

## ARTÍCULO ORIGINAL

**Análisis comparativo estructural de la secuencia pseudo-NLS de las importinas  $\alpha$  y el dominio C-terminal de las proteínas ORF6 del SARS-CoV-2 y SARS-CoV****Comparative structural analysis of pseudo-NLS sequence of importins  $\alpha$  and C-terminal domain of ORF6 proteins of SARS-CoV-2 and SARS-CoV**Elvio Gayozo<sup>1,\*</sup>, Laura Rojas<sup>2</sup> & Fernando Alvarez<sup>3</sup><sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.<sup>2</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Microbiología Industrial, San Lorenzo, Paraguay.<sup>3</sup>Universidad Autónoma Metropolitana Campus Xochimilco, Departamento El Hombre y su Ambiente, Ciudad de México, México.\*Autor por correspondencia: [egayoso@facen.una.py](mailto:egayoso@facen.una.py); [elviologo@gmail.com](mailto:elviologo@gmail.com).

**Resumen:** La proteína ORF6 (P6) del SARS-CoV-2 y SARS-CoV tiene la función principal de bloquear la respuesta antiviral en las células infectadas. Estudios revelaron la ausencia de secuencias NLS (señal de localización nuclear) canónicas en la P6, por lo que el posible mecanismo de interacción entre las P6 y las importinas  $\alpha$  no queda claro aún, sin embargo, parecen compartir ciertas características con la secuencia pseudo-NLS de las importinas  $\alpha$ . El objetivo principal de este estudio fue analizar estructuralmente las semejanzas existentes entre las secuencias del dominio C-terminal de la P6 y la secuencia pseudo-NLS de las importinas  $\alpha$  mediante un análisis computacional del acoplamiento molecular entre estas proteínas y la autoinhibición de la importina  $\alpha$ . Para ello, se realizó el alineamiento entre secuencias de la P6 y la secuencia pseudo-NLS de la importina  $\alpha$ , seguidamente se procedió llevar a cabo el modelado de estas proteínas y realizar pruebas de acoplamiento molecular entre la P6 (SARS-CoV-2 y SARS-CoV) y la importina  $\alpha$ , así como simular la autoinhibición de la importina  $\alpha$ . Los datos obtenidos evidenciaron una similitud del 54,5% entre estas secuencias, las simulaciones de acoplamiento molecular revelaron valores de energía libre de unión favorables. El análisis de los complejos reveló que comparten afinidades por los mismos dominios ARM en las importinas  $\alpha$  y mismos residuos activos en un 50% en el caso de la P6 del SARS-CoV-2, esto podría sugerir que estas secuencias virales podrían presentar propiedades fisicoquímicas semejantes a las de la secuencia pseudo-NLS de la misma importina  $\alpha$ .

**Palabras clave:** ORF6, COVID-19, Carioferinas, 2019-nCoV, acoplamiento molecular.

**Abstract:** The ORF6 (P6) protein of SARS-CoV-2 and SARS-CoV has the main function of blocking the antiviral response in infected cells. Studies revealed the absence of canonical NLS (nuclear localization signal) sequences in P6, so the possible mechanism of interaction between P6 and importins  $\alpha$  is still unclear, however, they seem to share certain features with the pseudo-NLS sequence of importins  $\alpha$ . The main objective of this study was to structurally analyze the similarities existing between the sequences of the C-terminal domain of P6 and the pseudo-NLS sequence of  $\alpha$ -importins, by means of a computational analysis of the molecular coupling between these proteins and importin  $\alpha$  autoinhibition. For this purpose, the alignment between P6 sequences and pseudo-NLS sequence of importin  $\alpha$  was performed, followed by molecular modeling of these proteins and molecular docking simulations between P6 (SARS-CoV-2 and SARS-CoV) and importin  $\alpha$ , as well as importin  $\alpha$  autoinhibition. The data obtained evidenced a 54.5% similarity between these sequences, molecular docking simulations revealed favorable binding free energy value. The analysis of complexes revealed that they share affinities to the same ARM domains in importins  $\alpha$  and same active residues, approximately 50% in the case of P6 of SARS-CoV-2, this suggest that these viral sequences could present a similar physicochemical property to those of the pseudo-NLS sequence of the importin  $\alpha$ .

**Key words:** ORF6, COVID-19, Karyopherins, 2019-nCoV, molecular docking.

**Introducción**

Una de las proteínas más importantes e imprescindibles para el éxito en la replicación del

virus SARS-CoV y SARS-CoV-2 es la proteína ORF6 (P6), la cual está implicada en el bloqueo de la respuesta antiviral por parte de las células

**Editor responsable:** Nery López Acosta<sup>\*</sup>**Recibido:** 12/02/2025**Aceptado:** 01/06/2025<sup>\*</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Dirección de Investigación, San Lorenzo, Paraguay.2078-399X/2025 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.  
Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).

hospederas, y se encuentra codificada solo en los genomas de estos dos virus (Frieman *et al.*, 2007; J. Y. Li *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2014; Shereen *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). Se ha descrito que la P6 del virus SARS-CoV se localiza en las membranas del retículo endoplásmico (RE)/Complejo de Golgi de las células hospederas e interacciona con las importinas  $\alpha$  citoplasmáticas, éstas a su vez interaccionan con las importinas  $\beta$ , promoviendo la relocalización de los complejos importina  $\alpha/\beta$  en la superficie de las membranas del RE/Golgi, generando el bloqueo del transporte de las proteínas STAT1 y STAT2 al nucleoplasma de la célula hospedera, regulando de esta manera el antagonismo de la respuesta mediada por Interferones  $\alpha$ ,  $\beta$  (Frieman *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014; Narayanan *et al.*, 2008; J. Zhao *et al.*, 2009).

El dominio C-terminal de la P6, específicamente entre los residuos 54-63 en la SARS-CoV y probablemente también entre los residuos 54-61 de la SARS-CoV-2, es la implicada en la formación de la unión con los dominios armadillos (ARM) de las importinas  $\alpha$ , a pesar de que este dominio carece de secuencias putativas NLS (Hussain & Gallagher, 2010). En un estudio realizado con la P6 del virus SARS-CoV no se demostró la presencia de secuencias bipartitas NLS funcionales en la región C-terminal, no obstante se sugiere que la interacción con las importinas  $\alpha$  podría ser dependiente de un motivo de hélices  $\alpha$  presente en dominios anfipáticos de la región N-terminal de la proteína, a pesar de ello, no queda bien claro el posible mecanismo de interacción entre estas secuencias y las importinas  $\alpha$  (Frieman *et al.*, 2007; Hussain & Gallagher, 2010).

Las importinas  $\alpha$  son proteínas de unos 60 kDa de peso molecular, que cumplen un papel fundamental en el transporte nucleocitoplasmático de proteínas en las células eucariotas, mediante el reconocimiento de las secuencias NLS que se encuentran presentes en las proteínas nucleares, las cuales son transportadas al interior del núcleo mediante el heterodímero importina  $\alpha/\beta$  (Chook & Blobel, 2001; Kobe, 1999; Moroianu *et al.*, 1996a; Mosammaparast & Pemberton, 2004). Las

importinas  $\alpha$  son capaces de autoinhibirse mediante la interacción intramolecular que ocurre entre una secuencia de diez aminoácidos (residuos 44-54), que se encuentra en el dominio N-terminal y el sitio mayor de unión (ARM 2-ARM 5), esta secuencia tampoco es estrictamente una secuencia NLS por lo que es denominada como secuencia pseudo-NLS por poseer la capacidad de interaccionar con los dominios ARM de las importinas  $\alpha$  (Chook & Blobel, 2001). Existen otros mecanismos de autoinhibición, sin embargo, el mencionado es el que ocurre con mayor frecuencia (Chook & Blobel, 2001; Miyatake *et al.*, 2015).

Las posibles semejanzas existentes entre el segmento pseudo-NLS (residuos 44-54) de las importinas  $\alpha$  y el dominio C-terminal de las P6 virales, en cuanto a la interacción con los dominios ARM de las importinas  $\alpha$  sin la existencia estricta de secuencias NLS, nos permite plantear la hipótesis de la existencia de posibles similitudes fisicoquímicas entre los residuos que conforman dichas secuencias.

En este estudio se propone como objetivos principal analizar estructuralmente las semejanzas existentes entre el dominio C-terminal de la P6 (SARS-CoV-2 y SARS-CoV) y la secuencia pseudo-NLS de las importinas  $\alpha$  mediante un análisis computacional de acoplamiento molecular entre la P6 y las importinas  $\alpha$ , así como de la autoinhibición de la importina  $\alpha$ , también se propuso identificar los posibles dominios diana de unión en las importinas  $\alpha$  y caracterizar dichos dominios mediante la identificación de residuos activos y las fuerzas intermoleculares involucradas en la formación y estabilización de los complejos proteicos formados.

El conocimiento y la comprensión del mecanismo de interacción de la P6 con la importina  $\alpha$ , así como la identificación de los dominios específicos de acoplamiento con esta proteína viral y los residuos activos implicados en la importina  $\alpha$ , esto permitirán llevar a cabo ensayos *in silico* para la búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas con aptitudes farmacológicas con posibles actividades antivirales teniendo

como blanco precisamente las interacciones entre esta proteína viral y las importinas  $\alpha$ .

### Materiales y métodos

#### Análisis de secuencias de la importina $\alpha 1$ y la P6 del SARS-CoV-2 y SARS-CoV

Las secuencias de aminoácidos de la P6 del virus SARS-CoV-2 (NCBI: QIV65092.1) y del virus SARS-CoV (NCBI: NP\_828856.1), así como la secuencia de aminoácidos de la importina  $\alpha 1$  (NCBI: AAI46906.1), fueron obtenidas de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). La búsqueda de secuencias NLS putativas (Nuclear Localization Signals) en la importina  $\alpha 1$  se llevó a cabo empleando el programa WoLF PSORT (Horton *et al.*, 2007).

El alineamiento entre secuencias de la P6 de la SARS-CoV-2 y SARS-CoV, con el fin de determinar el grado de similitud entre estas secuencias, se realizó empleando una matriz BLOSUM62, una penalización de gap igual a 10 y una ampliación de la penalización igual a 0,5. También se realizó el alineamiento de las secuencias de las P6 junto con la secuencia pseudo-NLS de las importinas  $\alpha$  (<sup>44</sup>DDQMLKRRNV<sup>54</sup>), a modo de conocer la existencia de regiones en las proteínas virales semejantes con la secuencia pseudo-NLS. El grado de similitud y conservación entre estas se determinó empleando el algoritmo Needleman-Wunsch de EMBL-EBI (ebi.ac.uk) (W. Li *et al.*, 2015) y el programa ESPript 3.0 (Robert & Gouet, 2014). También se calculó la medida de alineamiento RMSD (Kufareva & Abagyan, 2012) («*Root Mean Square Deviation*», «*desviación de la raíz cuadrada media*») de las posiciones atómicas en las estructuras proteicas de los segmentos C-terminal de las P6 y la pseudo-NLS, para esto se utilizó el programa Discovery Studio Visualizer v. 20 (Dassault Systèmes BIOVIA, Francia).

El análisis de las secuencias de aminoácidos de las P6 de la SARS-CoV-2 y SARS-CoV se realizó utilizando el algoritmo propuesto por Zhao & London (G. Zhao & London, 2006) para la estimación de una escala de predicciones de

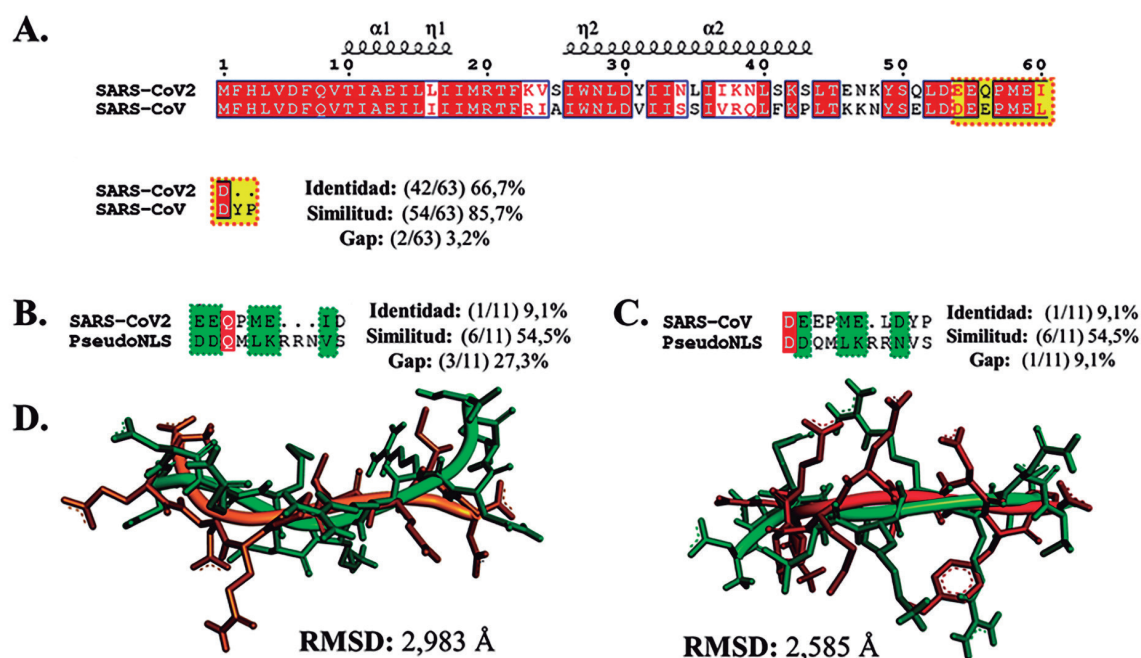
tendencia transmembranosa de las proteínas, también se empleó el método de doble predicción propuesto por Deléage & Roux (Deléage & Roux, 1987) para la predicción de estructuras secundarias en conformación de espirales en el segmento analizado.

#### Simulaciones de acoplamiento molecular de la importina $\alpha 1$ con la P6 del SARS-CoV-2, la P6 del SARS-CoV y el segmento pseudo-NLS

El modelado de las estructuras de las P6 del virus SARS-CoV-2 (NCBI: QIV65092.1) y del virus SARS-CoV (NCBI: NP\_828856.1) se llevó a cabo empleando la herramienta I-TASSER (Yang & Zhang, 2015). El modelado de la estructura de la importina  $\alpha 1$  (NCBI: AAI46906.1) se realizó por homología empleando como estructura de templado la importina  $\alpha$  (PDB: 4WV6) disponible en Protein Data Bank RCSB (Berman *et al.*, 2000), con una identidad del 80,5% y RMSD igual a 0,108 Å, para esto se utilizó la herramienta SWISS-MODEL (Waterhouse *et al.*, 2018).

Las simulaciones de acoplamiento entre los dominio ARM2-ARM5 de la importina  $\alpha 1$  y la secuencia pseudo-NLS (conformación autoinhibida), así como con la región C-terminal de la P6 del SARS-CoV-2 (residuos 54-61) y del SARS-CoV (residuos 54-63), se llevaron cabo empleando como distancias *restraints* el sitio mayor de unión (Chook & Blobel, 2001; Frieman *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014), se utilizaron los algoritmos FTDock (Fourier Transform Dock) y pyDockRST con el programa pyDock 3.0 (T. M. K. Cheng *et al.*, 2007). La selección de los mejores modelos de acoplamiento se realizaron teniendo en cuenta las energías de unión de los complejos en función a las energías electrostáticas, de desolvatación y al aporte de la energía de Van der Waals (T. M. K. Cheng *et al.*, 2007; Grosdidier *et al.*, 2007). Los modelos seleccionados fueron sometidos a un ajuste de refinamiento realizando una dinámica molecular de 14,4 ns, para ello se empleó el programa Galaxy Refine Complex (Heo *et al.*, 2016).

La identificación y caracterización de los



**Figura 1:** A. Alineamiento entre secuencias de P6 del virus SARS-CoV-2 y SARS-CoV. Recuadro amarillo: segmento C-Terminal (SARS-CoV-2: residuos 54-61, SARS-CoV: residuos 54-63), recuadro rojo: secuencias conservadas. B. Alineamiento de las secuencias pseudo-NLS de la importina  $\alpha 1$  y la región C-terminal de la P6 del SARS-CoV-2 (residuos 54-61), recuadro rojo: residuo conservado, recuadro verde: residuos con algunas propiedades fisicoquímicas semejantes, RMSD: Desviación de la raíz cuadrada media, modelo verde: pseudo-NLS, modelo naranja: C-terminal de la P6 del SARS-CoV-2, Å: Ångstrom. C. Alineamiento de las secuencias pseudo-NLS de la importina  $\alpha 1$  y la región C-terminal de la P6 del SARS-CoV (residuos 54-63). recuadro rojo: residuo conservado, recuadro verde: residuos con propiedades semejantes. D. Estimación de los valores de desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) entre las secuencias pseudo-NLS (modelo verde), C-terminal de la P6 del SARS-CoV-2 (modelo naranja) y SARS-CoV (modelo rojo). Å: Ångstrom.

residuos activos de las proteínas, implicadas en las interacciones entre las proteínas virales y la importina  $\alpha 1$ , así como la detección de las fuerzas intermoleculares involucradas en la estabilización de los complejos, se llevaron a cabo mediante visualizaciones en diagramas bidimensionales, con la aplicación del campo de fuerza CHARMM y cargas parciales de Momany-Rone tanto para el receptor como para el ligando, para ello se empleó el programa Discovery Studio Visualizer v. 20 (Dassault Systèmes BIOVIA, Francia).

## Resultados

El análisis de la secuencia de la proteína importina  $\alpha 1$  reveló la presencia de secuencias NLS putativas en la misma, la primera de ellas del tipo monopartita pat 4  $^{28}RRRR^{31}$  y la segunda del tipo

bipartita  $^{28}RRRRIEVNVELRKAKKD^{44}$ , estas secuencias se encuentran específicamente en las regiones del dominio IBB (Dominio de unión a las importinas  $\beta$ ), las cuales se disponen en las regiones N-terminales de las importinas  $\alpha$  y son indispensables para la formación del complejo importina  $\alpha/\beta$  (Görlich *et al.*, 1996; Kobe, 1999; Moroianu *et al.*, 1996b). Sin embargo, estas secuencias NLS no se encuentran en la región de la secuencia pseudo-NLS (entre residuos 44-54), por lo que estas últimas no es considerada estrictamente una secuencia NLS putativa (Chook & Blobel, 2001).

El alineamiento entre las secuencias de la P6 de los virus SARS-CoV-2 y SARS-CoV evidenció una identidad del 66,7% (42/63) y una similitud del 85,7% (54/63) (Fig. 1A). Se pudo observar la

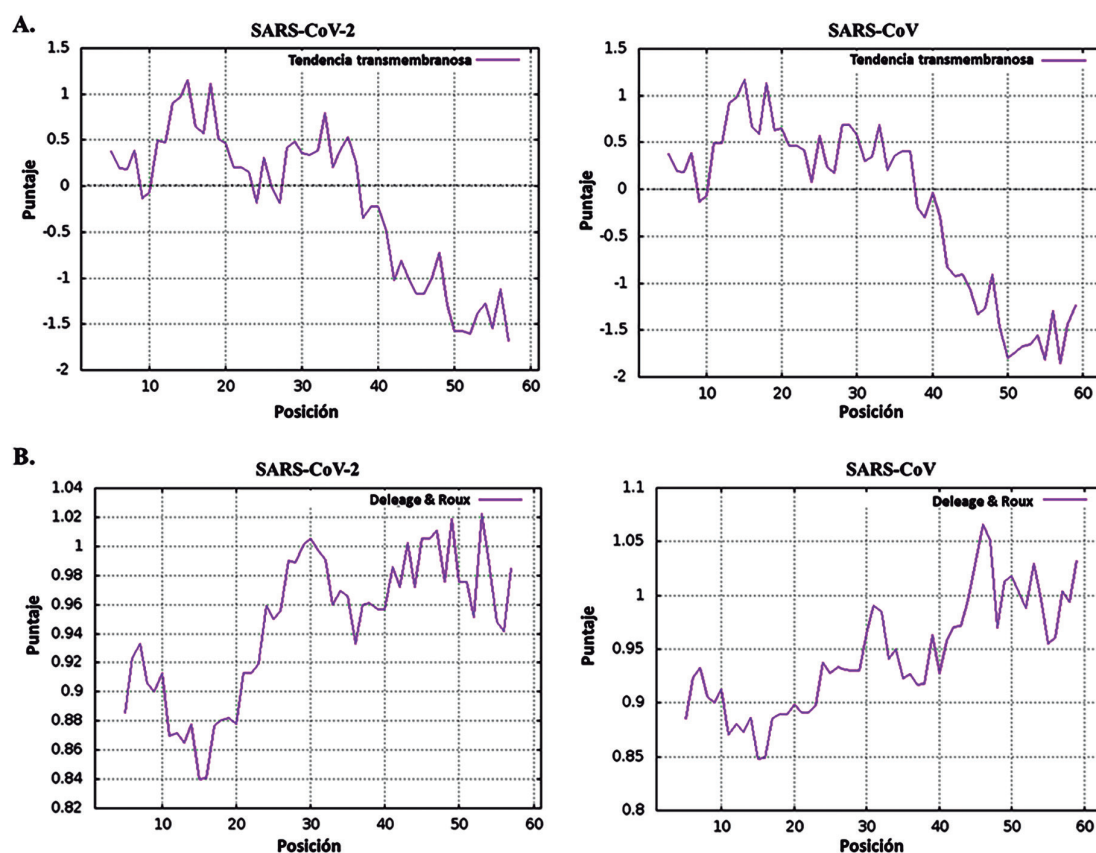


presencia de residuos conservados (E55, P57, M58, E59 y D61) en la región del dominio C-terminal. La semejanza existente podría indicar que además de compartir la misma función antagónica a la respuesta antiviral, probablemente también compartan la misma localización dentro de la célula hospedera durante el proceso de infección (Frieman *et al.*, 2007; Hussain & Gallagher, 2010; Kopecky-Bromberg *et al.*, 2007; J. Y. Li *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2014; Narayanan *et al.*, 2008; J. Zhao *et al.*, 2009) (Fig. 1A).

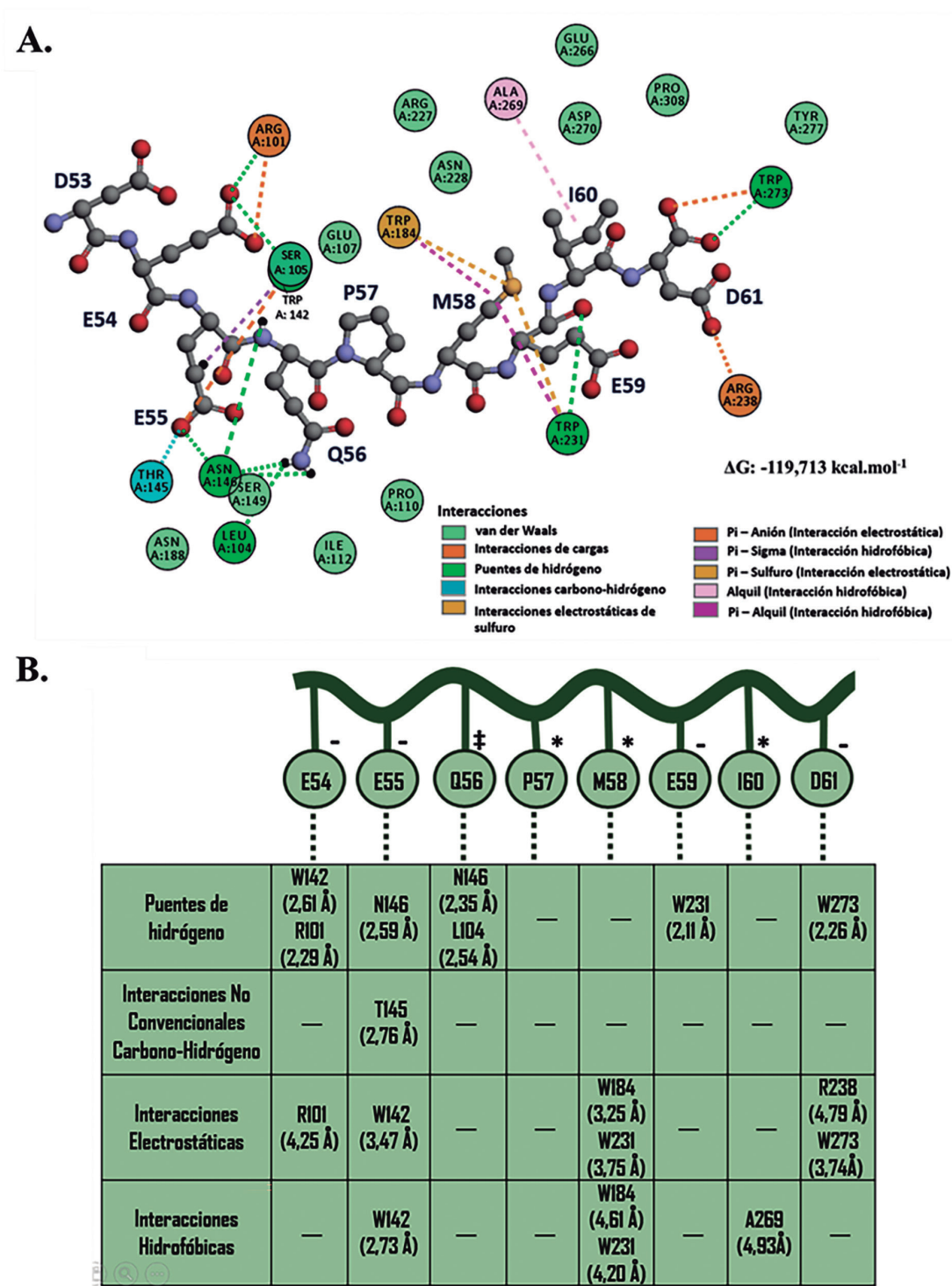
El alineamiento entre el dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV-2 (residuos 54-61) y la secuencia pseudo-NLS de la importina  $\alpha 1$  reveló una identidad del 9,1% (1/11), una similitud entre secuencias del 54,5% (6/11) y la presencia de 27,3% (3/11) de gap en dicho segmento, también

el alineamiento entre los modelos de ambos segmentos proteicos ha evidenciado una RMSD = 2,983 Å (Fig. 1B). A su vez el alineamiento realizado las secuencias pseudo-NLS y el dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV, evidenció una identidad de 9,1% (1/11), una similitud igual a 54,5% (6/11) y 9,1% (1/11) de gap entre estas secuencias, así también el alineamiento entre modelos ha registrado una RMSD = 2,585 Å. Esta similitud e identidad es igual a la observada en el dominio C-terminal de la P6 del nuevo SARS-CoV-2, sin embargo, el porcentaje de gap es mucho menor en el dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV (Fig. 1C).

El análisis llevado a cabo con las secuencia del SARS-CoV-2 y SARS-CoV reveló entre los residuos 1-38, puntuaciones de la escala de Zhao



**Figura 2:** A. Escala de Zhao & London de tendencias transmembranas de las secuencias de la P6 viral. Tamaño de ventana: 9 residuos. B. Escala de Deléage & Roux (método de doble predicción) para la secuencia de la P6 viral. Tamaño de ventana: 9 residuos.



**Figura 3:** **A.** Representación bidimensional de la interacción entre la P6 de la SARS-CoV-2 y la importina  $\alpha 1$ .  $\Delta G$ : Energía libre de unión. **B.** Interacción entre residuos del dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV-2 y la importina  $\alpha 1$ . (-) residuo cargado, ( $\ddagger$ ) residuo polar, (\*) residuo apolar. Distancia entre residuos en Ångstrom (Å).

Secuencia pseudo-NLS de las importinas  $\alpha$  y el dominio C-terminal de las proteínas ORF6 del SARS-CoV-2 y SARS-CoV

& London (G. Zhao & London, 2006) mayores a cero lo cual nos indica que estos segmentos son potencialmente transmembranosos (Fig. 2A). Así también el análisis de la escala de Deléage & Roux (Deléage & Roux, 1987) del método de doble predicción presentó, entre los residuos 40-61 del SARS-CoV-2 y 40-63 del SARS-CoV, puntuaciones de entre 0,94-1,02 y 0,95-1,07, respectivamente, lo cual nos sugiere potenciales conformaciones secundarias en espirales, esto se da en una región que no presenta una tendencia transmembranosa (Fig. 2B).

En la proteína importina  $\alpha 1$  los residuos activos identificados fueron W142, R101, N146, T145, L104, W184, W231, A269, W273 y R238, en la P6 los residuos activos identificados fueron E54, E55, Q56, P57, M58, E59, I60 y D61.

La estructura del complejo formado por la P6 de la SARS-CoV-2 y la importina  $\alpha 1$  se encuentra estabilizada por la formación de puentes de hidrógeno entre los residuos E54:W142, E54:R101, E55:N146, D56:N146, D56:L104, E59:W231 y D61:W273 respectivamente, la distancia existente entre los residuos activos durante la formación de los puentes de hidrógeno fue de entre 2,11–2,61 Å.

Las pruebas de acoplamiento molecular entre la P6 del virus SARS-CoV-2 y la importina  $\alpha 1$  reveló un complejo de interacción con una energía libre de unión igual a  $-119,713 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , presentando una mayor afinidad específicamente por los dominios ARM2-ARM5 (Figs. 3A y 6A). Se registró la formación de interacciones de puentes de hidrógeno no convencionales mediada por átomos de carbono e hidrógeno entre los residuos E55:T145 con una distancia de 2,76 Å entre residuos, es importante destacar que este tipo de unión, a pesar de ser poco frecuente, cumple un papel importante en la estabilización de estructuras de complejos (Itoh *et al.*, 2019) (Fig. 3B).

Se logró registrar la formación de interacciones electrostáticas entre los residuos E54:R101, E55:W142, M58:W184, M58:W231, D61:R238 y D61:W273 del complejo P6:importina  $\alpha 1$ , entre estos residuos activos se pudo observar de

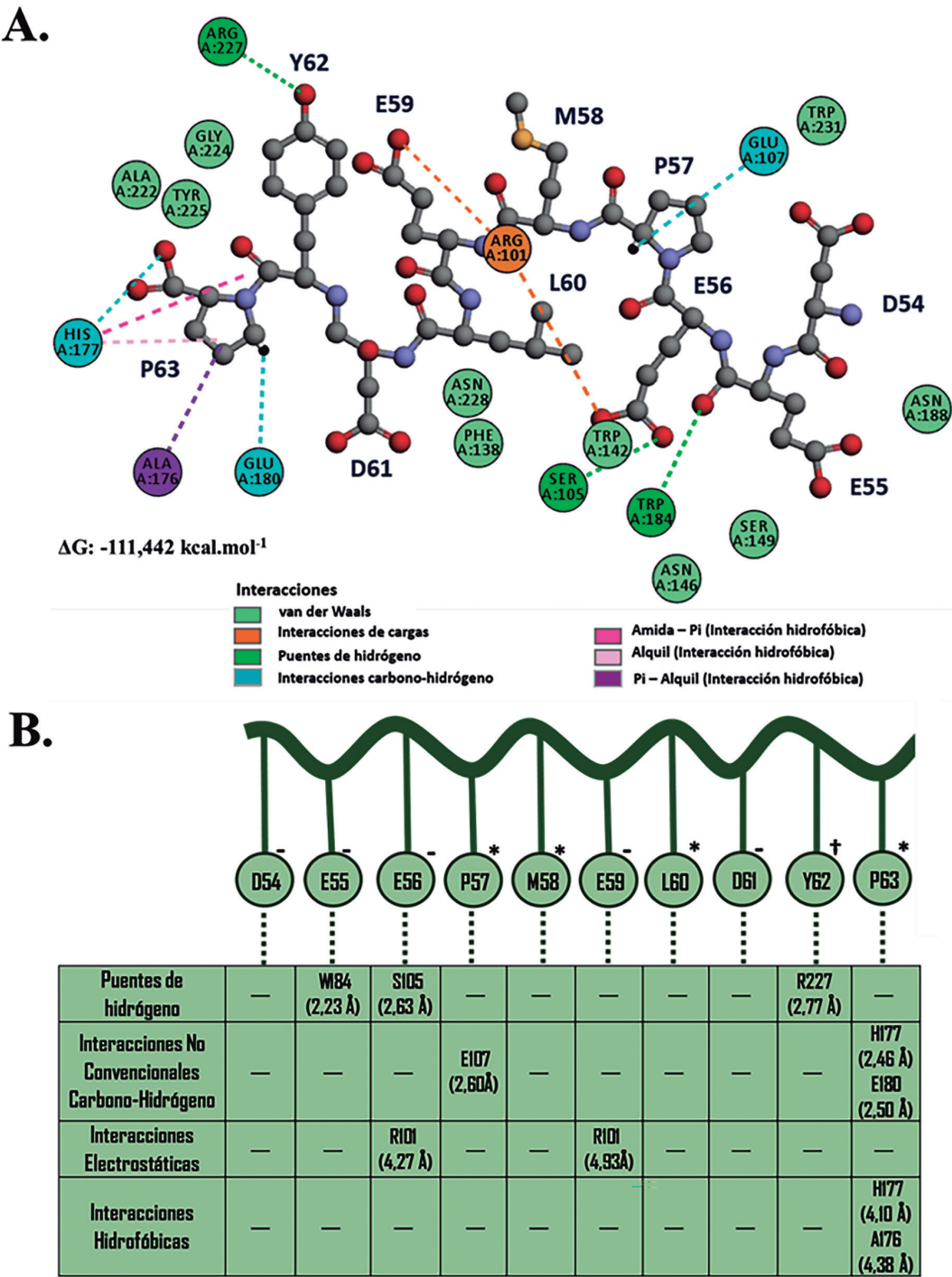
distancias de entre 3,25–4,79 Å, es importante destacar que este tipo de interacción es una de las más fuertes que participan en la estabilidad de los complejos (Fig. 3B). También se registraron interacciones hidrofóbicas entre los residuos E55:W142, M58:W184, M58:W231 y I60:A269 respectivamente, con distancias de entre 2,73–4,93 Å (Fig. 3B).

El acoplamiento realizado entre la importina  $\alpha 1$  y la P6 del virus SARS-CoV demostró la formación de un complejo con una energía libre de unión igual de  $-111,442 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , donde la proteína viral presenta afinidades por los dominios ARM2-ARM5 de la importina  $\alpha 1$  (Fig. 4A, Fig. 6B). Los residuos activos identificados en la proteína importina  $\alpha 1$  fueron W184, S105, R101, E107, R227, H177, E180 y A176, en la P6 los residuos activos identificados fueron E55, E56, P57, E59, L60, L60, D61 e Y62 (Fig. 4A).

Se detectó la presencia de puentes de hidrógeno entre los residuos E55:W184, E56:S105 e Y62:R227, con de distancia entre residuos de 2,23–2,77 Å. También se registraron interacciones no convencionales del tipo carbono-hidrógeno entre los residuos P57:E107, P63:H177 y P63:E180, con de distancias de 2,46–2,60 Å (Fig. 4B).

Se identificó la formación de interacciones electrostáticas entre los residuos E56:R101 y E59:R101, con de distancias de 4,27–4,93 Å. De igual manera se registraron interacciones hidrofóbicas entre los residuos P63:H177 y P63:A176, con de distancias entre residuos de 4,10–4,38 Å (Fig. 4B).

En cuanto a la conformación autoinhibida de la importina  $\alpha 1$  se detectó un valor de energía libre de unión de  $-119,078 \text{ kcal.mol}^{-1}$ . El segmento pseudo-NLS (residuos 44–54) presenta afinidades de unión por residuos presentes en los dominios ARM2-ARM5, los cuales corresponden al sitio mayor de unión de las importinas  $\alpha$  (Fig. 5A, Fig. 6). Los residuos activos involucrados en el acoplamiento de autoinhibición fueron D44, D45, Q46, M47, L48, K49, R50, R51, N52, V53, S54, W273, R315, T311, K348, W231, N235, G191, D192, T155, A148, G150, N188, D270, W184,



**Figura 4:** **A.** Representación bidimensional de la interacción entre la P6 de la SARS-CoV y la importina  $\alpha 1$ .  $\Delta G$ : Energía libre de unión. **B.** Interacciones entre la P6 del SARS-CoV y la importina  $\alpha 1$ . (-) residuo cargado, (\*) residuo apolar, (†) residuo aromático. Distancia entre residuos en Ångstrom (Å).

Secuencia pseudo-NLS de las importinas  $\alpha$  y el dominio C-terminal de las proteínas ORF6 del SARS-CoV-2 y SARS-CoV



W142 y S105 (Fig. 5A, B).

La estructura de la importina  $\alpha 1$  en la conformación autoinhibida se encuentra estabilizada por puentes de hidrógeno entre los residuos D44:W273, M47:W231, L48:W231, L48:N235, K49:D192, K49:T155, K49:A148, K49:G150, R50:D270, R50:N188, R50:W184, R51:S149, N52:W142 y N52:N146, con de distancias de 1,88-3,06 Å (Fig. 5B).

También se pudo registrar la formación de interacciones no convencionales entre átomos de carbono y de hidrógeno entre los residuos D45:T311, L48:G191, K49:N188, K49:G150, K49:D192 y V53:S105, los cuales evidenciaron de distancia de 2,44-3,07 Å (Fig. 5B).

Se registró también la formación de puentes salinos entre los residuos D44:R315, D45:R315, D45:K348, K49:D192, R50:D270 y R50:W231, con de distancia de 3,41-4,94 Å. También se observó la presencia de interacciones hidrofóbicas entre los residuos R50:W231 y R50:W184 con de distancia de 4,29-5,48 Å (Fig. 5B).

### Discusión

La interacción entre la P6 viral y la importina  $\alpha 1$  fue primeramente reportada por Frieman y colaboradores (Frieman *et al.*, 2007), empleando células Vero, MA104, HEK293 y Caco-2 infectadas con el virus SARS-CoV, estos investigadores reportaron que el segmento de la proteína viral involucrada en este acoplamiento se encuentra específicamente entre los residuos 54-63 del dominio C-terminal de la P6, estas interacciones que se dan entre la P6 y la importina  $\alpha 1$  desencadena un efecto antagónico a la respuesta antiviral por parte de las células hospederas.

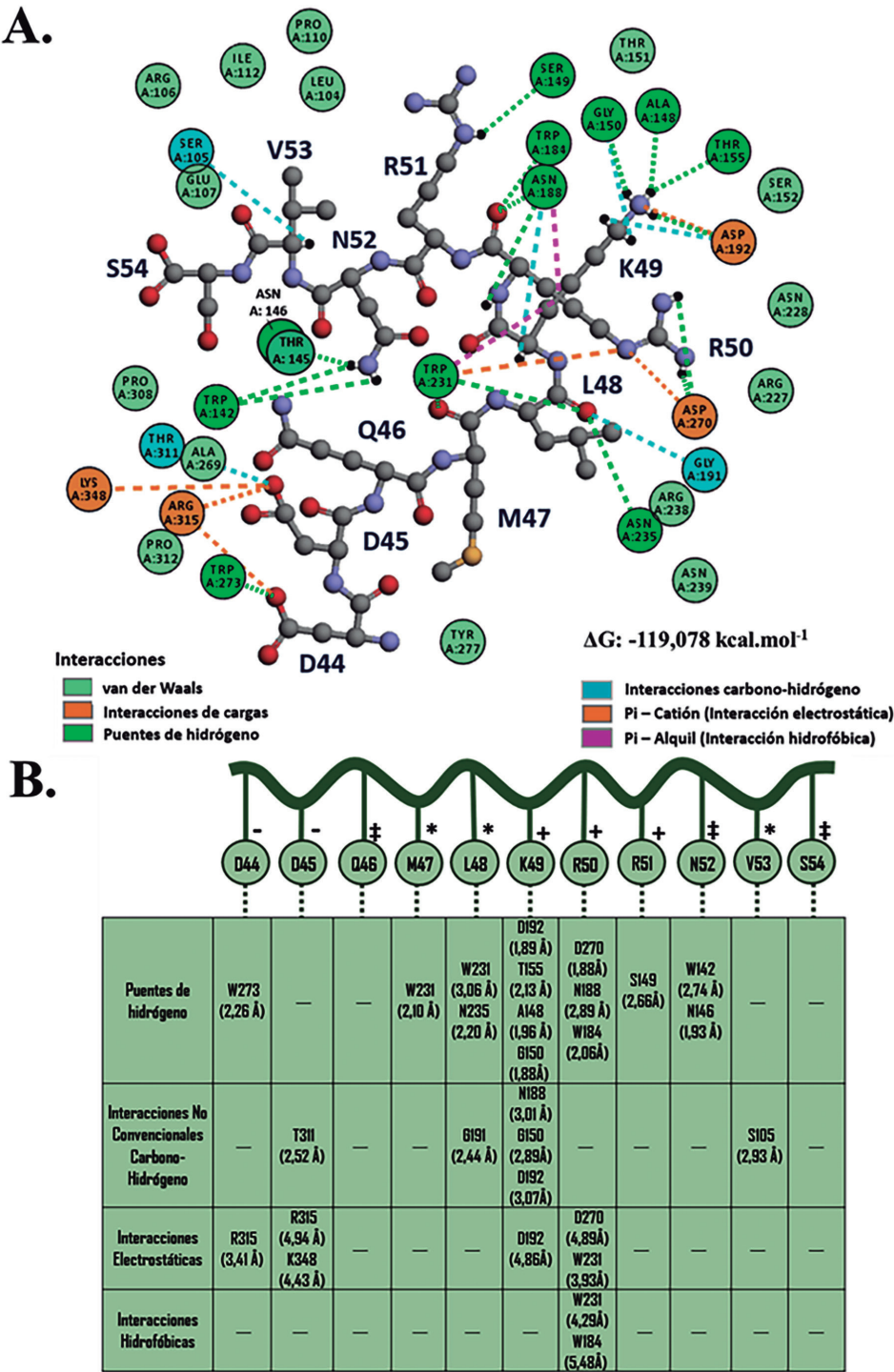
La P6 también se encuentra codificada en el genoma del nuevo virus SARS-CoV-2, recientemente Li y colaboradores (J. Y. Li *et al.*, 2020) confirmaron que la P6 (ORF6) del SARS-CoV-2 actúa de igual manera que la P6 del virus SARS-CoV, en cuanto en el bloqueo de la ruta de señalización del interferón tipo I, modulando de esta manera la respuesta antiviral de las células hospederas.

Las similitudes existente entre ambas proteínas virales fue también descrito por Grifoni y colaboradores (Grifoni *et al.*, 2020) quienes describieron un 68% de identidad entre ambas secuencias. Las puntuaciones obtenidas en la escala de Zhao & London en este estudio sugieren que podrían no solo compartir la misma función sino también la misma localización intracelular durante la infección viral, presentando probablemente una topología predominantemente transmembranosa (Frieman *et al.*, 2007; Iqbal *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2014; Shereen *et al.*, 2020; J. Zhao *et al.*, 2009). Es importante destacar que la escala de Zhao & London presenta una alta correlación con el contenido hidropático de los segmentos transmembranosos de las proteínas, por lo que son considerado estimadores predictivos de dominios transmembranosos (G. Zhao & London, 2006).

La búsqueda por dilucidar el mecanismo de interacción entre las P6 del SARS-CoV y los dominios ARM de las importinas  $\alpha$ , fue anteriormente abordado por Hussain y Gallagher (Hussain & Gallagher, 2010), quienes evidenciaron la ausencia de secuencias NLS putativas funcionales (monopartitas y bipartitas) en la proteína, por lo que propusieron que la interacción podría estar influenciada por motivos de hélices  $\alpha$  anfipáticas presentes en la estructura proteica viral, las cuales pertenecerían a los dominios transmembranosos de la P6 (Liu *et al.*, 2014; J. Zhao *et al.*, 2009).

Los modelos de acoplamiento molecular entre la P6 (SARS-CoV-2 y SARS-CoV) y la importina  $\alpha 1$ , así como la importina  $\alpha 1$  en la conformación autoinhibida, revelaron resultados semejantes de energías de unión, las cuales se encuentran en el rango de -111 a -119 kcal.mol<sup>-1</sup>. Es importante destacar que la formación del complejo P6 (SARS-CoV-2) y la importina  $\alpha 1$  presenta energías de acoplamiento similares a la energía presentada por el acoplamiento durante la autoinhibición de la importina  $\alpha 1$ , siendo estas de -119,713 kcal.mol<sup>-1</sup> y -119,078 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente.

Tanto el segmento de interacción de la P6 del SARS-CoV-2 (residuos 54-61) como la



**Figura 5:** **A.** Representación bidimensional de la interacción entre la pseudo-NLS de la importina  $\alpha 1$  en conformación autoinhibida.  $\Delta G$ : Energía libre de unión. **B.** Interacciones entre residuos de la pseudo-NLS y dominios ARM de la importina  $\alpha 1$ . (-) residuo cargado, (+) residuo cargado, (‡) residuo polar, (\*) residuo apolar. Distancia entre residuos en Ångström (Å).

Secuencia pseudo-NLS de las importinas  $\alpha$  y el dominio C-terminal de las proteínas ORF6 del SARS-CoV-2 y SARS-CoV

pseudo-NLS de las importinas  $\alpha 1$  (residuos 44-54), presentan semejanzas en un 54,5% de su composición. El dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV-2 se encuentra conformada por residuos cargados (E54 y E55), un residuo polar (Q56) y los residuos apolares (P57 y M58), este segmento presenta un punto isoelectrico igual a 3,61, y los residuos mencionados se encuentra participando en el 50% de las interacciones intermoleculares registradas en este estudio.

En la secuencia pseudo-NLS de la importina  $\alpha 1$  se observa la presencia de dos residuos cargados (D44 y D45), un residuo polar (Q46), y residuos apolares (M47 y L48), este segmento a su vez posee un punto isoelectrico de 3,49, y durante la autoinhibición, estos residuos, participan en el 32% del total de las interacciones intramoleculares registradas. También se destaca la importancia de los residuos K49 y R50 en las interacciones analizadas en esta investigación, ya que los mismos participan en el 54% de las uniones intramoleculares de la conformación autoinhibida.

El dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV exhibe de igual manera residuos cargados (D54, E55 y E56) y residuos apolares (P57 y M58), posee un punto isoelectrico igual a 3,42, estos residuos participan en el 40% de las interacciones intermoleculares registradas en este estudio. También es importante resaltar la importancia del residuo P63 con la cual se da también el 40% de las interacciones intermoleculares (Fig. 4).

Kobe (1999) estudiando la autoinhibición de las importinas  $\alpha$  describe que los residuos involucrados activamente en este proceso son W142, N146, W184, N188, W231, S234, N235, R238, D270, W273 e Y277, estos residuos también fueron registrados en la conformación autoinhibida de la importina  $\alpha 1$  en este estudio (Fig. 5).

En la interacción entre la P6 del virus SARS-CoV-2 y la importina  $\alpha 1$  se observó la participación activa de los residuos W142, N146, W184, W231, R238 y W273 de la importina  $\alpha 1$  los cuales fueron también residuos activos en la conformación

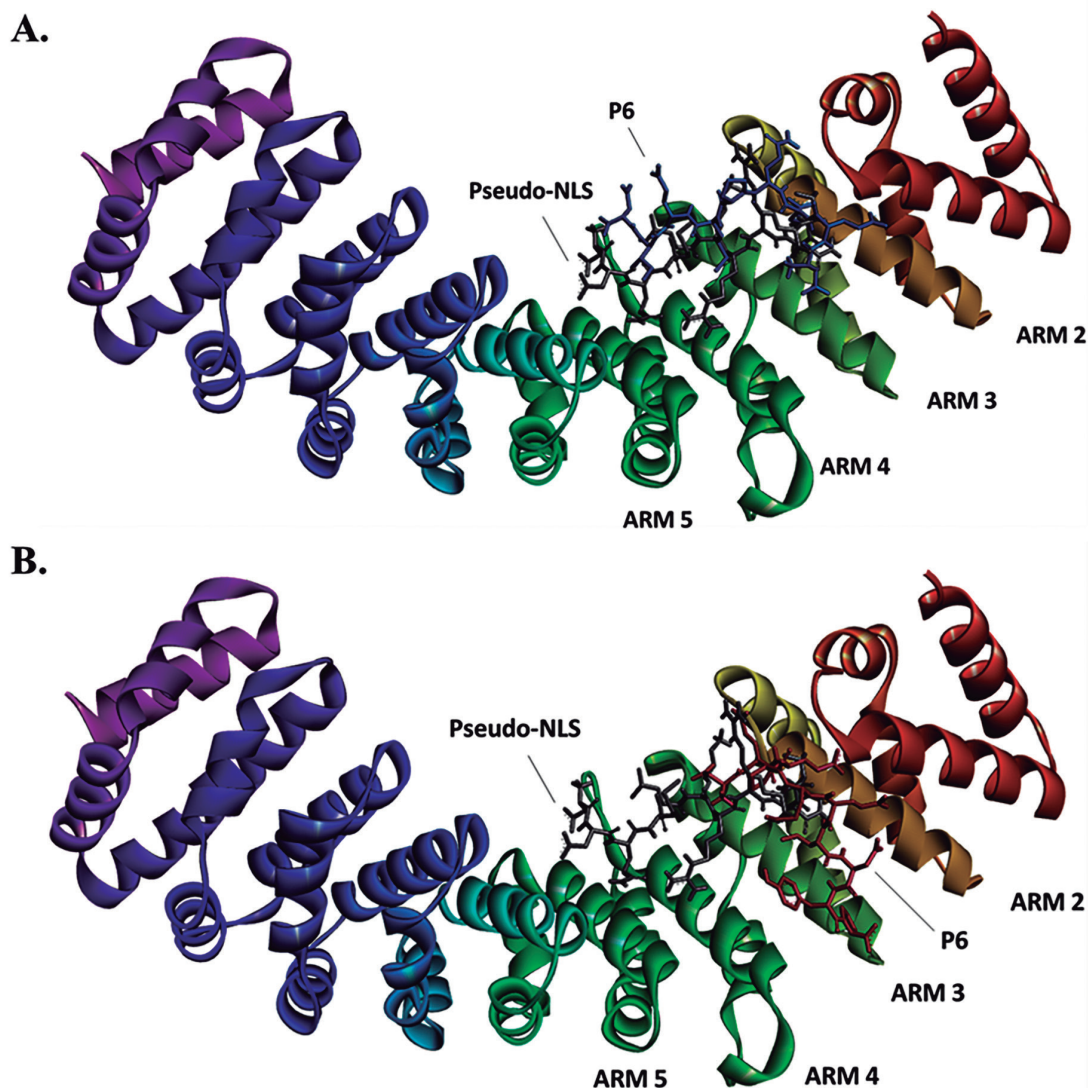
autoinhibida (Kobe, 1999) (Figs. 3, 5). Es relevante destacar la existencia en común del 50% de los residuos activos así como de los dominios ARM de interacción en los complejos P6 (SARS-CoV-2):importina  $\alpha 1$  y la conformación autoinhibida (Fig. 3, Fig. 5, Fig. 6A). Sin embargo, el restante 50% de diferencias existentes en residuos activos de la importina  $\alpha 1$  se encuentran en su mayoría formando parte del sitio bolsillo de unión donde el dominio C-terminal de la P6 se sitúa mediante interacciones del tipo Van der Waals (Fig. 3, Fig. 5, Fig. 6A).

La interacción del dominio C-terminal de la P6 del virus SARS-CoV con la importina  $\alpha 1$  evidencia la participación de solo los residuos activos W184 y S105 en común con los registrados en la autoinhibición. Este bajo número de residuos activos en común influye directamente en las diferencias existentes en los valores de energía libre de unión de los complejos, lo que podría deberse a la disposición del dominio C-terminal en la estructura de la importina  $\alpha 1$ , difiriendo en la localización del sitio bolsillo de interacción (Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6B).

Entre las interacciones intermoleculares que fueron registradas los puentes de hidrógeno son los más comunes y presentan grandes aportes energéticos de entre 0,30 kcal.mol<sup>-1</sup> a 40 kcal.mol<sup>-1</sup> (Zhou *et al.*, 2012). De igual manera, las uniones no convencionales entre átomos de carbono que se encuentran parcialmente polarizados y átomos de hidrógeno son débiles (Zhou *et al.*, 2012).

Las interacciones hidrofóbicas también son consideradas uniones débiles con aportes energéticos de entre 1,5 kcal.mol<sup>-1</sup> a 2 kcal.mol<sup>-1</sup>, sin embargo, posee funciones claves en la estabilización de los complejos proteína-proteína, proteína-péptido, o proteína-ligando (Patil *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012).

En los sitios de unión de las importina  $\alpha$  se han descrito residuos activos conservados importantes que se encuentran participando en las interacciones con las secuencias NLS, estos son el triptófano (W) y la asparagina (N) (Chook & Blobel, 2001). El triptófano posee una cadena lateral



**Figura 6:** A. Comparación topológica de las interacciones entre la pseudo-NLS (modelo gris) y el dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV-2 (modelo azul) en la importina  $\alpha 1$ . B. Comparación topológica de las interacciones entre la pseudo-NLS (modelo gris) y el dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV (modelo fucsia) en la importina  $\alpha 1$ .

de naturaleza aromática, estos grupos facilitan a que se den lugar interacciones entre orbitales Pi y otros grupos sulfuro, alquilos, cargados positivamente y negativamente (cationes, aniones) y orbitales sigmas, estos facilitan a la formación de interacciones Pi mediante polarizaciones y momentos cuadrupolos considerables con la finalidad de alcanzar la estabilidad energética de los complejos (Bissantz *et al.*, 2010).

### Conclusiones

Los resultados evidencian que tanto la secuencia pseudo-NLS de las importinas  $\alpha 1$ , así como la secuencia del dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV-2 presentan semejanzas en cuanto a las afinidades de interacción a los dominios ARM2-ARM5 que corresponde al sitio mayor de unión de las importinas  $\alpha$ . Esto influye principalmente en las magnitudes de las energías libre de unión



en ambos modelos de acoplamientos y podría deberse a que ambas secuencias presentan residuos con propiedades fisicoquímicas semejantes. Sin embargo, la semejanza existente con el dominio C-terminal de la P6 del SARS-CoV es menor, a pesar de presentar afinidades por los mismos dominios ARM, los residuos activos involucrados en las interacciones son diferentes.

### Contribuciones de los autores

EG: Diseño del estudio, pruebas computacionales y análisis de resultados, escritura y corrección del artículo. LR: Pruebas computacionales y análisis de resultados, escritura y corrección del artículo. FA: Análisis de los resultados, escritura y corrección del artículo.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

### Fuente de financiamiento

Fuente de financiamiento propia.

### Literatura citada

- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1): 235–242. <<https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>>.
- Bissantz, C., Kuhn, B. & Stahl, M. (2010). A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(14): 5061–5084. <<https://doi.org/10.1021/jm100112j>>.
- Cheng, T. M.-K., Blundell, T. L. & Fernandez-Recio, J. (2007). pyDock: Electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein-protein docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 68(2): 503–515. <<https://doi.org/10.1002/prot.21419>>.
- Chook, Y. & Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(6): 703–715. <[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(01\)00264-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(01)00264-0)>.
- Deléage, G. & Roux, B. (1987). An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1(4): 289–294. <<https://doi.org/10.1093/protein/1.4.289>>.
- Frieman, M., Yount, B., Heise, M., Kopecky-Bromberg, S. A., Palese, P. & Baric, R. S. (2007). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus ORF6 Antagonizes STAT1 Function by Sequestering Nuclear Import Factors on the Rough Endoplasmic Reticulum/Golgi Membrane. *Journal of Virology*, 81(18): 9812–9824. <<https://doi.org/10.1128/JVI.01012-07>>.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. & Hartmann, E. (1996). A41 amino acid motif in importin- $\alpha$  confers binding to importin- $\beta$  and hence transit into the nucleus. *The EMBO Journal*, 15(8): 1810–1817. <<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00530.x>>.
- Grifoni, A., Sidney, J., Zhang, Y., Scheuermann, R. H., Peters, B. & Sette, A. (2020). A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2. *Cell Host and Microbe*, 27(4): 671–680.e2. <<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.002>>.
- Grosdidier, S., Pons, C., Solernou, A. & Fernández-Recio, J. (2007). Prediction and scoring of docking poses with pyDock. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 69(4): 852–858. <<https://doi.org/10.1002/prot.21796>>.
- Heo, L., Lee, H. & Seok, C. (2016). GalaxyRefineComplex: Refinement of protein-protein complex model structures driven by interface repacking. *Scientific Reports*, 6: 32153. <<https://doi.org/10.1038/srep32153>>.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: Protein localization predictor. *Nucleic Acids*

- Research*, 35(suppl\_2): W585–W587. <<https://doi.org/10.1093/nar/gkm259>>.
- Hussain, S. & Gallagher, T. (2010). SARS-coronavirus protein 6 conformations required to impede protein import into the nucleus. *Virus Research*, 153(2): 299–304. <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.017>>.
- Iqbal, H. M. N., Romero-Castillo, K. D., Bilal, M. & Parra-Saldivar, R. (2020). The emergence of novel-coronavirus and its replication cycle—An overview. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(1): 1–6. <<https://doi.org/10.22207/JPAM.14.1.03>>.
- Itoh, Y., Nakashima, Y., Tsukamoto, S., Kurohara, T., Suzuki, M., Sakae, Y., Oda, M., Okamoto, Y. & Suzuki, T. (2019). N<sup>+</sup>-C-H...O Hydrogen bonds in protein-ligand complexes. *Scientific Reports*, 9(1): Article 1. <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36987-9>>.
- Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin  $\alpha$ . *Nature Structural Biology*, 6(4): Article 4. <<https://doi.org/10.1038/7625>>.
- Kopecky-Bromberg, S. A., Martínez-Sobrido, L., Frieman, M., Baric, R. A. & Palese, P. (2007). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Open Reading Frame (ORF) 3b, ORF 6, and Nucleocapsid Proteins Function as Interferon Antagonists. *Journal of Virology*, 81(2): 548–557. <<https://doi.org/10.1128/JVI.01782-06>>.
- Kufareva, I. & Abagyan, R. (2012). Methods of Protein Structure Comparison. Pp. 231–257, in Orry, A. J. W. & Abagyan, R. (Eds.). *Homology Modeling: Methods and Protocols*. New York: Humana Press. 391 pp. <[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-588-6_10)>.
- Li, J. Y., Liao, C. H., Wang, Q., Tan, Y. J., Luo, R., Qiu, Y. & Ge, X. Y. (2020). The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhibit type I interferon signaling pathway. *Virus Research*, 286: 198074. <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198074>>.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N. & Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research*, 43(W1): W580–W584. <<https://doi.org/10.1093/nar/gkv279>>.
- Liu, D. X., Fung, T. S., Chong, K. K.-L., Shukla, A. & Hilgenfeld, R. (2014). Accessory proteins of SARS-CoV and other coronaviruses. *Antiviral Research*, 109: 97–109. <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.06.013>>.
- Miyatake, H., Sanjoh, A., Unzai, S., Matsuda, G., Tatsumi, Y., Miyamoto, Y., Dohmae, N. & Aida, Y. (2015). Crystal structure of human importin- $\alpha$ 1 (Rch1), revealing a potential autoinhibition mode involving homodimerization. *PLOS ONE*, 10(2): e0115995. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115995>>.
- Moroianu, J., Blobel, G. & Radu, A. (1996a). The binding site of karyopherin alpha for karyopherin beta overlaps with a nuclear localization sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13): 6572–6576. <<https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6572>>.
- Moroianu, J., Blobel, G. & Radu, A. (1996b). The binding site of karyopherin alpha for karyopherin beta overlaps with a nuclear localization sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13): 6572–6576. <<https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6572>>.
- Mosammamarast, N. & Pemberton, L.F. (2004). Karyopherins: From nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends in Cell Biology*, 14(10): 547–556. <<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.09.004>>.
- Narayanan, K., Huang, C. & Makino, S. (2008). SARS coronavirus accessory proteins.

- Virus Research, 133(1): 113–121. <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.10.009>>.
- Patil, R., Das, S., Stanley, A., Yadav, L., Sudhakar, A. & Varma, A.K. (2010). Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of drug-designing. PLOS ONE, 5(8): e12029. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>>.
- Robert, X. & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. Nucleic Acids Research, 42(W1): W320–W324. <<https://doi.org/10.1093/nar/gku316>>.
- Shereen, M.A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N. & Siddique, R. (2020). COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. Journal of Advanced Research, 24: 91–98. <<https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>>.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Research, 46(W1): W296–W303. <<https://doi.org/10.1093/nar/gky427>>.
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., Meng, J., Zhu, Z., Zhang, Z., Wang, J., Sheng, J., Quan, L., Xia, Z., Tan, W., Cheng, G. & Jiang, T. (2020). Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. Cell Host & Microbe, 27(3): 325–328. <<https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>>.
- Yang, J. & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. Nucleic Acids Research, 43(W1): W174–W181. <<https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>>.
- Zhao, G. & London, E. (2006). An amino acid “transmembrane tendency” scale that approaches the theoretical limit to accuracy for prediction of transmembrane helices: Relationship to biological hydrophobicity. Protein Science, 15(8): 1987–2001. <<https://doi.org/10.1110/ps.062286306>>.
- Zhao, J., Falcón, A., Zhou, H., Netland, J., Enjuanes, L., Breña, P.P. & Perlman, S. (2009). Severe acute respiratory syndrome coronavirus protein 6 is required for optimal replication. Journal of Virology, 83(5): 2368–2373. <<https://doi.org/10.1128/JVI.02371-08>>.
- Zhou, P., Huang, J. & Tian, F. (2012). Specific noncovalent interactions at protein-ligand interface: Implications for rational drug design. Current Medicinal Chemistry, 19(2): 226–238. <<https://doi.org/10.2174/092986712803414150>>.