shRNA 1	F	CCGGCGGACAAAGATACCTTCGAGTCTCGAGACTCGAAGGTATCTTTGTCCGTTTTTG
	R	AATTCAAAAACGGACAAAGATACCTTCGAGTCTCGAGACTCGAAGGTATCTTTGTCCG
shRNA 2	F	CCGGCTAGGTCTCTTAGATGACTATCTCGAGATAGTCATCTAAGAGACCTAGTTTTTG
	R	AATTCAAAAACCTAGGTCTCTTAGATGACTATCTCGAGATAGTCATCTAAGAGACCTAG
shRNA 3	F	CCGGCCAGAGCATTCTTTAGTTTACTCGAGTAACTAAAGGAATGCTCTGGTTTTTG
	R	AATTCAAAAACAGAGCATTCTTTAGTTTACTCGAGTAACTAAAGGAATGCTCTGG

Una vez reconstituidas las secuencias a una concentración 100µM, estas parejas de oligonucleótidos se anillaron siguiendo el protocolo *10878 pIKO.1-TRC protocol* del repositorio *Addgene*:

- 2µl oligonucleótido F (*IDT*)
- 2µl oligonucleótido R (*IDT*)
- 5µl tampón 2 10X NEB (*New England Biolabs, #E702S*)
- Hasta 35µl con ddH₂O

Esta mezcla fue incubada en el termociclador con el siguiente programa:

1. 4 minutos a 95°C
2. *Ramp down* de -5°C cada 1 minuto hasta 20°C

El vector lentiviral utilizado en esta tesis fue cedido por Miguel Fidalgo, y presenta una modificación sobre el vector comercial, debido a que contiene la proteína fluorescente mCherry a modo de proteína reportera, con lo que se puede verificar la transfección de las células de empaquetamiento para la producción de lentivirus, así como la infección de las células de las vías respiratorias.

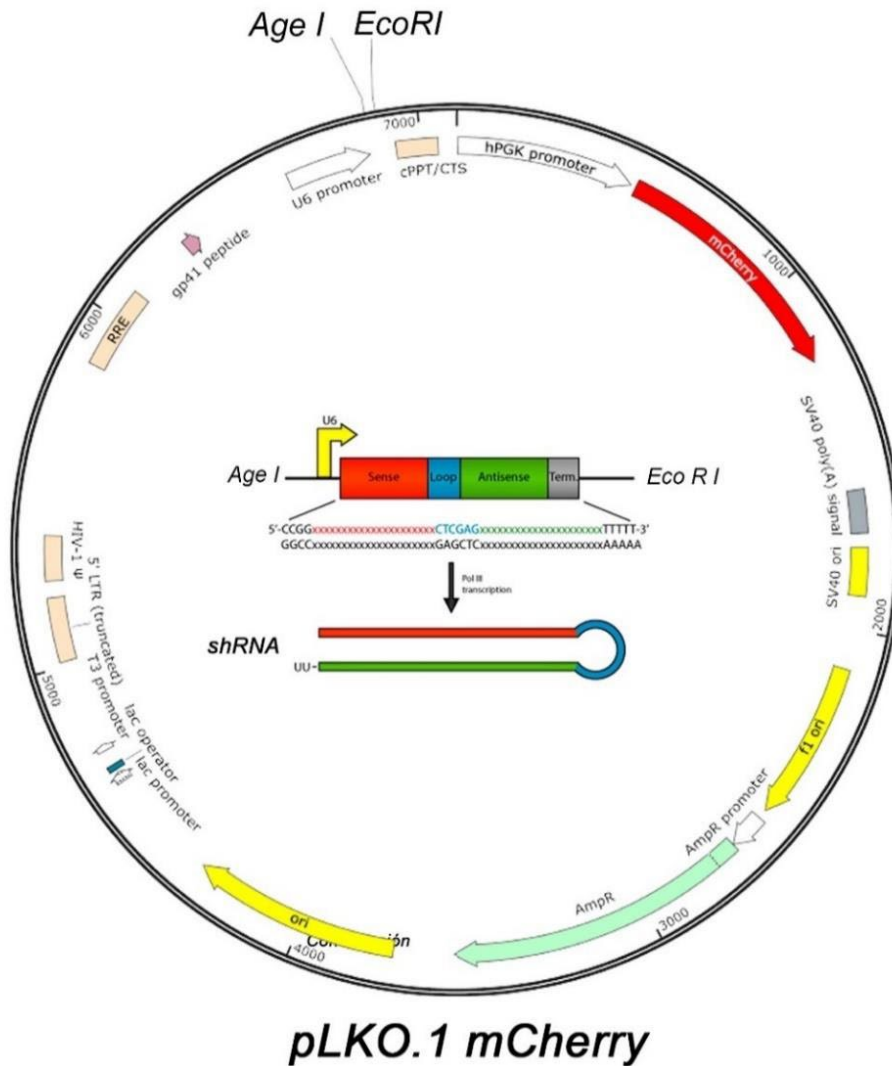


Figura M.4: Esquema del vector utilizado para la clonación de las secuencias de ARN de interferencia.

De forma simultánea al anillamiento de las secuencias de ARNi, 7,5µg del vector *pLKO.1-mCherry* fueron digeridos con las enzimas de restricción *AgeI* y *EcoRI*, según las especificaciones de la casa comercial, y purificados utilizando el kit *Nucleospin* (*Macherey-Nagel*, #740609.250). una vez purificado, se procedió a la ligación entre las secuencias anilladas y el vector lentiviral cortado mediante el siguiente protocolo:

- 5µl de la ligación de los oligonucleótidos F+R (*IDT*)
- 50ng del vector *pLKO.1* digerido y purificado

- 10µl de tampón *Quick ligase 2X* (*New England Biolabs*, #M2200L)
- 1µl T4 DNA ligase (*New England Biolabs*, #M0201S)
- Hasta 20µl con ddH₂O

Mediante este diseño, las secuencias de ARNi quedan bajo el promotor U6, el cual promueve la transcripción.

Tras la ligación, se transformaron bacterias competentes *Stb13* (*Thermoscientific*, #7373-03), que fueron crecidas toda la noche en placas con ampicilina 100µg/ml (*Sigma*, #A0166-5G), después se realizaron cultivos líquidos de éstas para proceder a aislar el ADN plasmídico utilizando el kit de purificación *Plasmid miniprep kit* (*Thermoscientific*, #k0503). Una vez purificadas, las construcciones fueron secuenciadas en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la UEx. El cebador utilizado para la secuenciación de los plásmidos *pLKO.1* fue: 5'GACTATCATATGCTTACCGT-3' (*IDT*). Tras secuenciar los fragmentos, los clones seleccionados fueron crecidos en cultivos de 100ml o 500ml para extraer el ADN plasmídico por Midiprep o Maxiprep respectivamente mediante el kit *NucleoBond Extra Midi* (*Macherey-Nagel*, #740410.50) o *NucleoBond Extra Maxi* (*Macherey-Nagel*, #740414.50).

5.2. Producción de partículas lentivirales.

Para el empaquetamiento de los vectores de ARNi en partículas lentivirales, se utilizó la línea celular KEK293T, cedida por el laboratorio de Miguel Fidalgo. Esta línea celular fue mantenida en medio DMEM (*Gibco*, #21969-c35), suplementado con FBS al 10%, más L-Gln 1% (*Gibco*, #25030-024) y P/S 1%. El día previo a la transfección de los vectores lentivirales, se plaqueó 9×10^6 de células HEK293T en placas de cultivo de 150mm (*Falcon*, #353025) (tantas placas como construcciones de ARNi se deseen producir), y se dejó crecer durante toda la noche, hasta alcanzar un confluencia del 60-70%.

Además de las construcciones generadas en el apartado anterior, para la producción de partículas lentivirales fueron necesarias otras dos construcciones más: el vector psPAX2 (*Addgene*, #12260), que codifica para proteínas lentivirales de empaquetamiento (Gag-pol-Rev), y el vector pMD2.G (*Addgene*, #12259), que contiene la información para generar proteínas de la envoltura vírica (VSV-G). en los experimentos de silenciamiento con ARNi, se utilizó como control negativo un vector lentiviral que contiene como diana una secuencia del gen *Photinus pyralis* que codifica para la proteína Luciferasa (GenBank nº M15077), además de la proteína fluorescente *mCherry*, vector cedido por el laboratorio de Miguel Fidalgo.

Una vez que el cultivo celular alcanzó la confluencia deseada, se utilizó el método de la polietilenamina (PEI) (*Sigma*, #919012) para cotransfectar las construcciones anteriormente descritas, necesarias para la producción de lentivirus. Para ellos se preparó una mezcla de los vectores lentivirales pMD2.G y psPAX2 en NaCl (*Panreac*, #131659.1214) 150mM, además de la construcción generada para cada uno de los ARNi. Se preparó 1,6ml de NaCl 150mM en los que se resuspendió 20µg tanto del vector de empaquetamiento como el de la envoltura, y 40µg de las construcciones de *pLKO.1-ARNi*. En otro tubo con el mismo volumen de NaCl 150mM, se añadieron 16µl de PEI 5X, se mezclaron con la solución de ADN anterior y, tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se dispensaron por goteo sobre el medio de cultivo fresco de las placas de HEK293T. Las células se incubaron a 37°C y al 5% de CO₂ durante toda la noche y transcurrido este tiempo, el medio fue reemplazado por medio fresco.

Después de otras 24h de incubación (48h desde el momento de la transfección), el medio fue colectado y este sobrenadante con las partículas víricas se concentró mediante centrifugación en los filtros *Amicon Ultra 100KDa* (*Merk*, #UFC910096) durante 30 minutos a 3.500xg. Los concentrados de lentivirus fueron alicuotados en volumen reducido (75µl) para evitar ciclos de descongelado-recongelado. Este proceso se realizó nuevamente a las 72H después de la transfección, obteniendo así el concentrado de los lentivirus listo para infectar en los cultivos de interés.

La titulación de las partículas lentivirales se realizó utilizando el kit *Ultrarapid Lentiviral Global Titer Kit* (SBI, #LV961A-1), el cual se basa en la extracción de ARN de células infectadas para evaluar, mediante qPCR, la proporción de células infectadas a través del análisis de secuencias específicas de la construcción que se integran en el ADN celular. El título de partículas lentivirales en los concentrados fue establecido en aproximadamente 1×10^6 partículas infectivas/ml.

5.3. Transducción de lentivirus y selección de los cultivos celulares.

Las partículas víricas producidas fueron utilizadas para el silenciamiento de ATF4 en cultivos de células progenitoras de las vías respiratorias de ratón, inicialmente expandidas como se detalla en el apartado x.x. una vez crecidas, son resuspendidas y contadas, preparando una suspensión de 25.000 células en 100 μ l de *Pneumacult ExPlus*. Se emplearon 25 μ l de cada concentrado de lentivirus, que fueron usados conjuntamente para la proteína, de tal forma que el volumen total de lentivirus añadido a la suspensión celular fue de 75 μ l. En base al título de partículas lentivirales y al número de células (partículas víricas/células infectadas), se puede calcular un factor conocido como multiplicidad de la infección (MOI): $0,075 \text{ ml de concentrado} \times 10^6 \text{ partículas víricas/ml} = 75.000$ partículas víricas añadidas a las 25.000 células, lo que da un MOI de 3. Además, para incrementar la eficiencia de la infección, se añadió polibrene (*Sigam, TR-1003*) a una concentración de 8 μ g/ml, un polímero catiónico que actúa neutralizando la repulsión de cargas entre el virus y la membrana plasmática. Una vez se añadió el polibrene, la mezcla fue homogeneizada e incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras esta incubación, se centrifugó la suspensión celular durante 5 minutos a 700xg para favorecer la interacción célula-virus, y las células se resuspendieron en el mismo medio, añadiendo 2,5ml de *Pneumacult ExPlus* con polibrene y fueron sembradas en placas de 60mm previamente tratadas con colágeno, como se describió anteriormente.

Pasadas unas 16-18h desde la infección, el medio fue renovado y las células incubadas toda la noche. Después de este tiempo, se procedió a

seleccionar las células que habían sido infectadas, para lo cual se utilizó puromicina (*MP biomedical*, #100552) a una concentración de 3µg/ml. La selección se mantuvo durante 48h, renovado transcurrido este tiempo con medio *Pneumacult Explus* sin selección durante 24h más. Después, se comprobó la eficiencia de la infección analizando la fluorescencia procedente de la proteína reportera mCherry. Una vez seleccionadas, las células fueron utilizadas para los distintos experimentos.

6. Inmunofluorescencias en células de las vías respiratorias.

La localización subcelular de las proteínas estudiadas en este trabajo de tesis fue analizada mediante inmunofluorescencia (IF). Esta técnica se realizó en cultivos de células de las vías respiratorias de ratón y humano sembradas sobre *transwells*.

Para realizar los marcajes, las muestras se lavaron inicialmente con PBS Ca^{2+}/Mg^{2+} para así preservar las uniones célula-célula. Tras este lavado, las células se fijaron con PFA 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavando después las muestras dos veces con PBS-Tritón 0.1% (PBS-t), 10 minutos cada lavado. Después de los lavados, las membranas porosas sobre las que crecieron las células fueron separadas de los soportes con ayuda de un bisturí, y colocadas en oscuridad en una cámara húmeda. Entonces las muestras fueron bloqueadas con PBS-t BSA al 2% durante 45 minutos, y posteriormente incubadas con los anticuerpos primarios recogidos en la tabla M.3, preparados en la solución anterior de bloqueo a 4°C durante toda la noche.

Tabla M.3: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia

Anticuerpo primario	Dilución	Fuente	Casa Comercial, Referencia
Anti-p63	1:200	Conejo	<i>Abcam</i> , #124762
Anti-FOXJ1	1:200	Ratón	<i>Invitrogen</i> , #14-9965-82
Anti-SCGB1A1	1:50	Cabra	<i>Santa Cruz</i> , #sc9772
Anti-Acetil Tubulina	1:200	Ratón	<i>Sigma</i> , #6793
Anti-Centriolin C9	1:100	Ratón	<i>Santa Cruz</i> , #sc365521

Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron con PBS-t durante 1h (seis lavados de 10 minutos), quedando las muestras listas para el marcaje con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (tabla M.x), preparados al igual que los primarios, en PBS-t BSA 2%. En esta misma solución se preparó, cuando fue necesario, la Faloidina fluorescente, así como el marcaje de los núcleos con DAPI (*4',6-diamidino-2-fenilindol*, *Sigma*, #62248) a una concentración 0,3µM. Tras 1h de incubación a temperatura ambiente, las muestras se lavaron con PBS-t durante 1h, y las muestras fueron montadas sobre portaobjetos utilizando el medio *Vectashield* (#H-1000), quedando las muestras preparadas para la adquisición de imágenes.

Tabla M.4: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas por inmunofluorescencia

Anticuerpo secundario	Dilución	Fuente	Casa Comercial, Referencia
Alexa-Fluor 488 Anti-Rabbit	1:500	Cabra	<i>Invitrogen</i> , #A21206
Alexa-Fluor 488 Anti-Mouse	1:500	Cabra	<i>Invitrogen</i> , #A11001
Alexa-fluor 488 Anti-Goat	1:500	Burro	<i>Invitrogen</i> , #A32814

6.1. Adquisición y análisis de imágenes de microscopía.

La adquisición de imágenes de IF fue llevada a cabo en la Unidad de Microscopía del Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biociencias (STAB) de la universidad de Extremadura. Se utilizó el sistema de microscopía confocal *Olympus FV 1000*, y las imágenes fueron procesadas utilizando los softwares *ImageJ* y *Adobe Photoshop CC 2018*.

Las imágenes obtenidas de los cultivos de células de las vías respiratorias fueron procesadas para cuantificar las poblaciones celulares, para lo cual se utilizó la señal procedente del marcaje con anticuerpos específicos de cada tipo celular. Las áreas para ello fueron definidas a partir de las imágenes obtenidas con el objetivo 40X del microscopio *Olympus FV 1000*, con un zoom 2X y una

resolución de 1024x1024. Las imágenes se separaron por canales y se utilizó el software *ImageJ*.

7. Análisis de proteínas mediante *Immunoblotting* (Western-blot).

Para el análisis de los niveles de expresión y estado de fosforilación de proteínas se utilizó la técnica de *immunoblotting*, que consiste en la separación de proteínas en geles de acrilamida, y su posterior transferencia a una membrana, para permitir así el marcaje con anticuerpos para su posterior detección.

7.1. Preparación de los extractos proteicos lisado.

El tampón de lisis utilizado para la extracción de proteínas fue preparado en fresco y estaba compuesto por Tris.HCl 50mM (pH7,5) (*Panreac*, #A2264), EGTA 1 mM (*Sigma*, #E-4378), EDTA 1mM (*Fisher Chemical*, #D/0700/53), ortovanadato sódico 10mM (*Sigma*, #S6508-10G), fosfato sódico 5mM (*Sigma*, #342483-25G), fluoruro sódico 10mM (*Sigma* #201154-100G), sacarosa 0,27M (*Panreac*, #131621.1210), 2-mercaptoetanol 1% (v/v) (*Panreac*, #A1108.0100) Tritón X-100 y cóctel de inhibidor de proteasa 1x (*Roche*, #11873580001).

Para la preparación de los extractos, las células se lavaron con PBS y una vez retirado, se añadió el tampón de lisis a 4°C sobre las placas de cultivo en el caso de las células en expansión, transfiriendo después el volumen a un Eppendorf. En el caso de los *transwells*, las membranas se cortaron con un bisturí e introducidas después en tubos Eppendorf, donde se añadía el tampón de lisis. Esta lisis se realizó en agitación a 4°C, incubando durante 1h. una vez transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron en frío durante 30 minutos a 14.000xg para eliminar los restos de membrana y fragmentos celulares no lisados. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se separaron 10µl para la cuantificación de la concentración de proteínas.

7.2. Cuantificación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas de los extractos celulares se determinó mediante el método colorimétrico de *Bradford* utilizando el reactivo *Coomassie G250* (*Bio-Rad*, #5000205) y albumina de suero bovino (BSA, *Panreac*, #A8412) para elaborar la recta patrón. Para esta recta patrón, en una placa de 96 pocillos, se tomaron cantidades crecientes de BSA, desde 0,25µg hasta 2,5µg, que se diluyeron en agua hasta un volumen final de 160µl. las muestra fueron preparadas en la misma placa, añadiendo 1µl del extracto proteico en 159µl de agua. Después, tanto las muestra como en la recta patrón se añadieron 40µl de reactivo de *Commassie*, se homogenizó y se midió la absorbancia a 595nm en el lector de placas multipocillo *Infinite M Plex* (*Tecan*). La concentración de proteína de cada uno de los extractos se determinó por extrapolación a partir de regresión lineal determinada con la recta patrón construida con las cantidades conocidas de BSA.

7.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Una vez conocida la concentración de proteínas, las muestras fueron mezcladas con el volumen apropiado de tampón de carga (1/5 del volumen total) para mantener así las condiciones desnaturizantes, incrementar la densidad de la muestra y permitir la visualización del frente por la adición de azul de bromofenol. Este tampón de carga contenía Tris-HCl 6,5mM pH6,8 (*Panreac*, #A2264), SDS (10% p/v, *Sigma*, #161-031), glicerol (50% v/v), azul de bromofenol (0,025% p/v, *Bio-rad*, #1610404) y β-mercaptoetanol (20% v/v). una vez mezcladas, las muestras de proteínas se incubaron a 95°C durante 5 minutos para su desnaturización térmica, quedando así listas para se separadas en geles de acrilamida.

La separación de las proteínas en función de su peso molecular se llevó a cabo en geles de acrilamida-bis-acrilamida según el método establecido por Laemmli(ref). Primero se preparó el gel inferior, con una concentración de

acrilamida que osciló entre el 7,5% y el 12%, en función del tamaño molecular de las proteínas de interés. Este gel estaba constituido por acrilamida 40% (18,5-30% v/v, *Alfa Aesar*, #J60868), Tris 1,5M pH 8,8 (25% v/v), SDS 10% (1% v/v), persulfato amónico 10% (0,5% v/v, *Panreac*, #A2941) y TEMED (0,05% v/v, *Sigma*, #T9281). Una vez polimerizado, se preparó en gel superior, con la misma composición, pero a una menor concentración de acrilamida (4%), y usando Tris 0,5M pH 6,8 en lugar del Tris 1,5M. Posteriormente, se cargaron alícuotas de entre 10µg y 30µg, además del marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (*Bio-Rad*, #161-0374) y la electroforesis se realizó en tampón Tris/Glicina/SDS (*Fisher*, #BP13414). Se empleó un voltaje constante inicial de 75V hasta el empaquetamiento del frente, modificándose después a 125V. fue utilizado el sistema de electroforesis *Miniprotean 3* (*Bio-Rad*), y la fuente de alimentación *Power Pac 300* (*Bio-Rad*).

7.4. Electrotransferencia en húmedo.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Bio-Rad*, #1620112) por aplicación de un campo eléctrico en una cubeta con tampón de transferencia compuesto por Tris 25mM, 1,9M y metanol al 20% (v/v). La transferencia se realizó a 4°C aplicando una intensidad de campo eléctrico constante de 1000mA totales por membrana en cada cubeta. Se utilizó la fuente de alimentación *Consort EV261* (*Bio-Rad*). Las membranas se tiñeron con el colorante reversible *Ponceau S*. (*Sigma*, #p7170) con la finalidad de comprobar la eficiencia de la transferencia y la homogeneidad de carga para las diferentes muestras. Tras esto, el colorante se retiró de las membranas mediante lavados con una solución de Tris-HCl 50mM pH 7,5 y tween-20 (0,05% v/v *Fisher* #BP337) (TBS-T).

7.5. Marcaje con anticuerpos y revelado de las membranas.

Antes de realizar el marcaje de las proteínas con anticuerpos específicos, las membranas fueron bloqueadas con una solución de TBS-T a la que se

añadió leche desnatada al 5% (p/v) con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. La incubación se realizó a temperatura ambiente en agitación durante 1h. Los anticuerpos primarios utilizados para la inmunodetección que se recogen en la tabla M.5 fueron preparados en la misma solución de bloqueo, y se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación.

Tabla M.5: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas mediante western blot

Anticuerpo primario	Dilución	Fuente	Casa Comercial
Anti-P-eIF2 α	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #3398s</i>
Anti-eIF2 α	1:1000	Conejo	<i>Cell Signaling, #5324s</i>
Anti- α Tubulina	1:1000	Ratón	<i>Invitrogen, #32-2500</i>
Anti-Vinculina	1:1000	Ratón	<i>Sigma, #V4505</i>

Transcurrido el tiempo de incubación, las membranas se lavaron con TBS-T cinco veces durante 10 minutos en agitación, quedando listas para el marcaje con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), recogidos en la tabla M.6. Los anticuerpos secundarios se prepararon también en la solución de bloqueo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1h.

Tabla M.6: Anticuerpos secundarios utilizados para la detección de proteínas mediante western blot

Anticuerpo secundario	Dilución	Fuente	Casa Comercial
Anti-Mouse-HRP	1:1000	Cabra	<i>Cell Signaling, #7076s</i>
Anti-Rabbit-HRP	1:1000	Cabra	<i>Invitrogen, #31460</i>

Pasado el tiempo de incubación, las membranas de nitrocelulosa se sometieron a seis lavados con TBS-T, y posteriormente se incubaron durante 5 minutos con el sustrato quimioluminiscente *Supersignal West Dura* (*Thermo Scientific*). Una vez incubadas, las membranas se revelaron utilizando el equipo *iBright CL1000* (*Invitrogen*). Como control interno, para la normalización de los niveles de proteínas entre todas las muestras, se utilizó la inmunodetección de vinculina, así como la tinción de la membrana con *Ponceau*. La cuantificación de la señal adquirida se realizó por densitometría, usando el software *ImageJ*.

8. Análisis de los niveles de expresión por PCR cuantitativa.

El análisis de los niveles de expresión de los diferentes genes de los cultivos celulares se realizó mediante la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) presente en las muestras. Para ello fue necesario la extracción del ARNm, que posteriormente se sometió a una reacción de retrotranscripción para sintetizar el ADN complementario (ADNc), usado como molde para la PCR cuantitativa.

8.1. Extracción de ARN.

Para la extracción de ARN mensajero, los cultivos celulares fueron inicialmente lavados con PBS. La purificación del ARNm se realizó mediante el kit *ilustra RNAspin Mini (GE Healthcare, #2505500-71)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit consistió en una lisis inicial, un posterior filtrado del lisado total para su precipitación con etanol 70%, la transferencia de este volumen sobre una columna de afinidad, donde se realizó una incubación con DNasa para eliminar el ADN genómico, y tras varios lavados, la elución en agua mili-Q libre de RNAsa. Una vez purificado, fue determinada la concentración de ARN midiendo su absorbancia espectrofotométrica a 260nm, así como la presencia de proteínas contaminantes mediante la relación A_{260}/A_{280} . Para ello fue utilizado el equipo espectrofotométrico *BioPhotometer (Eppendorf)*.

8.2. Retrotranscripción.

Para realizar la retrotranscripción del ARN mensajero al ADNc, se utilizó el kit *High-Capacity cDNA reverse transcription (Applied Biosystems, #4368814)*. Siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, se retrotranscribieron entre 200 y 400ng de ARN totales.

En este protocolo, la cantidad de ARN establecida se lleva a 10µl de agua destilada libre de RNAsa para cada muestra. En otro tubo, de forma conjunta

para todas las muestras, se preparó la mezcla del tampón 10X, los cebadores aleatorios para la enzima, la mezcla de dNTPs y la retrotranscriptasa. Una vez preparada, se añaden 10µl de esta mezcla en los tubos con el ARN, quedando listos para la reacción en el termociclador. Las muestras se incubaron en primer lugar a 25°C durante 10 minutos, seguido de 2h a 37°C y, por último, a 85°C durante 5 minutos. El equipo termociclador utilizado fue *Veriti 96-well Therman Cycler (Applied Biosystems)*. Una vez finalizada la reacción de retrotranscripción, las muestras se diluyeron 10 veces con agua mili-Q quedando a una concentración de 1 y 2ng/µl, y se utilizaron para la reacción de PCR cuantitativa.

8.3. PCR cuantitativa.

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa (qPCR, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), utilizando el kit *PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems #A25742)*, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Se usó 1µl de cada muestra del ADNc sintetizado en el paso anterior, que fue transferido a una placa de 96 pocillos (*MicroAmp EnduraPlate Optical 96-Well, Applied Biosystems, #4483354*). En un tubo a parte se preparó una mezcla de 2µl de agua mili-Q, 2µl de la mezcla de cebadores específicos de cada gen, los cuales vienen de un stock a una concentración 100µM y 5µl de la *master mix* del kit, (9µl en total) que se añadieron sobre las muestras de ADNc. Se realizaron duplicados técnicos de cada gen analizado sobre la misma muestra. El protocolo de qPCR utilizado consistió en un primer paso de desnaturalización a 95° durante 10 minutos, seguida de una repetición de 50 ciclos, cada uno de los cuales consistió en las tres etapas siguientes: desnaturalización de ADN a 95°C, hibridación de los cebadores al ADN molde a 60°C, y extensión de la nueva cadena de ADN, paso tras el cual es medida la señal fluorescente en cada pocillo. Una vez terminada la reacción, se incluyó un paso para analizar la temperatura de desnaturalización de cada producto de PCR, con el fin de comprobar la presencia de un único producto, validando así la especificidad de los cebadores. Para ello se mide la emisión de fluorescencia de *SYBR Green*

durante el cambio paulatino de temperatura de 60°C a 95°C. el equipo empleado fue el termociclador *QuantStudio 3* de *Applied Biosystems*.

Para la cuantificación, se determinó el ciclo en el cual, cada muestra superó un determinado umbral de fluorescencia (Ct) y la amplificación del gen *Eif1a* se utilizó como control interno para normalizar la cantidad de ADNc inicial entre las distintas muestras, calculando así la expresión de los genes estudiados (ΔCt). La expresión relativa de los transcritos se calculó refiriendo los valores obtenidos a nuestra condición basal (sin tratamientos, no diferenciadas, etc), calculando el $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Las secuencias de los cebadores utilizados en la qPCR para los genes estudiados se diseñaron a partir de los exones obtenidos de la base de datos *Ensembl* y el software *Primer3*, y todos los oligonucleótidos fueron diseñados con una temperatura de hibridación de 60°C y un tamaño de entre 18 y 25 nucleótidos. Las secuencias para el estudio de la expresión de genes murinos se recogen en la tabla M.7.

Tabla M.8: Listado de oligonucleótidos utilizados como cebadores en qPCR en muestras procedentes de ratón

Nombre del gen	Secuencia F	Secuencia R
<i>Krt5</i>	CATCGATTGCACCTGCTCTA	TCCAGCAGCTTCCTGTAGG
<i>Trp63</i>	CAGATTCAGAACGGCTCCTC	GATGGAGAGAGGGCATCAAA
<i>FoxJ1</i>	GTTTCATCCACCCATGTTCC	GTAGGACCCTTCTGGGCTTC
<i>Mcidas</i>	CAGATCAAGGCAACAACGAA	TTAGGGTCACGATTGTGCAG
<i>Scgb1a1</i>	CATCATGAAGCTCACGGAGA	AGGTGAGATGCTCGCAGTTT
<i>Scgb3a2</i>	TTCCCTCATTTGATCCCTTG	CACGTAGCAAAGGCTTCTCC
<i>Spdef</i>	CAGGGCCTGTCTGCTTTCTA	CATCGATTGCACCTGCTCTA
<i>Muc5ac</i>	ACACAACCTCCTCAGTCCCT	GTGGTAGAACTGACTGGGGC
<i>Irf1</i>	CCTGCCAGACATCGAGGAAG	TTTCCTCTGGTTCCTGGTGAG
<i>Irf2</i>	AATTCCTGCCCGACATTGA	AAGGTCGTTCCGATAAGGGC
<i>Irf3</i>	AATGGGAGTTCGAGGTGACC	GTCCGTCAGAAACCCCTCAG
<i>Eif3</i>	GCTGTACTCCACCTTGCAGA	GGAGAAGTCGATGGAGCTGG
<i>Egr1</i>	CTTACCCGCCATATCCGCAT	GGATGTGGGTGGTAAGGTGG

<i>Epas1</i>	CTATGGACGGCGAGGACTTC	CCAAGTGTGCGGGTACTTA
<i>Pact</i>	AGCCTGGGAAAACACCGATT	TCTGAAGGTGAAAGTGGGCA
<i>Chop</i>	AACAGAGGTCACACGCACAT	ACTTTCCGCTCGTTCTCCTG
<i>Gadd34</i>	CCAGCGTTGTCTACCAGGAG	TTGAACAATCTGAGCCGCCT
<i>Perk</i>	GACAACAGTGAAGTACGCGGA	GAGAAGCTTCGGACGGACAA
<i>Pkr</i>	ATCTGCAGTCTGAGGGGAGT	CCACAGGCCAGCAATTAAC
<i>eIF2α</i>	CGCAGCCTTCTATAGCCCTC	AACCTAGGAGCACATGTGGC
<i>Ifit1</i>	TGAAGCCTTGATCCAGAGCG	TCCTTGACACCTTCTCCAC
<i>Ifit2</i>	AGTCCTCTTGGCACTGAAGC	GCAATAAACCTGGCTGCCC
<i>Ifit3</i>	AAGCCAAAGGACCCAGAGTG	ATCCTCAGCAGTTTCAGGGC
<i>Oas1</i>	ACTCAAGGGCAAGTCAGACG	CTTGAAGCTCAGAGACCGGG
<i>Oas2</i>	TGCTCACTGTGTATGCCTGG	TGTTCCGGACTGTCTCATCC
<i>Oas3</i>	GGGATCTTGGATTTGGGCCA	GGATCTTGGTGGCTGCTTCT
<i>Irf7</i>	CCGGTGATCTTTCCAGTCC	CCTCCCAGTACACCTTGAC
<i>Mx2</i>	GTATGAGGAGAAGGTGCGGC	TCCCAATGACAGCGATGG
<i>Ii33</i>	TTCAAAGGGGTGACGTCTCG	TGCAGCTCTCATCTTCTCCTC
<i>Runx2</i>	CATGGTGGAGATCATCGCGG	ACGGGCAGGGTCTTGTTG
<i>Igf1</i>	CTCTTCTACCTGGCGCTCTG	AAGTAAAAGCCCCTCGGTCC
<i>Nell1</i>	AGATCCACTCAGCCCCTCAT	AGCTCCCGGATCGACAGTAT
<i>Bmpr1b</i>	AAGTGCGGTGGAGAAAAGGT	TTCTCATGCCGCATCAGGAC
<i>Ptger4</i>	GATCGAACCGTGAGCTCCAA	CACCACCCGAAGATGAACA
<i>Smad5</i>	ACCTGAGCCACAATGAACCG	AGCAGGGGAAGGAGGATAGG

9. Secuenciación masiva de transcritos.

Para la secuenciación masiva de transcritos, el ARN de las muestras fue extraído como se detalla en el apartado x.x. Una vez aislado, las muestras fueron procesadas en el Servicio de Técnicas Aplicadas a las Biotecnologías (STAB) de la Universidad de Extremadura. Las lecturas fueron obtenidas utilizando el equipo *Ion Torrent (Thermo Fisher)* y posteriormente alineadas con el genoma de *Mus musculus* (mm10), normalizando las lecturas con el fin de

comparar la expresión génica entre las muestras. Las lecturas y el procesamiento de los datos están recogidos en el repositorio *ArrayExpress* (E-MTAB-8852).

10. Inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación (ChIP sequencing)

La Inmunoprecipitación de la Cromatina acoplada a Secuenciación, del inglés, ChIP-sequencing (ChIP-seq) es un método de análisis molecular utilizado para identificar los sitios de unión de las proteínas con la molécula de ADN.

Para realizar la inmunoprecipitación de cromatina, las muestras fueron inicialmente lavadas con PBS. Tras esto, las células fueron fijadas con PFA1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió glicina a una concentración final de 0,125M de una solución 2,5M, y fue incubado durante 5 minutos, con el fin de bloquear la fijación. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con PBS más un coctel de inhibidores de proteasa 1X (IP). A continuación, se procedió a la lisis de las células mediante una solución de Tris-HCl 50mM pH8, EDTA 10mM, 1% de SDS y agua (SDS *Lysis Buffer*) más un coctel de inhibidores de proteasas 1X, incubándolo 30 minutos a 4°C. Las muestras con la solución de lisis fueron sonicadas en dos ciclos de 15 minutos a máxima potencia con pulso de *on-off* de 30 segundos. Tras la sonicación, se centrifugaron 10 minutos a 15000xg, recolectándose posteriormente el sobrenadante, el cual se midió para ver la cantidad de cromatina en el *NANODROP 2000c* (*Thermo Scientific*). Se apartó el 2% del volumen de cada muestra (*ImPut*) y se congeló a -80°C. El resto del sobrenadante se diluyó 10 veces con *Dilution Buffer* (0,01% SDS, 1,1% tritón X-100, Tris-HCl 16,7mM pH8, EDTA 1,2mM, NaCl 167 mM y agua) más el coctel de inhibidores de proteasas 1x. Una vez diluidas, las muestras se prelavaron con bolas de proteína A sefarosa y proteína G sefarosa, y fueron incubadas 30 minutos a 4°C en agitación. Tras ello, se centrifugaron 1 minuto a 4°C y 2.000xg, recuperando el sobrenadante, al cual se le añadieron los anticuerpos y las bolas de proteínas, incubándolo toda la noche a 4°C en agitación.

Al día siguiente, se volvió a centrifugar a 4°C durante 1 minuto a 2.000xg, y esta vez fueron recolectadas las bolas. Estas fueron lavadas con diferentes buffers, se realizó un primer lavado con *Low Salt Wash buffer* (0,1% SDS, 0,1% Tritón X-1000, NaCl 150mM, EDTA 2mM, Tris-HCl 20mM pH8 y agua), un segundo con *High Salt Wash buffer* (0,1% SDS, 0,1% Tritón X-1000, NaCl 500mM, EDTA 2mM, Tris-HCl 20mM pH8 y agua), un tercer lavado con *IP Wash buffer* (0,5M LiCl, 1% NP-40, 1% de ácido desoxicólico, Tris-HCl 100mM PH9 y agua), y por último, dos lavados con TE 1X. En todos los lavados las muestras fueron incubadas 3 minutos en rotación con las diferentes soluciones, centrifugadas 1 minuto a 2.000xg y retirado el sobrenadante. Fueron eluidas en dos pasos o dos lavados, en los cuales se añadió *Elution buffer* (1% SDS, 0,1M NaHCO₃, y agua) y se vortearon durante 15 minutos. En cada lavado se recuperó el sobrenadante.

Tras la elución de las muestras, se descongelaron los Imput, llevándolos al mismo volumen que las muestras, con la solución de elución. Después se añadió una solución de NaCl a una concentración final de 0,3M, de una solución stock de 5M, tanto a las muestras como a sus Imput, para revertir el cross-link y esto fue incubado 4h a 65°C. Pasado el tiempo de incubación se añadió la solución 5X PK Buffer (Tris-HCl 50mM pH7,5, EDTA 25mM, 1,25% SDS y agua) además de 40µg/ml de proteinasa K. Por último, para la purificación de las muestras se utilizó el kit *ChIP DNA Clean & Concentrator (ZYMO RESEARCH, #D5205)* siguiendo el protocolo del fabricante. Se añadió tanto a las muestras como a los ImPut 5 volúmenes de *ChIP DNA Binding Buffer*, se transfirió el volumen a una columna colocada sobre un tubo colector y se centrifugó 30 segundos a 10.000xg. El volumen que pasó por la columna fue descartado, y fueron añadidos 200µl de *Wash Buffer* a la columna. Se volvió a centrifugar 30 segundos a 10.000xg, y se volvió a descartar el volumen que pasó por la columna. Posteriormente se añadieron 45µl de *Elution Buffer*, se pasaron las columnas a eppendorf, se incubaron 2 minutos y se centrifugaron 30 segundos a 10.000xg.

Una vez aisladas, las muestras fueron procesadas y secuenciadas en *STAB VIDA*. Los fragmentos de ADN generados (bibliotecas de ADN) se

secuenciaron con la plataforma Illumina Novaseq, utilizando lecturas de secuenciación de extremos emparejados de 150 pb.

11. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

La microscopía electrónica de barrido fue utilizada para analizar la morfología, distribución y abundancia de los cilios en las células multiciliadas, y para analizar la morfología de la superficie apical de las células secretoras. Para ello, se diferenciaron cultivos de células progenitoras de las vías respiratorias, y una vez diferenciadas, los *transwells* se lavaron con PBS $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, manteniéndolos en el soporte de plástico dentro de la placa multipocillo. Las células fueron fijadas durante 90 minutos a 4°C con glutaraldehído (2,5% v/v, *Sigma*, #G5882) en una solución de cacodilato sódico 0,1M (*Sigma*, #C0250). Tras la fijación, se realizan tres lavados de 5 minutos con cacodilato sódico 0,1M, y posteriormente se incubó durante 2h a 4°C en tetraóxido de osmio (1% v/v *Sigma*, #75632). El tetraóxido de osmio en exceso fue eliminado mediante otros tres lavados con cacodilato 0,1M, y las muestras se deshidrataron con incubaciones de 30 minutos a 4°C en concentraciones de etanol crecientes desde el 10% hasta el 100% 8v/v) (10%, 30%, 50%, 70%, 90% y 100%).

Tras la deshidratación de las muestras, la membrana porosa del *transwell* se separó del soporte de plástico. A partir de este paso, las muestras se procesaron en el Servicio de Análisis y Caracterización de Sólidos y Superficies de la Universidad de Extremadura. El etanol en el que se encontraban los *transwells* fue sustituido progresivamente por CO_2 , y éste fue retirado mediante la técnica del punto crítico para secar por completo las muestras. Una vez secas, las muestras se recubrieron de oro por pulverización catódica o *sputtering*, y visualizadas utilizando el equipo *Quanta 3D FEG (FEI Company)*. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con los softwares *ImageJ* y *Adobe Photoshop CC2018*.

12. Ensayo de Doubling Time.

La capacidad de proliferación celular de los cultivos bajo los distintos tratamientos y silenciamientos génicos fue evaluada mediante el análisis del tiempo en el cual el número de células iniciales se duplicó, conocido como *Doubling Time*. Para ello, se plaqueó un número constante de células de 8×10^3 en placas multipocillos de 12 pocillos (*Corning, #3513*) y se incubó hasta que los cultivos estuvieron a una confluencia del 70-80%, teniendo en cuenta las horas transcurridas desde la siembra. Tras esto, las células fueron despegadas y contadas para plaquear de nuevo el mismo número de células en el siguiente pase. Se utilizó la ecuación $\frac{(t_2-t_1)\log 2}{\log c_2 - \log c_1}$, donde t_2-t_1 expresa el tiempo transcurrido entre la siembra y la recolección de células, c_1 es el número de células plaqueadas y c_2 el número de células totales recolectadas del pocillo. El cultivo fue mantenido durante varios pases y las condiciones experimentales se plaquearon por duplicado.

13. Medida de la resistencia eléctrica Transepitelial.

Las células epiteliales de las vías respiratorias fueron plaqueadas en *transwells* según se describe anteriormente. Transcurridas las 24h desde la siembra y a lo largo del proceso de diferenciación, la resistencia transepitelial (*Transepithelial Electrical Resistance, TEER*) fue medida utilizando el equipo *EVOM3 (World Precision Instrument)*. Para ello el medio *PneumaCult* fue sustituido momentáneamente por medio DMEM suplementado con FBS al 10%, además de Gln 1% y P/S 1%, que se colocó en ambas cámaras del pocillo *transwell*. Los valores obtenidos fueron normalizados a K-Ohm/cm².

14. Medida del batido de los cilios.

Para medir la frecuencia del batido de los cilios de las células multiciliadas, los cultivos se diferenciaron hasta ALI14, momento en el cual la

cámara superior de los *transwells* fue lavada con PBS $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ a 37°C para eliminar el moco secretado por las células. Tras la incubación de 10 minutos, el PBS fue retirado y sustituido por una suspensión que contenía 5µl de bolas magnéticas (*Dynabeads Streptavidin C1, Invitrogen, #65001*) en 300µl de PBS $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$, suspensión que se incubó durante otros 10 minutos para permitir la decantación de las bolas magnéticas sobre las células. Posteriormente fue retirado el volumen de la cámara superior y se dejó que las bolas magnéticas se fijasen a las células mediante una incubación de 90 minutos a 37°C. En el momento de adquirir las grabaciones, se añadió 100µl de PBS $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ sobre los *transwells* y éstos fueron colocados en el microscopio invertido *Motic AE20*. Las grabaciones fueron adquiridas con la cámara de un *iPhone XS (Apple Inc.)* a 240 fps y analizadas con el software *MATLAB* a través de una aplicación desarrollada en nuestro laboratorio para seguir el movimiento de las bolas magnéticas en las películas adquiridas. Los resultados de frecuencia fueron expresados en s^{-1} .

15. Análisis estadísticos.

Todos los experimentos descritos en esta tesis se realizaron empenado, al menos, dos replicas biológicas experimentales de cada condición. Los datos representados se muestran como media \pm desviación estándar (s.d.) y fueron analizados mediante el test *T de Student* para muestras no pareadas. La generación de gráficos y la significación estadística han sido obtenidas empleando el software *GraphPad 6.0*.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia:

- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y., & Dynlacht, B. D. (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Molecular Cell*, *27*(1), 53–66. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2007.06.011>
- Aggarwal, S., Ahmad, I., Lam, A., Carlisle, M. A., Li, C., Wells, J. M., Raju, S. V., Athar, M., Rowe, S. M., Dransfield, M. T., & Matalon, S. (2018). Heme scavenging reduces pulmonary endoplasmic reticulum stress, fibrosis, and emphysema. *JCI Insight*, *3*(21). <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.120694>
- Ahn, D.-G., Shin, H.-J., Kim, M.-H., Lee, S., Kim, H.-S., Myoung, J., Kim, B.-T., & Kim, S.-J. (2020). Current Status of Epidemiology, Diagnosis, Therapeutics, and Vaccines for Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(3), 313–324. <https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03011>
- Alsaadi, E. A. J., Neuman, B. W., & Jones, I. M. (2020). Identification of a Membrane Binding Peptide in the Envelope Protein of MHV Coronavirus. *Viruses*, *12*(9), 1054. <https://doi.org/10.3390/v12091054>
- Arguello, M. D., & Hiscott, J. (2007). Ub surprised: viral ovarian tumor domain proteases remove ubiquitin and ISG15 conjugates. *Cell Host & Microbe*, *2*(6), 367–369. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2007.11.005>
- Astuti, I., & Ysrafil. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome*, *14*(4), 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.020>
- Azhar, M., Phutela, R., Kumar, M., Ansari, A. H., Rauthan, R., Gulati, S., Sharma, N., Sinha, D., Sharma, S., Singh, S., Acharya, S., Sarkar, S., Paul, D., Kathpalia, P., Aich, M., Sehgal, P., Ranjan, G., Bhojar, R. C., Singhal, K., ... Maiti, S. (2021). Rapid and accurate nucleobase detection using FnCas9 and its application in COVID-19 diagnosis. *Biosensors & Bioelectronics*, *183*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2021.113207>
- Bagheri-Yarmand, R., Sinha, K. M., Gururaj, A. E., Ahmed, Z., Rizvi, Y. Q., Huang, S. C., Ladbury, J. E., Bogler, O., Williams, M. D., Cote, G. J., & Gagel, R. F. (2015). A Novel Dual Kinase Function of the RET Proto-oncogene Negatively Regulates Activating Transcription Factor 4-mediated Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(18), 11749. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.619833>
- Bertalanffy, F. D. (1964). *Respiratory Tissue: Structure, Histophysiology, Cytodynamics Part I. Review and Basic Cytomorphology* (G. H. Bourne & J. F. B. T.-I. R. of C. Danielli, Eds.; Vol. 16, pp. 233–328). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60298-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60298-3)

- Bettigole, S. E., & Glimcher, L. H. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Immunol-032414-112116>, *33*, 107–138.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032414-112116>
- Bhojar, R. C., Jain, A., Sehgal, P., Divakar, M. K., Sharma, D., Imran, M., Jolly, B., Ranjan, G., Rophina, M., Sharma, S., Siwach, S., Pandhare, K., Sahoo, S., Sahoo, M., Nayak, A., Mohanty, J. N., Das, J., Bhandari, S., Mathur, S. K., ... Sivasubbu, S. (2021). High throughput detection and genetic epidemiology of SARS-CoV-2 using COVIDSeq next-generation sequencing. *PLoS One*, *16*(2), e0247115–e0247115.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247115>
- Bianchi, M., Benvenuto, D., Giovanetti, M., Angeletti, S., Ciccozzi, M., & Pascarella, S. (2020). Sars-CoV-2 Envelope and Membrane Proteins: Structural Differences Linked to Virus Characteristics? *BioMed Research International*, *2020*, 4389089.
<https://doi.org/10.1155/2020/4389089>
- Blair, H. C., Larrouture, Q. C., Li, Y., Lin, H., Beer-Stoltz, D., Liu, L., Tuan, R. S., Robinson, L. J., Schlesinger, P. H., & Nelson, D. J. (2017). Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *23*(3), 268–280.
<https://doi.org/10.1089/TEN.TEB.2016.0454>
- Böger, B., Fachi, M. M., Vilhena, R. O., Cobre, A. F., Tonin, F. S., & Pontarolo, R. (2021). Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *American Journal of Infection Control*, *49*(1), 21.
<https://doi.org/10.1016/J.AJIC.2020.07.011>
- Bokelmann, L., Nickel, O., Maricic, T., Pääbo, S., Meyer, M., Borte, S., & Riesenberger, S. (2021). Point-of-care bulk testing for SARS-CoV-2 by combining hybridization capture with improved colorimetric LAMP. *Nature Communications*, *12*(1).
<https://doi.org/10.1038/S41467-021-21627-0>
- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Singh, J., Streithorst, J., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C.-Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu, C. Y. (2020). Rapid Detection of 2019 Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Using a CRISPR-based DETECTR Lateral Flow Assay. *MedRxiv : The Preprint Server for Health Sciences*, 2020.03.06.20032334.
<https://doi.org/10.1101/2020.03.06.20032334>
- Buss, L. F., Prete Jr, C. A., Abraham, C. M. M., Mendrone Jr, A., Salomon, T., de Almeida-Neto, C., França, R. F. O., Belotti, M. C., Carvalho, M. P. S. S., Costa, A. G., Crispim, M. A. E., Ferreira, S. C., Fraiji, N. A., Gurzenda, S., Whittaker, C., Kamaura, L. T., Takecian, P. L., da Silva Peixoto, P., Oikawa, M. K., ... Sabino, E. C. (2021). Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science (New York, N.Y.)*, *371*(6526), 288–292. <https://doi.org/10.1126/science.abe9728>
- Buss, L. F., Prete, C. A., Abraham, C. M. M., Mendrone, A., Salomon, T., De Almeida-Neto, C., França, R. F. O., Belotti, M. C., Carvalho, M. P. S. S., Costa, A. G., Crispim, M. A. E., Ferreira, S. C., Fraiji, N. A., Gurzenda, S., Whittaker, C., Kamaura, L. T., Takecian, P. L., Da Silva

- Peixoto, P., Oikawa, M. K., ... Sabino, E. C. (2021). Three-quarters attack rate of SARS-CoV-2 in the Brazilian Amazon during a largely unmitigated epidemic. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6526), 288–292. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABE9728>
- Bustamante-Marin, X. M., & Ostrowski, L. E. (2017). Cilia and Mucociliary Clearance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(4), a028241. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028241>
- Cantón, R., De Lucas Ramos, P., García-Botella, A., García-Lledó, A., Gómez-Pavón, J., González Del Castillo, J., Hernández-Sampelayo, T., Martín-Delgado, M. C., Martín Sánchez, F. J., Martínez-Sellés, M., Molero García, J. M., Moreno Guillén, S., Rodríguez-Artalejo, F. J., Ruiz-Galiana, J., & Bouza, E. (2021). New variants of SARS-CoV-2. *Revista Espanola de Quimioterapia : Publicacion Oficial de La Sociedad Espanola de Quimioterapia*, 34(5), 419–428. <https://doi.org/10.37201/req/071.2021>
- Cao, S. S., & Kaufman, R. J. (2012). Unfolded protein response. *Current Biology*, 22(16), R622–R626. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.07.004>
- Chakrabarti, A., Chen, A. W., & Varner, J. D. (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), 2777–2793. <https://doi.org/10.1002/BIT.23282>
- Chan, J. F.-W., Kok, K.-H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K.-W., Yuan, S., & Yuen, K.-Y. (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 221–236. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1719902>
- Chandler-Brown, D., Bueno, A. M., Atay, O., & Tsao, D. S. (2020). A Highly Scalable and Rapidly Deployable RNA Extraction-Free COVID-19 Assay by Quantitative Sanger Sequencing. *BioRxiv*, 2020.04.07.029199. <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.029199>
- Chang, Y. G., Yan, X. Z., Xie, Y. Y., Gao, X. C., Song, A. X., Zhang, D. E., & Hu, H. Y. (2008). Different roles for two ubiquitin-like domains of ISG15 in protein modification. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(19), 13370–13377. <https://doi.org/10.1074/JBC.M800162200>
- Chen, R. E., Zhang, X., Case, J. B., Winkler, E. S., Liu, Y., VanBlargan, L. A., Liu, J., Errico, J. M., Xie, X., Suryadevara, N., Gilchuk, P., Zost, S. J., Tahan, S., Droit, L., Turner, J. S., Kim, W., Schmitz, A. J., Thapa, M., Wang, D., ... Diamond, M. S. (2021). Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. *Nature Medicine*, 27(4), 717–726. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01294-w>
- Chen, X., Karnovsky, A., Sans, M. D., Andrews, P. C., & Williams, J. A. (2010). Molecular characterization of the endoplasmic reticulum: insights from proteomic studies. *Proteomics*, 10(22), 4040–4052. <https://doi.org/10.1002/PMIC.201000234>
- Chi, X., Yan, R., Zhang, J., Zhang, G., Zhang, Y., Hao, M., Zhang, Z., Fan, P., Dong, Y., Yang, Y., Chen, Z., Guo, Y., Zhang, J., Li, Y., Song, X., Chen, Y., Xia, L., Fu, L., Hou, L., ... Chen, W. (2020). A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein

of SARS-CoV-2. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6504), 650–655.

<https://doi.org/10.1126/science.abc6952>

de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier, R. A. M., Galiano, M., Gorbalenya, A. E., Memish, Z. A., Perlman, S., Poon, L. L. M., Snijder, E. J., Stephens, G. M., Woo, P. C. Y., Zaki, A. M., Zambon, M., & Ziebuhr, J. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*, 87(14), 7790–7792. <https://doi.org/10.1128/JVI.01244-13>

Deeks, J. J., Dinnes, J., Takwoingi, Y., Davenport, C., Spijker, R., Taylor-Phillips, S., Adriano, A., Beese, S., Dretzke, J., Ferrante di Ruffano, L., Harris, I. M., Price, M. J., Dittrich, S., Emperador, D., Hooft, L., Leeflang, M. M. G., & Van den Bruel, A. (2020). Antibody tests for identification of current and past infection with SARS-CoV-2. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2020(6). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013652>

Deng, X., Garcia-Knight, M. A., Khalid, M. M., Servellita, V., Wang, C., Morris, M. K., Sotomayor-González, A., Glasner, D. R., Reyes, K. R., Gliwa, A. S., Reddy, N. P., Sanchez San Martin, C., Federman, S., Cheng, J., Balcerak, J., Taylor, J., Streithorst, J. A., Miller, S., Sreekumar, B., ... Chiu, C. Y. (2021). Transmission, infectivity, and neutralization of a spike L452R SARS-CoV-2 variant. *Cell*, 184(13), 3426-3437.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.025>

Di Giorgio, S., Martignano, F., Torcia, M. G., Mattiuz, G., & Conticello, S. G. (2020). Evidence for host-dependent RNA editing in the transcriptome of SARS-CoV-2. *Science Advances*, 6(25), eabb5813–eabb5813. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb5813>

Digard, P., Lee, H. M., Sharp, C., Grey, F., & Gaunt, E. (2020). Intra-genome variability in the dinucleotide composition of SARS-CoV-2. *Virus Evolution*, 6(2), veaa057–veaa057. <https://doi.org/10.1093/ve/veaa057>

Duart, G., García-Murria, M. J., Grau, B., Acosta-Cáceres, J. M., Martínez-Gil, L., & Mingarro, I. (2020). SARS-CoV-2 envelope protein topology in eukaryotic membranes. *Open Biology*, 10(9), 200209. <https://doi.org/10.1098/rsob.200209>

Ebert, S. M., Bullard, S. A., Basisty, N., Marcotte, G. R., Skopec, Z. P., Dierdorff, J. M., Al-Zougbi, A., Tomcheck, K. C., DeLau, A. D., Rathmacher, J. A., Bodine, S. C., Schilling, B., & Adams, C. M. (2020). Activating transcription factor 4 (ATF4) promotes skeletal muscle atrophy by forming a heterodimer with the transcriptional regulator C/EBP β . *The Journal of Biological Chemistry*, 295(9), 2787–2803. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA119.012095>

Ebert, S. M., Rasmussen, B. B., Judge, A. R., Judge, S. M., Larsson, L., Wek, R. C., Anthony, T. G., Marcotte, G. R., Miller, M. J., Yorek, M. A., Vella, A., Volpi, E., Stern, J. I., Strub, M. D., Ryan, Z., Talley, J. J., & Adams, C. M. (2022). Biology of Activating Transcription Factor 4 (ATF4) and Its Role in Skeletal Muscle Atrophy. *The Journal of Nutrition*, 152(4), 926. <https://doi.org/10.1093/JN/NXAB440>

Endo, M., Oyadomari, S., Suga, M., Mori, M., & Gotoh, T. (2005). The ER stress pathway involving CHOP is activated in the lungs of LPS-treated mice. *Journal of Biochemistry*, 138(4), 501–507. <https://doi.org/10.1093/JB/MVI143>

- Fauver, J. R., Petrone, M. E., Hodcroft, E. B., Shioda, K., Ehrlich, H. Y., Watts, A. G., Vogels, C. B. F., Brito, A. F., Alpert, T., Muyombwe, A., Razeq, J., Downing, R., Cheemarla, N. R., Wyllie, A. L., Kalinich, C. C., Ott, I. M., Quick, J., Loman, N. J., Neugebauer, K. M., ... Grubaugh, N. D. (2020). Coast-to-Coast Spread of SARS-CoV-2 during the Early Epidemic in the United States. *Cell*, *181*(5), 990. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.04.021>
- Fessler, E., Eckl, E. M., Schmitt, S., Mancilla, I. A., Meyer-Bender, M. F., Hanf, M., Philippou-Massier, J., Krebs, S., Zischka, H., & Jae, L. T. (2020). A pathway coordinated by DELE1 relays mitochondrial stress to the cytosol. *Nature*, *579*(7799), 433–437. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2076-4>
- Garrido-Jimenez, S., Barrera-Lopez, J. F., Diaz-Chamorro, S., Mateos-Quiros, C. M., Rodriguez-Blanco, I., Marquez-Perez, F. L., Lorenzo, M. J., Centeno, F., Roman, A. C., & Carvajal-Gonzalez, J. M. (2021). p53 regulation by MDM2 contributes to self-renewal and differentiation of basal stem cells in mouse and human airway epithelium. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *35*(9). <https://doi.org/10.1096/FJ.202100638R>
- Ge, X., Hu, B., & Shi, Z. (2015). Bat coronaviruses. *Bats and Viruses: From Pathogen Discovery to Host Genomics*. NY: Wiley, 127–155.
- Ghosh, R., Wang, L., Wang, E. S., Perera, B. G. K., Igbaria, A., Morita, S., Prado, K., Thamsen, M., Caswell, D., Macias, H., Weiberth, K. F., Gliedt, M. J., Alavi, M. V., Hari, S. B., Mitra, A. K., Bhatarai, B., Schürer, S. C., Snapp, E. L., Gould, D. B., ... Papa, F. R. (2014). Allosteric inhibition of the IRE1 α RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell*, *158*(3), 534–548. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.07.002>
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, *5*(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/S41564-020-0695-Z>
- Gordon, B. S., Kelleher, A. R., & Kimball, S. R. (2013). Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(10), 2147–2157. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2013.05.039>
- Grabowski, F., Preibisch, G., Giziński, S., Kochańczyk, M., & Lipniacki, T. (2021). SARS-CoV-2 Variant of Concern 202012/01 Has about Twofold Replicative Advantage and Acquires Concerning Mutations. *Viruses*, *13*(3), 392. <https://doi.org/10.3390/v13030392>
- Guan, B. J., Krokowski, D., Majumder, M., Schmotzer, C. L., Kimball, S. R., Merrick, W. C., Koromilas, A. E., & Hatzoglou, M. (2014). Translational control during endoplasmic reticulum stress beyond phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(18), 12593–12611. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.543215>

- Guo, L., Ren, L., Yang, S., Xiao, M., Chang, D., Yang, F., Dela Cruz, C. S., Wang, Y., Wu, C., Xiao, Y., Zhang, L., Han, L., Dang, S., Xu, Y., Yang, Q.-W., Xu, S.-Y., Zhu, H.-D., Xu, Y.-C., Jin, Q., ... Wang, J. (2020). Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *71*(15), 778–785. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>
- Guo, L., Sun, X., Wang, X., Liang, C., Jiang, H., Gao, Q., Dai, M., Qu, B., Fang, S., Mao, Y., Chen, Y., Feng, G., Gu, Q., Wang, R. R., Zhou, Q., & Li, W. (2020). SARS-CoV-2 detection with CRISPR diagnostics. *Cell Discovery*, *6*(1), 34. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0174-y>
- Guo, X., Aviles, G., Liu, Y., Tian, R., Unger, B. A., Lin, Y. H. T., Wiita, A. P., Xu, K., Correia, M. A., & Kampmann, M. (2020). Mitochondrial stress is relayed to the cytosol by an OMA1-DELE1-HRI pathway. *Nature*, *579*(7799), 427–432. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2078-2>
- Guo, Y.-R., Cao, Q.-D., Hong, Z.-S., Tan, Y.-Y., Chen, S.-D., Jin, H.-J., Tan, K.-S., Wang, D.-Y., & Yan, Y. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Military Medical Research*, *7*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>
- Hall, V. J., Foulkes, S., Saei, A., Andrews, N., Oguti, B., Charlett, A., Wellington, E., Stowe, J., Gillson, N., Atti, A., Islam, J., Karagiannis, I., Munro, K., Khawam, J., Chand, M. A., Brown, C. S., Ramsay, M., Lopez-Bernal, J., Hopkins, S., & Group, S. S. (2021). COVID-19 vaccine coverage in health-care workers in England and effectiveness of BNT162b2 mRNA vaccine against infection (SIREN): a prospective, multicentre, cohort study. *Lancet (London, England)*, *397*(10286), 1725–1735. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00790-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00790-X)
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(1), 38–47. <https://doi.org/10.1038/NRC704>
- Hassler, J. R., Scheuner, D. L., Wang, S., Han, J., Kodali, V. K., Li, P., Nguyen, J., George, J. S., Davis, C., Wu, S. P., Bai, Y., Sartor, M., Cavalcoli, J., Malhi, H., Baudouin, G., Zhang, Y., Yates, J. R., Itkin-Ansari, P., Volkman, N., & Kaufman, R. J. (2015). The IRE1 α /XBP1s Pathway Is Essential for the Glucose Response and Protection of β Cells. *PLoS Biology*, *13*(10), 1–22. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1002277>
- Hikmet, F., Méar, L., Edvinsson, Å., Micke, P., Uhlén, M., & Lindskog, C. (2020). The protein expression profile of ACE2 in human tissues. *Molecular Systems Biology*, *16*(7). <https://doi.org/10.15252/MSB.20209610>
- Hoffmann, M., Arora, P., Groß, R., Seidel, A., Hörnich, B. F., Hahn, A. S., Krüger, N., Graichen, L., Hofmann-Winkler, H., Kempf, A., Winkler, M. S., Schulz, S., Jäck, H.-M., Jahrsdörfer, B., Schrezenmeier, H., Müller, M., Kleger, A., Münch, J., & Pöhlmann, S. (2021). SARS-CoV-2 variants B.1.351 and P.1 escape from neutralizing antibodies. *Cell*, *184*(9), 2384-2393.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.036>
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020).

- SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.052>
- Hollien, J., & Weissman, J. S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)*, *313*(5783), 104–107. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1129631>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews. Microbiology*, *19*(3), 141. <https://doi.org/10.1038/S41579-020-00459-7>
- Hu, C. C. A., Dougan, S. K., McGehee, A. M., Love, J. C., & Ploegh, H. L. (2009). XBP-1 regulates signal transduction, transcription factors and bone marrow colonization in B cells. *The EMBO Journal*, *28*(11), 1624–1636. <https://doi.org/10.1038/EMBOJ.2009.117>
- Huh, W. J., Esen, E., Geahlen, J. H., Bredemeyer, A. J., Lee, A., Shi, G., Konieczny, S. F., Glimcher, L. H., & Mills, J. C. (2010). XBP1 controls maturation of gastric zymogenic cells by induction of MIST1 and expansion of the rough endoplasmic reticulum. *Gastroenterology*, *139*(6), 2038. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2010.08.050>
- Hwang, S. S., Lim, J., Yu, Z., Kong, P., Sefik, E., Xu, H., Harman, C. C. D., Kim, L. K., Lee, G. R., Li, H. B., & Flavell, R. A. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (New York, N.Y.)*, *367*(6483), 1255–1260. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABB2507>
- Iliescu, F. S., Ionescu, A. M., Gogianu, L., Simion, M., Dedi, V., Chifiriuc, M. C., Pircalabioru, G. G., & Iliescu, C. (2021). Point-of-Care Testing-The Key in the Battle against SARS-CoV-2 Pandemic. *Micromachines*, *12*(12), 1464. <https://doi.org/10.3390/mi12121464>
- Johnson, B. A., Xie, X., Bailey, A. L., Kalveram, B., Lokugamage, K. G., Muruato, A., Zou, J., Zhang, X., Juelich, T., Smith, J. K., Zhang, L., Bopp, N., Schindewolf, C., Vu, M., Vanderheiden, A., Winkler, E. S., Swetnam, D., Plante, J. A., Aguilar, P., ... Menachery, V. D. (2021). Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature*, *591*(7849), 293–299. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03237-4>
- Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A., & Barvkar, V. T. (2021a). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, *61*(3), 180–202. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>
- Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A., & Barvkar, V. T. (2021b). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, *61*(3), 180–202. <https://doi.org/10.1002/JOBM.202000537>
- Kaser, A., Lee, A. H., Franke, A., Glickman, J. N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E. E. S., Higgins, D. E., Schreiber, S., Glimcher, L. H., & Blumberg, R. S. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*, *134*(5), 743–756. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.07.021>
- Kemp, S. A., Collier, D. A., Datir, R. P., Ferreira, I. A. T. M., Gayed, S., Jahun, A., Hosmillo, M., Rees-Spear, C., Mlcochova, P., Lumb, I. U., Roberts, D. J., Chandra, A., Temperton, N.,

- Collaboration, C.-N. B. C.-19, Consortium, C.-19 G. U. K. (COG-U., Sharrocks, K., Blane, E., Modis, Y., Leigh, K. E., ... Gupta, R. K. (2021). SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection. *Nature*, *592*(7853), 277–282. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03291-y>
- Kern, D. M., Sorum, B., Mali, S. S., Hoel, C. M., Sridharan, S., Remis, J. P., Toso, D. B., Kotecha, A., Bautista, D. M., & Brohawn, S. G. (2021). Cryo-EM structure of the SARS-CoV-2 3a ion channel in lipid nanodiscs. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*, 2020.06.17.156554. <https://doi.org/10.1101/2020.06.17.156554>
- Khachfe, H. H., Chahrour, M., Sammouri, J., Salhab, H., Makki, B. E., & Fares, M. (2020). An Epidemiological Study on COVID-19: A Rapidly Spreading Disease. *Cureus*, *12*(3), e7313–e7313. <https://doi.org/10.7759/cureus.7313>
- Kidd, M., Richter, A., Best, A., Cumley, N., Mirza, J., Percival, B., Mayhew, M., Megram, O., Ashford, F., White, T., Moles-Garcia, E., Crawford, L., Bosworth, A., Atabani, S. F., Plant, T., & McNally, A. (2021). S-Variant SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 Is Associated With Significantly Higher Viral Load in Samples Tested by TaqPath Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Infectious Diseases*, *223*(10), 1666–1670. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab082>
- Kilberg, M. S., Shan, J., & Su, N. (2009). ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *20*(9), 436–443. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2009.05.008>
- Kim, K. Il, Giannakopoulos, N. V., Virgin, H. W., & Zhang, D.-E. (2004). Interferon-inducible ubiquitin E2, Ubc8, is a conjugating enzyme for protein ISGylation. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(21), 9592–9600. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9592-9600.2004>
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, *85*, 104502. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., de Silva, T. I., Angyal, A., Brown, R. L., Carrilero, L., ... Montefiori, D. C. (2020). Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus. *Cell*, *182*(4), 812–827.e19. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.06.043>
- Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., De Silva, T. I., Group, G., Mcdanal, C., Perez, L. G., ... Montefiori, D. C. (n.d.). *Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>

- Laffeber, C., de Koning, K., Kanaar, R., & Lebbink, J. H. G. (2021). Experimental Evidence for Enhanced Receptor Binding by Rapidly Spreading SARS-CoV-2 Variants. *Journal of Molecular Biology*, *433*(15), 167058. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167058>
- Lamb, P., & McKnight, S. L. (1991). Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends in Biochemical Sciences*, *16*(11), 417–422. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90167-T](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90167-T)
- Lazear, H. M., Schoggins, J. W., & Diamond, M. S. (2019). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, *50*(4), 907–923. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2019.03.025>
- Lee, N., Hui, D., Wu, A., Chan, P., Cameron, P., Joynt, G. M., Ahuja, A., Yung, M. Y., Leung, C. B., To, K. F., Lui, S. F., Szeto, C. C., Chung, S., & Sung, J. J. Y. (2003). A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. *New England Journal of Medicine*, *348*(20), 1986–1994. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030685>
- Lenschow, D. J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V., Lutz, A., Wolff, T., Osiak, A., Levine, B., Schmidt, R. E., García-Sastre, A., Leib, D. A., Pekosz, A., Knobloch, K. P., Horak, I., & Virgin IV, H. W. (2007). IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(4), 1371–1376. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0607038104>
- Lewis, M., & Stracker, T. H. (2021a). Transcriptional regulation of multiciliated cell differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *110*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2020.04.007>
- Lewis, M., & Stracker, T. H. (2021b). Transcriptional regulation of multiciliated cell differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *110*, 51–60. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2020.04.007>
- Li, L., Wen, Y., Jiang, L., & Zhu, Y. Q. (2022). Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway is involved in odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *Archives of Oral Biology*, *133*. <https://doi.org/10.1016/J.ARCHORALBIO.2021.105312>
- Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., & Lu, S. (2020). Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *10*(2), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>
- Lin, J. H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H. R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K. M., LaVail, M. M., & Walter, P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5852), 944–949. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1146361>
- Lind, A., Barlinn, R., Landaas, E. T., Andresen, L. L., Jakobsen, K., Fladeby, C., Nilsen, M., Bjørnstad, P. M., Sundaram, A. Y. M., Ribarska, T., Müller, F., Gilfillan, G. D., & Holberg-Petersen, M. (2021). Rapid SARS-CoV-2 variant monitoring using PCR confirmed by whole

- genome sequencing in a high-volume diagnostic laboratory. *Journal of Clinical Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 141. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2021.104906>
- Loeffelholz, M. J., & Tang, Y.-W. (2020). Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 747–756. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1745095>
- Long, F. (2011). Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(1), 27–38. <https://doi.org/10.1038/NRM3254>
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., ... Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet (London, England)*, 395(10224), 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Ma, H., Zeng, W., He, H., Zhao, D., Jiang, D., Zhou, P., Cheng, L., Li, Y., Ma, X., & Jin, T. (2020). Serum IgA, IgM, and IgG responses in COVID-19. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(7), 773–775. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0474-z>
- Ma, Y., & Hendershot, L. M. (2004). The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nature Reviews. Cancer*, 4(12), 966–977. <https://doi.org/10.1038/NRC1505>
- Madhi, S. A., Baillie, V., Cutland, C. L., Voysey, M., Koen, A. L., Fairlie, L., Padayachee, S. D., Dheda, K., Barnabas, S. L., Bhorat, Q. E., Briner, C., Kwatra, G., Ahmed, K., Aley, P., Bhikha, S., Bhiman, J. N., Bhorat, A. E., du Plessis, J., Esmail, A., ... Group, W.-V. C. (2021). Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant. *The New England Journal of Medicine*, 384(20), 1885–1898. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2102214>
- Malakhova, O. A., & Zhang, D. E. (2008). ISG15 inhibits Nedd4 ubiquitin E3 activity and enhances the innate antiviral response. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 8783–8787. <https://doi.org/10.1074/JBC.C800030200>
- Mariano, G., Farthing, R. J., Lale-Farjat, S. L. M., & Bergeron, J. R. C. (2020). Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. <https://doi.org/10.3389/FMOLB.2020.605236>
- McBride, R., van Zyl, M., & Fielding, B. C. (2014). The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses*, 6(8), 2991. <https://doi.org/10.3390/V6082991>
- McCallum, M., De Marco, A., Lempp, F. A., Tortorici, M. A., Pinto, D., Walls, A. C., Beltramello, M., Chen, A., Liu, Z., Zatta, F., Zepeda, S., di Iulio, J., Bowen, J. E., Montiel-Ruiz, M., Zhou, J., Rosen, L. E., Bianchi, S., Guarino, B., Fregni, C. S., ... Veessler, D. (2021). N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2. *Cell*, 184(9), 2332–2347.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.028>

- Mousavizadeh, L., & Ghasemi, S. (2021). Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, *54*(2), 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.022>
- Mustafa Hellou, M., Górska, A., Mazzaferri, F., Cremonini, E., Gentilotti, E., De Nardo, P., Poran, I., Leeflang, M. M., Tacconelli, E., & Paul, M. (2021). Nucleic acid amplification tests on respiratory samples for the diagnosis of coronavirus infections: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *27*(3), 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.11.002>
- Neopane, P., Nypaver, J., Shrestha, R., & Beqaj, S. S. (2021). SARS-CoV-2 Variants Detection Using TaqMan SARS-CoV-2 Mutation Panel Molecular Genotyping Assays. *Infection and Drug Resistance*, *14*, 4471–4479. <https://doi.org/10.2147/IDR.S335583>
- Nieto-Torres, J. L., DeDiego, M. L., Verdía-Báguena, C., Jimenez-Guardeño, J. M., Regla-Nava, J. A., Fernandez-Delgado, R., Castaño-Rodríguez, C., Alcaraz, A., Torres, J., Aguilera, V. M., & Enjuanes, L. (2014). Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathogens*, *10*(5), e1004077–e1004077. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004077>
- Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H. P., & Ron, D. (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *The EMBO Journal*, *22*(5), 1180–1187. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDG112>
- Okba, N. M. A., Müller, M. A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C. H., Corman, V. M., Lamers, M. M., Sikkema, R. S., de Bruin, E., Chandler, F. D., Yazdanpanah, Y., Le Hingrat, Q., Descamps, D., Houhou-Fidouh, N., Reusken, C. B. E. M., Bosch, B.-J., Drosten, C., Koopmans, M. P. G., & Haagmans, B. L. (2020). SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *MedRxiv*, 2020.03.18.20038059. <https://doi.org/10.1101/2020.03.18.20038059>
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016a). The integrated stress response. *EMBO Reports*, *17*(10), 1374–1395. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201642195>
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016b). The integrated stress response. *EMBO Reports*, *17*(10), 1374–1395. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201642195>
- Paul, P., France, A. M., Aoki, Y., Batra, D., Biggerstaff, M., Dugan, V., Galloway, S., Hall, A. J., Johansson, M. A., Kondor, R. J., Halpin, A. L., Lee, B., Lee, J. S., Limbago, B., MacNeil, A., MacCannell, D., Paden, C. R., Queen, K., Reese, H. E., ... Silk, B. J. (2021). Genomic Surveillance for SARS-CoV-2 Variants Circulating in the United States, December 2020-May 2021. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *70*(23), 846–850. <https://doi.org/10.15585/MMWR.MM7023A3>
- Pene, F., Merlat, A., Vabret, A., Rozenberg, F., Buzyn, A., Dreyfus, F., Cariou, A., Freymuth, F., & Lebon, P. (2003). Coronavirus 229E-related pneumonia in immunocompromised patients.

Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 37(7), 929–932. <https://doi.org/10.1086/377612>

- Pincus, D., Chevalier, M. W., Aragón, T., van Anken, E., Vidal, S. E., El-Samad, H., & Walter, P. (2010). BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biology*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1000415>
- Plasschaert, L. W., Žilionis, R., Choo-Wing, R., Savova, V., Knehr, J., Roma, G., Klein, A. M., & Jaffe, A. B. (2018). A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature*, 560(7718), 377–381. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0394-6>
- Podust, L. M., Krezel, A. M., & Kim, Y. (2001). Crystal structure of the CCAAT box/enhancer-binding protein beta activating transcription factor-4 basic leucine zipper heterodimer in the absence of DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 505–513. <https://doi.org/10.1074/JBC.M005594200>
- Promptchara, E., Ketloy, C., & Palaga, T. (2020). Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 38(1), 1–9. <https://doi.org/10.12932/AP-200220-0772>
- Rabaan, A. A., Al-Ahmed, S. H., Haque, S., Sah, R., Tiwari, R., Malik, Y. S., Dhama, K., Yattoo, M. I., Bonilla-Aldana, D. K., & Rodriguez-Morales, A. J. (2020). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: A comparative overview. *Le Infezioni in Medicina*, 28(2), 174–184.
- Rabouw, H. H., Langereis, M. A., Anand, A. A., Visser, L. J., De Groot, R. J., Walter, P., & Van Kuppeveld, F. J. M. (2019). Small molecule ISRIB suppresses the integrated stress response within a defined window of activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(6), 2097–2102. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1815767116>
- Redondo, N., Zaldívar-López, S., Garrido, J. J., & Montoya, M. (2021). SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Frontiers in Immunology*, 12, 708264. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708264>
- Rees-Spear, C., Muir, L., Griffith, S. A., Heaney, J., Aldon, Y., Snitselaar, J. L., Thomas, P., Graham, C., Seow, J., Lee, N., Rosa, A., Roustan, C., Houlihan, C. F., Sanders, R. W., Gupta, R. K., Cherepanov, P., Stauss, H. J., Nastouli, E., Investigators, S., ... McCoy, L. E. (2021). The effect of spike mutations on SARS-CoV-2 neutralization. *Cell Reports*, 34(12), 108890. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108890>
- Roberts, A., Chouhan, R. S., Shahdeo, D., Shrikrishna, N. S., Kesarwani, V., Horvat, M., & Gandhi, S. (2021). A Recent Update on Advanced Molecular Diagnostic Techniques for COVID-19 Pandemic: An Overview. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.732756>

- Rohaim, M. A., El Naggar, R. F., Clayton, E., & Munir, M. (2021). Structural and functional insights into non-structural proteins of coronaviruses. *Microbial Pathogenesis*, *150*, 104641. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104641>
- Rokni, M., Ghasemi, V., & Tavakoli, Z. (2020). Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS. *Reviews in Medical Virology*, *30*(3), e2107–e2107. <https://doi.org/10.1002/rmv.2107>
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(7), 519–529. <https://doi.org/10.1038/NRM2199>
- Sabino, E. C., Buss, L. F., Carvalho, M. P. S., Prete Jr, C. A., Crispim, M. A. E., Fraiji, N. A., Pereira, R. H. M., Parag, K. V, da Silva Peixoto, P., Kraemer, M. U. G., Oikawa, M. K., Salomon, T., Cucunuba, Z. M., Castro, M. C., de Souza Santos, A. A., Nascimento, V. H., Pereira, H. S., Ferguson, N. M., Pybus, O. G., ... Faria, N. R. (2021). Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. *Lancet (London, England)*, *397*(10273), 452–455. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00183-5)
- Sadler, A. J., & Williams, B. R. G. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews. Immunology*, *8*(7), 559. <https://doi.org/10.1038/NRI2314>
- Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., Tsumagari, K., Murakami, T., Cavener, D. R., & Imaizumi, K. (2011a). Endoplasmic reticulum stress response mediated by the PERK-eIF2(α)-ATF4 pathway is involved in osteoblast differentiation induced by BMP2. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(6), 4809–4818. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.152900>
- Saito, A., Ochiai, K., Kondo, S., Tsumagari, K., Murakami, T., Cavener, D. R., & Imaizumi, K. (2011b). Endoplasmic Reticulum Stress Response Mediated by the PERK-eIF2α-ATF4 Pathway Is Involved in Osteoblast Differentiation Induced by BMP2. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(6), 4809–4818. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.152900>
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). THE MAMMALIAN UNFOLDED PROTEIN RESPONSE. <https://doi.org/10.1146/Annurev.Biochem.73.011303.074134>, *74*, 739–789. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.73.011303.074134>
- Shang, J., Han, N., Chen, Z., Peng, Y., Li, L., Zhou, H., Ji, C., Meng, J., Jiang, T., & Wu, A. (2021). Compositional diversity and evolutionary pattern of coronavirus accessory proteins. *Briefings in Bioinformatics*, *22*(2), 1267–1278. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa262>
- Sheikh, A., McMenamin, J., Taylor, B., Robertson, C., & Collaborators, P. H. S. and the E. I. I. (2021). SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness. *Lancet (London, England)*, *397*(10293), 2461–2462. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01358-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01358-1)
- Shen, X., Ellis, R. E., Lee, K., Liu, C. Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D. M., Mori, K., & Kaufman, R. J. (2001). Complementary signaling pathways regulate the

- unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell*, 107(7), 893–903. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00612-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00612-2)
- Sidiq, Z., Hanif, M., Dwivedi, K. K., & Chopra, K. K. (2020). Benefits and limitations of serological assays in COVID-19 infection. *The Indian Journal of Tuberculosis*, 67(4S), S163–S166. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.07.034>
- Sidrauski, C., & Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90(6), 1031–1039. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80369-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80369-4)
- Simmonds, P. (2020). Rampant C→U Hypermutation in the Genomes of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses: Causes and Consequences for Their Short- and Long-Term Evolutionary Trajectories. *MSphere*, 5(3), e00408-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00408-20>
- So, J. S. (2018). Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Immune Responses. *Molecules and Cells*, 41(8), 705–716. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2018.0241>
- Starr, T. N., Greaney, A. J., Dingens, A. S., & Bloom, J. D. (2021). Complete map of SARS-CoV-2 RBD mutations that escape the monoclonal antibody LY-CoV555 and its cocktail with LY-CoV016. *Cell Reports. Medicine*, 2(4), 100255. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100255>
- Sun, Y., Koh, V., Marimuthu, K., Ng, O. T., Young, B., Vasoo, S., Chan, M., Lee, V. J. M., De, P. P., Barkham, T., Lin, R. T. P., Cook, A. R., Leo, Y. S., & Team, N. C. for I. D. C.-19 O. R. (2020). Epidemiological and Clinical Predictors of COVID-19. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(15), 786–792. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa322>
- Tada, T., Dcosta, B. M., Samanovic, M. I., Herati, R. S., Cornelius, A., Zhou, H., Vaill, A., Kazmierski, W., Mulligan, M. J., & Landau, N. R. (2021). Convalescent-Phase Sera and Vaccine-Elicited Antibodies Largely Maintain Neutralizing Titer against Global SARS-CoV-2 Variant Spikes. *MBio*, 12(3), e0069621–e0069621. <https://doi.org/10.1128/mBio.00696-21>
- Tadokoro, T., Wang, Y., Barak, L. S., Bai, Y., Randell, S. H., & Hogan, B. L. M. (2014). IL-6/STAT3 promotes regeneration of airway ciliated cells from basal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(35). <https://doi.org/10.1073/PNAS.1409781111/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201409781SI.PDF>
- Takeuchi, T., Kobayashi, T., Tamura, S., & Yokosawa, H. (2006). Negative regulation of protein phosphatase 2Cbeta by ISG15 conjugation. *FEBS Letters*, 580(18), 4521–4526. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.07.032>
- Tao, K., Tzou, P. L., Nouhin, J., Gupta, R. K., de Oliveira, T., Kosakovsky Pond, S. L., Fera, D., & Shafer, R. W. (2021). The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews. Genetics*, 22(12), 757–773. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00408-x>
- Taubner, B., Peredo-Wende, R., Ramani, A., Singh, G., Strle, K., & Cady, N. C. (2021). Rapid and Quantitative Detection of Human Antibodies against the 2019 Novel Coronavirus SARS

- CoV2 and Its Variants as a Result of Vaccination and Infection. *Microbiology Spectrum*, 9(2).
<https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.00890-21>
- Tegally, H., Wilkinson, E., Giovanetti, M., Iranzadeh, A., Fonseca, V., Giandhari, J., Doolabh, D., Pillay, S., San, E. J., Msomi, N., Mlisana, K., von Gottberg, A., Walaza, S., Allam, M., Ismail, A., Mohale, T., Glass, A. J., Engelbrecht, S., Van Zyl, G., ... de Oliveira, T. (2021). Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*, 592(7854), 438–443.
<https://doi.org/10.1038/s41586-021-03402-9>
- Teske, B. F., Fusakio, M. E., Zhou, D., Shan, J., McClintick, J. N., Kilberg, M. S., & Wek, R. C. (2013). CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis. *Molecular Biology of the Cell*, 24(15), 2477–2490.
<https://doi.org/10.1091/MBC.E13-01-0067>
- Thomson, E. C., Rosen, L. E., Shepherd, J. G., Spreafico, R., da Silva Filipe, A., Wojcechowskyj, J. A., Davis, C., Piccoli, L., Pascall, D. J., Dillen, J., Lytras, S., Czudnochowski, N., Shah, R., Meury, M., Jesudason, N., De Marco, A., Li, K., Bassi, J., O'Toole, A., ... Snell, G. (2021). Circulating SARS-CoV-2 spike N439K variants maintain fitness while evading antibody-mediated immunity. *Cell*, 184(5), 1171-1187.e20.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.037>
- Thorne, L. G., Bouhaddou, M., Reuschl, A.-K., Zuliani-Alvarez, L., Polacco, B., Pelin, A., Batra, J., Whelan, M. V. X., Ummadi, M., Rojc, A., Turner, J., Obernier, K., Braberg, H., Soucheray, M., Richards, A., Chen, K.-H., Harjai, B., Memon, D., Hosmillo, M., ... Krogan, N. J. (2021). Evolution of enhanced innate immune evasion by the SARS-CoV-2 B.1.1.7 UK variant. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*, 2021.06.06.446826.
<https://doi.org/10.1101/2021.06.06.446826>
- Tindle, C., Fuller, M., Fonseca, A., Taheri, S., Ibeawuchi, S. R., Beutler, N., Katkar, G. D., Claire, A., Castillo, V., Hernandez, M., Russo, H., Duran, J., Alexander, L. E. C., Tipps, A., Lin, G., Thistlethwaite, P. A., Chattopadhyay, R., Rogers, T. F., Sahoo, D., ... Das, S. (2021). Adult stem cell-derived complete lung organoid models emulate lung disease in COVID-19. *ELife*, 10, 66417. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.66417>
- Tirasophon, W., Welihinda, A. A., & Kaufman, R. J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes & Development*, 12(12), 1812.
<https://doi.org/10.1101/GAD.12.12.1812>
- Upton, J. P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M. T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F. R., & Oakes, S. A. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6108), 818–822. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1226191>
- Urano, F., Wang, X. Z., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5453), 664–666.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.287.5453.664>

- Uygun, Z. O., Yeniay, L., & Girgin Sağın, F. (2020). CRISPR-dCas9 powered impedimetric biosensor for label-free detection of circulating tumor DNAs. *Analytica Chimica Acta*, *1121*, 35–41. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.04.009>
- Vanderheiden, A., Ralfs, P., Chirkova, T., Upadhyay, A. A., Zimmerman, M. G., Bedoya, S., Aoued, H., Tharp, G. M., Pellegrini, K. L., Manfredi, C., Sorscher, E., Mainou, B., Lobby, J. L., Kohlmeier, J. E., Lowen, A. C., Shi, P.-Y., Menachery, V. D., Anderson, L. J., Grakoui, A., ... Suthar, M. S. (2020a). Type I and Type III Interferons Restrict SARS-CoV-2 Infection of Human Airway Epithelial Cultures. *Journal of Virology*, *94*(19). https://doi.org/10.1128/JVI.00985-20/SUPPL_FILE/JVI.00985-20-SD001.XLSX
- Vanderheiden, A., Ralfs, P., Chirkova, T., Upadhyay, A. A., Zimmerman, M. G., Bedoya, S., Aoued, H., Tharp, G. M., Pellegrini, K. L., Manfredi, C., Sorscher, E., Mainou, B., Lobby, J. L., Kohlmeier, J. E., Lowen, A. C., Shi, P.-Y., Menachery, V. D., Anderson, L. J., Grakoui, A., ... Suthar, M. S. (2020b). Type I and Type III Interferons Restrict SARS-CoV-2 Infection of Human Airway Epithelial Cultures. *Journal of Virology*, *94*(19). <https://doi.org/10.1128/JVI.00985-20>
- Velazquez-Salinas, L., Zarate, S., Eberl, S., Gladue, D. P., Novella, I., & Borca, M. V. (2020). Positive Selection of ORF1ab, ORF3a, and ORF8 Genes Drives the Early Evolutionary Trends of SARS-CoV-2 During the 2020 COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 550674. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.550674>
- Vijgen, L., Keyaerts, E., Moës, E., Maes, P., Duson, G., & Van Ranst, M. (2005). Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR assays for absolute quantitation of human coronaviruses OC43 and 229E. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(11), 5452–5456. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5452-5456.2005>
- Vinson, C., Myakishev, M., Acharya, A., Mir, A. A., Moll, J. R., & Bonovich, M. (2002). Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(18), 6321–6335. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.18.6321-6335.2002>
- Vladar, E. K., & Stearns, T. (2007). Molecular characterization of centriole assembly in ciliated epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, *178*(1), 31–42. <https://doi.org/10.1083/JCB.200703064>
- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, *181*(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wek, R. C. (2018). Role of eIF2 α Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(7). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A032870>
- Wek, R. C., Jiang, H.-Y., & Anthony, T. G. (2006). Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society Transactions*, *34*(Pt 1), 7. <https://doi.org/10.1042/BST20060007>

- Wortel, I. M. N., van der Meer, L. T., Kilberg, M. S., & van Leeuwen, F. N. (2017). Surviving Stress: Modulation of ATF4-Mediated Stress Responses in Normal and Malignant Cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *28*(11), 794–806. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2017.07.003>
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C.-L., Abiona, O., Graham, B. S., & McLellan, J. S. (2020). Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science (New York, N.Y.)*, *367*(6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Li, M., Li, X., Zheng, M., Chen, L., & Li, H. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, *10*(5), 766–788. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>
- Wu, M., Chen, G., & Li, Y. P. (2016). TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Research*, *4*. <https://doi.org/10.1038/BONERES.2016.9>
- Xie, X., Liu, Y., Liu, J., Zhang, X., Zou, J., Fontes-Garfias, C. R., Xia, H., Swanson, K. A., Cutler, M., Cooper, D., Menachery, V. D., Weaver, S., Dormitzer, P. R., & Shi, P.-Y. (2021). Neutralization of SARS-CoV-2 spike 69/70 deletion, E484K, and N501Y variants by BNT162b2 vaccine-elicited sera. *BioRxiv : The Preprint Server for Biology*, 2021.01.27.427998. <https://doi.org/10.1101/2021.01.27.427998>
- Xu, H., Zhong, L., Deng, J., Peng, J., Dan, H., Zeng, X., Li, T., & Chen, Q. (2020). High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science*, *12*(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R. J., & Mori, K. (2004). Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *Journal of Biochemistry*, *136*(3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/JB/MVH122>
- Yan, C., Cui, J., Huang, L., Du, B., Chen, L., Xue, G., Li, S., Zhang, W., Zhao, L., Sun, Y., Yao, H., Li, N., Zhao, H., Feng, Y., Liu, S., Zhang, Q., Liu, D., & Yuan, J. (2020). Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *26*(6), 773–779. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.04.001>
- Yang, S. Y., Wei, F. L., Hu, L. H., & Wang, C. L. (2016). PERK-eIF2 α -ATF4 pathway mediated by endoplasmic reticulum stress response is involved in osteodifferentiation of human periodontal ligament cells under cyclic mechanical force. *Cellular Signalling*, *28*(8), 880–886. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2016.04.003>
- Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuoka, H. C., Schinke, T., Li, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T. M., Hanauer, A., & Karsenty, G. (2004). ATF4 is a substrate of

- RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology: Implication for Coffin-Lowry syndrome. *Cell*, 117(3), 387–398. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00344-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00344-7)
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular Cell*, 6(6), 1355–1364. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00133-7)
- Yonekura, S., Tsuchiya, M., Tokutake, Y., Mizusawa, M., Nakano, M., Miyaji, M., Ishizaki, H., & Haga, S. (2018). The unfolded protein response is involved in both differentiation and apoptosis of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 3568–3578. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13718>
- Yu, C. Y., Chan, K. G., Yean, C. Y., & Ang, G. Y. (2021). Nucleic Acid-Based Diagnostic Tests for the Detection SARS-CoV-2: An Update. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 11(1), 53. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010053>
- Yu, X., & Long, Y. C. (2015). Autophagy modulates amino acid signaling network in myotubes: differential effects on mTORC1 pathway and the integrated stress response. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(2), 394–407. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-252841>
- Yuan, M., Wu, N. C., Zhu, X., Lee, C.-C. D., So, R. T. Y., Lv, H., Mok, C. K. P., & Wilson, I. A. (2020). A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6491), 630–633. <https://doi.org/10.1126/science.abb7269>
- Yurkovetskiy, L., Wang, X., Pascal, K. E., Tomkins-Tinch, C., Nyalile, T. P., Wang, Y., Baum, A., Diehl, W. E., Dauphin, A., Carbone, C., Veinotte, K., Egri, S. B., Schaffner, S. F., Lemieux, J. E., Munro, J. B., Rafique, A., Barve, A., Sabeti, P. C., Kyratsous, C. A., ... Luban, J. (2020). Structural and Functional Analysis of the D614G SARS-CoV-2 Spike Protein Variant. *Cell*, 183(3), 739-751.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.032>
- Zhang, H., Wang, C. Y., Zhou, P., Yue, H., & Du, R. (2020). Histopathologic Changes and SARS-CoV-2 Immunostaining in the Lung of a Patient With COVID-19. *Annals of Internal Medicine*, 173(4), 324. <https://doi.org/10.7326/L20-0895>
- Zhang, H., Xu, Y., Fohlerova, Z., Chang, H., Iliescu, C., & Neuzil, P. (2019). LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. *Trends in Analytical Chemistry : TRAC*, 113, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.01.015>
- Zhang, K., Wang, M., Li, Y., Li, C., Tang, S., Qu, X., Feng, N., & Wu, Y. (2019). The PERK-EIF2 α -ATF4 signaling branch regulates osteoblast differentiation and proliferation by PTH. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 316(4), E590–E604. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00371.2018>
- Zhang, K., Wong, H. N., Song, B., Miller, C. N., Scheuner, D., & Kaufman, R. J. (2005). The unfolded protein response sensor IRE1 α is required at 2 distinct steps in B cell

- lymphopoiesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 268–281.
<https://doi.org/10.1172/JCI21848>
- Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., Drosten, C., Sauerhering, L., Becker, S., Rox, K., & Hilgenfeld, R. (2020). Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6489), 409–412.
<https://doi.org/10.1126/science.abb3405>
- Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., Wang, X., Yuan, J., Li, T., Li, J., Qian, S., Hong, C., Wang, F., Liu, Y., Wang, Z., He, Q., Li, Z., He, B., Zhang, T., ... Zhang, Z. (2020). Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 71(16), 2027–2034. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>
- Zhou, D., Dejnirattisai, W., Supasa, P., Liu, C., Mentzer, A. J., Ginn, H. M., Zhao, Y., Duyvesteyn, H. M. E., Tuekprakhon, A., Nutalai, R., Wang, B., Paesen, G. C., Lopez-Camacho, C., Slon-Campos, J., Hallis, B., Coombes, N., Bewley, K., Charlton, S., Walter, T. S., ... Sreaton, G. R. (2021). Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera. *Cell*, 184(9), 2348–2361.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.037>
- Zhu, H., Podesva, P., Liu, X., Zhang, H., Teply, T., Xu, Y., Chang, H., Qian, A., Lei, Y., Li, Y., Niculescu, A., Iliescu, C., & Neuzil, P. (2020). IoT PCR for pandemic disease detection and its spread monitoring. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 303, 127098.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127098>
- Zhu, K., Jiao, H., Li, S., Cao, H., Galson, D. L., Zhao, Z., Zhao, X., Lai, Y., Fan, J., Im, H. J., Chen, D., & Xiao, G. (2013). ATF4 promotes bone angiogenesis by increasing VEGF expression and release in the bone environment. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 28(9), 1870–1884.
<https://doi.org/10.1002/JBMR.1958>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., & Team, C. N. C. I. and R. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zimmerman, M. G., Bowen, J. R., McDonald, C. E., Young, E., Baric, R. S., Pulendran, B., & Suthar, M. S. (2019). STAT5: a Target of Antagonism by Neurotropic Flaviviruses. *Journal of Virology*, 93(23), 665–684. <https://doi.org/10.1128/JVI.00665-19/ASSET/2F2CB0F2-105D-4AFE-A64C-6D893CB89094/ASSETS/GRAPHIC/JVI.00665-19-F0006.JPEG>
- Zyryanova, A. F., Weis, F., Faille, A., Abo Alard, A., Crespillo-Casado, A., Sekine, Y., Harding, H. P., Allen, F., Parts, L., Fromont, C., Fischer, P. M., Warren, A. J., & Ron, D. (2018). Binding of ISRIB reveals a regulatory site in the nucleotide exchange factor eIF2B. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6383), 1533–1536. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR5129>