

УДК 577.217.52

## АДЕКВАТНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ мРНК РЕТРОТРАНСПОЗОНА L1 ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

© 2006 г. С. Е. Дмитриев\*, Н. В. Быкова, Д. Е. Андреев, И. М. Теренин

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899

Поступила в редакцию 09.09.2005 г.  
Представлена к публикации И.Н. Шатским

Ретротранспозон L1 кодирует уникальную бицистронную мРНК, которая является одновременно транспозиционным интермедиатом и матрицей для синтеза двух белков этого мобильного элемента. По предварительным данным, инициация трансляции обоих цистронов L1 происходит по неканоническому механизму. При трансляции мРНК L1 в лизате ретикулоцитов кролика (ЛРК) – стандартной системе, часто используемой для изучения механизмов биосинтеза белка у эукариот – наряду с ожидаемыми продуктами нами обнаружено большое количество продуктов aberrантной инициации на внутренних AUG-кодонах. Подобные продукты отсутствуют при трансляции мРНК L1 *in vivo*. Добавление в систему цитоплазматического экстракта клеток HeLa привело к исчезновению aberrантных продуктов при сохранении эффективной трансляции первого цистрона. Уровень трансляции второго цистрона мРНК L1 стал существенно ниже, что также отражает ситуацию *in vivo*. Эти и другие опыты позволили наглядно показать, что новая комбинированная система ЛРК + HeLa гораздо больше подходит для изучения механизмов инициации трансляции, чем обычный ЛРК.

**Ключевые слова:** лизат ретикулоцитов кролика, инициация трансляции, ретротранспозон L1, aberrантная инициация.

ADEQUATE SYSTEM FOR INVESTIGATION OF THE HUMAN RETROTRANSPOSON L1 mRNA TRANSLATION INITIATION *IN VITRO*, by S. E. Dmitriev\*, N. V. Bykova, D. E. Andreev, I. M. Terenin (A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow 119992; \*e-mail: dmitriev\_sergey@genebee.msu.su). Retrotransposon L1 codes for a unique dicistronic mRNA which serves both a transposition intermediate and a template for the synthesis of two proteins of this mobile element. According to preliminary data, the translation initiation of both cistrons of L1 occurs by non-canonical mechanisms. When translating the L1 mRNA in rabbit reticulocyte lysate (RRL), a standard system routinely used by many researchers to study mechanisms of translation initiation in eukaryotes, we observed along with expected products a number of polypeptides resulted from aberrant initiation at internal AUG codons. Such products are absent on translation of L1 mRNA *in vivo*. Addition to the system of a cytoplasmic extract from HeLa cells resulted in disappearance of these aberrant products whereas the efficiency of translation of the first cistron remained unchanged. The level of translation of the second cistron became significantly lower. This also made the picture closer to that observed *in vivo*. These and other experiments allowed us to clearly demonstrate that the new combined cell-free system is much more adequate to study mechanisms of translation initiation than a regular RRL.

**Key words:** rabbit reticulocyte lysate, translation initiation, retrotransposon L1, aberrant initiation.

Ретротранспозон L1 – чрезвычайно широко представленный в геномах млекопитающих мобильный элемент, относящийся к группе LINE [1]. В процессе эволюции число его копий превысило 500000, в совокупности они составляют около 17% всей хромосомной ДНК человека. мРНК, которую кодирует ретротранспозон L1, одновременно

служит транспозиционным интермедиатом и матрицей для синтеза двух белков ретротранспозона: РНК-связывающего белка с неизвестной функцией (p40) и обратной транскриптазы. Открытые рамки считывания этих двух белков не перекрываются и разделены участком длиной 63 н. – таким образом, мРНК L1 является природной бицистронной матрицей, совершенно не характерной для эукариот. Другой отличительной чертой мРНК L1 является удивительно длинная (910 н.) 5'-нетранслируемая область, предшествующая первому цистрону. Она содержит две короткие

Принятые сокращения: ЛРК – лизат ретикулоцитов кролика, 5'-НТО – 5'-нетранслируемая область; IRES – Internal Ribosome Entry Site – участок внутренней посадки рибосомы.

\*Эл. почта: dmitriev\_sergey@genebee.msu.su

рамки считывания и, за исключением последних 100 н., имеет GC-богатый состав. Наконец, третьей уникальной особенностью L1 является аномально высокое содержание во всей остальной части мРНК адениловых остатков: на некоторых участках аденин – едва ли не каждое второе основание. Все эти черты делают мРНК ретротранспозона L1 интересной моделью для изучения неканонических механизмов трансляции у эукариот.

Молекулярные механизмы инициации трансляции у млекопитающих удобнее изучать в системах *in vitro*. Классической такой системой является лизат ретикулоцитов кролика (ЛРК), который и был избран нами в качестве отправной точки в нашем исследовании. ЛРК представляет собой цитоплазматический экстракт клеток – предшественников эритроцитов крови, который готовится по стандартной процедуре [2] и доступен в виде коммерческих препаратов, поставляемых фирмой “Promega”. Несмотря на то, что ретикулоциты – специализированные клетки, в которых идет массивный синтез белка с очень небольшого набора матриц (в основном это  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобины), ЛРК широко используется для изучения трансляции самых разных мРНК. При этом исследователи обычно не задумываются о возможных артефактах, связанных с использованием этой специализированной системы. Как будет показано ниже, такое пренебрежение особенностями ЛРК не всегда оправдано.

Цель данной работы – разработка системы для изучения инициации трансляции мРНК L1 и других сложно устроенных матриц *in vitro*, которая была бы максимально приближена к условиям, существующим в животной клетке, и позволяла бы получать результаты, сходные с получаемыми *in vivo*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Молекулярно-генетические конструкции** получали на основе вектора pGL3-Control (“Promega”). Работы с плазмидами и генно-инженерные манипуляции проводили согласно [3], использовали ферменты фирмы “Fermentas” (Литва). Фрагмент L1 с 1 по 1993 н., включающий 5'-НТО, первый цистрон и межцистронный участок, был получен из любезно предоставленной Г. Сверголом плазмиды p3LZ [4] с помощью ПЦР с праймерами 5'-GGCGGAGGAGCCAAGATGG-3' и 5'-CGTGGC-CAGTGTTCATTATGATGTTAGCTGG-3'. Для получения конструкции pLL2 продукт ПЦР лигировали в вектор pGL3 по сайтам SmaI-NcoI (последний был затуплен). Конструкцию pLL2imp получали из pLL2 путем замены фрагмента HindIII-BalI на ПЦР-продукт, полученный с нее же с праймерами 5'-CCAGCCAAACTAAGCTTCATAAGTG-3' и 5'-CCAGATCCATGGCGGCTATGATGTTAGCTG-

GTGATTTTGC-3', обработанный HindIII. Правильность конструкций подтверждали секвенированием (“Геном”, Москва).

**РНК** получали с помощью РНК-полимеразы фага T7 (“Fermentas”) согласно протоколу фирмы-изготовителя. Реакцию проводили в течение 2 ч при 37°C, с обязательным добавлением ингибитора рибонуклеаз RiboLock (“Fermentas”). В качестве ДНК-матрицы использовали ПЦР-продукт, полученный с использованием соответствующей плазмиды и праймеров T7UTR – 5'-CGCCGTAATACGACTCAC-TATAGGCGGAGGAGCCAAGATGG-3' и FLA50 – 5'-(T)<sub>50</sub>AACTTGTATTATGTCAGCTTATAATGG-3', очищенный электрофорезом в агарозном геле с последующей элюцией с помощью коммерческого набора H-1602 фирмы “Хеликон” (Россия). После транскрипции РНК очищали осаждением LiCl. Для этого к реакционной смеси добавляли равный объем 4 M LiCl, инкубировали 1 ч во льду и центрифугировали 10 мин при 12000 g при +4°C, осадок РНК промывали раствором, содержащим 70% спирта, 5 mM MgCl<sub>2</sub> и 50 mM NaCH<sub>3</sub>COO, и после подсушивания растворяли в воде.

**Для трансляции мРНК** использовали обработанный нуклеазой ЛРК фирмы “Promega”. Реакционная смесь (7 мкл) содержала 5 мкл лизата, дополненного смесью аминокислот и [<sup>35</sup>S]метионином (“Amersham”) согласно рекомендации изготовителя, 0,5 мкл водного раствора мРНК и либо 1,5 мкл воды, либо 1,5 мкл обработанного микрококковой нуклеазой экстракта клеток HeLa. Электрофорез белковых продуктов проводили по Лэммли в 12%-ном полиакриламидном геле [3]. Радиоавтографы получали с помощью фосфоримиджера (“Molecular Dynamics”) и обрабатывали, используя программу Image Quant 5.0.

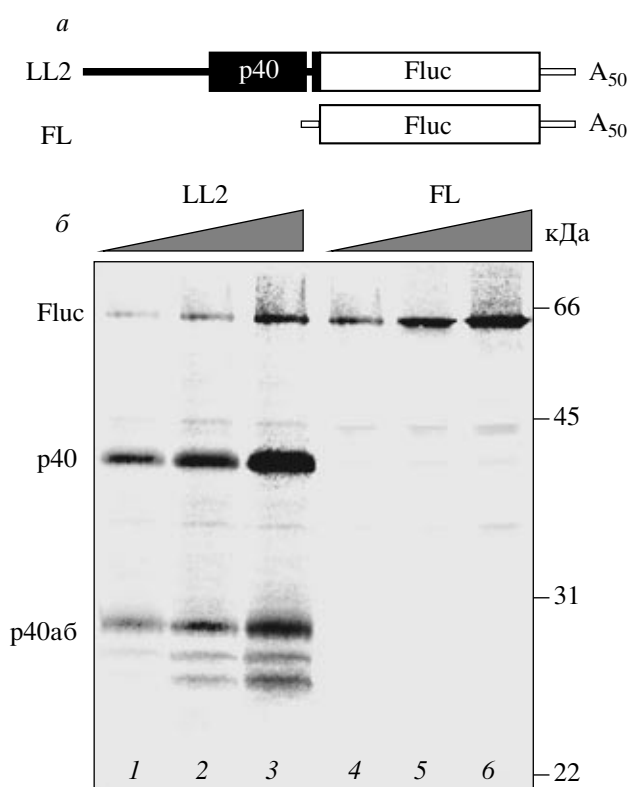
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модельной матрицы для подбора условий трансляции *in vitro* мы использовали искусственную мРНК LL2 (рис. 1a), аналогичную полноразмерной мРНК L1, но с заменой второго цистрона на ген-репортер, кодирующий люциферазу светлячка (Fluc). Эту замену пришлось произвести по причине слишком большой длины второй рамки считывания в природной мРНК L1, которая сделала бы ее трансляцию в ЛРК крайне неэффективной. При этом нуклеотидный контекст стартового кодона второй рамки был сохранен. мРНК получали T7-транскрипцией *in vitro*. Поскольку мРНК L1 в клетке полиаденилирована [1], на 3'-конец мРНК были введены 50 остатков адениловой кислоты. Для этого в качестве ДНК-матрицы при синтезе РНК использовали непосредственно плазмидную ДНК, а ПЦР-продукт, полученный с плазмиды pLL2 с праймерами T7UTR и FLA50, первый из которых соответство-

вал началу 5'-НТО LL1 и содержал T7-промотор, а второй был комплементарен области плазмиды, лежащей на расстоянии 200 н. после *Fluc* и содержал 50 тимидиловых остатков. Данный вариант введения гомонуклеотидных трактов позволяет избежать клонирования плазмиды, содержащей такую последовательность (подобные области с высокой вероятностью рекомбинируют в бактериальной клетке, в результате чего получается гетерогенная популяция молекул плазмиды).

Трансляцию мРНК LL2 в ЛРК проводили с добавлением в реакционную смесь [<sup>35</sup>S]метионина, после чего продукты разделяли с помощью электрофореза в ПААГ геле по методу Лэммли. В качестве контроля использовали стандартную моноцистронную полиаденилированную мРНК FL из набора для трансляции фирмы “Promega” – эта мРНК также кодирует люциферазу, но имеет простую короткую 5'-НТО (рис. 1а).

На рис. 1б представлен радиоавтограф геля с результатом трансляции мРНК LL2 в трех различных концентрациях (дорожки 1–3). В этих условиях в реакционной смеси обнаружены продукты трансляции как первого (~40 кДа), так и второго (~60 кДа) цистронов – p40 и Fluc соответственно. Однако, помимо этих двух полипептидов, на радиоавтографе можно наблюдать еще несколько полос с молекулярной массой меньше 30 кДа (дорожки 1–3). Они не исчезают при добавлении ингибитора протеаз и ингибитора рибонуклеаз (данные не представлены) и по размеру соответствуют полипептидам, закодированным в той же рамке, что и p40, но начинающимся с внутренних AUG-кодонов. При трансляции мРНК FL эти продукты отсутствуют (рис. 1б, дорожки 4–6). Таким образом, при трансляции мРНК LL2 в ЛРК с использованием стандартного протокола выявлен ряд продуктов aberrантной инициации с внутренних AUG-кодонов первой рамки считывания. Похожие продукты наблюдали и другие авторы при трансляции мРНК LL1 в ЛРК [4], но их происхождение никак не обсуждалось. Однако в живой клетке, согласно литературным данным, подобных полипептидов не обнаруживается [4, 5]. Следовательно, система ЛРК в ее классическом варианте не воспроизводит условия живой клетки, скорее всего, по причине вышеупомянутой специализации ретикулоцитов, служащих материалом для приготовления экстракта. Известно, например, что в ЛРК довольно бедно представлены мРНК-связывающие белки, необходимые для эффективной трансляции некоторых вирусных мРНК [6–8]. Кроме того, ряд исследователей, изучавших трансляцию мРНК некоторых пикорнавирусов, также наблюдали в этой системе случаи aberrантной инициации [9–12], в то время как в экстрактах, приготовленных из других клеток

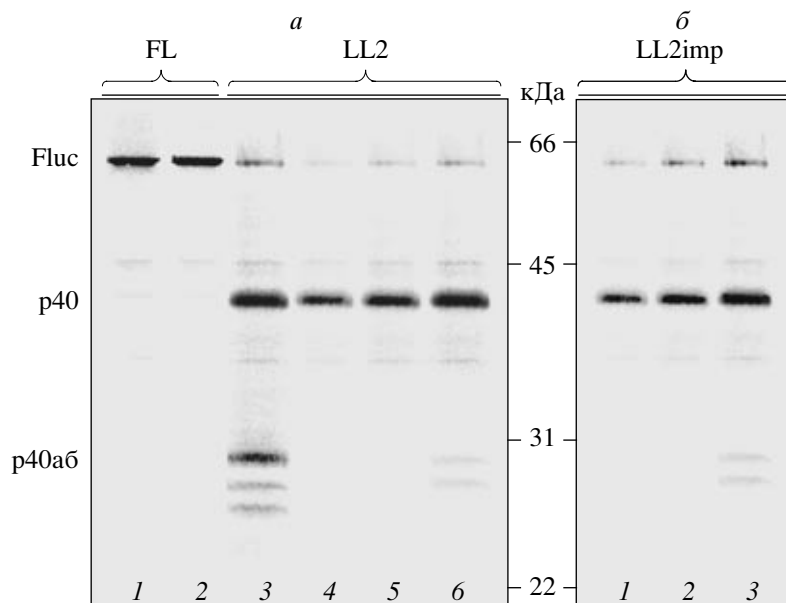


**Рис. 1.** Трансляция мРНК LL2 и FL в ЛРК. а – Схема мРНК LL2 и FL. Рамки считывания показаны прямоугольниками, черным цветом обозначены участки последовательности ретротранспозона. б – Радиоавтограф с результатом трансляции в ЛРК. Справа отмечена молекулярная масса согласно белковым маркерам, кДа; слева – продукты трансляции LL2, где “p40ab” – aberrантные продукты. Дорожки: 1–3 – трансляция мРНК LL2, 4–6 – трансляция мРНК FL. Концентрации мРНК: 1 и 4 – 12.5 нМ, 2 и 5 – 25 нМ, 3 и 6 – 50 нМ.

(например, HeLa), инициация проходила нормально [9, 10, 12].

В то же время, по сравнению с другими клеточными экстрактами ЛРК имеет ряд преимуществ: доступность, высокую эффективность и хорошую воспроизводимость результатов. Поэтому мы решили использовать в нашем исследовании комбинированную систему, взяв за основу ЛРК и добавив в него обработанный микрококковой нуклеазой S30-экстракт клеток HeLa (20% v/v). Подобную комбинированную систему использовали в работе [10] для изучения трансляции мРНК полиовируса, однако широкого распространения она не получила.

Результат трансляции в такой системе представлен на рис. 2а. Добавление экстракта клеток HeLa практически не сказывается на эффективности трансляции контрольной мРНК FL (сравни дорожки 1 и 2). Однако картина трансляции мРНК LL2 (дорожки 3–6) при добавлении экстракта



**Рис. 2.** Трансляция различных мРНК в системах ЛПК и ЛПК + HeLa. *а* – Трансляция мРНК LL2 и FL. 1 – 25 нМ FL в ЛПК, 2 – 25 нМ FL в ЛПК + HeLa, 3 – 25 нМ LL2 в ЛПК, 4–6 – LL2 в ЛПК + HeLa (12.5, 25 и 50 нМ соответственно). *б* – Трансляция мРНК LL2imp в системе ЛПК + HeLa. Концентрации мРНК: 1 – 12.5 нМ, 2 – 25 нМ, 3 – 50 нМ. Остальные обозначения – как на рис. 1.

клеток HeLa значительно изменяется. Прежде всего, исчезают продукты aberrантной инициации – лишь при максимальной (50 нМ) из тестируемых концентраций мРНК в этой области наблюдаются слабые полосы (рис. 2*а*, дорожка *б*). Последний факт может свидетельствовать в пользу того, что за маскирование сайтов aberrантной инициации отвечают именно мРНК-связывающие белки: при повышении концентрации мРНК соотношение белок : РНК падает, мРНК “раздевается”, и недоступные ранее области внутри молекулы мРНК становятся доступными для рибосом. Подобный эффект мРНК-связывающих белков наблюдали в работе [13]: при добавлении их в ЛПК вероятность инициации трансляции с внутреннего участка бицистронной мРНК, где находился сайт внутреннего связывания рибосомы (IRES), уменьшалась, зато увеличивалась эффективность трансляции 5'-концевого цистрона. По-видимому, в случае мРНК LL2 наличие aberrантных продуктов трансляции обусловлено тем, что из-за аномального А-богатого состава практически вся область первого цистрона находится преимущественно в одноцепочечной конформации и в отсутствие мРНК-связывающих белков может связывать рибосому подобно одноцепочечному U-богатому IRES-элементу вируса RhPV [14] или А-богатым IRES-элементам вируса cгTMV [15]. Однако при добавлении экстракта клеток HeLa содержащиеся в нем мРНК-связывающие белки образуют с мРНК рибонуклеопротеидные комплексы, блокируя aberrантную внутреннюю инициацию и направляя рибосомы на

“правильные” стартовые кодоны – те, попадание на которые обусловлено наличием специфических механизмов. То, что при этом практически не меняется эффективность трансляции мРНК FL и первого цистрона мРНК LL2, как раз и свидетельствует о существовании для них таких механизмов: в первом случае это наверняка классическая 5'-конец-зависимая инициация, во втором – либо она же, либо другой, еще не выясненный, механизм.

Иначе обстоит дело со вторым цистроном мРНК LL2. При добавлении экстракта HeLa эффективность его трансляции сильно падает – хотя и несколько в меньшей степени, чем aberrантных продуктов (сравни интенсивности полос Fluc и p40ab в дорожках 3 и 5 на рис. 2*а*). Возможно, это свидетельствует о том, что в исходном ЛПК инициация трансляции второй рамки в значительной степени происходит по механизму aberrантного внутреннего связывания рибосомы, аналогичному таковому для других внутренних AUG-кодонов. Тем не менее, тот факт, что после добавления к ЛПК экстракта клеток HeLa продукт Fluc не исчезает совсем, говорит о существовании и другого механизма, обеспечивающего инициацию трансляции второго цистрона, хотя эффективность работы этого механизма невысока. Следует заметить, что столь низкий уровень трансляции второго цистрона вовсе не является неожиданным. В исходной мРНК ретротранспозона L1 второй цистрон кодирует обратную транскриптазу, а этот белок необходим ретротранспозону в

очень небольших количествах. В живых клетках, по-видимому, концентрация этого белка крайне невелика – даже сам факт его наличия в тканях и в клетках культуры удалось подтвердить лишь недавно [16]. мРНК L1 существует в цитоплазме в форме рибонуклеопротеидной частицы, в состав которой входит в основном белок р40 (продукт первой рамки считывания) [17], и, хотя обратная транскриптаза также должна входить в состав этих мРНК (поскольку в частицах обнаруживается ревертазная активность [18]), ее наличие там до сих пор не удалось выявить даже с помощью антител. Предполагается, что в состав мРНК входит лишь две или даже одна молекула ревертазы [19], в то время как количество молекул р40 в ней, по-видимому, весьма велико. Диспропорция в соотношении количества структурного белка и полимеразы характерна для многих вирусных частиц. Очень часто эта диспропорция вызвана именно различием в эффективности инициации трансляции. И хотя ретротранспозоны и не являются вирусами в прямом понимании этого слова, некоторые аспекты жизненного цикла роднят их, в частности, с представителями семейства Retroviridae [1]. В соответствии с этими предположениями, при трансфекции мРНК LL2 в клеточные культуры наблюдаемый уровень активности второго цистрона также оказался крайне невысоким (Дмитриев С.Е., неопубликованные данные).

Для доказательства того, что второй цистрон специально запрограммирован на низкую эффективность трансляции по специфическому механизму, отличному от аберрантной инициации на других внутренних AUG-кодонах, мы решили добиться повышения уровня его экспрессии в системе ЛРК + HeLa. Одна из причин низкого уровня инициации могла быть связана с неоптимальным нуклеотидным контекстом стартового AUG-кодона (atcataATGaca), поэтому была создана конструкция rLL2imp, в которой контекст был заменен на оптимальный (gccgccATGgat), согласно [20, 21]. Полученную на основе этой конструкции мРНК LL2imp транслировали в системе ЛРК + HeLa. Результат трансляции представлен на рис. 2б. Можно видеть, что изменение контекста сильно повысило эффективность инициации трансляции второго цистрона (сравни дорожки 1–3 на рис. 2б и дорожки 4–6 на рис. 2а), и при умеренных концентрациях мРНК LL2imp продуктом реакции являются два мажорных полипептида (Fluc и р40), в то время как аберрантные продукты инициации на других внутренних AUG (многие из которых изначально находились в контексте, очень близком к оптимальному), практически не видны (дорожки 1, 2). Таким образом, в разработанной нами системе специфические механизмы инициации трансляции мРНК ретротранспозона L1 работают эффективно, в то время как аберрантная инициация практически отсутствует. Точность трансляции и

соотношение ее продуктов гораздо больше соответствуют ситуации *in vivo*, чем при использовании исходного ЛРК.

На наш взгляд, высокая вероятность наличия артефактов в системе трансляции *in vitro* в ЛРК, изученная нами на примере мРНК L1 и замеченная ранее другими авторами на примере мРНК пикорнавирусов [9–12], обязательно должна учитываться при использовании данной системы для изучения механизмов биосинтеза белка. ЛРК идеально подходит для проверки длины и целостности рамок считывания, для получения меченых рекомбинантных белков и некоторых других целей технического характера, однако исследование механизмов инициации трансляции, в особенности в случае мРНК с протяженными одноцепочечными участками, требует иных подходов. Один из них предложен в данной статье.

Авторы выражают искреннюю признательность И.Н. Шатскому за обсуждение работы и за предоставление S30-экстракта клеток HeLa, Г. Свергольду – за плазмиду р3LZ.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (04-04-49507) и фонда Fogarty International Research Collaboration Award (FIRCA PA-02-057).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ostertag E.M., Kazazian H.H., Jr. 2001. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 501–538.
2. Pelham H.R., Jackson R.J. 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**, 247–256.
3. Sambrook J., Russell D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3d Ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
4. Leibold D.M., Swergold G.D., Singer M.F., Thayer R.E., Dombroski B.A., Fanning T.G. 1990. Translation of LINE-1 DNA elements *in vitro* and in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 6990–6994.
5. McMillan J.P., Singer M.F. 1993. Translation of the human LINE-1 element, L1Hs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 11533–11537.
6. Meerovitch K., Svitkin Y.V., Lee H.S., Lejbkowitz F., Kenan D.J., Chan E.K., Agol V.I., Keene J.D., Sonenberg N. 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J. Virol.* **67**, 3798–3807.
7. Hunt S.L., Hsuan J.J., Totty N., Jackson R.J. 1999. unr, a cellular cytoplasmic RNA-binding protein with five cold-shock domains, is required for internal initiation of translation of human rhinovirus RNA. *Genes Dev.* **13**, 437–448.
8. Jia X.Y., Scheper G., Brown D., Updike W., Harmon S., Richards O., Summers D., Ehrenfeld E. 1991. Translation of hepatitis A virus RNA *in vitro*: aberrant internal initiations influenced by 5' noncoding region. *Virology.* **182**, 712–722.

9. Brown B.A., Ehrenfeld E. 1979. Translation of poliovirus RNA *in vitro*: changes in cleavage pattern and initiation sites by ribosomal salt wash. *Virology*. **97**, 396–405.
10. Dorner A.J., Semler B.L., Jackson R.J., Hanecak R., Dreyer E., Wimmer E. 1984. *In vitro* translation of poliovirus RNA: utilization of internal initiation sites in reticulocyte lysate. *J. Virol.* **50**, 507–514.
11. Dasso M.C., Jackson R.J. 1989. On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. *Nucleic Acids Res.* **17**, 3129–3144.
12. Jackson R.J. 1991. Potassium salts influence the fidelity of mRNA translation initiation in rabbit reticulocyte lysates: unique features of encephalomyocarditis virus RNA translation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1088**, 345–358.
13. Svitkin Y.V., Ovchinnikov L.P., Dreyfuss G., Sonenberg N. 1996. General RNA binding proteins render translation cap dependent. *EMBO J.* **15**, 7147–7155.
14. Terenin I.M., Dmitriev S.E., Andreev D.E., Royall E., Belsham G.J., Roberts L.O., Shatsky I.N. 2005. A cross-kingdom internal ribosome entry site reveals a simplified mode of internal ribosome entry. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7879–7888.
15. Dorokhov Y.L., Skulachev M.V., Ivanov P.A., Zvereva S.D., Tjulkina L.G., Merits A., Gleba Y.Y., Hohn T., Atabekov J.G. 2002. Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 5301–5306
16. Ergun S., Buschmann C., Heukeshoven J., Dammann K., Schnieders F., Lauke H., Chalajour F., Kilic N., Stratling W.H., Schumann G.G. 2004. Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *J. Biol. Chem.* **279**, 27753–27763.
17. Hohjoh H., Singer M.F. 1996. Cytoplasmic ribonucleoprotein complexes containing human LINE-1 protein and RNA. *EMBO J.* **15**, 630–639.
18. Deragon J.M., Sinnett D., Labuda D. 1990. Reverse transcriptase activity from human embryonal carcinoma cells NTera2D1. *EMBO J.* **9**, 3363–3368.
19. Ostertag E.M., Kazazian H.H. Jr. 2001. Twin priming: a proposed mechanism for the creation of inversions in L1 retrotransposition. *Genome Res.* **11**, 2059–2065.
20. Kozak M. 1987. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**, 947–950.
21. Grunert S., Jackson R.J. 1994. The immediate downstream codon strongly influences the efficiency of utilization of eukaryotic translation initiation codons. *EMBO J.* **13**, 3618–3630.