

На правах рукописи

УДК 576.315.42

КЛОЧКОВ Денис Борисович

**ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ И
КОНТРОЛЯ ВРЕМЕНИ ИХ РЕПЛИКАЦИИ В ДОМЕНЕ
АЛЬФА-ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ КУР**

Специальность 03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2007

Работа выполнена в рамках программы Российско-Французского научного сотрудничества в лаборатории структурно-функциональной организации хромосом Института биологии гена РАН (Москва, Россия) и лаборатории хроматина, развития и канцерогенеза Института им. Густава Русси (Вилльжуиф, Франция).

Научные руководители: чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор
С.В. Разин

доктор биологических наук
Е.С. Васецкий

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук, профессор
И.А. Крашенинников

доктор биологических наук
Е.Н. Набирочкина

Ведущая организация: Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится октября 2007 года в часов на заседании

Диссертационного совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу:
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991 Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан сентября 2007 года.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы.

Доменная гипотеза организации генома высших эукариот постулирует, что геном состоит из единообразных структурно-функциональных единиц – геномно-хроматиновых доменов, функционирующих сходным образом. Эта гипотеза базируется на результатах изучения ряда тканеспецифических генов и кластеров генов (бета-глобиновые гены позвоночных, ген лизоцима кур, ген аполипопротеина В человека и др.). В последние годы широкомасштабное изучение организации геномов различных позвоночных показало, что существует множество «неканонических» доменов, которые часто называют доменами открытого типа. Одной из основных характеристик этих доменов является их расположение в богатых генами областях генома, где тканеспецифичные гены соседствуют с неродственными генами «домашнего хозяйства».

Ярким примером геномных доменов с перекрывающимися генами является домен α -глобиновых генов кур. В этом домене 5'-регуляторная область кластера тканеспецифичных α -глобиновых генов перекрывается с геном «домашнего хозяйства» *ggPRX*. Как следствие такого перекрывания имеет место интерференция регуляторных систем неродственных генов. В настоящей работе идентифицированы два регуляторных элемента из 5'-фланкирующей области α -глобинового домена – промотор гена *ggPRX* и находящийся поблизости от него CTCF-зависимый сайленсер. Предложена модель функциональной изоляции гена *ggPRX* от кластера α -глобиновых генов с участием этих регуляторных элементов. Особенностью доменов открытого типа является то, что в рамках этих доменов каким-то образом должны совмещаться принципиально разные репликационные программы, типичные для генов «домашнего хозяйства» и тканеспецифичных генов. Вопрос о том, какая из этих программ реализуется в каждом конкретном случае практически не изучен. Поэтому данная работа также посвящена определению времени репликации α -глобиновых генов кур в клетках различного происхождения.

Следует отметить, что структурно-функциональные особенности организации доменов открытого типа, содержащих одновременно тканеспецифичные гены и гены «домашнего хозяйства», сравнительно мало изучены. О молекулярных механизмах, обеспечивающих функциональную изоляцию перекрывающихся регуляторных систем, так же как и о процессах, лежащих в основе выбора программы репликации в доменах с перекрывающимися генами, практически ничего неизвестно. В то же время домены открытого типа широко представлены в геноме высших эукариот. Изучение структурно-функциональных особенностей этих доменов, понимание механизмов, регулирующих процессы транскрипции и репликации в таких доменах, позволит лучше понять общие принципы организации эукариотического генома. Именно это определяет актуальность темы данной диссертационной работы.

Цели и задачи исследования.

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1) выяснить, каким образом обеспечивается контроль экспрессии гена *ggPRX* в процессе эритроидной дифференцировки;
- 2) определить, существует ли зависимость между временем репликации и транскрипционным статусом α -глобиновых генов кур.

Научная новизна и практическая ценность работы.

В работе впервые продемонстрировано существование «кондиционного» CTCF-зависимого сайленсера в геноме позвоночных. Показано, что данный регуляторный элемент, расположенный в пределах CpG-островка из 5'-регуляторной области домена α -глобиновых генов кур, активен только в эритроидных клетках. Вблизи него картирован промотор гена «домашнего хозяйства» *ggPRX*. Предложена оригинальная модель разграничения перекрывающихся регуляторных систем в домене α -глобиновых генов кур, осуществляющегося при участии обнаруженных регуляторных элементов. В геноме человека найдены гомологи идентифицированных в настоящей работе регуляторных элементов в той же позиции относительно кластера α -глобиновых генов, что и в курином геноме. Эти данные позволяют предположить, что предложенная модель является эволюционно консервативной и может быть применима для объяснения механизмов функционирования и других доменов с перекрывающимися генами. Кроме того, нами впервые определена временная программа репликации домена α -глобиновых генов кур. Высказано предположение о контроле времени репликации конкретного участка генома на уровне структуры хроматина.

Результаты данной работы вносят существенный вклад в развитие представлений о структурно-функциональной организации эукариотического генома.

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы были представлены на 9-ой международной конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2005), на 6-ой международной конференции по молекулярной генетике соматических клеток (Звенигород, 2005), на международных школах, конференциях и конгрессах: «Gliwice Scientific Meetings 2004» (Гливицы, Польша, 2004), EMBO/FEBS Conference on Nuclear Structure and Dynamics (Ла Гранд Мотт, Франция, 2005), 18th IGB Meeting «Epigenetic Bases of Genome Reprogramming» (Капри, Италия, 2005), ESF - JSPS Workshop on Functional Genomics (Канагава, Япония, 2006), ICGEB-TUBITAK Workshop on Emerging Topics in Human Functional Genomics and Proteomics (Анталия, Турция, 2006), 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (Киото, Япония, 2006), 4th International Summer School «DNA and Chromosomes 2006» (Каржез, Франция, 2006), 32nd FEBS Congress «Molecular Machines» (Вена, Австрия, 2007), EMBO Conference on Nuclear Structure and Dynamics (Монпелье, Франция, 2007).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ. Из них статей – 2, тезисов докладов и материалов конференций – 10.

Структура и объем работы.

Диссертация изложена на _____ страницах, содержит _____ рисунков и 1 таблицу, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов исследования, Обсуждения, Выводов и списка литературы, включающего _____ источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

I. ОБНАРУЖЕНИЕ CTCF-ЗАВИСИМОГО САЙЛЕНСЕРА, РАСПОЛОЖЕННОГО РЯДОМ С ПРОМОТОРОМ ГЕНА *ggPRX*.

Кластер регулируемых в развитии куриных α -глобиновых генов содержит эмбриональный (π) и два взрослых (α^A и α^D) гена (рис. 1А). Он находится в «открытой», ДНК-аза-чувствительной, конфигурации вне зависимости от клеточной дифференцировки, хотя экспрессия α -глобиновых генов строго ограничена клетками эритроидного происхождения [Craddock et al., 1995]. Этот факт может объясняться тем, что домен α -глобиновых генов лежит в богатой генами области генома. В частности, в 5'-фланкирующей области α -глобинового домена находится ген «домашнего хозяйства», который транскрибируется в направлении, противоположном транскрипции глобиновых генов, в геноме человека [Vyas et al., 1995], курицы [Sjakste et al., 2000] и мыши [Kielman et al., 1993]. Кроме того, главный регуляторный элемент домена, активирующий экспрессию α -глобиновых генов, лежит в одном из интронов этого гена «домашнего хозяйства» [Flint et al., 2001]. В данном случае мы сталкиваемся с ситуацией, когда тканеспецифичный домен перекрывается с доменом повсеместно экспрессирующегося гена. Таким образом, домен α -глобиновых генов курицы представляет собой яркий пример домена открытого типа [Razin et al., 2003]. Регуляторные системы доменов такого типа остаются пока мало исследованными и как следствие плохо понятыми.

Нашей задачей было попытаться понять, как достигается функциональная изоляция куриного гена «домашнего хозяйства» *ggPRX* от перекрывающегося с ним домена α -глобиновых генов. Дело в том, что промотор гена *ggPRX* лежит между главным регуляторным элементом (MRE) α -глобинового домена и кластером самих α -глобиновых генов. В процессе эритроидной дифференцировки происходит активация энхансера в составе главного регуляторного элемента α -глобинового домена и начинается ацетилирование гистонов вдоль всей 5'-фланкирующей области домена, включающей часть гена *ggPRX* и его промотор [Anguita et al., 2001]. Изменение статуса ацетилирования гистонов в промоторной области гена *ggPRX* и действие мощного вышележащего энхансера в процессе эритроидной дифференцировки могут влиять на экспрессию гена *ggPRX*, повышая её уровень. Тем не менее экспрессия гена *ggPRX* в эритроидных клетках остается на прежнем «базовом» уровне [Sjakste et al., 2000]. Это указывает на существование неких регуляторных систем, стабилизирующих уровень экспрессии гена *ggPRX* в эритроидных клетках.

Мы предположили, что в регуляции экспрессии гена *ggPRX* могут участвовать энхансер-блокирующие элементы. У позвоночных животных эти элементы работают при участии многофункционального белкового фактора CTCF [Bell et al., 1999]. Поэтому мы решили

проверить, есть ли участки связывания CTCF рядом с промотором гена *ggPRX*. Из ранее опубликованных работ было известно, что транскрипция гена *ggPRX* начинается в пределах CpG-богатой области, лежащей на расстоянии 2.5 – 5 т.п.н. от начала α -глобинового π -гена [Vyas et al., 1995 ; Sjakste et al., 2000]. В связи с этим нашей первой задачей был анализ нуклеотидной последовательности упомянутого CpG-островка на предмет наличия потенциальных участков связывания CTCF.

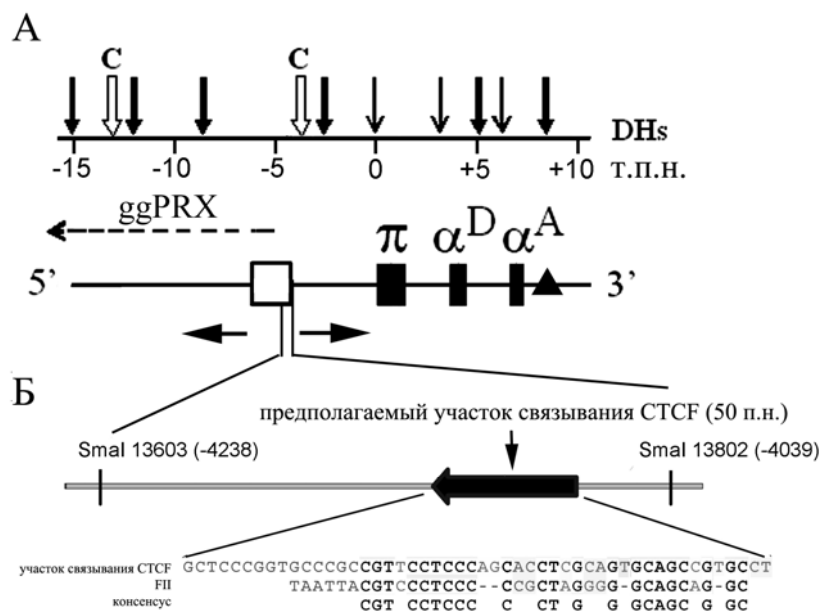


Рис 1. Схематическое изображение регуляторных и структурных элементов куриного α -глобинового домена.

(А) Показано распределение участков гиперчувствительности к DNазе I - DHs (чёрные стрелки соответствуют эритроид-специфическим участкам; тонкие стрелки – промоторным областям; белые стрелки – постоянным участкам). Глобиновые гены изображены в виде черных прямоугольников. Незакрашенным прямоугольником обозначен CpG-островок, включающий промотор гена *ggPRX* и точку инициации репликации. Горизонтальными стрелками указано направление репликации. Позиция и направление транскрипции гена *ggPRX* показаны пунктирной линией. Черный треугольник указывает на эритроид-специфичный энхансерно-сайленсерный элемент.

(Б) Предполагаемый участок связывания с CTCF (50 п.н.) расположен в пределах 200 п.н. SmaI-фрагмента из CpG-островка. Стрелка указывает направление транскрипции гена *ggPRX*. Консервативные мотивы, выявленные при сравнении последовательности предполагаемого участка связывания CTCF из 5'-фланкирующей области куриного домена α -глобиновых генов с CTCF-узнающей последовательностью FII из 5'-инсулятора домена β -глобиновых генов кур, выделены жирным шрифтом. Номера, обозначающие позиции SmaI-сайтов, соответствуют депонированной в GenBank последовательности под номером AF098919; номера в скобках указывают расстояние от точки старта транскрипции π -гена.

1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО УЧАСТКА СВЯЗЫВАНИЯ CTCF В ПРЕДЕЛАХ CpG-ОСТРОВКА, РАСПОЛОЖЕННОГО В 5'-ФЛАНКИРУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ ДОМАНА АЛЬФА-ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ КУР.

Проведённый нами анализ нуклеотидной последовательности CpG-островка из 5'-фланкирующей области домена α -глобиновых генов кур позволил выявить участок высокой гомологии с «классической» CTCF-связывающей последовательностью FII из 5'-инсулятора

куриного домена β -глобиновых генов [Bell et al., 1999]. Мы обнаружили ~50 п.н. последовательность, которая с ~70% точностью совпадала по нуклеотидному составу с последовательностью FII-инсулятора (рис. 1Б). Найденный участок лежал в пределах 200 п.н. SmaI-фрагмента с координатами 13603 – 13802 на последовательности ДНК, депонированной в базе данных GenBank под номером AF098919. Эта последовательность включает собственно кластер α -глобиновых генов кур и 5'-регуляторную область этого кластера. В пользу наличия потенциального участка связывания CTCF в пределах найденной 50 п.н. последовательности говорило присутствие консервативных мотивов – CCTCCC и GCAGC, а также сохранение позиции консервативного CpG-динуклеотида относительно CCTCCC-мотива (рис. 1Б).

I. 2. CTCF ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ *IN VITRO* С ИЗУЧАЕМОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ДНК.

С тем, чтобы определить, действительно ли CTCF связывается с найденной нами последовательностью ДНК, мы поставили опыты по задержке электрофоретической подвижности в геле, которые позволяют судить о наличии в составе изучаемого фрагмента ДНК участков связывания для различных белковых факторов. В качестве источника белковых факторов мы использовали экстракт ядерных белков, полученный из клеток линии куриных эритробластов HD3. Электрофорез белков в денатурирующих условиях и последующий Вестерн-блот анализ с использованием CTCF-специфичных антител подтвердил наличие эндогенного CTCF в составе полученного нами экстракта ядерных белков (рис. 2В). В результате эксперимента по задержке подвижности при электрофорезе в полиакриламидном геле 200 п.н. фрагмента ДНК, содержащего потенциальный участок связывания CTCF, мы обнаружили полосу с замедленной подвижностью, соответствующую ДНК-белковому комплексу (рис. 2А). Следовательно, изучаемый 200 п.н. фрагмент ДНК связывался с неким белковым фактором, присутствующим в экстрактах из куриных клеток HD3. Судя по степени задержки, данный белковый фактор обладал большой молекулярной массой, то есть в принципе это мог быть CTCF. Для того, чтобы проверить это предположение, были поставлены опыты по конкуренции связывания избытком немеченого («холодного») двуспирального олигонуклеотида (FII), содержащего канонический участок связывания CTCF из 5'-инсулятора домена β -глобиновых генов кур. Данный олигонуклеотид эффективно конкурировал с изучаемым фрагментом ДНК за связываемый белковый фактор: уже при 10-кратном молярном избытке специфического конкурента сигнал, соответствовавший ДНК-белковому комплексу, практически полностью исчезал (рис. 2А). В следующей серии экспериментов по задержке подвижности в геле мы использовали наряду с обычным ядерным экстрактом из клеток HD3 экстракт, обогащённый куриным белком CTCF (рис. 2В). Для получения такого экстракта проводили сверхэкспрессию куриного CTCF в клетках COS-1. В

эксперименте с обогащенным экстрактом была зарегистрирована зона замедленной подвижности на одном уровне с полосой, соответствовавшей ДНК-белковому комплексу, образованному в результате связывания изучаемого фрагмента с белковым фактором из ядер клеток HD3, и во много раз её превосходящая по интенсивности (рис 2Б). Этот факт легко объясняется тем, что увеличенное количество белка CTCF в обогащенном экстракте связывает большее количество свободного меченого фрагмента. Результаты экспериментов по задержке подвижности геле с добавлением конкурентной CTCF-связывающей последовательности FII и использованием обогащенного белком CTCF ядерного экстракта позволяют заключить, что фактором, взаимодействующим с изучаемой последовательностью ДНК, действительно является CTCF.

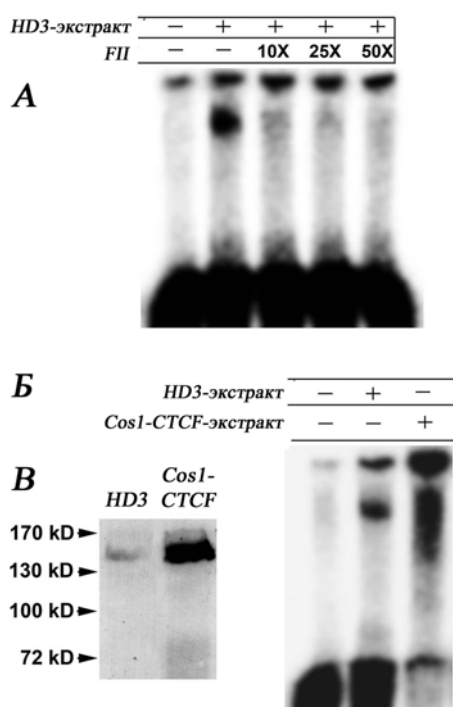


Рис. 2. CTCF взаимодействует *in vitro* с фрагментом CpG-островка из 5'-фланкирующей области куриного домена α -глобиновых генов.

(А) Эксперименты по задержке электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле с использованием ядерных экстрактов из клеток HD3 без и с добавлением избытка (10x – 50x) специфического немеченого конкурента (FII).

(Б) Эксперименты по задержке электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле с использованием ядерных экстрактов из клеток HD3 и клеток COS-1, суперэкспрессирующих куриный белок CTCF.

(В) Вестерн-блот анализ ядерных экстрактов из клеток HD3 и клеток COS-1, трансфицированных экспрессионным вектором pSG5-CTCF, с использованием антител против CTCF.

1.3. МЕТИЛИРОВАНИЕ ИЗУЧАЕМОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК ПРЕДОТВРАЩАЕТ ЕЁ СВЯЗЫВАНИЕ С CTCF.

Известно, что метилирование CpG-динуклеотидов в участке связывания CTCF препятствует связыванию. В пределах изучаемой нами 50 п.н. CTCF-связывающей последовательности содержится 5 CpG-динуклеотидов, являющихся мишенями для метилирования. Мы решили проверить, влияет ли метилирование этих CpG-динуклеотидов на связывание CTCF *in vitro*. Был приготовлен следующий набор двуспиральных синтетических олигонуклеотидов: 50 п.н. изучаемый участок связывания CTCF (С), участок связывания CTCF, полностью метилированный по всем 5 CpG-динуклеотидам (FM) и 5 олигонуклеотидов, метилированных по одному из пяти CpG-динуклеотидов (M1 – M5). Эти олигонуклеотиды были

протестированы в экспериментах по задержке электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле. По результатам этой серии экспериментов мы выяснили, что, как и предполагалось, полное метилирование всех 5 CpG-динуклеотидов предотвращает связывание CTCF, о чём можно судить по отсутствию специфической верхней полосы (рис. 3, FM). Метилирование по позициям CpG-динуклеотидов 1 или 2 никак не влияло на связывание с CTCF (рис. 4А, M1 и M2). Напротив, метилирование CpG-динуклеотида по позиции 3 полностью предотвращало взаимодействие изучаемой последовательности с CTCF (рис. 4А, M3). Метилирование по позициям CpG-динуклеотидов 4 или 5 понижало эффективность связывания изучаемой последовательности с CTCF, о чём свидетельствует значительное, но неполное исчезновение верхней полосы, соответствующей CTCF-ДНК комплексу (рис. 4А, M4 и M5).

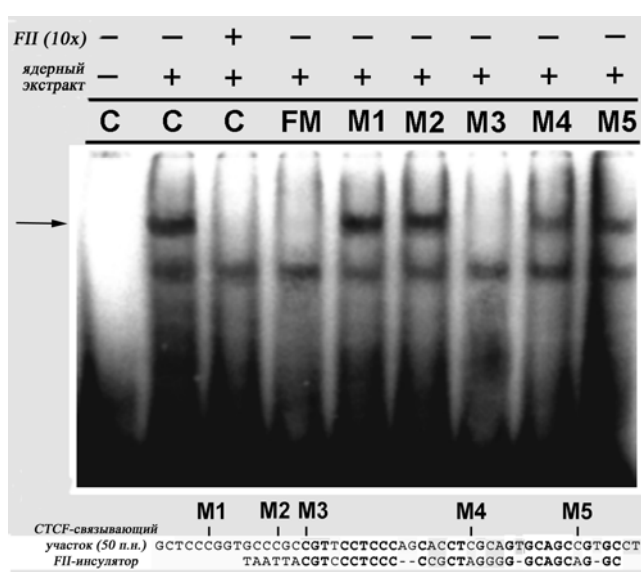


Рис. 3. Метилирование предотвращает связывание CTCF с изучаемой последовательностью.

Эксперименты по задержке электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле с радиоактивно мечеными 50 п.н. олигонуклеотидами, представляющими неметилированный (С), полностью метилированный (FM) или метилированный по отдельным CpG-динуклеотидам (M1-M5) участок связывания CTCF. Ядерный экстракт был выделен из клеток HD3. Стрелка указывает на полосу с замедленной подвижностью, соответствующую специфическому комплексу CTCF с ДНК.

Таким образом, CpG-динуклеотиды 3, 4 и 5 участвуют в ДНК-белковом взаимодействии CTCF с изучаемой последовательностью. Причём роль 3-го CpG-динуклеотида наиболее важна, так как метилирования по одной этой позиции уже достаточно для полного предотвращения образования комплекса между CTCF и изучаемым фрагментом ДНК. Стоит напомнить, что именно 3-ий CpG-динуклеотид является «консервативным» между изучаемым нами 50 п.н. участком связывания CTCF и FII-последовательностью из 5'-инсулятора домена β-глобиновых генов кур.

1.4. АНАЛИЗ СТАТУСА МЕТИЛИРОВАНИЯ ИЗУЧАЕМОЙ CTCF-СВЯЗЫВАЮЩЕЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК В КЛЕТКАХ ЭРИТРОИДНОГО И ЛИМФОИДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что дифференциальное метилирование изучаемой последовательности ДНК может играть эпигенетическую роль,

регулируя её связывание с CTCF. Поэтому мы решили сравнить статус метилирования изучаемой последовательности в клетках эритроидного и лимфоидного происхождения. Для реализации данной задачи мы использовали комбинацию бисульфитного геномного секвенирования и ПЦР чувствительной к метилированию. Результаты, представленные на рис. 4, указывают на то, что последовательность ДНК, охватывающая изучаемый участок связывания CTCF, неметилирована в эритроидных клетках HD3 и гиперметилирована в лимфоидных клетках DT40. Таким образом, фрагмент ДНК, содержащий CTCF-связывающий мотив, оказался метилирован в клетках неэритроидного происхождения, что, как было продемонстрировано выше, препятствует его связыванию с CTCF *in vitro*.

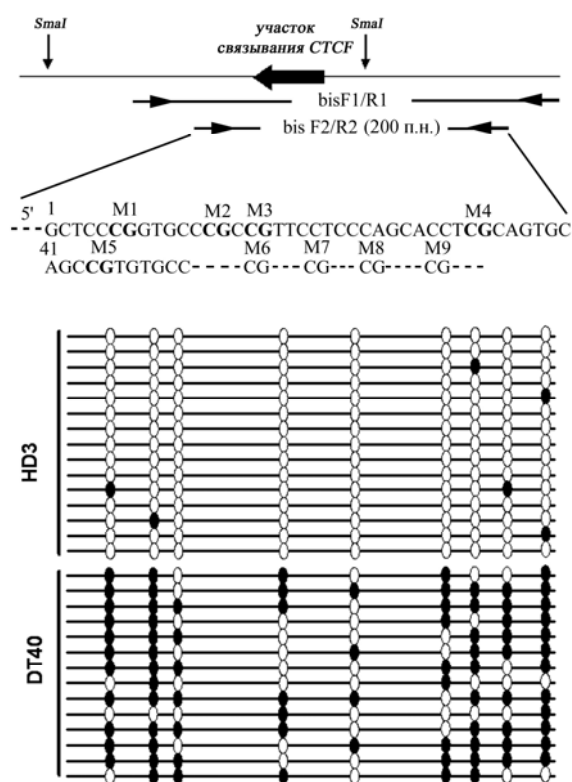


Рис. 4. Статус метилирования CTCF-связывающей последовательности в эритроидных (HD3) и лимфоидных (DT40) клетках.

Обработанную бисульфитом геномную ДНК из клеток HD3 и DT40 использовали как матрицу для амплификации с внутренних праймеров изучаемого фрагмента ДНК (200 п.н.), содержащего 5 CpG-динуклеотидов в пределах CTCF-связывающей последовательности (M1-M5) и ещё 4 примыкающих CpG-динуклеотида (M6-M9). Продукты амплификации были клонированы и просеквенированы. Результаты геномного бисульфитного секвенирования представлены в нижней части рисунка (для каждого типа клеток было проанализировано по 14 клонов). Метилированные и неметилированные CpG-динуклеотиды представлены как белые и черные овалы соответственно.

1.5. CTCF ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ *IN VIVO* С ИЗУЧАЕМОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬЮ ДНК.

Как мы показали, метилирование предотвращает взаимодействие CTCF с изучаемой последовательностью ДНК *in vitro*, а сама последовательность в составе CpG-островка 5'-некодирующей области домена α -глобиновых генов кур по-разному метилирована в клетках эритроидного и лимфоидного происхождения. В этой связи закономерным представляется вопрос о том, как взаимодействует CTCF с изучаемой последовательностью *in vivo*. Наиболее удобным инструментом для получения ответа на этот вопрос является метод иммунопреципитации хроматина (ChIP) – один из немногих биохимических подходов, позволяющих изучать ДНК-

белковые взаимодействия *in vivo*. Используя данную методику, мы сравнили выделенный хроматин из эритроидных и лимфоидных клеток. На ДНК, полученной из фракции осажденного антителами против CTCF хроматина, проводилась ПЦР амплификация 200 п.н. области, включающей изучаемую последовательность ДНК. В качестве контроля мы ставили ПЦР на той же фракции ДНК с праймерами, амплифицирующими β/ϵ -энхансер из кластера β -глобиновых генов кур, так как достоверно известно, что CTCF не связывается с этим энхансером [Recillas-Targa et al., 2002]. Результаты, представленные на рис. 5А, показывают, что CTCF связан с изучаемой нами последовательностью ДНК в клетках эритроидного (HD3), но не лимфоидного (DT40) происхождения, где она метилирована. Надо отметить, что CTCF экспрессируется в клетках DT40 [Valadez-Graham et al., 2004]. Следовательно, отсутствие сигнала в лимфоидных клетках DT40 (рис. 5А) вызвано невозможностью взаимодействия CTCF с исследуемой последовательностью ДНК в связи с метилированием CpG-динуклеотидов в составе последней.

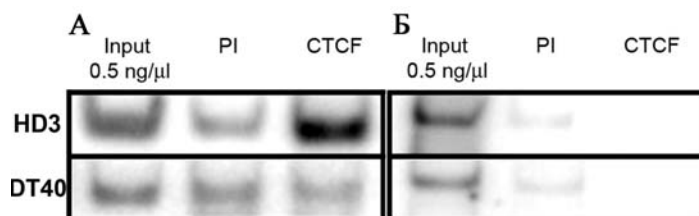


Рис. 5. CTCF взаимодействует *in vivo* с изучаемой последовательностью.

Хроматин, полученный из клеток HD3 и DT40 иммунопреципитировали с помощью антител против CTCF (CTCF) или преиimmunной сыворотки (PI). (А) ПЦР амплификация 200 п.н. фрагмента, содержащего участок связывания CTCF. (Б) «Контрольная» ПЦР амплификация β/ϵ -энхансера.

1.6. ИЗУЧАЕМЫЙ ФРАГМЕНТ ДНК ОБЛАДАЕТ CTCF-ЗАВИСИМОЙ АКТИВНОСТЬЮ САЙЛЕНСЕРА.

Так как участок связывания CTCF определяет энхансер-блокирующую функцию инсуляторов позвоночных [Bell et al., 1999], представлялось интересным выяснить, проявляет ли изучаемая CTCF-связывающая последовательность свойства энхансер-блокирующего элемента. Для получения ответа на этот вопрос было приготовлено несколько генных конструктов, содержащих репортерный ген под контролем энхансера и изучаемую последовательность ДНК. Базовый генетический конструкт для экспериментов по тестированию энхансер-блокирующих свойств фрагментов ДНК включал репортерный ген хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), поставленный под контроль промотора β^A -глобинового гена кур и β/ϵ -энхансера из домена β -глобиновых генов кур (рис. 6, конструкт 1). Анализируемый фрагмент ДНК длиной 200 п.н., включающий найденную нами 50 п.н. CTCF-связывающую последовательность (рис. 1Б), был встроен в обеих ориентациях между репортерным геном и энхансером (рис. 6, конструкты 3, 4) либо после энхансера так же в обеих ориентациях (рис. 6, конструкты 5, 6). Для анализа функциональной активности изучаемой нами последовательности ДНК был использован метод временной трансфекции линейных генетических конструктов в эукариотические клетки, который,

как было показано ранее, позволяет тестировать активность как сайленсеров, так и инсуляторов [Recillas-Targa et al., 1999].

Анализ активности репортерного гена CAT показал, что анализируемый фрагмент ДНК существенно угнетает работу этого гена, будучи встроенным после энхансера в «глобиновой» ориентации (т.е. совпадающей с направлением транскрипции α -глобиновых генов) и перед энхансером в противоположной ориентации (рис. 6, конструкции 4, 5). При положении исследуемого фрагмента в «глобиновой» ориентации перед энхансером и в противоположной ориентации после энхансера наблюдалось гораздо менее существенное снижение активности гена CAT (рис. 6, конструкции 3, 6). Исходя из этих данных, можно заключить, что исследуемый фрагмент обладает активностью сайленсера, но не является энхансер-блокирующим элементом, так как подавляет активность энхансера и в том случае, когда он вынесен за пределы промотор-энхансерной коммуникации. Это заключение было подтверждено и в эксперименте по трансфекции кольцевых конструкций (см. рис. 15Б Диссертации).

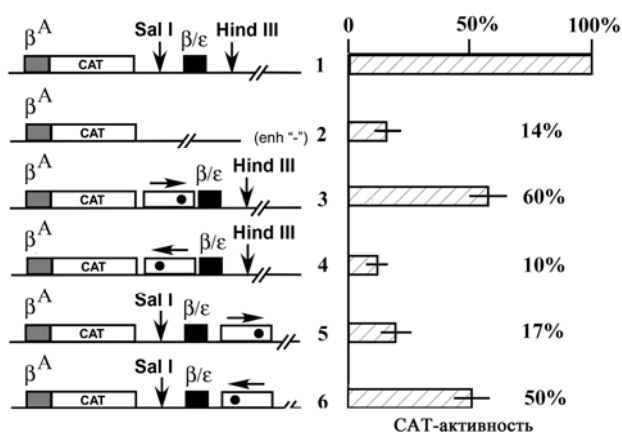


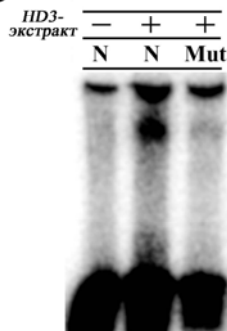
Рис. 6. Анализ функциональной активности изучаемой СТСФ-связывающей последовательности в экспериментах по временной трансфекции линейных конструкций в клетки HD3.

Стрелкой показана ориентация встроенного 200 п.н. фрагмента ДНК, содержащего участок связывания СТСФ (чёрный кружок). Активность репортерного гена CAT показана с учётом эффективности трансфекции. Все конструкции были линейаризованы перед трансфекцией в клетки HD3.

А

(N) 5'GCTCCCGGTGCCGTTCTCCAGCACCTCGCAGTGCAGCCGTGCCT3'
 (Mut) 5'GCTCCCGGTGCCGTTCT---AGCAC---CAGTGCAGCCGTGCCT3'

Б



В

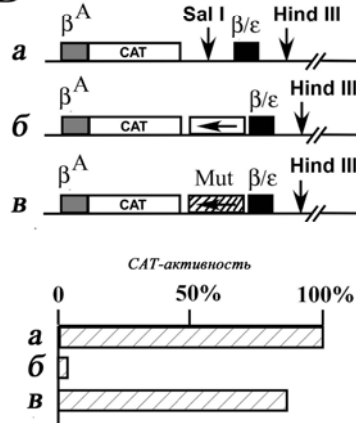


Рис.7. Зависимость активности сайленсера от связывания с СТСФ.

(А) Нормальный (N) и мутантный (Mut) участок связывания СТСФ. Мотивы предположительно важные для взаимодействия с СТСФ выделены подчёркиванием.

(Б) Эксперименты по задержке электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле с 200 п.н. фрагментом ДНК, содержащим нормальный (N) или мутантный (Mut) участок связывания СТСФ.

(В) Сайленсерная активность нормального (б) и содержащего мутантный участок связывания СТСФ (в) фрагментов ДНК. Все конструкции были линейаризованы перед трансфекцией в клетки HD3.

С целью доказать, что сайленсерная активность исследуемого фрагмента действительно зависит от связывания с CTCF мы сконструировали 200 п.н. фрагмент ДНК с мутантным участком связывания CTCF (рис. 7А). Данный мутантный фрагмент не образовывал комплекса с CTCF в экспериментах по задержке подвижности в геле (рис. 7Б) и одновременно не проявлял активности сайленсера в экспериментах по временной трансфекции (рис. 7В). Таким образом, можно сделать вывод, что активность сайленсера, проявляемая изучаемым фрагментом ДНК, зависит от связывания с CTCF.

I.7. РАССТОЯНИЕ МЕЖДУ УЧАСТКОМ СВЯЗЫВАНИЯ CTCF И ЭНХАНСЕРОМ ВЛИЯЕТ НА АКТИВНОСТЬ САЙЛЕНСЕРА.

В экспериментах по временной трансфекции генетических конструкторов максимальная активность сайленсера наблюдалась в случае конструкторов 4 и 5 (рис 6), когда 200 п.н. фрагмент был встроен в «глобиновой» ориентации после β/ϵ -энхансера или в противоположной ориентации перед энхансером. Единственной общей чертой этих двух конструкторов было то, что 50 п.н. участок связывания CTCF, расположенный асимметрично в пределах 200 п.н. SmaI-фрагмента (см. рис. 1Б), в составе этих конструкторов был одинаково удалён на расстояние 120 п.н. от β/ϵ -энхансера. В случае же конструкторов 3 и 6 (рис. 6), когда активность сайленсера была значительно менее выражена, CTCF-связывающий участок располагался на расстоянии 40 п.н. от энхансера. В связи с этим мы предположили, что расстояние между участком связывания CTCF и энхансером играет важную роль при формировании функционального комплекса между CTCF и другими белками, взаимодействующими с последовательностью энхансера. С целью проверить данное предположение, мы взяли конструктор 3 (см. рис. 6), где CTCF-связывающий участок был удалён на расстояние 40 п.н. от β/ϵ -энхансера, и встроили 80 п.н. функционально инертную последовательность между β/ϵ -энхансером и 200 п.н. фрагментом, тем самым подвинув участок связывания CTCF на расстояние 120 п.н. от β/ϵ -энхансера (рис. 8, конструктор 4). При трансфекции данного конструктора в клетки HD3 активность сайленсера резко возросла (в 15 раз) по сравнению с исходным конструктором (рис. 8, конструктор 2) и была сходной с сайленсерной активностью 200 п.н. фрагмента из конструктора, где связывающий CTCF участок был изначально позиционирован на расстоянии 120 п.н. от β/ϵ -энхансера (рис. 8, конструктор 3). Сдвиг участка связывания CTCF на расстояние 200 п.н. от β/ϵ -энхансера (рис. 8, конструктор 5) приводил к резкому снижению его сайленсерной активности (в 8 раз) по сравнению с исходным конструктором (рис. 8, конструктор 4). Исходя из этих результатов, можно заключить, что позиционирование участка связывания CTCF на расстояние 120 п.н. от модельного β/ϵ -энхансера является оптимальным для проявления его максимальной сайленсерной активности.

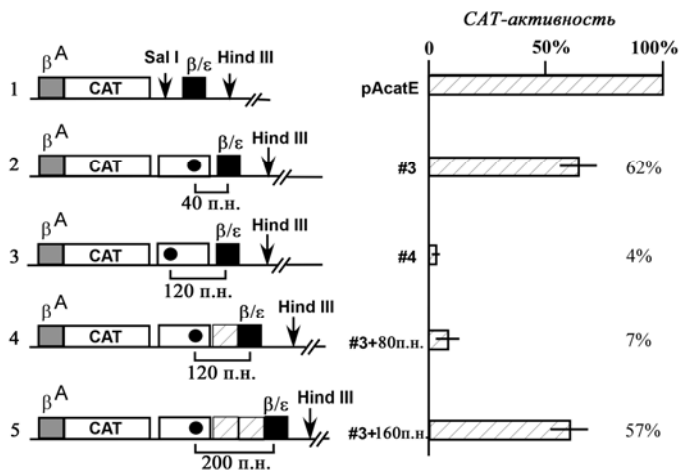


Рис. 8. Зависимость активности сайленсера от расстояния между участком связывания CTCF и энхансером.

Чёрным кружком обозначена позиция участка связывания CTCF в пределах 200 п.н. SmaI-фрагмента. Заштрихованными квадратами показаны 80 п.н. блоки, встроенные между 200 п.н. фрагментом и β/ϵ -энхансером. Все конструкции были линейаризованы перед трансфекцией в клетки HD3.

I.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЗИЦИИ ПРОМОТОРА ГЕНА *GGPRX*.

Обнаруженный нами сайленсер располагается в 3'-части CpG-островка из 5'-фланкирующей области домена α -глобиновых генов кур. В пределах того же CpG-островка должен находиться промотор гена «домашнего хозяйства» *ggPRX*. Из ранее опубликованных работ было известно, что ген *ggPRX*, перекрывающийся с доменов α -глобиновых генов, начинает транскрибироваться в области изучаемого CpG-островка [Sjakste et. al., 2000], но промотор этого гена так и не был картирован. Так как мы изначально предполагали промотор гена *ggPRX* в качестве возможной мишени действия обнаруженного CTCF-зависимого регуляторного элемента, то было необходимо определить точную позицию этого промотора в пределах CpG-островка и относительно найденного сайленсера. Сравнив последовательность промотора гена «-14» [Vyas et al., 1995] - человеческого гомолога гена *ggPRX* - с последовательностью CpG-островка из 5'-некодирующей области куриного домена α -глобиновых генов, мы обнаружили на расстоянии 120 п.н. от охарактеризованной в нашей работе CTCF-связывающей последовательности участок высокой гомологии с промотором гена «-14» (см. рис. 18 Диссертации). Этот участок гомологии длиной 110 п.н. был тестирован на промоторную активность в клетках различного происхождения. Из результатов серии трансфекций, представленных на рис. 9А, видно, что фрагмент CpG-островка, представляющий участок гомологии с промотором гена «-14» человека (конструкт 2), обладал промоторной активностью (примерно такого же уровня, что и промотор гена «-14» человека (конструкт 3)) не только в куриных эритроидных (HD3) и лимфоидных (DT40) клетках, но и в человеческих эпителиальных (HeLa) клетках. Таким образом, фрагмент куриной ДНК, гомологичный промотору гена «-14», обладает промоторной активностью, которая не является ткане- и видоспецифичной.

Чтобы подтвердить, что найденный нами промотор действительно направляет транскрипцию гена *ggPRX* *in vivo*, мы поставили серию ОТ-ПЦР с несколькими парами праймеров, охватывающих область промотора и фланкирующие последовательности ДНК (тест-

фрагменты 1 – 4, схема на рис. 9Б). Результаты ОТ-ПЦР (рис. 9Б) продемонстрировали, что области, лежащие ниже промотора (тест-фрагменты 1 и 2), транскрибируются в направлении транскрипции гена *ggPRX*, в то время как область, охватывающая собственно промотор (тест-фрагмент 3), и область выше промотора (тест-фрагмент 4) не транскрибируются в этом направлении. Таким образом, данный промотор действительно направляет транскрипцию гена *ggPRX*.

Принимая во внимание результаты вышеописанных экспериментов, можно заключить, что в пределах изучаемого CpG-островка обнаружен промотор гена *ggPRX*, не являющийся ткане- и видоспецифичным, что подтверждает ранее опубликованные предположения о том, что ген *ggPRX* представляет собой ген «домашнего хозяйства» [Vyas et al., 1995 ; Sjakste et al., 2000].

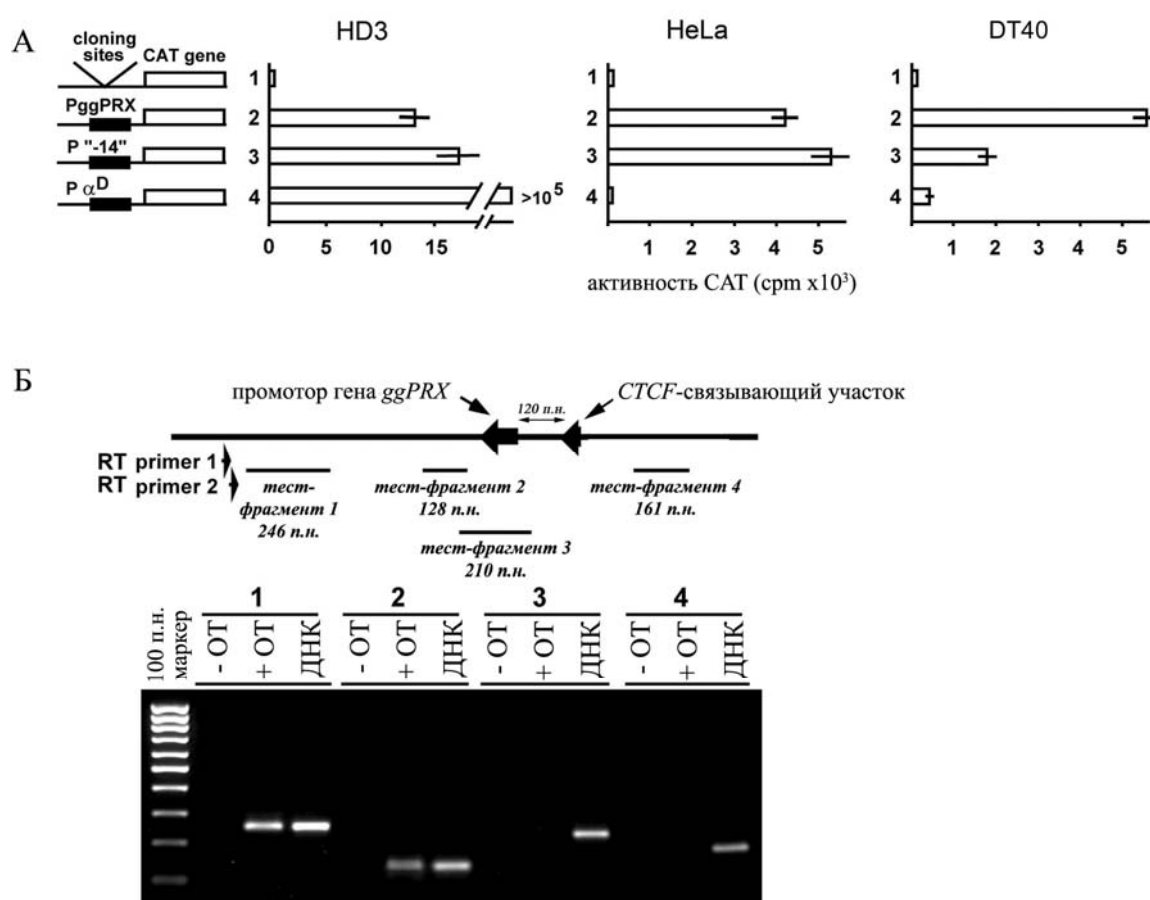


Рис. 9. Определение позиции промотора куриного гена *ggPRX*.

(А) Эксперименты по временной трансфекции в клетки HD3, DT40 и HeLa. В качестве отрицательного контроля использовался не содержащий промотора вектор (конструкт 1). Конструкт 4, содержащий эритроидспецифичный промотор α^D -гена, использовали как положительный контроль в клетках HD3 и как отрицательный – в клетках DT40 и HeLa.
 (Б) ОТ-ПЦР анализ транскрипции гена *ggPRX* в HD3-клетках HD3. Вверху: на схеме показаны позиции амплифицируемых тест-фрагментов. Внизу: амплификация тест-фрагментов 1-4; дорожки «-ОТ» обозначают контрольные препараты, в которых ПЦР-амплификация проводилась без предварительной обратной транскрипции; на дорожки, обозначенные «ДНК», наносились продукты амплификации на куриной геномной ДНК .

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ РЕПЛИКАЦИИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОГО КЛАСТЕРА АЛЬФА-ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ КУР В КЛЕТКАХ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.

Наряду с вопросом о разграничении функций регуляторных систем разных генов в доменах открытого типа важным представляется и вопрос о том, зависит ли от программы клеточной дифференцировки время репликации доменов открытого типа, содержащих тканеспецифичные гены. Этот вопрос на настоящий момент очень мало исследован. Время, или «тайминг», репликации определенной геномной области говорит о том, за какой период S-фазы произошла полная репликация данной области. Обычно различают «раннюю» (в начале S-фазы) и «позднюю» (в конце S-фазы) репликацию. Постоянно активные гены «домашнего хозяйства» всегда реплицируются «рано». Тканеспецифичные геномные домены «классического» типа являются раннереплицирующимися в клетках, где гены данного домена экспрессируются, и поздне-реплицирующимися во всех остальных типах клеток, где эти гены неактивны [Holmquist, 1987]. Иными словами, существует зависимость между временем репликации гена и его транскрипционным статусом. В случае кластера α -глобиновых генов курицы, являющимся ярким примером доменов открытого типа, мы сталкиваемся с парадоксом. С одной стороны, экспрессия α -глобиновых генов является строго тканеспецифичной [Moss et al., 1969], и, исходя из вышеизложенных наблюдений, в клетках незритроидного происхождения они должны реплицироваться поздно. С другой стороны, домен α -глобиновых генов кур перекрывается с повсеместно экспрессирующимся геном «домашнего хозяйства» [Sjakste et al., 2000], который, исходя из тех же соображений, должен реплицироваться рано во всех типах клеток. Меняется или нет время репликации α -глобиновых генов в зависимости от клеточного типа? Существует ли в таком случае зависимость между временем репликации и транскрипционным статусом α -глобиновых генов? С целью ответить на эти вопросы мы определили время репликации α -глобиновых генов курицы в клетках эритроидного и незритроидного происхождения.

Для определения времени репликации была выбрана методика флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) уникальной геномной последовательности с несинхронизированными клетками [Selig et al., 1992]. В том случае, если изучаемая последовательность ДНК не является «импринтированной», возможны только два варианта результатов: либо два одиночных гибридизационных сигнала («синглеты») в ядрах тех клеток, где изучаемый сегмент ДНК ещё не реплицировался (рис. 10А), либо два двойных гибридизационных сигнала («дублеты») в ядрах тех клеток, где изучаемый сегмент ДНК уже прошёл репликацию (рис. 10Б). Характер распределения «дублетов» и «синглетов» в несинхронной популяции клеток позволяет определить время репликации в S-фазе любой неимпринтированной последовательности ДНК. Для раннереплицирующихся генов будет характерна большая доля «дублетов» среди

гибридизационных сигналов, тогда как в случае поздне-repliciruyemykh генoв большая часть ядер будет давать «синглетные» гибридизационные сигналы.

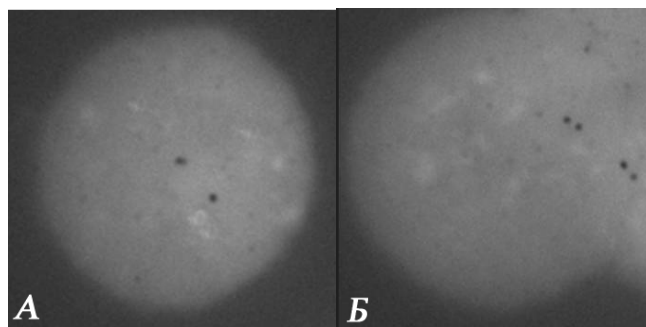


Рис. 10. Использование флуоресцентной *in situ* гибридизации для визуализации специфических последовательностей в интерфазных ядрах несинхронизированных клеток выявляет недореплицированные локусы в виде двух отдельных точек в диплоидных клетках (А), тогда как реплицированная ДНК характеризуется двойными сигналами (Б).

Мы провели *in situ* гибридизацию флуоресцентных зондов на овальбуминовый ген (контроль на поздне-repliciruyemyy локус), ген β-актина (контроль на ранне-repliciruyemyy локус), β-глобиновый домен (как пример локуса, меняющего время репликации в зависимости от клеточной дифференцировки) и α-глобиновый домен с препаратами куриных эритробластов (HD3), куриных лимфобластов (DT40) и куриных эмбриональных фибробластов (CEF). Результаты гибридизаций, представленные в табл.1., показали, что, как и предполагалось, куриные β-глобиновые гены реплицировались согласно своему экспрессионному профилю: рано в клетках эритроидного происхождения и поздно в клетках неэритроидного происхождения. В то время как α-глобиновые гены реплицировались рано в клетках как эритроидного, так и неэритроидного происхождения. С целью проверить, насколько время репликации α-глобиновых генов курицы соотносится с их транскрипционным статусом, мы провели анализ профиля экспрессии α^A-гена в клетках различного происхождения методом ОТ-ПЦР. Результаты ОТ-ПЦР (рис. 11) свидетельствует о том, что экспрессия α^A-гена ограничена исключительно клетками эритроидного происхождения (в наших экспериментах – линия HD3). В итоге, исходя из полученных результатов, можно утверждать, что время репликации куриных α-глобиновых генов не соотносится с их транскрипционным статусом.

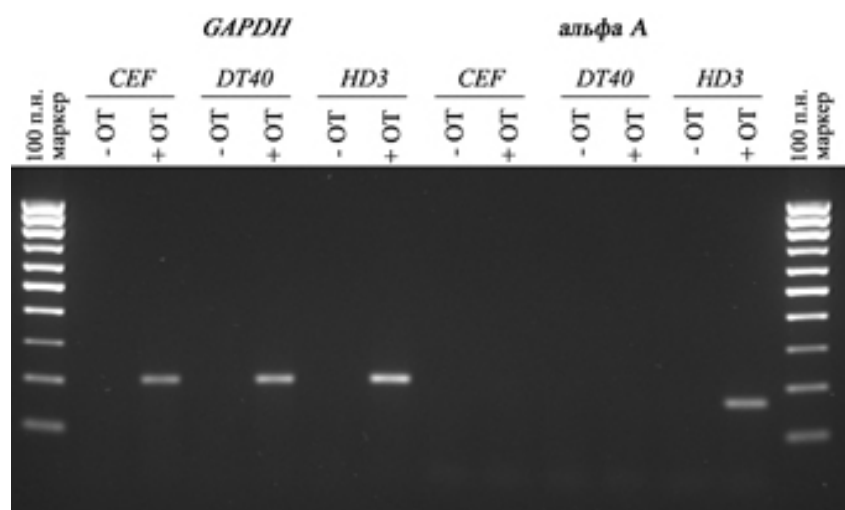


Рис. 11. Сравнительный анализ транскрипционного статуса α^A-гена в клетках различного типа методом ОТ-ПЦР. «-ОТ» обозначает контрольные препараты, в которых ПЦР-амплификация проводилась без предварительной обратной транскрипции. Амплификация фрагмента куриного гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* проводилась в качестве положительного контроля.

Таблица 1. Время репликации генных локусов курицы в клетках различного типа.

Клеточная культура	ген	синглеты	дублиеты	время репликации
фибробласты (CEF)	β -актин	42%	58%	раннее
	овальбумин	86%	14%	позднее
	β -глобин	71%	29%	позднее
	α -глобин	52,5%	47,5%	раннее
лимфобласты (DT40)	овальбумин	82%	18%	позднее
	β -актин	35%	65%	раннее
	β -глобин	70%	30%	позднее
	α -глобин	45%	55%	раннее
эритробласты (HD3)	овальбумин	83%	17%	позднее
	β -актин	32%	68%	раннее
	β -глобин	53%	47%	раннее
	α -глобин	37%	63%	раннее

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как уже было многократно отмечено выше, особенностью домена α -глобиновых генов кур, равно как и доменов α -глобиновых генов других позвоночных животных, является тот факт, что эти домены перекрываются с доменом гена «домашнего хозяйства» (ген *-14* у человека [Vyas et al., 1995], ген *ggPRX* у кур [Sjakste et al., 2000]). В условиях активации домена α -глобиновых генов, сопровождающейся, в частности, появлением гиперацетилированного хроматинового домена, включающего и промоторы этих генов [Anguita et al., 2001], уровень экспрессии данных генов может возрасти. Последствия этого трудно предсказать, так как функции генов «домашнего хозяйства», перекрывающихся с кластером α -глобиновых генов, до сих пор не установлены. Однако трудно предположить, что увеличение уровня экспрессии этих генов необходимо в дифференцирующихся эритроидных клетках. Более того, было прямо показано, что этого не происходит.

В настоящей работе мы обнаружили и охарактеризовали новый сайленсер, расположенный в CpG-островке из 5'-фланкирующей области домена α -глобиновых генов кур. Этот сайленсер является CTCF-зависимым, причём CTCF ассоциирован с последовательностью сайленсера лишь в клетках эритроидного происхождения, но не в лимфоидных клетках, где она гиперметилирована. В экспериментах *in vitro* мы продемонстрировали, что метилирование обнаруженного нами участка связывания CTCF предотвращает связывание. Таким образом, обнаруженный нами

регуляторный элемент можно охарактеризовать как «кондиционный» сайленсер, т.е. способный «включаться» и «выключаться» в ответ на определённые сигналы. В данном случае активность сайленсера регулируется посредством метилирования участка связывания CTCF. Поэтому сайленсер должен быть активен лишь в эритроидных клетках, где он неметилирован, в отличие от лимфоидных и других клеток неэритроидного происхождения. В непосредственной близости от обнаруженного сайленсера (120 п.н.) мы картировали промотор гена *ggPRX*. Надо отметить, что в модельных экспериментах, проведённых в нашей работе, сайленсер проявлял максимальную активность, когда был удалён от энхансера на то же расстояние в 120 п.н. Принимая во внимание, что промоторы генов «домашнего хозяйства» представляют обычно единый промоторно-энхансерный блок, можно с высокой степенью уверенности говорить о том, что обнаруженный нами сайленсер контролирует работу промотора гена *ggPRX* в эритроидных клетках. Согласно предлагаемой нами модели (рис. 12), активный в эритроидных клетках сайленсер стабилизирует экспрессию гена *ggPRX* в ситуации, когда промотор этого гена может быть дополнительно стимулирован действием мощного вышележащего энхансера (MRE), ответственного за активацию α -глобиновых генов, и появлением домена гиперацетилирования гистонов, включающего и промотор гена *ggPRX*. В неэритроидных клетках, где цис-действующие α -глобиновые регуляторные элементы неактивны, сайленсер «выключен» посредством метилирования участка связывания CTCF. В силу этого транскрипция с промотора гена *ggPRX* остаётся неизменной.

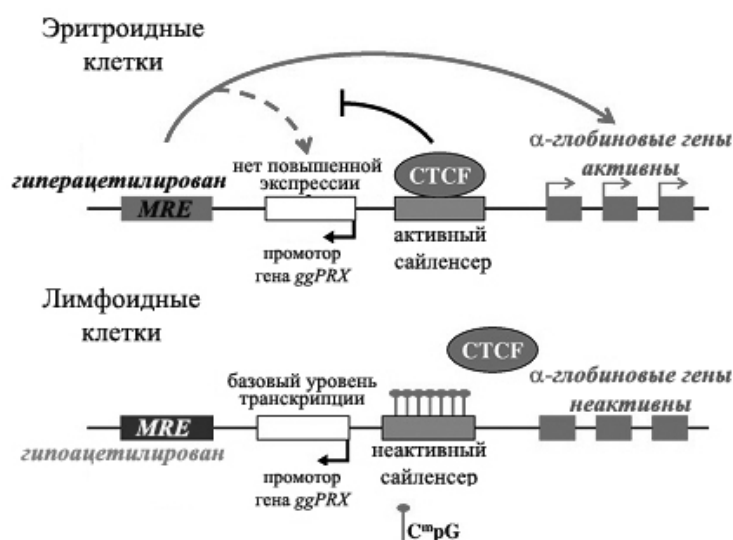


Рис. 12. Модель действия CTCF-зависимого сайленсера из 5'-фланкирующей области домена α -глобиновых генов кур. В эритроидных клетках CTCF взаимодействует с проксимальным к промотору гена *ggPRX* элементом, расположенным на расстоянии ~ 4 т.п.н. от эмбрионального μ -гена. Образовавшийся сайленсер позволяет избегать активирующего действия главного регуляторного элемента (MRE), контролирующего экспрессию α -глобиновых генов, на промотор гена «домашнего хозяйства» *ggPRX*. В неэритроидных клетках выключение сайленсера посредством метилирования его последовательности и изменение структуры хроматина 5'-фланкирующей области α -глобинового домена обеспечивают нормальную экспрессию гена *ggPRX*.

Следствием перекрывания домена α -глобиновых генов кур с геном «домашнего хозяйства» также является возможность наложения двух разных репликационных программ. Согласно накопленным экспериментальным данным, в эукариотическом геноме гены «домашнего хозяйства» реплицируются рано в S-фазе, тогда как тканеспецифичные гены реплицируются в зависимости от их транскрипционного статуса - рано в экспрессирующих их клетках и поздно во всех остальных клетках. Определение нами времени репликации α -глобиновых генов кур в клетках различного происхождения показало, что, несмотря на различный транскрипционный статус, они реплицируются рано в S-фазе как в эритроидных клетках, так и в клетках незритроидного происхождения. Данные результаты согласуются с ранее опубликованной работой, утверждающей, что гены, расположенные в богатых генами GC-изохорах, не меняют время своей репликации в зависимости от клеточной дифференцировки [Hiratani et al., 2004]. Подобное явление можно объяснить тем, что такой параметр, как время репликации, определяется не уровнем транскрипции, а конфигурацией хроматинового домена и как следствие характером доступности ДНК для компонентов репликационной машины.

ВЫВОДЫ

1. Картирован промотор повсеместно экспрессирующегося гена *ggPRX*, перекрывающегося с доменом α -глобиновых генов кур.
2. Обнаружен и охарактеризован CTCF-зависимый сайленсер, расположенный в CpG-островке из 5'-фланкирующей области домена α -глобиновых генов кур, рядом с промотором гена *ggPRX*.
3. Показано, что функционирование CTCF-зависимого сайленсера, расположенного в CpG-островке домена α -глобиновых генов кур, регулируется метилированием участка связывания CTCF.
4. Продемонстрировано, что время репликации домена α -глобиновых генов кур не зависит от транскрипционного статуса домена.

Статьи:

1. Клочков Д. Б., Юдинкова Е.С., Разин С.В. **2004**. Характеристика сайленсера, расположенного в CpG-богатой области перед кластером α -глобиновых генов кур. *Доклады Академии Наук*. 398(5), 699 - 701.
2. Klochkov D., Rincon-Arano H., Ioudinkova E.S., Valadez-Graham V., Gavrilov A., Recillas-Targa F. and Razin S.V. **2006**. A CTCF-dependent silencer located in the differentially methylated area may regulate expression of a house-keeping gene overlapping a tissue-specific gene domain. *Molecular and Cellular Biology*. 26(5), 1589-97.

Тезисы конференций:

1. Klochkov D., Ioudinkova E., Razin S. Characterization of a regulatory element located within CpG-island upstream to the chicken α -globin gene cluster. Gliwice Scientific Meetings 2004. Gliwice, Poland, 19 - 20 November **2004**, 21.
2. Клочков Д.Б., Юдинкова Е.С., Петрова Н.В., Разин С.В. Идентификация нового CTCF-связывающего регуляторного элемента из 5'-некодирующей области домена α -глобиновых генов кур. 9-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология - Наука XXI Века». Пущино, Россия, 19 - 21 апреля **2005**, 30.
3. Klochkov D., Ioudinkova E., Recillas-Targa F. and Razin S.V. New CTCF-dependent regulatory element within the area of overlapping gene loci of chicken ggPRX gene and α -globin gene cluster. EMBO/FEBS Conference on Nuclear Structure and Dynamics. La Grande Motte, France, 24 – 28 September **2005**, 82.
4. Klochkov D., Ioudinkova E.S., Rincon-Arano H., Recillas-Targa F. and Razin S.V. The novel CTCF-dependent silencer in the vicinity of ggPRX gene promoter in the upstream part of the chicken α -globin gene domain. 18th IGB Meeting «Epigenetic Bases of Genome Reprogramming». Capri, Italy, 8 – 11 October **2005**, 56.
5. Клочков Д.Б., Юдинкова Е.С., Гаврилов А., Ресиллас-Тарга Ф., Разин С.В. Функциональная характеристика CpG-богатой области из 5'-некодирующей области куриного домена α -глобиновых генов. VI Международная конференция по молекулярной генетике соматических клеток. Звенигород, Россия, 12-16 декабря **2005**, 22-23.
6. Klochkov D., Rincon-Arano H., Ioudinkova E., Gavrilov A., Recillas-Targa F. and Razin S.V. Differentially methylated region in the extended upstream area of chicken α -globin gene domain reveals silencer activity in erythroid cells. ESF - JSPS Workshop on Functional Genomics: From the Bench to Bioinformatics. Kanagawa, Japan, 6-11 March **2006**, 39.

7. Klochkov D., Gavrilov A., Ioudinkova E.S., Recillas-Targa F. and Razin S.V. Vertebrate α -globin gene domain as a tissue-specific domain with vague boundaries. ICGEB-TUBITAK Workshop on Emerging Topics in Human Functional Genomics and Proteomics. Antalya, Turkey, 26-31 March **2006**, 14.
8. Klochkov D., Rincon-Arano H., Ioudinkova E., Recillas-Targa F. and Razin S. Structural-functional characterization of differentially methylated region in the extended upstream area of chicken α -globin gene domain. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, 16 – 23 June **2006**, 761.
9. Klochkov D., Rincon-Arano H., Recillas-Targa F. and Razin S.V. Functional isolation of a house-keeping gene overlapping tissue-specific gene domain may be ensured by a conditional CTCF-dependent silencer. 4th International Summer School “DNA and Chromosomes 2006: Physical and Biological Approaches”. Cargese, France, 19 June – 1 July **2006**, 68.
10. Klochkov D., Vassetzky Y. and Razin S. Replication timing is likely to depend on the chromatin structure than the transcriptional status of gene locus. 32nd FEBS Congress “Molecular Machines”. Vienna, Austria, 7 – 12 July **2007**. *The FEBS Journal*, 274(1), 77.