中国细胞生物学学报 Chinese Journal of Cell Biology 2019, 41(7): 1395–1400 DOI: 10.11844/cjcb.2019.07.0020

综述

增强子功能鉴定及其在农业动物中的研究进展

谢骏辉[1,2] 孙艳[1,2] 王昇[1,2] 田小欢[1,2] 曹建华[1,2]*

([1]华中农业大学, 农业动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;
[2]华中农业大学动物科学技术学院, 武汉 430070)

摘要 真核生物的基因转录受多种元件共同调控, 其中增强子是重要的顺式作用元件, 能够极大促进基因的转录。增强子的功能与细胞、组织、个体的特异性功能或表型密切相关, 其异常功能往往导致性状改变和疾病发生。因此, 研究增强子的功能对于揭示表型背后的分子机理具有十分重要的生物学意义, 对于农业动物科学显得尤为重要。本文就增强子的特性、鉴定方法、活性检测以及在农业动物研究中的进展进行综述, 以期能够对增强子的相关研究提供依据和参考。

关键词 增强子; 功能鉴定; 农业动物

Functional Identification of Enhancer and Its Research Progress in Agricultural Animals

Xie Junhui[1,2], Sun Yan[1,2], Wang Sheng[1,2], Tian Xiaohuan[1,2], Cao Jianhua[1,2]*

([1]*Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction (Huazhong Agricultural University), Ministry of Education, Wuhan 430070, China*; [2]*College of Animal Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*)

Abstract Gene transcription in eukaryotes is regulated by various elements, of which enhancers are important cis-regulatory elements capable of greatly promoting gene transcription. The function of enhancers is closely related to specific function or phenotype of cells, tissues and individuals. The abnormality of enhancers often leads to alteration of traits and occurrence of diseases. Thus, studying the function of enhancers is of great biological significance for revealing the underlying molecule mechanism of phenotype which is crucial for agricultural animal science. In this article, characteristics, identical method, activity detection and progress in agricultural animal research of enhancers are reviewed in order to provide basis and reference for relevant research of enhancers.

Keywords enhancer; function identification; agricultural animal

增强子(enhancer)是一段长度在50~1 500 bp的DNA序列, 可以结合特定因子——activator提高特异性基因的转录水平[1-2], 由于其能够显著增强相关联基因的转录, 故将该DNA元件命名为增强子。真核生物基因的转录是一个复杂的过程, 受多种元件共同调控。增强子作为顺式调控元件(cis-regulatory elements, CREs), 在真核生物的基因转录、细胞分化以及个体发育中起着十分重要的作

收稿日期: 2018-12-05 接受日期: 2019-02-28
国家科技支撑计划(批准号: 2015BAD03B01)和国家自然科学基金(批准号: 31472074、31772563)资助的课题
*通讯作者。Tel: 027-87282091, E-mail: jhcao@mail.hzau.edu.cn
Received: December 5, 2018 Accepted: February 28, 2019
This work was supported by the National Science and Technology Support Program (Grant No.2015BAD03B01) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31472074, 31772563)
*Corresponding author. Tel: +86-27-87282091, E-mail: jhcao@mail.hzau.edu.cn
网络出版时间: 2019-08-12 14:52:50 URL: http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190812.1452.010.html

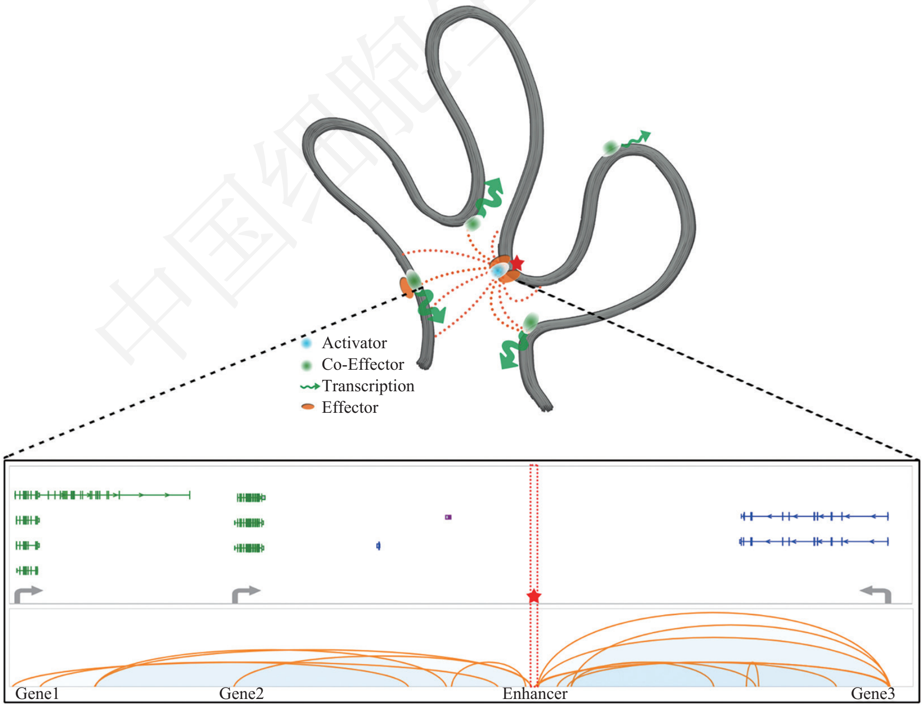
用。因此, 了解增强子功能以及其在农业动物中的研究的进展, 是农业动物功能基因组研究的迫切需求, 能为深入研究基因调控机制提供研究基础。

1 增强子及其特性

20世纪80年代, Banerji等[3]发现, 病毒SV40早期基因(early gene)上游约140 bp的序列能够显著增加兔β球蛋白(β-globin)基因的转录, 该段DNA序列被命名为增强子。两年后, 又在小鼠基因组中发现位于免疫球蛋白重链基因下游的淋巴细胞特异性增强子[4]。随后增强子的作用逐渐被重视, 对于增强子的研究越来越深入, 其作用特点以及生物学功能也进一步地被发掘。一般增强子发挥作用具有以下特点: (1)增强子位于基因启动子区域的上游、下游或者基因的内部, 并且能够远距离增强与其相关基因的转录, 其中超级增强子(super-enhancer)的作用距离甚至超过1 Mb[1,5]; (2)在某些真核细胞中, 持家基因(housekeeping gene)通常由临近的增强子调控, 对启动子没有特异性, 而对于一些细胞或组织特异性基因的转录调控如发育相关的基因, 通常由较远端的增强子进行调控, 具有组织或细胞特异性, 可调控细胞类型特异性基因的转录[6]; (3)增强子必须与某些蛋白质(转录因子或转录辅因子)结合才能发挥增强作用; (4)增强子的增强作用与其序列的正反方向无关, 将增强子反转也能发挥其作用。增强子的作用模式如图1所示。值得一提的是, 在一些特定的真核细胞系中, 基因的核心启动子区域(core promoter, 启动子的最小单元, 包括转录起始位点TSS、RNA聚合酶结合位点、转录因子结合区如TATA box等), 具有与增强子相似的序列特征, 也具有增强子的功能[7-8]。因此, 增强子与基因的启动子相互作用, 促进基因的转录。反之, 某些启动子特别是核心启动子, 既可以启动基因的转录, 也可以作为增强子提高基因的转录效率。二者既有联系又有不同, 共同调控基因的转录。

2 增强子的鉴定方法

增强子大多位于基因组非编码区, 而且序列较短, 使得其发现和功能注释变得更复杂和具有挑战



增强子(五角星及红色虚框)处往往结合有众多相关因子如activator(蓝色圆球)、effector(橙色椭圆球)、co-effector(黄色圆球)等, 与邻近或远程位点发生相互作用(黄色线), 从而激活远程的靶基因, 实现增强基因转录的功能(灰色箭头)。

Enhancers (pentagons and red dotted box) often combine with many related factors such as activators (blue sphere), effectors(orange ellipsoid), co-effectors (yellow sphere), *etc*., interacting with adjacent or remote sites (yellow lines), thereby enhancing remote target genes to achieve higher transcription (gray arrows).

图1 增强子作用示意图

Fig.1 Schematic diagram of the enhancer action

性。但是全基因组分析技术的进步, 使得研究增强子的特征成为了可能, 从而为增强子的鉴定奠定了基础。

2.1 基于转录因子、辅因子鉴定增强子

利用染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation followed by sequencing, ChIP-Seq)技术通常可以直接检测转录因子与靶标增强子的结合位点。有报道指出, 通过ChIP-Seq技术在果蝇中检测转录因子所对应的增强子中, 很多都不促进相关基因的转录, 其中的原因之一, 可能与负性转录因子结合增强子有关[9-10]。基于ChIP-Seq技术也可以通过转录辅因子在体内的结合来鉴定增强子, 比如组蛋白乙酰转移酶p300。转录辅因子通常不直接与DNA结合, 相反, 它们由转录因子募集到结合位点, 从而行使生物学功能。Axel等[11]在小鼠模型(前脑、中脑和肢体组织)中做了转录辅因子p300的ChIP-Seq实验, 发现了数千个与转录辅因子p300的结合位点。随后他们利用转基因技术将所得的86个序列导入小鼠体内进行测试, 结果显示, 绝大部分预测的结合位点都再现了增强子活性, 由此说明, 根据p300结合位点的体内作图是一种鉴定增强子的高度准确的手段。总之, 基因组上增强子与转录因子和辅因子的结合机制为增强子的鉴定提供了可行方法, 但更精准有效的鉴定功能性增强子, 还需要利用更多活性增强子的特征。

2.2 基于组蛋白修饰(histone modification)鉴定增强子

利用ChIP-Seq技术, Nathaniel等[12-15]在长度为30 Mb的人类基因组中发现了200个启动子和400个增强子, 并且发现在活性增强子区域存在高丰度的H3K4me1(histone H3 Lys4 monomethylation)修饰, 在活性启动子以及增强子区域都存在高丰度的H3K4me3(histone H3 Lys4 trimethylation)修饰。随后, Dorighi等[16]研究了H3K4me1修饰对于增强子活性功能的影响, 发现H3K4me1修饰普遍存在于增强子区域, 但对增强子的活性只有很微弱的影响。对于活性增强子的表征, 有研究结果表明, H3K27ac(histone H3 Lys27acetylation)修饰是区分活性增强子和非活性增强子(仅存在H3K4me1的修饰)的重要标记[17], 并且利用H3K27ac与H3K27me3(histone H3 Lys27 trimethylation)两种修饰, 就能把都具有p300、H3K4me1标记的增强子分为两类: 一类是只存在H3K27ac修饰的活性增强子, 位于转录基因的近端; 另一类是存在H3K27me3修饰却不存在H3K27ac修饰的增强子为平衡增强子, 不参与基因的转录[17-18]。此外, H3K79me3、H4K16ac和H3K122ac修饰也被证实是表征活性增强子的修饰[19-21]。因为活性增强子存在多种组蛋白修饰, 就有了多种不同的基于组蛋白修饰的增强子鉴定方法, 目前并没有确定哪几种组蛋白修饰的组合是鉴定活性增强子的黄金组合, 实际问题应实际情况而定, 需要根据自己的需求以及实验对象具体拟定。之前也有报道指出, 结合H3K4me1、H3K27ac以及H3K79me3这3种修饰能够准确地鉴定活性增强子[19], 可以作为参考。

2.3 基于增强子与启动子相互作用机制鉴定增强子

由于增强子必须与启动子结合后才能发挥其增强作用, 所以可以根据增强子的这种特性, 在增强子与启动子相互作用的基础上进行增强子的鉴定。通过ChIP-Seq技术鉴定介导增强子–启动子的相关因子, 其中cohesin和mediator已经被证明, 二者所形成的复合物参与了增强子与启动子的结合[22], 或者利用染色体构象俘获(chromosome conformation capture, 3C)技术[23]、配对末端标签测序分析染色质相互作用(chromatin interaction analysis by paired-end tag sequencing, ChIA-PET)技术[24]分析染色质之间、特定蛋白与染色体的相互作用, 进而确定与增强子相关联的基因。

2.4 基于染色质构象鉴定增强子

染色质的基本单位是核小体(nucleosome), 核小体则是由DNA与组蛋白组成。通常情况下由于核小体的压缩使DNA序列不被暴露。在活性增强子与一些转录因子比如p300/CBP结合行使增强功能时需要去除核小体结构, 从而导致了DNA序列的暴露, 使其具有可接近性(亦称为染色质可及性, chromatin accessibility)。因而可以利用脱氧核糖核酸酶I超敏位点测序(DNase I hypersensitive sites sequencing, DNase-seq)技术或者ATAC-Seq(assay for transposase-accessible chromatin with high throughput sequencing)技术在全基因组范围内鉴定染色质打开区域, 从而进行增强子的预测[25]。

RNA聚合酶II(RNA polymerase II)也可以与增强子结合[26], 因此可以通过ChIP-Seq、DNase-Seq、ATAC-Seq、3C和ChIA-PET等技术根据与增强子有关的转录因子和辅因子(如p300)、组蛋白修饰(如

H3K27ac)、结合蛋白(如cohesin)以及其区域染色质的构象在全基因组上鉴定增强子。值得注意的是, 每种方法都有其利弊, 应根据实际情况酌情考虑选择合适的鉴定方案。

3 增强子活性检测

增强子在细胞、组织和个体发育的不同阶段, 活性也各不相同, 其功能也不能一概而论, 但检测增强子的活性, 往往是研究其功能的首要任务, 有助于深入了解增强子的本质。根据体内和体外实验不同, 本文就目前几种检测增强子活性的方法进行概述。

3.1 体内增强子活性检测

对于单个增强子的活性检测, 一般是将该候选片段插入到启动子和报告基因的上游, 然后利用基因工程技术将整个序列导入动物胚胎中, 通过检测报告基因的RNA丰度或者蛋白翻译水平, 从而达到检测增强子活性的目的。利用该种策略, Visel等[27]将候选序列克隆至Hsp68启动子和*LacZ*报告基因上游, 然后将构建的报告载体导入小鼠受精的卵母细胞, 在11.5天收集胚胎, 通过对胚胎中*LacZ*报告基因活性染色, 成功检测出相关增强子的活性。该种技术也已经成功检测到转基因黑腹果蝇胚胎中102个增强子的活性, 并且发现相关增强子呈现多种空间和时间的活动模式[28]。这种检测方法直接、简便, 能够展示增强子活性在整个胚胎发育过程中的动态变化, 但不支持全基因组范围内增强子的活性检测。

Kim等[26]采用ChIP-Seq技术, 在小鼠大脑皮层神经元中发现了12 000多个调节神经元活性的增强子, 其活性依赖与转录因子CREB的结合。同时, 对RNA聚合酶II的结合位点进行分析发现, 其中3 000多个结合位点与增强子重合转录出RNA(enhancer RNA, eRNA), 这种现象有可能是增强子区域的CBP对RNA聚合酶II的募集作用导致的副作用, 也为增强子进行自身的转录提供了可能。Santa等[29]在内毒素刺激小鼠巨噬细胞的反应中, 用染色质特征来表征了RNA聚合酶II靶向的基因外转录位点, 发现70%基因外的RNA聚合酶II的结合位点位于具有染色质特征的增强子区域, 并且该区域增强子产生了低水平的转录物。最近的研究发现, 增强子的活性与其eRNA的转录水平有关, 高活性的增强子比低活性的增强子产生更多的转录物, 进一步证明了增强子活性与eRNA之间的关系[30]。以上的研究为增强子的转录潜能即eRNA的产生提供了强有力的证据, 同时也为检测增强子的活性与功能提供了一条新的思路。

3.2 体外增强子活性检测

基于质粒系统评估增强子活性, 是体外验证增强子活性的主要方法, 也是将候选片段插入到核心启动子和报告基因的上游或下游, 但是与之前所述方法的不同之处在于质粒中的报告基因含有一段独特的DNA标记条码(barcode)。在将构建的质粒导入细胞后, 通过检测含有不同的DNA barcode的报告基因的RNA丰度, 达到检测每个相应的候选增强子活性的目的。Nam等[31]利用DNA标记条码开发了“Nanotags”的方法, 成功地同时检测到了海胆胚胎中与46个基因相关的126个增强子的每小时活性。可以通过克隆[31]或者化学合成[32]的方法将每个候选片段与DNA barcode特异性的关联, 这种方法虽然支持数百个候选片段同时测定, 但也不支持全基因组范围的增强子活性检测。

自身转录活性调节区测序(self-transcribing active regulatory region sequencing, STARR-seq)在构建载体时, 充分利用增强子独立存在和作用无方向的特性, 将候选DNA片段置于核心启动子的下游, 使活性增强子可以进行自身转录, 并且每种增强子的活性可以通过其在细胞RNA中的丰度来反映[33]。此方法被成功运用于绘制5种果蝇物种的全基因组增强子活性图谱[34]。STARR-seq不仅支持百万数量级的DNA候选片段的检测, 同时也可以评估全基因组增强子的活性。更重要的是这种直接基于其活性并且不依赖于染色质特征的增强子的全基因组鉴定方法能够揭示增强子功能和染色质之间的关系。值得注意的是, 虽然该方法支持数量庞大的候选文库, 克服了以前无法在全基因组上检测增强子活性的困难, 但其自身也存在一定的局限性, 一定程度上受限于可以被有效转染的细胞类型, 对于一些不能进行转染的细胞该种方法就无能为力, 并且由于哺乳动物基因组的大小和复杂性, 文库的制备也具有挑战性。Laurent等[35]针对以上问题对STARR-seq的方法进行改进, 开发了一种在哺乳动物基因组中捕获感兴趣的基因组序列用于增强子活性检测的方法, 即CapStarr-seq, 并对其准确性进行了验证。最近, Felix等[36]还发现, STARR-seq技术存在一定的缺陷, 即将质粒转染到人类细胞时, 细菌质粒复制起点会与核心启动子相互冲突, 导致增强子活性检测产生

误差, 并且转染过程中IFN-1反应会被激活, 从而使STRAA-seq筛选结果中假阳性和阴性的混淆。幸运的是, 将质粒复制起点ORI作为核心启动子以及添加两种抑制IFN-1的激酶, 可克服这两个问题, 使全基因组范围内鉴定增强子以及活性检测的方法更加准确。

4 增强子在农业动物研究中的应用

Zou等[37]在小鼠模型中, 将骨骼肌特异性肌球蛋白轻链(MLC)的增强子插入到目标基因的非编码区来研究其对于胰岛素样生长因子IGF-1转录的影响, 发现增强子可以显著提高IGDF-1的转录, 促进肌管的形成和肌肉的肥大。该研究强调了增强子在动物生长发育过程中的重要性, 证实了通过遗传修饰非编码区上调基因转录来获得理想型动物个体的可行性。Brd4是癌症的重要药物靶标, 为了探究其在动物细胞分化和发育过程中的机制, Lee等[38]在小鼠模型中通过敲除实验, 证明了Brd4控制着细胞身份基因的诱导并且是脂肪生成和肌细胞生成所必需的, 进一步的研究还确定了活性增强子在Brd4行使功能过程中的重要性。仔猪腹泻是一种严重危害养猪业的疾病。仔猪的乳糖不耐受症是导致仔猪腹泻的原因之一。Du等[39]对猪乳糖酶基因的单核苷酸多态性(SNP)以及增强子、启动子活性进行分析, 结果显示在增强子区域存在1个SNP位点, 在启动子区域存在两个SNP位点, 且这3个SNP位点共同调节乳糖酶基因的转录。该研究为将来从表观修饰的角度治疗仔猪乳糖不耐受症、建立由于乳糖不耐受症导致仔猪腹泻的诊断方法奠定了一定的基础。Wang等[40]基于公开可用的哺乳动物增强子数据丰富了牛全基因组增强子区域的注释, 成功将许多基因组区域鉴定为潜在增强子, 并且还发现在增强子区域富含与16 581头奶牛产奶性状相关的变异。另外还发现, 增强子区域大多位于与牛怀孕、生长、抗病性以及奶牛产奶品质有关的基因附近。该项发现也强调了增强子在牛发育生长过程中的重要性。Marina等[41]为了研究驱动绵羊进化的分子机制, 比较了43种现代品种的绵羊以及其祖先的全基因组序列, 结合ChIP-Seq技术发现其差异主要富集在编码蛋白质的基因、基因的近端调控元件以及与活性转录相关的基因组特征区域, 说明了基因转录的重塑可能是推动绵羊进化的力量之一, 调控基因转录水平的增强子作为顺式作用元件在该过程中也发挥着重要的作用。基因组中增强子的数目远远多于基因数目, 是不是许多增强子没有发挥其作用呢?有研究发现, 增强子冗余在哺乳动物发育的过程中有着保持其表型稳健性的作用[42]。

5 展望

增强子在农业动物的生命过程中扮演着十分重要的角色, 了解和研究增强子有助于精细解读动物基因组的功能、转录调控、细胞分化以及个体发育的机制。随着科学技术的不断进步, 全基因组分析技术的不断完善, 对于目前增强子难以定位、功能不明、鉴定困难等问题的解决定会有所突破, 从而有利于从增强子的角度, 来研究和提高动物的生产性能与抗病力, 使我国的畜牧业更加辉煌蓬勃地发展。

参考文献 (References)

1 Pennacchio LA, Bickmore W, Dean A, Nobrega MA, Bejerano G. Enhancers: five essential questions. Nat Rev Genet 2013; 14(4): 288-95.
2 Blackwood EM, Kadonaga JT. Going the distance: a current view of enhancer action. Science 1998; 281(5373): 60-3.
3 Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, *et al*. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell 2007; 129(4): 823-37.
4 Banerji J, Olson L, Schaffner W. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. Cell 1983; 33(3): 729-40.
5 Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, Lau A, Saint-Andre V, Sigova AA, *et al*. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. Cell 2013; 155(4): 934-47.
6 Zabidi MA, Stark A. Regulatory enhancer-core-promoter communication via transcription factors and cofactors. Trends Genet 2016; 32(12): 801-14.
7 Dao LTM, Galindo-Albarran AO, Castro-Mondragon JA, Andrieu-Soler C, Medina-Rivera A, Souaid C, *et al*. Genome-wide characterization of mammalian promoters with distal enhancer functions. Nat Genet 2017; 49(7): 1073-81.
8 Dao LTM, Spicuglia S. Transcriptional regulation by promoters with enhancer function. Transcription 2018; 9(5): 307-14.
9 Li XY, MacArthur S, Bourgon R, Nix D, Pollard DA, Iyer VN, *et al*. Transcription factors bind thousands of active and inactive regions in the *Drosophila* blastoderm. PLoS Biol 2008; 6(2): e27.
10 Fisher WW, Li JJ, Hammonds AS, Brown JB, Pfeiffer BD, Weiszmann R, *et al*. DNA regions bound at low occupancy by transcription factors do not drive patterned reporter gene expression in Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109(52): 21330-5.
11 Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, *et al*. ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. Nature 2009; 457(7231): 854-8.

12 Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, *et al*. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. Nat Genet 2007; 39(3): 311-8.

13 Core LJ, Martins AL, Danko CG, Waters CT, Siepel A, Lis JT. Analysis of nascent RNA identifies a unified architecture of initiation regions at mammalian promoters and enhancers. Nat Genet 2014; 46(12): 1311-20.

14 Pekowska A, Benoukraf T, Zacarias-Cabeza J, Belhocine M, Koch F, Holota H, *et al*. H3K4 tri-methylation provides an epigenetic signature of active enhancers. EMBO J 2011; 30(20): 4198-210.

15 Shah RN, Grzybowski AT, Cornett EM, Johnstone AL, Dickson BM, Boone BA, *et al*. Examining the roles of H3K4 methylation states with systematically characterized antibodies. Mol cell 2018; 72(1): 162-77, e7.

16 Dorighi KM, Swigut T, Henriques T, Bhanu NV, Scruggs BS, Nady N, *et al*. Mll3 and Mll4 facilitate enhancer RNA Synthesis and transcription from promoters independently of H3K4 monomethylation. Mol Cell 2017; 66(4): 568-76, e4.

17 Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, *et al*. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. Proc Natl Acad Sci USA 2010; 107(50): 21931-6.

18 Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. Nature 2011; 470(7333): 279-83.

19 Bonn S, Zinzen RP, Girardot C, Gustafson EH, Perez-Gonzalez A, Delhomme N, *et al*. Tissue-specific analysis of chromatin state identifies temporal signatures of enhancer activity during embryonic development. Nat Genet 2012; 44(2): 148-56.

20 Taylor GC, Eskeland R, Hekimoglu-Balkan B, Pradeepa MM, Bickmore WA. H4K16 acetylation marks active genes and enhancers of embryonic stem cells, but does not alter chromatin compaction. Genome Res 2013; 23(12): 2053-65.

21 Pradeepa MM, Grimes GR, Kumar Y, Olley G, Taylor GC, Schneider R, *et al*. Histone H3 globular domain acetylation identifies a new class of enhancers. Nat Genet 2016; 48(6): 681-6.

22 Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, van Berkum NL, *et al*. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. Nature 2010; 467(7314): 430-5.

23 Jin F, Li Y, Dixon JR, Selvaraj S, Ye Z, Lee AY, *et al*. A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. Nature 2013; 503(7475): 290-4.

24 Fullwood MJ, Liu MH, Pan YF, Liu J, Xu H, Mohamed YB, *et al*. An oestrogen-receptor-alpha-bound human chromatin interactome. Nature 2009; 462(7269): 58-64.

25 Ghisletti S, Barozzi I, Mietton F, Polletti S, De Santa F, Venturini E, *et al*. Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages. Immunity 2010; 32(3): 317-28.

26 Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, *et al*. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. Nature 2010; 465(7295): 182-7.

27 Visel A, Minovitsky S, Dubchak I, Pennacchio LA. VISTA Enhancer Browser: a database of tissue-specific human enhancers. Nucleic Acids Res 2007; 35(Database issue): D88-92.

28 Kvon EZ, Stampfel G, Yanez-Cuna JO, Dickson BJ, Stark A. HOT regions function as patterned developmental enhancers and have a distinct cis-regulatory signature. Genes Dev 2012; 26(9): 908-13.

29 De Santa F, Barozzi I, Mietton F, Ghisletti S, Polletti S, Tusi BK, *et al*. A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. PLoS Biol 2010; 8(5): e1000384.

30 Mikhaylichenko O, Bondarenko V, Harnett D, Schor IE, Males M, Viales RR, *et al*. The degree of enhancer or promoter activity is reflected by the levels and directionality of eRNA transcription. Genes Dev 2018; 32(1): 42-57.

31 Nam J, Davidson EH. Barcoded DNA-tag reporters for multiplex cis-regulatory analysis. PLoS One 2012; 7(4): e35934.

32 Patwardhan RP, Hiatt JB, Witten DM, Kim MJ, Smith RP, May D, *et al*. Massively parallel functional dissection of mammalian enhancers *in vivo*. Nat Biotech 2012; 30(3): 265-70.

33 Arnold CD, Gerlach D, Stelzer C, Boryn LM, Rath M, Stark A. Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq. Science 2013; 339(6123): 1074-7.

34 Arnold CD, Gerlach D, Spies D, Matts JA, Sytnikova YA, Pagani M, *et al*. Quantitative genome-wide enhancer activity maps for five Drosophila species show functional enhancer conservation and turnover during cis-regulatory evolution. Nat Gene 2014; 46(7): 685-92.

35 Vanhille L, Griffon A, Maqbool MA, Zacarias-Cabeza J, Dao LT, Fernandez N, *et al*. High-throughput and quantitative assessment of enhancer activity in mammals by CapStarr-seq. Nat Commun 2015; 6: 6905.

36 Muerdter F, Boryn LM, Woodfin AR, Neumayr C, Rath M, Zabidi MA, *et al*. Resolving systematic errors in widely used enhancer activity assays in human cells. Nat Methods 2018; 15(2): 141-9.

37 Zou Y, Dong Y, Meng Q, Zhao Y, Li N. Incorporation of a skeletal muscle-specific enhancer in the regulatory region of Igf1 upregulates IGF1 expression and induces skeletal muscle hypertrophy. Sci Rep 2018; 8(1): 2781.

38 Lee JE, Park YK, Park S, Jang Y, Waring N, Dey A, *et al*. Brd4 binds to active enhancers to control cell identity gene induction in adipogenesis and myogenesis. Nat Commun 2017; 8(1): 2217.

39 Du HT, Zhu HY, Wang JM, Zhao W, Tao XL, Ba CF, *et al*. Single-nucleotide polymorphisms and activity analysis of the promoter and enhancer of the pig lactase gene. Gene 2014; 545(1): 56-60.

40 Wang M, Hancock TP, MacLeod IM, Pryce JE, Cocks BG, Hayes BJ. Putative enhancer sites in the bovine genome are enriched with variants affecting complex traits. Genet Sel Evol 2017; 49(1): 56.

41 Naval-Sanchez M, Nguyen Q, McWilliam S, Porto-Neto LR, Tellam R, Vuocolo T, *et al*. Sheep genome functional annotation reveals proximal regulatory elements contributed to the evolution of modern breeds. Nat Commun 2018; 9(1): 859.

42 Osterwalder M, Barozzi I, Tissieres V, Fukuda-Yuzawa Y, Mannion BJ, Afzal SY, *et al*. Enhancer redundancy provides phenotypic robustness in mammalian development. Nature 2018; 554(7691): 239-43.