

ОБЗОРНЫЕ
И ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ СТАТЬИ

УДК 577.218

ФУНКЦИИ ИНСУЛЯТОРОВ В КОНТЕКСТЕ СОВРЕМЕННЫХ
ПОЛНОГЕНОМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© 2019 г. Н. Е. Воробьева¹, М. Ю. Мазина¹, *

¹Институт биологии гена Российской академии наук,
группа динамики транскрипционных комплексов, Москва, 199334 Россия

*e-mail: magadovam@yandex.ru; info@genebiology.ru

Поступила в редакцию 28.03.2018 г.

После доработки 16.04.2018 г.

Принята к публикации 05.06.2018 г.

Инсуляторы принято определять как элементы ДНК, обладающие свойством защищать ген от действия других регуляторных элементов: энхансер-блокирующие инсуляторы предотвращают активацию промотора гена энхансером, будучи расположенными между ними; барьерные инсуляторы снимают так называемый эффект положения, предотвращая распространение гетерохроматина. В последние годы использование полногеномных методов анализа привело к накоплению информации относительно свойств инсуляторных элементов, выходящих за рамки канонических определений. В предлагаемом обзоре суммированы самые современные данные о функциях инсуляторов в организации архитектуры и транскрипции хроматина, а также о неканонических функциях, дополняющих общепринятые взгляды на роль инсуляторов в регуляции работы генома.

Ключевые слова: инсулятор, ТАД, транскрипция, репликация, ответ на стресс.

DOI: 10.1134/S0016675819020188

Осуществление программы развития многоклеточного организма требует правильной регуляции экспрессии генов в пространстве и времени. На сегодняшний день принято считать, что большая часть геномов эукариот представлена именно регулирующими работу генома последовательностями ДНК, к которым относят промоторы, энхансеры, сайленсеры и инсуляторы. Считается, что основной функцией данных элементов, выполняемой ими вместе с рядом ДНК-связывающих и модифицирующих хроматин белков, является поддержание доменной организации генома эукариот. Разделение генома на домены обеспечивает своевременную экспрессию генов домена и ограничение перекрестного влияния регуляторных элементов одного домена на окружающие домены. Значительную часть информации относительно механизмов работы инсуляторов представляют результаты генетических экспериментов, полученные *in vivo*, но с использованием искусственных репортерных конструкций. В ходе подобных экспериментов в различных модельных организмах было идентифицировано множество хорошо известных сегодня инсуляторов и, кроме того, были определены механизмы их энхансер-блокирующей активности. Однако получение наиболее полной информации о функционировании данных регуляторных элементов в естественном геномном контексте стало возмож-

но только с внедрением методов высокопроизводительного полногеномного анализа, таких как ChIP-seq и Hi-C. Использование этих методов позволило обнаружить ряд ранее неизвестных особенностей и взаимодействий инсуляторов и инсуляторных белков, не укладывающихся в традиционные, приписываемые им функции. Так, за последнее время было показано, что помимо участия в организации структуры хроматина на разных уровнях и регуляции транскрипции, инсуляторы и инсуляторные белки регулируют репликацию, паузинг РНК-полимеразы II, сплайсинг и экспорт мРНК, участвуют в репарации ДНК и ответе на стрессовые воздействия. Далее мы подробнее остановимся на описании перечисленных функций инсуляторов.

РАСШИРЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ
О КАНОНИЧЕСКИХ ФУНКЦИЯХ
ИНСУЛЯТОРОВ

Инсуляторы были впервые открыты на модели *Drosophila melanogaster* с использованием биохимических [1] и генетических подходов [2, 3] как последовательности ДНК, определяющие границы между различными состояниями хроматина. Также было показано, что такие элементы способны блокировать взаимодействия энхансера и промотора, будучи расположенными между ни-

ми. В настоящий момент инсуляторы и ДНК-связывающие инсуляторные белки, обеспечивающие работу инсуляторов, описаны для множества модельных организмов. Так, для *D. melanogaster* известны тысячи сайтов связывания инсуляторных белков в геноме, часть из них охарактеризована как инсуляторы в трансгенных системах. Уже на ранних этапах изучения инсуляторов было понятно, что энхансер-блокирующие и барьерные функции, выполняемые данными элементами, могут влиять на трехмерную организацию ядра. Так, для комплекса белков, формируемого на инсуляторах ДНК-связывающим белком Su(Hw) (Suppressor of Hairy wings) дрозофилы, было показано взаимодействие с ядерной ламиной [4]. Было также показано, что некоторые Su(Hw)-зависимые инсуляторы *gypsy*, расположенные удаленно друг от друга на одной и той же хромосоме, могут сближаться, образуя кластеры, локализованные на периферии ядра [5, 6]. Другим примером энхансер-блокирующих элементов, в функционировании которых важно образование петлевых хроматиновых доменов, являются *scs/scs'*-элементы, фланкирующие локус *hsp70* у *D. melanogaster* [7]. Известно, что белки Zw5 (Zeste-white 5) и BEAF32 (boundary-element associated factor of 32 kD) связывают, соответственно, *scs* и *scs'* [8, 9]. Было показано, что взаимодействие между BEAF32 и Zw5 стабилизирует формирование петлевого домена путем сближения противоположных концов *hsp70*-локуса *in vivo* [10]. Аналогичная информация была получена и для инсуляторного белка CTCF (CCCTC-binding factor), встречающегося у многих эукариот. Было показано, что молекулы CTCF могут взаимодействовать друг с другом, формируя кластеры и способствуя образованию закрытых хроматиновых доменов [11, 12]. Удаление CTCF из локуса β -глобиновых генов млекопитающих приводит к нарушению дальних взаимодействий внутри локуса и распространению в нем репрессивных модификаций гистонов [13].

В ряде исследований описано, что эффект действия инсуляторов определяется ориентацией их ДНК-мотивов: так, два инсулятора Fab-7 гомеозисного гена *Abd-B* полностью нейтрализуют друг друга будучи расположены в противоположной ориентации, но усиливают эффект, если ориентация совпадает [14–16]. Причиной данных различий является то, что выпетливание при взаимодействии двух инсуляторов может привести как к сближению промотора с энхансером, так и к удалению их друг от друга. При этом основной движущей силой формирования взаимодействий между инсуляторами считается способность инсуляторных белков к формированию гомо- и гетеродимеров [17–20].

ИНСУЛЯТОРЫ В ОРГАНИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ ГЕНОМА

На сегодняшний день данные об участии инсуляторов и инсуляторных белков в формировании структуры хроматина не ограничиваются локальными контактами внутри одного геномного локуса, но представлены и примерами крупномасштабной организации доменов хроматина длиной в сотни тысяч и миллионы пар нуклеотидов. В исследованиях последних лет было показано, что геномы эукариот организованы в контактные структуры различных размеров. Наиболее крупные контактные домены получили название топологически-ассоциированных доменов (ТАД), которые часто содержат топологические структуры более низкого порядка, называемые суб-ТАД [21]. Для данных доменов показано, что контакты чаще происходят между областями хроматина внутри них, чем с внешним хроматином [22]. ТАД проявляют консервативность в различные моменты дифференцировки клеток организма [21]. Кроме того, принципы организации генома в контактные домены консервативны между разными видами организмов, от дрозофилы до млекопитающих [23]. Было показано, что ТАД колокализуются с временными доменами репликации [24], определяют уровень транскрипции внутренних генов домена [25] и разделяют активность внутренних генов соседних доменов [26, 27]. Последнее свойство ТАД называют также “инсуляторным”. Одними из первых в поддержании инсуляторных свойств и границ ТАД была подтверждена роль инсуляторного белка CTCF и взаимодействующего с ним когезинового белкового комплекса, ответственного за сегрегацию сестринских хроматид в ходе деления клеток [28, 29]. Так, на культурах клеток человека было показано, что нокдаун когезина приводит к утрате ближних взаимодействий в хроматине, не влияя на структуру ТАД. Снижение количества CTCF не просто уменьшает количество внутридоменных взаимодействий, но и усиливает контакты между ТАД, что приводит к нарушению регуляции транскрипции ряда генов, расположенных в данных доменах [30]. Направление дальних взаимодействий внутри ТАД у млекопитающих определяет ориентация мотивов связывания белка CTCF [31, 32]. В модели “выпетливания” предполагается, что когезиновый комплекс протаскивает сквозь себя петлю хроматина до тех пор, пока не встретит две молекулы CTCF, связанные со своими сайтами в конвергентной ориентации. Считается, что именно такие сайты связывания CTCF образуют границы ТАД [33]. Изменение ориентации мотивов CTCF связано с изменениями внутренней структуры доменов у различных видов млекопитающих и, видимо, является одним из способов эволюции регуляции экспрессии генов [34]. В то же время показано, что сайты связывания белка CTCF, коло-

кализирующиеся у различных позвоночных с границами функционально сходных ТАД, маркируют наиболее древние и консервативные в эволюции виды домены, содержащие гены-регуляторы развития организмов [35].

У дрозофилы в отличие от млекопитающих CTCF связывает лишь небольшое количество границ ТАД [37–39]. Данные различия в функциональной роли консервативного белка CTCF между дрозофилой и млекопитающими возможно вызвано тем, что с границами ТАД у дрозофилы колокализуются другие известные инсуляторные белки – BEAF32, CP190, Su(Hw), ZIPIC, GAF, Pita, Ibf1-2, причем определенные их комбинации формируют границы хроматиновых доменов различных типов [20, 36, 37]. Так, ZIPIC, BEAF32, Pita, CTCF и Ibf1-2 преимущественно связывают границы активных доменов, обогащение белком Su(Hw) демонстрируют границы доменов СИНЕГО (обогащенного белками группы Polycomb) и ЧЕРНОГО (характеризующегося наличием гистона H1 и белка SuUR) типов хроматина, которые являются транскрипционно неактивными [40]. CP190 колокализуется с границами всех доменов, исключая ЧЕРНЫЙ гетерохроматин. В то же время для инсуляторного белка Su(Hw) показана преимущественная локализация внутри доменов [22].

В ряде исследований отмечена важность колокации нескольких инсуляторных белков в определении “силы” границ топологических доменов. Так, в работе [41] по результатам ChIP-seq экспериментов показано, что чем больше инсуляторных белков колокализуется с границами ТАД, тем более “сильными” являются эти границы – взаимодействия таких ТАД с окружающими доменами в Hi-C экспериментах практически не регистрируются. С другой стороны, в исследовании [37] с использованием комбинации биоинформатических подходов было показано, что границы ТАД, проходящие по промоторам генов, ассоциированы преимущественно с сайтами связывания инсуляторных белков BEAF32 и ZIPIC, а не-промоторные границы обогащены сайтами связывания Su(Hw), CTCF и Ibf1-2. При этом ассоциации с “сильными” границами ТАД были показаны для определенных комбинаций мотивов связывания белков BEAF32, Pita и ZIPIC, а не для наибольшего количества мотивов, маркирующих границу ТАД. Различия выводов в приведенных исследованиях можно отчасти объяснить тем, что результаты экспериментов ChIP-seq без учета ДНК-мотивов связывания не позволяют различить непосредственное и опосредованное связывание ДНК-связывающих инсуляторных белков с хроматином и требуют подтверждения альтернативными методиками либо определенной строгости в формулировке выводов.

Помимо роли в формировании границ таких консервативных структур, как ТАД, имеется информация об участии инсуляторов в организации динамических и специфичных для типа клеток доменов – суб-ТАД. В работе [42] была получена карта топологических взаимодействий хроматина для человеческих эмбриональных стволовых клеток и клеток-предшественников нейронов в высоком разрешении (до 4 тпн). Идентифицированные суб-ТАД значительно различаются для исследованных клеточных линий, и их границы колокализуются с CTCF и когезином. Кроме того, в ряде исследований [43, 44] было показано, что CTCF определяет специфическую для типа клеток человека организацию локуса β -глобиновых генов, при которой более плотные контакты формируются в отсутствие активности данных генов в клеточной линии. Непосредственное участие CTCF и когезина в формировании специфических взаимодействий хроматина было показано в работе [45] на четырех различных культурах клеток человека (GM12878, HeLa, K562 и MCF7) с использованием метода ChIA-PET, позволяющего *de novo* идентифицировать пространственную структуру хроматина, связанного с определенным белком. Помимо картирования множества специфических петель хроматина, формируемых CTCF, исследователями было отмечено, что CTCF совместно с когезином организует основания данных петлевых доменов в CTCF-фокусы, с которыми часто колокализуются транскрипционные фабрики. Границы таких петлевых доменов маркированы сайтами CTCF в конвергентной ориентации, а сайты CTCF в тандемной ориентации локализируются преимущественно внутри более крупных доменов и определяют менее вероятные пространственные взаимодействия.

ИНСУЛЯТОРЫ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ

Опосредованные инсуляторными белками выпетливания хроматина играют значительную роль в регуляции транскрипции. Так, очевидно, что сближение или разделение в пространстве энхансеров с промоторами генов, вызванное формированием определенных петлевых доменов, может положительно либо отрицательно сказываться на транскрипции данных генов [46, 47]. Известны примеры ген-специфического влияния инсуляторов на транскрипцию. Так, связывание CTCF с областью теломер необходимо для нормальной транскрипции РНК теломерных повторов, поддерживающей стабильность данных повторов в ходе жизненного цикла клетки [48]. Кроме того, CTCF участвует в функционировании импринтированного локуса *H19/Igf2*, способствуя инициации транскрипции гена *h19* и поддерживая гипометилированное состояние материнской аллели

[49]. Также недавно для дрозофилы был обнаружен новый инсуляторный белок Orbp, необходимый для экспрессии рибосомных генов [50]. Роль в ген-специфической регуляции транскрипции известна и для Su(Hw): в работе [51] показано, что данный белок является репрессором транскрипции гена Rbp9 в яичниках дрозофилы.

Инсуляторы могут направлять репрессию генов, опосредованную белками группы Polycomb. Данное семейство белков известно своей ролью в регуляции эпигенетического сайленсинга генов развития, происходящего посредством связывания Polycomb со специальными последовательностями ДНК – PREs (Polycomb Response Elements). Связывая PREs, белки семейства Polycomb вносят в хроматин репрессивную модификацию H3K27me3, которая привлекает дополнительные белки, обеспечивающие сайленсинг генов. Широко известно, что инсуляторы способны останавливать Polycomb-опосредованную репрессию, будучи помещены между PRE и промотором. В то же время пара одинаковых инсуляторов, расположенная последовательно, полностью восстанавливает исходную репрессию [52, 53] по аналогии с влиянием инсуляторов на взаимодействие энхансера с промотором [46, 47]. На основании этих данных можно предположить, что формирование петлевых доменов при участии инсуляторов влияет на распространение репрессированного хроматина. Действительно, было показано, что инсуляторы направляют связывание репрессированных трансгенов с тельцами Polycomb, а активных трансгенов с транскрипционными фабриками [54]. Данное свойство инсуляторов и инсуляторных белков, вероятно, играет роль в масштабных перестроениях профиля экспрессии генов клетки под действием индуцирующих сигналов. Так, в исследовании [55] было продемонстрировано, что при тепловом шоке в клетках дрозофилы происходят изменения связывания инсуляторных белков и их переход с границ ТАД внутрь доменов. Эти изменения сопровождаются значительным усилением взаимодействий удаленных друг от друга энхансеров и промоторов (расположенных на расстоянии в 10 млн пн вместо <300 тпн в норме) и связыванием их с белками семейства Polycomb, что приводит к сайленсингу большей части генома в ходе теплового шока.

НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ ИНСУЛЯТОРОВ

Использование современных методов полногеномного анализа позволило обнаружить ранее не известные свойства инсуляторов и инсуляторных белков, часть из которых не укладывается в их традиционные функции в регуляции транскрипции и организации архитектуры ядра, описанные в предыдущем разделе. В недавних исследова-

ниях была обнаружена связь инсуляторов с такими процессами, происходящими в ядре, как репарация и репликация ДНК, паузинг РНК-полимеразы II, альтернативный сплайсинг, экспорт мРНК, ответ на стрессовые воздействия. Некоторые из этих функций инсуляторов непосредственно связаны с их способностью формировать петлевые домены. Тем не менее на данный момент нельзя сказать, что все неканонические функции инсуляторов являются следствием основных инсуляторных свойств, а не описывают новые, независимые роли инсуляторов в регуляции работы генома.

ИНСУЛЯТОРЫ И ОТВЕТ НА СТРЕССОВЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ

В предыдущем разделе мы описали функцию инсуляторных белков в перестроении архитектуры хроматина в ходе ответа на стресс, вызванный тепловым шоком. Однако необходимо отметить, что существующие данные не позволяют сделать вывод о единообразии роли инсуляторов в ответе на различные стрессовые воздействия. Так, в статье [56] описаны изменения, происходящие в клетке с инсуляторными белками в ходе осмотического шока: при обработке клеток дрозофилы гипертоническим раствором NaCl наблюдается нарушение связывания CP190 и Mod(mdg4) инсуляторных белков с хроматином и переход их в инсуляторные тельца, известные как места скопления инсуляторных белков в ядре [57]. По окончании воздействия осмотического шока на клетки инсуляторные тельца разбираются, и образующие их белки связывают свои сайты в хроматине, восстанавливая нормальную архитектуру ядра.

Ответ на другие типы клеточного стресса, наоборот, требует функционирования инсуляторных белков в местах их связывания в геноме. Так, в клетках человека CTCF участвует в ответе на окислительный стресс: он необходим для рекрутирования на хроматин комплекса ремоделирования хроматина CSB семейства SWI/SNF, мутации в субъединицах которого приводят к развитию синдрома Коккейна [58]. В ходе ответа на генотоксический стресс (ионизирующую радиацию) в человеческих клетках CTCF привлекается в места повреждений ДНК с помощью связывания своими доменами цинковых пальцев поли(АДФ)-рибозы, маркирующей места разрывов ДНК, и фермента PARP-1, вносящего эту модификацию [59, 60]. В отсутствие CTCF увеличиваются как доля поврежденных клеток, так и количество повреждений ДНК в расчете на одну клетку. Эти данные позволяют предположить, что CTCF необходим для локализации ответа на повреждение на ранних этапах программы репарации разрывов ДНК. Действительно в более позднем исследовании [61] было показано, что нокдаун CTCF приводит к распространению γ H2AX модификации

гистонов, маркирующей двуцепочечные разрывы, на соседние домены и снижает эффективность репарации ДНК.

ИНСУЛЯТОРЫ И РЕПАРАЦИЯ ДНК

Роль CTCF не ограничивается предотвращением распространения маркеров повреждений ДНК по хроматину и представлена более непосредственным участием в репарации поврежденный ДНК по механизму гомологичной рекомбинации (HR). Так, в клетках человека CTCF взаимодействует и необходим для рекрутирования в места двуцепочечных разрывов ДНК белков Rad51 и BRCA2, участвующих в связывании одноцепочечной ДНК и ее внедрения в комплементарный участок сестринской хроматиды [62, 63], причем для связывания с BRCA2 CTCF должен быть поли(АДФ)-рибозилирован ферментом PARP-1. Кроме того, в подтверждение роли CTCF в репарации ДНК по механизму HR свидетельствует то, что отсутствие CTCF в клетках приводит к развитию ими фенотипа, сходного с нокдауном BRCA2, а нарушение поли(АДФ)-рибозилирования CTCF наблюдается при раке молочной железы и связано с прогрессией опухоли [64].

ИНСУЛЯТОРЫ И РЕПЛИКАЦИЯ ХРОМАТИНА

В дополнение ко взаимодействию с белками, участвующими в репарации ДНК, новой областью исследования функций инсуляторов и инсуляторных белков является репликация хроматина. Инициация репликации у эукариот происходит на множественных распределенных в геноме сайтах, называемых точками начала репликации, или ориджинами, с которыми в ходе G1-фазы клеточного цикла связывается комплекс узнавания ориджинов репликации (ORC). ORC совместно с рядом других белков (CDC45, MCM2-6) формирует пре-репликативный комплекс, готовый к инициации репликации. Не смотря на отсутствие явных консенсусных последовательностей ориджинов у высших эукариот, ORC связывают определенные участки генома в клеточных линиях и тканях [65, 66]. Для многих типов клеток и тканей данные участки совпадают, т.е. позиционирование ORC не происходит случайным образом. ORC часто локализуется в промоторных областях активно транскрибируемых генов и связываются с АТ-богатыми участками ДНК с низкой плотностью расположения нуклеосом и активным обменом гистонов [65, 67–69]. В своих исследованиях [70, 71] мы показали, что инсуляторный белок дрозофилы Su(Hw) взаимодействует *in vivo* с субъединицами комплекса ORC и необходим для рекрутирования ORC на Su(Hw)-сайты. На часть из этих сайтов привлекается еще и

CDC45, маркирующий ориджины, готовые к старту репликации. Свойство Su(Hw) рекрутировать репликационные белки требует также Su(Hw)-зависимого привлечения комплексов BRAHMA и SAGA, ремоделирующих и модифицирующих хроматин, которые формируют на Su(Hw)-сайтах участки с низкой плотностью расположения нуклеосом. Анализ существующих данных о распределении перечисленных белков в геноме показал, однако, что Su(Hw) может отвечать за привлечение репликационных комплексов только на 6% ориджинов в геноме. Оставшиеся 94% ориджинов ассоциированы с другими свободными от нуклеосом участками хроматина, такими как промоторы, с которыми часто колокализуются инсуляторные белки BEAF32, CTCF, GAF. Возможную связь этих инсуляторных белков с формированием ориджинов репликации еще предстоит исследовать.

Примером функциональной значимости открытой нами роли белка Su(Hw) в формировании пререпликативных сайтов является необходимость Su(Hw) для позиционирования части ампликонов фолликулярных клеток дрозофилы (DAFCs) в раннем оогенезе [72]. Данные ампликоны являются областями генома, в которых в течение эмбрионального развития дрозофилы (на стадии 10-го оогенеза) происходит многократная репликация (амплификация) хроматина и значительное увеличение копийности всего локуса [73]. DAFCs являются одной из известных модельных систем для изучения процесса репликации [74, 75]. Мы показали, что Su(Hw) связывается со всеми известными локусами DAFCs и это связывание является необходимым для позиционирования репликационного комплекса ORC, по крайней мере, на части локусов DAFCs на ранних этапах оогенеза. Эти данные позволяют расширить существующую на сегодняшний день точку зрения на роль белка Su(Hw) в процессе оогенеза дрозофилы как репрессора транскрипции [51].

ИНСУЛЯТОРЫ И ПАУЗИНГ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ II

Для инсуляторного белка CTCF было продемонстрировано непосредственное участие в феномене торможения, или паузирования РНК-полимеразы II, на промоторах ряда генов. В настоящее время торможение РНК-полимеразы II путем ингибирования эффективности ее перехода в кодирующую область гена с промотора считается широко распространенным путем регуляции транскрипции генов эукариот [76]. Несколько лет назад было обнаружено, что сайты, содержащие паузировавшую РНК-полимеразу II в кодирующих областях генов бета-актина и U2 мРНК, маркированы инсуляторным белком CTCF [77]. Позднее, ассоциация сайтов CTCF и

эффекта торможения РНК-полимеразы II была подтверждена в полногеномных экспериментах [78]. И наконец, недавно было обнаружено, что CTCF функционально участвует в регуляции торможения РНК-полимеразы II на гене *c-myc* [79]. Снижение внутриклеточного уровня CTCF нарушает рекрутирование фактора паузинга DSIF к сайту, содержащему паузированную РНК-полимеразу II. Подтверждение или опровержение этих данных в полногеномных экспериментах сыграет большую роль в нашем понимании механизмов регуляции транскрипции РНК-полимеразой II.

Известно, что торможение РНК-полимеразы II происходит не только вблизи промоторных областей генов. В теле генов торможение элонгирующей РНК-полимеразы II может происходить локально, вблизи сайтов сплайсинга и полиаденилирования. Было обнаружено, что инсуляторный белок CTCF вовлечен в процесс торможения РНК-полимеразы II поблизости от сайтов сплайсинга [80]. Нокдаун CTCF приводит к удалению экзонов, ассоциированных с сайтом CTCF, из состава мРНК. Интересно, что связывание CTCF с сайтами локального торможения полимеразы регулируется посредством метилирования ДНК.

ИНСУЛЯТОРЫ И АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ

Роль CTCF в альтернативном сплайсинге определяется не только влиянием на паузинг РНК-полимеразы, но и непосредственно связана с образованием CTCF-зависимых внутригенных петель хроматина. В исследовании [81] показано, что в клетках человека CTCF может формировать внутригенные петли хроматина, сближающие экзон с промотором. Эти петли определяют включение экзона в сплайсированные варианты мРНК и могут различаться в отдельных популяциях клеток. Гены, сплайсинг которых регулируется CTCF-зависимым путем, вовлечены в регуляцию сигнальных путей и клеточного ответа на стресс. Ранее в данном обзоре мы писали, что инсуляторы вовлечены в ответ на различные стрессовые воздействия. В контексте новых данных об участии CTCF в сплайсинге генов ответа на стресс интересной задачей будущих исследований является интеграция перечисленных сведений в единую схему.

ИНСУЛЯТОРЫ И ЭКСПОРТ мРНК ИЗ ЯДРА В ЦИТОПЛАЗМУ

Транспорт транскриптов из ядра является как местом проверки готовности мРНК к последующей трансляции, так и способом воздействия на скорость экспрессии генов. Известно, что связываться с белками ядерной поры могут не только активные, но и недавно репрессированные гены,

что позволяет быстро реактивировать ген в ответ на соответствующий сигнал. Эта особенность получила название транскрипционной памяти, которая является эпигенетической, так как может наследоваться в ряду поколений клеток. В недавнем исследовании [82] было обнаружено, что в клетках дрозофилы субъединица ядерной поры Nup98 связывает в геноме области, гиперчувствительные к ДНКазе I, среди которых встречаются промоторы, энхансеры и инсуляторы. Сайты связывания Nup98 колокализуются с инсуляторными белками CTCF и CP190 и обогащены консенсусными последовательностями CTCF, Su(Hw) и GAF. Данные инсуляторные белки совместно с Nup98 могут участвовать в стабилизации взаимодействия энхансера с промотором при первичной и повторной активации транскрипции, т.е. в формировании транскрипционной памяти: добавление гормона 20-гидроксиэксидизона к клеткам приводит к усилению взаимодействия инсуляторных белков с компонентами ядерной поры и одновременному Nup98-опосредованному взаимодействию промотора и энхансера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С появлением полногеномных методов исследования наши знания о функциях инсуляторов и инсуляторных белков существенно расширились: известные для них роли в регуляции работы генома больше не ограничиваются классическими “инсуляторными” функциями. Так, в последнее время термин “архитектурные белки” используется исследователями наравне либо вместо термина “инсуляторные белки”. Формирование инсуляторами петлевых структур хроматина действительно является механизмом реализации ими таких функций, как регуляция транскрипции, сплайсинг и экспорт мРНК. Тем не менее многие новые “неканонические” функции инсуляторов (такие как паузинг РНК-полимеразы II, инициация репликации, репарация ДНК) пока не могут быть полностью объяснены с позиции организации ими архитектуры генома. Интеграция этих данных в единую схему работы регуляторных элементов генома потребует дополнительной расширенной и углубленной экспериментальной работы и пластичности взглядов исследователей в отношении возможных открытий.

Данная работа была поддержана грантом Российского научного фонда № 17-74-10211.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Udvardy A., Maine E., Schedl P.* The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 185. № 2. P. 341–358.

2. *Holdridge C., Dorsett D.* Repression of hsp70 heat shock gene transcription by the suppressor of hairy-wing protein of *Drosophila melanogaster* // *Mol. Cell Biol.* 1991. V. 11. № 4. P. 1894–1900.
3. *Geyer P.K., Corces V.G.* DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein // *Genes Dev.* 1992. V. 6. № 10. P. 1865–1873.
4. *Capelson M., Corces V.G.* The ubiquitin ligase dTopors directs the nuclear organization of a chromatin insulator // *Mol. Cell.* 2005. V. 20. № 1. P. 105–116.
5. *Gerasimova T.I., Corces V.G.* Polycomb and trithorax group proteins mediate the function of a chromatin insulator // *Cell.* 1998. V. 92. № 4. P. 511–521.
6. *Gerasimova T.I., Byrd K., Corces V.G.* A chromatin insulator determines the nuclear localization of DNA // *Mol. Cell.* 2000. V. 6. № 5. P. 1025–1035.
7. *Kellum R., Schedl P.* A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay // *Mol. Cell Biol.* 1992. V. 12. P. 2424–2431.
8. *Gaszner M., Vazquez J., Schedl P.* The Zw5 protein, a component of the scs chromatin domain boundary, is able to block enhancer-promoter interaction // *Genes Dev.* 1999. V. 13. № 16. P. 2098–2107.
9. *Zhao K., Hart C.M., Laem Mli U.K.* Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32 // *Cell.* 1995. V. 81. P. 879–889.
10. *Blanton J., Gaszner M., Schedl P.* Protein:protein interactions and the pairing of boundary elements *in vivo* // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 5. P. 664–675.
11. *Yusufzai T.M., Tagami H., Nakatani, Y., Felsenfeld G.* CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species // *Mol. Cell.* 2004. V. 13. № 2. P. 291–298.
12. *Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S. et al.* Selective interactions of boundaries with upstream region of Abd-B promoter in *Drosophila* bithorax complex and role of dCTCF in this process // *NAR.* 2011. V. 39. № 8. P. 3042–3052. doi 10.1093/nar/gkq1248
13. *Splinter E., Heath H., Kooren J. et al.* CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 17. P. 2349–2354. doi 10.1101/gad.399506
14. *Majumder P., Cai H.N.* The functional analysis of insulator interactions in the *Drosophila* embryo // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 9. P. 5223–5228. doi 10.1073/pnas.0830190100
15. *Rodin S.A., Georgiev P.G.* Study of the properties of the Fab-7 insulator in *Drosophila melanogaster* // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2005. V. 404. P. 332–335.
16. *Kyrchanova O., Chetverina D., Maksimenko O.* Orientation-dependent interaction between *Drosophila* insulators is a property of this class of regulatory elements // *NAR.* 2008. V. 36. № 22. P. 7019–7028. doi 10.1093/nar/gkn781
17. *Bonchuk A., Denisov S., Georgiev P., Maksimenko O.* *Drosophila* BTB/POZ domains of “ttk group” can form multimers and selectively interact with each other // *J. Mol. Biol.* 2011. V. 412. № 3. P. 423–436. doi 10.1016/j.jmb.2011.07.052
18. *Bonchuk A., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al.* Functional role of dimerization and CP190 interacting domains of CTCF protein in *Drosophila melanogaster* // *BMC Biol.* 2015. V. 13. P. 63. doi 10.1186/s12915-015-0168-7
19. *Zolotarev N.A., Maksimenko O.G., Georgiev P.G., Bonchuk A.N.* ZAD-domain is essential for nuclear localization of insulator proteins in *Drosophila melanogaster* // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 3. P. 97–102.
20. *Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O. et al.* Architectural proteins Pita, Zw5, and ZIPIC contain homodimerization domain and support specific long-range interactions in *Drosophila* // *NAR.* 2016. V. 44. № 15. P. 7228–7241. doi 10.1093/nar/gkw371
21. *Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F. et al.* Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions // *Nature.* 2012. V. 485. № 7398. P. 376–380. doi 10.1038/nature11082
22. *Sexton T., Yaffe E., Kenigsberg E. et al.* Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome // *Cell.* 2012. V. 148. № 3. P. 458–472. doi 10.1016/j.cell.2012.01.010
23. *Wang Q., Sun Q., Czajkowsky D.M., Shao Z.* Sub-kb Hi-C in *D. melanogaster* reveals conserved characteristics of TADs between insect and mammalian cells // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 188. doi 10.1038/s41467-017-02526-9
24. *Pope B.D., Ryba T., Dileep V. et al.* Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation // *Nature.* 2014. V. 515. № 7527. P. 402–405. doi 10.1038/nature13986
25. *Nora E.P., Lajoie B.R., Schulz E.G. et al.* Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre // *Nature.* 2012. V. 485. № 7398. P. 381–385. doi 10.1038/nature11049
26. *Lupianez D.G., Kraft K., Heinrich V. et al.* Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions // *Cell.* 2015. V. 161. № 5. P. 1012–1025. doi 10.1016/j.cell.2015.04.004
27. *Narendra V., Rocha P.P., An D. et al.* CTCF establishes discrete functional chromatin domains at the Hox clusters during differentiation // *Science.* 2015. V. 347. № 6225. P. 1017–1021. doi 10.1126/science.1262088
28. *Parelho V., Hadjur S., Spivakov M. et al.* Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms // *Cell.* 2008. V. 132. № 3. P. 422–433. doi 10.1016/j.cell.2008.01.011
29. *Wendt K.S., Yoshida K., Itoh T. et al.* Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor // *Nature.* 2008. V. 451. № 7180. P. 796–801. doi 10.1038/nature06634
30. *Zuin J., Dixon J.R., van der Reijden M.I. et al.* Cohesin and CTCF differentially affect chromatin architecture and gene expression in human cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 3. P. 996–1001. doi 10.1073/pnas.1317788111
31. *Rao S.S., Huntley M.H., Durand N.C. et al.* A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping // *Cell.* 2014. V. 159. № 7. P. 1665–1680. doi 10.1016/j.cell.2014.11.021
32. *Sanborn A.L., Rao S.S., Huang S.C. et al.* Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 47. P. 6456–6465. doi 10.1073/pnas.1518552112

33. Tang Z., Luo O.J., Li X. et al. CTCF-Mediated human 3D genome architecture reveals chromatin topology for transcription // *Cell*. 2015. V. 163. № 7. P. 1611–1627. doi 10.1016/j.cell.2015.11.024
34. Vietri Rudan M., Barrington C., Henderson S. et al. Comparative Hi-C reveals that CTCF underlies evolution of chromosomal domain architecture // *Cell Rep*. 2015. V. 10. № 8. P. 1297–1309. doi 10.1016/j.celrep.2015.02.004
35. Gómez-Marín C., Tena J.J., Acemel R.D. et al. Evolutionary comparison reveals that diverging CTCF sites are signatures of ancestral topological associating domains borders // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 24. P. 7542–7547. doi 10.1073/pnas.1505463112
36. Hou C., Li L., Qin Z.S., Corces V.G. Gene density, transcription, and insulators contribute to the partition of the *Drosophila* genome into physical domains // *Mol. Cell*. 2012. V. 48. № 3. P. 471–784. doi 10.1016/j.molcel.2012.08.031
37. Ramírez F., Bhardwaj V., Arrigoni L. et al. High-resolution TADs reveal DNA sequences underlying genome organization in flies // *Nat. Commun*. 2018. V. 9. № 1. P. 189. doi 10.1038/s41467-017-02525-w
38. Rowley M.J., Nichols M.H., Lyu X. et al. Evolutionarily conserved principles predict 3D chromatin organization // *Mol. Cell*. 2017. V. 67. № 5. P. 837–852. doi 10.1016/j.molcel.2017.07.022
39. Ulianov S.V., Khrameeva E.E., Gavrilov A.A. et al. Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains // *Genome Res*. 2016. V. 26. № 1. P. 70–84. doi 10.1101/gr.196006.115
40. Filion G.J., van Bemmell J.G., Braunschweig U. et al. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells // *Cell*. 2010. V. 143. № 2. P. 212–224. doi 10.1016/j.cell.2010.09.009
41. Van Bortle K., Nichols M.H., Li L. et al. Insulator function and topological domain border strength scale with architectural protein occupancy // *Genome Biol*. 2014. V. 15. № 6. P. 82. doi 10.1186/gb-2014-15-5-r82
42. Phillips-Cremins J.E., Sauria M.E., Sanyal A. et al. Architectural protein subclasses shape 3D organization of genomes during lineage commitment // *Cell*. 2013. V. 153. № 6. P. 1281–1295. doi 10.1016/j.cell.2013.04.053
43. Junier I., Dale R.K., Hou C. et al. CTCF-mediated transcriptional regulation through cell type-specific chromosome organization in the β -globin locus // *NAR*. 2012. V. 40. № 16. P. 7718–7727. doi 10.1093/nar/gks536
44. Hou C., Dale R., Dean A. Cell type specificity of chromatin organization mediated by CTCF and cohesion // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 8. P. 3651–3656. doi 10.1073/pnas.0912087107
45. Tang Z., Luo O.J., Li X. et al. CTCF-mediated human 3D genome architecture reveals chromatin topology for transcription // *Cell*. 2015. V. 163. № 7. P. 1611–1627. doi 10.1016/j.cell.2015.11.024
46. Muravyova E., Golovnin A., Gracheva E. et al. Loss of insulator activity by paired Su(Hw) chromatin insulators // *Science*. 2001. V. 291. № 5503. P. 495–498. doi 10.1126/science.291.5503.495
47. Cai H.N., Shen P. Effects of cis arrangement of chromatin insulators on enhancer-blocking activity // *Science*. 2001. V. 291. № 5503. P. 493–495. doi 10.1126/science.291.5503.493
48. Beishline K., Vladimirova O., Tutton S. et al. CTCF driven TERRA transcription facilitates completion of telomere DNA replication // *Nat. Commun*. 2017. V. 8. № 1. P. 2114. doi 10.1038/s41467-017-02212-w
49. Engel N., Thorvaldsen J.L., Bartolomei M.S. CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus // *Hum. Mol. Genet*. 2006. V. 15. № 19. P. 2945–2954. doi 10.1093/hmg/ddl237
50. Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al. Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression // *NAR*. 2017. V. 45. № 21. P. 12285–12300. doi 10.1093/nar/gkx840
51. Soshnev A.A., Baxley R.M., Manak J.R. et al. The insulator protein suppressor of Hairy-wing is an essential transcriptional repressor in the *Drosophila* ovary // *Development*. 2013. V. 140. № 17. P. 3613–3623. doi 10.1242/dev.094953
52. Sigrist C.J., Pirrotta V. Chromatin insulator elements block the silencing of a target gene by the *Drosophila* polycomb response element (PRE) but allow trans interactions between PREs on different chromosomes // *Genetics*. 1997. V. 147. № 1. P. 209–221.
53. Comet I., Savitskaya E., Schuettengruber B. et al. PRE-mediated bypass of two Su(Hw) insulators targets PcG proteins to a downstream promoter // *Dev. Cell*. 2006. V. 11. № 1. P. 117–124. doi 10.1016/j.devcel.2006.05.009
54. Li H.B., Ohno K., Gui H., Pirrotta V. Insulators target active genes to transcription factories and polycomb-repressed genes to polycomb bodies // *PLoS Genet*. 2013. V. 9. № 4. e1003436. doi 10.1371/journal.pgen.1003436
55. Li L., Lyu X., Hou C. et al. Widespread rearrangement of 3D chromatin organization underlies polycomb-mediated stress-induced silencing // *Mol. Cell*. 2015. V. 58. № 2. P. 216–231. doi 10.1016/j.molcel.2015.02.023
56. Schoborg T., Rickels R., Barrios J., Labrador M. Chromatin insulator bodies are nuclear structures that form in response to osmotic stress and cell death // *J. Cell Biol*. 2013. V. 202. № 2. P. 261–276. doi 10.1083/jcb.201304181
57. Golovnin A., Melnikova L., Volkov I. et al. “Insulator bodies” are aggregates of proteins but not of insulators // *EMBO Rep*. 2008. V. 9. № 5. P. 440–445. doi 10.1038/embor.2008.32
58. Lake R.J., Boetefuer E.L., Won K.J., Fan H.Y. The CSB chromatin remodeler and CTCF architectural protein cooperate in response to oxidative stress // *NAR*. 2016. V. 44. № 5. P. 2125–2135. doi 10.1093/nar/gkv1219
59. Peña-Hernández R., Marques M., Hilmi K. et al. Genome-wide targeting of the epigenetic regulatory protein CTCF to gene promoters by the transcription factor TFII-I // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 7. P. 677–686. doi 10.1073/pnas.1416674112

60. Han D., Chen Q., Shi J. et al. CTCF participates in DNA damage response via poly(ADP-ribosylation) // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 43530. doi 10.1038/srep43530
61. Natale F., Rapp A., Yu W. et al. Identification of the elementary structural units of the DNA damage response // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15760. doi 10.1038/ncomms15760
62. Lang F., Li X., Zheng W. et al. CTCF prevents genomic instability by promoting homologous recombination-directed DNA double-strand break repair // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 41. P. 10912–10917. doi 10.1073/pnas.1704076114
63. Hilmi K., Jangal M., Marques M. et al. CTCF facilitates DNA double-strand break repair by enhancing homologous recombination repair // *Sci. Adv.* 2017. V. 3. № 5. e1601898. doi 10.1126/sciadv.1601898
64. Docquier F., Kita G.X., Farrar D. et al. Decreased poly(ADP-ribosylation) of CTCF, a transcription factor, is associated with breast cancer phenotype and cell proliferation // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. № 18. P. 5762–5871. doi 10.1158/1078-0432.CCR-09-0329
65. MacAlpine H.K., Gordân R., Powell S.K. et al. Drosophila ORC localizes to open chromatin and marks sites of cohesin complex loading // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 2. P. 201–211. doi 10.1101/gr.097873.109
66. Kim J.C., Orr-Weaver T.L. Analysis of a Drosophila amplicon in follicle cells highlights the diversity of metazoan replication origins // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 40. P. 16681–16686. doi 10.1073/pnas.1114209108
67. MacAlpine D.M., Rodríguez H.K., Bell S.P. Coordination of replication and transcription along a Drosophila chromosome // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 24. P. 3094–3105. doi 10.1101/gad.1246404
68. Balasov M., Huijbrechts R.P., Chesnokov I. Role of the Orc6 protein in origin recognition complex-dependent DNA binding and replication in *Drosophila melanogaster* // *Mol. Cell Biol.* 2007. V. 27. № 8. P. 3143–3153. doi 10.1128/MCB.02382-06
69. Deal R.B., Henikoff J.G., Henikoff S. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones // *Science.* 2010. V. 328. № 5982. P. 1161–1164. doi 10.1126/science.1186777
70. Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K. et al. Insulator protein Su(Hw) recruits SAGA and Brahma complexes and constitutes part of Origin Recognition Complex-binding sites in the Drosophila genome // *NAR.* 2013. V. 41. № 11. P. 5717–5730. doi 10.1093/nar/gkt297
71. Mazina M.Iu., Vorob'eva N.E., Krasnov A.N. The ability of the Su(Hw) protein to create a platform for ORC binding does not depend on the type of surrounding chromatin // *Tsitologiya.* 2013. V. 55. № 4. P. 218–224.
72. Краснов А.Н., Воробьева Н.Е., Мазина М.Ю. Инсуляторный белок Su(Hw) необходим для позиционирования части ампликонов фолликулярных клеток в раннем оогенезе дрозофилы // *Докл. Акад. наук.* 2018. Т. 479. № 2. С. 228–231.
73. Kim J.C., Nordman J., Xie F. et al. Integrative analysis of gene amplification in Drosophila follicle cells: parameters of origin activation and repression // *Genes Dev.* 2011. V. 25. № 13. P. 1384–1398. doi 10.1101/gad.2043111
74. Claycomb J.M., MacAlpine D.M., Evans J.G. et al. Visualization of replication initiation and elongation in Drosophila // *J. Cell Biol.* 2002. V. 159. № 2. P. 225–236. doi 10.1083/jcb.200207046
75. Park E.A., Macalpine D.M., Orr-Weaver T.L. Drosophila follicle cell amplicons as models for metazoan DNA replication: a cyclinE mutant exhibits increased replication fork elongation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 43. P. 16739–16746. doi 10.1073/pnas.0707804104
76. Adelman K., Lis J.T. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. № 10. P. 720–731. doi 10.1038/nrg3293
77. Egloff S., Al-Rawaf H., O'Reilly D., Murphy S. Chromatin structure is implicated in “late” elongation checkpoints on the U2 snRNA and beta-actin genes // *Mol. Cell Biol.* 2009. V. 29. № 14. P. 4002–4013. doi 10.1128/MCB.00189-09
78. Paredes S.H., Melgar M.F., Sethupathy P. Promoter-proximal CCCTC-factor binding is associated with an increase in the transcriptional pausing index // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 12. P. 1485–1487. doi 10.1093/bioinformatics/bts596
79. Laitem C., Zaborowska J., Tellier M. et al. CTCF regulates NELF, DSIF and P-TEFb recruitment during transcription // *Transcription.* 2015. V. 6. № 5. P. 79–90. doi 10.1080/21541264.2015.1095269
80. Shukla S., Kavak E., Gregory M. et al. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing // *Nature.* 2011. V. 479. № 7371. P. 74–79. doi 10.1038/nature10442
81. Ruiz-Velasco M., Kumar M., Lai M.C. et al. CTCF-mediated chromatin loops between promoter and gene body regulate alternative splicing across individuals // *Cell Syst.* 2017. V. 5. № 6. P. 628–637. doi 10.1016/j.cels.2017.10.018
82. Pascual-Garcia P., Debo B., Aleman J.R. et al. Metazoan nuclear pores provide a scaffold for poised genes and mediate induced enhancer-promoter contacts // *Mol. Cell.* 2017. V. 66. № 1. P. 63–76. doi 10.1016/j.molcel.2017.02.020

Insulators Functions in the Context of Modern Whole-Genome Investigations

N. E. Vorobyeva^{a, **} and M. Yu. Mazina^{a, *}

^aInstitute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow 119334, Russia

*e-mail: magadovam@yandex.ru

**e-mail: info@genebiology.ru

Insulators are usually defined as DNA-elements with the property to defend the gene from the influence of the other regulatory elements: enhancer-blocking insulators prevent the activation of gene promoter by the enhancer, being located between them; barrier insulators remove so-called position-effect variegation, preventing the spread of heterochromatin. However, in recent years the use of whole-genome methods of analysis has led to the accumulation of information on the functions of insulator elements that go beyond the framework of canonical definitions. The proposed review summarizes the most up-to-date data on the functions of insulators in the organization of chromatin architecture, transcription of genes, as well as on non-canonical functions supplementing the generally accepted concept of insulators role in regulating genome functioning.

Keywords: insulator, TAD, transcription, replication, stress response.