

[J Med Virol.](#) 2022 Septiembre 19 : 10.1002/jmv.28135.  
doi:[10.1002/jmv.28135](#)[Epub antes de imprimir]

PMCID: PMC9538743  
PMID: [36085352](#)

## Inhibidores codificados por SARS-CoV-2 de la retro transposición humana de LINE-1

[Yan Li](#), [Jiaxin Yang](#), [Siyu Shen](#), [Wei Wang](#), [Nian Liu](#), [Haoran Guo](#), [Wei Wei](#) <sup>1</sup>, <sup>2</sup>, <sup>3</sup>

Información del autor [Notas del artículo](#) [Información sobre derechos de autor y licencia](#) [Descargo de responsabilidad](#)

### Datos asociados

[Declaración de disponibilidad de datos](#)

[Vete a:](#)

### Resumen

---

La pandemia en curso del coronavirus respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2) está causando un impacto devastador en la salud pública en todo el mundo. Sin embargo, los detalles sobre el profundo impacto del SARS-CoV-2 en las células huésped siguen siendo difíciles de alcanzar. Aquí, investigamos los efectos de las proteínas virales codificadas por SARS-CoV-2 en la actividad intracelular de retrotransposones del elemento 1 (L1) intercalados durante mucho tiempo utilizando sistemas informadores bien establecidos. Varias proteínas no estructurales o accesorias (Nsps) del SARS-CoV-2 (es decir, Nsp1, Nsp3, Nsp5 y Nsp14) suprimen significativamente la movilidad L1 humana, y estos inhibidores virales de L1 generan una red compleja que modula la transposición de L1. Específicamente, Nsp1 y Nsp14 inhiben la acumulación intracelular de proteínas de marco de lectura abierta L1 (ORF1p), mientras que Nsp3, Nsp5 y Nsp14 reprimen la actividad de la transcriptasa inversa de L1 ORF2p. Dados los hallazgos recientes sobre el papel de L1 en la activación inmune antiviral y la inestabilidad del genoma del huésped, las actividades anti-L1 mediadas por inhibidores codificados por

SARS-CoV-2-2 sugieren que el SARS-CoV-2 emplea diferentes estrategias para optimizar el entorno genético del huésped.

**Palabras clave:** coronavirus, LINE-1, retrotransposón, SARS-CoV-2

[Vete a:](#)

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Las infecciones humanas por coronavirus causan principalmente enfermedades respiratorias y entéricas. La enfermedad por coronavirus (COVID-19) causada por el coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) continúa afectando ampliamente al mundo. [1](#) Biológicamente, los coronavirus son virus de ARN monocatenario de sentido positivo con una envoltura. [número arábigo](#) Las proteínas estructurales del coronavirus incluyen la espiga (S), la envoltura (E), la membrana (M) y la nucleocápside (N). El ARN monocatenario de sentido positivo está encapsulado por proteínas N, mientras que las proteínas M y E ayudan en la incorporación viral durante el proceso de ensamblaje de partículas. La unión específica de la proteína S a los receptores de entrada celular, incluida la enzima convertidora de angiotensina 2, inicia la infección por coronavirus. El ARN genómico contiene dos grandes marcos de lectura abiertos (ORF1a y ORF1b) que codifican 15-16 proteínas no estructurales (Nsps). [número arábigo](#) El genoma del coronavirus también contiene genes que codifican proteínas accesorias que son prescindibles para la replicación viral y el crecimiento in vitro. [3](#)

El genoma humano contiene una gran proporción de secuencias repetidas de ADN, que pueden caracterizarse aún más según la longitud como cortas (SINE) o largas (LINE). [4](#) El elemento humano intercalado largo 1 (LINE-1 o L1), el único retrotransposón autónomamente competente en retrotransposición, pertenece a la familia dominante de elementos que impulsan la amplificación. [5](#) L1 se transcriben como un ARNm bicistrónico que codifica ORF1p y ORF2p. [4](#) ORF1p, una proteína de unión al ARN de 40 kDa, posee actividad chaperona de ácido nucleico, mientras que ORF2p, una proteína de 150 kDa, es una endonucleasa que corta los sitios diana del ADN genómico y una transcriptasa inversa endógena (RTasa) que genera ADNc L1 (ADN complementario). [5.6](#) ORF1p y ORF2p interactúan con sus propios ARN para formar ribonucleoproteínas L1 (RNP) en el citoplasma. Un estudio previo indicó que ORF1p y ORF2p exhiben una localización altamente heterogénea, con ORF1p localizado en el citoplasma o ambos en el citoplasma y el núcleo, pero nunca exclusivamente en el núcleo, mientras que ORF2p se encuentra en el citoplasma, solo en el núcleo, o tanto en el citoplasma como en el núcleo. [7](#) Un estudio reciente reveló que los aminoácidos de carga múltiple en el extremo C de ORF1p son responsables de su localización subcelular al interactuar con las proteínas de unión nuclear. [8](#) Las RNP L1 pueden ingresar al núcleo, donde la retrotransposición ocurre a través de un mecanismo llamado transcripción inversa cebada en el sitio objetivo (TPRT). [9](#) La reparación no homóloga de unión de extremos también está involucrada en la retrotransposición L1. [10](#) La nueva copia L1 se integra en el genoma, aunque los detalles asociados con este proceso siguen sin estar claros. [11](#)

Los análisis del genoma humano muestran que L1 ocupa el 17% del ADN. [12](#) Los elementos transponibles (TE) dan forma al genoma humano de muchas maneras diferentes, incluso impulsando la evolución del genoma, la inestabilidad genómica, los reordenamientos genómicos y la innovación genética. [13](#) La evidencia acumulada indica que varios factores codificados por el huésped, como las proteínas de reparación del ADN, están involucrados en el ciclo de vida L1. [10](#) Nicole et al. [14](#) relataron que la proteína de respuesta al daño del ADN ataxia telangiectasia mutó, una serina/treonina quinasa modula la retrotransposición L1 y se correlaciona con enfermedad neurodegenerativa. Sin embargo, las células huésped también

mantiene factores de restricción que suprimen la actividad de transposición L1. [11](#) Por ejemplo, el motivo de  $\alpha$  estéril relacionado con el síndrome de Aicardi-Goutières y la proteína 1 que contiene el dominio histidina-aspartato (SAMHD1), un regulador celular de la actividad de LINE-1, inhibe la transcripción inversa L1 mediada por ORF2p. [15](#) Además, la proteína 5 $\alpha$  que contiene motivos tripartitos, que es un factor de restricción intracelular contra la infección retroviral, restringe los elementos L1. [16](#)

Estudios previos han revelado que la recombinación ilegítima entre virus de ARN exógenos y retrotransposones endógenos conduce a la integración no retroviral del ADNc. [17,18,19](#) Zhang et [al.20](#) demostraron que el ARN del SARS-CoV-2 transcrito inversamente puede integrarse en el genoma de células humanas cultivadas y expresarse en tejidos derivados de pacientes. Además, se han detectado transcripciones quiméricas virales-celulares en tejidos derivados de pacientes. [20](#) En particular, las porciones de secuencias de reconocimiento de endonucleasas L1 de consenso pueden flanquear las secuencias virales integradas, lo que es consistente con la TPRT mediada por L1 y el mecanismo de transposición. [21](#) Sin embargo, Smits et [al.22](#) no encontraron ninguna evidencia de integración del SARS-CoV-2 en el genoma en células HEK293T infectadas con SARS-CoV-2. Además, los patrones moleculares exógenos asociados a patógenos activaron epigenéticamente L1 para activar la sintasa cíclica GMP-AMP, mejorando así las respuestas de interferón tipo I (IFN) del huésped. Esto sugiere que la inducción de la expresión de elementos transponibles es fundamental para la detección innata. [23](#) En particular, la infección por SARS-CoV-2 induce respuestas bajas de huésped-IFN y altos niveles de quimiocinas. [24,25](#) Sin embargo, el impacto del SARS-CoV-2 en el huésped L1 sigue siendo difícil de alcanzar. Aquí, utilizando sistemas reporteros bien establecidos y sobreexpresión de proteínas virales, investigamos las interacciones / diafonía entre las proteínas codificadas por SARS-CoV-2 y el huésped L1 para ampliar nuestra comprensión de la patogénesis viral, el control de enfermedades y la prevención.

[Vete a:](#)

## [2. MATERIALES Y MÉTODOS](#)

---

### [2.1. Células y plásmidos](#)

Las células HEK293T se cultivaron en el medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 10% de suero bovino fetal y 100  $\mu$ g / ml de penicilina-estreptomicina. Los plásmidos humanos LINE-1 99 PUR L1RP EGFP (enhanced green fluorescent protein) (L1RP EGFP) y 99 PUR JM111 EGFP (JM111), el plásmido pc-L1-1FH y los plásmidos pEGFP-N1-ORF1-EGFP fueron amablemente proporcionados por el Dr. Haig H. Kazazian, Jr. y John L. Goodier. [26,27,28,29](#) La construcción JM111 que contiene dos mutaciones sin sentido en la región ORF1 se utilizó como control negativo para L1RP EGFP. [27](#) El plásmido pc-L1-1FH expresó LINE-1 de longitud completa, y LINE-1 ORF1p se marcó con FLAG y HA. [La construcción 28](#) pEGFP-N1-ORF1-EGFP contenía la secuencia L1RP ORF1 marcada con GFP. [29](#) Los plásmidos pYX014 y pYX017 fueron amablemente proporcionados por el Dr. Wenfeng [An.30,31](#) Los vectores que expresan proteínas codificadas por SARS-CoV-2 fueron amablemente proporcionados por el Prof. Pei-Hui Wang. [32](#)

### [2.2. Retrotransposición L1 con ensayo del notificador del EGFP](#)

Las células HEK293T se sembraron en placas de 24 pocillos y se transfectaron con 1  $\mu$ g de construcciones L1RP EGFP o JM111. Las células fueron seleccionadas con puromicina (3  $\mu$ g/ml) 48 h después de la transfección. El porcentaje de células GFP (+) se midió utilizando un citómetro de flujo BD FACSCalibur después de 48 h de selección de puromicina. El plásmido JM111 constructo fue utilizado como control negativo. Un total de 10 000 eventos unicelulares se cerraron mediante citometría de flujo. El porcentaje de células GFP(+) se analizó utilizando el CellQuest Pro (v.5.2).

### 2.3. Retrotransposición L1 con un sistema de reportero de Luciferasa

Las células HEK293T sembradas en placas de 24 pocillos se transfectaron con los plásmidos pYX014 o pYX017. Las células fueron entonces puromicina seleccionadas 24 h después de la transfección. Después de 3 días de selección de puromicina, se realizaron ensayos de doble luciferasa de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Firefly y *Renilla* luciferasa se midieron utilizando Promega GloMax® de una sola muestra.

### 2.4. Ensayo de viabilidad celular

Las células HEK293T fueron pretransfectadas. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos 1 día después de la transfección. Luego, las células se cultivaron durante otros 3 días antes de evaluar su viabilidad. La absorbancia se detectó a una longitud de onda de 490 nm utilizando un lector BioTek ELISA (BioTek Instruments, Inc.) al agregar 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil)-2H-tetrazolio, sal interna (Promega) a cada pozo.

### 2.5. Immunoblotting

Las muestras celulares se recolectaron y lisaron en tampón RIPA (1 M Tris pH 7.8, 1 M NaCl, 1% NP-40, 0.5 M EDTA). El lisado celular se separó en geles de electroforesis en gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida al 12% y luego se transfirió a membranas de nitrocelulosa utilizando un aparato semiseco (Bio-Rad). Anti-HA se compró a Thermo Fisher Scientific. El anticuerpo anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fue comprado a GenScript Biotech Corp.

### 2.6. Ensayo del protocolo de amplificación de elementos L1 (LEAP) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se ha descrito la construcción L1 pc-L1-1FH. [28](#) Las células HEK293T se transfectaron con el plásmido pc-L1-1FH. Las RNP L1 se separaron mediante un cojín de sacarosa de 8,5% + 17% de centrifugación de gradiente a 4 °C, 178 000g durante 2 h como se describió anteriormente. [33](#) Durante el ensayo LEAP, se agregaron 2 µl de la muestra L1 RNP a cada solución de reacción de extensión de ADNc (500 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 M dithiothreitol, RNasin (40 U/µl), 0.05% (v/v) Tween 20, y dNTP) usando el cebador LEAP: 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTTTTTTTN-3'. El ARNm de L1 se transcribió a ADNc L1 por L1 ORF2p en las RNP a 37 °C durante 1 h. Para detectar el nivel del ARNm L1, se extrajo el ARN L1 del RNP L1 y se transcribió inversamente con el mismo cebador utilizando MuLV RT (GoScript Reverse Transcription System; Promega). El ADNc sintetizado tanto del ensayo LEAP como de MuLV RT se analizó mediante qRT-PCR utilizando los siguientes cebadores: cebador de PCR de enlace, 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGACT-3'; L1 imprimación de 3'', 5'-GGGTTGCGAAATCGATAAGCTTGGATCCAGAC-3', con un método estándar de tres pasos (95°C durante 15 s, 60°C durante 1 min y 72°C 2–4 kb/min) como se describió anteriormente. [33](#) Para los cálculos se utilizó el método .

### 2.7. Análisis estadístico

Los datos estadísticos de este estudio fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0; GraphPad Software Inc.). Los datos se describen como el  $M \pm SD$  de tres réplicas de cada experimento. La prueba de Unpaired Student se realizó en los datos entre los dos grupos.  $P < 0,01$  se consideró significativo en los grupos.

[Vete a:](#)

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Las proteínas codificadas por SARS-CoV-2-regulan la actividad de retrotransposición L1-

Examinamos los efectos de las proteínas individuales codificadas por SARS-CoV-2- en la movilidad L1 utilizando un sistema informador de EGFP bien establecido. [26](#) La construcción L1RP EGFP contenía tanto el casete L1RP como el casete reportero EGFP con su promotor citomegalovirus (CMV) (Figura [1A](#)). El casete del reportero EGFP fue interrumpido por intrones, y el marcador EGFP solo se pudo detectar después de la eliminación exitosa del intrón del retroelemento y la integración L1 (Figura [1B](#)). Encontramos que varias proteínas virales restringieron la actividad de transposición L1 a diferentes niveles. En particular, Nsp1, Nsp3, Nsp5 y Nsp14 mostraron una mayor actividad inhibitoria contra L1 (Figuras [1Cy2A](#)), mientras que otras proteínas virales dieron lugar a una actividad L1 modestamente mejorada. En particular, la sobreexpresión de todas las proteínas probadas no influyó significativamente en la proliferación celular (Figura [2B](#)) o expresión de GFP impulsada por el promotor del CMV (Figura [2C](#)) en células HEK293T. **Estos resultados sugirieron que las proteínas virales codificadas por el SARS-CoV-2 son inhibidores específicos de la integración del transposón humano.**

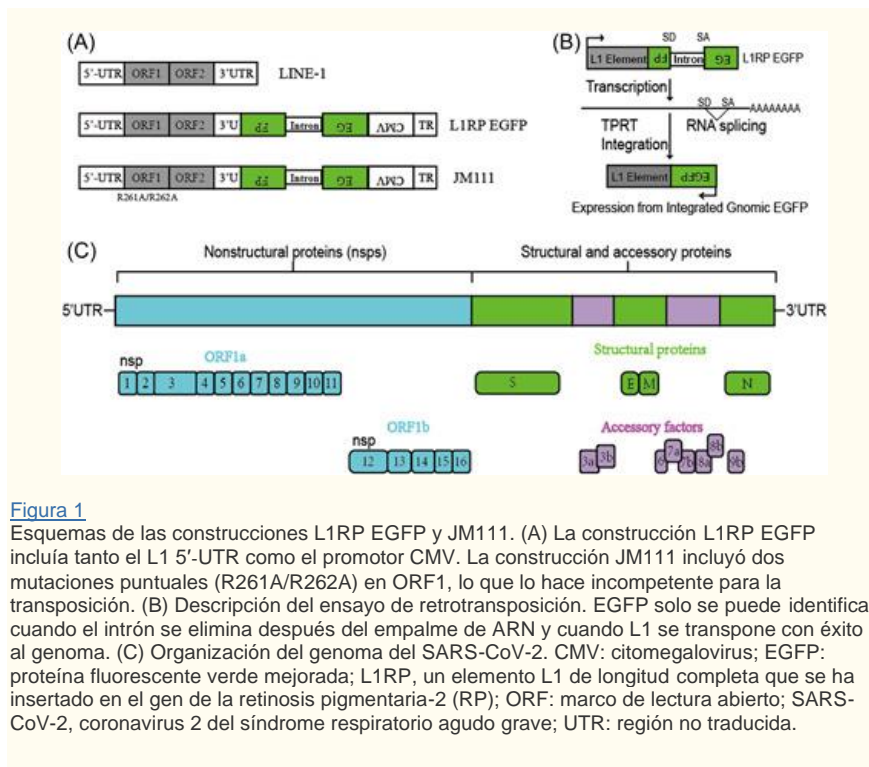
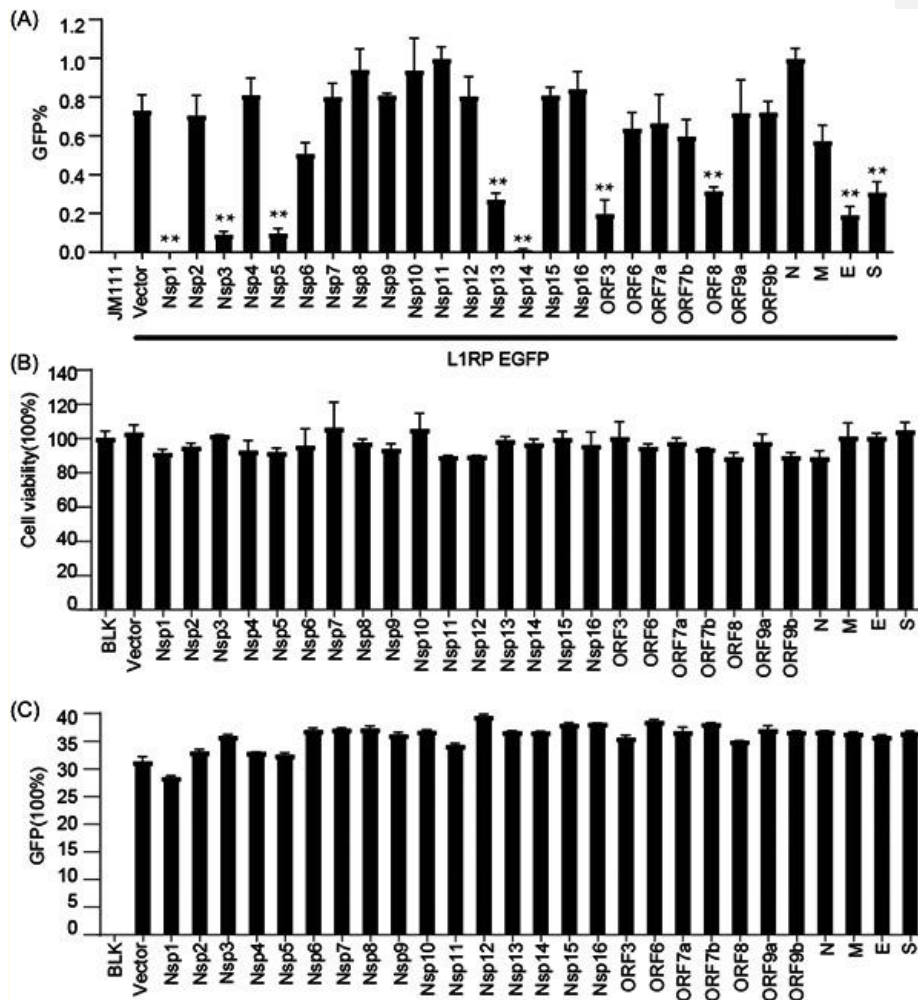


Figura 1

Esquemas de las construcciones L1RP EGFP y JM111. (A) La construcción L1RP EGFP incluía tanto el L1 5'-UTR como el promotor CMV. La construcción JM111 incluyó dos mutaciones puntuales (R261A/R262A) en ORF1, lo que lo hace incompetente para la transposición. (B) Descripción del ensayo de retrotransposición. EGFP solo se puede identificar cuando el intrón se elimina después del empalme de ARN y cuando L1 se transpone con éxito al genoma. (C) Organización del genoma del SARS-CoV-2. CMV: citomegalovirus; EGFP: proteína fluorescente verde mejorada; L1RP, un elemento L1 de longitud completa que se ha insertado en el gen de la retinosis pigmentaria-2 (RP); ORF: marco de lectura abierto; SARS-CoV-2, coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave; UTR: región no traducida.



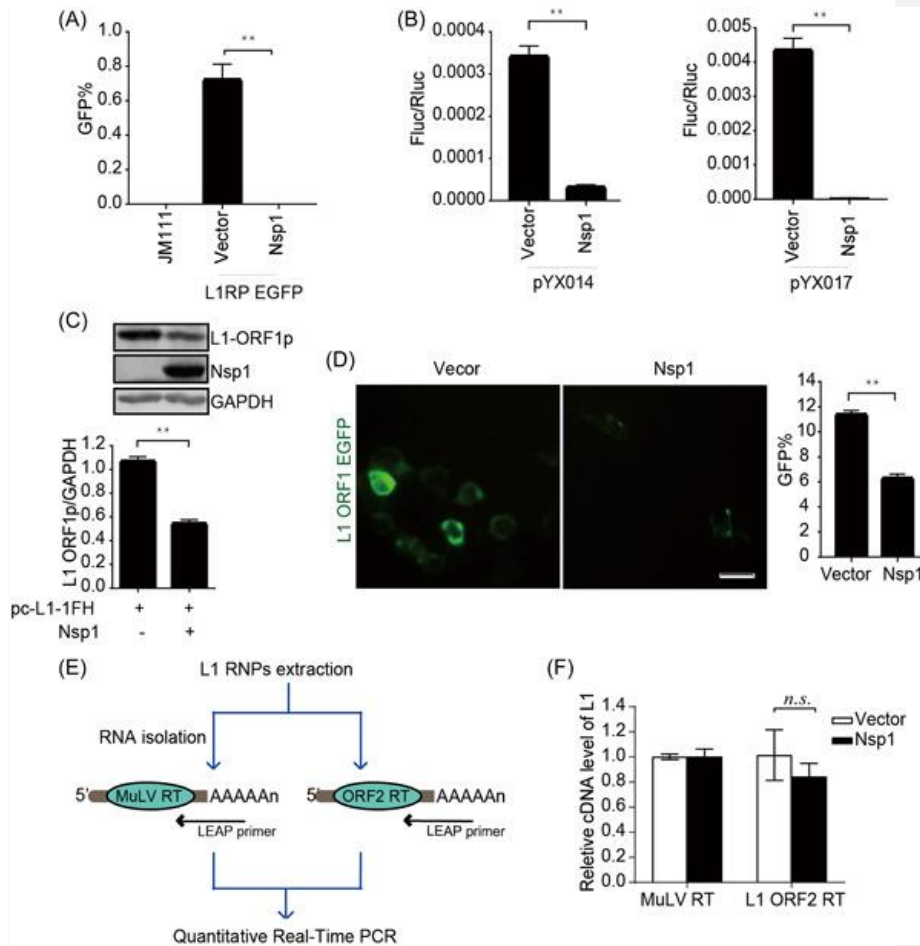
**Figura 2**

Las proteínas codificadas por SARS-CoV-2 disminuyen la frecuencia de retrotransposición L1. (A) Los vectores vacíos o los plásmidos que expresan proteínas del SARS-CoV-2 (50 ng) se cotransfectaron en células HEK293T junto con plásmidos L1RP EGFP (1 µg), y el número de células positivas para EGFP se determinó a los 4 días después de la transfección mediante citometría de flujo. JM111 se utilizó como control negativo para el gating por citometría de flujo. La barra representa la eficiencia de retrotransposición. Los experimentos se realizaron por triplicado, y cada barra de error indica la desviación estándar de tres réplicas para un experimento. \*\* $p < 0,01$ , Prueba de Student. (B) Las células HEK293T pretransfectadas con vectores vacíos o construcciones que expresan proteínas del SARS-CoV-2 se sembraron en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante 4 días, seguidas de tinción MTS y medición de la absorbancia. La barra representa la viabilidad celular. La muestra tratada con control se fijó en 100%. (C) los plásmidos pcDNA3.1-EGFP y los plásmidos expresadores de proteínas vectores vacíos/SARS-CoV-2 se cotransfectaron en células HEK293T, y el número de células positivas para EGFP se determinó a los 4 días después de la transfección mediante citometría de flujo. La barra representa el porcentaje de células GFP-positivas. EGFP: proteína fluorescente verde mejorada; L1RP, un elemento L1 de longitud completa que se ha insertado en el gen de la

retinosis pigmentaria-2 (RP); MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-5-(3-carboximetoxifenil)-2-2-(4-sulfofenil)-2-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio; SARS-CoV-2, coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave.

### 3.2. El SARS-CoV-2 Nsp1 modula la actividad L1 inhibiendo la expresión de L1

Luego investigamos los posibles mecanismos de inhibición de L1 por la proteína viral Nsp1 mediante el uso de constructos reporteros L1 basados en luciferasa (pYX014 y pYX017)<sup>30,31</sup> para confirmar el efecto inhibitorio de Nsp1 sobre la actividad de L1. Los plásmidos pYX014 y pYX017 contienen luciferasa luciérnaga, que sirve como indicador de retrotransposición L1, y *Renilla* luciferasa, que se utilizó para la normalización. El plásmido pYX014 incluye L1RP de longitud completa, mientras que el plásmido pYX017 contiene un promotor más fuerte al reemplazar el L1 5'-UTR con CAG. <sup>30,31</sup> Similar a los resultados del reportero del EGFP (Figura 3A), los resultados del reportero de luciferasa mostraron que la movilidad L1 disminuyó en Nsp1 (Figura 3B). Además, el ensayo de inmunoblot y las imágenes de células vivas indicaron una regulación a la baja doble de los niveles de proteína ORF1p por Nsp1 en comparación con los del control (Figura 3C,D). Luego realizamos un ensayo LEAP<sup>34</sup> para evaluar la actividad de transcripción inversa de ORF2p en el complejo L1 RNP (Figura 3e). Encontramos que Nsp1 no disminuyó la actividad de la RTasa L1 ORF2p (Figura 3F). Estos hallazgos sugirieron que el SARS-CoV-2 Nsp1 suprime la movilidad L1 al dirigirse a la expresión L1.



**Figura 3**

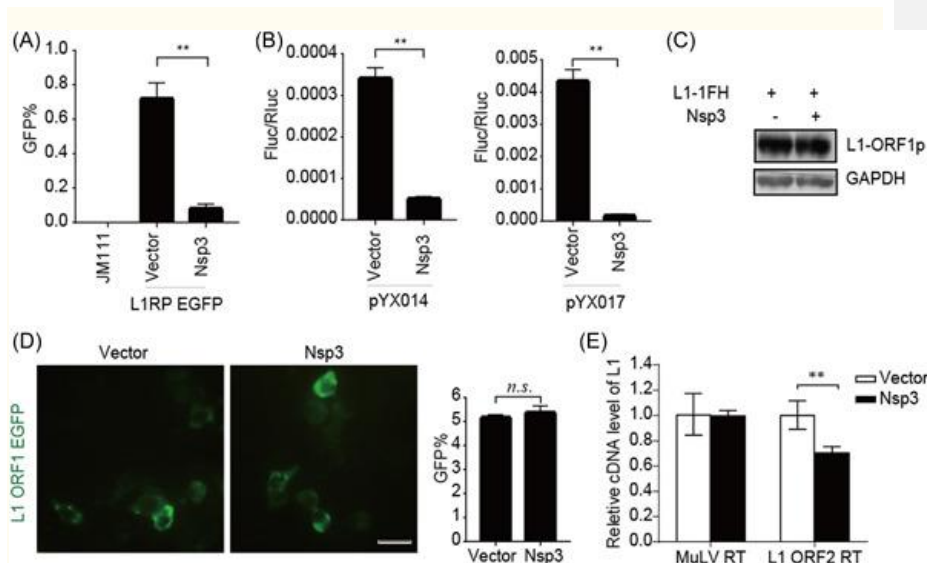
SARS-CoV-2 Nsp1 modula la movilidad L1 inhibiendo la expresión de L1. (A) Los plásmidos L1RP EGFP junto con vectores vacíos/construcciones que expresan SARS-CoV-2 Nsp1 se transfectoron en células HEK293T, seguidas de citometría de flujo realizada a los 4 días posteriores a la transfección. JM111 se utilizó como control negativo. El gráfico de barras muestra el porcentaje de células GFP positivas. \*\* $p < 0,01$ . (B) Los vectores vacíos o las construcciones que expresan Nsp1 del SARS-CoV-2 se cotransfectaron junto con pYX014/pYX017 en células HEK293T, seguidas de ensayos de luciferasa dual a los 4 días posteriores a la transfección. El gráfico de barras de la relación luciferasa Firefly:Renilla representa la frecuencia de retrotransposición. \*\* $p < 0,01$ . (C) Los vectores vacíos/plásmidos que expresan SARS-CoV-2 Nsp1 junto con pc-L1-1FH se cotransfectaron en células HEK293T, seguido de un análisis de Western blot a las 48 h después de la transfección. \*\* $p < 0,01$ . (D) Las células HEK293T se transfectoron con plásmidos que expresan pEGFP-N1-ORF1-EGFP y vectores vacíos/SARS-CoV-2 Nsp1, seguidos de imágenes de células vivas a las 48 h después de la transfección (barra de escala, 20  $\mu$ m). El gráfico de barras representa el porcentaje de células GFP positivas según los resultados de la citometría de flujo. \*\* $p < 0,01$ . (E) Descripción del ensayo LEAP. Las células HEK293T se transfectoron con pc-L1-1FH, y los complejos L1 RNP se ultracentrifugaron, se extrajo ARNm L1 y el ADNc L1 se transcribió inversamente mediante MuLV y ORF2p, respectivamente, seguido de una



reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR). (F) Ensayo LEAP, seguido de la cuantificación de los productos por qRT-PCR. El gráfico de barras de los niveles relativos de ADNc de L1 representa la eficiencia de transcripción inversa de ORF2p o MuLV. El nivel relativo de ADNc de la transcripción inversa de MuLV se estableció en 1.0. ADNc: ADN complementario; EGFP: proteína fluorescente verde mejorada; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; LEAP, protocolo de amplificación de elementos L1; L1RP, un elemento L1 de longitud completa que se ha insertado en el gen de la retinosis pigmentaria-2 (RP); ARNm: ARN mensajero; Nsp: proteína no estructural; *n.s.*, no significativo; ORF: marco de lectura abierto; RNP: ribonucleoproteína; SARS-CoV-2, coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave.

### 3.3. El SARS-CoV-2 Nsp3 restringe la actividad de transcripción inversa de L1 ORF2p

Confirmamos la disminución de la actividad L1 inducida por Nsp3 utilizando ensayos reporteros basados en EGFP y luciferasa (Figura 4A, B). Los resultados mostraron que Nsp3 no disminuyó la expresión de L1 ORF1p de acuerdo con los datos repetidos de inmunoblot (Figura 4C), y las imágenes de células vivas indicaron que la sobreexpresión de Nsp3 no amortiguó la agregación de L1 ORF1p en el citoplasma (Figura 4D). Sin embargo, la presencia de Nsp3 restringió significativamente la actividad RTasa de L1 ORF2p en L1 RNPs (Figura 4E). **Estos resultados mostraron que el SARS-CoV-2 Nsp3 restringe la retrotransposición L1 al dirigirse al paso de transcripción inversa.**



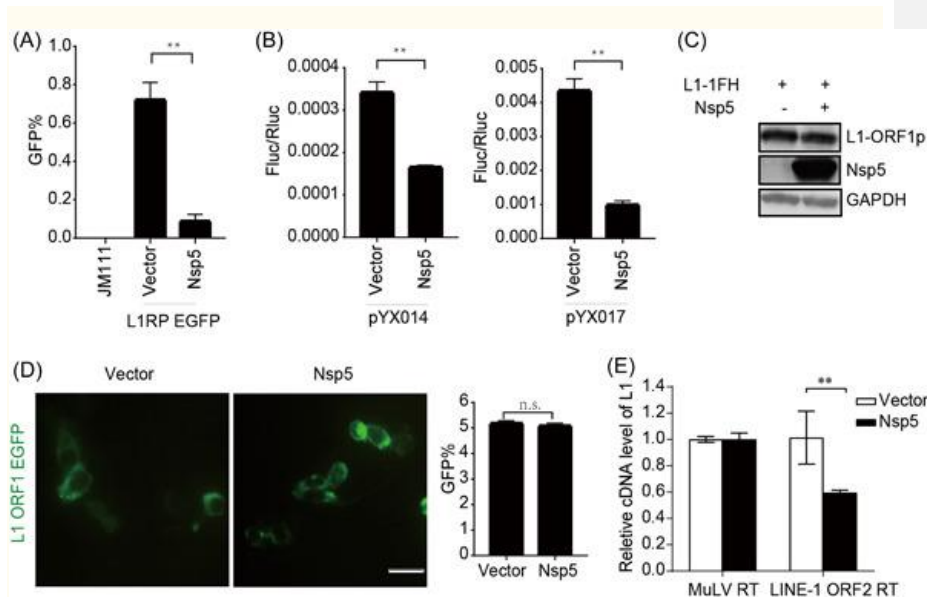
**Figura 4**

SARS-CoV-2 Nsp3 restringe la movilidad L1 de una manera dependiente de ORF2p. (A) Los plásmidos L1RP EGFP y los vectores vacíos/SARS-CoV-2 Nsp3- expresan constructos se transfirieron en células HEK293T, con JM111 utilizado como control negativo, y la citometría de flujo se realizó a los 4 días después de la transfección. El gráfico de barras muestra el porcentaje de células GFP positivas.  $**p < 0,01$ . (B) Los constructos vectoriales vacíos o que expresan SARS-CoV-2 Nsp3 se cotransfectaron junto con los constructos reporteros pYX014/pYX017 en células HEK293T, seguidos de ensayos de doble luciferasa realizados a los 4 días posteriores a la transfección. El gráfico de barras representa la frecuencia de retrotransposición.  $**p < 0,01$ . (C) Las células HEK293T se cotransfectaron con vectores vacíos/SARS-CoV-2 Nsp3 y pc-L1-1FH, después de lo cual se recolectaron células a las 48-h

después de la transfección, y se utilizaron anticuerpos anti-HA en un ensayo de inmunoblot. (D) Las células HEK293T se transfectaron con pEGFP-N1-ORF1-EGFP y vectores vacíos/construcciones que expresan SARS-CoV-2 Nsp3, seguidas de imágenes de células vivas realizadas a las 48 h después de la transfección (barra de escala, 20 mm). El gráfico de barras representa el porcentaje de células GFP positivas según la citometría de flujo. (E) Ensayos LEAP, seguidos de análisis de MuLV RTasa y productos LEAP por qRT-PCR. El gráfico de barras del nivel relativo de ADNc de L1 representa la eficiencia de transcripción inversa del L1 ORF2p o MuLV. El nivel relativo de ADNc de la transcripción inversa de MuLV se estableció en 1.0.  $**p < 0,01$ . ADNc, ADN complementario; EGFP: proteína fluorescente verde mejorada; LEAP, protocolo de amplificación de elementos L1; L1RP, un elemento L1 de longitud completa que se ha insertado en el gen de la retinosis pigmentaria-2 (RP); Nsp: proteína no estructural; ORF: marco de lectura abierto; *n.s.*, no significativo; SARS-CoV-2, coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave.

#### 3.4. El SARS-CoV-2 Nsp5 restringe la actividad de transcripción inversa de L1 ORF2p

Tanto los ensayos basados en EGFP como los basados en luciferasa revelaron además que Nsp5 deterioró robustamente la movilidad L1 (Figura 5A, B), aunque la presencia de Nsp5 no redujo la expresión de L1 ORF1p (Figura 5C) ni afectó la localización subcelular de ORF1p (Figura 5D). Sin embargo, Nsp5 disminuyó específicamente la actividad RTasa de L1 ORF2p de acuerdo con los resultados del ensayo LEAP (Figura 5E). Estos hallazgos sugirieron que la inhibición de L1 por Nsp5 implica un paso de transcripción inversa durante la transposición de L1.



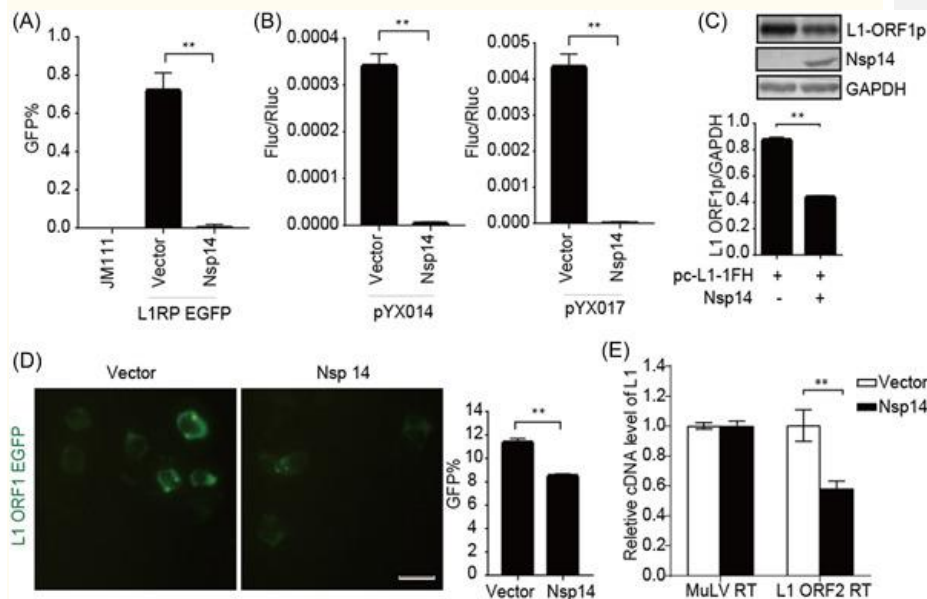
**Figura 5**

SARS-CoV-2 Nsp5 restringe la movilidad L1 de una manera dependiente de ORF2p. (A) Los plásmidos L1RP EGFP y los vectores vacíos/construcciones que expresan SARS-CoV-2 Nsp5 se transfectaron en células HEK293T, seguidas de citometría de flujo a los 4 días posteriores a la transfección. JM111 se utilizó como control de compuerta negativo. El gráfico de barras indica el porcentaje de células GFP positivas.  $**p < 0,01$ . (B) Los vectores vacíos o las construcciones que expresan SARS-CoV-2 Nsp5 se cotransfectaron con el reportero pYX014/pYX017 en células HEK293T, seguidas de ensayos de doble luciferasa realizados a

los 4 días posteriores a la transfección. El gráfico de barras de la relación luciferasa Firefly:Renilla representa la frecuencia de retrotransposición.  $**p < 0,01$ . (C) Los vectores vacíos o los plásmidos que expresan SARS-CoV-2 Nsp5 se cotransfectaron con pc-L1-1FH en células, seguido de análisis de inmunoblot a las 48 h después de la transfección. (D) Las células HEK293T se transfectaron con plásmidos que expresan pEGFP-N1-ORF1-EGFP y vectores vacíos/SARS-CoV-2 Nsp5, seguidos de imágenes de células vivas realizadas a las 48 h después de la transfección (barra de escala, 20 mm). El gráfico de barras representa el porcentaje de células GFP positivas según la citometría de flujo. (E) Ensayos LEAP, seguidos de análisis de MuLV RTasa y productos LEAP por qRT-PCR. El gráfico de barras del nivel relativo de ADNc de L1 representa la eficiencia de transcripción inversa del L1 ORF2p o MuLV. El nivel relativo de ADNc de la transcripción inversa de MuLV se estableció en 1.0.  $**p < 0,01$ . ADNc, ADN complementario; EGFP: proteína fluorescente verde mejorada; LEAP, protocolo de amplificación de elementos L1; L1RP, un elemento L1 de longitud completa que se ha insertado en el gen de la retinosis pigmentaria-2 (RP); Nsp: proteína no estructural; *n.s.*, no significativo; ORF: marco de lectura abierto; SARS-CoV-2, coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave.

### 3.5. El SARS-CoV-2 Nsp14 suprime la retrotransposición L1

Luego identificamos el SARS-CoV-2 Nsp14 como un supresor viral de la actividad de retrotransposición L1 utilizando ambos ensayos de reporteros (Figura 6A, B). La sobreexpresión de Nsp14 causó una disminución de aproximadamente dos veces en los niveles de L1 ORF1p (Figura 6C), que fue confirmada por imágenes de células vivas (Figura 6D). Además, Nsp14 restringió la actividad de transcripción inversa de L1 ORF2p en RNP L1 (Figura 6E). Los datos sugirieron que el SARS-CoV-2 Nsp14 afecta tanto la expresión de L1 como la actividad de la RTasa RNP L1.



**Figura 6**

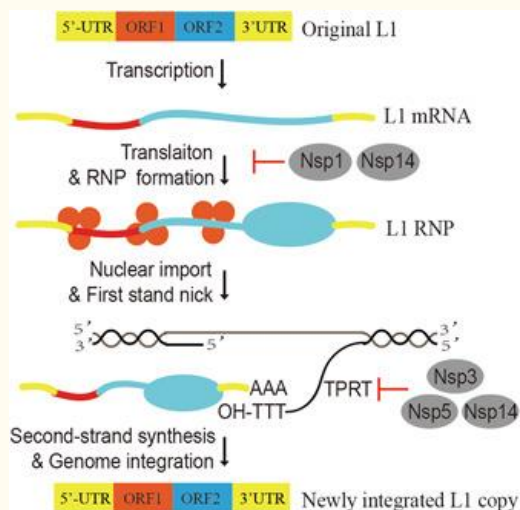
El SARS-CoV-2 Nsp14 inhibe la movilidad L1 al inhibir la expresión de L1. (A) Los plásmidos L1RP EGFP y los vectores vacíos/construcciones que expresan SARS-CoV-2 Nsp14 se transfectaron en células HEK293T, con JM111 utilizado como control negativo, seguido de

citometría de flujo a los 4 días después de la transfección. El gráfico de barras muestra el porcentaje de células GFP positivas.  $**p < 0,01$ . (B) Los vectores vacíos o las construcciones que expresan SARS-CoV-2 Nsp14 se cotransfectaron con el reportero pYX014/pYX017 en células HEK293T, seguidas de ensayos de doble luciferasa a los 4 días posteriores a la transfección. La relación luciferasa Firefly:*Renilla* representa la frecuencia de retrotransposición.  $**p < 0,01$ . (C) Los vectores vacíos o los plásmidos que expresan SARS-CoV-2 Nsp14 se cotransfectaron con pc-L1-1FH en células, seguidos de ensayos de inmunotransferencia a las 48 h después de la transfección.  $**p < 0,01$ . (D) Las células HEK293T se transfectaron con plásmidos que expresan pEGFP-N1-ORF1-EGFP y vectores vacíos/SARS-CoV-2 Nsp14, seguidos de imágenes de células vivas realizadas a las 48 h después de la transfección (barra de escala, 20 mm). El porcentaje de células GFP positivas se presenta en el gráfico de barras de acuerdo con los resultados de la citometría de flujo.  $**p < 0,01$ . (E) Ensayos LEAP, seguidos de análisis de MuLV RTasa y productos LEAP por qRT-PCR. El gráfico de barras del nivel relativo de ADNc de L1 representa la eficiencia de transcripción inversa del L1 ORF2p o MuLV. El nivel relativo de ADNc de la transcripción inversa de MuLV se estableció en 1.0.  $**p < 0,01$ . ADNc, ADN complementario; EGFP: proteína fluorescente verde mejorada; LEAP, protocolo de amplificación de elementos L1; L1RP, un elemento L1 de longitud completa que se ha insertado en el gen de la retinosis pigmentaria-2 (RP); Nsp: proteína no estructural; ORF: marco de lectura abierto; SARS-CoV-2, coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave.

[Vete a:](#)

#### 4. DISCUSIÓN

**L1 es un retroelemento oncogénico que se silencia temprano en el desarrollo a través de mecanismos epigenéticos estrechamente controlados. <sup>13</sup> Debido a las funciones críticas de L1 en la variabilidad genética y la activación inmune, su actividad de transposición está estrictamente modulada durante la infección por virus. <sup>23</sup> En este estudio, revelamos que los inhibidores codificados por SARS-CoV-2-2 Nsp1, Nsp3, Nsp5 y Nsp14 limitan la actividad L1 a través de varios componentes específicos de L1 (Figura 7). Nuestros resultados agregan una pieza más de evidencia para apoyar la relación de la carrera armamentista entre el virus y los retroelementos del huésped. <sup>35</sup>**



#### Figura 7

Diagrama que describe el mecanismo de supresión mediada por SARS-CoV-2 de la transposición L1 por Nsp1, Nsp3, Nsp5 y Nsp14. La movilización de los elementos L1 de longitud completa implica el 5'-UTR, dos ORFs (ORF1 y ORF2) y el 3'-UTR de acuerdo con los siguientes pasos. L1 se transcribe y traduce en ORF1p y ORF2p, y las proteínas funcionales interactúan con su propio ARNm para formar el complejo RNP. L1 ORF1p es una proteína de unión al ARN que ayuda a la translocación de L1 RNP del citoplasma al núcleo, mientras que ORF2p realiza actividades de endonucleasa (EN) y RTasa. Tras la translocación nuclear L1 RNP, ORF2p ejerce su actividad EN para cortar una cadena de ADN en el sitio objetivo para generar el grupo hidroxilo 3'. Esto es seguido por TPRT mediado por ORF2p que implica la transcripción inversa del ARN L1 utilizando el grupo hidroxilo 3' como cebador, lo que resulta en la inserción de L1 en el genoma. ARNm: ARN mensajero; Nsp: proteína no estructural; ORF: marco de lectura abierto; RNP: ribonucleoproteína; SARS-CoV-2, coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo grave; UTR: región no traducida.

**Nsp1 del SARS-CoV-2 exhibe una función biológica que suprime la expresión génica del huésped a través de la asociación ribosómica, lo que resulta en el cierre de la traducción del ARNm y el bloqueo de la respuesta inmune del huésped. [36](#) El SARS-CoV-2 elude el bloqueo traslacional del huésped para producir sus propias proteínas a través de un mecanismo integral que implica interacciones entre el dominio Nsp1-C-terminal-40S y el dominio Nsp1-N-terminal-5'-UTR. [37](#) Nsp14 contiene dominios 3'-5'-exoribonucleasa y guanina-N7-metiltransferasa. [38](#) Un experimento de reconstitución in vitro de la tapa de ARNm del SARS-CoV reveló que la metilación de la tapa del ARNm viral requiere Nsp10, Nsp14 y Nsp16, donde Nsp14 actúa como un iniciador esencial de la secuencia obligada de eventos de metilación. [39](#) Por lo tanto, el virus secuestra la maquinaria de traslación de las células que les permite sobrevivir a través de las funciones de las proteínas virales, incluidas Nsp1 y Nsp14. [36](#) En este estudio, la sobreexpresión de Nsp1 o Nsp14 disminuyó los niveles de L1 ORF1p, lo que sugiere que el SARS-CoV-2 Nsp1 y Nsp14 pueden inhibir la movilidad L1 a través del bloqueo traslacional del ARNm L1 para completar la replicación viral. Curiosamente, Nsp14 también disminuyó la actividad de RTasa de L1 RNP en comparación con Nsp1. Sin embargo, los mecanismos detallados de la inhibición de la RTasa L1 por Nsp14 aún no se han caracterizado.**

**Comentado [MI1]:** El secuestro de los ribosomas, para la replicación viral, se lleva a cabo por medio de la alteración del DECAIMIENTO DE ARNM SIN DETENCION, este mecanismo elimina el ARNM FORANE O DEFECTUOSO. [Se descubre un nuevo mecanismo que ataca y destruye al ARN defectuoso | HHMI](#)

Al igual que otros virus de ARN, el SARS-CoV-2 codifica poliproteínas que contienen Nsps que luego son procesadas por proteasas virales. [40](#) SARS-CoV-2 Nsp3 y Nsp5, ambas proteasas virales, son responsables de escindir las poliproteínas virales. [41](#), [42](#) Nsp3, la proteína multidominio más grande codificada por el ARN del SARS-CoV-2, contiene una proteasa similar a la papaína, [43](#) y Nsp5 contiene una proteasa de cisteína similar a la quimotripsina, 3CLpro. [3](#) Nsp3 y Nsp5 junto con otras proteínas no estructurales codificadas por SARS-CoV-2 facilitan la replicación del virus al ensamblar el complejo de replicación y transcripción. [44](#) El virus también induce la reorganización de las membranas de la célula huésped en vesículas de doble membrana o membranas enrevesadas para organizar la replicación viral. [45](#) Además, tanto Nsp3 como Nsp5 se detectan en las membranas enrevesadas, lo que indica una replicación asociada a la membrana. [45](#) Nsp3 y Nsp5 no afectaron la expresión o localización subcelular de L1 ORF1p, pero disminuyeron la actividad de transcripción inversa de L1 ORF2p según los resultados del ensayo LEAP en el presente estudio. Por lo tanto, especulamos que Nsp3 y Nsp5 interrumpen la función de L1 ORF2p para mantener un microambiente óptimo para la síntesis de ARN viral. Sin embargo, debido a que no fue posible obtener un anticuerpo efectivo contra L1 ORF2p, la posible interacción entre las proteínas virales y L1 ORF2p debe investigarse en estudios futuros. La relación entre las proteínas virales (Nsp3 y Nsp5) y la actividad L1 ORF2p aún no se ha aclarado.

Estudios recientes han revelado que la regulación positiva de la expresión de elementos transponibles es común en las células infectadas por virus, que puede desencadenarse por el estrés celular inducido por la infección por virus y al mejorar la desmetilación global del ADN. [21](#) , [46](#) En contraste, encontramos que las proteínas codificadas por SARS-CoV-2 suprimen potentemente la retrotransposición L1 cuando se coexpresan en las células. Esta discrepancia puede deberse a diferencias técnicas y diferentes estrategias experimentales. Los estudios previos que analizaron el transcriptoma de células infectadas por virus se basaron principalmente en conjuntos de datos de secuenciación de próxima generación; solo mostraron el estado general de la influencia de la infección por SARS-CoV-2 en la transposición de TE. Nuestros estudios utilizaron ensayos in vitro para confirmar la actividad de inhibición L1 de una sola proteína viral codificada por SARS-CoV-2, sin infección viral. En combinación, estos resultados sugieren que hubo resistencia viral a la activación extraordinaria de la ET. La transposición estricta, aunque puede no ser completamente exitosa, permitió la replicación y transmisión del virus, incluso a niveles aceptables. Marston et al. [47](#) informaron que la infección por SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 condujo a una regulación positiva o negativa de la transcripción de TE en diferentes muestras de tejido, lo que implica una relación compleja entre el SARS-CoV-2 y los transposones que requiere más investigación.

La transposición de L1 es una causa importante de inestabilidad del genoma del huésped, que puede influir en la expresión génica intracelular de los cofactores virales y el microambiente del huésped para la replicación del virus. Además, la evidencia acumulada implica que los transposones L1 son nuevos activadores inmunes innatos del huésped, y el ácido nucleico derivado de la transposición L1 puede ser detectado por la vía cGAS-STING o RLR para estimular las defensas antivirales del huésped. [48](#) Por lo tanto, especulamos que la expresión elevada de retrotransposones tras la infección por virus es una respuesta de defensa del huésped, mientras que el SARS-CoV-2 codifica diversas proteínas para controlar la movilidad L1 para evadir la activación inmune sobrecargada.

Las células humanas han desarrollado una serie de reguladores que coexisten con los transposones. Especialmente, muchos factores antivirales, incluidas las proteínas similares a polipéptidos catalíticos de la enzima de edición de ARNm de la apolipoproteína B, las proteínas antivirales de dedo de zinc, la exonucleasa 1 de tres primos y SAMHD1, ejercen potentes efectos inhibitorios sobre los retroelementos L1. **11 Para infectar con éxito las células huésped, los virus utilizan diversas estrategias para contrarrestar los factores antivirales del huésped. Sin embargo, la eliminación de estos factores antivirales tras la infección por el virus podría contribuir a una mayor movilidad L1. Los estudios acumulados han informado que varios virus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis C (VHC) y los enterovirus, codifican inhibidores virales de L1, generando una red compleja para controlar la transposición de L1. [30](#) , [49](#) , [50](#) VIH Vpr disminuye la tasa de transposición de L1 de una manera dependiente del ciclo celular. Además, Vpr puede unirse a L1 ORF2p, inhibiendo posteriormente su actividad RTasa. [30](#) Un estudio reciente también mostró que la infección por VHC produce una disminución de la actividad de L1 a través de la redistribución de L1 ORF1p a sitios de ensamblaje del VHC en gotas de lípidos. [49](#) Además, recientemente encontramos que la infección con diferentes enterovirus conduce a la supresión de la movilidad L1 debido a los efectos sinérgicos de diversas proteínas accesorias virales. [50](#) En este documento, demostramos que el virus emergente SARS-CoV-2 ha adquirido la capacidad de interferir con la actividad de L1, lo que también implica que otros coronavirus tienen características potencialmente inhibitorias de L1. Los estudios futuros deben centrarse en las funciones de la inhibición de L1 durante la infección por coronavirus.**

**La carrera armamentista entre diferentes virus y transposones huéspedes apoya la supresión no despreciable de la actividad L1 durante la transmisión viral. Es importante caracterizar la infectividad alterada de los**

**virus de ARN en células que han integrado secuencias genéticas virales. 17, 20, 35 Si esta inserción críptica de ADNc viral es una estrategia viral para la infección y transmisión persistentes o una introducción de "memoria" inmunológica similar a CRISPR para proporcionar a las células huésped una huella molecular de los virus que las infectan sigue abierto a discusión y debe abordarse con urgencia.**

[Vete a:](#)

#### CONTRIBUCIONES DEL AUTOR

---

Weí Wei concibió y diseñó los experimentos; Yan Li, Jiixin Yang y Siyu Shen participaron en múltiples experimentos; Yan Li, Jiixin Yang, Siyu Shen, Wei Wang, Nian Liu, Haoran Guo y Wei Wei analizaron los datos; Yan Li y Wei Wei escribieron el manuscrito con la ayuda de todos los autores.

[Vete a:](#)

#### CONFLICTO DE INTERESES

---

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

[Vete a:](#)

#### RECONOCIMIENTOS

---

Agradecemos a Yuanyuan Li y Guoqiang Zhou por su asistencia técnica. Agradecemos al Dr. Kazazian HH Jr, al Dr. John L Goodier, al Dr. Pei-Hui Wang y al Dr. Wenfeng An por sus reactivos críticos. Este estudio fue apoyado por la Fundación Nacional de Ciencias Naturales de China (32222005 y 82172246), el Proyecto Nacional Principal para el Control y la Prevención de Enfermedades Infecciosas (2018ZX10731-101-001-016), el Departamento de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Jilin (No. 20190304033YY y 20180101127JC), el Proyecto Abierto de Laboratorio Clave de Regeneración y Trasplante de Órganos, Ministerio de Educación, el Programa para el Equipo de Investigación Innovadora de Ciencia y Tecnología de JLU (2017TD-08) y los Fondos de Investigación Fundamental para las Universidades Centrales.

[Vete a:](#)

#### Notas

---

Li Y, Yang J, Shen S, et al. Inhibidores codificados por SARS-CoV-2-2 de la retrotransposición humana de LINE-1. *J Med Virol* 2022;1-11. 10.1002/jmv.28135 [[Artículo libre PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)]

Yan Li y Jiixin Yang contribuyeron igualmente a este estudio.

[Vete a:](#)

## Información del colaborador

---

Haoran Guo, correo electrónico: [moc.361@046513gnehs](mailto:moc.361@046513gnehs).

Wei Wei, correo electrónico: [nc.ude.ulj@6ieww](mailto:nc.ude.ulj@6ieww).

[Vete a:](#)

## DECLARACIÓN DE DISPONIBILIDAD DE DATOS

---

Los datos que apoyan los hallazgos de este estudio están disponibles en el material complementario de este artículo. Todos los datos relevantes están dentro del manuscrito y sus archivos de información de apoyo.

[Vete a:](#)

## REFERENCIAS

---

1. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpretación de pruebas diagnósticas para SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020;323(22):2249-2251. [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
2. V'Kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(3):155-170. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA. La virología molecular de los coronavirus. *J Biol Chem*. 2020;295(37):12910-12934. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Scott A, Schmeckpeper BJ, Abdelrazik M, et al. Origen de los elementos L1 humanos: genes progenitores propuestos deducidos de una secuencia de ADN de consenso. *Genómica*. 1987;1(2):113-125. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. Retrotransposones no LTR de mamíferos: para bien o para mal, en la enfermedad y en la salud. *Genoma Res*. 2008;18(3):343-358. [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
6. Kopera HC, Flasch DA, Nakamura M, Miyoshi T, Doucet AJ, Moran JV. LEAP: Protocolo de amplificación de elementos L1. *Métodos Mol Biol*. 2016;1400:339-355. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Mita P, Wudzinska A, Sun W, et al. LINE-1 localización de proteínas y dinámica funcional durante el ciclo celular. *eLife*. 2018;7:e30058. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Freeman BT, Sokolowski M, Roy-Engel AM, Smither ME, Belancio VP. Identificación de aminoácidos cargados necesarios para la localización nuclear de la proteína humana L1 ORF1. *ADN de la mafia*. 2019;10:20. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Macia A, Widmann TJ, Heras SR, et al. Retrotransposición LINE-1 diseñada en neuronas humanas no divisorias. *Genoma Res*. 2017;27(3):335-348. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Suzuki J, Yamaguchi K, Kajikawa M, et al. Evidencia genética de que la vía de reparación no homóloga de unión de extremos está involucrada en la retrotransposición de LINE. *PLoS Genet*. 2009;5(4):e1000461. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]



11. Goodier JL. Restricción de retrotransposones: una revisión. *ADN de la mafia*. 2016;7:16. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Brook Brouha JS, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV, Kazazian HH, Jr. Los L1 calientes representan la mayor parte de la retrotransposición en la población humana. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(9):5280-5285. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Cordaux R, Batzer MA. El impacto de los retrotransposones en la evolución del genoma humano. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):691-703. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Coufal N, Garcia-PerezPeng JL, Peng GE, et al. La ataxia telangiectasia mutada (ATM) modula la retrotransposición del elemento 1 (L1) intercalada larga en células madre neurales humanas. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(51):20382-20387. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Zhao K, Du J, Han X, et al. Modulación de la retrotransposición de LINE-1 y Alu/SVA por SAMHD1 relacionada con el síndrome de Aicardi-Goutieres. *Representante de Cell* 2013;4(6):1108-1115. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Volkman B, Wittmann S, Lagisquet J, et al. El TRIM5 $\alpha$  humano detecta y restringe los elementos LINE-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(30):17965-17976. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Geuking MB, Weber J, Dewannieux M, et al. La recombinación de retrotransposón y virus de ARN exógeno da como resultado la integración no retroviral del ADNc. *Ciencia*. 2009;323(5912):393-396. [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
18. Klenerman P, Hengartner H, Zinkernagel RM. Un virus de ARN no retroviral persiste en forma de ADN. *Naturaleza*. 1997;390(6657):298-301. [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
19. Shimizu A, Nakatani Y, Nakamura T, et al. Caracterización del ADN citoplasmático complementario a los virus de ARN no retroviral en células humanas. *Sci Rep*. 2014;4(1):5074. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Zhang L, Inmaculada Barrasa M, Hughes SH, Young RA, Jaenisch R, Richards A. El ARN del SARS-CoV-2 transcrito inversamente puede integrarse en el genoma de células humanas cultivadas y puede expresarse en tejidos derivados de pacientes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(21):e2105968118. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Yin Y, Liu XZ, He X, Zhou LQ. El coronavirus exógeno interactúa con la retrotransposón endógena en células humanas. *Las células frontales infectan microbiol*. 2021;11:609160. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Smits N, Rasmussen J, Bodea GO, et al. No hay evidencia de integración del genoma humano del SARS-CoV-2 encontrada por secuenciación de ADN de lectura larga. *Representante de Cell* 2021;36(7):109530. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Rookhuizen DC, Bonte P-E, Ye M. La inducción de la expresión de elementos transponibles es fundamental para la detección innata. *preimpresión bioRxiv*. 2021. 10.1101/2021.09.10.457789 [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
24. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, et al. La respuesta desequilibrada del huésped al SARS-CoV-2 impulsa el desarrollo de COVID-19. *Celda*. 2020;181(5):1036-1045. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Chu H, Chan JF-W, Wang Y, et al. Perfiles comparativos de replicación y activación inmune del SARS-CoV-2 y el SARS-CoV en pulmones humanos: un estudio ex vivo con implicaciones para la patogénesis de COVID-19. *Clin infectar dis*. 2020;71(6):1400-1409. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Ostertag EM, Luning Prak ET, DeBerardinis RJ, Moran JV, Kazazian HH Jr. Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Ácidos nucleicos res*. 2000;28(6):1418-1423. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

27. Moran JV, Holmes SE, Naas TP, et al. Retrotransposición de alta frecuencia en células de mamíferos cultivadas. *Celda*. 1996;87(5):917-927. [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
28. Goodier JL, Cheung LE, Kazazian HH, Jr. La helicasa de ARN MOV10 es un potente inhibidor de la retrotransposición en las células. *PLoS Genet*. 2012;8(10):E1002941. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH, Jr. La proteína LINE-1 ORF1 se localiza en gránulos de estrés con otras proteínas de unión al ARN, incluidos los componentes del complejo de silenciamiento inducido por ARN de interferencia de ARN. *Mol Cell Biol*. 2007;27(18):6469-6483. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Kawano K, Doucet AJ, Ueno M, et al. HIV-1 Vpr y p21 restringen la movilidad LINE-1. *Ácidos nucleicos res*. 2018;46(16):8454-8470. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Xie Y, Rosser JM, Thompson TL, Boeke JD, An W. Characterization of L1 retrotransposition with high-throughput dual-luciferase assays. *Ácidos nucleicos res*. 2011;39(3):e16. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Zhang J, Cruz-cosme R, Zhuang M-W, et al. Un estudio sistémico y molecular de la localización subcelular de las proteínas SARS-CoV-2. *Objetivo de transducción de señal ther*. 2020;5(1):269. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Liang W, Xu J, Yuan W, et al. APOBEC3DE inhibe la retrotransposición de LINE-1 al interactuar con ORF1p e influir en la actividad de la transcriptasa inversa de LINE. *PLoS One*. 2016;11(7):E0157220. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Kulpa DA, Moran JV. Actividad cis-preferencial de la transcriptasa inversa LINE-1 en partículas de ribonucleoproteína. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(7):655-660. [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]
35. Horie M, Honda T, Suzuki Y, et al. Elementos endógenos del virus de ARN no retroviral en genomas de mamíferos. *Naturaleza*. 2010;463(7277):84-87. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Thoms M, Buschauer R, Ameisemeier M, et al. Bases estructurales para el cierre traslacional y la evasión inmune por la proteína Nsp1 del SARS-CoV-2. *Ciencia*. 2020;369(6508):1249-1255. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
37. Shi M, Wang L, Fontana P, et al. SARS-CoV-2 Nsp1 suprime la traducción del huésped pero no viral a través de un mecanismo bipartito. *bioRxiv*. 2020. 10.1101/2020.09.18.302901 [[CrossRef](#)] [[Google Académico](#)]
38. Ogando NS, Zevenhoven-Dobbe JC, van der Meer Yvonne, Bredenbeek PJ, Posthuma CC, Snijder EJ. La actividad enzimática de la exoribonucleasa nsp14 es crítica para la replicación del MERS-CoV y el SARS-CoV-2. *J Virol*. 2021;94(23):E01246. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Bouvet M, Debarnot C, Imbert I, et al. Reconstitución in vitro de la metilación de la tapa del ARNm del SARS-Coronavirus. *PLoS Pathog*. 2010;6(4):e1000863. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Yoshimoto FK. Una perspectiva bioquímica de las proteínas no estructurales (NSP) y la proteína espiga del SARS CoV-2. *Proteína J*. 2021;40(3):260-295. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Moustaqil M, Ollivier E, Chiu H-P, et al. Las proteasas PLpro y 3CLpro de SARS-CoV-2 escinden IRF3 y moduladores críticos de las vías inflamatorias (NLRP12 y TAB1): implicaciones para la presentación de la enfermedad en todas las especies. *Los microbios Emerg infectan*. 2021;10(1):178-195. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Muramatsu T, Kim YT, Nishii W, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S. Autoprocessing mechanism of severe acute respiratory syndrome coronavirus 3C-like protease (SARS-CoV

3CLpro) from its polyproteins. *FEBS J.* 2013;280(9):2002-2013. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

43. Gallo A, Tsika AC, Fourkiotis NK, et al. (1)H,(13)C and (15)N chemical shift assignments of the SUD domains of SARS-CoV-2 non-structural protein 3c: "the N-terminal domain-SUD-N". *Asignaciones de RMN Biomol.* 2021;15(1):85-89. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

44. Yan L, Zhang Y, Ge J, et al. Arquitectura de un mini complejo de replicación y transcripción del SARS-CoV-2. *Nat Commun.* 2020;11(1):5874. [[Artículo gratuito de PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

45. Knoops K, Kikkert M, van den Worm SHE. La replicación del SARS-coronavirus está respaldada por una red reticulovesicular de retículo endoplásmico modificado. *PLoS Biol.* 2008; 6(9):E226. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

46. Macchietto MG, Langlois RA, Shen SS. Regulación positiva de la expresión de elementos transponibles inducida por virus en células huésped humanas y de ratón. *Life Sci Alliance.* 2020; 3(2):E201900536. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

47. Marston JL, Greenig M, Singh M, et al. La infección por SARS-CoV-2 media la expresión diferencial de los retrovirus endógenos humanos y los elementos nucleares intercalados durante mucho tiempo. *Visión de la JCI.* 2021; 6(24):E147170. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

48. Zhao K, Du J, Peng Y, et al. LINE1 contribuye a la autoinmunidad a través de vías de detección de ARN mediadas por RIG-I y MDA5. *J Autoimmun.* 2018; 90:105-115. [[PubMed](#)] [[Google Académico](#)]

49. Schobel A, Nguyen-Dinh V, Schumann GG, Herker E. Hepatitis C virus infection restricts human LINE-1 retrotransposition in hepatoma cells. *PLoS Pathog.* 2021; 17(4):E1009496. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

50. Li Y, Shen S, Guo H, et al. La infección por enterovirus restringe la retrotransposición del elemento 1 intercalado largo. *Microbiol frontal.* 2021; 12:706241. [[Artículo gratuito PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]