

肌肉特异性基因启动子的上游转录调控元件研究进展

赵丹丹 刘聪聪 贾明玉 杨悦 叶枫 严云勤*

(东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要 真核生物启动子位于基因5'端上游转录起始位点附近, 是包含核心启动子以及上游转录调控元件的一段DNA序列, 这些转录调控元件控制着基因表达的强度和特异性。肌肉特异性启动子的上游调控元件种类、数量和排列顺序决定着基因在肌肉中的特异性表达。深入研究肌肉启动子的上游调控元件, 可以进一步了解肌肉基因表达机制, 从而为肌肉性状的改良、增殖分化的机理和疾病的基因治疗等研究提供重要依据。该文回顾了近年来肌肉特异性启动子研究领域中的新发现, 包括肌肉特异性启动子转录调控元件的分子机制、建立人工合成肌肉启动子的方法及应用, 并探讨该领域中急需解决的问题和发展前景。

关键词 肌肉特异性启动子; 转录调控元件; 人工合成启动子

1 前言

启动子是位于基因5'端上游转录起始位点附近的一段DNA序列, 根据基因表达的情况, 可分为组成型启动子和特异型启动子(诱导型/组织特异性), 前者在各种组织中均能启动基因表达, 后者仅在一定发育时期的特定组织中启动基因表达^[1-2]。近年来, 随着基因组测序等生物技术的飞速发展, 人们分离了许多肌肉特异性启动子, 如骨骼肌 α -actin、心肌 α -actin、肌肉肌酸激酶(MCK)、肌球蛋白重链(MyHC)、结蛋白(desmin)和生肌调控因子家族(MyoD、Myf5、Mrf4和Myogenin)等肌肉特异性基因的启动子, 并对这些启动子的转录活性和其对肌肉细胞的增殖、分化作用进行深入研究^[3-5]。肌肉作为外源物质注射的靶器官, 具备生长周期长和血流量高等优点, 肌肉特异性启动子指导的外源蛋白质在肌肉细胞中可表达数年, 并且能通过血液循环系统为其他组织器官疾病的治疗提供相应的蛋白质或激素。因此, 肌肉特异性启动子在临床医学研究中也受到广泛关注, 被认为是肌肉疾病治疗的重要研究工具。

Goodrich等^[6]证实, 启动子的上游区域转录调控元件的种类、数量、排列顺序对组织特异性基因的转录活性具有十分重要的作用。研究这些转录元件的分子作用机理, 可合成肌肉特异性强表达活性的启动子。肌肉特异性启动子中含有多种上游转录调控元件, 本文介绍的主要有: SRE元件、MEF-1元件、MEF-2元件、Trex/MEF-3元件、M-CAT元件、

MPEX元件、CACCC盒、Pax3/7元件。

2 肌肉特异性启动子调控元件

不同的肌肉特异性启动子, 其控制基因表达的特异性和表达的强度也不同, 这些特异性启动子通过什么机制调控基因表达的特异性和强度呢? 这个问题随着染色质免疫共沉淀(ChIP)研究技术的不断进步逐渐得到解决。人们应用该技术对肌肉基因的表达机制进行研究, 发现了一些起关键作用的转录调控元件和与这些元件结合的反式作用因子。

2.1 SRE元件(CArG元件)

SRE元件(CArG元件), 即血清应答元件, 其核心序列为5'-CC[A/T]₆GG-3'。Lee等^[7]首先发现, 多重重复序列的SREs元件存在于心肌、骨骼肌和平滑肌的 α -actin启动子中以及肌球蛋白轻链(MyLC)和肌营养不良基因(dystrophin)的启动子中。Pagel等^[8]在早期生长应答因子-1(early growth response-1, Egr-1)启动子中也发现了SREs元件。这种顺式元件是由反式作用因子即血清应答因子(serum response factor, SRF)或竞争性抑制剂YY1识别的。Chow等^[9]定点突变鸡骨骼肌 α -actin启动子(SK)中的SRE元件核心序列, 结果发现突变后的SRE元件不能与SRF结合, 最终导致鸡骨骼肌 α -actin启动子(SK)活性降低甚至不起作用,

收稿日期: 2012-01-07 接受日期: 2012-02-29

转基因生物新品种培育重大专项课题(No.2008ZX08007-002)资助项目

*通讯作者。Tel: 0451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com

这一现象说明了SRE对骨骼肌 α -actin启动子转录活性的重要作用。Lahoute等^[10]突变小鼠 SRF 基因, 实验证明突变 SRF 后小鼠肌肉特异性基因的表达及后天发育都有不同程度的缺陷。Kim等^[11]在小鼠中证实 SRF 并不总是单独对肌肉发育起作用的, SRF 与骨骼肌 α -actin启动子的SRE元件结合, $Epc1$ 再与 SRF 物理性协同结合共同激活肌肉基因的表达。敲除小鼠 $Epc1$ 基因会导致骨骼肌 α -actin表达紊乱, 小鼠的成肌细胞不能正常进行肌肉分化。可见, SRE元件受多种反式作用因子协同作用, 影响肌肉特异性启动子的转录活性, 对肌肉细胞的分化具有重要的作用。

2.2 MEF-1元件(E-box)

MEF-1元件(E-box), 其核心序列为5'-CANNTG-3' (N代表任何一种碱基, 下同), Weintraub等^[12]发现该元件存在于多数肌肉特异基因的上游调控区域, 由碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)家族蛋白识别。bHLH结构主要存在于生肌调控家族因子中, 如MyoD、Myf5、Myogenin和MRF4, 它们在骨骼肌生长和发育过程中起着至关重要的作用。MEF-1位点可充分指导肌肉特异性基因的表达和MyoD介导的反式激活作用。

2.3 MEF-2元件

MEF-2元件, 其核心序列为5'-[C/T]TAAAAAT-AAC[C/T]₃-3', Kanatous等^[13]证实该元件存在于肌球蛋白轻链2A基因的启动子/增强子区域。富含A/T基序的MEF-2顺式作用元件可与MEF2因子结合。MEF2因子是MADS-box超家族蛋白一员, 是哺乳动物生肌调控基因 $MyoD$ 的重要下游调控因子。Potthoff等^[14]在脊椎动物骨骼肌细胞的研究中发现, MEF2与bHLH结构的转录因子协同调控肌肉基因的表达并起始生肌分化, MEF2转录因子在骨骼肌细胞的增殖、分化及凋亡中起调控作用。Cunha等^[15]研究发现, 锌指结构转录因子lame duck(lmd)与MEF2因子物理性协同结合, 使MEF2更紧密地作用在肌肉特异性基因启动子MEF-2元件上并驱使肌管融合, 突变lmd或MEF2后均阻碍肌管的融合。

2.4 Trex/MEF-3元件

TreX结合序列为5'-[G/C/T][A/G/C]NGAT[A/G]G[G/C/T][G/C/T]-3', MEF-3元件核心序列为5'-TC-AGGTT-3', Trex/MEF-3复合元件核心序列为5'-[C/A]ACC[C/T]GA-3'。Himeda等^[16]通过蛋白质组学研究发现, 小鼠MCK启动子上的Trex元件、MEF-3元件以及Trex/MEF-3复合元件可被反式作用因子Six4

特异性结合。Aziz等^[17]报道Six4在成体骨骼肌细胞中能够激活肌肉特异性基因 $MyoD$ 的表达。这也证实了Six4是调控成体骨骼肌肌肉基因表达的重要调控因子。Trex元件是肌肉MCK增强子的一个正调控位点。Himeda等^[16]通过培养小鼠成肌细胞和转基因实验研究, 证明Trex在骨骼肌和心肌中对MCK的表达至关重要。MEF-3存在于多种肌肉特异性基因的调控区域, 具有高度保守性。

Xu等^[18]克隆并分析了鳐鱼肌肉特异性基因 $Myogenin$ 的启动子序列, 发现MEF-1和MEF-2结合位点彼此相邻, 共同激活肌肉特异性基因的转录, 与目前公认的MyoD的碱性氨基酸区域与MEF2结合、共同激活肌肉特异性基因转录这一理论相吻合。缺失克隆斑马鱼的 $Myogenin$ 启动子片段, 发现转录起始位点上游550 bp的启动子序列对于肌肉的特异性表达起核心作用。序列分析发现, 该缺失启动子中含有高度保守的MEF2和MEF3结合位点。对斑马鱼体内注射该启动子片段指导绿色荧光蛋白GFP表达的重组质粒, 发现斑马鱼骨骼肌中有GFP的表达。可预测, 这种斑马鱼 $Myogenin$ 启动子中含有MEF2和MEF3结合位点, 能为鱼肌肉DNA疫苗的制备和鱼肌肉生长、发育的改善提供依据, 成为肌肉基因直接注射的有效工具。因此, 保守的MEF2和MEF3位点以及它们作用机制的确定, 在肌肉特异性启动子中具有重要作用。

克隆分析斑马鱼 $Myogenin$ 启动子, 发现MEF-3元件与MEF-1、MEF-2元件协同调控肌肉特异性基因 $Myogenin$ 的表达, 突变任何一种元件都会影响斑马鱼肌肉的分化。

2.5 M-CAT元件(TEF-1元件)

M-CAT元件(TEF-1元件), 其核心序列为5'-CAT-TCCT-3', 是转录增强因子TEF-1结合的特异性元件。M-CAT位于骨骼肌 α -actin、心肌肌钙蛋白T、心肌 α -和 β -肌球蛋白重链的启动子/增强子中, 可以介导肌肉特异性基因的转录。转录增强因子TEF-1结合M-CAT元件调节骨骼肌、心肌、平滑肌的发育。Anbanandam等^[19]敲除小鼠 $TEF-1$ 基因, 结果发现小鼠肌肉发育缺陷, 严重的会导致胚胎致死。这证明了 $TEF-1$ 因子在介导含有M-CAT元件的肌肉特异性基因的表达中具有重要作用。Koivisto等^[20]定点突变B型利尿肽(BNP)启动子中的M-CAT元件, 并与荧光素酶报告基因构建重组质粒, 体外转染新生大鼠的心肌细胞, 结果发现突变后的BNP启动子活性降

低到正常启动子活性的88%，心肌细胞的伸缩性也降低到原来的58%且差异性显著，这证明，M-CAT元件对启动子的活性具有重要作用。Yoshida^[21]克隆并分析鼠 β -MyHC启动子上游600 bp碱基序列，发现含有两个M-CAT元件，它们对于鼠 β -MyHC基因肌肉特异性表达发挥重要作用。定点突变这两个M-CAT元件的核心序列，小鼠肌肉 β -MyHC基因的转录特异性和活性均有不同程度的降低。这也证明了在依赖M-CAT元件的启动子中，其核心序列会促进细胞特异性转录并提高启动子的转录活性。

2.6 MPEX元件、CACCC盒

在不同物种中MPEX元件和CACCC盒这两种元件具有不同的核心序列，是反式作用因子KLF3的结合元件。Himeda等^[22]通过染色质免疫共沉淀技术研究发现，MPEX元件存在于小鼠、人、猫、狗、牛的MCK启动子中，是一种富含GC序列的转录调控元件，与转录因子KLF3结合。KLF3是锌指转录因子(krupple-like factor, KLF)家族中的一员。哺乳动物KLFs转录因子家族一共有17个成员，存在于多种类型细胞中，大多数KLFs家族蛋白成员可以结合CACCC盒。Kitamura等^[23]序列分析和凝胶移动电泳发现，小鼠Wee1蛋白激酶基因启动子含有多个CACCC盒，其中，处于第一、三、四位置的CACCC盒可与KLF3物理性结合。荧光报告基因转染实验发现，过表达小鼠KLF3会导致Wee1 mRNA表达量降低。敲除Wee1启动子中第一个和第四个CACCC盒，KLF3的抑制作用明显降低，这证明KLF3具有抑制Wee1基因表达的作用。Himeda等^[22]染色质免疫共沉淀分析发现，KLF3富含在许多肌肉基因的启动子中(如MCK、Myosin heavy chain II、Six4、Calcium channel receptor α -1和 α -actin)。KLF3可与SRF物理性结合，协同激活肌肉特异性基因的转录表达。这两种结合方式，一种是KLF3富集在CACCC盒上，KLF3的N末端抑制结构域(氨基酸1~90)被SRF的MADS结构域 α 螺旋I占据后，会形成KLF3-SRF复合物，此时，KLF3激活肌肉基因的转录表达；另一种是SRF的MADS结构域 α 螺旋I结合在启动子SRE元件上后，KLF3与SRF的MADS结构域 α 螺旋II结合，协同激活肌肉基因的转录表达。有趣的是，当KLF3与CACCC盒结合后，若其N末端抑制结构域(氨基酸1~90)被C末端结合蛋白2(C terminal binding protein 2, CtBP2)或4个半LIM结构域蛋白3(four-and-a-half

LIM domain protein 3, FHL3)占据后，KLF3会抑制肌肉特异性基因的转录。Black等^[24]报道KLF3的这种正/负转录调控作用在KLF3、KLF4、KLF5、KLF10、KLF11中均有发现。Himeda等^[22]和Haldar等^[25]两个小组报道，KLFs家族蛋白成员KLF4、KLF5、KLF13、KLF15在哺乳动物平滑肌和心肌中表达，成员KLF3、KLF6、KLF13、KLF15在骨骼肌中表达，这些因子在肌肉中的调控机理和潜在的功能还需要深入研究。

2.7 Pax3/7元件

Pax3/7元件，其核心序列为5'-GTAAC-3'，与反式作用因子Pax3和Pax7复合物结合。Pax3/7元件主要存在于生肌调控因子MRF基因的启动子上游调控区域，起始MRF基因的表达，在胚胎的骨骼肌发育中起关键性作用。Buckingham等^[26]在成年大鼠肌肉中过表达MyoD基因，Real-time PCR检测出Pax3/7复合物mRNA的表达量也随之升高。可推断，Pax3/7复合物表达量的提高可以促进生肌调控因子MRF指导肌卫星细胞的激活、增殖并分化为肌纤维。Kuang等^[27]测定正常成年大鼠肌肉中Pax3/7复合物mRNA的表达量很低，但肌肉注射心肌毒素后，在化学损伤的成年鼠肌肉中Pax3/7复合物mRNA的表达量显著增加，Western blot分析Pax3/7蛋白表达量也有显著提高。可推断，成体骨骼肌中Pax3/7复合物具有肌肉再生和修复的潜在功能。但是，Hu等^[28]通过免疫共沉淀技术，发现Pax3/7复合物和FoxO3因子协同激活C2C12成肌细胞中MyoD的表达，调控骨骼肌细胞的分化。RNAi抑制小鼠FoxO3基因的表达，发现成年小鼠肌肉再生过程中MyoD mRNA的表达量降低。可推测，Pax3/7复合物在肌肉中并不是单独起作用的，它需要和其他的转录因子共同起作用。综上所述，研究Pax3/7元件的分子作用机制，对进一步增加生肌调控因子的表达量，从而一定程度上增加肌纤维长度、周径和数量，最终提高肌肉的生成率具有重要的作用。

3 人工合成肌肉启动子的方法的建立及应用

3.1 人工合成肌肉启动子的方法的建立

1999年，Li等^[29]通过对一些肌肉强启动子中调控元件组成的分析，考虑顺式调控元件和其反式调控因子的相互作用，根据骨骼肌 α -actin启动子在肌

肉组织中特异性启动外源基因表达的这一特性, 以鸡骨骼肌 α -actin启动子SK 144 bp核心片段为基础, 将SRE、TEF-1、MEF-1、MEF-2元件按1:1:1:1或1:1:1:4

摩尔比例混合, 构建出含有不同元件组合的合成启动子文库。最终筛选出高表达的肌肉特异性合成启动子SPc5-12(图1)。具体筛选过程如下:



图1 人工合成启动子SPc5-12的调控元件组合种类、数量及方向^[26]

Fig.1 The variety, quantity and orientation of control elements in the artificial synthetic promoter SPc5-12^[26]

首先, 筛选体内/体外活性较高的肌肉合成启动子。瞬时转染鸡的早期成肌细胞, 检测荧光素酶活性。结果发现合成启动子文库中的克隆体, 如c1-28、c5-12、c5-1、c5-5等分别在体外/体内具有较高的活性。肌肉特异性调控元件在体外和体内的表达活性并不一致, 为筛选体内外表达活性相对最高的启动子, Li等^[29]进行了小鼠体内肌肉注射实验。将体外活性较高的两种合成启动子(SPc1-28和SPc5-12)、SK448启动子和巨细胞病毒CMV启动子分别构建的重组质粒, 注射到ICR小鼠的胫骨前肌中。一周后, 发现注射了SPc5-12重组质粒的小鼠肌肉中蛋白表达水平远高于SK448和SPc1-28指导的蛋白表达水平, SPc5-12与CMV转录活性相似。证实了合成启动子SPc5-12在体外和体内的高表达活性。

其次, 检测SPc5-12合成启动子的肌肉特异性。肌肉注射后得到的转基因小鼠携带SPc5-12启动子调控的核定位信号大肠杆菌beta-gal, 处死五周龄不同样本的转基因小鼠。Northern blot分析显示, 在所有SPc5-12转基因小鼠阳性品系中, beta-gal转录物仅在肌肉和心脏中表达; 在非肌肉器官中未检测到beta-gal的表达。组织学上观察发现, 含有beta-gal阳性信号的核存在于肌纤维中, 但在同窝对照组小鼠的肌纤维中并不存在。这些实验说明了人工合成启动子SPc5-12具有肌肉特异性。

除了利用启动子的转录调控元件合成人工肌肉启动子文库以外, 近年来, 人们利用基因的增强子和启动子的重新组合, 构建并筛选了特异性高表达的合成启动子。2008年, Wang等^[30]将片段c5-12与肌肉肌酸激酶(MCK)增强子206 bp重组构建312 bp的肌肉合成启动子, 结果发现与MCK增强子相比, c5-12能够提高MCK增强子的转录活性, 在小鼠骨骼肌及心肌细胞中的表达活性提高2~3倍, 但在小鼠成

纤维细胞中并未发现此优势。这进一步证实了人工合成肌肉特异性且高表达活性启动子的可能。

应用肌肉特异性转录调控元件人工组合这一新策略, 可以筛选出具有活性的器官特异性启动子/增强子片段, 这些片段比天然启动子/增强子的活性更具持久性和增强性。并且, 应用转录调控元件的组合, 设计合成启动子/增强子的方式比以前重组质粒DNA表达载体的方法具有显著改进。然而, 体外实验获得的活性肌肉合成启动子, 仍需在体内鉴定并筛选最适合生物体的合成启动子。

3.2 人工合成肌肉启动子的应用

Li等^[29]合成的启动子可以指导产生满足治疗水平的分泌性蛋白。将人生长激素释放激素(hGHRH) cDNA分别克隆到SPc5-12和鸡骨骼肌 α -actin(SK448)启动子的下游, 分别对成年小鼠肌肉注射等量的SPc5-12-GHRH和SK-GHRH质粒。hGHRH刺激垂体前叶分泌内源性生长素(endogenous growth hormone, mGH), 7天后使用特异的放射免疫分析法测定小鼠血清中的生长素(mGH)。结果发现, 注射了SPc5-12-GHRH的小鼠血清中生长素(mGH)表达水平是注射SK-GHRH小鼠的5倍。实验证明, 人工合成的肌肉启动子可以优化用于基因治疗的质粒DNA载体以及其他转基因方法, 增加治疗性蛋白质的产生, 如激素、凝血因子、疫苗或是神经营养因子等, 以便机体更好地利用。

Draghia-Akli等^[31]将骨骼肌 α -actin启动子(SK)和猪生长激素释放激素(GHRH) cDNA构建重组质粒, 对猪进行肌肉注射SK-GHRH表达载体, 两周后发现猪的体重增加10%。

目前, 人工合成的肌肉特异性启动子主要的应用领域有: 在转基因动物研究中, 人工合成的肌肉特异性启动子是外源基因在肌肉中特异性表达的重要

工具; 在临床医学治疗中, 利用肌肉特异性合成的启动子可起始外源基因的定向表达从而靶向治疗肌肉性疾病; 在家畜的肉用性状研究中, 合成的肌肉特异性启动子能在分子水平上指导基因在肌肉中的表达, 从而为肌肉的增殖和分化的分子机理的研究提供新工具。

4 小结及展望

肌肉特异性基因启动子的上游转录调控元件在动物成体肌肉及早期胚胎发育研究中已经取得了一定的成果, 在人工合成肌肉启动子中已被应用, 但仍有一些方面需要探讨: (1)研究成体肌肉和早期胚胎肌肉中特异性调控元件的体内作用机制, 以便更有效地利用肌肉转录调控元件; (2)如何对肌肉转录调控元件的种类、数目和相对位置进行有效组合, 以便在肌肉细胞和动物整体水平中提高外源基因表达的活性和特异性; (3)尽快建立一套完善、标准的肌肉转录调控元件的研究方案。

目前, 尽管合成了一些肌肉特异性高表达活性的启动子, 但对肌肉特异性转录调控元件的组合与核心启动子的改造还处于初期研究阶段。随着该研究的不断发展和完善, 必将成为动物肌肉发育研究的强有力工具, 为研究肌肉特异性基因的表达和肌肉增殖、分化机制提供理论依据, 为提高家畜农产品肉产量的研究提供重要帮助, 为外源基因的特异性表达和临床医学中靶向治疗肌肉性疾病提供理论依据, 为转基因方法及转基因动物的研究提供新的手段。综上所述, 对肌肉特异性启动子调控元件的研究具有重要的应用价值。

参考文献 (References)

- 1 Kim TH, Barrera LO, Qu C, van Calcar S, Trinklein ND, Cooper SJ, *et al.* Direct isolation and identification of promoters in the human genome. *Genome Res* 2005; 15(6): 830-9.
- 2 Sandelin A, Carninci P, Lenhard B, Ponjavic J, Hayashizaki Y, Hume DA. Mammalian RNA polymerase II core promoters: Insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 2007; 8(6): 424-36.
- 3 Skarli M, Kiri A, Vrbova G, Lee CA, Goldspink G. Myosin regulatory elements as vectors for gene transfer by intramuscular injection. *Gene Ther* 1998; 5(4): 514-20.
- 4 Hagstrom JN, Couto LB, Scallan C, Burton M, McClelland ML, Fields PA, *et al.* Improved muscle-derived expression of human coagulation factor IX from a skeletal actin/CMV hybrid enhancer/promoter. *Blood* 2000; 95(8): 2536-42.
- 5 Zhu T, Zhou L, Mori S, Wang Z, McTiernan CF, Qiao C, *et al.* Sustained whole-body functional rescue in congestive heart failure and muscular dystrophy hamsters by systemic gene transfer. *Circulation* 2005; 112(17): 2650-9.
- 6 Goodrich JA, Tjian R. Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation. *Nat Rev Genet* 2010; 11(8): 549-58.
- 7 Lee TC, Shi Y, Schwartz RJ. Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal alpha-actin transcription in embryonic myoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(20): 9814-8.
- 8 Pagel JI, Deindl E. Early response 1-a transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian J Biochem Biophys* 2011; 48(4): 226-35.
- 9 Chow KL, Schwartz RJ. A combination of closely associated positive and negative cis-acting promoter elements regulates transcription of the skeletal alpha-actin gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10(2): 528-38.
- 10 Lahoute C, Sotiropoulos A, Favier M, Guillet-Deniau I, Charvet C, Ferry A, *et al.* Premature aging in skeletal muscle lacking serum response factor. *PLoS One* 2008; 3(12): e3910.
- 11 Kim JR, Kee HJ, Kim JY, Joung H, Nam KI, Eom GH, *et al.* Enhancer of polycomb1 acts on serum response factor to regulate skeletal muscle differentiation. *J Biol Chem* 2009; 284(24): 16308-16.
- 12 Weintraub H, Davis R, Lockshon D, Lassar A. MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: Occupancy of two sites is required for activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(15): 5623-7.
- 13 Kanatous SB, Mammen PP. Regulation of myoglobin expression. *J Exp Biol* 2010; 213(Pt 16): 2741-7.
- 14 Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: A central regulator of diverse developmental programs. *Development* 2007; 134(23): 4131-40.
- 15 Cunha PM, Sandmann T, Gustafson EH, Ciglar L, Eichenlaub MP, Furlong EE. Combinatorial binding leads to diverse regulatory responses: Lmd is a tissue-specific modulator of Mef2 activity. *PLOS Genet* 2010; 6(7): e1001014.
- 16 Himeda CL, Ranish JA, Angello JC, Maire P, Aebersold R, Hauschka SD. Quantitative proteomic identification of six4 as the trex-binding factor in the muscle creatine kinase enhancer. *Mol Cell Biol* 2004; 24(5): 2132-43.
- 17 Aziz A, Liu QC, Dilworth FJ. Regulating a master regulator: Establishing tissue-specific gene expression in skeletal muscle. *Epigenetics* 2010; 5(8): 691-5.
- 18 Xu P, Tan X, Zhang Y, Zhang PJ, Xu Y. Cloning and expression analysis of myogenin from flounder (*Paralichthys olivaceus*) and promoter analysis of muscle-specific expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007; 147(1): 135-45.
- 19 Anbanandam A, Albarado DC, Nguyen CT, Gao X, Veeraraghavan S. Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(46): 17225-30.
- 20 Koivisto E, Karkkola L, Majalahti T, Aro J, Tokola H, Kerkela R, *et al.* M-CAT element mediates mechanical stretch-activated transcription of B-type natriuretic peptide via ERK activation. *Can J Physiol Pharmacol* 2011; 89(8): 539-50.
- 21 Yoshida T. Development and disease MCAT elements and the

- TEF-1 family of transcription factors in muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(1): 8-17.
- 22 Himeda CL, Ranish JA, Pearson RC, Crossley M, Hauschka SD. KLF3 regulates muscle-specific gene expression and synergizes with serum response factor on KLF binding sites. *Mol Cell Biol* 2010; 30(14): 3430-43.
- 23 Kitamura T, Suzuki H, Tamura TA. Mouse Wee1 gene is repressed by krüppel-like factor 3 (KLF3) via interaction with multiple upstream elements. *Gene* 2012; 492(2): 361-7.
- 24 Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 2001; 188(2): 143-60.
- 25 Haldar SM, Ibrahim OA, Jain MK. Kruppel-like factors (KLFs) in muscle biology. *J Mol Cell Cardiol* 2007; 43(1): 1-10.
- 26 Buckingham M, Relaix F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 645-73.
- 27 Kuang S, Chargé SB, Seale P, Huh M, Rudnicki MA. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol* 2006; 172(1): 103-13.
- 28 Hu P, Geles KG, Paik JH, DePinho RA, Tjian R. Co-dependent activators direct myoblast specific MyoD transcription. *Cell* 2008; 15(4): 534-46.
- 29 Li X, Eastman EM, Schwartz RJ, Draghia-Akli R. Synthetic muscle promoters: Activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotech* 1999; 17(3): 241-5.
- 30 Wang B, Li J, Fu FH, Chen C, Zhu X, Zhou L, *et al.* Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther* 2008; 15(22): 1489-99.
- 31 Draghia-Akli R, Li X, Schwartz RJ. Enhanced growth by ectopic expression of growth hormone releasing hormone using an injectable myogenic vector. *Nat Biotechnol* 1997; 15(12): 1285-9.

Progress of Upstream Transcriptional Control Elements in Promoters of Skeletal Specific Genes

Zhao Dandan, Liu Congcong, Jia Mingyu, Yang Yue, Ye Feng, Yan Yunqin*
(College of Life Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract The promoter of eukaryote, which is a short segment of DNA including core promoter and upstream transcriptional control element which regulates the strength and specificity of expression of genes, has been located at 5' upstream of a gene. The specificity of a muscle specific gene is determined by the variety, the quantity and the sequence of upstream control elements on muscle specific promoters. The further understanding of the mechanism of a gene expression would be gained by further studying upstream control elements of muscle promoters, and would lay a theoretical foundation for the study of the improvement of muscle traits, the mechanism of proliferation and differentiation, and the gene therapy of disease. In this paper, we review the new discoveries in the area of studying the artificial synthetic promoter, which includes the molecule mechanism of the transcriptional control element on the muscle specific promoter, and the method or application of establishing the artificial synthetic promoter, and we discuss the urgent problem and the development prospect which would be solved in this area.

Key words muscle specific promoter; transcriptional control element; artificial synthetic promoter

Received: January 7, 2012 Accepted: February 29, 2012

This work was supported by the Important Project of the New Breeding of Transgenic Animals (No.2008ZX08007-002)

*Corresponding author. Tel: 86-451-55190846, E-mail: yanyunqin@sohu.com