

УДК 576.315.42

β-ГЛОБИНОВЫЕ ГЕНЫ КУР: МОДЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ НА УРОВНЕ ГЕНОМНЫХ ДОМЕНОВ

© 2012 г. С. В. Ульянов^{1,2}, А. А. Гаврилов^{1,3*}

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334

²Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234

³Центр медицинских исследований Университета Осло, Москва, 119334

Поступила в редакцию 16.12.2011 г.

Принята к печати 10.02.2012 г.

В последней четверти XX века в результате исследования ряда модельных систем была сформулирована гипотеза, согласно которой геном высших эукариот построен из функционально обособленных участков, названных геномными доменами. Каждый домен включает один или несколько генов и регуляторную систему, в норме активную только по отношению к данному домену, что позволяет ему быть регуляторно автономным. Домен характеризуется различными спектрами ковалентных модификаций гистонов, которые определяют границы данного домена и степень конденсации хроматина в его пределах, а также, следовательно, и возможность активации транскрипции генов, входящих в его состав. Разработка доменной гипотезы организации генома стала возможной, во многом, благодаря изучению механизмов регуляции транскрипции глобиновых генов позвоночных. Одной из самых популярных моделей в этой области молекулярной биологии вот уже на протяжении полувека остается домен β-глобиновых генов кур. В ходе его изучения описаны фундаментальные принципы работы комплексных энхансеров высших эукариот, подробно изучены свойства инсуляторов и отдельных функциональных блоков эукариотических энхансеров и промоторов, исследовано влияние ковалентных модификаций гистонов на степень конденсации хроматина и их роль в регуляции транскрипции внутри домена. В настоящем обзоре мы суммируем данные по исследованию домена β-глобиновых генов кур, а также обсуждаем доменную гипотезу организации эукариотического генома.

Ключевые слова: домен β-глобиновых генов кур, транскрипция, хроматин, зона контроля локуса.

THE CHICKEN β-GLOBIN GENES: A MODEL SYSTEM FOR STUDYING TRANSCRIPTION REGULATION AT THE LEVEL OF GENOMIC DOMAINS, by S. V. Ulyanov^{1,2}, A. A. Gavrilo^{1,3*} (¹Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia; ²Department of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia; ³University of Oslo, Center for Medical Studies, Moscow, 119334 Russia; *e-mail: aleksey.gavrilov@mail.ru). In the last quarter of the XX century, as a result of studies performed on a number of model systems, a hypothesis was formulated according to which the genome of higher eukaryotes consists of functionally isolated areas named genomic domains. Each domain includes one or more genes and a regulatory system that is normally active only in respect of this domain and allows it to achieve the regulatory autonomy of the neighboring chromosome regions. A genomic domain is characterized by the spectra of covalent histone modifications which define the boundaries of the domain and the degree of chromatin condensation within it, and so, the probability of transcription activation of genes within the domain. Development of the domain hypothesis of genome organization became possible to a large extent through the study of mechanisms of transcriptional regulation of the globin genes in vertebrates. One of the most popular models in this field of molecular biology is the chicken β-globin gene domain. Based on this model system, the fundamental principles of complex enhancer action in higher eukaryotes have been described, the properties of insulators and functional units of enhancers and promoters have been studied, the influence of covalent histone modifications on the level of chromatin condensation and their role in the regulation of transcription within the domain have been investigated. In this review we summarize the data on the study of the chicken β-globin gene domain, as well as consider the domain hypothesis of eukaryotic genome organization.

Keywords: β-globin gene domain, transcription, chromatin, locus control region.

Принятые сокращения: DHS (DNase I Hypersensitive Site) – сайт гиперчувствительности к ДНКазе I; LCR (Locus Control Region) – зона контроля локуса; HDAC – гистон-деацетилаза.

* Эл. почта: aleksey.gavrilov@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Отличительной чертой эукариотического генома, по сравнению с прокариотическим, является его упаковка в хроматин — сложный комплекс ДНК и множества белков. В структурном аспекте это связано с необходимостью компактизации ДНК, средняя суммарная длина которой, например у человека, составляет порядка 2 м при диаметре ядра около 10 мкм, что требует сокращения линейных размеров генома почти в 200 000 раз. При этом должно быть соблюдено условие доступности ДНК для реализации заключенной в ней наследственной информации. Компактизация ДНК осуществляется на нескольких уровнях: наматывание ДНК на гистоновый октамер с образованием нуклеосом, формирование из них 30-нм фибриллы, ее укладка в крупные петлевые домены разного размера (50–200 т.п.н.), прикрепленные к белковому ядерному остову [1, 2]. Кроме сокращения линейных размеров, упаковка эукариотического генома в хроматин обуславливает возникновение в эволюции принципиально нового способа регуляции транскрипции генов, репликации ДНК, процессов рекомбинации и репарации. Этот способ и заключается в возможности изменения взаимного пространственного расположения элементов генома и степени его компактизации, что отражается на доступности разных участков ДНК для тех или иных белковых факторов.

Домены глобиновых генов позвоночных животных — одни из самых популярных объектов в изучении регуляции транскрипции эукариотических генов. β -глобиновый ген кролика был первым, который удалось успешно трансфицировать в эукариотические клетки, где была изучена его экспрессия под влиянием его собственных регуляторных элементов. Исследования на мышцах с использованием генетических конструкций на основе β -глобинового домена человека в 1980-х гг. привели к открытию зоны контроля локуса, или LCR (англ. Locus Control Region), — позитивного регуляторного элемента, обеспечивающего экспрессию трансгена в эндогенной позиции независимо от места интеграции в геном. На примере глобиновых доменов изучены также свойства инсуляторов — особых генетических элементов, препятствующих распространению гетерохроматина по ДНК, а также блокирующих действие энхансера на промотор [3]. В частности, 5'-инсулятор домена β -глобинового домена кур стал первым инсулятором, открытым у позвоночных животных.

Полномасштабное исследование домена β -глобиновых генов кур начато еще в середине XX века, и за прошедшие десятилетия этот домен стал классическим модельным объектом в изучении регуляции транскрипции на уровне хромати-

на. В многочисленных работах получены обширные сведения о роли зоны контроля локуса в механизмах активации транскрипции глобиновых генов в ходе онтогенеза, о функциональном взаимодействии управляющих элементов домена и роли эпигенетических модификаций в регуляции транскрипции. При изучении домена β -глобиновых генов кур и других теплокровных животных открыт феномен переключения программы экспрессии, который заключается в том, что в ходе онтогенеза происходит поочередная активация транскрипции генов β -глобинов — сначала эмбрионального, затем взрослого типа. Механизмы этого переключения на сегодняшний день, во многом, остаются не ясными.

В первой части настоящего обзора мы определим, что подразумевается под термином “геномный домен”, и рассмотрим принципы регуляции транскрипции на доменном уровне. Во второй части мы проследим историю исследований домена β -глобиновых генов кур и покажем, как концентрация усилий многих исследовательских коллективов на характеристике одной и той же модельной системы позволила раскрыть фундаментальные принципы, лежащие в основе регуляции транскрипции у эукариот.

ДОМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА

Хроматиновые домены

Еще в начале XX века цитологи обратили внимание на то, что ядро интерфазной клетки неравномерно окрашивается основными красителями. Были описаны области с высокой и низкой плотностью ядерного вещества, впоследствии названные гетерохроматином и эухроматином соответственно [4, 5]. С развитием представлений об организации генома эукариотической клетки и о механизмах реализации наследственной информации встал вопрос о том, может ли осуществляться регуляция транскрипции на уровне компактизации молекул ДНК в ядерном пространстве. Иными словами, имеется ли корреляция между уровнем транскрипции данного гена и степенью конденсации хроматина на этом участке генома.

Впервые экспериментальные данные, косвенно указывавшие на то, что транскрипция и компактизация хроматина взаимосвязаны, были получены в опытах по мечению вновь синтезируемых (наскентных) цепей РНК с помощью радиоактивного уридина [6]. На радиоавтографах изолированных ядер было отчетливо видно, что цепи РНК локализируются преимущественно в областях эухроматина и лишь иногда оказываются в пределах “глыбок” гетерохроматина (рис. 1). Последующие опыты по транскрипции хроматина бактериальной РНК-полимеразой [7] показали, что

транскрипция глобиновых генов *in vitro* идет гораздо более активно при использовании в качестве матриц препаратов хроматина из ретикулоцитов, нежели из клеток мозга или печени. Этот экспериментальный факт авторы работы объяснили тем, что “белки хроматина” связываются с ДНК неравномерно, и паттерны связывания зависят от типа клеток. Другими словами, фактически, была выдвинута гипотеза, что один и тот же район генома в клетках из разных тканей на уровне хроматина организован по-разному. Позднее было показано, что активно транскрибируемые гены в составе хроматина сильнее подвержены перевариванию ДНКазой I, нежели гены, не транскрибируемые в данном клеточном типе [2, 8, 9]. Предшествующее этому открытию нуклеосом и 30-нанометровой хроматиновой фибриллы — в комплексе с новыми данными по дифференциальной чувствительности хроматина к ДНКазе I — послужили основой для построения структурной модели транскрипционно-активного хроматина [10]. Согласно этой модели, активно транскрибируемые гены находятся в состоянии расправленной цепи ДНК с нуклеосомами. Такая конформация хроматина отвечает активным и потенциально активным генам и является ДНКазочувствительной. В пределах генов, не транскрибируемых в данном типе клеток, ДНК с нуклеосомами организована в 30-нанометровую хроматиновую фибриллу и структуры более высокого порядка компактизации, в составе которых ДНК гораздо более устойчива к перевариванию нуклеазами.

Изучение чувствительности хроматина к ДНКазе I, помимо прочего, способствовало разработке методик выделения транскрипционно-активной фракции хроматина [11, 12]. Применение этих экспериментальных подходов позволило выявить самые характерные черты такого хроматина: гистоны в составе нуклеосом гиперацетилированы, в нем присутствуют белки группы HMG и множество гистонацетилтрансфераз, нуклеосома частично развернута [2, 13, 14]. В транскрипционно-неактивном хроматине, напротив, ацетилированных форм гистонов существенно меньше. В его пределах уровень метилирования гистона H3 по лизину в позициях 9 и 27 повышен, присутствует белок HP1, необходимый для конденсации хроматиновой нити, и белки, участвующие в репрессии генов (группа Polycomb и целый ряд других факторов) [15, 16]. Поддержание эпигенетического статуса как в эухроматине, так и в гетерохроматине — активный энергозависимый процесс, и протекает он при участии большого числа факторов ремоделирования, обеспечивающих динамичность структуры хроматина [17]. Важно, что ферменты, модифицирующие гистоны в составе нуклеосом, в комплексе с факторами ремоделирования могут передвигаться по ДНК — теоретически — на неограниченные рас-

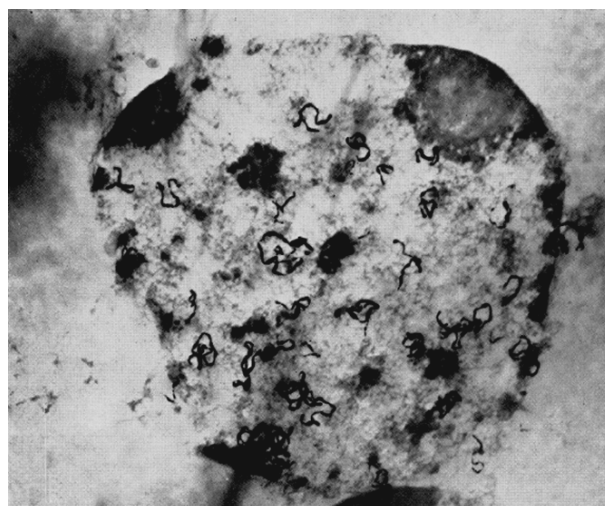


Рис. 1. Радиоавтограф изолированного ядра тимоцита ($\times 21000$). Клетки инкубировали с радиоактивно-меченным уридином, визуализированы новосинтезированные (насцентные) цепи РНК, располагающиеся преимущественно в пределах эухроматиновых районов ядра (из [6], модифицировано).

стояния, обеспечивая процессивное распространение ацетилирования, метилирования и других ковалентных модификаций гистонов. Естественные границы распространения эпигенетических модификаций создают особые последовательности ДНК, названные инсуляторами [18, 19].

Обширный массив экспериментальных данных, касающихся структуры хроматина и свойств, характерных для его транскрипционно-активной и транскрипционно-неактивной фракций, стал основой для появления концепции геномного (или хроматинового) домена, в структурном отношении представляющего собой участок ДНК, внутри которого могут происходить те или иные изменения в структуре хроматина, не распространяющиеся на прилегающие области [20]. В функциональном смысле геномный домен представляет собой экспрессионный модуль, включающий один или более генов (генный кластер), подконтрольный собственной регуляторной системе, активной только в отношении данного домена и позволяющей ему достичь регуляторной автономии [21].

Итак, гены поодиночке или в составе генных кластеров расположены внутри хроматиновых доменов, характеризующихся теми или иными эпигенетическими модификациями, которые определяют степень конденсации хроматина внутри домена. Активные и потенциально активные гены расположены в доменах с “открытой”, ДНКазочувствительной конфигурацией, нетранскрибирующиеся гены располагаются в доменах конденсированного, “закрытого” ДНКазорезистентного хроматина. Каждый домен управляется собствен-

ной регуляторной системой, сфера влияния которой не распространяется за пределы данного домена. Границы доменов часто (но не всегда) маркированы инсуляторами, которые в отдельных случаях могут располагаться и внутри домена. Описанная картина устройства эукариотического генома, несомненно, довольно упрощена. Кроме классических хроматиновых доменов, которые имеют четкие границы, определяемые по изменению чувствительности хроматина к ДНКазе I, имеются домены, не имеющие выраженных границ, — так называемые домены открытого типа. Зачастую они включают в себя филогенетически и функционально не связанные гены и кластеры генов, регуляторные системы которых перекрываются. Классический пример — домены β -глобиновых генов позвоночных животных [22]. Во всех изученных системах они перекрываются с каким-либо неглобиновым геном, транскрибирующимся независимо от типа клеток и являющимся геном домашнего хозяйства. Домены открытого типа находятся в ДНКазочувствительной, т.е. в потенциально активной, конформации во всех типах клеток. Учитывая, что в их состав входят гены, подконтрольные разным регуляторным системам, можно полагать, что возникает задача распознавания мишеней, одним из возможных путей решения которой является повышение специфичности взаимодействия между промоторами генов и *cis*-регуляторными элементами. Кроме того, работа таких систем может модулироваться инсуляторами, расположенными внутри домена и подразделяющими его на субдомены, в пределах которых активность позитивных или негативных регуляторных элементов будет направлена на промотор одного отдельно взятого гена. Другой отличительной чертой доменов открытого типа является то, что для выявления их границ не всегда может быть применен тест на чувствительность к ДНКазе I, поскольку часто транскрипционный статус домена не коррелирует с изменением степени чувствительности области к ДНКазе. Для установления протяженности доменов открытого типа может быть использовано картирование сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I (DNase I Hypersensitive Site, DHS), маркирующих сайты связывания регуляторных факторов, а также определение профилей модификаций гистонов.

Инсуляторы

Важную роль в функционировании как классических доменов, так и доменов открытого типа играют инсуляторы. Впервые эти элементы генома обнаружены на границе локуса генов теплового шока *hsp70* у *Drosophila melanogaster* как участки, гиперчувствительные к ДНКазе I [18]. Впоследствии они были найдены во всех изученных

группах эукариот, от дрожжей до человека [23], при этом никаких консенсусных мотивов в последовательностях инсуляторов из разных таксономических групп обнаружено не было [24]. Классический инсулятор обладает двумя активностями: барьерной и энхансер-блокирующей. Первая ограничивает распространение по геному сигналов (ковалентных модификаций гистонов и ДНК), влияющих на структуру хроматина. Так ограничивается распространение гетерохроматина по ДНК, а также распространение волн гиперацетилирования гистонов, приводящих, наоборот, к “открыванию” хроматина. Согласно одной из моделей, инсулятор связывает белковые факторы, взаимодействующие с гистонами на соседних нуклеосомах и, тем самым, ограничивающие активность гистон-ацетилтрансфераз и гистон-деацетилаз (HDAC) в этом районе. Кроме того, на основе изучения инсулятора, расположенного на 5'-конце домена β -глобиновых генов кур, показано, что возникновение на инсуляторе участка, свободного от нуклеосом, может значительно снижать процессивность комплексов, осуществляющих ковалентные модификации гистонов [25].

Функция блокировки влияния энхансера на промотор связана с активностью белка CTCF (у млекопитающих и дрозодилы взаимодействующего с инсуляторами). Молекула CTCF включает одиннадцать цинковых пальцев, разные комбинации которых позволяют этому белку узнавать разные последовательности ДНК. Считается, что помимо этой активности, CTCF может влиять на пространственную структуру хроматина, организуя его в петли, поскольку его молекулы могут образовывать гетероолигомеры с другими белками [26]. Эта способность играет важную роль в компартиментализации ядерного пространства и в привлечении активных генов к транскрипционным фабрикам или, напротив, в локализации неактивных генов вблизи ядерной ламины и вблизи конститутивного гетерохроматина [23]. Исследования последних лет показывают, что в функционировании инсуляторов как элементов, организующих пространственную структуру хроматина, участвует также когезин, связывающийся в интерфазных хромосомах с инсуляторами посредством CTCF и обуславливающий физическое взаимодействие удаленных регуляторных элементов генома в ядерном пространстве [27, 28].

Регуляция транскрипции зонами контроля локуса. Хроматиновый хаб

Транскрипция генов внутри домена нередко регулируется LCR — комплексными энхансерными элементами, включающими сайты связывания транскрипционных факторов. Впервые LCR была определена в β -глобиновом домене человека как протяженный участок ДНК, содержащий

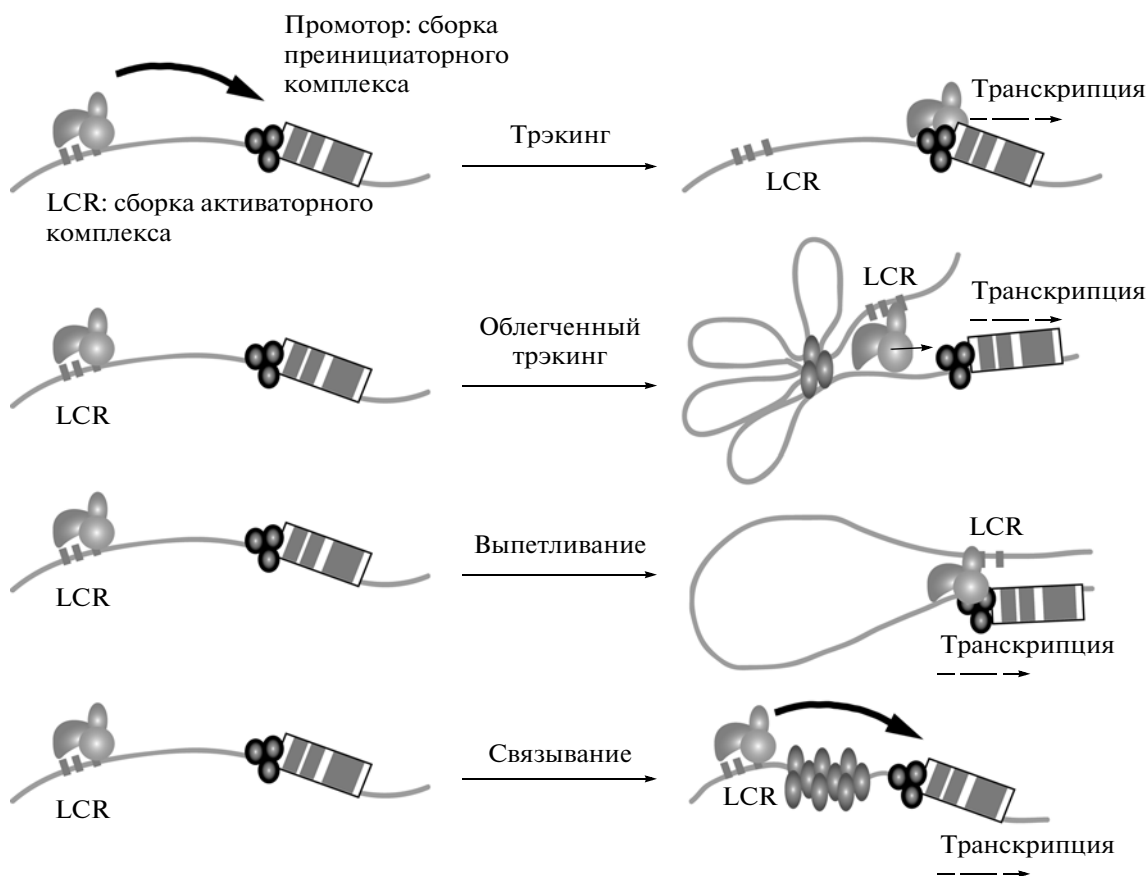


Рис. 2. Модели действия LCR. Пояснения в тексте.

несколько DHS, при делециях внутри которого наблюдаются нарушения в регуляции транскрипции домена [29]. В ходе последующего изучения LCR домена β-глобиновых генов и ряда других геномных доменов выяснили главную особенность, которая в опыте отличает LCR от обычных энхансеров: LCR направляет транскрипцию сцепленного с ней трансгена в эндогенной позиции независимо от сайта интеграции в геном (в прямой зависимости от количества копий трансгена) [30]. Таким образом, кроме осуществления непосредственной регуляции активности промоторов подконтрольных генов, LCR влияет на локальную структуру хроматина, являясь платформой для сборки ферментных комплексов, осуществляющих ковалентные модификации гистонов в составе нуклеосом, что приводит к локальной деконденсации хроматина в месте интеграции трансгена [31]. Функции LCR реализуются посредством факторов транскрипции, связывающихся с DHS. Эти белки участвуют как в построении полноценного инициаторного комплекса на подконтрольном промоторе [32], так и могут влиять на структуру хроматина в этом районе, привлекая факторы ремоделирования хроматина и участвуя в инициации ацетилирования и деацетилирования гистонов.

Предложено несколько моделей действия LCR [33, 34]. Согласно модели “трэкинга” (tracking) (рис. 2) активаторный комплекс собирается на LCR, затем движется по ДНК и достигает промотора, на котором и формируется полноценный инициаторный транскрипционный комплекс. По-видимому, трэкинг обычно происходит по хроматиновой нити, обогащенной ацетилированными гистонами; волна ацетилирования гистонов начинается также на LCR и распространяется от нее в обе стороны до тех пор, пока она не встретится с барьерным элементом. Кроме того, во второй модели – “облегченного трэкинга” (facilitated tracking) – предполагается, что участок ДНК между LCR и промотором организован в микропетли или что происходит связывание активаторного комплекса, расположенного на LCR, с последовательностью ДНК выше подконтрольного промотора, что сокращает дистанцию последующего трэкинга. Согласно третьей модели (“петлевая модель”, looping), участок между LCR и промотором полностью выпетливается, и транскрипционные факторы, связанные с зоной контроля локуса, оказываются в непосредственном контакте с промотором. В рамках этой модели предложен так называемый “флип-флоп-механизм”

переключения транскрипции внутри домена: LCR поочередно взаимодействует с каждым из промоторов, т.е. в каждый момент времени контактирует только с одним из них [35]. Еще в одной модели (модель “связывания”, linking) предполагается существование специальных белков, ответственных за конденсацию хроматина между энхансером и промотором, в результате чего энхансер подтягивается к промотору; это обеспечивает более эффективный перенос факторов транскрипции к промоторной области.

Кроме регуляции активности промоторов, LCR вовлечены и в ряд других процессов [29]. Они позиционируют активные гены в определенных компартментах ядра вблизи от транскрипционных фабрик, могут быть ответственны за установление времени репликации подконтрольного домена, а также за репрессию тканеспецифичных генов. Так, Фенг (Feng) и соавт. (цит. по [31]) показали, что репрессия β -глобиновых генов в незрелых эритроидных клетках человека зависит от DHS2 и DHS3 внутри LCR, контролирующего β -глобиновый домен.

Сайты связывания транскрипционных факторов локализованы не только в пределах зоны контроля локуса. Они располагаются в пределах менее крупных энхансеров, а также сайленсеров и инсуляторов, и маркируются DHS, которые или конститутивны, или присутствуют только в определенных типах клеток, если содержат сайты связывания тканеспецифичных факторов [36]. В геноме все эти регуляторные элементы оказываются пространственно сближенными с промоторами, которые они контролируют, с выпетливанием промежуточного участка ДНК, протяженность которого может составлять тысячи и даже сотни тысяч пар нуклеотидов. При этом транскрипционные факторы участвуют в образовании полноценных транскрипционных комплексов на активных промоторах, а не транскрибирующиеся гены оказываются в пределах выпетленных участков ДНК. Формируются структуры, в которых удаленные регуляторные элементы и промоторы подконтрольных генов находятся в непосредственном физическом контакте, будучи связанными посредством белок-белковых взаимодействий транскрипционных факторов, одни из которых узнают промоторы генов, а другие располагаются на регуляторных элементах.

Такие сложные ДНК-белковые комплексы описаны в рамках модели “активного хроматинового хаба” (*hub* – узловая станция). Хроматиновые хабы – динамичные структуры, стабильность которых зависит от спектра транскрипционных факторов, участвующих в их формировании [21, 26]. Сборка хроматинового хаба не происходит единовременно. Так, в эритроидных клетках кур на стадии преэритробластов, когда глобино-

вые гены еще не активны, домен α -глобиновых генов находится в практически линейной конфигурации, пространственно сближенными оказываются только два регуляторных элемента домена [37]. И только после перехода к дифференцировке на стадии эритробластов в полноценный активный хаб привлекаются дополнительные энхансерный элемент и промотор одного из α -глобиновых генов.

Сходная ситуация наблюдается и в β -глобиновом локусе мыши [38]. Он включает в себя четыре гена, активность которых зависит от стадии развития. Гены β^{maj} и β^{min} экспрессируются во взрослом организме, гены ϵ и β_{H1} активны на эмбриональных стадиях. До того, как в клетках эритроидной линии начнется активный синтез глобинов, в их ядрах β -глобиновый локус собирается в незрелый хроматиновый хаб, включающий в себя LCR и ряд DHS. После перехода клеток к терминальной дифференцировке в него привлекаются также промоторы активных β -глобиновых генов. Строго говоря, неким “минимальным” хабом можно считать комплекс энхансера с промотором, однако во всех изученных системах зрелый хроматиновый хаб, формирующийся с участием зоны контроля локуса, всегда содержит дополнительные элементы (участки последовательности ДНК), которые влияют, по всей видимости, на динамичность структуры хаба и, возможно, модулируют его работу.

Согласно современной модели, именно формирование активного хроматинового хаба вызывает супрессию эффекта положения в трансгенах за счет того, что сформировавшийся хаб представляет собой область с высокой концентрацией сайтов связывания транскрипционных факторов, которые часто служат “затравками” при сборке комплексов гистон-ацетилтрансфераз [21]. За счет этого в районе хаба формируется локальный участок “открытого” хроматина, даже если трансген вставлен в гетерохроматиновую область хромосомы. В нормальных условиях внутри геномных доменов формирование активного хроматинового хаба также, несомненно, вносит вклад в поддержание “открытой” конформации хроматина, дополняя, тем самым, барьерную функцию инсуляторов, расположенных на границах домена.

ДОМЕН β -ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ КУР

Общая характеристика

Домен β -глобиновых генов кур расположен на первой хромосоме, его протяженность – порядка 33 т.п.н. Он включает кластер из четырех β -глобиновых генов: ρ (*HBG1*), β^{H} (*HBE1*), β^{A} (*HBG2*) и ϵ (*HBE*), а также ряд управляющих элементов, маркированных DHS и необходимых для регуляции

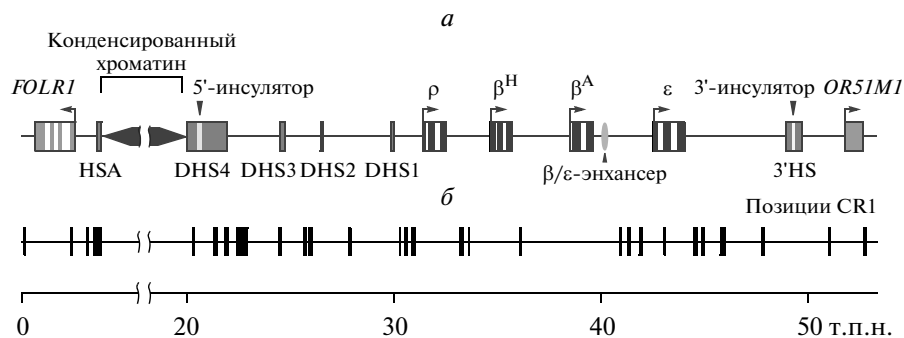


Рис. 3. Домен β-глобиновых генов кур. *а* – Общая схема домена. *FOLR1* – ген фолатного рецептора, активный в пре-эритробластах; *OR51M1* – ген обонятельного рецептора; HSA, DHS1-4, 3'HS – сайты гиперчувствительности к ДНКазе I (HSA присутствует в эритробластах; DHS1-3 – эритроидспецифичные; DHS4, 3'HS – конститутивные). Карта построена по последовательности нуклеотидов GenBank NW_001471556 и [83]. *б* – Положения ретротранспозонов типа CR1, рекомбинация между которыми играет важную роль в эволюции домена (по данным UCSC Genome Bioinformatics и Рейтман (Reitman) и соавт. [44]).

транскрипции, репликации и хроматинового статуса домена [39] (рис. 3а). Первые молекулы гемоглобина появляются в эритробластах эмбриона через 32 ч после оплодотворения [40]. β-цепи в них представлены продуктами генов ρ и ε, которые транскрибируются со второго по пятый день развития эмбриона. После пятого дня происходит переключение программы экспрессии, и в популяции эритроидных клеток начинается экспрессия генов взрослых глобинов β^H и β^A, а транскрипция ρ и ε прекращается. Фетальный ген β^H транскрибируется с десятого дня развития эмбриона до момента вылупления птенца, после чего активно транскрибируется только ген β^A [41].

β-глобиновые гены кур произошли путем серии дупликаций и генных конверсий от общего гена-предшественника, что привело к возникновению генного кластера, внутри которого все гены транскрибируются в одном направлении [42]. Гены ρ и ε имеют два района гомологии: первый включает 5'-нетранслируемую область и экзон 1, второй расположен внутри экзона 2. Вне этих районов гены ρ и ε имеют больше сходства с генами взрослых глобинов, нежели друг с другом [43]. Первым в β-глобиновом кластере обособился ген ε, затем ρ, после чего произошло обособление генов фетального и взрослого глобинов β^H и β^A. Такой способ эволюции, вероятно, связан с тем, что домен обогащен ретротранспозонами типа CR1 (рис. 3б) и является, по-видимому, “горячей точкой” инсерционного мутагенеза [44]. В регионах генома, обогащенных подобными мобильными элементами, генные дупликации должны происходить с повышенной частотой за счет рекомбинации между CR1-содержащими участками [45]. Эволюция посредством последовательных дупликаций потомков одного гена-предшественника – общая черта β-глобиновых доменов кур и млекопитающих. Сходен также и способ регуляции

транскрипции внутри домена, при котором на разных стадиях онтогенеза транскрибируются только строго определенные гены [44]. Отличительной чертой организации β-глобинового домена кур является то, что гены расположены не в порядке активации транскрипции в онтогенезе, как это имеет место у млекопитающих [46], а также то, что домен расположен в GC-богатой области. При этом, CpG-динуклеотиды распределены неравномерно и сосредоточены, главным образом, в промоторах генов и в пределах сайтов гиперчувствительности, расположенных выше гена ρ (*DHS1-3*).

Домен β-глобиновых генов кур принадлежит к классическим доменам закрытого типа. В ранних исследованиях показано, что область длиной 6.2 т.п.н., включающая в себя ген β^A, ген ε и межгенный участок, обладает высокой чувствительностью к ДНКазе I в эритроцитах 14-дневных куриных эмбрионов и практически нечувствителен к действию этого фермента в клетках мозга [47]. Далее показано, что весь домен целиком находится в чувствительной к ДНКазе I хроматиновой конформации только в эритроидных клетках, которые транскрибируют β-глобиновые гены [48]. DHS на промоторах детектируются также только на тех стадиях онтогенеза, когда соответствующий ген активен [49]. Репликация β-глобинового домена и расположенной слева от него области конденсированного хроматина в эритроидных клетках происходит в начале S-фазы клеточного цикла, что типично для доменов закрытого типа, которые содержат тканеспецифичные гены, экспрессирующиеся в данном типе клеток. В эритроидных предшественниках (стадия CFU-E), когда β-глобиновые гены еще не транскрибируются, в домене картировано четыре главных точки начала репликации [50]: одна расположена в пределах инсулятора на 5'-конце домена, три остальных – внутри генов ρ и β^A. Кроме того, обнаруживается

ряд минорных ориджинов репликации в районе 5'-инсулятора и внутри области конденсированного хроматина, примыкающей с 5'-конца к β -глобиновому домену [51].

Интересно, что в пределах β -глобинового домена кур наблюдается укороченный спейсинг — нуклеосомы расположены через каждые 180 п.н. В опытах по сборке хроматина *in vitro* показано, что укороченный спейсинг является структурным свойством последовательности ДНК β -глобинового домена и каким-то образом поддерживается β/ϵ -энхансером [52].

Как и в домене α -глобиновых генов кур, в пределах β -глобинового домена в эритроидных клетках на стадии активной экспрессии синтезируются длинные транскрипты, первоначально описанные как предшественники β -глобиновых мРНК [53]. Позже в ходе исследований тех же транскриптов в β -глобиновых доменах человека и мыши выяснили, что они представляют собой так называемые “полнодоменные” транскрипты, покрывающие весь домен целиком, включая LCR и короткие фланкирующие области. Согласно гипотезе Траверса (Travers) [54], полнодоменная транскрипция необходима для поддержания эпигенетического статуса данного участка генома: элонгирующая РНК-полимераза II служит своего рода “транспортным средством” для комплексов ремоделирования хроматина и гистон-ацетилтрансфераз, взаимодействующих с С-концевым доменом полимеразы. Таким образом, эти ферментные комплексы получают возможность передвигаться в пределах домена, поддерживая высокий уровень ацетилирования гистонов и открытую конформацию хроматина соответственно.

На протяжении всего β -глобинового домена уровень ацетилирования гистонов H3, H4 (в особенности H4acK12) и H2B [55] повышен. Однако он наиболее высок на DHS, расположенных в промоторах активно транскрибируемых β -глобиновых генов. Абсолютный максимум ацетилирования в пределах домена наблюдается на DHS4; видимо, этот элемент является точкой распространения ацетилирования гистонов в домене [56] и служит площадкой для сборки гистон-ацетилтрансферазных комплексов [57]. Профиль ацетилирования гистонов в домене меняется в ходе дифференцировки эритроидных клеток. На ранних этапах (стадия BFU-E), когда домен находится в состоянии, подготовленном для транскрипции β -глобинов, гиперацетилированными оказываются только DHS4, DHS2 и промотор гена β^A . В дальнейшем ацетилирование распространяется на другие регуляторные элементы и внутренние участки генов (стадия активной экспрессии β -глобинов). Гиперацетилированными оказываются, в том числе, и ориджины репликации, которые маркированы гистонем H3, ацетилирован-

ным по остаткам лизина в положениях 9 и 14. Границы области распространения ацетилированных гистонов на всех стадиях развития совпадают с границами чувствительности к DNКазе I, что является характерным свойством геномных доменов закрытого типа [58].

Присутствуют и отдельные фокусы метилированных гистонов (главным образом H3metK9), в частности, на промоторе гена β^H в эритроцитах 9-дневных эмбрионов и в пределах CR-1-повторов, возможно, находящихся в состоянии конденсированного хроматина [56].

Пограничные элементы домена

При дифференциальном солевом фракционировании хроматина из ядер эритроцитов взрослых кур показано, что в “низкосолевой” фракции, обогащенной высокоацетилированными гистонами, белками HMG14/17 и обедненной гистонем H1, содержатся фрагменты ДНК, включающие в себя весь β -глобиновый кластер и участок длиной 10 т.п.н. левее гена ρ [59]. На основании этих данных выдвинуто предположение, что левая граница β -глобинового геномного домена совпадает с левой границей домена высокоацетилированных гистонов и расположена примерно на 10 т.п.н. выше промотора гена ρ . Спустя почти десятилетие эта гипотеза получила прямое подтверждение: на 5'-конце домена высокоацетилированных гистонов был обнаружен классический инсулятор, обладающий барьерной, энхансер-блокирующей активностью [60–62] и способный защищать транскрипцию от эффекта положения — независимо от сайта интеграции в геноме, в том числе, и в непосредственной близости от теломеры [63]. Это первый инсулятор, найденный у позвоночных животных. Его свойства всесторонне изучены в опытах по трансгенезу и транзитной трансфекции в клетки позвоночных и беспозвоночных животных, изучена его способность работать внутри вирусной минихромосомы [64], сделаны попытки использовать инсулятор в разработке методов генной терапии злокачественных опухолей [65]. Коровий элемент (250 п.н.), содержащий DHS4, представляет собой CpG-островок и имеет некоторое (небольшое) структурное сходство с промоторами генов домашнего хозяйства [66]. Инсулятор содержит единственный сайт связывания транскрипционного фактора CTCF в пределах 42-нуклеотидного участка (футпринт-сайт FII), ответственного за барьерную и энхансер-блокирующую активность [67, 68]. Имеются данные, согласно которым CTCF может формировать микропетлю ДНК на инсуляторе, однако неизвестно, имеет ли это какое-либо значение для функционирования инсулятора в ядерном пространстве [69]. Сайт связывания CTCF перекрывается с сайтом связывания когезина. При нок-

даунах как по CTCF, так и по когезину инсуляторная активность DHS4 исчезает [70].

Изначально считалось, что наличие корового элемента — необходимое и достаточное условие для проявления полной инсуляторной активности, однако позже было показано, что необходим также 400-нуклеотидный участок, примыкающий к 3'-концу корового элемента [71].

Барьерная и энхансер-блокирующая активность присуща разным структурным блокам инсулятора. При делеции сайта связывания CTCF теряется только способность инсулятора блокировать действие энхансера, в то время как способность поддерживать высокий уровень ацетилирования гистонов в подконтрольном районе (т.е. супрессия эффекта положения) остается. Таким образом, барьерная функция инсулятора обеспечивается белковыми факторами, отличными от CTCF [72], в частности, белком USF1, связывающимся с инсулятором и привлекающим к нему комплексы гистон-метилтрансфераз (главным образом H4R3-специфичную PRMT1) и гистон-ацетилтрансфераз [73]. Механизм функционирования инсулятора как энхансер-блокирующего элемента неким образом связан с созданием на нем участка, свободного от нуклеосом, который возникает в результате связывания CTCF. Точечные мутации по участкам связывания CTCF в пределах инсулятора полностью ингибируют энхансер-блокирующую активность и восстанавливают нормальный спейсинг нуклеосом в его пределах [25].

Как было сказано выше, инсулятор — точка, от которой распространяется ацетилирование гистонов в пределах β-глобинового домена. В пределах самого инсуляторного элемента на всех стадиях развития, в том числе и в ядрах эритроидных предшественников (CFU-E), где транскрипция глобиновых генов отсутствует, наблюдается гиперацетилирование гистонов H3 и H4 [50] и метилирование гистона H3 по четвертому остатку лизина. Кроме того, цитозиновые остатки в составе CpG-динуклеотидов в пределах инсулятора неметилированы. Для возникновения и поддержания этих эпигенетических модификаций на инсуляторе необходимо связывание фактора USF1 внутри DHS4 [74].

Инсулятор не только блокирует действие энхансера и распространение ковалентных модификаций гистонов, но также предотвращает метилирование ДНК в сцепленном с ним промоторе в искусственно созданных конструктах [75]. Это снимает эффект сайленсинга, возникающий вследствие метилирования ДНК и последующего связывания репрессорного комплекса Mi2/NuRD в трансгенах, лишенных инсулятора [76]. Такая активность не связана ни с ацетилированием гистонов, ни с транскрипцией, и обусловлена способностью инсулятора связывать белок VEZF-1,

сайты связывания которого не перекрываются с сайтами связывания CTCF и USF1.

Как пограничный элемент, 5'-концевой инсулятор β-глобинового домена кур необходим для разделения областей влияния регуляторных систем домена и гена фолатного рецептора FOLR1, расположенного выше и транскрибирующегося в направлении, противоположном транскрипции β-глобинов. Этот ген обладает собственной регуляторной системой (фрагмент длиной 3.3 т.п.н. выше промотора *FOLR1*) и экспрессируется на стадии ранних эритроидных предшественников (CFU-E), когда транскрипция β-глобиновых генов еще не идет. Между *FOLR1* и инсулятором β-глобинового домена расположена область гетерохроматина, протяженностью порядка 16 т.п.н. Распространение гетерохроматина из этой области направо сдерживается β-глобиновым инсулятором, а налево — элементом HAS, отсутствующим в клетках мозга и терминально дифференцированных эритроцитах взрослых кур [77]. Возможно, гетерохроматин в этом районе также играет роль в разделии регуляторных систем *FOLR1* и β-глобинового домена. Подавление активности гистон-деацетилаз или нокдаун по белку Dicer сильнее всего сказывается на состоянии гетерохроматина: в пределах района начинает возрастать уровень ацетилирования гистонов, и хроматин становится более чувствителен к перевариванию эндонуклеазами рестрикции. Кроме того, поддержание гетерохроматинового статуса зависит от белка Argonaute, связывающегося с этим районом куриного генома посредством образования комплекса с белком Dicer. Таким образом, поддержание гетерохроматинового статуса в этом районе зависит от активности комплексов HDAC и системы РНК-интерференции [78].

Инсулятор прочно ассоциирован с ядерным матриксом, несмотря на то, что ни он сам, ни фланкирующие его последовательности не имеют выраженной гомологии с классическими MAR [79]. Такая связь, видимо, обусловлена взаимодействием входящего в инсуляторный комплекс белка CTCF с нуклеофосмином, который является одним из мажорных компонентов ядерного белкового матрикса.

Правая граница β-глобинового домена кур изучена гораздо хуже. Примерно на 5 т.п.н. ниже гена ε расположен конститутивный DHS (3'HS). Он имеет небольшое структурно-функциональное сходство с 5'-концевым инсулятором домена (DHS4). Внутри 3'HS картирован ряд сайтов связывания транскрипционного фактора CTCF, благодаря чему, видимо, 3'HS обладает энхансер-блокирующей активностью [80]. Однако, в отличие от DHS4, 3'HS не способен защитить трансген от эффекта положения, т.е. он не обладает барьерной функцией, присущей классическим инсулято-

рам. По-видимому, 3'HS экранирует β -глобиновый домен от действия регуляторной системы гена одорантного рецептора OR51M1, расположенного на расстоянии 7.5 т.п.н. от 3'-конца гена ϵ [81, 82].

Регуляция транскрипции внутри домена

Как сказано выше, в домене β -глобиновых генов, как и в α -глобиновом домене, “работает” феномен переключения экспрессии, механизмы которого ясны далеко не полностью. До пятого дня развития эмбриона в эритроидных клетках активно транскрибируются гены ρ и ϵ , затем между пятым и седьмым днем наблюдается переход ко взрослому типу экспрессии: транскрипция генов эмбриональных β -глобинов затухает, а в клетках в большом количестве появляется мРНК фетального β -глобина β^H и взрослого β -глобина β^A . Однако необходимо отметить, что даже на десятом дне эмбрионального развития в крови есть клетки (порядка 10% от общего их числа), которые экспрессируют гены эмбриональных β -глобинов [83]. Транскрипция β^H идет на небольшом уровне вплоть до вылупления птенца (21-й день развития), после чего затухает. Таким образом, в эритроидных клетках взрослых кур транскрибируется только ген β^A . Переключение на первых этапах происходит посттранскрипционно, поскольку эритроидные клетки дефинитивной линии, в которых нет белкового продукта гена ρ , сохраняют способность транскрибировать этот ген [84]. Однако несомненно, что, в конечном итоге, переключение экспрессии и необратимая в онтогенезе репрессия генов эмбриональных глобинов осуществляются на уровне транскрипции. Эффекторы регуляции транскрипции внутри домена — это общие и эритроидспецифичные транскрипционные факторы, связывающиеся с регуляторными элементами и промоторами генов в местах, которые маркированы DHS.

На участке протяженностью 65 т.п.н., включающем β -глобиновый домен и фланкирующие области, найдено 12 крупных DHS, которые можно сгруппировать в несколько классов [83]. К классу I относиться конститутивный DHS4, найденный как в эритроидных, так и в неэритроидных клетках; в его пределах находится инсулятор, маркирующий левую границу β -глобинового домена. Класс II представлен тремя DHS (DHS1, DHS2, DHS3), расположенными выше гена ρ и присутствующими во всех эритроидных клетках на всех стадиях развития. Класс III включает в себя четыре сайта гиперчувствительности к ДНКазе I, расположенные в промоторных областях всех четырех β -глобиновых генов; эти DHS работают только при наличии активной транскрипции того гена, в промоторе которого сайт находится. В класс IV сгруппированы DHS, расположенные в

3'-концевых областях генов ρ , β^H и ϵ ; их наличие также коррелирует с транскрипцией этих генов. Класс V представлен эритроидспецифичным DHS, расположенным между генами β^A и ϵ и маркирующим эритроидспецифичный строгий энхансер (далее — β/ϵ -энхансер). Любопытно, что для существования DHS требуется торсионное напряжение ДНК: при обработке блеомицином и внесении одноцепочечных разрывов все DHS в пределах домена исчезают [85, 86].

В общем случае, активация транскрипции внутри геномного домена происходит в две стадии: активация самого домена как целого и последующая активация конкретных промоторов. Активация β -глобинового домена в эритроидных клетках кур начинается с массивированного ацетилирования гистонов на протяжении всего домена и перевода хроматина в открытую конформацию, после чего транскрипционные факторы получают доступ к промоторам генов и главным регуляторным элементам домена — β/ϵ -энхансеру и зоне контроля локуса (DHS1-3) [87, 88].

В ранних исследованиях регуляторной системы β -глобинового домена кур [89] было обнаружено, что в трансгенных мышах, несущих фрагмент куриного генома, который содержит ген β^A и β/ϵ -энхансер, наблюдается подавление эффекта положения, т.е. уровень экспрессии гена β^A не зависит от места интеграции в геном и прямо зависит от числа копий трансгена. Позднее выяснили, что свойством “открывать” хроматин обладает не сам энхансер, а его комплекс с промотором β^A . Свойство защиты трансгена от эффекта положения характерно для открытых к тому времени LCR в β -глобиновых доменах мыши и человека [30]. По аналогии с этими LCR был сделан вывод, что LCR β -глобинового домена кур расположена в районе гена β^A и β/ϵ -энхансера и устроена проще, чем в случае доменов β -глобиновых генов млекопитающих (включает в себя только один энхансерный элемент) [44]. Этот вывод впоследствии был опровергнут исследованиями роли DHS1-3 в регуляции транскрипции β -глобиновых генов [90, 91].

DHS1-3 не имеют структурной гомологии с DHS β -глобинового домена млекопитающих [44, 91], содержат сайты связывания как для конститутивных, так и для эритроидспецифичных транскрипционных факторов. В опытах по влиянию на экспрессию при транзientной трансфекции в куриные эритроидные предшественники показано, что заметной энхансерной активностью обладают лишь DHS2 и DHS3. В пределах DHS2 расположены четыре сайта связывания эритроидспецифичного транскрипционного фактора GATA-1, два сайта связывания Sp1-подобного фактора и один сайт связывания EKLF, причем внесение точечных мутаций практически не влияет на энхан-

серную активность, если не затронуты сайты связывания GATA-1 [88]. GATA-1 (а также подобный ему GATA-2) относится к факторам, имеющим в своей структуре мотив “цинковых пальцев”. GATA-1 участвует в созревании эритроидных предшественников, модулируя функции многих регуляторных элементов их генома, а также участвуя в установлении специфической структуры хроматина [92]. В опытах по трансгенезу показано, что DHS1-3 способен супрессировать эффект положения, причем трансгены, содержащие только один DHS из трех, не защищены от эффекта положения при интеграции в геном, независимо от того, обладает ли данный DHS энхансерной активностью, или нет в опытах по транзитной трансфекции [88].

В опытах с трансгенной линией мышей, несущих β-глобиновый домен кур, изучали комплексную регуляцию транскрипции β-глобиновых генов, которая осуществляется DHS1-3 и β/ε-энхансером [91]. При использовании конструкций, содержащих ген β^A, β/ε-энхансер и отдельно каждый из DHS, показано, что регуляторная активность трех DHS распределена между ними равномерно, и полноценно работать они могут только в комплексе. Другими словами, обнаружена кооперативность действия регуляторных элементов, входящих в состав зоны контроля локуса [87]. При делеции энхансера снижается (но не пропадает полностью) экспрессия генов ε, β^H и β^A на соответствующих стадиях развития. При удалении DHS1-3 уменьшается экспрессия генов ρ, β^H и β^A. То есть ни энхансер, ни DHS1-3 отдельно друг от друга не обладают специфичностью по отношению к стадии развития, и только в тандеме они способны обеспечить полноценную регуляцию транскрипции в пределах домена. Имеются данные, согласно которым элементы зоны контроля локуса и β/ε-энхансер могут оказывать прямое репрессорное воздействие на подконтрольный промотор. В опытах по переносу первой хромосомы курицы в культивируемые клетки эритролейкоза человека (линия K562) показано участие β/ε-энхансера, DHS1 и DHS2 в репрессии транскрипции генов ρ и β^H [93]. Транскрипция этих генов наблюдается только при делеции хотя бы одного из этих регуляторных элементов, что свидетельствует об их роли в качестве транскрипционных сайленсеров в хромосомном контексте.

Расположенный примерно эквидистантно между промоторами генов β^A и ε, энхансер β/ε — первый регуляторный элемент, картированный в пределах β-глобинового домена кур. В первых же опытах показано, что он является не только элементом, увеличивающим активность промоторов генов β^A и ε, но и участвует также в обеспечении тканеспецифичной экспрессии β-глобиновых генов и своевременного запуска их транскрипции в

ходе развития [94–96]. В клетках неэритроидного происхождения, где синтез β-глобина не идет, энхансер неактивен и метилирован [44].

Основной мотив, ответственный за активацию транскрипции, имеет длину 136 п.н. Внутри него имеется ряд сайтов связывания регуляторных белковых факторов, которые обнаруживаются как в эмбриональных эритроцитах, так и в эритроцитах взрослых кур, а также в тканях мозга. Это универсальный эритроидный регулятор Egr1-1, сайты связывания которого локализованы не только в энхансере, но также в промоторах всех членов глобинового семейства. Кроме того, с энхансером могут связываться факторы AP-1 и AP-2 [49]. Это связывание имеет кооперативный характер, а энхансерная активность сосредоточена в пределах двух из четырех сайтов связывания [97]. В клетках разных тканей и на разных стадиях развития спектр регуляторных белков, связанных с энхансером, сильно меняется [98]. В более поздних работах энхансер подразделили на два структурно-функциональных блока: один содержит GATA-мотивы, другой — NF-E2-подобный сайт. С ним связывается транскрипционный фактор ECH семейства CNC (специфические эритроидные регуляторы). Этот белок экспрессируется в культивируемых эритроидных клетках после терминальной дифференцировки, в эритроцитах периферической крови и в некоторых негематопоэтических клетках. Фактор ECH образует гетеродимеры с некоторыми представителями Maf-семейства белков и NF-E2 и является строгим транскрипционным активатором [99]. Кроме ECH, в семейство белков CNC входят факторы группы Nrf. Белок Nrf3 может взаимодействовать с белками семейства Maf; обнаружены, кроме того, сайты связывания этого белка в β/ε-энхансере, что дает основание предположить его участие в регуляции транскрипции, по крайней мере, генов ε и β^A [100].

Как сказано выше, энхансер регулирует транскрипцию как взрослого β-глобинового гена β^A, так и эмбрионального ε. Мутации в энхансере, в результате которых увеличивается транскрипция взрослого гена, приводят к пропорциональному увеличению транскрипции и гена ε; сделан вывод, что активность промоторов обоих генов регулируется одним и тем же участком энхансера. Таким образом, в ядре должна существовать конкуренция промоторов генов β^A и ε за общий регуляторный элемент, что, по-видимому, и является ключевым моментом в регуляции экспрессии этих генов на соответствующих стадиях развития [101]. Положительная регуляция транскрипции β^A осуществляется посредством взаимодействия энхансера и элемента SSE (Stage Selector Element), расположенного внутри промотора гена β^A. Видимо, энхансер обеспечивает тканеспецифичность тран-

скрипции β^A , а элемент SSE отвечает за то, на какой стадии развития ген будет транскрибироваться. Кроме того, в промоторе β^A локализована последовательность, участвующая в репрессии гена ϵ в эритроцитах взрослого животного. Позднее именно SSE была отведена роль этой “репрессорной” последовательности, “выигрывающей” конкуренцию за энхансер у промотора гена ϵ в ядрах эритроидных клеток взрослых кур [102].

Итак, регуляторная система β -глобинового домена кур, как и в случае α -глобинового домена, имеет модульное строение — на 5'-конце имеется классическая зона контроля локуса, а ближе к 3'-концу располагается сильный эритроидспецифичный энхансер. Сферы контроля этих регуляторных элементов перекрываются, и только в паре они способны обеспечить эффективную и правильную регуляцию транскрипции внутри домена на всех стадиях онтогенеза.

В завершение этого раздела стоит рассмотреть особенности “эмбрионального” и “взрослого” субкластеров генов внутри β -глобинового домена.

Согласно данным, полученным в опытах по FISH на целых куриных эмбрионах (стадия развития HH10 [103]), гены ρ и ϵ в пределах одного локуса (на одной и той же хромосоме) экспрессируются согласованно. Другими словами, если один из генов обладает активным транскрипционным статусом, то это облегчает перевод в состояние активной транскрипции и второго гена. То есть в большинстве эритроидных клеток (около 60% от исследованной популяции) оба гена активны в обоих β -глобиновых локусах, а в меньшем числе клеток (около 24%) экспрессируется по одному гену в каждом β -глобиновом локусе [104]. Эти наблюдения легли в основу модели, согласно которой промоторы генов ρ и ϵ не конкурируют за регуляторные элементы, а управляют параллельно, что подтверждается и опытами на трансгенных линиях мышей, несущих делеции отдельных регуляторных элементов домена [90].

К 5'-концу гена ρ примыкает участок длиной 456 п.н., содержащий сайты связывания для универсального транскрипционного фактора Sp1 и эритроидспецифичного фактора GATA-1. Концентрация их в ядрах эритроидных клеток эмбриона на ранних стадиях развития примерно в 10 раз выше, чем в эритроцитах цыплят. По-видимому, связывание их с указанным участком, примыкающим к промотору гена ρ , играет важную роль в запуске экспрессии этого гена в эритроидных клетках эмбриона на начальных этапах развития [105]. Интересно, что ген ρ принадлежит к небольшой группе эукариотических генов, регуляция которых в ходе онтогенеза достигается путем обратимого метилирования ДНК. Репрессия гена ρ после пятого дня эмбрионального развития достигается за счет метилирования цитозинового

остатков в составе CpG-динуклеотидов в районе промотора, первого интрона и первого экзона. Метильные группы служат метками для привлечения репрессорного комплекса MeCP1, включающего белки группы MBD, RbAp48, HDAC2 и MTA1 [106]. MBD3 является также компонентом репрессорного комплекса NuRD. Перечисленные белки формируют стабильный комплекс на промоторе и на проксимальной части, кодирующей области гена ρ , препятствуя связыванию общих факторов транскрипции и РНК-полимеразы II.

Промоторная область гена ϵ включает ряд сайтов связывания универсальных и эритроидспецифичных транскрипционных факторов — GATA-1, Sp1, EKLF и EKLF-подобных белков. Эти белки ответственны за функциональное взаимодействие ϵ -промотора с β/ϵ -энхансером и регуляцией транскрипции гена ϵ в первые дни эмбрионального развития [91].

В промоторах генов взрослых β -глобинов найдены два типа регуляторных последовательностей. Первый тип, Pal, представляет собой палиндром, содержащий консенсус TGAGCC и сайты связывания белковых факторов группы Nf-1. Второй тип представляет собой консенсус CACCC, найденный также в промоторах α -глобиновых генов α^D и α^A . С ним связывается транскрипционный фактор Sp1 и некоторые другие факторы, присутствующие, кроме эритроидных клеток, и в клетках мозга. В опытах по транзientной трансфекции показано, что Pal ингибирует, а CACCC стимулирует транскрипцию репортерного гена. С помощью ДНК-футпринтинга и метода “bend-shift” показано, что на ранних эмбриональных стадиях развития CACCC инактивируется некими белковыми факторами, и Pal, в этой ситуации, ингибирует транскрипцию взрослых β -глобиновых генов. К 15-му дню развития эмбриона, в результате изменения профиля регуляторных ядерных факторов, активируется CACCC и ингибируется Pal, что “позволяет” транскрипцию генов β^H и β^A [107]. Для некоей “фоновой” транскрипции CACCC не нужен, требуется только β/ϵ -энхансер и сайт промотора в позиции -58 п.н. (относительно старта транскрипции). Возможно, это связано с наличием и в промоторах взрослых β -глобинов, и в β/ϵ -энхансере сайтов связывания сильного эритроидного активатора NF-E4, благодаря чему энхансер получает возможность взаимодействовать с промоторами этих генов [108].

Ген β^A транскрибируется не только в эритроцитах эмбрионов на поздних стадиях развития, но так же и в фибробластах, в культивируемых клетках MSB, в клетках мозга и эмбриональных эритроцитах, начиная со стадии развития HH8 [109]. При этом уровень транскрипции в мозге составляет порядка 10% от уровня в эритроцитах 9-дневных куриных эмбрионов. В фибробластах и клетках

мозга транскрипция β^A является абортивной, транскрипты имеют небольшую длину, и, как следствие, плотность РНК-полимеразы II высока только в области промотора. Однако важно отметить, что β-глобиновый домен в этих клетках метилирован (особенно внутренняя его часть) и находится в конформации, нечувствительной к ДНКазе I. То есть, чувствительность к ДНКазе I в данном случае коррелирует не с транскрипцией, как таковой, а, скорее, со специфичным хроматиновым статусом, связанным с образованием полноразмерных мРНК и, возможно, с их процессингом [110]. В тканях, где не экспрессируются β-глобиновые гены, промотор β^A полностью метилирован [44].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важным шагом на пути к раскрытию механизмов реализации наследственной информации у высших эукариот стало появление доменной гипотезы организации генома, согласно которой геном построен из функционально, а в ряде случаев — и топологически, изолированных единиц (геномных доменов). Каждый из них включает в себя один ген или генный кластер и регуляторные участки (энхансеры, сайленсеры, инсультаторы), управляющие транскрипцией внутри данного домена. Часто регуляторные элементы оказываются кластеризованы на определенном участке домена и организованы в систему, называемую зоной контроля локуса — LCR. LCR оказывается способна не только регулировать транскрипцию внутри домена, на разных стадиях онтогенеза и в разных линиях дифференцировки, включая одни промоторы и выключая другие, но и определять хроматиновый статус домена, устанавливая время репликации, а также позиционировать домен в определенных компартментах ядра. Таким образом, согласно доменной гипотезе, в общем случае промоторы генов высших эукариот не являются полностью независимыми друг от друга участниками процессов, управляющих транскрипцией. Домен с расположенными внутри него генами и регуляторными элементами, в норме не активными в отношении соседних доменов, является, по сути, экспрессионным модулем генома. Активация промоторов внутри этого модуля зависит, во-первых, от того, активен или не активен модуль в целом (т.е. находится ли он в состоянии “открытого” хроматина, или гетерохроматизирован), во-вторых — от того, на какие именно промоторы направлено действие регуляторной системы домена на данной стадии онтогенеза (или в данном клеточном типе). Однако важно понимать, что доменная гипотеза была сформулирована по результатам исследований, выполненных на весьма ограниченном числе модельных систем (в частности, на β-глобиновых генах позвоночных), по-

этому описанная картина устройства эукариотического генома, несомненно, упрощена и не может служить парадигмой организации генома в целом.

Домен β-глобиновых генов кур в течение нескольких десятилетий и по сей день служит одной из самых популярных моделей в исследованиях механизмов регуляции транскрипции у эукариот. На его примере показана кооперативность действия отдельных элементов зоны контроля локуса, в нем расположен один из самых изученных инсультаторов, а также подробно охарактеризованы спектры ковалентных модификаций гистонов в пределах домена до и после активации экспрессии β-глобиновых генов. Несомненно, что результаты этих исследований, проводимых множеством научных коллективов на протяжении почти пятидесяти лет, сыграли важную роль в становлении концепции доменной организации генома. Однако и сегодня многие вопросы, касающиеся регуляции экспрессии β-глобиновых генов, остаются без ответа. В частности, одна из ключевых проблем — переключение экспрессии глобиновых генов с эмбрионального на взрослый тип. Этот феномен не удается полностью объяснить на основании установленных фактов, а значит, можно полагать, что будущие исследования откроют, возможно, некие, еще совершенно неизвестные, аспекты регуляции транскрипции внутри β-глобинового домена, что приведет к более полному пониманию картины функционирования эукариотического генома.

Работа получила финансовую поддержку Министерства наук и образования РФ (ГК № 14.740.12.1344; 16.740.11.0353), Гранта РФФИ (12-04-00036-а) Совета при Президенте РФ для поддержки молодых ученых (МК-3813.2012.4) и программы “Молекулярная и клеточная биология” Президиума РАН, фонда Дмитрия Зимина “Династия”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cremer T., Cremer M., Dietzel S., Müller S., Solovei I., Fakan S. 2006. Chromosome territories — a functional nuclear landscape. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 307–316.
2. Razin S., Iarovaia O., Sjakste N., Sjakste T., Bagdoniene L., Rynditch A., Eivazova E., Lipinski M., Vasetzky E. 2007. Chromatin domains and regulation of transcription. *J. Mol. Biol.* **369**, 597–607.
3. Valadez-Graham V., Razin S., Recillas-Targa F. 2004. CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken α-globin gene domain. *Nucl. Acids Res.* **4**, 1354–1362.
4. Schultz J. 1947. Nuclear differentiation and the origin of tumors. *Cancer Res.* **7**, 41.
5. Passarge E. 1979. Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *Am. J. Hum. Genet.* **31**, 106–115.

6. Littau V., Frenster H., Mirsky A. 1964. Active and inactive regions of nuclear chromatin as revealed by electron microscope autoradiography. *Biochemistry*. **52**, 93–100.
7. Axel R., Cedar H., Felsenfeld G. 1973. Synthesis of globin ribonucleic acid from duck-reticulocyte chromatin *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **70**, 2029–2032.
8. Weintraub H., Groudine M. 1976. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science*. **193**, 848–856.
9. Stalder J., Larsen A., Engel J., Dolan M., Groudine M., Weintraub H. 1980. Tissue-specific DNA cleavages in the globin chromatin domain introduced by DNase I. *Cell*. **20**, 451–460.
10. Weisbrod S. 1982. Active chromatin. *Nature*. **297**, 289–295.
11. Davie J., Candido E. 1980. DNase I-sensitive chromatin is enriched in the acetylated species of histone H4. *FEBS Letters*. **110**, 164–168.
12. Allegra P., Sterner R., Clayton D., Allfrey V. 1987. Affinity chromatographic purification of nucleosomes containing transcriptionally active DNA sequences. *J. Mol. Biol.* **196**, 379–388.
13. Hebbes T., Thorne A., Crane-Robinson C. 1988. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* **7**, 1395–1402.
14. Walters C., Fiering S., Goeke S., Bouhassira E., Magis W., Martin K., Garrick D., Scalzo, D., Whitelaw E. 1999. The chicken beta-globin 5'HS4 boundary element blocks enhancer-mediated suppression of silencing. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3714–3726.
15. Spencer V., Davie J. 1999. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene*. **240**, 1–12.
16. Beisel C., Paro R. 2011. Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nature Rev. Genet.* **12**, 123–135.
17. Hargreaves D., Crabtree G. 2011. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res.* **21**, 396–420.
18. Груздева Н., Куллыев А. 2002. Инсуляторы *Drosophila melanogaster*: структура функции. *Успехи биологической химии*. **42**, 161–176.
19. Zhao H., Dean A. 2004. An insulator blocks spreading of histone acetylation and interferes with RNA polymerase II transfer between an enhancer and gene. *Nucl. Acids Res.* **32**, 4903–4919.
20. Разин С.В. 2006. Пространственная организация эукариотического генома и работа эпигенетических механизмов. *Генетика*. **42**, 1605–1614.
21. De Laat W., Grosveld F. 2003. Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Res.* **11**, 447–459.
22. Разин С.В., Юдинкова Е.С. 2007. Механизмы контролирующей активацию домена α -глобиновых генов в эритроидных клетках кур. *Биохимия*. **72**, 581–585.
23. Brassat E., Vaury C. 2005. Insulators are fundamental components of the eukaryotic genomes. *Heredity*. **94**, 571–576.
24. Lunyak V. 2008. Boundaries. Boundaries... Boundaries??? *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 281–287.
25. Zhao H., Kim A., Song S., Dean A. 2006. Enhancer blocking by chicken β -globin 5'-HS4 insulator. *J. Biol. Chem.* **281**, 30573–30580.
26. West A., Fraser P. 2005. Remote control of gene transcription. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 101–111.
27. Ohlsson R., Bartkuhn M., Renkawitz R. 2010. CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin. *Chromosoma*. **119**, 351–360.
28. Ong C.-T., Corces V. 2011. Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature Rev. Genet.* **12**, 283–293.
29. Li Q., Peterson K., Fang X., Stamatoyannopoulos G. 2002. Locus control regions. *Blood*. **100**, 3077–3086.
30. Grosveld F., van Assendelft G., Greaves D., Kollias G. 1987. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell*. **51**, 975–985.
31. Dean A. 2006. On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet.* **1**, 38–45.
32. Green M. 2005. Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol. Med.* **18**, 399–402.
33. Li Q., Barkess G., Qian H. 2006. Chromatin looping and the probability of transcription. *Trends Genet.* **22**, 197–202.
34. Kukreti S., Kaur H., Kaushik M., Bansal A., Saxena S., Kaushik S., Kukreti R. 2010. Biochemical structural polymorphism at LCR and its role in beta-globin gene regulation. *Biochimie*. **92**, 1199–1206.
35. Wijgerde M., Grosveld F., Fraser P. 1995. Transcription complex stability and chromatin dynamics *in vivo*. *Nature*. **377**, 209–213.
36. Gross D., Garrard T. 1988. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 159–197.
37. Gavrilo A., Razin S. 2008. Spatial configuration of the chicken α -globin gene domain: immature and active chromatin hubs. *Nucl. Acids Res.* **14**, 4629–4640.
38. De Laat W., Klous P., Kooren J., Noordermeer D., Palstra R., Simonis M., Splinter E., Grosveld F. 2008. Three-dimensional organization of gene expression in erythroid cells. *Curr. Topics Develop. Biol.* **82**, 117–139.
39. Guerrero G., Delgado-Olguín P., Escamilla-Del-Arenal M. et al. 2007. Globin genes transcriptional switching, chromatin structure and linked lessons to epigenetics in cancer: A comparative overview. *Comp. Biochem. Physiol.* **147**, 750–760.
40. Groudine M., Holster H. 1974. Lineage-dependent transcription of globin genes. *Cell*. **3**, 243–247.
41. Bruns G., Ingram V. 1973. The erythroid cells and hemoglobins of the chick embryo. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B, Biol. Sc.* **266**, 226–319.
42. Dodgson J., Stadt S., Choi O., Dolan M., Fischer H., Engel J. 1983. The nucleotide sequence of the embryonic chicken beta-type globin genes. *J. Biol. Chem.* **258**, 12685–12692.
43. Roninson I., Ingram V. 1982. Gene evolution in the chicken beta-globin cluster. *Cell*. **28**, 515–521.
44. Leitman M., Grasso J., Blumenthal T., Lewit P. 1993. Primary sequence, evolution, and repetitive elements of the *Gallus gallus* (chicken) β -globin cluster. *Genomics*. **18**, 616–626.
45. Lehrman M., Schneider W., Sudhof T., Brown M., Goldstein J., Russell D. 1984. Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding

- transmembrane and cytoplasmic domains. *Science*. **227**, 140–146.
46. Hanscombe O., Whyatt D., Fraser P. 1991. Importance of globin gene order for correct developmental expression. *Gen. Develop.* **5**, 1387–1394.
 47. Wood W., Felsenfeld G. 1982. Chromatin structure of the chicken beta-globin gene region. Sensitivity to DNase I, micrococcal nuclease, and DNase II. *J. Biol. Chem.* **257**, 7730–7736.
 48. Kukushkin A., Svetlikova S., Pospelov V. 1988. A structure of potentially active and inactive genes of chicken erythrocyte chromatin upon decondensation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 8555–8569.
 49. Evans T., Felsenfeld G., Reitman M. 1990. Control of globin gene transcription. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 95–124.
 50. Prioleau M., Gendron M.-C., Hyrien O. 2003. Replication of the chicken β-globin locus: early-firing origins at the 5'-HS4 insulator and the ρ- and β^A-globin genes show opposite epigenetic modifications. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3536–3549.
 51. Dazy S., Gandrillon O., Hyrien O., Prioleau M.-N. 2006. Broadening of DNA replication origin usage during metazoan cell differentiation. *EMBO Rep.* **7**, 806–811.
 52. Liu K., Lauderdale J., Stein A. 1993. Signals in chicken β-globin DNA influence chromatin assembly *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7596–7603.
 53. Imaizumi T., Diggelmann H., Scherrer K. 1973. Demonstration of globin messenger sequences in giant nuclear precursors of messenger RNA of avian erythroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **70**, 1122–1126.
 54. Travers A. 1999. Chromatin modification by DNA tracking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 13634–13637.
 55. Hebbes T., Clayton A., Thorne A., Crane-Robinson C. 1994. Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken β-globin chromosomal domain. *EMBO J.* **13**, 1823–1830.
 56. Litt M., Simpson M., Gaszner M., Allis D., Felsenfeld G. 2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken β-globin locus. *Science*. **293**, 2453–2455.
 57. Litt M., Simpson M., Recillas-Targa M., Prioleau M.-N., Felsenfeld G. 2001. Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.* **20**, 2224–2235.
 58. Hebbes T., Allen S. 2000. Multiple histone acetyltransferases are associated with a chicken erythrocyte chromatin fraction enriched in active genes. *J. Biol. Chem.* **275**, 31347–31352.
 59. Rocha E., Davie J., van Holde K., Wein H. 1984. Differential salt fractionation of active and inactive genomic domains in chicken erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **259**, 8558–8563.
 60. Chung J., Whiteley M., Felsenfeld G. 1993. A 5'-element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in drosophila. *Cell*. **74**, 505–514.
 61. Pikaart M., Recillas-Targa F., Felsenfeld G. 1998. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* **12**, 2852–2862.
 62. Recillas-Targa F., Bell C., Felsenfeld G. 1999. Positional enhancer-blocking activity of the chicken β-globin insulator in transiently transfected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 14354–14359.
 63. Rincon-Arango H., Furlan-Magaril M., Recillas-Targa F. 2007. Protection against telomeric position effects by the chicken cHS4 β-globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 14044–14049.
 64. Wang X., Li L., Ding S., Huang X., Zhang J., Yin J., Zhong J. 2009. Chicken HS4 insulator significantly improves baculovirus-mediated foreign gene expression in insect cells by modifying the structure of neighboring chromatin in virus minichromosome. *J. Biotechnol.* **142**, 193–199.
 65. Desprat R., Bouhassira E. 2009. Gene specificity of suppression of transgene-mediated insertional transcriptional activation by the chicken HS4 insulator. *PLoS ONE*. **4**, 1–11.
 66. Chung J., Bell A., Felsenfeld G. 1997. Characterization of the chicken β-globin insulator. *Genetics*. **94**, 575–580.
 67. Bell A., West A., Felsenfeld G. 1999. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*. **98**, 387–396.
 68. Gerasimova T., Corces V. 2001. Chromatin insulators and boundaries: effects on transcription and nuclear organization. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 193–208.
 69. Macpherson M., Sadowski P. 2010. The CTCF insulator protein forms an unusual DNA structure. *BMC Mol. Biol.* **11**, 1–17.
 70. Wendt K., Yoshida K., Itoh T., et al. 2008. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*. **451**, 796–803.
 71. Arumugam P., Urbinati F., Velu C., Higashimoto T., Grimes H., Malik P. 2009. The 3'-region of the chicken hypersensitive site-4 insulator has properties similar to its core and is required for full insulator activity. *PLoS ONE*. **4**, 1–15.
 72. Recillas-Targa F., Pikaart M., Burgess-Beusse B., Bell A., Litt M., West A., Gaszner M., Felsenfeld G. 2002. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 6883–6888.
 73. Huang S., Li X., Yusufzai T., Qiu Y., Felsenfeld G. 2007. USF1 recruits histone modification complexes and is critical for maintenance of a chromatin barrier. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 7991–8002.
 74. West A., Huang S., Gaszner M., Litt M., Felsenfeld G. 2004. Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol. Cell.* **16**, 453–463.
 75. Dickson J., Gowher H., Strogantsev R., Gaszner M., Hair A., Felsenfeld G., West A. 2010. VEZF1 elements mediate protection from DNA methylation. *PLoS Genet.* **6**, 1–16.
 76. Mutskov V., Farrell C., Wade P., Wolffe A., Felsenfeld G. 2002. The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation. *Genes Dev.* **16**, 1540–1554.
 77. Prioleau M., Nony P., Simpson M., Felsenfeld G. 1999. An insulator element and condensed chromatin region separate the chicken β-globin locus from an independently regulated erythroid-specific folate receptor gene. *EMBO J.* **18**, 4035–4048.

78. Giles K., Ghirlando R., Felsenfeld G. 2010. Maintenance of a constitutive heterochromatin domain in vertebrates by a Dicer-dependent mechanism. *Nat. Cell Biol.* **12**, 94–100.
79. Yusufzai T., Felsenfeld G. 2004. The 5'-HS4 chicken beta-globin insulator is a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 8620–8624.
80. Saitoh N., Bell A., Recillas-Targa F., West A., Simpson M., Pikaart M., Felsenfeld G. 2000. Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken beta-globin domain. *EMBO J.* **19**, 2315–2322.
81. Bulger M., Doorninck J., Saitoh N., Telling A., Farrell C., Bender M., Felsenfeld G., Axel R., Groudine M. 1999. Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human beta-globin loci: the beta-globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes. *Genetics.* **96**, 5129–5134.
82. Burgess-Beusse B., Farrell C., Gaszner M., Litt M., Mutskov V., Recillas-Targa F., Simpson M., West A., Felsenfeld G. 2002. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 16433–16437.
83. Reitman M., Felsenfeld G. 1990. Developmental regulation of Topoisomerase II sites and DNase I-hypersensitive sites in the chicken beta-globin locus. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2774–2786.
84. Landes G., Villeponteau B., Pribyl T., Martinson H. 1982. Hemoglobin switching in chickens. Is the switch initiated post-transcriptionally? *J. Biol. Chem.* **257**, 11008–11014.
85. Villeponteau B., Martinson H. 1987. Gamma rays and bleomycin nick DNA and reverse the DNase I sensitivity of beta-globin gene chromatin *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1917–1924.
86. Sjakste N., Sjakste T. 2002. Structure of globin gene domains in mammals and birds. *Russ. J. Genet.* **38**, 1343–1358.
87. Chapman B., Tobin A. 1979. Distribution of developmentally regulated hemoglobins in embryonic erythroid populations. *J. Dev. Biol.* **69**, 375–387.
88. Abruzzo L., Reitman M. 1994. Enhancer activity of upstream hypersensitive site 2 of the chicken beta-globin cluster is mediated by GATA sites. *J. Biol. Chem.* **269**, 32565–32571.
89. Reitman M., Lee E., Westphal H., Felsenfeld G. 1990. Site-independent expression of the chicken beta A-globin gene in transgenic mice. *Nature.* **348**, 749–752.
90. Reitman M., Lee E., Westphal H. 1995. Function of the upstream hypersensitive sites of the chicken beta-globin gene cluster in mice. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1790–1794.
91. Mason M., Lee E., Westphal H., Reitman M. 1995. Expression of the chicken beta-globin gene cluster in mice: correct developmental expression and distributed control. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 407–414.
92. Escamilla-Del-Arenal M., Recillas-Targa F. 2008. GATA-1 Modulates the chromatin structure and activity of the chicken alpha-globin 3'-enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 575–586.
93. Wang J., Liu H., Lin C., Aladjem M., Epner E. 2005. Targeted deletion of the chicken beta-globin regulatory elements reveals a cooperative gene silencing activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 23340–23348.
94. Choi O., Engel J. 1986. A 3' enhancer is required for temporal and tissue-specific transcriptional activation of the chicken adult beta-globin gene. *Nature.* **323**, 731–734.
95. Nickol J., Felsenfeld G. 1988. Bidirectional control of the chicken beta^A- and epsilon-globin genes by a shared enhancer. *Biochemistry.* **85**, 2548–2552.
96. Evans T., Reitman M., Felsenfeld G. 1988. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. *Develop. Biol.* **85**, 5976–5980.
97. Reitman M., Felsenfeld G. 1988. Mutational analysis of the chicken beta-globin enhancer reveals two positive-acting domains. *Biochemistry.* **85**, 6267–6271.
98. Emerson B., Nickol J., Jackson P., Felsenfeld G. 1987. Analysis of the tissue-specific enhancer at the 3' end of the chicken adult beta-globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 4786–4790.
99. Itoh K., Igarashi K., Hayashi N., Nishizawa N., Yamamoto M. 1995. Cloning and characterization of a novel erythroid cell-derived CNC family transcription factor heterodimerizing with the small Maf family proteins. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4184–4193.
100. Kobayashi A., Ito E., Toki T., Kogam K., Takahashi S., Igarashi K., Hayashi N., Yamamoto M. 1999. Molecular cloning and functional characterization of a new cap'n'collar family transcription factor Nrf3. *Biochemistry.* **274**, 6443–6452.
101. Foley K., Engel J. 1992. Individual stage selector element mutations lead to reciprocal changes in beta- vs. epsilon-globin gene transcription: genetic confirmation of promoter competition during globin gene switching. *Gen. Dev.* **6**, 730–744.
102. Choi O., Engel J. 1988. Developmental regulation of beta-globin gene switching. *Cell.* **55**, 17–26.
103. Hamburger V., Hamilton H. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* **88**, 49–92.
104. Nagai H., Sheng G. 2007. Cis-cotranscription of two beta-globin genes during chicken primitive hematopoiesis. *Plos ONE.* **8**, 1–3.
105. Minie M., Kimura T., Felsenfeld G. 1992. The developmental switch in embryonic beta-globin expression is correlated with erythroid lineage-specific differences in transcription factor levels. *Develop.* **115**, 1149–1164.
106. Kransdorf E., Wang S., Zhu S., Langston T., Rupon J., Ginder G. 2006. MBD2 is a critical component of a methyl cytosine-binding protein complex isolated from primary erythroid cells. *Blood.* **108**, 2836–2845.
107. Jackson P., Evans T., Nickol J., Felsenfeld G. 1989. Developmental regulation of protein binding to beta-globin gene regulatory sites within chicken erythrocyte nuclei. *Gen. Dev.* **3**, 1860–1873.
108. Gallarda J., Foley K., Yang Z. 1989. The beta-globin stage selector element factor is erythroid-specific promoter/enhancer binding protein NF-E4. *Gen. Dev.* **3**, 1845–1859.
109. Alev C., McIntyre B., Nagai H., Shin M., Shinmyozu K., Jakt M., Sheng G. 2008. Beta-A, the major beta globin in definitive red blood cells, is present from the onset of primitive erythropoiesis in chicken. *Dev. Dynamics.* **273**, 1193–1197.
110. Lois R., Freeman T., Villeponteau B., Martinson H. 1990. Active beta-globin gene transcription occurs in methylated, DNase I-resistant chromatin of nonerythroid chicken cells. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 16–27.