

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00050

L1-ORF2 不同片段对报告基因表达产生不同影响

段肖翠¹, 靳霞¹, 谢英¹, 焦宁², 刘静¹, 王晓燕¹, 吕占军¹

1. 河北医科大学实验动物学部遗传研究室, 河北省实验动物重点实验室, 石家庄 050017;
2. 河北医科大学第三医院制剂室, 石家庄 050051

摘要: 长散布重复序列-1(*Line-1*, *L1*)是重要的人类基因组成分, 完整的 *L1* 有 6 kb, 在基因组中存在的 *L1* 多数是不完整序列, 有必要研究 *L1* 片段对基因表达的调控作用。PCR 扩增 *L1* 第二读码框(*L1-ORF2*)不同位置的 280 bp 片段, 共 7 段, 同向 8 串联按正、反方向分别插入 pEGFP 质粒 *GFP* 基因下游, 观察插入序列对 *GFP* 报告基因表达的影响。构建的质粒瞬时转染 HeLa 细胞, 经荧光显微镜和 Northern 检测, 不同片段对转录量和终止影响不同。7 个片段正序对 *GFP* 报告基因的抑制均高于其反序, 在正序串联表达载体 p280-1*8 和 p280-9*8 的 *GFP* 基因转录量超过其他 280 正序插入片段, 在反序串联表达载体 p280-1*8as 和 p280-9*8as 的 *GFP* 基因转录量超过其他 280 反序片段。280-1*8、280-9*8、280-1*8as 和 280-9*8as 属于转录终止性序列。*Alu* 在基因组的多数区段与 *L1* 分布呈反比, *Alu* 正、反序均对 *GFP* 表达有抑制作用, 但反序抑制作用高于正序, *Alu* 正序属于转录延伸性序列。280 bp 片段反序插入的所有质粒荧光阳性细胞均高于正序插入质粒。经碱基分析, *L1-ORF2* 各段均存在 A 碱基含量多, T 碱基含量少的现象, 这可能是其正、反序对基因表达影响不同的原因。

关键词: *L1*; *Alu*; pEGFP-C1; ORF2; *GFP*

Different effects on reporter gene expression by distinct L1-ORF2 segments

DUAN Xiao-Cui¹, JIN Xia¹, XIE Ying¹, JIAO Ning², LIU Jing¹, WANG Xiao-Yan¹,
LU Zhan-Jun¹

1. Hebei Key Lab of Laboratory Animal, Department of Genetics, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;
2. Preparation Room of the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

Abstract: An intact *L1* define element is 6 kb in length in human genome. The majority of the *L1*s is truncated and has direction difference, implying that it is interesting to study the effects of different length and directions of *L1*s on gene. In this work, 7 different segments were obtained from *L1*-open reading frame 2 (ORF2), each of which was 280 bp in length. Each segment was connected into 8 repeats in head and tail tandem manner and was inserted to downstream of *GFP* gene in different directions in pEGFP-C1. The inserted ORF2 segments in the sense orientation caused much stronger inhibition on gene transcription and protein expression than antisense sequences did. Among all segments, the first and ninth 280 bp segments of ORF2 in both orientations induced weaker inhibition on gene transcription than other segments in the same orientations and did not induce transcriptional elongation. The distribution of *Alu* in most regions of genome was inverse ratio with *L1*. The inserted *Alus* in both orientations inhibited *GFP* gene expression, but the inhibition in antisense orientation was stronger than that in sense orientation and the sense *Alu* was the sequence of inducing transcription elongation. A-rich of ORF2 was probably the molecular basis of its sense orientation with stronger inhibition on gene expression.

Keywords: *L1*; *Alu*; pEGFP-C1; ORF2; *GFP*

收稿日期: 2008-04-12; 修回日期: 2008-07-08

基金项目: 河北省自然科学基金项目(编号: C2008001065)资助

作者简介: 段肖翠(1979-), 女, 讲师, 硕士, 专业方向: 遗传育种。Tel: 0311-86266844; E-mail: duanduanxiatian@126.com

通讯作者: 吕占军(1952-), 男, 博士生导师, 研究方向: 衰老机理。E-mail: LSLAB@hebmu.edu.cn

在人类基因组中,主要的重复序列类型有长散布重复序列(Long interspersed nuclear elements, *LINEs*)和短散布重复序列(Short interspersed nuclear elements, *SINES*)。 *LINE1(L1)*是主要的 *LINEs* 序列,占人类基因组的 17%。 *Alu* 家族占人类基因组 10%,是主要 *SINEs* 成分。

重复序列是重要的非编码序列,在多细胞真核生物基因表达调节中起重要作用^[1]。 *L1* 重复序列和 *Alu* 重复序列在基因组中的分布不是随机的,与其生物学功能有关。容易失活的基因(如 X 染色体基因, B 细胞抗原受体基因, T 细胞抗原受体基因),染色体基因贫乏区域存在较多的 *L1* 序列^[2], *L1* 与基因表达调节,生物进化有关。 *Alu* 的特征与 *L1* 不同,在基因丰富区域和高表达的染色体中分布较多,在多数染色体区域 *Alu* 与 *L1* 呈负相关分布^[3]。

有报道 L1-ORF2(来自 *L1.2* 家族)插入报告基因下游可以下调 *GFP* 表达,而且正、反序列表现出明显差异性^[4]。完整的 *L1* 有 6 kb,但是在基因组中多数 *L1* 序列属于不完整的序列,而且在基因中的插入方向以反序插入为主,因此需要研究不同的 *L1* 片段对基因表达的影响。 *Alu* 的基因组学特征与 *L1* 不同,那么作为 *GFP* 的下游插入序列是否与 *L1* 显示差异,也值得探讨。本研究用 L1-ORF2 不同位置片段的串联序列和 *Alu* 串联序列对上述问题做了探讨。之所以使用串联序列是考虑短片段(280 bp)对基因表达的影响较小不易观察。

1 材料和方法

1.1 材料

RP11-29107 克隆引自英国 Wellcome Trust 实验室,氯霉素抵抗型,含有 *LIPA3(L1)* 亚家族和 *Alu* 序列。 pEGFP-C1 质粒、DH5 α 菌株和 HeLa 细胞均为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 构建 8 串联表达载体

PCR 扩增 RP11-29107 克隆 L1-ORF2 的不同片段,在引物上设计合适的酶切位点,根据 *Xba* 和 *Nhe* 酶切位点可以连接不能切断的特性,反复同向串联,构建出含有 ORF2 片段 8 同向重复串联的表达载体。正序名称为: p280-1*8(pEGFP-C1 质粒

GFP 基因下游插入 L1-ORF2 5' 端 280 bp 正向同向 8 串联体)、p280-2*8、p280-4*8、p280-5*8、p280-7*8、p280-8*8 和 p280-9*8;反序名称为: p280-1*8as、p280-2*8as、p280-4*8as、p280-5*8as、p280-7*8as、p280-8*8as 和 p280-9*8as。

PCR 扩增 RP11-29107 克隆上的 *Alu*,引物设计原则与串联同上,正、反表达载体分别称为 pAlu*8 和 pAlu*8as。构建 8 串联表达载体所使用的引物见表 1。

1.2.2 细胞转染

将 pEGFP-C1 和重组表达载体用 LipofectamineTM 2000 瞬时转染 HeLa 细胞,于 37℃、5%CO₂ 环境中培养 36 h,4%多聚甲醛固定。

1.2.3 荧光显微镜观察

荧光显微镜下观察计数 *GFP* 荧光阳性细胞数,白光下计数同样视野的细胞总数(每个样本至少 500 个),计算荧光阳性细胞百分率。在白光和荧光下分别对同一视野照相。

荧光细胞阳性率=荧光阳性细胞数/同样视野细胞总数 \times 100%。

1.2.4 Northern 杂交

GFP5F 和 *GFP6R* 作为引物, pEGFP-C1 作为模板, dNTP 中的 dCTP 用 α -³²P-dCTP 取代,配制 PCR 反应液,用 PCR 法制备 ³²P 标记的 *GFP* 探针。12 孔板培养的转染细胞用 Trizol(赛百盛公司, Beijing SBS Genetech Co.,Ltd.)提取总 RNA,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,毛细法将 RNA 转移到尼龙膜。50%甲酰胺-³²P 标记的 *GFP* 探针杂交、冲洗后放射自显影。*GFP* 探针杂交、放射自显影以后,尼龙膜用剥离液(50%甲酰胺-5%SDS-50 mmol/L Tris)80℃,1 h 处理两次,冲洗后用检测 neo (Neomycin resistance cassette) mRNA 的探针再次杂交,作为对照,neo mRNA 探针用 PCR 法制备,引物为 NeoF 和 NeoR,见表 1。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体构建

2.1.1 重组表达载体构建示意图

在 pEGFP-C1 质粒多克隆位点(MCS)插入 L1-ORF2 不同片段或 *Alu*(图 1)。图 1 显示串联重复

表达载体构建方法, 插入一个片段的表达载体用 *Hind* 和 *Xba* 酶切, 回收大片段, 用 *Hind* 和 *Nhe* 酶切回收小片段, 将回收的大、小片段连接得到 2 串联体, 利用 *Xba* 和 *Nhe* 酶切位点可以连接但是不能切断的特性, 反复重复上述步骤, 得到 4 串联和 8 串联表达载体。

表 1 表达载体构建使用的引物

引物名称	序列(5' 3')	注
280-1F	ATCGGAATTCTTAATCTAGATAAATGACAGGATCAA ATTCACA	扩增 ORF2 5 端第一个 280 bp 上、下游引物
280-1R	ATCGGGTACCATGCTAGCCTTTGTCTCTTTTGATCTTT	
280-2F	ATCGGAATTCTTAATCTAGATAAAAGGCCATTACATAATGGT	扩增 280-2 上、下游引物
280-2R	ATCGGGTACCATGCTAGCTTGGGGTGA AGAGTTCTG T	
280-4F	ATCGGAATTCTTAATCTAGATAAAAGAAGGCAAGAAATAACT	扩增 280-4 上、下游引物
280-4R	ATCGGGTACCATGCTAGCTTCTCCTAGATTTTCTAG	
280-5F	ATCGGAATTCTTAATCTAGATAAATCCACCATGATCAAGTG	扩增 280-5 上、下游引物
280-5R	ATCGGGTACCATGCTAGCGGGAATGCTTCCGTTTTT	
280-7F	ATCGGAATTCTTAATCTAGATAACCATGCTCATGGGTAGG	扩增 280-7 上、下游引物
280-7R	ATCGGGTACCATGCTAGCTATCTCTGTTTTAGTACCAGT AC	
280-8F	ATCGGAATTCTTAATCTAGATAAGGAAAACCTAGGCATTAC	扩增 280-8 上、下游引物
280-8R	ATCGGGTACCATGCTAGCCCACTTTTTGATGGGGT	
280-9F	ATCGGAATTCTTAATCTAGATAAGTGAAGGACATGAACAG	扩增 280-9 上、下游引物
280-9R	ATCGGGTACCATGCTAGCTCCTAGATCCCTGAGGAAT	
Alu-1	ATCGGAATTCTTAATCTAGATAAGGCTGGGCGCGGTGGCTCAC	扩增 <i>Alu</i> 上、下游引物(283 bp)
Alu-2	ATCGGGTACCATGCTAGCTGAGACGGAGTCTCGCTGTG	
1GFP1F	CCACTACCTGAGCACCCAGTC	位于 <i>GFP</i> 基因 3 端, 检测用上游引物(460 bp)
GFP5F	GGGCGAGGGCGATG	<i>GFP</i> 探针上、下游引物(81 bp)
GFP6R	GTGGGCCAGGGCAC	
NeoF	GCTCCTGCCGAGAAAGTATCC	Neo 探针上、下游引物(170 bp)
NeoR	CCCTGATGCTCTTCGTCCAGA T	

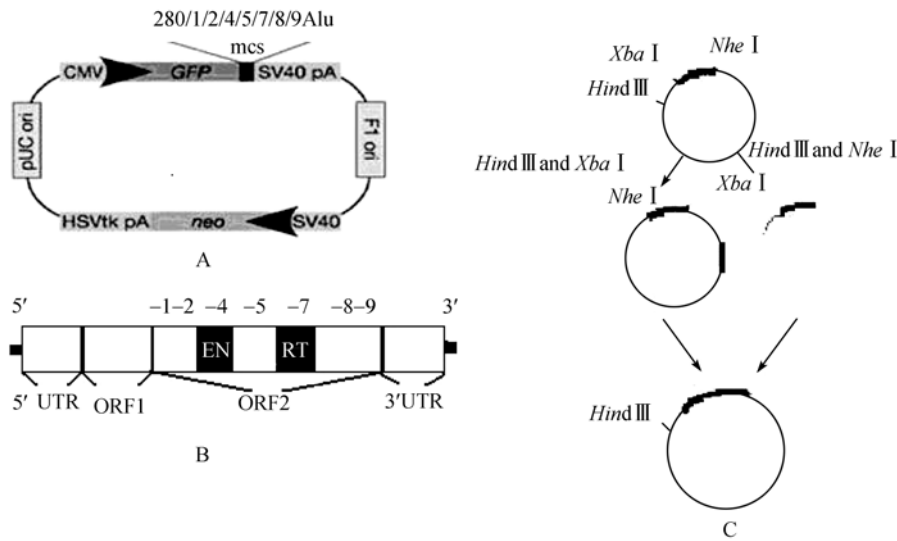


图 1 质粒的结构、L1-ORF2 片段的扩增位置和串联表达载体构建示意图
A: 片段插入位置示意图; B: 完整的 *LINE-1*, 包括 5' UTR、ORF1、ORF2 和 3' UTR, EN 和 RT 分别代表核酸内切酶和逆转录酶的编码序列; -1~-9 的位置表示 PCR 扩增片段插入构建质粒位置; C: 8 串联片段重组质粒构建示意图。

2.2 重组表达载体的鉴定

重组表达载体经 PCR、测序和酶切鉴定证明序列正确, PCR 鉴定结果见图 2; 测序和酶切鉴定结果从略。

用 1GFP1F 为上游引物, 用相应特异性引物(正序重组表达载体用下游引物, 如 280-1R, 反序重组表达载体用上游引物, 如 280-1F)进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪下观察到特异引物各泳道均出现约 400 bp 特异扩增条带, 与预期大小吻合。图 2A 显示下游引物扩正序模板可见明显条带; 图 2B 显示上游引物扩反序模板可见明显条带。

2.3 荧光观察

在荧光显微镜视野下, 随机选取同一视野, 分别在白光下计数总细胞数, 在荧光下计数荧光阳性细胞数, 结果见表 2, 并拍摄照片(图 3)。所有 p280 片段表达载体反序的荧光阳性率均高于正序, pAlu 的正、反序列 GFP 荧光阳性率没有明显的差异。

2.4 不同插入片段对 GFP 基因转录的影响

L1-ORF2 不同片段串联序列和 Alu 串联序列插入 pEGFP-C1 质粒, 瞬时转染 HeLa 细胞, Northern 杂交分析发现, 所有 L1-ORF2 片段串联序列反序 GFP 基因的表达均高于正序, 在正序串联表达载体

中, p280-1*8 和 p280-9*8 的 GFP 基因转录量超过其他 280 正序插入片段, 在反序串联表达载体 p280-1*8as 和 p280-9*8as 的 GFP 基因转录量超过其他 280 反序片段。Alu 与 L1-280 片段不同, 正序插入 GFP 基因表达高于反序。不同串联片段转录终止位置不同, 图 4A 中 p280-1*8(泳道 1)、p280-9*8(泳道 7), 图 4B 中 p280-1*8as(泳道 1)、p280-9*8as(泳道 7)属于提前终止性序列, Alu 正序(图 4A, 泳道 8)不发生转录提前终止。HeLa 细胞 RNA 作为空白对照, 没有任何杂交带(泳道 9), 说明探针的杂交带来自于转染质粒; 图 4C 和图 4D 显示 GFP 基因表达参照的 Neo 杂交结果, 各质粒转染泳道的 Neo mRNA 表达没有显著区别, 说明实验条件一致, 对 GFP 基因表达的分析成立。

2.5 碱基量分析

对 L1-ORF2 不同的 280 bp 片段和 Alu(283 bp)进行碱基量分析, 发现不同的 280 bp 片段 A 碱基均明显多于 T 碱基(图 5)。图 6 为 L1-ORF2 的不同 280 bp 片段及 Alu 中 A、T 碱基比率。将 L1-ORF2 不同的 280 bp 片段、Alu 分为 10 bp 一段, 统计其中的 A 碱基含量, 以 A 碱基数做纵坐标, 以 10 bp 的序列位置为横坐标, 结果见图 6, 显示在各 280 bp 片段中 A 碱基含量没有明显的聚集和平均分配趋势。

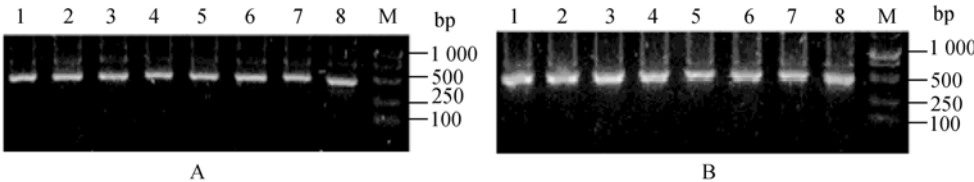


图 2 PCR 鉴定正、反序重组表达载体

A: 正序扩增。1~8: 分别为 p280-1*8、p280-2*8、p280-4*8、p280-5*8、p280-7*8、p280-8*8、p280-9*8、pAlu*8; M: DL2000 Marker; B: 反序扩增。1~8: 分别为 p280-1*8as、p280-2*8as、p280-4*8as、p280-5*8as、p280-7*8as、p280-8*8as、p280-9*8as、pAlu*8as; M: DL2000 marker。

表 2 重组表达载体正、反序的荧光阳性率

插入片段	细胞阳性率($\bar{x} \pm S, \%$)	插入片段	细胞阳性率($\bar{x} \pm S, \%$)
280-1*8	1.81 \pm 0.87	280-1*8as	14.00 \pm 4.63
280-2*8	1.40 \pm 0.59	280-2*8as	19.70 \pm 3.18
280-4*8	1.50 \pm 0.18	280-4*8as	12.82 \pm 3.45
280-5*8	0.51 \pm 0.17	280-5*8as	12.51 \pm 3.04
280-7*8	1.67 \pm 0.93	280-7*8as	11.12 \pm 3.15
280-8*8	2.46 \pm 0.14	280-8*8as	15.45 \pm 6.41
280-9*8	2.54 \pm 0.59	280-9*8as	11.96 \pm 4.54
Alu*8	4.4 \pm 1.85	Alu*8as	1.70 \pm 0.56

注: 取三次平均值。

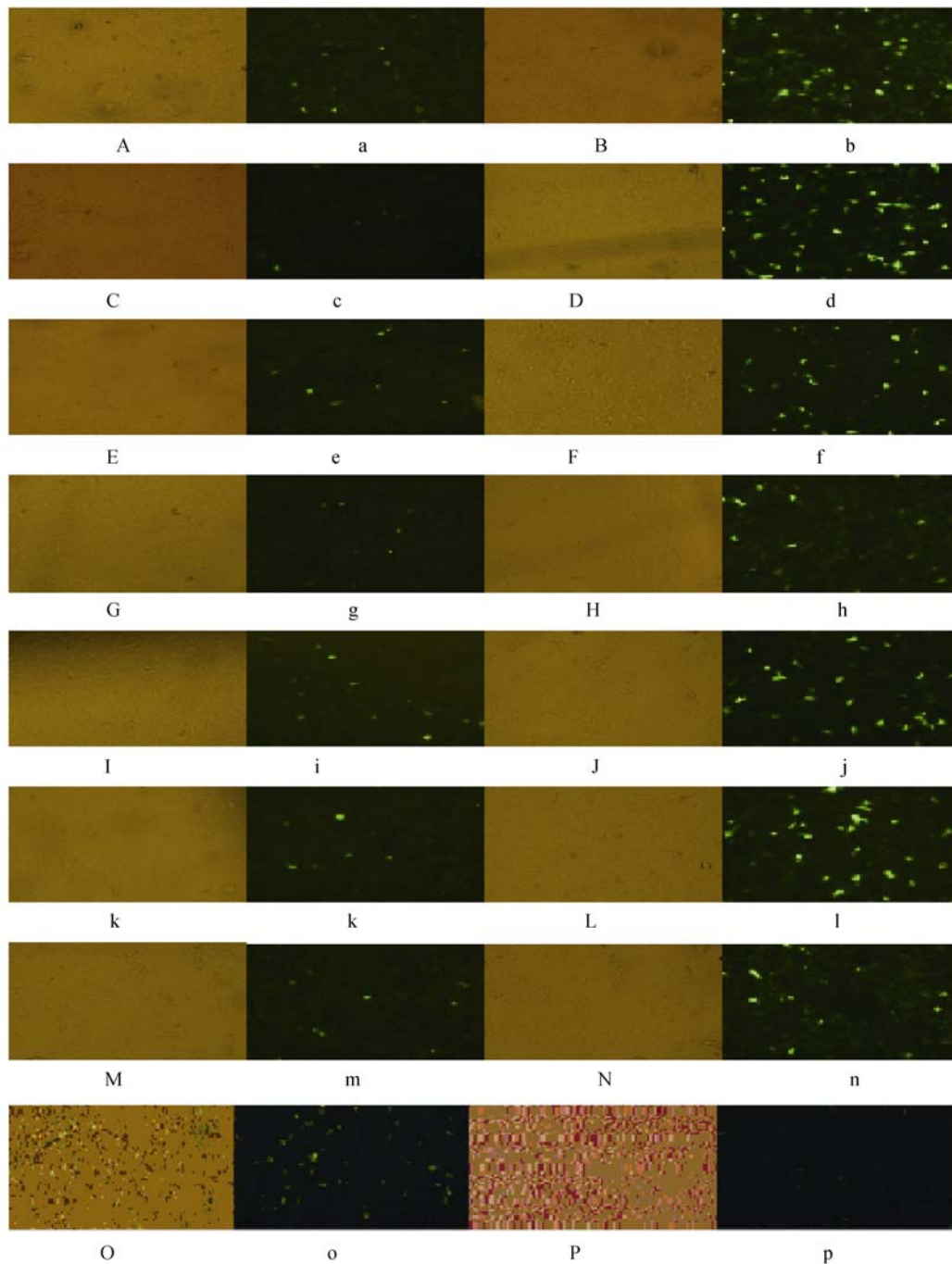


图 3 重组表达载体瞬时转染 HeLa 细胞荧光观察 GFP 蛋白表达

A~P: 白光下的细胞; a~p: 荧光下荧光阳性细胞. A(a): p280-1*8; B(b): p280-1*8as; C(c): p280-2*8; D(d): p280-2*8as; E(e): p280-4*8; F(f): p280-4*8as; G(g): p280-5*8; H(h): p280-5*8as; I(i): p280-7*8; J(j): p280-7*8as; K(k): p280-8*8; L(l): p280-8*8as; M(m): p280-9*8; N(n): p280-9*8as; O(o): pAlu*8; P(p): pAlu*8as。

3 讨论

L1 重复序列约有 50 万个拷贝, 完整的 *L1* 约有 6 kb, 在基因组中的 *L1* 多数属于不完整的序列^[5], 这样就存在了 *L1* 重复序列的不同片段对基因表达

是否影响不同的问题。本实验将 *L1*-ORF2 280 bp 不同片段的正、反序列反复串联后分别插入到 pEGFP-C1 的 *GFP* 基因下游, 共选择 7 段 280 bp 片段, 覆盖 *L1*-ORF2 序列的 51.24%, 因为其他位置有较多的干扰连接的酶切位点(*Hind* , *Xba* 等), 所以未进

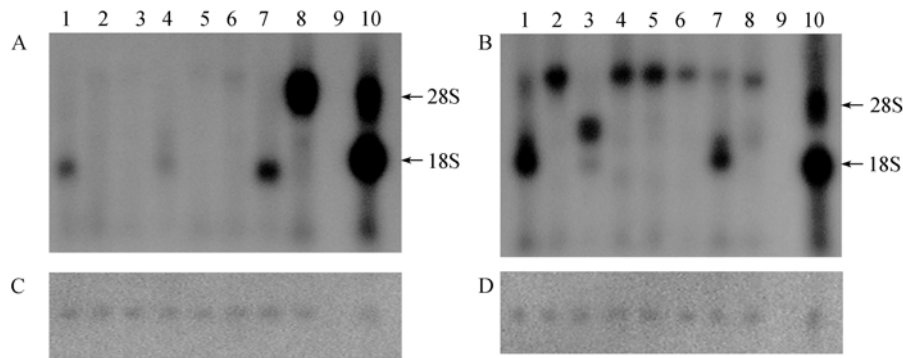


图 4 串联片段影响 *GFP* 基因表达的 Northern 杂交验证

A: *GFP* 报告基因探针杂交。1~10: 分别为 p280-1*8、p280-2*8、p280-4*8、p280-5*8、p280-7*8、p280-8*8、p280-9*8、pAlu*8、HeLa 和 pEGFP-C1; B: *GFP* 报告基因探针杂交。1~10: 分别 p280-1*8as、p280-2*8as、p280-4*8as、p280-5*8as、p280-7*8as、p280-8*8as、p280-9*8as、pAlu*8as、HeLa 和 pEGFP-C1; C 和 D 表示 Neo 探针杂交。

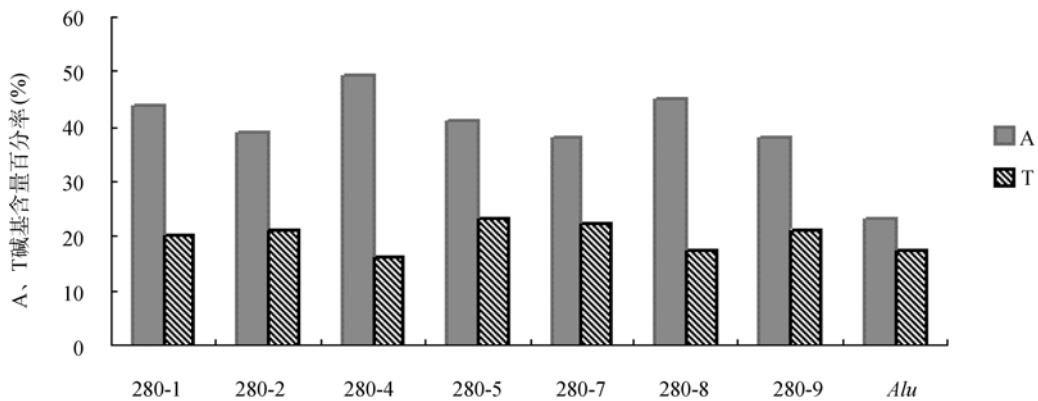


图 5 L1-ORF2 的 280 碱基不同片段和 *Alu* 中 A、T 碱基比率

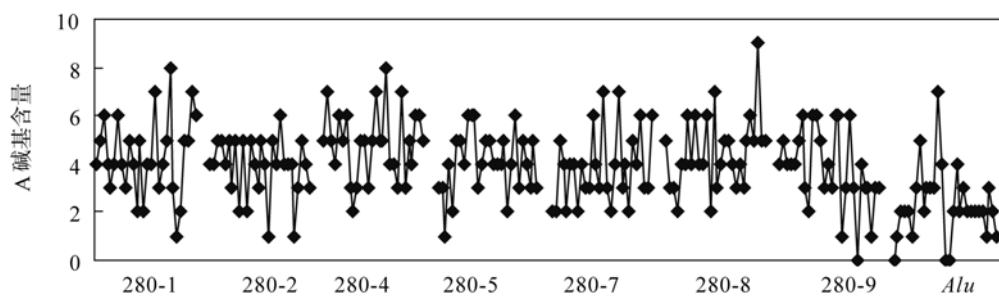


图 6 序列位置 A 碱基含量

图中每个数据点代表 10 碱基中的 A 含量。

行实验。发现不同 280 bp 片段抑制基因表达不同, 正序抑制作用高于反序。基因组学分析表明, 人的 19 号染色体含有大量的 *Alu* 重复序列(27.6%), 而 19 号染色体是基因密度最多, 基因表达最活跃的染色体^[6], 提示 *Alu* 可能与活化基因有关。X 染色体基因容易发生失活, 基因组学分析表明 X 染色体含有 29% 的 *L1* 重复

序列^[7], *L1* 在容易失活的 X 染色体基因转录起始部位含量高, 而逃逸失活基因 *Alu* 含量高^[8]。

Han 等^[4]将 ORF2 正序列插入报告基因下游抑制报告基因转录, 低表达基因及其侧翼有较多的 *L1*, *L1* 与基因表达下调有关^[9]。基因中的 *L1* 片段多数是反序, 这可能是由于正序对基因表达产生抑制导致

有害影响的缘故^[5]。Han 等^[4]发现 L1-ORF2 正序抑制报告基因表达,其抑制机理可能是由于抑制 RNA 聚合酶转录延伸。HS-40 是位于 球蛋白基因 5 上游的 DNase 敏感位点,两个串联 HS-40 序列插入质粒却抑制基因表达,同时缺失 DNase 敏感性,提示插入序列抑制基因表达可能与染色质构象有关^[5]。

本文中用串联重复的方法直接证明 ORF2 不同位置片段均抑制报告基因表达,且正序串联片段的抑制作用高于反序,这些结果与基因组学分析和以往的实验报道一致。L1-ORF2 不同片段对基因表达的抑制程度不同,Northern 检测表明,在正序中,280-1 和 280-9 对基因的抑制作用较弱,在反序中 280-1as 和 280-9as 对基因的抑制作用较弱。L1-ORF2 不同片段对 *GFP* 基因的终止位置产生不同影响,280-1、280-9、280-1as 和 280-9as 发生转录提前终止,其他 280 片段转录延伸。转录终止是基因表达的重要组成部分,有人认为,RNA 聚合酶在离开启动子之后几百碱基范围 *I* 和 *Alu* 均抑制基因表达,根据本文 Northern 结果分析,*Alu* 正序插入质粒(图 4A,泳道 8)的 *GFP* 基因表达超过所有 280 片段插入质粒,而 *Alu* 反序的 *GFP* 基因表达(图 4B,泳道 8)虽然低于所有 280 反序,但却高于多数 280 正序。所以说 *Alu* 虽然抑制基因表达,但比 *L1* 序列的抑制程度要轻,这可以解释 *Alu* 和 *L1* 的基因组分布特征和实验数据。*Alu* 正序插入质粒 *GFP* RNA 量最高,但是荧光阳性细胞率没有成比例升高,这可能是因为 *Alu* 作为 *GFP* mRNA 的下游序列对转录后过程产生了影响^[12,13]。

Alu 正序不发生转录提前终止(Fit4A lane8),*Alu* 序列没有 RNA Pol 的转录终止信号^[14],*GFP* 基因上游的 CMV 启动子使用 RNA Pol ,将 *Alu* 插在 *GFP* 基因下游与 *GFP* 基因共用一个启动子,不发生转录提前终止,说明 *Alu* 序列上也没有 RNA Pol 的终止信号。

对 L1-ORF2 280 bp 各段进行了碱基量分析,发现正序的 A 碱基含量高于其他碱基,这就意味着在反序中 T 碱基含量高于其他碱基。这可能是正、反序列对 *GFP* 基因表达影响不同的一种原因。

参考文献(References):

- [1] 吕占军,王秀芳,宋淑霞,翟羽. 是否应重新重视 RNA 在启动基因中的作用. 生命的化学, 2003, 23(2): 157–159.
- [2] Allen E, Horvath S, Tong F, Kraft P, Spiteri E, Riggs AD, Marahrens Y. High concentrations of long interspersed nuclear element sequence distinguish monoallelically expressed genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(17): 9940–9945. [\[DOI\]](#)
- [3] Graham T, Boissinot S. The genomic distribution of L1 elements: the role of insertion bias and natural selection. *J Biomed Biotechnol*, 2006(1): 75327–75330.
- [4] Han J, Szak S, Boeke J. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature*, 2004, 429(6989): 268–274. [\[DOI\]](#)
- [5] Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. LINE-1 RNA splicing and influences on mammalian gene expression. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(5): 1512–1521. [\[DOI\]](#)
- [6] Dehal P, Predki P, Olsen AS, Kobayashi A, Foltz P, Lucas S, Land M, Terry A, Ecale Zhou CL, Rash S, Zhang Q, Gordon L, Kim J, Elkin C, Pollard MJ, Richardson P, Rokhsar D, Uberbacher E, Hawkins T, Branscomb E, Stubbs L. Human chromosome 19 and related regions in mouse: conservative and lineage-specific evolution. *Science*, 2001, 293(5527): 104–111. [\[DOI\]](#)
- [7] Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, 2005, 434(7031): 325–337. [\[DOI\]](#)
- [8] Wang Z, Willard HF, Mukherjee S, Furey T. Evidence of influence of genomic DNA sequence on human X chromosome inactivation. *PLoS Comput Biol*, 2006, 2(9): e113. [\[DOI\]](#)
- [9] Shephard EA, Chandan P, Stevanovic-Walker M, Edwards M, Phillips IR. Alternative promoters and repetitive DNA elements define the species-dependent tissue-specific expression of the *FMOI* genes of human and mouse. *Biochem J*, 2007, 406(Pt 3): 491–499. [\[DOI\]](#)
- [10] Orozco IJ, Kim SJ, Martinson HG. The poly(A) signal, without the assistance of any downstream element, directs RNA polymerase II to pause *in vivo* and then to release stochastically from the template. *J Biol Chem*, 2002, 277(45): 42899–42911. [\[DOI\]](#)
- [11] Abrusán G, Krambeck HJ. The distribution of L1 and Alu retroelements in relation to GC content on human sex chromosomes is consistent with the ectopic recombination model. *J Mol Evol*, 2006, 63(4): 484–492. [\[DOI\]](#)
- [12] Häslér J, Strub K. Alu RNP and Alu RNA regulate translation initiation *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(8): 2374–2385. [\[DOI\]](#)
- [13] Häslér J, Strub K. Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(19): 5491–5497.
- [14] Alemán C, Roy-Engel AM, Shaikh TH, Deininger PL. Cis-acting influences on Alu RNA levels. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(23): 4755–4761. [\[DOI\]](#)