

RESEARCH

Red de los targets de SARS-CoV2

Irene Romero Granados*, Paula Andújar Zambrano*, Rosario García Morales* and Soledad del Castillo Carrera*

*Correspondence:

ireero99@uma.es;

paulandujar@uma.es;

0619884107@uma.es;

delcastillosoledad@uma.es

ETSI Informática, Universidad de Málaga, Málaga, España

Full list of author information is available at the end of the article

Abstract

Este proyecto pretende estudiar las interacciones que se producen entre las 29 proteínas del virus SARS-COV-2 y el interactoma humano. Para ello, se recopilarán los datos de interacción comentados, con los que se procederá a realizar un análisis sobre ellos y construir la red de proteínas que conforman los objetivos principales para el virus. En cuanto a las herramientas que se utilizarán, serán la base de datos biológica UniProt para la obtención de los datos de entrada, y el lenguaje de R para los métodos de análisis.

Keywords: SARS-COV-2; interactoma; R

1 Introducción

La familia de los coronavirus son virus infecciosos a los que se llama así debido a que en su superficie tienen puntas en forma de corona. A esta familia se les unió en 2019 el conocido SARS-CoV-2, que ha dado lugar al coronavirus 2 o COVID-19. Esta enfermedad es una enfermedad infecciosa que afecta a las vías respiratorias, de manera leve a moderada. Sin embargo esta enfermedad en personas mayores o con patologías previas puede hacer que se desarrolle la enfermedad con consecuencias o síntomas más graves, pudiendo producir hasta la muerte.

El coronavirus actualmente es considerado un problema de salud global, ya que debido a esta pandemia se han contagiado hasta ahora unas 369.955.862 personas y han fallecido un total de 5.650.738 personas.

Es por esto que es esencial el estudio de este virus, tanto de sus genes, sus proteínas o como interacciona con el ser humano.

A día de hoy tras toda la inversión mundial que se ha hecho para poder poner fin a este virus, se sabe que el SARS-CoV-2 está formado por 29 proteínas que interactúan con las células del ser humano pudiendo producir síntomas respiratorios graves hasta poder causar la muerte. A estas interacciones moleculares binarias proteína-proteína se les llama interactoma.

El interactoma sirve como de punto de partida para estudiar los posibles fármacos que podrían bloquear dichas interacciones y así evitar que el virus entre a la célula y se replique. Gracias al estudio del interactoma ha sido posible la realización de vacunas contra el COVID-19.

En este proyecto vamos a crear y estudiar la red de interacciones de las proteínas del SARS-CoV-2 con las proteínas humanas, y así poder obtener cuales son las principales funciones biológicas humanas en las que este virus interviene y relacionarlo con la realidad. Todos los recursos usados para la obtención de dicha información la podremos encontrar en el GitHub proporcionado.

2 Materiales y métodos

2.1 Carga de librerías y datos

Para poder llevar a cabo este trabajo, el primer paso a realizar es la carga de librerías necesarias y la carga de datos. Antes de cargar los datos, estos han sido descargados de Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) en formato .csv para poder llevar a cabo el análisis de la red. Una vez ha sido añadido este fichero al directorio correspondiente (data), se procederá a la carga de librerías. Las librerías que han sido utilizadas en este proyecto son las siguientes:

- **igraph**: Esta librería permite realizar análisis de redes, por lo cual, proporciona funciones para manipular gráficos con facilidad.
- **dplyr**: Esta librería proporciona métodos para poder manejar los ficheros de datos.
- **ggplot2**: Esta librería es un paquete de visualización de datos.
- **zoo**: Esta librería está especialmente dirigida a series temporales irregulares de vectores/matrices y factores numéricos.
- **STRINGdb**: Este paquete proporciona una interfaz para la base de datos STRING de interacciones proteína-proteína.

Después de tener las librerías necesarias y saber la funcionalidad de cada una de ellas, se procederá a cargar el archivo en una variable llamada "data" mediante el método "read.csv()"

Seguidamente, se filtrarán las entradas utilizando el paquete "dplyr" en las que la columna Entry.Name contenga en su nombre "HUMAN" ya que estos son los datos que interesan en esta práctica.

El código que ha sido implementado para la carga de librerías y datos es el siguiente:

```
1 library(igraph)
2 library(dplyr)
3 library(ggplot2)
4 library(zoo)
5 library(STRINGdb)
6 library(linkcomm)
7
8 # Cargamos el archivo de datos
9 data <- read.csv("code/data/uniprot1.csv", header=T, sep=";")
10
11 # Filtramos las entradas y cambiamos el Entry name
12 data2 <- dplyr::filter(data, grepl("HUMAN", Entry.Name))
13 data2$Entry.Name2 <- sapply(data2$Entry.Name, function(i) gsub("_
  HUMAN", "", i))
14 contenidos...
```

2.2 Mapeo y primera capa de la red

A continuación, utilizando la librería STRINGdb, se realiza un mapeo con los datos ya filtrados. Se guardará los hits de string en una imagen png en el directorio de los resultados (results)

Seguidamente, se creará la primera capa de la red y se guardará el resultado de esta primera capa en una imagen png.

2.3 Grado de Distribución

El grado de un vértice en una red es el número de conexiones asociadas a un vértice. Haciendo un recuento en una red del número de nodos por cada grado se tiene el grado de distribución. Este es entendido igualmente como la distribución de probabilidad de un grado en la red.

En esta práctica, se ha obtenido el grado de la red mediante el método "degree" y después se ha obtenido el grado de distribución mediante el método "degree.distribution".

Seguidamente se ha obtenido el coeficiente de agrupamiento mediante el método "transitivity" y por último, ha sido calculada la distancia euclídea.

2.4 Robustez

Por último, utilizando los métodos proporcionados en el campus virtual, se ha calculado la robustez de la red de genes. Esta funciona para conocer si la red que se está estudiando es un sistema fuerte y si esta sigue manteniendo sus funciones en la presencia de "ataques" (errores o fallos). Además, ha sido calculada frente a ataques aleatorios como a ataques dirigidos, pero también, han sido combinados ambos ataques.

2.5 Linked Communities

Una vez se tiene los datos ya mapeados y filtrados, se pasa a realizar un agrupamiento por comunidades, para ello, ha sido utilizado el paquete Linkcomm. Este paquete, proporciona las herramientas necesarias para generar, visualizar y analizar comunidades dentro de un grafo.

Al obtener las comunidades vinculadas, estas serán guardadas en la carpeta de results y, además, se han obtenido los tamaños de los clusters. Seguidamente, se ha obtenido la modularidad de las comunidades y se ha guardado el resultado de un cluster aleatorio. Además, se han obtenido las comunidades completamente anidadas dentro de la comunidad más grande de nodos.

2.6 Enriquecimiento Funcional

Una vez encontradas las comunidades más relevantes en una nuestra red, se va a pasar a realizar el enriquecimiento funcional de estas. Este enriquecimiento es utilizado para obtener las principales funciones biológicas involucradas de cada comunidad.

Para ello, hemos realizado a cada clúster el análisis funcional mediante las ontologías GO y KEGG y así tener un abanico más amplio de funciones. En primer lugar, hemos utilizado las funciones del paquete STRINGdb para este propósito, con las que hemos obtenidos largas tablas de funciones que hemos recopilado en diversos archivos csv.

Al realizar búsquedas sobre la interpretación de los datos, nos hemos dado cuenta que el paquete clusterProfiler tiene funciones predeterminadas tanto para realizar los enriquecimientos como para aplicar el posterior análisis de los resultados. Por lo que también hemos incluido el análisis funcional con este paquete.

3 Resultados

3.1 Red de interacciones y robustez

En la imagen Figure 1 se muestra la red de interacciones del ser humano con las proteínas del SARS-CoV. Como podemos ver el SARS-CoV interactúa con 89 proteínas humanas, produciendo un total de 475 interacciones.

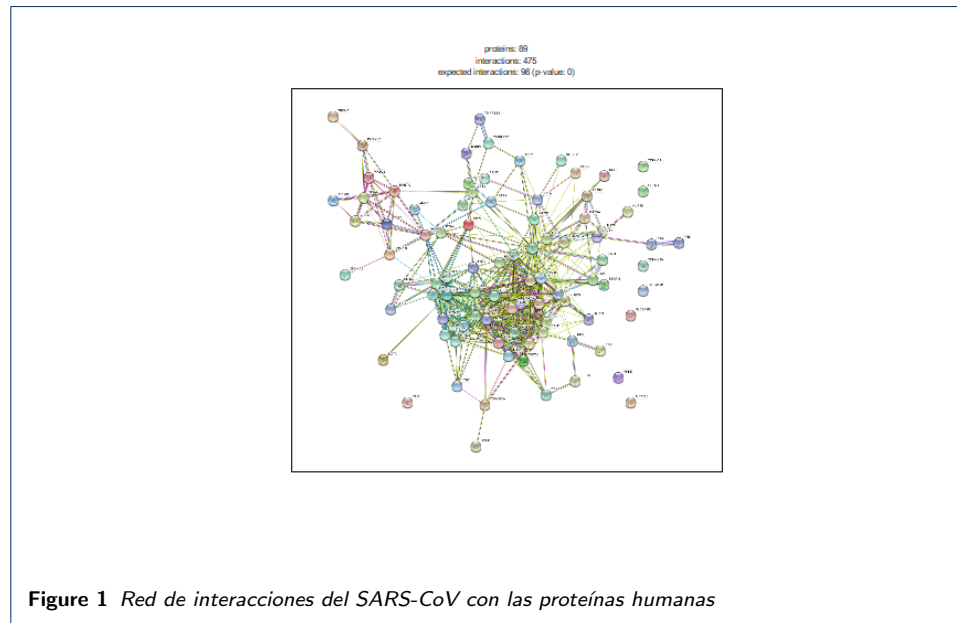


Figure 1 Red de interacciones del SARS-CoV con las proteínas humanas

Tras eliminar los nodos que no están conectados, hemos obtenido la red real de interacciones que podemos ver a continuación. Sin embargo hay demasiadas conexiones como para poder distinguir los nodos. Es por ello que realizaremos los pasos siguientes de clustering, para así poder extraer la información relevante de la red. Podemos observar la red de interacciones en la figura Figure 2.

Antes de empezar con ese proceso vamos a estudiar diferentes aspectos de nuestra red. En primer lugar si observamos la imagen Figure 3, vemos que la distribución de grado sigue la ley de potencias, por lo tanto nuestra red sigue un modelo de free-scale, lo cual era predecible al estar tratando con una red real.

Podemos ver una gran cantidad de hubs.

El coeficiente medio de agrupamiento es de 0.605, lo cual es bastante alto. Además se puede observar la característica propia de las redes reales la cual afirma que conforme el grado de los nodos aumenta, el coeficiente de agrupamiento disminuye. La gráfica del coeficiente de agrupamiento esta en la Figure 4.

La distancia media entre nodos es de 2.03, una medida muy pequeña que puede significar que los nodos tienen un alto índice de conexiones. Esta medida es la que le da la propiedad de mundo pequeño, es decir, la distancia entre nodos elegidos al azar en una red es muy pequeña. Esto se puede observar de forma visual en la Figure 5.

Por último vamos a estudiar la robustez de nuestra red. Para poder estudiar cual es la capacidad de nuestra red de mantener sus funciones frente a la presencia de "ataques" y ver cuán de adaptable es, usamos la robustez. Podemos observar en la Figure 6 que para ataques aleatorios es bastante robusta, mientras que para ataques

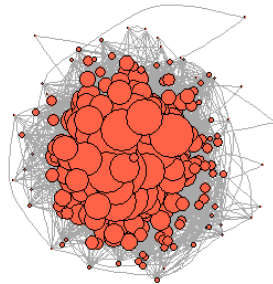


Figure 2 Red de interacciones del SARS-CoV con las proteínas humanas tras un proceso de filtrado

dirigidos es más débil. Pues a que tenemos una red real, estos resultados resultan obvios, ya que es más fácil destruir una red si atacas a puntos estratégicos como son los hubs, dónde el tamaño de la componente conexa se reduce drásticamente cuando eliminamos una pequeña fracción de los nodos (hubs).

3.2 Linked Communities

En esta sección se explicarán los resultados obtenidos al aplicar los métodos de comunidades enlazadas a nuestra red, para los cuales hemos usado el paquete linkcomm. Primero de todo, mencionar que las comunidades de una red son subredes que están altamente relacionados entre sí debido a que sus proteínas poseen algunas características similares. Estas pueden ser funciones biológicas, coeficiente de clustering, o tienen perturbaciones en su secuencia genética que pueden ser enlazadas a una enfermedad común.

Para la identificación de las comunidades más relevantes en nuestra red, hemos aplicado una función predefinida que devuelve el conjunto de las comunidades identificadas mediante la aplicación de un algoritmo de 'single clustering'. Se ha guardado una imagen Figure 7 del resumen de estas comunidades para un resultado más visual.

Podemos observar que este método ha definido 165 comunidades diferentes, la mayor de estas tiene 70 nodos lo cual podemos deducir que hay varias comunidades que comparten nodos en nuestra red.

Para poder analizar las comunidades y obtener las que consideremos más relevantes, han sido filtradas por tamaño y modularidad. Lo cual nos ha facilitado la búsqueda de la comunidad más grande y dos comunidades que tienen mayor modularidad (y respectivamente). Las gráficas generadas para este propósito son Figure 8 y Figure 9.

Hemos podido extraer la comunidad 112 siendo esta la más grande y las comunidades 78 y 22 con una mayor modularidad. A estas comunidades encontradas se les

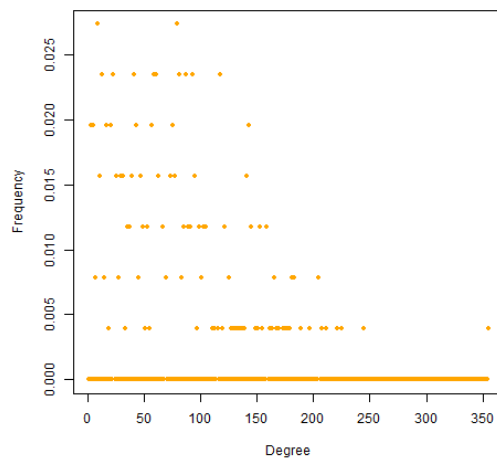


Figure 3 *Distribución de grado*

realizará un enriquecimiento funcional para observar las funciones y características comunes que poseen y así poder sacar conclusiones adecuadas.

Para una mejor visualización de los resultados, se ha cambiado el diseño de la gráfica al de Fruchterman Reingold (se puede observar en la Figure 10), mostrando solo nodos que pertenezcan a 10 o más comunidades.

Por otra parte, se han obtenido las comunidades anidadas y se han filtrado para que se muestren las que son independientes de las demás. Estas se observan en la Figure 11.

3.3 Enriquecimiento funcional

En esta sección se van a mostrar los resultados obtenidos al realizar el enriquecimiento funcional con GO y con KEGG, mediante el uso de STRINGdb, para los clústeres elegidos. Se ha guardado la información del enriquecimiento en archivos de tipo csv, y se va a mostrar una imagen de los mismos.

3.3.1 Clúster 112

Enriquecimiento con GO Entre las funciones biológicas obtenidas con el enriquecimiento con GO, se puede observar que algunas de ellas están relacionadas con la defensa del organismo, por lo que se puede deducir que son proteínas que forman parte del sistema inmunológico de nuestro organismo. Otras tantas funciones biológicas están asociadas con la regulación de diversos procesos biológicos.

Enriquecimiento con KEGG Las funciones biológicas en el enriquecimiento con KEGG están relacionadas con enfermedades/infecciones (malaria, hepatitis B, tuberculosis) por lo que se podríamos deducir que dichas proteínas forman parte de la respuesta inmunitaria del organismo ante dichas enfermedades o que las provocan. Además de esto, se observan funciones biológicas relacionadas con vías biológicas del organismo, como son la vía de señalización de quimioquinas, la de detección de ADN citosólico...

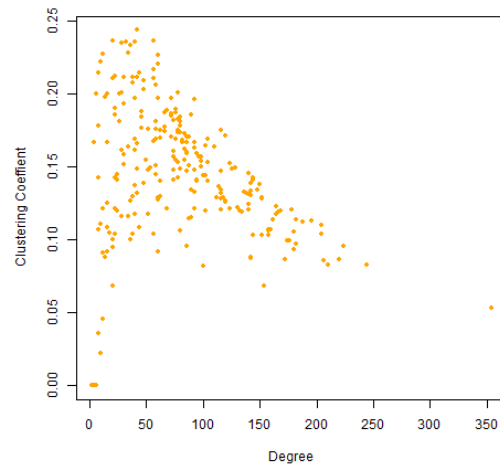


Figure 4 Coeficiente de Agrupamiento

3.3.2 Clúster 78

Enriquecimiento con GO GO no ha encontrado funciones biológicas asociadas al clúster elegido.

Enriquecimiento con KEGG En este caso, KEGG ha encontrado dos funciones biológicas asociadas al clúster: cáncer de tiroides y vías en el cáncer. Es por tanto que deducimos que las proteínas que forman parte de este clúster se ocupan de las vías principales del cáncer de tiroides, ya sea para detectarlo o provocarlo.

3.3.3 Clúster 22

Enriquecimiento con GO En este caso se puede observar que las principales funciones biológicas de las proteínas pertenecientes a este clúster son de regulación, transporte y recepción, por lo que desempeñan funciones muy importantes en las rutas metabólicas del organismo.

Enriquecimiento con KEGG Las funciones biológicas obtenidas por KEGG son más concretas: reabsorción de calcio regulada por factores endocrinos, ciclo de vesículas sinápticas, endocitosis, lisosoma, enfermedad de Huntington, invasión bacteriana de las células epiteliales y vía de señalización de la fosfolipasa D. Esta última está relacionada con la traducción de señales. Otras están relacionadas con enfermedades y sus causas.

Tras realizar el análisis funcional usando el paquete *clusuterProfiler*, hemos generado una gráfica para cada clúster que nos compara el p-value de los resultados frente al qscore de estos. Con esto podemos extraer las funciones más frecuentes de cada comunidad y así hacernos una idea de las características comunes de nuestros clústeres. Las funciones del clúster 78 podemos observarlas en la imagen Figure 12, las del clúster 22 se encuentran en la imagen Figure 13 y las del 112 en la imagen Figure 14.

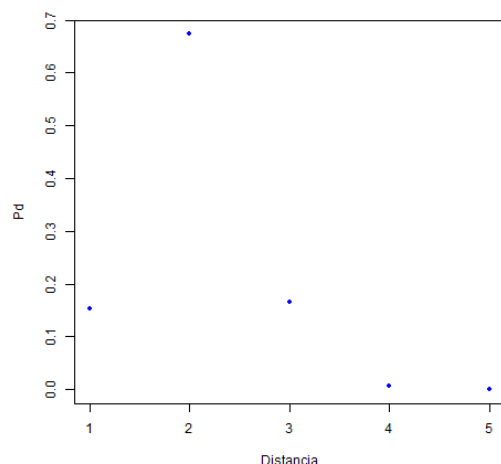


Figure 5 *Distancia entre nodos*

4 Discusión

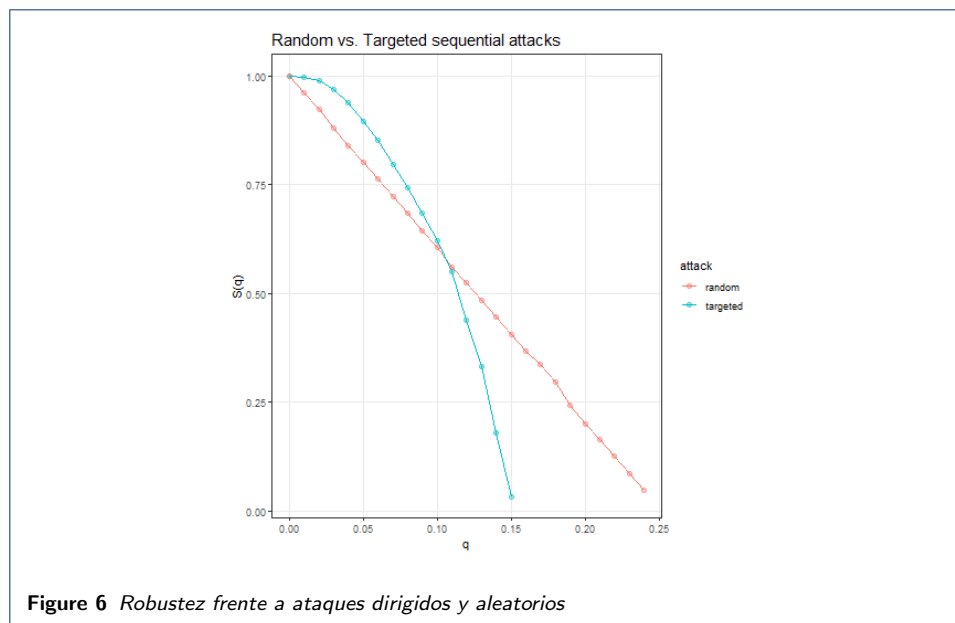
Una vez obtenidos los resultados, en este apartado se indagará en la relación que pueda tener el SarsCOV-2 con las funciones biológicas obtenidas previamente.

Tras el análisis funcional del **cluster 112**, descubrimos que una de las funciones con las que está muy relacionado es con el proceso metabólico de la fucosa. La fucosa es un azúcar que forma parte de algunas de las glucoproteínas que se encuentran en el aparato del Golgi cuando se produce la glucosilación.

Un estudio de Stanford Medicine (Estados Unidos) ha descubierto que aquellos pacientes que tenían una deficiencia en la fucosa, sufrían la enfermedad con más gravedad que los que tenían niveles normales. Además estos pacientes con leves niveles de fucosa, sus células inmunitarias presentaban niveles muy altos de unos receptores llamados CD16a, los cuales se sabe que aumentan la actividad inflamatoria de las células inmunitarias. Para una correcta respuesta inmunitaria es necesaria un poco de inflamación, sin embargo, si es demasiada puede producir que el paciente no tenga una respuesta inmunitaria buena y producir una inflamación en los pulmones, lo que puede provocar que el paciente pueda llegar a un estado crítico.

Así mismo, tras el análisis funcional del **cluster 22**, se ha llegado a la conclusión de que la principal función biológica que desempeñan las proteínas pertenecientes a dicho grupo afectan a la mitocondria de las células. El SarsCOV-2 secuestra las mitocondrias de las células inmunitarias, se replica dentro de las estructuras mitocondriales y altera la dinámica mitocondrial que conduce a la muerte celular, lo que aumenta la mortalidad de los pacientes que lo sufren.

De la misma forma, tras el análisis funcional del **cluster 78**, se ha llegado a la conclusión de que la principal función biológica que desempeñan las proteínas pertenecientes a dicho grupo afectan a la remodelación/degradación de la matriz extracelular de los pulmones. Los procesos patológicos que conducen a la disminución de la función pulmonar se usan para identificar mejor a los pacientes infectados con SARS-Co-V2 con mayor riesgo de deterioro agudo o daño fibrótico persis-



tente del pulmón y, como consecuencia, se podría usar para guiar las decisiones de tratamiento.

5 Conclusiones

Se ha llegado a la conclusión final de que las funciones biológicas de las proteínas estudiadas están basadas en el daño que el SarsCOV-2 le genera a los pulmones. Como se ha explicado, la fucosa los inflama y les genera un daño permanente que hace que las mitocondrias de las células se dañen y provoquen la muerte celular, lo que impide la regeneración de las matrices extracelulares de los pulmones. Esto desencadenará en daños permanentes en los pacientes, lo que puede impedir su total recuperación, que se les desarrollen patologías crónicas o incluso provocarles la muerte (sepsis por COVID).

Los resultados obtenidos en el análisis concuerdan con la descripción del propio virus, ya que el SarsCOV-2 provoca una infección respiratoria en los pacientes que afecta a todo su sistema respiratorio.

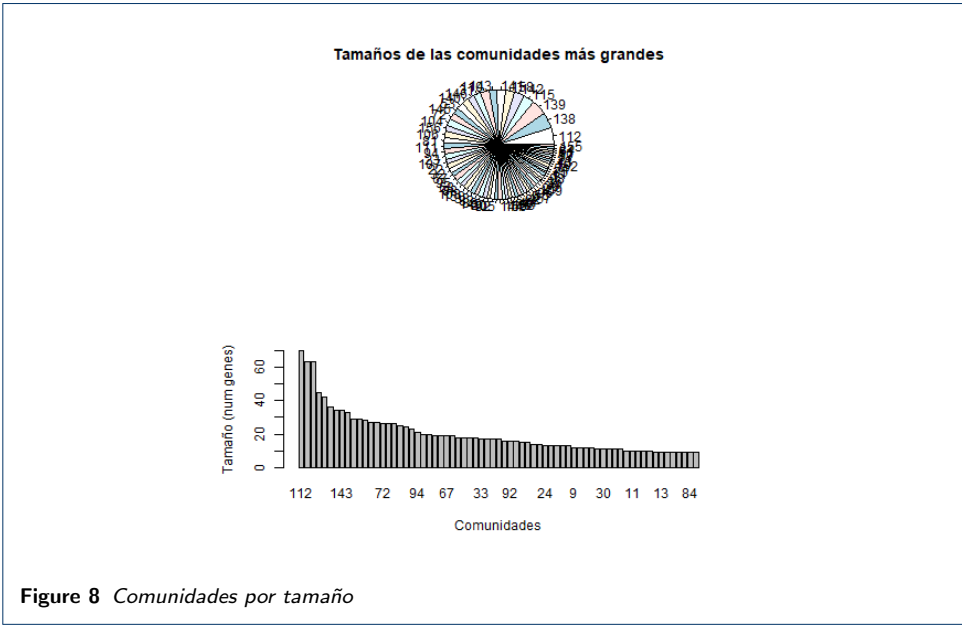
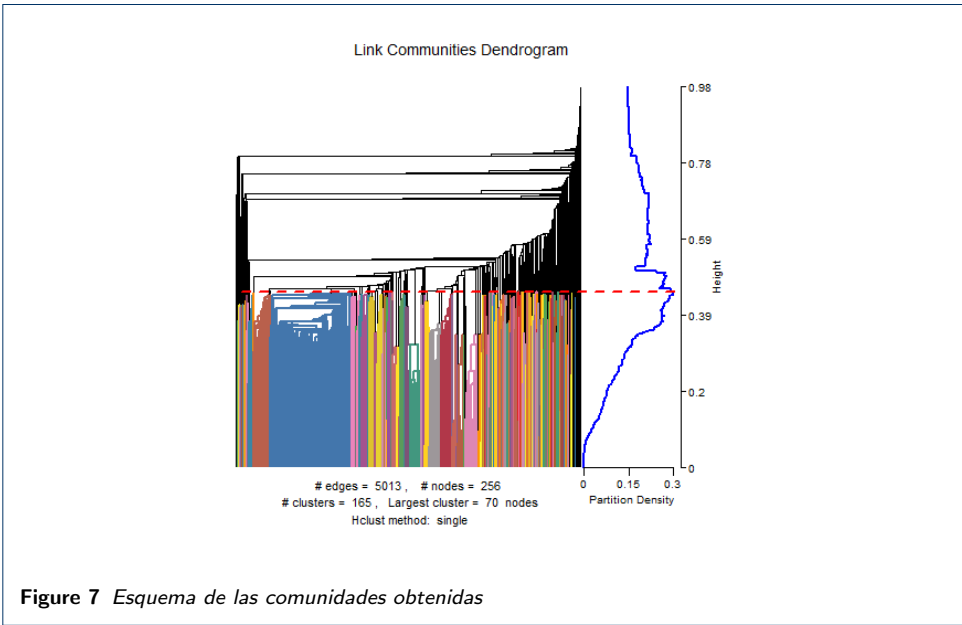
Este resultado demuestra la importancia de contar con el interactoma humano a la hora de estudiar enfermedades y así encontrar los principales focos causantes de la misma.

Disponibilidad de datos y materiales

https://github.com/Paulandujar/project_template

Contribución de los autores

I.R.G: Encargada del análisis de la red (distancia entre nodos, distribución de grado y coeficiente de agrupamiento), cálculo de la robustez, escritura del launch.sh y escritura de los resultados de estos cálculos en el report; P.A.Z: Encargada del cálculo linked communities, posterior análisis de esos resultados en el report y escritora del abstract; R.G.M: Encargada de las funciones de Robustez y escritura del apartado Materiales y Métodos; S.dC.C: Encargada del enriquecimiento funcional, análisis de esos resultados en el report y escritura del setup.sh.



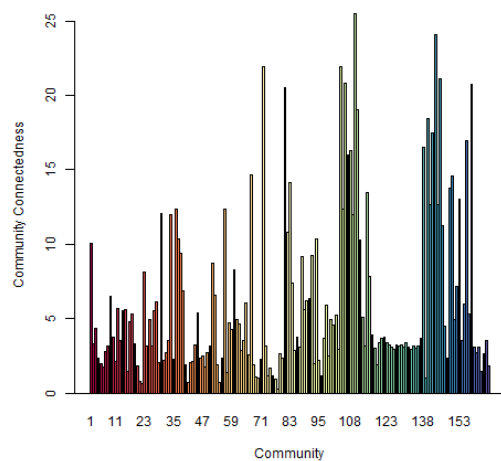


Figure 9 *Comunidades por modularidad*

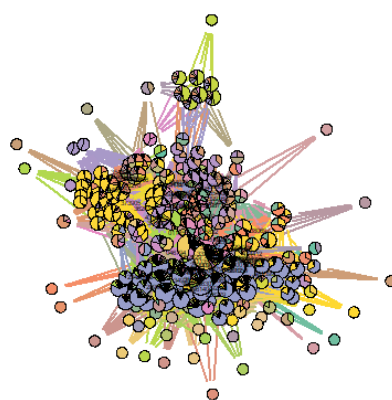


Figure 10 *Fruchterman Reingold graph*

