

УДК 577.21

ПРОФИЛИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФОРМ ГИСТОНОВ В ДОМЕНЕ α -ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ КУР

© 2011 г. Е. С. Юдинкова^{1*}, Д. А. Бунина², С. В. Ульянов², А. А. Гаврилов¹, С. В. Разин^{1,2}

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 117334

²Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

Поступила в редакцию 12.11.2010 г.

Принята к печати 17.12.2010 г.

С использованием метода иммунопреципитации нативного хроматина (N-ChIP) и последующего количественного ПЦР-анализа с TaqMan-пробами получены и проанализированы профили ацетилирования и метилирования гистонов в границах домена α -глобиновых генов кур до и после прекращения экспрессии эмбрионального гена π . Результаты не подтверждают выдвинутое ранее предположение о том, что инактивация гена π в эритроблестах взрослого типа связана с созданием неактивного хроматинового домена. С другой стороны, показано, что инактивация гена π коррелирует со снижением уровня ацетилирования гистонов в соответствующей области домена.

Ключевые слова: домен α -глобиновых генов, хроматин, ацетилирование.

PATTERNS OF THE HISTONE MODIFICATIONS ACROSS THE CHICKEN ALPHA-GLOBIN GENES DOMAIN, by E. S. Yudin^{1*}, D. A. Bunina², S. V. Uljanov², A. A. Gavrylov¹, S. V. Razin^{1,2} (¹Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117334 Russia, *e-mail: ioudinkova@inbox.ru; ²Biological Department, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia). Using native chromatin immunoprecipitation (N-ChIP) followed by TaqMan RT-PCR quantitative analysis we have determined the profiles of histone acetylation and histone methylation within the alpha-globin gene domain before and after switching of embryonic globin genes expression. The results obtained do not support a supposition that the inactivation of the embryonic alpha-type globin gene π in erythroid cells of the adult lineage is mediated via formation of an inactive chromatin domain. On the other hand we have demonstrated that suppression of the gene π activity in erythroid cells of adult lineage correlates with the decrease of the histone acetylation level within the embryonic subdomain of the alpha-globin gene domain.

Keywords: α -globin genes domain, chromatin, acetylation.

У позвоночных животных молекула гемоглобина состоит из α - и β -цепей, которые кодируются разными генами. Эти гены представлены несколькими копиями. В ходе развития организма происходит переключение экспрессии глобиновых генов. Суть феномена состоит в том, что в эмбриональных клетках и клетках взрослого организма экспрессируются разные группы глобиновых генов [1]. Механизм переключения изучают в течение многих лет, преимущественно на модели домена β -глобиновых генов человека и других позвоночных, в том числе и кур [2–6]. Получены убедительные свидетельства того, что включение экспрессии β -глобиновых генов “взрослого типа” связано с перестройкой хроматинового активаторного блока, включающего область контроля локуса и промоторы этих генов [7–9]. Механизм переключения экспрессии α -глобиновых генов изучен значительно хуже. Известно, что в их доменах также имеется регуляторный эле-

мент (MRE), обладающий некоторыми признаками области контроля локуса [10–13], однако характер взаимодействия этого регуляторного элемента с промоторами глобиновых генов в эмбриональных клетках крови пока не изучен. Следует отметить, что домены α - и β -глобиновых генов относятся к принципиально разным классам геномных доменов. Домен β -глобиновых генов всех позвоночных животных – типичный представитель доменов “закрытого типа” [14], которые характеризуются различной чувствительностью к ДНКазе I в клетках, экспрессирующих и не экспрессирующих входящие в состав домена гены. Домен же α -глобиновых генов относится к числу так называемых “функциональных доменов”, или доменов с невыраженными границами [14–16], которые обладают одинаково высоким уровнем чувствительности к ДНКазе I в клетках, специфично дифференцированных.

Домен α -глобиновых генов кур представляет собой удобную модель для изучения механизма пере-

* Эл. почта: ioudinkova@inbox.ru

Таблица 1. Праймеры и TaqMan-пробы, использованные для анализа ОТ-ПЦР РНК

Тестируемый ген	Прямой праймер (5' → 3')	Обратный праймер (5' → 3')	TaqMan-проба (5' → 3')
π	gctcacagcagtttgaagacct	Caaaaagcctggaggagaac	FAM-acgca(t-BHQ1)gatccgcacttgaataca
α^D	gtcaatttcaaggcaagca	tggcctctggctctgat	FAM-taacccaaga(t-BHQ1)cccctgacctgag
α^A	agggatcttcacaaaaatc	gtggagcacagtgagtcagc	FAM-aggtagtg(t-BHQ1)ccttctgtctctccg

ключения экспрессии α -глобиновых генов. Домен состоит из одного эмбрионального (ген π) и двух глобиновых генов взрослого типа (α^D и α^A) (см. обзор [17]). Ген π экспрессируется в эмбриональных эритроцитах до пятого дня развития эмбриона. В этих же клетках экспрессируются и α -глобиновые гены взрослого типа (α^D и α^A) [18, 19]. После четвертого дня развития эмбриона начинается постепенное замещение эмбриональных эритроцитов эритроцитами взрослого типа, часть из которых циркулирует в крови, а другая (большая) часть концентрируется в кровяных органах, выполняющих эту функцию и у взрослого организма [20]. В этих клетках экспрессия гена π полностью подавляется, уровень же экспрессии генов α^D и α^A существенно возрастает [21, 22]. Механизм подавления экспрессии гена π в эритроцитах взрослого типа не изучен.

Высказывалось предположение, что эмбриональный субдомен домена α -глобиновых генов каким-то образом перемещается (упаковывается) в неактивный гетерохроматин [23]. Нам это предположение не казалось убедительным, поскольку у кур эмбриональный субдомен домена α -глобиновых генов слишком короток (максимум 3 т.п.н., или 15 нуклеосом, см. “Экспериментальную часть”). Переход такого короткого геномного участка в гетерохроматин представляется событием маловероятным. Ситуация усугубляется еще и тем обстоятельством, что в 5'-концевой фланкирующей области эмбрионального субдомена домена α -глобиновых генов кур расположен CpG-островок, содержащий промотор гена домашнего хозяйства [24].

С тем, чтобы получить новую информацию о хроматиновом статусе эмбрионального субдомена домена α -глобиновых генов кур в клетках, экспрессирующих и не экспрессирующих ген π , мы изучили профили ацетилирования и метилирования гистонов в домене α -глобиновых генов кур в красных кровяных клетках трех- и девятидневных куриных эмбрионов. Полученные результаты не подтверждают предположения о том, что инактивация гена π в эритроцитах взрослого типа связана с созданием неактивного хроматинового домена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ОТ-ПЦР-анализ РНК. Тотальную клеточную РНК выделяли с использованием реагента Trizol (“Invitrogen”) и обрабатывали ДНКазой I. Для реак-

ции обратной транскрипции брали 0.5 мкг РНК, гексануклеотидные праймеры в качестве затравки и ревертазу M-MuLV (“Fermentas”) (в отрицательном контроле вместо ревертазы добавляли воду). Для анализа образовавшейся кДНК проводили ПЦР в реальном времени с TaqMan-пробами и использованием Hot-start-ДНК-полимеразы (“СибЭнзим”, Россия) по следующей схеме: 94°C – 5 мин; 1 цикл; 94°C – 15 с, 60°C – 60 с, 55 циклов. Последовательности праймеров и TaqMan-проб представлены в табл. 1 (ампликоны соответствуют внутренним участкам гена и частично включают интронные последовательности). Чтобы построить калибровочную кривую для определения относительного количества кДНК, реакцию амплификации проводили в нескольких последовательных разведениях полногеномной ДНК курицы.

Для получения нативного хроматина кровь, полученную из куриных эмбрионов, содержащую около 500 млн. клеток, центрифугировали, осадок клеток PBS промывали и ресуспендировали в 5 мл буфера, содержащего 0.32 М сахарозу, 5 мМ MgCl₂, 1% Тритон X-100, 10 мМ Трис-НСl, pH 7.5. После инкубации в течение получаса на льду суспензию гомогенизировали в гомогенизаторе Даунса (пестик В или tight) 5 раз. Ядра осаждали при +4°C. Осадок дважды промывали буфером, содержащим 10 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 3 мМ MgCl₂, и обрабатывали микрококковой нуклеазой 10 мин при 37°C в 1 мл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 1 мМ CaCl₂, 3 мМ MgCl₂, и 5 мкл микрококковой нуклеазы (40 ед./мкл). Реакцию останавливали, добавляя смесь 0.5 М EDTA и 0.5 М EGTA до конечной концентрации 5 мМ. К полученной суспензии добавляли равный объем буфера, содержащего 40% сахарозы, 10 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 300 мМ NaCl, 1.25 мМ EDTA, 1.25 мМ EGTA и осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в 3 мл буфера, содержащего 1 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 0.5 мМ EDTA, 0.5 мМ EGTA. Фракцию растворимого хроматина, полученную после 10 мин центрифугирования на максимальной скорости, использовали для последующей иммунопреципитации. Все растворы содержали 10 мМ бутират натрия и ингибиторы протеаз.

Реакцию иммунопреципитации проводили в течение двух часов при 4°C в 1 мл буфера, содержащего 20 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 50 мМ NaCl, 5 мМ EDTA, 150 мкл растворимого хроматина и 5 мкг поликлональных антител кролика против одной из модификаций гистонов (“Active motif”). Комплексы антител

Таблица 2. Праймеры и TaqMan-пробы, использованные для анализа результатов иммунопреципитации хроматина

Номера праймеров	Прямой праймер (5' → 3')	Обратный праймер (5' → 3')	TaqMan-проба (5' → 3')
1	сссааggсacgctсаса	ассааасgacgaggctgc	FAM-acagggc(t-BHQ1)gcacgagtгaggаgа
2	gаgааggctgссgтgacc	ggaatсactggagaggtаagtсa	FAM-caaagg(t-BHQ1)ggctaccagattgagtcc
3	ttссааactсaаgcttссааа	ссactgctgаactttgtgtctt	FAM-tgta(t-BHQ1)ttcaagtgcgгatсatgсgt
4	сccctсctttgtttgtgatg	aggсagagtгattссagcttt	FAM-gcaggссаа(t-BHQ1)аagtггtатсatсса
5	сaggctсctсатсacacatt	сgcttсссacсaggagg	FAM-tgссgaggааgаagс(t-BHQ1)atсса
6	tcgagtгatссagctg	catgctgccttcgacaagt	FAM-gctggc(t-BHQ1)gtacacatggссааgact
7	сaggatgttсaccactaccс	ggсааgаaggtagtgсctg	FAM-сact(t-BHQ1)сgatctgtсacacgгctсс
Het	gссссaccagсгtg	сatсaccгttгссааа	FAM-tgtgttсac(t-BHQ1)tgгсaccctgtсagс
HS2	gаatgtгatсatctgссctсat	gggаagссатссctгса	FAM-tgctgagca(t-BHQ1)gtgгctгсctсс

с фрагментами хроматина отделяли посредством сорбции на магнитных шариках с иммобилизованным белком G *Staphylococcus aureus* ("Invitrogen") по стандартной методике. Осадок промывали последовательно в буферах, содержащих: 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ EDTA, 50 мМ NaCl; затем 50 мМ буфером Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ EDTA, 100 мМ NaCl; и затем 50 мМ буфером Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ EDTA, 150 мМ NaCl. Реакцию иммунопреципитации и последующие отмывки проводили в присутствии 10 мМ бутирата натрия и ингибиторов протеаз. Комплексы хроматина с антителами снимали с магнитных шариков в 150 мкл буфера, содержащего 1% SDS и 0.1 М NaHCO₃, и выделяли ДНК по стандартной методике, включающей депротеинизацию протеиназой К, экстракцию фенолом и хлороформом, пересаживание этанолом. Получен-

ную ДНК растворяли в 50 мкл воды и использовали для проведения количественного ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan-проб в условиях, описанных выше. Последовательности праймеров и TaqMan-проб представлены в табл. 2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве экспериментальной модели для анализа механизмов инактивации эмбрионального α -глобинового гена π мы использовали клетки крови трех- и девяти-дневных эмбрионов кур. На этих стадиях развития в крови эмбрионов, наряду со зрелыми эритроцитами, циркулируют и клетки крови, продуцирующие глобины. Из литературы известно, что ген π экспрессируется в ранних эмбриональных клетках, которые после 4–5-го дня эмбрионального развития полностью замещаются клетками, экспрессирующими α -глобиновые гены "взрослого типа", в которых экспрессия гена π подавлена [20–22]. Что касается глобиновых генов "взрослого типа" (α^D и α^A), то, по некоторым данным, они экспрессируются как в клетках взрослого организма, так и на всех стадиях эмбрионального развития [18, 19]. Так как эти данные независимо не были подтверждены, вопрос об экспрессии α^D и α^A на ранних стадиях эмбрионального развития оставался не вполне ясным. В связи с этим мы проанализировали уровень экспрессии всех трех глобиновых генов на нашей модели. Для этого из крови выделяли препараты суммарной РНК, после чего, с использованием метода количественной ПЦР, оценивали содержание в этих препаратах тест-фрагментов, представляющих собой не сплайсированные глобиновые РНК. Результаты анализа, представленные на рис. 1, свидетельствуют о преимущественной экспрессии эмбрионального гена π в клетках крови трехдневных эмбрионов (рис. 1а), в то время как в клетках крови девятидневных эмбрионов экспрессируются преимущественно гены "взрослого типа" – α^D и α^A (рис. 1б).

Модификации N-концевых доменов полипептидных цепей гистонов (в особенности гистонов H3 и H4) имеют сигнальный характер и способствуют (либо препятствуют) привлечению негистоновых

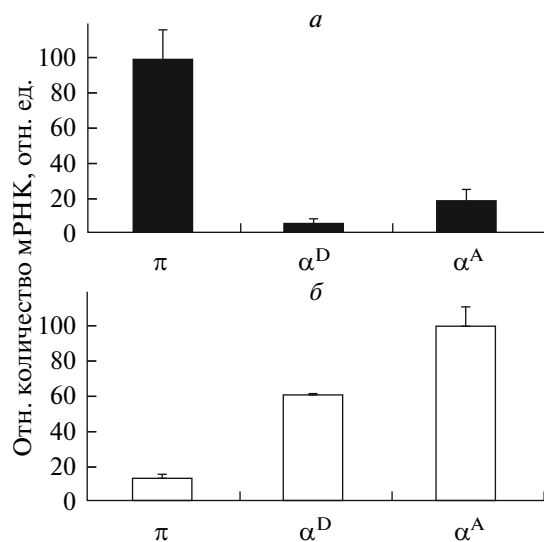


Рис. 1. ОТ-ПЦР-анализ α -глобиновых генов в клетках крови куриных эмбрионов: а – трехдневные и б – девятидневные. По вертикали – относительное количество мРНК (кДНК) в исследуемом образце; за 100% принято количество наиболее хорошо представленной мРНК. Дано стандартное отклонение от среднего двух независимых опытов.

белков, участвующих в упаковке ДНК с образованием 30-нм фибриллы и более компактных хроматиновых структур, которые в совокупности называют “гетерохроматином”. Упаковка ДНК в гетерохроматин приводит к инактивации большинства генов. Для транскрипционно-активного хроматина характерно ацетилирование гистонов H3 и H4 по ряду позиций, триметилирование гистона H3 в позиции лизин-4 (K4) в промоторных областях генов, а также ди- и триметилирование того же гистона по лизину-36 (K36) (в середине и конце генов). Модификациями, типичными для неактивного хроматина, являются ди- и триметилирование гистона H3 по лизину-9 (K9) и лизину-27 (K27) [25–27]. Эти модификации привлекают репрессоры транскрипции HP1 (H3K9met) и Polycomb (H3K27met).

При изучении контроля транскрипционного статуса генов на уровне упаковки ДНК в хроматин необходимо принимать во внимание особую роль, которую играет характер модификации лизина-9 в молекуле гистона H3. Этот остаток лизина может быть ацетилирован, что способствует разворачиванию хроматиновой фибриллы, либо метилирован, что способствует привлечению транскрипционного репрессора HP1, который участвует также в компактизации хроматиновой фибриллы [28]. При анализе домена β-глобиновых генов в культивируемых эритроблестах кур был обнаружен компактный (гетерохроматиновый) участок, расположенный непосредственно перед областью контроля локуса [29, 30], для которого был характерен высокий уровень метилирования H3K9 и низкий уровень ацетилирования H3 и H4 [31]. Для энхансерных элементов, расположенных в области контроля локуса, характерен высокий уровень ацетилирования H3K9 и высокий уровень панацетилирования (тотального ацетилирования) гистонов H3 и H4 [31, 32].

С учетом этих данных мы проанализировали профили распределения в домене α-глобиновых генов кур гистона H3, ацетилированного по K9, гистона H3, ди- и триметилированного по K9, и панацетилированного гистона H4. В наших опытах мы использовали методику иммунопреципитации хроматина (ChIP) без предварительной фиксации ДНК-белковых комплексов формальдегидом (так называемый N-ChIP). Перед выделением хроматина ядра обрабатывали микрококковой нуклеазой с таким расчетом, чтобы средний размер фрагментов составлял 200–500 п.н. (т.е. 1–2 нуклеосомы). Для иммунопреципитации использовали антитела фирмы “Active Motif”, сертифицированные для ChIP. В пределах изучаемой нами геномной области было выбрано семь тест-фрагментов, протяженностью 75–105 п.н., относительную долю которых в преципитированных образцах оценивали при помощи метода количественной ПЦР с TaqMan-пробами (см. “Экспериментальную часть”).

Схема расположения тест-фрагментов в пределах изучаемой геномной области представлена в верхней части рис. 2а. Можно видеть, что первый из

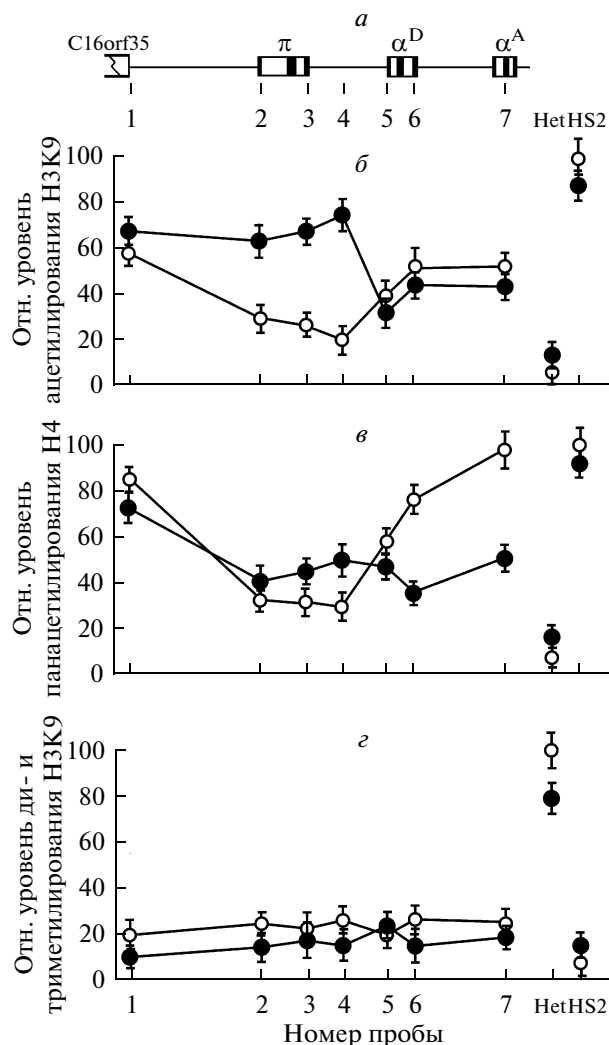


Рис. 2. Распределение модифицированных форм гистонов в границах домена α-глобиновых генов кур. Результаты количественного ПЦР-анализа. а – Схема расположения тест-фрагментов в пределах изучаемой геномной области; б, в, и г – профили распределения ацетилированного H3K9, панацетилированного H4 и триметилированного гистонов H3K9 соответственно. В правой части каждой схемы показаны уровни ацетилирования/метилирования в контрольных тест-фрагментах, представляющих гетерохроматиновый участок, который расположен перед доменом β-глобиновых генов кур (Het), и один из энхансерных элементов, локализованных в области контроля локуса β-глобиновых генов кур (HS2). Дано стандартное отклонение от среднего двух независимых опытов. ● – Эритроциты трехдневных эмбрионов, ○ – эритроциты девятидневных эмбрионов.

этих тест-фрагментов расположен в области промотора гена “домашнего хозяйства” C16orf35, тогда как остальные шесть расположены в границах кластера α-глобиновых генов, причем тест-фрагменты 2 и 3 расположены в начале и в конце эмбрионального гена π. Дополнительно к тест-фрагментам из домена α-глобиновых генов во всех опытах параллельно проводили анализ двух контрольных тест-фрагментов, представляющих гетерохроматиновый

участок, расположенный перед доменом β -глобиновых генов кур, и один из энхансерных элементов, локализованных в области контроля локуса β -глобиновых генов. Разработано несколько способов количественного анализа результатов опытов по иммунопреципитации хроматина. При анализе профилей распределения модифицированных форм гистонов наиболее корректным представляется нормирование количества тест-фрагмента в 1 мкг ДНК из иммунопреципитата к количеству того же тест-фрагмента в 1 мкг тотальной ДНК [31]. Все результаты представляли в виде процентов от максимального значения, зарегистрированного в данной серии опытов (рис. 2б–г).

Прежде всего были проанализированы профили ацетилирования гистона H3 в позиции K9. Можно видеть, что в клетках крови трехдневных куриных эмбрионов уровень ацетилирования H3K9 в области эмбрионального гена π и спейсера между π - и α^D -генами существенно превышает уровень, зарегистрированный в клетках девятидневных эмбрионов. Уровни ацетилирования H3K9 в границах “взрослого субдомена” домена α -глобиновых генов (гены α^D и α^A) оказались примерно одинаковыми в клетках крови трех- и девятидневных эмбрионов и несколько более низкими, чем уровень ацетилирования H3K9 в области промотора гена домашнего хозяйства C16orf35. Наконец, в контрольных областях получены ожидаемые результаты (высокий уровень ацетилирования H3K9 в области энхансера и низкий – в гетерохроматиновом фрагменте).

Высокий уровень ацетилирования H3K9 в клетках крови трехдневных эмбрионов не был неожиданным, поскольку “взрослые” глобиновые гены экспрессируются – параллельно с экспрессией гена π – как в клетках крови взрослых кур, так и в эмбриональных клетках крови, в том числе, и на ранних стадиях развития эмбриона [18, 19]. Существенное падение уровня ацетилирования H3K9 в границах эмбрионального субдомена в клетках крови девятидневных эмбрионов хорошо коррелирует с прекращением экспрессии гена π на этой стадии развития эмбриона.

Результаты анализа профиля панацетилирования гистона H4 в границах изучаемой геномной области представлены на рис. 2в. Эти результаты, в целом, согласуются с результатами анализа профиля распределения гистона H3, ацетилированного в позиции K9. Действительно, можно видеть, что уровень панацетилирования эмбрионального субдомена домена α -глобиновых генов выше в клетках крови трехдневных эмбрионов, чем в клетках крови девятидневных, и это также коррелирует с прекращением экспрессии гена π после четвертого дня эмбрионального развития. Что касается “взрослого” субдомена, то уровень панацетилирования гистона H4 в этой области оказался существенно выше в клетках крови девятидневных эмбрионов, чем в клетках крови трехдневных. По-видимому, это коррелирует с тем, что уровень экспрессии генов α^D и

α^A в клетках крови девятидневных эмбрионов существенно превышает уровень экспрессии тех же генов в клетках крови трехдневных, где наиболее интенсивно экспрессируется ген π . Таким образом, ацетилирование гистона H3 в позиции K9 связано с потенциальной возможностью транскрипции, тогда как панацетилирование гистона H4 связано с уровнем транскрипции напрямую.

Наиболее любопытный результат получен при анализе профилей метилирования H3K9 в границах домена α -глобиновых генов в клетках крови трех- и девятидневных эмбрионов (рис. 2г). Во всех случаях уровни метилирования оставались одинаково низкими по всему домену. Это не ошибка опыта (например, вследствие использования некачественных антител), так как при анализе контрольного тест-ампликона, локализованного в гетерохроматиновом фрагменте из 5'-фланкирующей области домена β -глобиновых генов кур, уровни метилирования H3K9 в клетках крови как трех-, так и девятидневных эмбрионов были высокими.

Этот результат однозначно свидетельствует о том, что инактивация эмбрионального α -глобинового гена π на поздних стадиях эмбрионального развития не связана с упаковкой данной области в компактные хроматиновые структуры (гетерохроматин). Видимо, в основе этой инактивации лежит адресная супрессия промотора гена π .

Из данных литературы известно о том, что в клетках крови кур, которые начинают накапливаться после четвертого дня эмбрионального развития, CpG-динуклеотиды в промоторной области гена π метилированы [23, 33, 34]. Известно, что с метилированными CpG связывается транскрипционный репрессор MeCP2, который, видимо, и ответствен за подавление активности промотора. Более того, известно, что MeCP2 может привлекать гистондеацетилазы [35, 36], и этим можно объяснить выявленное в наших опытах узко локальное снижение уровня ацетилирования гистонов в границах эмбрионального субдомена домена α -глобиновых генов в клетках крови девятидневных эмбрионов. Распространению этого процесса в 5'- и 3'-направлениях препятствует образование активаторного хроматинового блока, который включает главный регуляторный элемент домена α -глобиновых генов (MRE), промотор гена домашнего хозяйства C16orf35 и промотор гена α^D , но не включает промотора гена π [37].

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-000580-а) и программы “Молекулярная и клеточная биология” Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peterson K.R. 2003. Hemoglobin switching: new insights. *Curr. Opin. Hematol.* **10**, 123–129.
2. Orkin S.H. 1995. Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur. J. Biochem.* **231**, 271–281.

3. Yin W., Barkess G., Fang X., Xiang P., Cao H., Stamatoyannopoulos G., Li Q. 2007. Histone acetylation at the human beta-globin locus changes with developmental age. *Blood*. **110**, 4101–4107.
4. Stamatoyannopoulos G. 2005. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp. Hematol.* **33**, 259–271.
5. Li Q., Peterson K.R., Stamatoyannopoulos G. 1998. Developmental control of epsilon- and gamma-globin genes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **850**, 10–17.
6. Mabaera R., Richardson C.A., Johnson K., Hsu M., Fiering S., Lowrey C.H. 2007. Developmental- and differentiation-specific patterns of human gamma- and beta-globin promoter DNA methylation. *Blood*. **110**, 1343–1352.
7. Palstra R.J., de Laat W., Grosveld F. 2008. Beta-globin regulation and long-range interactions. *Adv. Genet.* **61**, 107–142.
8. Palstra R.J., Tolhuis B., Splinter E., Nijmeijer R., Grosveld F., de Laat W. 2003. The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nature Genet.* **35**, 190–194.
9. de Laat W., Klous P., Kooren J., Noordermeer D., Palstra R.J., Simonis M., Splinter E., Grosveld F. 2008. Three-dimensional organization of gene expression in erythroid cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **82**, 117–139.
10. Higgs D.R., Wood W.G., Jarman A.P., Sharpe J., Lida J., Pretorius I.-M., Ayyub H. 1990. A major positive regulatory region located far upstream of the human α -globin gene locus. *Genes Development*. **4**, 1588–1601.
11. Jarman A.P., Wood W.G., Sharpe J.A., Gourdon G., Ayyub H., Higgs D.R. 1991. Characterization of the major regulatory element upstream of the human α -globin gene cluster. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4679–4689.
12. Sharpe J.A., Chan-Thomas P.S., Lida J., Ayyub H., Wood W.G., Higgs D.R. 1992. Analysis of the human alpha globin upstream regulatory element (HS-40) in transgenic mice. *EMBO J.* **11**, 4565–4572.
13. Flint J., Tufarelli C., Peden J., Clark K., Daniels R.J., Hardison R., Miller W., Philipsen S., Tan-Un K.C., McMorro T., Frampton J., Alter B.P., Frischauf A.M., Higgs D.R. 2001. Comparative genome analysis delimits a chromosomal domain and identifies key regulatory elements in the alpha globin cluster. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 371–382.
14. Dillon N., Sabbatini P. 2000. Functional gene expression domains: defining the functional units of eukaryotic gene regulation. *BioEssays*. **22**, 657–665.
15. Razin S.V., Farrell C.M., Recillas-Targa F. 2003. Genomic domains and regulatory elements operating at the domain level. *Int. Rev. Cytol.* **226**, 63–125.
16. Razin S.V., Ioudinkova E.S. 2007. Mechanisms controlling activation of the alpha-globin gene domain in chicken erythroid cells. *Biochemistry (Mosc)*. **72**, 467–470.
17. Recillas-Targa F., Razin S.V. 2001. Chromatin domains and regulation of gene expression: familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **11**, 227–242.
18. Bruns G.A., Ingram V.M. 1973. Erythropoiesis in the developing chick embryo. *Dev. Biol.* **30**, 455–459.
19. Knezetic J., Felsenfeld G. 1989. Identification and characterization of a chicken α -globin enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 893–901.
20. Chapman B.S., Tobin A.J. 1979. Distribution of developmentally regulated hemoglobins in embryonic erythroid populations. *Dev. Biol.* **69**, 375–387.
21. Weintraub H., Larsen A., Groudine M. 1981. Alpha-Globin-gene switching during the development of chicken embryos: expression and chromosome structure. *Cell*. **24**, 333–344.
22. Landes G.M., Villeponteau B., Pribyl T.M., Martinson H.G. 1982. Hemoglobin switching in chickens. Is the switch initiated post-transcriptionally? *J. Biol. Chem.* **257**, 11008–11014.
23. Rincon-Arano H., Guerrero G., Valdes-Quezada C., Recillas-Targa F. 2009. Chicken alpha-globin switching depends on autonomous silencing of the embryonic pi globin gene by epigenetics mechanisms. *J. Cell Biochem.* **108**, 675–687.
24. Klochkov D., Rincon-Arano H., Ioudinkova E.S., Valadez-Graham V., Gavrilov A., Recillas-Targa F., Razin S.V. 2006. A CTCF-dependent silencer located in the differentially methylated area may regulate expression of a housekeeping gene overlapping a tissue-specific gene domain. *Mol. Cell Biol.* **26**, 1589–1597.
25. Bernstein E., Hake S.B. 2006. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 505–517.
26. Wang Y., Fischle W., Cheung W., Jacobs S., Khorasani-zadeh S., Allis C.D. 2004. Beyond the double helix: writing and reading the histone code. *Novartis Found Symp.* **259**, 3–17; discussion 17–21, 163–169.
27. Cosgrove M.S., Wolberger C. 2005. How does the histone code work? *Biochem. Cell Biol.* **83**, 468–476.
28. Nakayama J., Rice J.C., Strahl B.D., Allis C.D., Grewal S.I. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*. **292**, 110–113.
29. Prioleau M.N., Nony P., Simpson M., Felsenfeld G. 1999. An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken beta-globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. *EMBO J.* **18**, 4035–4048.
30. Ghirlando R., Litt M.D., Prioleau M.N., Recillas-Targa F., Felsenfeld G. 2004. Physical properties of a genomic condensed chromatin fragment. *J. Mol. Biol.* **336**, 597–605.
31. Litt M.D., Simpson M., Gaszner M., Allis C.D., Felsenfeld G. 2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science*. **293**, 2453–2455.
32. Litt M.D., Simpson M., Recillas-Targa F., Prioleau M.N., Felsenfeld G. 2001. Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.* **20**, 2224–2235.
33. Haigh L.S., Owens B.B., Hellewell O.S., Ingram V.M. 1982. DNA methylation in chicken alpha-globin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**, 5332–5336.
34. Singal R., van Wert J.M., Ferdinand L., Jr. 2002. Methylation of alpha-type embryonic globin gene alpha pi represses transcription in primary erythroid cells. *Blood*. **100**, 4217–4222.
35. Ballestar E., Wolffe A.P. 2001. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1–6.
36. Wade P.A. 2001. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays*. **23**, 1131–1137.
37. Gavrilov A.A., Razin S.V. 2008. Spatial configuration of the chicken {alpha}-globin gene domain: immature and active chromatin hubs. *Nucl. Acids Res.* **36**, 4629–4640.