

[Proc Natl Acad Sci U S A](#). 2021 enero 12; 118(2): e2021785118.
Publicado en línea 2020 Dec 23. doi:[10.1073/pnas.2021785118](https://doi.org/10.1073/pnas.2021785118)

PMCID: PMC7812859

PMID: [33361333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33361333/)

Artículo inaugural

Biofísica y Biología Computacional

Estructura del SARS-CoV-2 ORF8, una proteína de evasión inmune de rápida evolución

[Thomas G. Flower,unb,1](#) [Cosmo Z. Búfalo,unb,1](#) [Richard M. Hooy,unb](#) [Marc Allaire,c](#)
[Xuefeng Ren,unb](#) y [James H. Hurley](#)^{unb,c,2}

Información [del](#) autor [Información sobre derechos de autor y licencia](#) [Descarga de](#)
[responsabilidad](#)

Este artículo se basa en una preimpresión previamente disponible: "[Estructura del SARS-CoV-2 ORF8, una proteína de coronavirus de rápida evolución implicada en la evasión inmune](#)".

Datos asociados

[Materiales suplementarios](#)

[Declaración de disponibilidad de datos](#)

[Vete a:](#)

IMPORTANCIA

La estructura de la proteína ORF8 del SARS-CoV-2 revela dos nuevas interfaces intermoleculares en capas sobre un pliegue ORF7. Uno está mediado por un enlace disulfuro, el otro es no covalente, y ambos son novedosos con respecto al SARS-CoV. El análisis estructural aquí establece un marco molecular para comprender la rápida evolución de ORF8, sus contribuciones a la patogénesis de COVID-19 y el potencial para su neutralización por anticuerpos.

Palabras clave: Cristalografía de rayos X, SARS-CoV-2, COVID-19

[Vete a:](#)

RESUMEN

La base molecular de la gravedad y la rápida propagación de la enfermedad COVID-19 causada por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) es en gran parte desconocida. ORF8 es una proteína accesoria de rápida evolución que se ha propuesto que interfiere con las respuestas inmunes. La estructura cristalina del SARS-CoV-2 ORF8 se determinó a una resolución de 2,04-Å mediante cristalografía de rayos X. La estructura revela un núcleo de ~60 residuos similar al SARS-CoV-2 ORF7a, con la adición de dos interfaces de dimerización exclusivas del SARS-CoV-2 ORF8. Un dímero covalente unido al disulfuro se forma a través de una secuencia N-terminal específica del SARS-CoV-2, mientras que una interfaz no covalente separada está formada por otra secuencia específica del SARS-CoV-2, $YIDI_{76}$. Juntas, la presencia de estas interfaces muestra cómo el SARS-CoV-2 ORF8 puede formar ensamblajes únicos a gran escala que no son posibles para el SARS-CoV, lo que podría mediar actividades únicas de supresión y evasión inmune.

La gravedad de la actual pandemia de COVID-19 causada por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) en relación con brotes anteriores de síndrome respiratorio de Oriente Medio, SARS y otros betacoronavirus en humanos plantea la pregunta sobre su base molecular. La proteína accesoria ORF8 es una de las proteínas betacoronavirus de evolución más rápida (1-7). Si bien la expresión de ORF8 no es estrictamente esencial para la replicación del SARS-CoV y el SARS-CoV-2, una delección de 29 nucleótidos ($\Delta 29$) que ocurrió temprano en la transmisión de SARS-CoV de persona a persona, dividiendo ORF8 en ORF8a y ORF8b, se correlaciona con una enfermedad más leve (8). También se encontró que una delección de 382 nucleótidos ($\Delta 382$) en el SARS-CoV-2 (9, 10) se correlaciona con una enfermedad más leve y una menor incidencia de hipoxia (11).

SARS-CoV-2 ORF8 es una proteína de 121 aminoácidos (aa) que consiste en una secuencia de señal N-terminal seguida de un pliegue similar a Ig predicho (12). Con una identidad de secuencia del <20% al SARS-CoV ORF8, el SARS-CoV-2 ORF8 es

notablemente divergente. Las proteínas ORF8 de ambos virus poseen una secuencia de señales para la importación de retículo endoplásmico (RE). Dentro del lumen del RE, el SARS-CoV-2 ORF8 interactúa con una variedad de proteínas del huésped, incluidos muchos factores involucrados en la degradación asociada al RE (13). Presumiblemente, ORF8 se secreta, en lugar de retenerse en el RE, ya que los anticuerpos ORF8 son uno de los principales marcadores de infecciones por SARS-CoV-2 (14). Se han propuesto varias funciones para el SARS-CoV-2 ORF8. ORF8 interrumpe la señalización de IFN-I cuando se sobreexpresa exógenamente en las células (15). Se ha demostrado que ORF8 del SARS-CoV-2, pero no ORF8 u ORF8a/ORF8b del SARS-CoV, regula a la baja el MHC-I en las células (16).

Estas observaciones sugieren que la relación entre la estructura, la función y la variación de la secuencia de ORF8 puede ser fundamental para comprender la aparición del SARS-CoV-2 como un patógeno humano mortal. Sin embargo, no solo no hay una estructura tridimensional de ninguna proteína ORF8 de ningún coronavirus, sino que no hay homólogos de estructura conocida con identidad de secuencia suficiente para una alineación confiable. El SARS y el SARS-CoV-2 ORF7a son las plantillas más estrechamente relacionadas de la estructura conocida (17), sin embargo, su núcleo es aproximadamente la mitad del tamaño de ORF8, y su identidad de secuencia primaria es insignificante. Por lo tanto, determinamos la estructura cristalina del SARS-CoV-2 ORF8. La estructura confirma el pliegue similar a Ig esperado y la similitud general del pliegue del núcleo con el SARS-CoV-2 ORF7a. La estructura revela dos nuevas interfaces de dímero para el SARS-CoV-2 ORF8 únicas en relación con todos menos sus ancestros más recientes en murciélagos. Juntos, nuestros resultados sientan las bases para dilucidar aspectos esenciales de la biología ORF8 que se aprovecharán para el desarrollo de nuevas terapias.

[Vete a:](#)

RESULTADOS

Generamos la proteína SARS-CoV-2 ORF8 por expresión en *Escherichia coli* y repliegue oxidativo. La estructura del SARS-CoV-2 ORF8 se determinó mediante cristalografía de rayos X a una resolución de 2,04 Å (Fig. 1 A y B). La densidad de la cadena lateral fue visible en la mayor parte del mapa de densidad, y se construyó un modelo atómico ab initio en la densidad (Fig. 1C). ORF8 cristalizó como un dímero covalente con tres conjuntos de enlaces disulfuro intramoleculares por monómero y un solo enlace disulfuro intermolecular formado por Cys20 de cada monómero (Fig. 1B). El núcleo de cada monómero ORF8 consta de dos β antiparalelas (Fig. 1 D y E). La hoja más pequeña consiste en β2, β5 y β6, mientras que la más grande se forma a partir de β3, β4, β7 y β8. β8 también contribuye a una breve hoja de β paralela con β1 (Fig. 1 D y E).

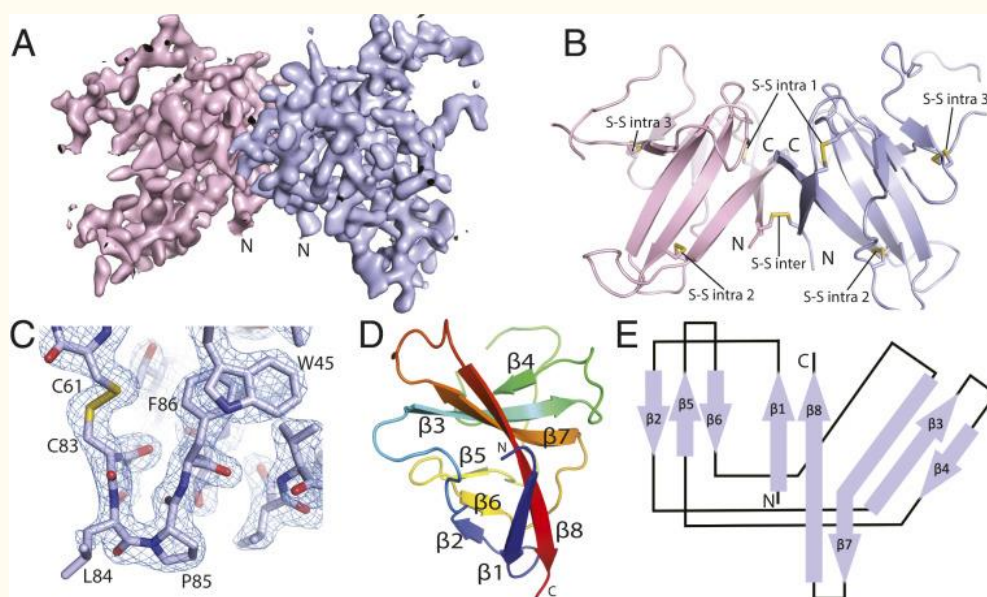


Figura 1.

Estructura cristalina del SARS-CoV-2 ORF8. (A) Un mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc del dímero cristalográfico SARS-CoV-2 ORF8 determinado a 2.04 Å (cadena A, azul claro; cadena B, rosa claro). (B) Representación en dibujos animados del dímero cristalográfico ORF8 del SARS-CoV-2. Los enlaces disulfuro se modelan mostrando pares de enlaces intermoleculares e intramoleculares. (C) Densidad representativa 2Fo-Fc del motivo de giro Cys83–Leu84–Pro85. El mapa está contorneado a 2σ y representado como una malla azul. (D) Representación de dibujos animados del monómero ORF8 del SARS-CoV-2. β-hebras están etiquetadas como β1 a β8, y la cadena está coloreada por el gradiente del arco iris para mayor claridad. (E) Representación topográfica del monómero ORF8 que muestra láminas β antiparalelas formadas por β1 a β8.

ORF8 tiene una identidad de secuencia del 16% con la proteína ORF7a del SARS-CoV-2. El pliegue similar a Ig de ORF7a (código de identificación 6W37 del Banco de Datos de Proteínas [PDB]) se alinea con el monómero ORF8 con una alineación de matriz de distancia (DALI) puntuación Z = 4.5 y un rmsd = 2.5 (Fig. 2B). Según la alineación estructural, ORF8 y ORF7a comparten dos conjuntos de enlaces disulfuro estructurales que son centrales para el pliegue similar a Ig (Fig. 2 A y C). Puntuado entre lo que sería $\beta 3$ y $\beta 5$ de ORF7a hay una región específica de ORF8 de ~35 aa de los residuos 46 a 83 que son estructuralmente distintos de ORF7a y otros pliegues similares a Ig (Fig. 2 A, B y D). Estos residuos son responsables de un tercer disulfuro específico de ORF8 (Fig. 2 A y C).

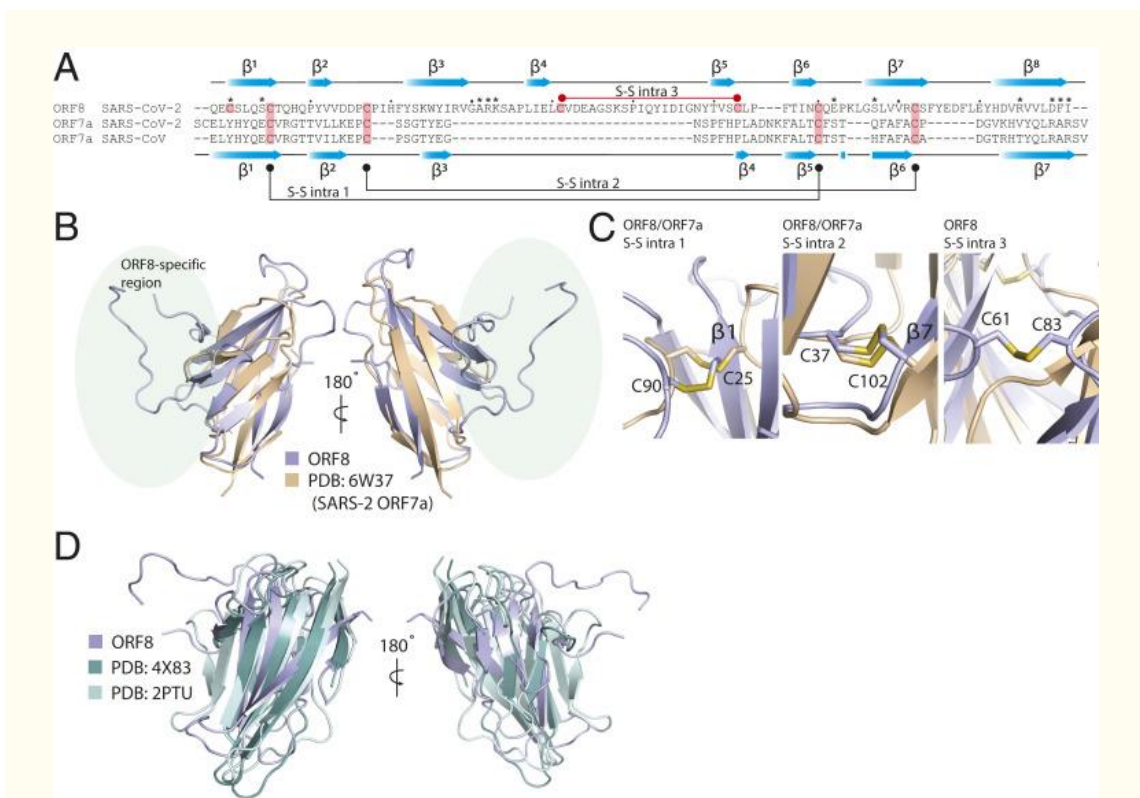


Figura 2. SARS-CoV-2 ORF8 adopta un pliegue similar a Ig. (A) Alineación de secuencia guiada por estructura de CoV-2 ORF8 con SARS-CoV y SARS-CoV-2 ORF7a. Las asignaciones de estructuras secundarias (flechas azules de dibujos animados) corresponden a las estructuras del SARS-CoV-2 ORF8 (arriba) y SARS-CoV-2 ORF7a (abajo). Se destacan los residuos de cisteína implicados en la formación de disulfuro (salmón). Se muestran los enlaces cisteína-cisteína conservados entre ORF7a y ORF8 (abajo: negro), así como el único enlace intramolecular cisteína-cisteína ORF8 (arriba: rojo). (B) Alineación del SARS-CoV-2 ORF8 y SARS-CoV-2 ORF7a (código de identificación PDB 6W37). La alineación produjo una puntuación

Z del servidor DALI = 4,3 y un rmsd = 2,5 Å. Se resalta la región única de la estructura ORF8 (verde claro). (C) enlaces disulfuro intramoleculares SARS-CoV-2 ORF8 y ORF7a. Se muestran los disulfuros estructuralmente conservados entre las dos proteínas, así como el enlace disulfuro intramolecular específico de ORF8. (D) Alineación de CoV-2 ORF8 y otras proteínas representativas del pliegue similar a Ig (códigos de identificación PDB Dscam1, 4X83; CD244 y 2PTU). Las alineaciones produjeron una puntuación Z del servidor DALI = 6.2 y 6.1 y un rmsd = 2.4 y 3.5, respectivamente.

El SARS-CoV-2 ORF8 se separa en dos especies distintas cuando se analiza mediante cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). La comparación de los volúmenes máximos de elución con los patrones de peso molecular sugiere formas diméricas y monoméricas ([Fig. 3A](#)). La forma dimérica de ORF8 se ha observado utilizando un sistema de expresión celular BY2 del tabaco (18). La unidad asimétrica dentro del cristal contiene la forma dimérica ([Fig. 3B](#)) y exhibe una simetría imperfecta doble no cristalográfica. Este mismo dímero ligado al disulfuro se observó en el cristal de selenometionina (SeMet) $C2_1$ que proporcionó la información inicial de fase utilizada para la determinación de la estructura, así como una estructura independiente del SARS-CoV-2 ORF8 determinada posteriormente (código de identificación PDB 7JX6). El dímero está unido por un puente disulfuro intermolecular formado entre dos copias de Cys20 ([Fig. 3B](#)). La generación del potencial electrostático superficial para cada monómero muestra que las interfaces son complementarias ([Fig. 3B](#)). La interfaz dimérica asciende a $\sim 1.320 \text{ \AA}^2$ en superficie enterrada (19). Los enlaces intermoleculares son aportados principalmente por los residuos $\beta 1$ y $\beta 8$ y el bucle que une $\beta 3$ y $\beta 4$ ([Fig. 3 C y D](#)). El puente disulfuro intermolecular orquesta el eje de simetría no cristalográfica ([Fig. 3C](#)). Val117 forma una interacción hidrofóbica con su contraparte relacionada con la simetría. Esta región hidrofóbica central está flanqueada por puentes salinos entre Arg115 y Asp119 ([Fig. 3C](#)). Los extremos de la interfaz están estabilizados por un bucle de "abrazadera" que realiza interacciones de enlace de hidrógeno de cadena principal entre Phe120 de una subunidad y Ala51 y Arg52 de la otra ([Fig. 3D](#)). El grupo guanidino de Arg52, a su vez, se extiende y forma un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de la cadena principal Ile121. Se forma un enlace de hidrógeno adicional entre ϵ -amino grupo de Lys53 y Ser24. Estas

características son casi idénticas en el lado opuesto de la interfaz, debido a la simetría del dímero.

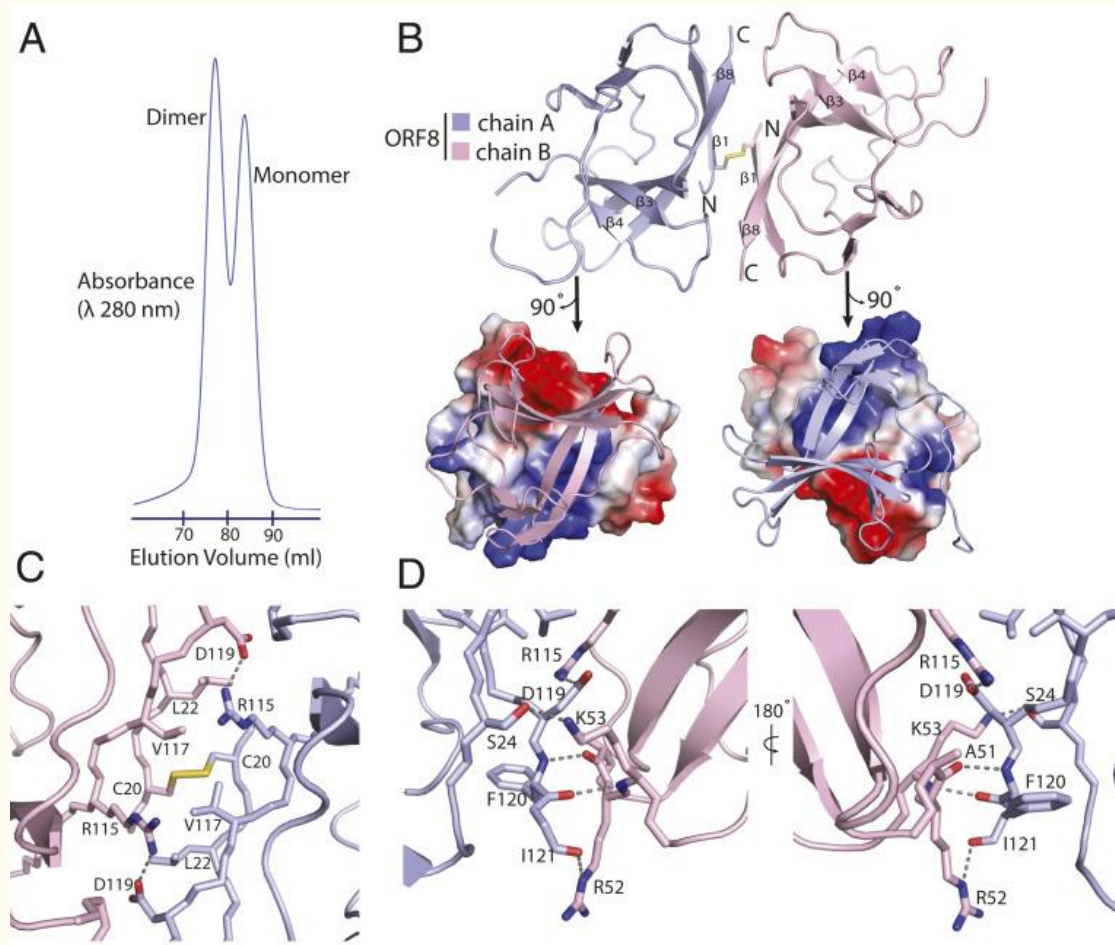


Figura 3.

SARS-CoV-2 ORF8 forma un homodímero ligado al disulfuro. (A) Perfil de elución SEC de una columna HiLoad 16/600 Superdex 75 que muestre picos correspondientes a especies ORF8 diméricas y monoméricas. La absorbancia se mide como un producto del volumen de elución. (B) La mitad superior del panel comunica una representación caricaturesca de la unidad asimétrica que contiene una sola copia del dímero ORF8. El puente disulfuro intermolecular se forma entre dos cisteínas, ambas correspondientes a la posición 20 en la secuencia primaria. Los terminales N y C se etiquetan en consecuencia. La mitad inferior muestra una representación de superficie potencial electrostática de cada monómero generado a pH neutro con cargas positivas, negativas y neutras de color azul, rojo y gris, respectivamente. (C) Vista detallada de la interfaz dimérica, centrada en el puente disulfuro intermolecular. (D) El borde de la interfaz dimérica está estabilizado por múltiples enlaces de hidrógeno. El lado opuesto de la interfaz muestra una disposición casi idéntica. Los residuos clave están etiquetados, y los enlaces de hidrógeno y los puentes de sal se muestran como líneas discontinuas.

La alineación de la secuencia del SARS-CoV-2 ORF8 y sus ortólogos RaTG13 y SL-CoVZC45 del betacoronavirus de murciélago estrechamente relacionados revelaron que los seis puentes disulfuro intramoleculares que forman Cys están conservados. Estos Cys también se conservan en el SARS-CoV y la mayoría de sus parientes (Fig. 4), y también están presentes en las regiones correspondientes del SARS-CoV ORF8a y ORF8b. Sin embargo, Cys20 no se conserva en el SARS-CoV ORF8 y los virus de murciélagos que se agrupan filogenéticamente con el SARS-CoV humano (Fig. 4). Los residuos que rodean inmediatamente Cys20 también se conservan en los precursores murciélagos más recientes del SARS-CoV-2. Por lo tanto, las características requeridas para el pliegue general del monómero ORF8 están bien conservadas en el SARS-CoV, el SARS-CoV-2 y el betacoronavirus relacionado. El dímero covalente es, sin embargo, una adición evolutivamente reciente entre los betacoronavirus humanos exclusiva del SARS-CoV-2.

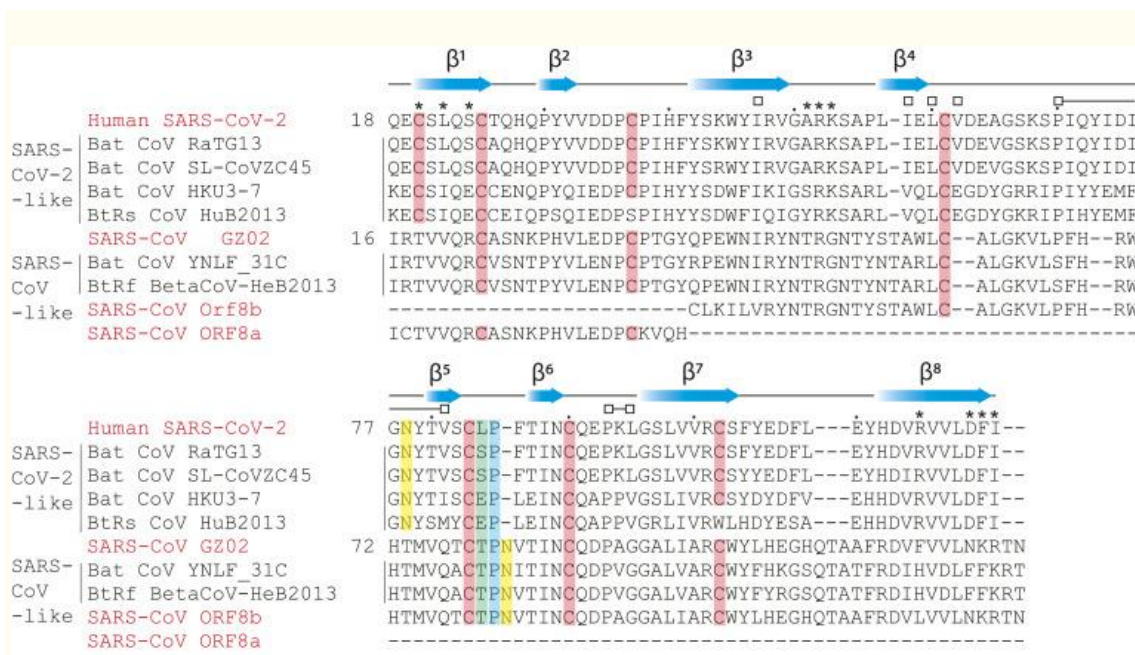


Figura 4.


Características conservadas y únicas del SARS-CoV y SARS-CoV-2 ORF8. Alineación de secuencia primaria de SARS-CoV-2 ORF8, SARS-CoV ORF8 y homólogos ORF8 estrechamente relacionados encontrados en cepas de betacoronavirus de murciélago (3). Las asignaciones de estructura secundaria (flechas azules de dibujos animados) corresponden a la estructura SARS-CoV-2 ORF8. Se destacan las características bioquímicas putativas y conservadas: cisteínas-disulfuros (salmón), cis-prolina (azul), residuo 84 (verde; Numeración ORF8 del SARS-CoV-2), sitio de N-glicosilación (amarillo; sitio previsto para el SARS-CoV-2) (12). Los asteriscos

designan los residuos que contribuyen a la interfaz del dímero "covalente". Los cuadrados abiertos designan residuos que contribuyen a la interfaz dimérica alternativa. Los puntos designan intervalos de 10 aa según la numeración SARS-CoV-2 ORF8.

El análisis filogenético de las cepas de SARS-CoV-2 reveló dos isoformas predominantes de ORF8 en circulación, que contienen Leu84 o Ser84 (4, 7). La estructura reportada aquí es de la forma Leu84. En la estructura ORF8, el residuo Leu84 está flanqueado por el Cys83 formador de disulfuro por un lado y por Pro85 por el otro (Fig. 1C). Pro85 adopta la inusual conformación *cis*. Tanto Cys83 como Pro85 se conservan entre los ortólogos de ORF8. Dada la posición de Leu84, con su cadena lateral expuesta al disolvente, parece poco probable que la mutación influya en la estructura terciaria general. Leu84 también es distal a las dos nuevas interfaces de dímeros específicos del SARS-CoV-2. El papel biológico del residuo 84 aún no se ha determinado, pero su posicionamiento inusual controlado por un disulfuro y *cis* Pro juntos sugiere su probable papel en la función.

Otra región importante de secuencia exclusiva del SARS-CoV-2 y sus parientes más cercanos comienza inmediatamente después de Cys61 y se extiende hasta justo antes del motivo conservado Cys83–Leu84–Pro85. La alineación estructural de las cadenas A y B sugiere que esta región es algo plástica (Fig. 5A). Una comparación adicional con PDB 7JX6 muestra cómo esta región única puede adoptar diferentes conformaciones (Fig. 5A). Un motivo específico de 73 YIDI 76 del SARS-CoV-2 se produce en el centro de esta región única. El motivo YIDI es responsable de estabilizar una extensa interfaz de dímero no covalente en el cristal, marcada como altamente significativa (19) sobre la base de sus 1.700 Å² de superficie enterrada e hidrofobicidad. Esto sugiere que el dímero no covalente visto en el cristal es una característica especial del SARS-CoV-2 ausente en el SARS-CoV. Esta misma interfaz de dímero no covalente se observó en el cristal SeMet C2₁ que proporcionó la información inicial de fase utilizada para la determinación de la estructura. Sin embargo, no figuraba en el código de identificación PDB 7JX6, que se determinó en el grupo espacial *P*₄₃ 2₁2. La combinación de Leu95, Ile58, Val49 y Pro56 forma una interacción hidrofóbica con Tyr73 del

motivo YIDI ([Fig. 5 C y D](#)). Los contactos cristalográficos revelaron una amplia gama de interacciones hidrofóbicas entre los residuos 71 y 75 de la cadena A que se interdigitan con los residuos correspondientes de una copia relacionada con la simetría de la cadena B, distinta de la subunidad B del dímero covalente ([Fig. 5 E y F](#)). El centro de la interfaz comprende una hoja de β paralela de dos hebras que es distinta de las hojas de β centrales del pliegue monomérico similar a Ig. Tomada en combinación con la interfaz de dímero covalente mediada por Cys20, la estructura muestra que dos regiones de secuencia únicas para el SARS-CoV-2 controlan la oligomerización y el empaquetamiento cristalino de ORF8, y potencialmente median ensamblajes macromoleculares de orden superior exclusivos del SARS-CoV-2 ([Fig. 5G](#)). Estas observaciones muestran cómo los cambios evolutivos recientes en la secuencia del SARS-CoV-2 en relación con sus precursores más benignos podrían contribuir a un ensamblaje único de orden superior que medie funciones únicas en la evasión y supresión inmunes.



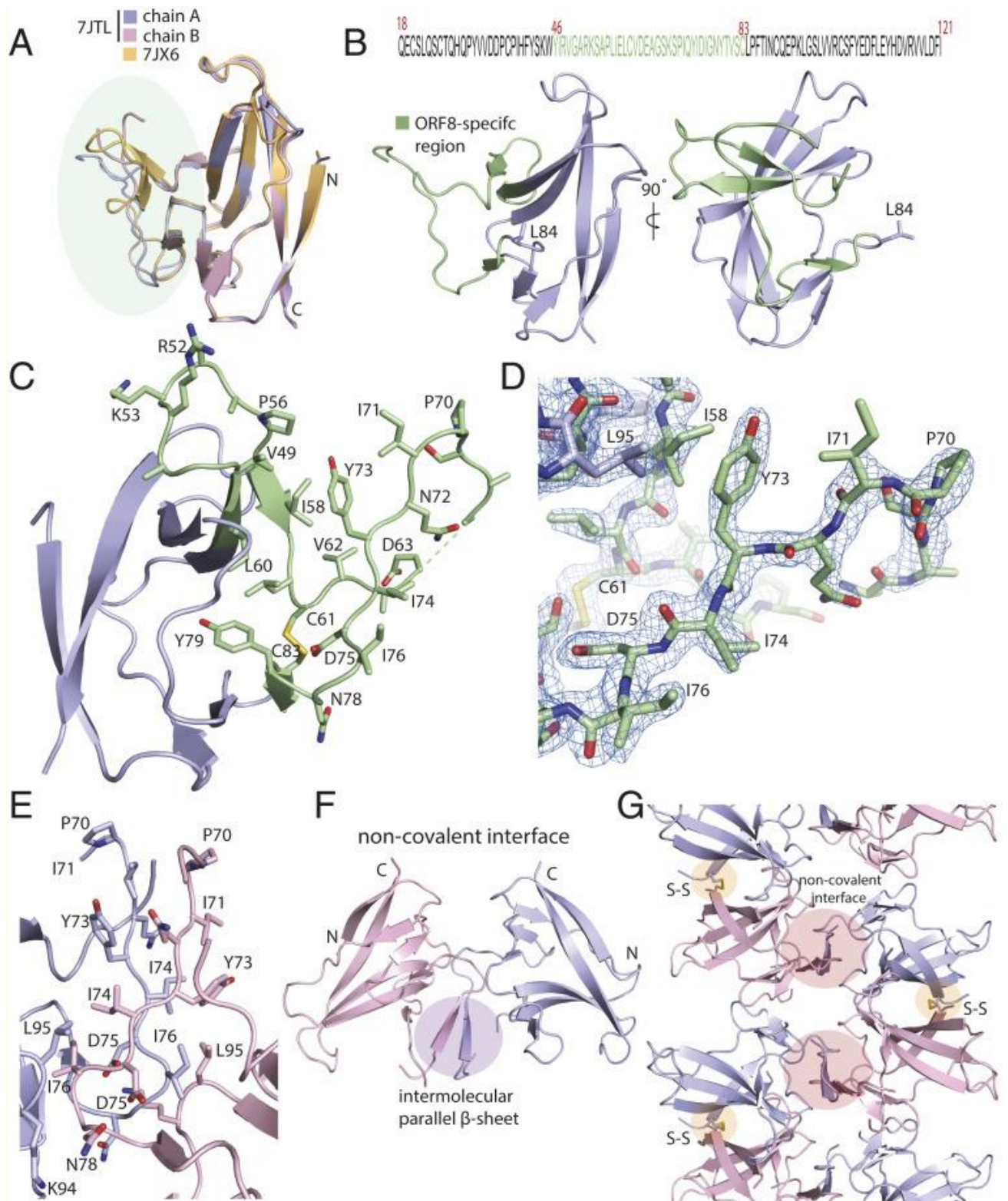


Figura 5.

SARS-CoV-2 ORF8 contiene una inserción grande y no estructurada. (A) Alineación estructural de las cadenas ORF8 A y B del dímero ligado al disulfuro (rmsd = 0,29) y comparación con el código ID PDB 7JX6 cadena A (rmsd = 0,42). La región correspondiente a la región específica de ORF8 se resalta en verde. (B) (Arriba) Se muestra la secuencia primaria de la construcción ORF8 del SARS-CoV-2 utilizada en este estudio. La región específica de ORF8 se resalta en verde. (Abajo) Una representación de dibujos animados del monómero con la región específica de

ORF8 de color verde. (C) Se anota un primer plano de la región específica de ORF8. Los residuos notables se muestran como palos y se etiquetan en consecuencia. (D) Representación en barra de la inserción con mapa de densidad electrónica $2F_o - F_c$. El mapa está contorneado a 2σ y representado como una malla azul. (E) El contacto cristalográfico entre las cadenas ORF8 A y B forma una interfaz no covalente resaltada por una amplia gama de residuos hidrófobos. Los residuos están anotados y se muestran en forma de barra. (F) La interfaz no covalente entre las cadenas ORF8 A y B forma una hoja β corta y paralela. (G) Representación de dibujos animados de interfaces alternas de disulfuro covalente y no covalente en la red cristalina ORF8.

[Vete a:](#)

DISCUSIÓN

La estructura del SARS-CoV-2 ORF8 proporciona un marco para comprender la relación entre las características de la secuencia, la evolución viral y la patogénesis, pero muchas preguntas clave siguen sin respuesta. Se han identificado muchos interactores celulares putativos ([13](#), [20](#)), pero el mecanismo de acción de ORF8 con respecto a estos interactores aún no está claro. Como se determinan las estructuras de los complejos ORF8 con receptores del huésped, esperaríamos ver a ORF8 unido en estos complejos como un dímero covalente. Es menos seguro si esperar que la interfaz de dímero no covalente mediada por motivos YIDI persista en algunos complejos funcionales. Dada la alta exposición a disolventes de estos residuos hidrofóbicos y su singularidad para el SARS-CoV-2 y sus parientes más cercanos, es razonable esperar que sean importantes para la patogénesis. Puede ser que estos residuos se involucren directamente con los objetivos del huésped en algunos casos, lo que presumiblemente no sería compatible con la persistencia del dímero ORF8 no covalente. Alternativamente, otras regiones pueden mediar interacciones directas con los receptores, mientras que la interfaz YIDI promueve el ensamblaje de orden superior y aumenta la avidéz de unión a los oligómeros receptores, o induce la oligomerización de los receptores. **Es intrigante que los anticuerpos ORF8 sean los principales marcadores serológicos de la infección por SARS-CoV-2.** Será importante definir los epítomos inmunogénicos en el SARS-CoV-2 ORF8, y si incluyen el motivo YIDI. En la medida en que los anticuerpos reaccionen con superficies funcionales

putativas de ORF8 como el motivo YIDI, **será importante determinar si los anticuerpos son neutralizantes con respecto a las funciones patogénicas de ORF8 y, de ser así, si estas propiedades pueden ser explotadas terapéuticamente.**

[Vete a:](#)

MATERIALES Y MÉTODOS

Expresión y purificación de proteínas.

El gen para el SARS-CoV-2 ORF8 18 a 121 de tipo salvaje se subclonó a partir de un ADN complementario proporcionado amablemente por D. Gordon y N. Krogan, Universidad de California, San Francisco, CA en el vector de clonación independiente de clonación independiente (LIC) del virus del grabado del tabaco (TEV) pET His6 (TEV). El plásmido se transformó en *E. coli* cepa BL21(DE3) Rosetta pLysS (QB3 MacroLab, Universidad de California, Berkeley), luego se expresó durante la noche (0,5 mM isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido) a 20 °C en caldo Luria que contenía ampicilina y cloranfenicol. Las células fueron granuladas y resuspendidas en tampón de lisis [50 mM Tris pH 8.0, 2 mM (etilendinitrilo)ácido tetraacético (EDTA), 100 mM NaCl, 1 mM ditiotrehitol, 0.5% Triton-X100] suplementado con inhibidores de la proteasa (Roche) y lisado por sonicación. El lisado se clarificó por centrifugación, y el pellet se lavó con tampón de lisis y se sonicó durante 10 minutos adicionales para homogeneizar. La suspensión se aclaró nuevamente por centrifugación, y el pellet se resuspendió en tampón de solubilización (100 mM Tris pH 8.5, 6 M clorhidrato de guanidina, 10 mM glutatión reducido) seguido de homogeneización Dounce e incubado a temperatura ambiente con balanceo durante 1 h. Las partículas insolubles se eliminaron por centrifugación, y el sobrenadante se aplicó a la agarosa cargada de níquel (GE Healthcare) preequilibrada en tampón de solubilización. La resina se lavó con tampón de solubilización y se unió ORF8 marcado con His-tagged eluido con tampón de elución (100 mM Tris pH 8.5, 6 M clorhidrato de guanidina, glutatión reducido 10 mM, imidazol 350 mM). El ORF8 solubilizado se añadió gota a gota a un exceso de 50 veces de tampón de repliegue

en frío (50 mM Tris pH 8,0, 500 mM de l-arginina, 2 mM EDTA, 5 mM de glutatión reducido, 0,5 mM de glutatión oxidado, 0,2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) durante un período de 2 h con agitación suave seguida de incubación durante la noche a 4 °C. La solución de repliegue se filtró, concentró y aplicó a una columna de exclusión de tamaño Superdex S75 equilibrada en tampón (20 mM Tris·HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). ORF8 plegado eluido como dos picos correspondientes a monómero y dímero. Ambos picos se agruparon e incubaron con proteasa TEV durante la noche. Los productos de escisión se pasaron a través de agarosa cargada de níquel (GE Healthcare) para eliminar cualquier ORF8 tío. El flujo continuo se concentró y se aplicó a una columna de exclusión de tamaño Superdex S75 equilibrada en tampón (20 mM Tris·HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). Tanto los picos de monómeros como los de dímeros se agruparon y concentraron.

El plásmido que contiene la secuencia codificante doble mutante ORF8 V32M, L84M fue generado por mutagénesis dirigida al sitio QuikChange de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Agilent). La proteína doble mutante ORF8 marcada con SeMet se expresó utilizando SelenoMet Medium Base de acuerdo con las instrucciones del fabricante (dimensiones moleculares). La purificación se llevó a cabo de la misma manera que el tipo salvaje, pero se omitió el paso de escisión TEV.

La expresión constructo se ha puesto a disposición en <http://www.addgene.org>.

Cristalografía de rayos X.

Los cristales de ORF8 de tipo salvaje se cultivaron utilizando el método de difusión de vapor de gota colgante a 18 °C. Dos microlitros de la muestra de proteína (7,8 mg·mL⁻¹) se mezclaron con 2 µL de solución de reservorio y se suspendieron sobre un depósito de 500 µL de 100 mM de dihidrógeno fosfato de sodio pH 6,5, 12% (peso / vol) PEG8000. Los cristales aparecieron después de 5 d y continuaron creciendo durante aproximadamente 1 semana. Los cristales se transfirieron al crioprotector (100 mM de dihidrógeno fosfato de sodio pH 6.5, 12% [peso / vol] PEG8000, 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 30% [vol / vol]

glicerol) y se congelaron rápidamente sumergiéndolos en nitrógeno líquido. Se recogió un conjunto de datos nativo de un único cristal del grupo espacial $P4_1 2_1 2$ en condiciones criogénicas (100 K) a una longitud de onda de 1,00001 Å utilizando un detector Dectris Pilatus3 S 6M (Beamline 5.0.2, Advanced Light Source, Lawrence Berkeley National Laboratory).

Los cristales de V32M/L84M ORF8 marcados con SeMet se produjeron utilizando la misma condición de reservorio que el tipo salvaje y una menor concentración de proteína (2,5 mg·mL⁻¹). Los cristales que exhibían una morfología diferente al tipo salvaje aparecieron después de 2 d y continuaron creciendo durante ~4 d. Se recolectó un conjunto de datos de pico de selenio de dispersión anómala de longitud de onda única en el grupo espacial $C2_1$ a una longitud de onda de 0.97903 Å.

Los datos de difracción se indexaron e integraron utilizando un software detector de rayos X (21). Las reflexiones integradas se escalaron, fusionaron y truncan utilizando el traje de software CCP4 (22). Las fases iniciales se obtuvieron para el conjunto de datos SeMet utilizando la tubería de autosol Phenix (23). Esta solución condujo a un mapa que permitió rastrear la cadena principal ORF8 completa, que se refinó parcialmente y luego se utilizó como modelo de búsqueda para el reemplazo molecular con respecto al conjunto de datos nativo utilizando Hierarchical Environment for Integrated Xtallography (PHASER) basado en Python (24). El grupo espacial del conjunto de datos nativo es $P4_1 2_1 2$ con un dímero ORF8 en la unidad asimétrica. Se llevaron a cabo rondas iterativas de construcción y refinamiento manual de modelos utilizando Coot (25) y Phenix Refine (23), respectivamente (para estadísticas, véase [el Apéndice SI, Tabla S1](#)). Las figuras estructurales se produjeron utilizando el programa PyMOL (<https://pymol.org/2/>).

Alineación de secuencias.

Las secuencias primarias de ORF8 y ORF7 de aislados humanos y murciélagos se recolectaron de GenBank. Las secuencias utilizadas para la alineación se seleccionaron en base a análisis filogenéticos previos (12). La alineación de la secuencia primaria

de los homólogos ORF8 se realizó utilizando el servidor ClustalOmega (26). La alineación de secuencias de ORF7a y ORF8 y las anotaciones de estructuras secundarias se guiaron mediante Define Secondary Structure of Proteins a través del servidor DALI (27) y se ajustaron manualmente en función de la inspección visual de las estructuras.

[Vete a:](#)

MATERIAL COMPLEMENTARIO

Expediente complementario

[Haga clic aquí para ver.](#) (138K, pdf)

[Vete a:](#)

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Subvención de Semilla de Emergencia R00RG2347 (J.H.H.) de la Oficina del Presidente de la Universidad de California (UCOP) y las Subvenciones de NIH R37 AI112442 (J.H.H.), R01 AI120691 (X.R. y J.H.H.), P50 AI150476 (J.H.H.), F32 AI150495 (C.Z.B.) y F32 AI152971 (R.M.H.). El Centro de Biología Estructural de Berkeley es apoyado, en parte, por el Instituto Médico Howard Hughes. La Fuente de Luz Avanzada es una Instalación de Usuario de la Oficina de Ciencias del Departamento de Energía bajo el Contrato DE-AC02-05CH11231. Las líneas de luz Advanced Light Source–Efficient Networking Advanced BeamLine Experiments (ALS-ENABLE) cuentan con el apoyo, en parte, del NIH, Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales, subvención P30 GM124169.

[Vete a:](#)

NOTAS

Los autores declaran que no hay intereses contrapuestos.

Este artículo contiene información de apoyo en línea en <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2021785118/-/DCSupplemental>.

[Vete a:](#)

DISPONIBILIDAD DE DATOS.

Las coordenadas se han depositado en el PDB, <http://www.wwpdb.org> (código de identificación PDB 7JTL). La expresión constructo se ha puesto a disposición en <http://www.addgene.org>.

[Vete a:](#)

REFERENCIAS

1. Lau S. K., et al., La proteína ORF8 del coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS) se adquiere del coronavirus relacionado con el SARS de murciélagos de herradura mayores a través de la recombinación. *J. Virol.* **89**, 10532–10547 (2015). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Cui J., Li F., Shi Z. L., Origen y evolución de los coronavirus patógenos. *Nat. Rev. Microbiol.* **17**, 181–192 (2019). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Lu R., et al., Caracterización genómica y epidemiología del nuevo coronavirus 2019: implicaciones para los orígenes del virus y la unión al receptor. *Lancet* **395**, 565–574 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Ceraolo C., Giorgi F. M., Variación genómica del coronavirus 2019-nCoV. *J. Med. Virol.* **92**, 522–528 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Mohammad S., et al., SARS-CoV-2 ORF8 and SARS-CoV ORF8ab: Genomic divergence and functional convergence. *Patógenos* **9**, 677 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. de Sousa E., et al., Mortality in COVID-19 disease patients: Corating the association of major histocompatibility complex (MHC) with severe acute respiratory syndrome 2 (SARS-CoV-2) variants. *Int. J. Infect. Dis.* **98**, 454–459 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

7. Laha S., et al., Characterizations of SARS-CoV-2 mutational profile, spike protein stability and viral transmission. *Infecta. Jinet. Evol.* **85**, 104445 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Muth D., et al., Attenuation of replication by a 29 nucleotide deletion in SARS-coronavirus acquired during the early stages of human-to-human transmission. *Rep.* **8**, 15177 (2018). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Gong Y. N., et al., La vigilancia genómica del SARS-CoV-2 en Taiwán reveló un nuevo mutante y clado de delección de ORF8 posiblemente asociado con infecciones en Oriente Medio. *Emerg. Los microbios infectan.* **9**, 1457–1466 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Su Y. C. F., et al., Discovery and genomic characterization of a 382-nucleotide deletion in ORF7b and ORF8 during the early evolution of SARS-CoV-2. *mBio* **11**, e01610-20 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Young B. E., et al., Effects of a major deletion in the SARS-CoV-2 genome on the severity of infection and the inflammatory response: An observational cohort study. *Lancet* **396**, 603–611 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Tan Y., Schneider T., Leong M., Aravind L., Zhang D., Novel immunoglobulin domain proteins provide insights into evolution and pathogenesis of SARS-CoV-2-related viruses. *mBio* **11**, e00760-20 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Gordon D. E. et al.; Consorcio de Biología Estructural QCRG; Zoonomia Consortium, Las redes comparativas de interacción de proteínas huésped-coronavirus revelan mecanismos de enfermedades virales. *Ciencia* **370**, eabe9403 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Hachim A., et al., Los anticuerpos ORF8 y ORF3b son marcadores serológicos precisos de infección temprana y tardía por SARS-CoV-2. *Nat. Immunol.* **21**, 1293–1301 (2020). [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
15. Li J. Y., et al., The ORF6, ORF8 and nucleocapsid proteins of SARS-CoV-2 inhiben la vía de señalización del interferón tipo I. *Virus Res.* **286**, 198074 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Zhang Y., et al., La proteína ORF8 del SARS-CoV-2 media la evasión inmune a través de la potente regulación negativa del MHC-I. [biorxiv:10.1101/2020.05.24.111823](https://doi.org/10.1101/2020.05.24.111823) (24 de mayo de 2020).
17. Nelson C. A., Pekosz A., Lee C. A., Diamond M. S., Fremont D. H., Structure and intracellular targeting of the SARS-coronavirus Orf7a accessory protein. *Estructura* **13**, 75–85 (2005). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

18. Imamura T., Isozumi N., Higashimura Y., Ohki S., Mori M., Production of ORF8 protein from SARS-CoV-2 using an inducible virus-mediated expression-system in suspension-cultured tobacco BY-2 cells. *bioRxiv*: 10.1101/2020.10.07.325910 (7 de diciembre de 2020). [[Artículo libre de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)]
19. Krissinel E., Henrick K., Inferencia de ensamblajes macromoleculares a partir del estado cristalino. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797 (2007). [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
20. Gordon D. E., et al., A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature* **583**, 459–468 (2020). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Kabsch W., XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Cristalizador.* **66**, 125–132 (2010). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Proyecto Computacional Colaborativo, Número 4, La suite CCP4: Programas para cristalografía de proteínas. *Acta Crystallogr. D Biol. Cristalizador.* **50**, 760–763 (1994). [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
23. Afonine P. V., et al., Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography. *Acta Crystallogr. D Estructura. Biol.* **74**, 531–544 (2018). [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. McCoy A. J., et al., Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674 (2007). [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G., Cowtan K., Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Cristalizador.* **66**, 486–501 (2010). [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Madeira F., et al., The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Ácidos nucleicos res.* **47**, W636–W641 (2019). [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Holm L., Using Dali for protein structure comparison. *Métodos Mol. Biol.* **2112**, 29–42 (2020). [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]