

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00347

## EN1 调节 *UTROPHIN* 表达机制

王谦<sup>1,3</sup>, 曹东华<sup>2</sup>, 林长坤<sup>3</sup>, 王正东<sup>3</sup>, 崔婉婷<sup>3</sup>, 金春莲<sup>3</sup>

1. 中国医科大学高职学院, 沈阳 110001;
2. 中国人民解放军第二〇二医院检验科, 沈阳 110003;
3. 中国医科大学基础医学院医学遗传学教研室, 沈阳 110001

**摘要:** 为了探讨人类 *UTROPHIN* 蛋白表达上调的可能因素, 文章利用 P-match 软件预测人类 *UTROPHIN* 基因启动子区域可能的调控元件, 应用 CHIP 和 EMSA 实验加以验证, 并利用 RNA 干扰和荧光定量 PCR 的方法分析人类 EN1 转录因子调节 *UTROPHIN* 表达的作用机制。经 P-match 软件预测, *UTROPHIN* 基因启动子区域有 2 个转录因子 EN1 的可能结合位点, 经 CHIP 和 EMSA 实验证实位点 2 是真正结合位点。通过 RNA 干扰实验, 发现在 HeLa 细胞中 *EN1* 基因沉默后, 可使 *UTROPHIN* mRNA 水平上调。以 *UTROPHIN* 蛋白为靶点可能为 DMD(Duchenne muscular dystrophy)基因治疗提供一种新的策略。

**关键词:** *UTROPHIN* 蛋白; EN1 转录因子; RNA 干扰; 荧光定量 PCR

## The regulation of *UTROPHIN* expression by EN1

WANG Qian<sup>1,3</sup>, CAO Dong-Hua<sup>2</sup>, LIN Chang-Kun<sup>3</sup>, WANG Zheng-Dong<sup>3</sup>,  
CUI Wan-Ting<sup>3</sup>, JIN Chun-Lian<sup>3</sup>

1. Higher Profession School, China Medical University, Shenyang 110001, China;
2. No.202 Hospital of People's Liberation Army, Shenyang 110003, China;
3. Department of Medical Genetics, China Medical University, Shenyang 110001, China

**Abstract:** To investigate possible factors up-regulating the expression of *UTROPHIN*, potential regulatory elements in the promoter of the human *UTROPHIN* was predicted by P-match software and verified by EMSA and ChIP. The mechanism of EN1 regulation of the human *UTROPHIN* expression was evaluated by RNA interference and real-time PCR analyses. Two potential EN1 binding sites in *UTROPHIN* promoter region were predicted by P-Match software but only the second site was verified to interact directly with EN1 by EMSA and ChIP. The results from RNA interference and real-time PCR showed that the mRNA level of *UTROPHIN* increased in HeLa cells after EN1 was knockdowned by siRNA. It indicated that *EN1* might be a negative regulatory factor for *UTROPHIN*. Our study suggested that *UTROPHIN* might be a new target for DMD therapy.

**Keywords:** *UTROPHIN*; EN1; RNA interference; Real-time PCR

收稿日期: 2010-08-23; 修回日期: 2010-11-25

基金项目: 国家十一五攻关课题项目(编号: 2006BAI05A08)资助

作者简介: 王谦, 博士, 讲师, 研究方向: 遗传病的分子遗传学研究及产前基因诊断。E-mail: wangqian529@163.com

通讯作者: 金春莲, 教授, 研究方向: 遗传病的分子遗传学研究及产前基因诊断。E-mail: jchlcmu@126.com

自从法国医学家 Guillaume-Benjamin-Amand Duchenne 于 1861 年首次详细描述 Duchenne 型肌营养不良(DMD)以来,不少临床医学家和遗传学家对该病进行了系统而深入的研究,虽然已在诊断和遗传咨询方面取得了重大进展,但是仍然无法阻止患者进行性加重的肌萎缩和在 20 岁左右死亡的命运。近年来对 Duchenne 型肌营养不良患者的治疗有了新的进展,在方法学上也有所创新,有些已开始进入临床研究阶段,如基因治疗领域中的外显子剪接(Exon skipping)治疗<sup>[1,2]</sup>、腺相关病毒(Adeno-associated viruses, AAV)载体介导的 *DYSTROPHIN* 小基因(Mini gene)治疗<sup>[3]</sup>、越过 *DYSTROPHIN* 基因异常终止密码(Read through)的治疗<sup>[4]</sup>、肌肉注射全长 *DYSTROPHIN* 基因 cDNA 质粒的治疗<sup>[5]</sup>、细胞移植治疗领域中的骨髓干细胞移植治疗<sup>[6,7]</sup>、成肌细胞移植治疗<sup>[8,9]</sup>、药物治疗领域中的增加 *UTROPHIN* 表达的治疗<sup>[10,11]</sup>、蛋白酶抑制治疗和胰岛素样生长因子治疗等<sup>[12]</sup>。目前,最为紧迫的问题就是如何寻找一种替代蛋白,此蛋白在体内的过量表达可补偿因 *DYSTROPHIN* 缺失而造成的伤害。而 *DYSTROPHIN* 相关蛋白—*UTROPHIN* 的发现<sup>[13]</sup>,恰恰为这种方法开辟了道路。

*UTROPHIN* 是人常染色体 6q24 上的一个基因,其 mRNA 长度为 13 kb,相对分子量约为 400 kDa。*UTROPHIN* 与 *DYSTROPHIN* 在氨基酸序列上有很大的同源性,它们都含有 4 个不同的结构区: N-端区,含同源重复顺序的棒状区,富含半胱氨酸区和 C-端区。N-端区的前 250 个氨基酸推测为肌动蛋白结合部位,二者在此区氨基酸序列同源。*UTROPHIN* 和 *DYSTROPHIN* 的 C-端区之间比较,发现二者在此区高度保守,氨基酸之间有 80% 能精确匹配,并且剩下的残基中约有一半是保守的。*DYSTROPHIN* 的部分 C-端区与相邻的富含半胱氨酸区参与 *DYSTROPHIN* 与糖蛋白复合物的结合<sup>[14]</sup>。C-端区的缺失往往会产生严重的 DMD 症状<sup>[15]</sup>,说明此区对维持 *DYSTROPHIN* 的功能十分重要。*UTROPHIN* 与 *DYSTROPHIN* 此区间的强烈保守性预示了 *UTROPHIN* 可能在 *DYSTROPHIN* 缺失的肌肉中以与 *DYSTROPHIN* 相似的方式结合到肌纤维膜上。正是由于氨基酸序列的高度同源性及结构相似性,*UTROPHIN* 才能像 *DYSTROPHIN* 一样结合肌动蛋白,并且随后发挥与 *DYSTROPHIN* 相似的功能<sup>[16]</sup>。

随着分子生物学研究的不断深入,*UTROPHIN* 被认为是基因治疗 DMD 非常有希望的替代物。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞系购自上海中科院细胞库。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

人宫颈癌 HeLa 细胞在 1640 培养基(10%胎牛血清, 100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素)、37℃、5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的条件下培养。0.25% 的胰酶(生理盐水配制)消化传代。

#### 1.2.2 *UTROPHIN* 启动子结构及活性分析

登陆 [www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/) 网址获取人 *UTROPHIN* 基因上游 1 500 bp 序列的信息,利用相关文献<sup>[17,18]</sup>及 P-MATCH 软件预测 *UTROPHIN* 基因 5' 上游序列转录因子的结合位点。

#### 1.2.3 染色质免疫沉淀(CHIP)

CHIP 实验是研究体内蛋白和 DNA 相互作用的有用工具,通过该技术研究者可以得到目的蛋白在活体细胞中与 DNA 的绑定情况以及相关组蛋白的修饰位点。培养的细胞在实验之前 12 h 换液,5 mL 定容。严格按照 CHIP 试剂盒(Active Motif 公司)操作步骤进行操作。实验管加入 5 mg EN1 抗体,阴性对照管中加入 5 mg Sox9 抗体。4℃ 摇床孵育过夜,用 CHIP 清洗液清洗 3 遍,65℃ 反交联 5 h,离心取上清,加入蛋白酶 K,42℃ 孵育 2 h,回收 DNA,进行 PCR 扩增。同时以 Input DNA 为对照,来验证 HeLa 细胞中是否有 *UTROPHIN* 基因表达;以 HeLa 细胞提取 DNA 为模板进行 PCR 扩增,作为 PCR 实验阳性对照。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 然后按 94℃ 50 s, 52℃ 50 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。CHIP 实验所用 PCR 引物序列见表 1。

#### 1.2.4 凝胶阻滞实验(EMSA)

化学合成含有 EN1 结合位点 2 的 DNA 序列 ctgacccgggaacGTAGTGGgctgatctccg(大写字母为结合位点)作为探针。3 生物素标记探针,按照说明书

表 1 染色质免疫沉淀实验及荧光定量 PCR 实验中所用的引物

染色质免疫沉淀实验中所用的引物及序列(5' 3')		荧光定量 PCR 实验中所用的引物及序列(5' 3')	
<i>UTROPHIN1</i>	F: TGGGGTGAGTTGGAAGGC	<i>EN1</i>	F: GCACCAGGAAGCTGAAGAAG
<i>UTROPHIN1</i> rev	R: GGAGACCGAACCAGAATG	<i>EN1</i> rev	R: TCCGTGATGTAGCGGTTTG
<i>UTROPHIN2</i>	F: CGCAGTCAGGTGACTTGGG	<i>UTROPHIN</i>	F: TTGAGGGCAGTGAGCCTATT
<i>UTROPHIN2</i> rev	R: CCAGATGAGAAGGGTGCAGAT	<i>UTROPHIN</i> rev	R: TGCACCAATCTTCAGTCCAG
		<i>β-actin</i>	F: CCCAGAGCAAGAGAGGCA
		<i>β-actin</i> rev	R: GGGAGCCACACGCAG

进行操作。取培养的 HeLa 细胞,应用核蛋白提取试剂盒(Pierce 公司)于实验前提取核蛋白。EMSA 体系按照比例配制后进行电泳,转膜,检测。

1.2.5 RNA 转染

本实验所有指标检测都按如下分组:实验中以 PBS 代替转染剂和 siRNA 混合物设置为空白对照组(Control),转染无义序列 siRNA 组(Nonsense siRNA),转染 *EN1*-1 siRNA、*EN1*-2 siRNA 组。然后进行 siRNA 的转染(按照说明书进行)。

1.2.6 Real-Time PCR 检测 RNA 干扰后 *EN1* 及 *UTROPHIN* 基因 mRNA 的表达水平

用反转录试剂盒(Promega)将总 RNA 反转录成 cDNA 第一链。反应总体积为 20 μL,反应条件为:42 ℃ 孵育 60 min,99 ℃ 5 min 终止反应,4 ℃ 5 min 灭活反转录酶。

参考 GenBank 中人 *EN1*、*UTROPHIN* 基因 cDNA 序列,应用 Primer3 软件设计引物,进行 PCR 扩增。所用的引物序列见表 1。

实时荧光定量 PCR 在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上进行,反应总体积 12.5 μL,包括 cDNA(约 20 ng/μL),1.0 μL;2×SYBR Green PCR mastermix,6.25 μL; Primer mix,4.0 μL; 无菌水,1.25 μL。反

应条件:50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,40 次循环。加溶解曲线阶段:95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s。每个标本重复测量两次,采用标准曲线法分析所得数据。

2 结果与分析

2.1 *UTROPHIN* 基因上游序列存在 *EN1* 的可能结合位点

利用 P-MATCH 软件预测转录因子的结合位点,结果预测到了 2 个 *EN1* 的结合位点(分别命名为 *EN1* binding site 1 和 *EN1* binding site 2,以后简称位点 1 和位点 2)。提示 *EN1* 可能通过这些结合位点发挥转录调节作用。如图 1 所示。

2.2 在 HeLa 细胞中 *EN1* 直接和 *UTROPHIN* 基因上游序列结合

我们应用染色质免疫沉淀技术验证在细胞内 *EN1* 和 *UTROPHIN* 基因上游序列的结合作用。外源表达了 *EN1* 的 HeLa 细胞的染色质经交联和酶切割后应用 *EN1* 抗体进行免疫沉淀。以转录起始点上游-7 000 bp 左右一段 240 bp 长的序列作为内对照,发现沉淀的染色质中有位点 2 的扩增,无位点 1 的扩增,无对照位点的扩增。表明 *EN1* 在体内可以和位点 2 结合。



图 1 *UTROPHIN* 基因 5'上游序列包含 *EN1* 可能的结合位点 *UTROPHIN* 基因启动子区域的核酸序列。灰框所示为 *EN1* 结合位点。

### 2.3 体外 EN1 直接和 *UTROPHIN* 基因上游序列结合

应用凝胶阻滞实验在体外验证 EN1 和位点 2 的结合作用, 当 EN1 蛋白质存在时出现阻滞的 DNA-蛋白质复合物, 当加入 EN1 抗体时出现超阻滞条带(图 2)。证明在体外 EN1 和位点 2 可以直接结合。

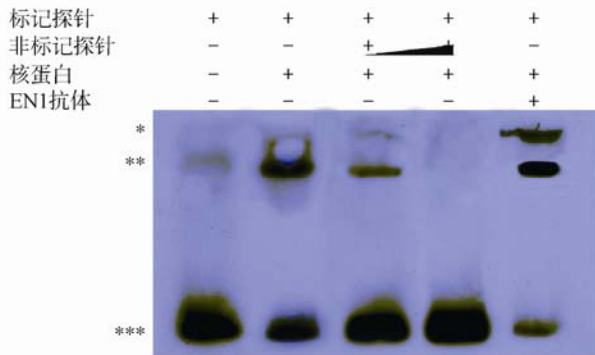


图 2 位点 2 的凝胶阻滞实验结果

“\*\*\*”所指为生物素标记的游离探针, “\*\*”为 EN1-DNA 复合物, “\*”为 EN1-EN1 抗体-DNA 复合物。

### 2.4 RNA 干扰

转染 HeLa 细胞 6 h 后观察转染效率(图 3)。在荧光显微镜下所见, 转染阳性细胞可看绿色荧光(图 3A); 在同一相差显微镜下所见, 可看到全部细胞(图 3B)。转染效率在 70%以上, 可满足实验的要求。

### 2.5 qRT-PCR 检测 RNA 干扰后目的基因的 mRNA 表达

检测转染后 *EN1* mRNA 在 HeLa 细胞系中的表达。转染 *EN1-2* siRNA 组 *EN1* 的 mRNA 拷贝数和 *EN1-1* siRNA 组及无义序列组相比明显降低, 说明转染 *EN1-2* siRNA 的 HeLa 细胞内 *EN1* mRNA

的表达明显受到抑制。

检测转染后 *UTROPHIN* mRNA 在 HeLa 细胞系中的表达。转染 *EN1-1* siRNA 组 *UTROPHIN* mRNA 表达变化不明显。转染 *EN1-2* siRNA 组, 可见 *UTROPHIN* 表达量明显升高(图 4)。

## 3 讨论

脊椎动物 *en* 基因有 *en1*、*en2* 两个成员, 人类的 *EN1* 基因定位于 2q13-q21。包括 2 个外显子和 1 个内含子, 编码序列长 1 179 bp。EN1 蛋白由 392 个氨基酸构成。在果蝇的体节分化中有重要作用。1989 年 Logan 等<sup>[19]</sup>克隆出的与人同源的小鼠 *en1* 和 *en2* 同源盒发现其与果蝇 *en1* 基因高度同源。1992 年 Logan 等<sup>[20]</sup>又发现 *en1* 蛋白可能在外胚层, 随后在神经发生中发挥重要作用。*EN* 基因表达很早(自 E8 开始), 在很多组织中有表达, 其中包括组织肌肉, 而且在成年中脑神经元中持续表达。

全长 *UTROPHIN* 蛋白同源产物为 A 和 B, 它们转录的初始不同, 由启动子 A 和 B 转录。启动子 A 位于 5' 末端的一个甲基化敏感 CpG 岛内, 第 1 外显子是非编码的。启动子 B 位于第 2 内含子内, 第 3 外显子以后的 mRNA 两者是相同的<sup>[21]</sup>。目前所知, *UTROPHIN* A 和 B 在许多组织中是独立调节并且共表达。应用 *UTROPHIN* A 和 B 的特异性抗体发现 *UTROPHIN* B 严格限定于各种组织的血管平滑肌层和内皮层, 认为是局限于血管内皮的 *UTROPHIN* 蛋白同型异构体; *UTROPHIN* A 位于 NMJ 和周围神经, 还主要存在于大血管平滑肌, 细动脉也有少量存在, 在其他组织, 如肾小球丛和皮质肾小管、脉络膜丛和软脑膜也有分布。mdx 小鼠(DMD 模型

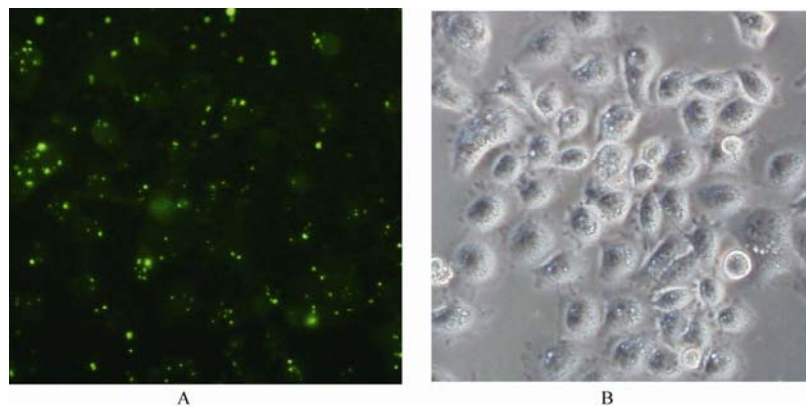


图 3 转染效率对比图

A: 为 20 倍荧光显微镜下转染后 6h 的细胞; B: 为同一相差显微镜下细胞。



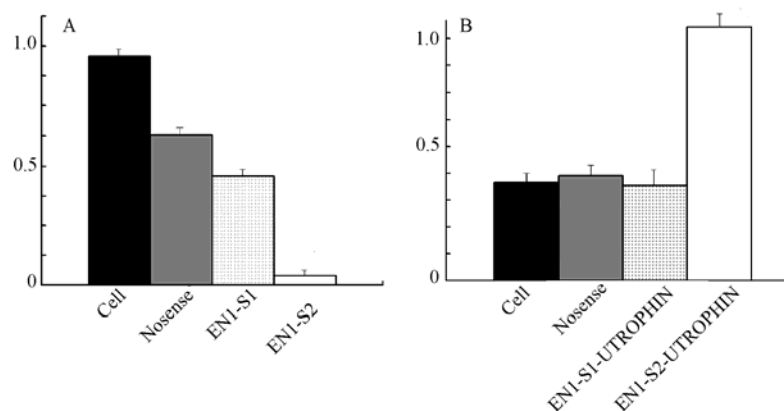


图4 RNA干扰后 *EN1* 和 *UTROPHIN* 表达情况

A: *EN1* 表达改变情况; B: *UTROPHIN* 表达改变情况。

鼠)utrophin A表达上调,并沿着肌肉膜广泛分布,Western blot 证明utrophin A在mdx小鼠的心脏和骨骼肌中分别上升到原来的2和4倍,utrophin B无变化。在正常人的骨骼肌中,UTROPHIN 位于NMJ和肌腱接合处;可是在DYSTROPHIN 缺陷鼠的肌肉中,UTROPHIN 也位于肌纤维膜,可和DPC (Dystrophin-associated protein complex) 成分共同纯化出来。在一些引起炎症的肌病中,也发现DYSTROPHIN 和UTROPHIN共同位于成熟纤维的肌纤维膜上。在正常胎儿的肌肉中,UTROPHIN位于肌纤维膜上,它的水平随胎儿的发育而逐渐降低,与此同时DYSTROPHIN 在肌纤维膜中的水平却随胎儿的发育渐渐升高。这就说明UTROPHIN与DYSTROPHIN在肌肉发育过程中具有协同调控的作用。而且,在一些情况下UTROPHIN 能定位到肌纤维膜上的事实说明UTROPHIN 能在某种条件下重新定位到DYSTROPHIN 病人的肌纤维膜上,从而缓解因DYSTROPHIN缺失而造成的伤害<sup>[22]</sup>。

我们预测到的EN1 结合序列位于转率起始点上游-1074~-1080 和-892~-899 区域,实验证实-892~-899 区域与EN1 蛋白有结合。2005年Miura<sup>[23]</sup>报道UTROPHIN基因 5'非翻译区启动子A对调节肌肉再生时UTROPHIN蛋白的水平有重要作用。2007年Perkins<sup>[24]</sup>报道了神经源性的生长因子heregulin通过N-box介导的沉默机制导致UTROPHIN启动子A活性增加。此外,其他学者也报道了SP1、NFATc1/calcineurin 和肌源性的生长因子可以增加UTROPHIN启动子A活性。

为了探讨EN1 对UTROPHIN蛋白表达的影响,我们将EN1 基因用RNA干扰的方法将其沉默。RNA

干扰的靶位识别是一个有着高度序列特异性的过程,同一mRNA 内不同部位核苷酸合成的 siRNA 会产生不同的沉默效应。Holen 等<sup>[25]</sup>报道只有一小部分能有效阻抑基因表达,不同靶点的抑制效果不同。即便有一个核苷酸的改变,实验过程中都有可能检测不到靶向基因的 RNA 干扰现象。因此在 RNA 干扰实验中, siRNA 序列的选择尤为重要。我们设计特异针对人EN1 基因的靶序列,选取 2 条 siRNA。EN1-1 siRNA干扰序列在本研究中未对HeLa细胞中的EN1 基因mRNA产生明显的干扰效应,而EN1-2 siRNA对其产生了明显的干扰效应,使EN1 在转录后水平发生沉默。证明选取合适的 siRNA 序列,可有效的抑制人HeLa细胞中EN1 基因的表达。在 RNA 干扰实验中,通常很难达到使基因完全沉默的效果,而只是将 mRNA 的表达降低到一个比较低的水平,其原因可能是在细胞的防御层如剪接体还存在部分mRNA,或是存在一些细胞未转染成功。

我们用 EN1-1 siRNA 和 EN1-2 siRNA 对 HeLa 细胞进行瞬时转染,我们用染料法进行 Real time PCR 检测 RNA 干扰后以  $\beta$ -actin 为内对照的 EN1 和 UTROPHIN 基因 mRNA 表达水平。发现 EN1-2 siRNA 可以使 EN1 基因表达明显下调,EN1-1 siRNA 使 EN1 基因沉默效应不明显。同时发现 EN1-2 siRNA 干扰后 UTROPHIN 表达有升高,EN1-1 siRNA 干扰后 UTROPHIN 表达改变不明显。说明 EN1 对 UTROPHIN 可能存在着负调控作用,但是这种表达改变是否在其他细胞系和体内同样存在还需进一步验证。

通过 EN1 RNA 干扰实验我们发现在 HeLa 细胞中 EN1 基因沉默后,可使 UTROPHIN mRNA 水平上调。以 UTROPHIN 蛋白为靶点可能为 DMD 基因治

疗提供一种新的策略。

## 参考文献(References):

- [1] Popplewell LJ, Trollet C, Dickson G, Graham IR. Design of phosphorodiamidate morpholino oligomers (PMOs) for the induction of exon skipping of the human *DMD* gene. *Mol Ther*, 2009, 17(3): 554–561. [\[DOI\]](#)
- [2] Aartsma-Rus A, Fokkema I, Verschuuren J, Ginjaar I, van Deutekom J, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat*, 2009, 30(3): 293–299. [\[DOI\]](#)
- [3] Wang B, Li J, Fu FH, Xiao X. Systemic human *minidystrophin* gene transfer improves functions and life span of dystrophin and dystrophin/utrophin-deficient mice. *J Orthop Res*, 2008, 27(4): 421–426. [\[DOI\]](#)
- [4] Salvatori F, Cantale V, Breveglieri G, Zuccato C, Finotti A, Bianchi N, Borgatti M, Feriotto G, Destro F, Canella A, Breda L, Rivella S, Gambari R. Development of K562 cell clones expressing  $\beta$ -globin mRNA carrying the  $\beta^{039}$  thalassemia mutation for the screening of correctors of stop codon mutations. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 54(1): 41–52. [\[DOI\]](#)
- [5] Cullen MJ, Walsh J, Nicholson LVB. Immunogold localization of the 43-kDa dystroglycan at the plasma membrane in control and dystrophic human muscle. *Acta Neuropathol*, 1994, 87(4): 349–354. [\[DOI\]](#)
- [6] Ambrosio F, Ferrari RJ, Fitzgerald GK, Carvell G, Boninger ML, Huard J. Functional overloading of dystrophic mice enhances muscle-derived stem cell contribution to muscle contractile capacity. *Arch Phys Med Rehabil*, 2009, 90(1): 66–73. [\[DOI\]](#)
- [7] Mueller GM, O'Day T, Watchko JF, Ontell M. Effect of injecting primary myoblasts versus putative muscle-derived stem cells on mass and force generation in *mdx* mice. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(9): 1081–1090. [\[DOI\]](#)
- [8] Bachrach E, Perez AL, Choi YH, Illigens BMW, Jun SJ, del Nido P, McGowan FX, Li S, Flint A, Chamberlain J, Kunkel LM. Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. *Muscle Nerve*, 2006, 34(1): 44–52. [\[DOI\]](#)
- [9] Parker MH, Kuhr C, Tapscott SJ, Storb R. Hematopoietic cell transplantation provides an immune-tolerant platform for myoblast transplantation in dystrophic dogs. *Mol Ther*, 2008, 16(7): 1340–1346. [\[DOI\]](#)
- [10] Hirst RC, McCullagh KJ, Davies KE. Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol*, 2005, 24(3): 209–216. [\[DOI\]](#)
- [11] Gyrd-Hansen M, Krag TOB, Rosmarin AG, Khurana TS. Sp1 and the *ets*-related transcription factor complex GABP  $\alpha/\beta$  functionally cooperate to activate the utrophin promoter. *J Neurol Sci*, 2002, 197(1–2): 27–35. [\[DOI\]](#)
- [12] Freidenberg GR, Olefsky JM. Dissociation of insulin resistance and decreased insulin receptor binding in Duchenne muscular dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 60(2): 320–327. [\[DOI\]](#)
- [13] Pozzoli U, Sironi M, Cagliani R, Comi GP, Bardoni A, Bresolin N. Comparative analysis of the human dystrophin and utrophin gene structures. *Genetics*, 2002, 160(2): 793–798. [\[DOI\]](#)
- [14] Miller G, Wang EL, Nassar KL, Peter AK, Crosbie RH. Structural and functional analysis of the sarcoglycan-sarcospan subcomplex. *Exp Cell Res*, 2007, 313(4): 639–651. [\[DOI\]](#)
- [15] Towbin JA. The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(1): 131–139. [\[DOI\]](#)
- [16] Anderson MS, Kunkel LM. The molecular and biochemical basis of Duchenne muscular dystrophy. *Trends Biochem Sci*, 1992, 17(8): 289–292. [\[DOI\]](#)
- [17] Stocksley MA, Chakkalakal JV, Bradford A, Miura P, De Repentigny Y, Kothary R, Jasmin BJ. A 1.3 kb promoter fragment confers spatial and temporal expression of utrophin A mRNA in mouse skeletal muscle fibers. *Neuromuscul Disord*, 2005, 15(6): 437–449. [\[DOI\]](#)
- [18] Dennis CL, Tinsley JM, Deconinck AE, Davies KE. Molecular and functional analysis of the utrophin promoter. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(9): 1646–1652. [\[DOI\]](#)
- [19] Logan C, Willard HF, Rommens JM, Joyner AL. Chromosomal localization of the human homeo box-containing genes, *EN1* and *EN2*. *Genomics*, 1989, 4(2): 206–209. [\[DOI\]](#)
- [20] Logan C, Hanks MC, Noble-Topham S, Nallainathan D, Provart NJ, Joyner DAL. Cloning and sequence comparison of the mouse, human, and chicken *engrailed* genes reveal potential functional domains and regulatory regions. *Dev Genet*, 1992, 13(5): 345–358. [\[DOI\]](#)
- [21] Li DJ, Bareja A, Judge L, Yue YP, Lai Y, Fairclough R, Davies KE, Chamberlain JS, Duan DS. Sarcolemmal nNOS anchoring reveals a qualitative difference between dystrophin and utrophin. *J Cell Sci*, 2010, 15(123): 2008–2013. [\[DOI\]](#)
- [22] Cerecedo D, Cisneros B, Gómez P, Galván JJ. Distribution of dystrophin- and utrophin-associated protein complexes during activation of human neutrophils. *Exp Hematol*, 2010, 38(8): 618–628. [\[DOI\]](#)
- [23] Miura P, Thompson J, Chakkalakal JV, Holcik M, Jasmin BJ. The utrophin A 5'-untranslated region confers internal ribosome entry site-mediated translational control during regeneration of skeletal muscle fibers. *J Biol Chem*, 2005, 280(38): 32997–33005. [\[DOI\]](#)
- [24] Perkins KJ, Basu U, Budak MT, Ketterer C, Baby SM, Lozynska O, Lunde JA, Jasmin BJ, Rubinstein NA, Khurana TS. Ets-2 repressor factor silences extrasynaptic utrophin by N-box-mediated repression in skeletal muscle. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(8): 2864–2872. [\[DOI\]](#)
- [25] Holen T. Mechanisms of RNAi: mRNA cleavage fragments may indicate stalled RISC. *J RNAi Gene Silencing*, 2005, 1(1):

---

21-25. [\[DOI\]](#)