

УДК 576.315.42

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЭУКАРИОТИЧЕСКОГО ГЕНОМА, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ТРАНСКРИПЦИЮ

© 2015 г. С. В. Разин^{1, 2*}, А. А. Гаврилов³, С. В. Ульянов^{1, 2}

¹Лаборатория структурно-функциональной организации хромосом, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва 119334

²Кафедра молекулярной биологии, Биологический факультет

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва 119992

³Группа пространственной организации генома, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва 119334

Поступила в редакцию
и принята к печати 24.09. 2014 г.

В обзоре рассмотрены регуляторные элементы эукариотического генома, контролирующие транскрипцию, функциональная анатомия тканеспецифичных промоторов и промоторов генов “домашнего хозяйства”, современные методы предсказания и обнаружения энхансеров, роль инсуляторов в энхансер-промоторной коммуникации и поддержании эпигенетического статуса геномного домена. Кратко обсуждается взаимосвязь топологии интерфазного хроматина и регуляции транскрипции. Особое внимание уделено новым данным, полученным в результате массивного секвенирования первичных транскриптов и полногеномного анализа профилей распределения модифицированных гистонов.

Ключевые слова: транскрипция, хроматин, пространственная организация генома, промотор, энхансер, сайленсер, инсулятор.

REGULATORY ELEMENTS OF THE EUKARYOTIC GENOME CONTROLLING TRANSCRIPTION, by S. V. Razin^{1, 2*}, A. A. Gavrilov³, S. V. Ulyanov^{1, 2} (¹Laboratory of Structural and Functional Organization of Chromosomes, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia, *e-mail: sergey.v.razin@usa.net; ²Department of Molecular Biology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; ³Group of Genome Spatial Organization, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia). In this review, we discuss regulatory elements of the eukaryotic genome that control transcription. We describe the functional anatomy of tissue specific promoters and promoters of house-keeping genes; current methodologies for prediction and identification of enhancers; the role of insulators in the enhancer-promoter communication and maintenance of the epigenetic status of genomic domains; and briefly discuss the relationship between the interphase chromatin topology and regulation of transcription. Considering these questions, we pay particular attention to the new data obtained in works on the high-throughput sequencing of primary transcripts and the genome-wide analysis of histone modifications.

Keywords: transcription, chromatin, genome spatial organization, promoter, enhancer, silencer, insulator.

DOI: 10.7868/S0026898415020123

ВВЕДЕНИЕ

Механизмы регуляции транскрипции в эукариотической клетке изучаются в течение нескольких десятилетий. Результатом этих исследований стала идентификация значительного числа различных регуляторных элементов, которые тем

или иным образом влияют на процесс транскрипции. Эти регуляторные элементы можно разделить на несколько групп. Первую группу составляют промоторы, которые располагаются непосредственно перед геном и служат местом сборки преинициаторного транскрипционного комплекса. Вторая группа представлена удаленными регу-

Принятые сокращения: BREd (downstream TFIIB recognition element) – находящийся после TATA-бокса участок связывания TFIIB; BREu (upstream TFIIB recognition element) – находящийся перед TATA-боксом участок связывания TFIIB; DPE (downstream promoter element) – нижележащий элемент промотора; DRE (DNA replication-related element) – элемент, связанный с репликацией ДНК; Inr (Initiator) – участок, в котором начинается транскрипция; LCR (Locus Control Region) – область контроля локуса; PRE (Polycomb response element) – элемент “ответа” на белки Polycomb; TBP (TATA-Binding Protein) – белок, связывающийся с TATA-боксом.

* Эл. почта: sergey.v.razin@usa.net

ляторными элементами, которые могут как активировать (энхансеры), так и подавлять (сайленсеры) транскрипцию. Наконец, существуют так называемые архитектурные элементы, которые поддерживают взаимодействия между удаленными участками генома, способствуя, как считается, созданию относительно стабильных хроматиновых петель. Наиболее известными архитектурными элементами являются инсуляторы, которые в зависимости от ряда дополнительных условий могут либо разделять функциональные домены генома, либо способствовать установлению коммуникаций между удаленными энхансерами и контролируемыми ими промоторами. Следует сказать, что контроль транскрипции у эукариот осуществляется как на уровне промоторов индивидуальных генов, так и на уровне хроматинового домена, который может быть активным либо репрессированным. В обоих случаях существенную роль играют модификации гистонов. Широкое использование полногеномных методов анализа, ставшее возможным благодаря развитию техники секвенирования нового поколения, позволило глубже понять механизмы контроля транскрипции и особенности различных регуляторных элементов. В настоящем обзоре мы проанализируем современные представления о разных типах регуляторных элементов эукариотического генома, сфокусировав особое внимание на их свойствах, выявленных с использованием полногеномных методов анализа. Предметом нашего обсуждения будут только регуляторные элементы, контролирующие работу генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II. При этом мы не будем касаться систем регуляции экспрессии генов, работающих при участии некодирующих РНК. Тема эта представляется столь обширной, что рассмотрение ее должно быть предметом отдельного обсуждения. В русскоязычной литературе недавно опубликован ряд хороших обзоров по данной проблеме [1–3].

ПРОМОТОРЫ

Промоторы являются предпочтительными местами посадки РНК-полимеразы II на ДНК. Канонические промоторы включают так называемый ТАТА-бокс, в качестве которого может выступать почти любая АТ-богатая последовательность, и ряд других элементов, характеризующихся присутствием определенных мотивов нуклеотидной последовательности, в том числе BREu (upstream TFIIB recognition element, находящийся перед ТАТА-боксом участок связывания TFIIB), BREd (downstream TFIIB recognition element, находящийся после ТАТА-бокса участок связывания TFIIB), Inr (Initiator, участок, в котором начинается транскрипция), DPE (downstream promoter element, нижележащий элемент промотора), DRE (DNA replication-related element, связанный с ре-

пликацией ДНК элемент) [4, 5]. С ТАТА-боксом связывается ТВР (ТАТА-Binding Protein, связывающийся с ТАТА-боксом белок), вокруг которого собираются все остальные компоненты преинициаторного комплекса РНК-полимеразы II [4, 6]. Плавление ДНК и формирование открытого комплекса РНК-полимеразы II происходит на некотором расстоянии от промотора в Inr (Initiator) элементе. Значительное число эукариотических промоторов не имеет выраженного ТАТА-бокса. Для привлечения ТВР к таким промоторам требуются дополнительные факторы транскрипции, наиболее известный из которых – универсальный фактор SP1 – связывается с GC-богатыми участками ДНК [4]. Не содержащие ТАТА-бокса промоторы обычно располагаются в CpG-островках, которые представляют собой относительно короткие (500–1000 т.п.н.) GC-богатые последовательности с соотношением CpG- и GpC-динуклеотидов близким к единице. В остальной части генома у организмов, имеющих CpG-метилирование, соотношение CpG/GpC составляет ~0.2. Это связано с тем, что 5-метилцитозин отличается низкой стабильностью и сравнительно легко превращается в тимин. Расположенные в CpG-островках промоторы контролируют, как правило, работу генов “домашнего хозяйства”, которые экспрессируются во всех типах клеток [7]. Для промоторов, ассоциированных с CpG-островками, характерно присутствие ряда близко расположенных альтернативных точек старта транскрипции [8, 9]. Это связано с присутствием в них свободного от нуклеосомы участка. В промоторах тканеспецифичных генов, расположенных вне CpG-островков, такого участка, как правило, нет. Вместо этого промоторы содержат слабо связанную (легко удаляемую) нуклеосому, которая вытесняется в момент сборки преинициаторного комплекса РНК-полимеразы [10, 11]. Промоторы, не ассоциированные с CpG-островками, характеризуются жестко детерминированным стартом транскрипции [8, 9]. По-видимому, позиция старта транскрипции задается в этом случае расположением ТАТА-бокса и Inr-элемента [12]. В последние годы стало очевидным, что разделение на два класса (ассоциированные и неассоциированные с CpG-островками) не в полной мере отражает все многообразие промоторов. Было предложено классифицировать промоторы по наличию фиксированного, либо ряда альтернативных стартов транскрипции, а также на основании комбинаторики присутствующих функциональных элементов (ТАТА-бокс, Inr-элемент, DRE и другие). Этот подход позволил идентифицировать три класса промоторов, направляющих транскрипцию тканеспецифичных генов, генов домашнего хозяйства и генов, экспрессия которых регулируется по ходу развития [13]. Первая группа фактически идентична хорошо известным

промоторам, локализованным вне CpG-островков. В состав этих промоторов входят выраженные TATA-боксы и Inr-элемент. Для второй группы характерно присутствие DRE. Промоторы третьей группы содержат Inr-элемент при отсутствии TATA-боксов. В этих промоторах также могут присутствовать DPE. Каждая из перечисленных групп внутренне гетерогенна. Используя другие комбинации параметров, можно различить 10 классов промоторов [14].

В геномах человека и млекопитающих животных достаточно много близко расположенных генов, транскрипция которых контролируется двунаправленными промоторами [15–18]. По приблизительным оценкам ~10% генов человека организовано в пары и транскрибируется с двунаправленных промоторов [17]. Такие промоторы обычно ассоциированы с CpG-островками [16]. Остальные 90% промоторов традиционно считали однонаправленными. Однако выполненные в последние годы работы по массивированному секвенированию первичных транскриптов показали, что с абсолютного большинства промоторов транскрипция инициируется в обоих направлениях [19–21]. Транскрипция, которая осуществляется в направлении, противоположном направлению транскрипции структурного гена, обычно прерывается на расстоянии одной–двух нуклеосом от промотора, в результате чего образуется пул коротких транскриптов. Короткие транскрипты синтезируются и в направлении транскрипции структурного гена. Однонаправленный синтез протяженных транскриптов структурных генов, скорее всего, обеспечивается не собственно промотором, а особым механизмом, блокирующим “процессивную” транскрипцию в противоположную геномную сторону. В работе этого механизма определенную роль играет образование петли между промотором и областью, в которой происходит терминация транскрипции [22]. Функциональная роль коротких двунаправленных транскриптов, синтез которых инициируется на большинстве промоторов, неясна. Некоторые ученые считают, что эти транскрипты вообще не играют никакой роли, а их синтез обусловлен “несовершенством” эукариотических промоторов. Однако некоторые результаты косвенно указывают на то, что эта РНК участвует в регуляции активности промотора. Показано, что подавление уровня экспрессии коротких антисмысловых РНК в области, расположенной перед промотором, влияет на активность промотора [23, 24].

Во многих случаях транскрипция в направлении, противоположном направлению структурного гена, не прерывается, и в результате этого синтезируются длинные некодирующие РНК [25, 26].

Для промоторов характерна особая организация в хроматиновой фибрилле. Как уже говори-

лось, многие промоторы содержат либо свободный от нуклеосом участок, либо участок с нестабильной нуклеосомой, в состав которой входят одновременно варианты гистонов H2A.Z и H3.3 [27]. Фланкирующие данный участок нуклеосомы содержат вариант гистона H2A.Z. Кроме того, нуклеосомы, расположенные в промоторных областях генов, характеризуются высоким уровнем триметилирования четвертого остатка лизина в гистоне H3 (H3K4-met3) [28] и ацетиляции гистонов H3 и H4 [29, 30]. В течение многих лет разрабатываются алгоритмы, позволяющие предсказывать позиции промоторов на основании нуклеотидной последовательности. Однако сложная комбинаторика различных элементов в составе промоторов и вырожденность консенсусов не позволили создать достаточно надежный инструмент для предсказания позиций промоторов. Намного полезнее для решения данной задачи оказался анализ профилей модификаций гистонов. Позиции работающих промоторов можно достаточно хорошо предсказывать по одновременному присутствию триметилированного H3K4 (H3K4-met3) и ацетилированных H3K27 и H3K9 [31].

ЭНХАНСЕРЫ

Энхансеры были обнаружены в экспериментах по транзientной трансфекции в клетки конструкций, несущих репортерные гены [32, 33]. На основании результатов этих опытов энхансер можно определить как геномный элемент, способный активировать транскрипцию, направляемую широким кругом промоторов, вне зависимости от положения данного элемента по отношению к промотору. В первых работах изучали вирусные энхансеры, которые либо не проявляли тканевой специфичности, либо проявляли весьма ограниченную тканевую специфичность. Однако довольно быстро были обнаружены тканеспецифичные энхансеры [34], и в настоящее время очевидно, что большинство эукариотических энхансеров обладают тканевой специфичностью [35]. Однако необходимо отметить, что, по всей видимости, тканевая специфичность экспрессии того или иного гена не определяется свойствами только контролирующего энхансера (энхансеров) или свойствами только самого промотора. В недавно опубликованной работе Symmons и соавт. [36] показали, что репортерный трансген, состоящий из гена *lacZ* под контролем минимального β -глобинового промотора, активируется широким набором тканеспецифичных энхансеров при интеграции трансгена в хромосому на расстоянии до нескольких сотен тысяч пар нуклеотидов от ближайшего энхансера [36]. Таким образом, зона действия энхансера (так называемый регуляторный домен) распространяется на значительное расстояние вдоль ДНК и не ограничивается узкой областью,

содержащей подконтрольный промотор. Очевидно, что внутри регуляторного домена, как правило, содержатся как подконтрольные данному энхансеру промоторы, так и те, которые не могут им активироваться. Таким образом, специфичность активации данным энхансером одного целевого промотора или небольшой группы функционально родственных промоторов обеспечивается неким механизмом, зависящим как от свойств энхансосомы (комплекса энхансера с факторами транскрипции), так и от характеристик промоторного комплекса. Наиболее вероятный кандидат на роль такого механизма — белок-белковые взаимодействия компонентов энхансерного и промоторного комплексов.

Не существует какой-либо консенсусной последовательности, типичной для всех или большинства энхансеров. Энхансеры представляют собой площадки для связывания транскрипционных факторов. Набор участков связывания, представленных в данном энхансере, определяет его тканевую специфичность. Механизм работы энхансеров активно изучается в течение последних 30 лет. Тем не менее, механизм этот остается неясным. Согласно традиционной точке зрения, энхансеры способствуют сборке преинициаторного комплекса РНК-полимеразы II. При этом обсуждаются различные сценарии, такие как: (1) повышение концентрации тканеспецифичных транскрипционных факторов в области промотора; (2) привлечение дополнительных компонентов (гистонацетилаз, факторов ремоделирования хроматина), способствующих реконфигурации хроматина; (3) сборка преинициаторного комплекса на энхансере с последующим переносом его на промотор; (4) стабилизация собранного на промоторе преинициаторного комплекса. Все эти модели были поставлены под сомнение результатами, показавшими, что на промоторах многих, в том числе и тканеспецифичных, генов присутствует собранный преинициаторный комплекс [37–39]. В этой связи стадией, определяющей скорость транскрипции (эффективность работы промотора), логично считать не сборку преинициаторного комплекса, а этап освобождения промотора (переход к элонгации) [39]. Соответственно, было высказано предположение о том, что именно эта стадия транскрипционного цикла регулируется энхансерами [40, 41]. Результаты полногеномного анализа профилей транскрипции показали, что большинство энхансеров представляют собой места начала синтеза двунаправленных транскриптов, получивших название энхансерной РНК (eRNA) [42–45]. Установлено, что энхансерные транскрипты важны для работы энхансеров.

Подавление транскрипции энхансерной РНК с помощью РНК-интерференции приводило к существенному снижению уровня транскрипции контролируемых данным энхансером генов [46,

47]. Вопрос о том, каковы именно функции энхансерной РНК, остается дискуссионным. Ряд результатов указывает на то, что энхансерная РНК направляет реконфигурацию хроматина в контролируемых энхансером локусах [48]. Другие данные указывают на то, что энхансерная РНК играет роль в установлении/поддержании коммуникации между энхансером и промотором [46]. Наконец, в модельных экспериментах показано, что привлечение энхансерной РНК к расположенному на плазмиде промотору существенно увеличивает активность этого промотора [49]. Этот результат показывает, что и сама энхансерная РНК может проявлять активирующий эффект.

Энхансеры могут направлять синтез не только относительно коротких (1–2 т.п.н.) двунаправленных транскриптов, но и длинных однонаправленных транскриптов, которые в ряде случаев подвергаются сплайсингу и полиаденилированию [50–52]. Функции таких транскриптов в настоящий момент не ясны.

Энхансеры могут находиться перед геном, после гена и внутри гена. При этом они часто значительно удалены (в пределах 10^6 п.н.) от промотора. Между энхансером и контролируемым им промотором могут располагаться неподконтрольные этому энхансеру гены. В этой связи чрезвычайно важным представляется вопрос о том, как устанавливается и поддерживается взаимодействие между энхансером и промотором. В настоящее время большинство исследователей отводят ключевую роль в этом процессе пространственной организации ДНК в интерфазной хромосоме. С использованием метода фиксации конформации хромосомы [53] показано, что удаленные регуляторные элементы пространственно сближены с контролируемыми ими промоторами [41, 54–58]. Это становится возможным благодаря выпетливанию разделяющего их фрагмента ДНК. Конфигурация хромосомы, обеспечивающая приближение энхансеров к промоторам, поддерживается с помощью различных взаимодействий. Важную роль в поддержании конфигурации играет когезин [59–61]. Связанные с энхансерами и промоторами факторы транскрипции и “коммуникаторные” белки также участвуют в поддержании взаимодействий между этими регуляторными элементами [57, 62–64].

Очень часто несколько энхансеров контролируют работу одного гена (либо группы функционально связанных генов). Было высказано предположение, что в этом случае все энхансеры и контролируемые ими промоторы организованы в единый активаторный комплекс (active chromatin hub, активаторный хроматиновый блок) [54, 56]. Хотя данная модель в настоящий момент весьма популярна, до сих пор не получено экспериментальных данных, прямо подтверждающих факт

существования упомянутых активаторных комплексов. Дело в том, что метод фиксации конформации хромосомы и производные процедуры [65] в принципе не позволяют ответить на вопрос о существовании комплексов, включающих более двух регуляторных элементов генома [66]. С помощью других экспериментальных подходов также не подтверждено существование мультикомпонентных комплексов регуляторных элементов [66].

Хотя тот факт, что удаленные энхансеры и промоторы находятся рядом в трехмерном пространстве клеточного ядра (в тех клетках, где энхансеры активны) не вызывает сомнений, механизмы перемещения энхансера к промотору по ходу клеточной дифференцировки, либо в ответ на внешние стимулы, активирующие транскрипцию определенных групп генов, остаются неясными. Более того, в ряде случаев установлено, что пространственная сближенность тканеспецифичных энхансеров и подконтрольных им промоторов наблюдается и в тех клетках, в которых эти промоторы в данный момент не активны, однако могут активироваться внешними стимулами [67–69].

Полногеномный анализ профилей модификаций гистонов показал, что для энхансеров характерно монометилирование гистона H3 по позиции K4 [70]. Эта модификация присутствует и в активных, и в неактивных энхансерах. Активные энхансеры можно отличить по присутствию белка p300 и гистона H3, ацетилованного по позиции K27 [71, 72]. В стволовых клетках неработающие энхансеры, которые будут активированы далее по ходу развития, содержат гистон H3, монометилированный по позиции K4 и триметилированный по позиции K27 [71, 73, 74]. Таким образом, анализ профилей модификаций гистонов позволяет не только идентифицировать энхансеры, но и сказать, работают ли они в клетках данного типа [72]. Достоверность предсказаний существенно повышается, если учесть другие параметры (присутствие участков гиперчувствительности к ДНКазе I и кластеризованных участков связывания транскрипционных факторов, синтез энхансерной РНК и т.д.) [75]. Общее число энхансеров, предсказанных с помощью данных методов, составляет ~400 000 в геноме человека [76], ~50 000–100 000 в геноме дрозофилы [77] и ~2300 в геноме нематоды *Caenorhabditis elegans* [78]. Если учесть, что общее число генов в геноме человека равно ~25 000, то легко подсчитать, что экспрессия каждого гена контролируется в среднем 10–20 энхансерами.

Помимо обычных энхансеров существуют кластеры энхансеров, к числу которых можно отнести области контроля локуса (Locus Control Region, LCR) и так называемые суперэнхансеры. Наиболее хорошо изучены LCR локуса доменов β -глобиновых генов позвоночных [79, 80]. Эти регуляторные элементы представляют собой бло-

ки из нескольких энхансеров. 5'-конец β -глобиновых LCR маркирован CTCF-зависимым инсулятором. В отличие от обычных энхансеров LCR способен создавать автономный домен в эктопических позициях [81]. Соответственно, экспрессия контролируемых LCR трансгенов не подвержена позиционным эффектам [81, 82]. Сначала считалось, что LCR контролирует хроматиновый статус доменов β -глобиновых генов в обычной геномной позиции [83]. Однако направленная делеция отдельных блоков LCR, равно как и всего LCR домена β -глобиновых генов мыши, не привела к изменению хроматинового статуса домена [84, 85]. В эритроидных клетках с делецией LCR домен β -глобиновых генов сохранял потенциально активную (предпочтительно чувствительную к ДНКазе I) конфигурацию, хотя уровень транскрипции глобиновых генов падал практически до нуля [84]. Регуляторные элементы, способные создавать автономный домен в эктопических позициях, т.е. сходные с LCR доменов β -глобиновых генов, обнаружены и в других участках генома у различных организмов [79, 86–90]. Тем не менее, следует сказать, что в большинстве охарактеризованных геномных доменов нет LCR.

Термин “суперэнхансеры” был предложен сравнительно недавно для обозначения особой группы энхансеров, которые контролируют работу генов, определяющих основные свойства клеток [91, 92]. Суперэнхансеры, более протяженные, чем обычные энхансеры, содержат множественные участки связывания ключевых факторов транскрипции, определяющих тип клеточной дифференцировки. В эмбриональных стволовых клетках с суперэнхансерами связываются факторы Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 и Esrrb. Также для суперэнхансеров характерно связывание Медиатора [91]. В дифференцирующихся клетках активируются суперэнхансеры, связывающие “мастер-регуляторы” транскрипции генов, определяющих тип дифференцировки (PU.1 в предшественниках В-клеток, MyoD в мышечных клетках, C/EBP α в макрофагах) [91, 92].

САЙЛЕНСЕРЫ

Сайленсеры – наименее определенная группа регуляторных элементов. Исходно сайленсером считали элемент, проявляющий активность, противоположную активности энхансера [93]. Сейчас ясно, что механизмы работы энхансеров и известных сайленсеров существенно различаются. Энхансеры работают в тесной кооперации с промоторами. Как говорилось выше, для энхансера необходимо, чтобы он был пространственно сближен с промотором. Сайленсеры же работают на уровне реконфигурации хроматина. Так, сайленсерами обычно называют PRE-элементы (Polycomb response element), инициирующие сборку ре-

прессорных комплексов Polycomb [94–96]. Понятно, что в данном случае речь идет о долговременной репрессии и эпигенетической “памяти”, поэтому PRE-элементы едва ли можно рассматривать как элементы, активность которых противоположна активности энхансеров. Данному определению лучше соответствуют участки связывания специфических в отношении нуклеотидной последовательности белков, например ZF транскрипционных факторов VTB-ZF и CRAB, которые привлекают корепрессоры [97–100], в том числе CAP1 [101], индуцирующие формирование неактивного хроматина [102]. В этом процессе важную роль играют гистондеацетилазы, которые рекрутируются корепрессорами [103–105]. В противоположность белкам группы Polycomb, которые полностью выключают транскрипцию, действие корепрессоров не столь однозначно. В ряде случаев они привлекаются к местам активной транскрипции, где, как предполагается, осуществляют тонкую регуляцию уровня транскрипции [97].

ИНСУЛЯТОРЫ

Первые инсуляторы были обнаружены в локусе генов теплового шока дрозофилы [106, 107]. Инсуляторы, согласно первоначальному определению, обладают двумя активностями: (1) способностью прерывать коммуникацию между промотором и энхансером, находясь между ними (активность, блокирующая энхансер), и (2) способностью препятствовать распространению гетерохроматина (барьерная активность). У позвоночных животных идентифицирован один белок, который связывается с инсуляторами и необходим для проявления блокирующей энхансер активности. Это многофункциональный фактор транскрипции CTCF [108]. Наряду с CTCF в работе инсуляторов участвует когезин [109, 110]. У дрозофилы идентифицировано несколько инсуляторных белков, которые связываются с разными группами инсуляторов.

Существенно, что все эти белки привлекают к инсуляторам белок CP190 [111–113], необходимый для работы инсулятора [114]. В чем именно состоит функция CP190 – не вполне ясно. Существующие данные позволяют связать этот белок с формированием свободных от нуклеосом участков [115] и локальной декомпактизацией хроматина [116]. У позвоночных животных аналога CP190 не выявлено.

Вопрос о том, как именно инсуляторы препятствуют установлению коммуникации между энхансером и промотором, остается открытым. Согласно одной из моделей, инсулятор играет роль своеобразной ловушки, с которой связывается энхансер, в силу чего исключается возможность образования комплекса между энхансером и расположенным далее промотором [117]. В этой связи уместно напомнить, что изученные инсулято-

ры имеют много общего с промоторами [118]. Существуют и другие модели, основанные на способности инсуляторов взаимодействовать друг с другом, организуя геном в топологически замкнутые домены [119–122].

В последние годы стало очевидным, что основная функция инсуляторов состоит в поддержании трехмерной организации генома [123]. У позвоночных животных в этом процессе ключевую роль играют CTCF и когезин [124]. В зависимости от геномного контекста инсуляторы могут как препятствовать, так и способствовать установлению коммуникации между удаленными геномными элементами [125–128]. Инсуляторы также участвуют в привлечении генов к транскрипционным фабрикам и репрессорным компартаментам (тельцам Polycomb) [129]. В свете всех этих наблюдений закономерным представляется вопрос о том, насколько название этих геномных элементов отражает их реальные функции [130].

Барьерная функция инсуляторов состоит в остановке распространения гетерохроматина. Соответственно, фланкированные инсуляторами трансгены оказываются защищенными от позиционных эффектов. Уровень их экспрессии не зависит от места интеграции в геном. Не все инсуляторы обладают одновременно энхансерблокирующей и барьерной функциями. Эти функции обеспечиваются разными белковыми факторами [108, 131], сайты связывания которых могут быть как сгруппированы (полноценные инсуляторы), так и разнесены в отдельные элементы (раздельные энхансерблокирующие и барьерные элементы). В течение многих лет классической моделью для изучения инсуляторов позвоночных животных служит инсулятор, расположенный перед LCR β-глобиновых генов кур [132, 133]. Показано, что в этом инсуляторе блокирующая энхансер функция обеспечивается фактором CTCF [108], тогда как барьерная – факторами VEZF1 [134] и USF1/USF2 [135]. Функции этих факторов различны. USF1/USF2 привлекают комплексы ремоделирования хроматина и ферментные комплексы, осуществляющие модификации гистонов [135, 136], тогда как VEZF1 препятствует метилированию расположенных рядом с инсулятором нуклеотидных последовательностей [134]. В течение ряда лет считалось, что инсулятор создает некое пассивное препятствие на пути распространения гетерохроматина. Таким препятствием может быть свободный от нуклеосом участок, присутствующий в инсуляторах. Кроме того, ограничивать распространение гетерохроматина могло бы привлечение к инсуляторам супрессоров гистонметилтрансфераз [137, 138]. В настоящее время стало понятно, что инсулятор – это скорее активный, нежели пассивный элемент. В области расположения инсулятора создается локальный активный хроматиновый домен, характеризующийся высо-

кими уровнями ацетилирования гистонов, триметилированием H3 по позиции K4, убиквитинированием H2B и присутствием ацетилированного варианта гистона H2A.Z [139–142]. Сталкиваясь с этим активным доменом, волна распространения гетерохроматина обрывается. По спектру модификаций гистонов инсулятор домена β -глобиновых генов напоминает промоторы. Однако с этим инсулятором не связывается РНК-полимераза [141], и он не проявляет промоторной активности в экспериментах по трансфекции конструкций, несущих репортерный ген [132]. Следует отметить, что инсуляторы, обладающие барьерной функцией, но не способные блокировать действие энхансера, найдены также и в клетках дрожжей [143]. С этими инсуляторами связываются различные белки, главные из которых TFIIIC, Rap1 и Reb1 (в *Saccharomyces cerevisiae*; в *Schizosaccharomyces pombe* присутствуют только TFIIIC-зависимые инсуляторы).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что эукариотический геном содержит “разорванные” гены, которые собираются только на уровне РНК. Для этого существует достаточно сложный и энергозатратный механизм сплайсинга. К преимуществам интронированных генов относится возможность собирать различные кодирующие последовательности посредством альтернативного сплайсинга. По-видимому, это достаточно весомое преимущество, поскольку интронированные гены возникли и сохранились в эволюции. С регуляторными последовательностями, контролирующими экспрессию генов высших эукариот, произошло примерно то же самое, что и с кодирующими последовательностями. Они оказались “разорванными”, т.е. разнесенными на молекуле ДНК. Функциональный регуляторный модуль собирается посредством пространственного сближения удаленных элементов. Разделение регуляторных модулей на ряд разнесенных блоков сделало актуальным разграничение мишеней этих регуляторных модулей. Сборка функциональных регуляторных модулей на уровне пространственного сближения удаленных регуляторных элементов стала возможной благодаря возникновению архитектурных элементов, поддерживающих функциональнозависимую пространственную организацию генома. Задачи по сближению регуляторных элементов и разграничению “своих” и “чужих” мишеней выполняют инсуляторы, которые организуют интерфазный геном в различные петли. Данные элементы характерны именно для высших эукариот, они являются неотъемлемой частью системы регуляции транскрипции у этих организмов.

Если учесть, что на один ген в среднем приходится 10–20 энхансеров, то легко прийти к заключению, что комбинаторика энхансеров и промотора (или промоторов) будет существенно рас-

ширять функциональный потенциал регуляторной системы, обеспечивая возможность сборки большого числа альтернативных регуляторных модулей. Изучение таких модулей и их значения для контроля дифференциальной экспрессии генов в ходе дифференцировки и в условиях изменения внешней среды, в том числе при различных стрессах, представляется одной из важных задач современной молекулярной биологии.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00022)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гвоздев В.А. 2013. Регуляторные “короткие” РНК. *Биохимия*. **78**, 733–734.
2. Рогаев Е.И., Боринская С.А., Исламгулов Д.В., Григоренко А.П. 2008. МикроРНК человека в норме и патологии. *Молекуляр. биология*. **42**, 751–764.
3. Шатский А.С., Гвоздев В.А. 2013. Формирование гетерохроматина и транскрипция в связи с транснактивацией генов и их пространственной организацией в ядре. *Биохимия*. **78**, 784–794.
4. Smale S.T., Kadonaga J.T. 2003. The RNA polymerase II core promoter. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 449–479.
5. Juven-Gershon T., Kadonaga J.T. 2010. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev. Biol.* **339**, 225–229.
6. Sandelin A., Carninci P., Lenhard B., Ponjavic J., Hayashizaki Y., Hume D.A. 2007. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 424–436.
7. Saxonov S., Berg P., Brutlag D.L. 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 1412–1417.
8. Kawaji H., Frith M.C., Katayama S., Sandelin A., Kai C., Kawai J., Carninci P., Hayashizaki Y. 2006. Dynamic usage of transcription start sites within core promoters. *Genome Biol.* **7**, R118.
9. Carninci P., Sandelin A., Lenhard B., Katayama S., Shimokawa K., Ponjavic J., Semple C.A., Taylor M.S., Engstrom P.G., Frith M.C., Forrest A.R., Alkema W.B., Tan S.L., Plessy C., Kodzius R., Ravasi T., Kasukawa T., Fukuda S., Kanamori-Katayama M., Kitazume Y., Kawaji H., Kai C., Nakamura M., Konno H., Nakano K., Mottagui-Tabar S., Arner P., Chesi A., Gustinich S., Persichetti F., Suzuki H., Grimmond S.M., Wells C.A., Orlando V., Wahlestedt C., Liu E.T., Harbers M., Kawai J., Bajic V.B., Hume D.A., Hayashizaki Y. 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat. Genet.* **38**, 626–635.
10. Venters B.J., Pugh B.F. 2009. A canonical promoter organization of the transcription machinery and its regulators in the *Saccharomyces* genome. *Genome Res.* **19**, 360–371.
11. Workman J.L. 2006. Nucleosome displacement in transcription. *Genes Dev.* **20**, 2009–2017.
12. Ponjavic J., Lenhard B., Kai C., Kawai J., Carninci P., Hayashizaki Y., Sandelin A. 2006. Transcriptional and

- structural impact of TATA-initiation site spacing in mammalian core promoters. *Genome Biol.* **7**, R78.
13. Lenhard B., Sandelin A., Carninci P. 2012. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 233–245.
 14. Gagniuc P., Ionescu-Tirgoviste C. 2012. Eukaryotic genomes may exhibit up to 10 generic classes of gene promoters. *BMC Genomics.* **13**, 512.
 15. Koyanagi K.O., Hagiwara M., Itoh T., Gojobori T., Imanishi T. 2005. Comparative genomics of bidirectional gene pairs and its implications for the evolution of a transcriptional regulation system. *Gene.* **353**, 169–176.
 16. Takai D., Jones P.A. 2004. Origins of bidirectional promoters: computational analyses of intergenic distance in the human genome. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 463–467.
 17. Trinklein N.D., Aldred S.F., Hartman S.J., Schroeder D.I., Otilar R.P., Myers R.M. 2004. An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res.* **14**, 62–66.
 18. Орехова А.С., Рубцов П.М. 2013. Двухнаправленные промоторы в геноме млекопитающих. *Биохимия.* **78**, 442–450.
 19. Seila A.C., Calabrese J.M., Levine S.S., Yeo G.W., Rahl P.B., Flynn R.A., Young R.A., Sharp P.A. 2008. Divergent transcription from active promoters. *Science.* **322**, 1849–1851.
 20. Taft R.J., Glazov E.A., Cloonan N., Simons C., Stephen S., Faulkner G.J., Lassmann T., Forrest A.R., Grimmond S.M., Schroeder K., Irvine K., Arakawa T., Nakamura M., Kubosaki A., Hayashida K., Kawazu C., Murata M., Nishiyori H., Fukuda S., Kawai J., Daub C.O., Hume D.A., Suzuki H., Orlando V., Carninci P., Hayashizaki Y., Mattick J.S. 2009. Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals. *Nat. Genet.* **41**, 572–578.
 21. Core L.J., Waterfall J.J., Lis J.T. 2008. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science.* **322**, 1845–1848.
 22. Randise-Hinchliff C.E., Brickner J.H. 2012. A new direction for gene looping. *Dev. Cell.* **23**, 919–921.
 23. Han J., Kim D., Morris K.V. 2007. Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 12422–12427.
 24. Tomikawa J., Shimokawa H., Uesaka M., Yamamoto N., Mori Y., Tsukamura H., Maeda K., Imamura T. 2011. Single-stranded noncoding RNAs mediate local epigenetic alterations at gene promoters in rat cell lines. *J. Biol. Chem.* **286**, 34788–34799.
 25. Lepoivre C., Belhocine M., Bergon A., Griffon A., Yammine M., Vanhille L., Zacarias-Cabeza J., Garibal M.A., Koch F., Maqbool M.A., Fenouil R., Lloriod B., Holota H., Gut M., Gut I., Imbert J., Andrau J.C., Puthier D., Spicuglia S. 2013. Divergent transcription is associated with promoters of transcriptional regulators. *BMC Genomics.* **14**, 914.
 26. Sigova A.A., Mullen A.C., Molinie B., Gupta S., Orlando D.A., Guenther M.G., Almada A.E., Lin C., Sharp P.A., Giallourakis C.C., Young R.A. 2013. Divergent transcription of long noncoding RNA/mRNA gene pairs in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**, 2876–2881.
 27. Soboleva T.A., Nekrasov M., Ryan D.P., Tremethick D.J. 2014. Histone variants at the transcription start site. *Trends Genet.* **30**, 199–209.
 28. Schneider R., Bannister A.J., Myers F.A., Thorne A.W., Crane-Robinson C., Kouzarides T. 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat. Cell Biol.* **6**, 73–77.
 29. Rando O.J. 2007. Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet.* **23**, 67–73.
 30. Rando O.J. 2012. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 148–155.
 31. Chen Y., Jorgensen M., Kolde R., Zhao X., Parker B., Valen E., Wen J., Sandelin A. 2011. Prediction of RNA polymerase II recruitment, elongation and stalling from histone modification data. *BMC Genomics.* **12**, 544.
 32. Banerji J., Rusconi S., Schaffner W. 1981. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell.* **27**, 299–308.
 33. Picard D., Schaffner W. 1983. Correct transcription of a cloned mouse immunoglobulin gene *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 417–421.
 34. Gillies S.D., Morrison S.L., Oi V.T., Tonegawa S. 1983. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell.* **33**, 717–728.
 35. Heintzman N.D., Hon G.C., Hawkins R.D., Kheradpour P., Stark A., Harp L.F., Ye Z., Lee L.K., Stuart R.K., Ching C.W., Ching K.A., Antosiewicz-Bourget J.E., Liu H., Zhang X., Green R.D., Lobanov V.V., Stewart R., Thomson J.A., Crawford G.E., Kellis M., Ren B. 2009. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature.* **459**, 108–112.
 36. Symmons O., Uslu V.V., Tsujimura T., Ruf S., Nassari S., Schwarzer W., Ettwiller L., Spitz F. 2014. Functional and topological characteristics of mammalian regulatory domains. *Genome Res.* **24**, 390–400.
 37. Nechaev S., Adelman K. 2011. Pol II waiting in the starting gates: regulating the transition from transcription initiation into productive elongation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1809**, 34–45.
 38. Adelman K., Lis J.T. 2012. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 720–731.
 39. Boettiger A.N., Ralph P.L., Evans S.N. 2011. Transcriptional regulation: effects of promoter proximal pausing on speed, synchrony and reliability. *PLoS Comput. Biol.* **7**, e1001136.
 40. Sawado T., Halow J., Bender M.A., Groudine M. 2003. The beta-globin locus control region (LCR) functions primarily by enhancing the transition from transcription initiation to elongation. *Genes Dev.* **17**, 1009–1018.
 41. Salem T., Gomard T., Court F., Moquet-Torcy G., Brockly F., Forne T., Piechaczyk M. 2013. Chromatin loop organization of the *junc* locus in mouse dendritic cells. *Nucl. Acids Res.* **41**, 8908–8925.

42. Kim T.K., Hemberg M., Gray J.M., Costa A.M., Bear D.M., Wu J., Harmin D.A., Laptewicz M., Barbara-Haley K., Kuersten S., Markenscoff-Papadimitriou E., Kuhl D., Bito H., Worley P.F., Kreiman G., Greenberg M.E. 2010. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*. **465**, 182–187.
43. De Santa F., Barozzi I., Mietton F., Ghisletti S., Polletti S., Tusi B.K., Muller H., Ragoussis J., Wei C.L., Natoli G. 2010. A large fraction of extragenic RNA pol II transcription sites overlap enhancers. *PLoS Biol.* **8**, e1000384.
44. Mousavi K., Zare H., Koulunis M., Sartorelli V. 2014. The emerging roles of eRNAs in transcriptional regulatory networks. *RNA Biol.* **11**, 106–110.
45. Natoli G., Andrau J.C. 2012. Noncoding transcription at enhancers: general principles and functional models. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 1–19.
46. Li W., Notani D., Ma Q., Tanasa B., Nunez E., Chen A.Y., Merkurjev D., Zhang J., Ohgi K., Song X., Oh S., Kim H.S., Glass C.K., Rosenfeld M.G. 2013. Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature*. **498**, 516–520.
47. Lam K.N., van Bakel H., Cote A.G., van der Ven A., Hughes T.R. 2011. Sequence specificity is obtained from the majority of modular C2H2 zinc-finger arrays. *Nucl. Acids Res.* **39**, 4680–4690.
48. Mousavi K., Zare H., Dell'orso S., Grontved L., Gutierrez-Cruz G., Derfoul A., Hager G.L., Sartorelli V. 2013. eRNAs promote transcription by establishing chromatin accessibility at defined genomic loci. *Mol. Cell.* **51**, 606–617.
49. Melo C.A., Drost J., Wijchers P.J., van de Werken H., de Wit E., Oude Vrielink J.A., Elkon R., Melo S.A., Leveille N., Kalluri R., de Laat W., Agami R. 2013. eRNAs are required for p53-dependent enhancer activity and gene transcription. *Mol. Cell.* **49**, 524–535.
50. Kowalczyk M.S., Hughes J.R., Garrick D., Lynch M.D., Sharpe J.A., Sloane-Stanley J.A., McGowan S.J., De Gobbi M., Hosseini M., Vernimmen D., Brown J.M., Gray N.E., Collavin L., Gibbons R.J., Flint J., Taylor S., Buckle V.J., Milne T.A., Wood W.G., Higgs D.R. 2012. Intragenic enhancers act as alternative promoters. *Mol. Cell.* **45**, 447–458.
51. Koch F., Fenouil R., Gut M., Cauchy P., Albert T.K., Zacarias-Cabeza J., Spicuglia S., de la Chapelle A.L., Heidemann M., Hintermair C., Eick D., Gut I., Ferrier P., Andrau J.C. 2011. Transcription initiation platforms and GTF recruitment at tissue-specific enhancers and promoters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 956–963.
52. Marques A.C., Hughes J., Graham B., Kowalczyk M.S., Higgs D.R., Ponting C.P. 2013. Chromatin signatures at transcriptional start sites separate two equally populated yet distinct classes of intergenic long noncoding RNAs. *Genome Biol.* **14**, R131.
53. Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. 2002. Capturing chromosome conformation. *Science*. **295**, 1306–1311.
54. de Laat W., Grosveld F. 2003. Spatial organization of gene expression: the active chromatin hub. *Chromosome Res.* **11**, 447–459.
55. de Laat W., Klous P., Kooren J., Noordermeer D., Palstra R.J., Simonis M., Splinter E., Grosveld F. 2008. Three-dimensional organization of gene expression in erythroid cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* **82**, 117–139.
56. Tolhuis B., Palstra R.J., Splinter E., Grosveld F., de Laat W. 2002. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol. Cell.* **10**, 1453–1465.
57. Gong F., Sun L., Wang Z., Shi J., Li W., Wang S., Han X., Sun Y. 2011. The *BCL2* gene is regulated by a special AT-rich sequence binding protein 1-mediated long range chromosomal interaction between the promoter and the distal element located within the 3'-UTR. *Nucl. Acids Res.* **39**, 4640–4652.
58. Gheldof N., Smith E.M., Tabuchi T.M., Koch C.M., Dunham I., Stamatoyannopoulos J.A., Dekker J. 2010. Cell-type-specific long-range looping interactions identify distant regulatory elements of the *CFTR* gene. *Nucl. Acids Res.* **38**, 4325–4336.
59. He B., Chen C., Teng L., Tan K. 2014. Global view of enhancer-promoter interactome in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, E2191–2199.
60. DeMare L.E., Leng J., Cotney J., Reilly S.K., Yin J., Sarro R., Noonan J.P. 2013. The genomic landscape of cohesin-associated chromatin interactions. *Genome Res.* **23**, 1224–1234.
61. Chien R., Zeng W., Kawauchi S., Bender M.A., Santos R., Gregson H.C., Schmiesing J.A., Newkirk D.A., Kong X., Ball A.R., Jr., Calof A.L., Lander A.D., Groudine M.T., Yokomori K. 2011. Cohesin mediates chromatin interactions that regulate mammalian beta-globin expression. *J. Biol. Chem.* **286**, 17870–17878.
62. Deng W., Lee J., Wang H., Miller J., Reik A., Gregory P.D., Dean A., Blobel G.A. 2012. Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor. *Cell*. **149**, 1233–1244.
63. Nolis I.K., McKay D.J., Mantouvalou E., Lomvardas S., Merika M., Thanos D. 2009. Transcription factors mediate long-range enhancer-promoter interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 20222–20227.
64. Kagey M.H., Newman J.J., Bilodeau S., Zhan Y., Orlando D.A., van Berkum N.L., Ebmeier C.C., Goossens J., Rahl P.B., Levine S.S., Taatjes D.J., Dekker J., Young R.A. 2010. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*. **467**, 430–435.
65. Gavrillov A.A., Razin S.V., Iarovaia O.V. 2012. C-methods to study 3D organization of the eukaryotic genome. *Biopolymers Cell.* **28**, 245–251.
66. Gavrillov A.A., Chetverina H.V., Chermnykh E.S., Razin S.V., Chetverin A.B. 2014. Quantitative analysis of genomic element interactions by molecular colony technique. *Nucl. Acids Res.* **42**, e36.
67. Eijkelenboom A., Mokry M., de Wit E., Smits L.M., Polderman P.E., van Triest M.H., van Bostel R., Schulze A., de Laat W., Cuppen E., Burgering B.M. 2013. Genome-wide analysis of FOXO3 mediated transcription regulation through RNA polymerase II profiling. *Mol. Systems Biol.* **9**, 638.
68. Hakim O., Sung M.H., Voss T.C., Splinter E., John S., Sabo P.J., Thurman R.E., Stamatoyannopoulos J.A., de Laat W., Hager G.L. 2011. Diverse gene reprogram-

- ming events occur in the same spatial clusters of distal regulatory elements. *Genome Res.* **21**, 697–706.
69. Jin F., Li Y., Dixon J.R., Selvaraj S., Ye Z., Lee A.Y., Yen C.A., Schmitt A.D., Espinoza C.A., Ren B. 2013. A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. *Nature.* **503**, 290–294.
 70. Herz H.M., Mohan M., Garruss A.S., Liang K., Takahashi Y.H., Mickey K., Voets O., Vrijzener C.P., Shilatifard A. 2012. Enhancer-associated H3K4 monomethylation by Trithorax-related, the Drosophila homolog of mammalian Mll3/Mll4. *Genes Dev.* **26**, 2604–2620.
 71. Creighton M.P., Cheng A.W., Welstead G.G., Kooistra T., Carey B.W., Steine E.J., Hanna J., Lodato M.A., Frampton G.M., Sharp P.A., Boyer L.A., Young R.A., Jaenisch R. 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 21931–21936.
 72. Spicuglia S., Vanhille L. 2012. Chromatin signatures of active enhancers. *Nucleus.* **3**, 126–131.
 73. Rada-Iglesias A., Bajpai R., Swigut T., Brugmann S.A., Flynn R.A., Wysocka J. 2011. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature.* **470**, 279–283.
 74. Zentner G.E., Tesar P.J., Scacheri P.C. 2011. Epigenetic signatures distinguish multiple classes of enhancers with distinct cellular functions. *Genome Res.* **21**, 1273–1283.
 75. Shlyueva D., Stampfel G., Stark A. 2014. Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 272–286.
 76. Consortium E.P., Bernstein B.E., Birney E., Dunham I., Green E.D., Gunter C., Snyder M. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* **489**, 57–74.
 77. Arnold C.D., Gerlach D., Stelzer C., Boryn L.M., Rath M., Stark A. 2013. Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq. *Science.* **339**, 1074–1077.
 78. Chen R.A., Down T.A., Stempor P., Chen Q.B., Egelhofer T.A., Hillier L.W., Jeffers T.E., Ahringer J. 2013. The landscape of RNA polymerase II transcription initiation in *C. elegans* reveals promoter and enhancer architectures. *Genome Res.* **23**, 1339–1347.
 79. Li Q., Peterson K.R., Fang X., Stamatoyannopoulos G. 2002. Locus control regions. *Blood.* **100**, 3077–3086.
 80. Li Q., Zhou B., Powers P., Enver T., Stamatoyannopoulos G. 1990. β -globin locus activation regions: conservation of organization, structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 8207–8211.
 81. Grosveld F., van Assandelt G.B., Greaves D.R., Kollias B. 1987. Position-independent, high-level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell.* **51**, 975–985.
 82. Kioussis D., Festenstein R. 1997. Locus control regions: overcoming heterochromatin-induced gene inactivation in mammals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 614–619.
 83. Forrester W.C., Epner E., Driscoll M.C., Enver T., Brice M., Papayannopoulou T., Groudine M. 1990. A deletion of the human β -globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire β -globin locus. *Genes Dev.* **4**, 1637–1649.
 84. Bender M.A., Bulger M., Close J., Groudine M. 2000. β -globin gene switching and DNase I sensitivity of the endogenous β -globin locus in mice do not require the locus control region. *Mol. Cell.* **5**, 387–393.
 85. Schubeler D., Groudine M., Bender M.A. 2001. The murine beta-globin locus control region regulates the rate of transcription but not the hyperacetylation of histones at the active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 11432–11437.
 86. Higgs D.R., Wood W.G., Jarman A.P., Sharpe J., Lida J., Pretorius I.-M., Ayyub H. 1990. A major positive regulatory region located far upstream of the human α -globin gene locus. *Genes Dev.* **4**, 1588–1601.
 87. Talbot D., Descombes P., Schibler U. 1994. The 5' flanking region of the rat LAP (C/EBP β) gene can direct high-level, position-independent, copy number-dependent expression on multiple tissues in transgenic mice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 756–766.
 88. Porter S.D., Meyer S.J. 1994. A distal tyrosinase upstream element stimulates gene expression in neutral-crest-derived melanocytes of transgenic mice: position-independent and mosaic expression. *Development.* **120**, 2103–2111.
 89. Palmiter R.D., Sandgren E.P., Koeller D.M., Brinster R.L. 1993. Distal regulatory elements from the mouse metallothionein locus stimulate gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5266–5275.
 90. Diaz P., Cado D., Winoto A. 1994. A locus control region in the T cell receptor alpha/delta locus. *Immunity.* **1**, 207–217.
 91. Whyte W.A., Orlando D.A., Hnisz D., Abraham B.J., Lin C.Y., Kagey M.H., Rahl P.B., Lee T.I., Young R.A. 2013. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell.* **153**, 307–319.
 92. Hnisz D., Abraham B.J., Lee T.I., Lau A., Saint-Andre V., Sigova A.A., Hoke H.A., Young R.A. 2013. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell.* **155**, 934–947.
 93. Brand A.H., Breeden L., Abraham J., Sternglanz R., Nasmyth K. 1985. Characterization of a “silencer” in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. *Cell.* **41**, 41–48.
 94. Sengupta A.K., Kuhrs A., Muller J. 2004. General transcriptional silencing by a Polycomb response element in Drosophila. *Development.* **131**, 1959–1965.
 95. Muller J., Kassis J.A. 2006. Polycomb response elements and targeting of Polycomb group proteins in Drosophila. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 476–484.
 96. Kassis J.A., Brown J.L. 2013. Polycomb group response elements in Drosophila and vertebrates. *Adv. Genet.* **81**, 83–118.
 97. Reynolds N., O’Shaughnessy A., Hendrich B. 2013. Transcriptional repressors: multifaceted regulators of gene expression. *Development.* **140**, 505–512.
 98. Schoch H., Abel T. 2014. Transcriptional co-repressors and memory storage. *Neuropharmacology.* **80**, 53–60.

99. Watson P.J., Fairall L., Schwabe J.W. 2012. Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* **348**, 440–449.
100. Battaglia S., Maguire O., Campbell M.J. 2010. Transcription factor co-repressors in cancer biology: roles and targeting. *Int. J. Cancer.* **126**, 2511–2519.
101. Friedman J.R., Fredericks W.J., Jensen D.E., Speicher D.W., Huang X.P., Neilson E.G., Rauscher F.J., 3rd. 1996. KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain. *Genes Dev.* **10**, 2067–2078.
102. Groner A.C., Meylan S., Ciuffi A., Zangger N., Ambrosini G., Denervaud N., Bucher P., Trono D. 2010. KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading. *PLoS Genet.* **6**, e1000869.
103. Jones P.L., Shi Y.B. 2003. N-CoR-HDAC corepressor complexes: roles in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **274**, 237–268.
104. Wade P.A., Jones P.L., Vermaak D., Veenstra G.J., Imhof A., Sera T., Tse C., Ge H., Shi Y.B., Hansen J.C., Wolffe A.P. 1998. Histone deacetylase directs the dominant silencing of transcription in chromatin: association with MeCP2 and the Mi-2 chromodomain SWI/SNF ATPase. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **63**, 435–445.
105. Chanda D., Xie Y.B., Choi H.S. 2010. Transcriptional corepressor SHP recruits SIRT1 histone deacetylase to inhibit LRH-1 transactivation. *Nucl. Acids Res.* **38**, 4607–4619.
106. Kellum R., Schedl P. 1991. A position-effect assay for boundaries of higher-order chromosomal domains. *Cell.* **64**, 941–950.
107. Kellum R., Schedl P. 1992. A group of scs elements function as boundaries in enhancer-blocking assay. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2424–2431.
108. Bell A.C., West A.G., Felsenfeld G. 1999. The protein CTCF is required for the enhancer-blocking activity of vertebrate insulators. *Cell.* **98**, 387–396.
109. Wendt K.S., Yoshida K., Itoh T., Bando M., Koch B., Schirghuber E., Tsutsumi S., Nagae G., Ishihara K., Mishiro T., Yahata K., Imamoto F., Aburatani H., Nakao M., Imamoto N., Maeshima K., Shirahige K., Peters J.M. 2008. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature.* **451**, 796–801.
110. Rubio E.D., Reiss D.J., Welch P.L., Distèche C.M., Filippova G.N., Baliga N.S., Aebersold R., Ranish J.A., Krumm A. 2008. CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 8309–8314.
111. Negre N., Brown C.D., Shah P.K., Kheradpour P., Morrison C.A., Henikoff J.G., Feng X., Ahmad K., Russell S., White R.A., Stein L., Henikoff S., Kellis M., White K.P. 2010. A comprehensive map of insulator elements for the *Drosophila* genome. *PLoS Genet.* **6**, e1000814.
112. Ahanger S.H., Shouche Y.S., Mishra R.K. 2013. Functional sub-division of the *Drosophila* genome via chromatin looping: the emerging importance of CP190. *Nucleus.* **4**, 115–122.
113. Yang J., Corces V.G. 2012. Insulators, long-range interactions, and genome function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **22**, 86–92.
114. Pai C.Y., Lei E.P., Ghosh D., Corces V.G. 2004. The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator. *Mol. Cell.* **16**, 737–748.
115. Bartkuhn M., Straub T., Herold M., Herrmann M., Rathke C., Saumweber H., Gilfillan G.D., Becker P.B., Renkawitz R. 2009. Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. *EMBO J.* **28**, 877–888.
116. Ahanger S.H., Gunther K., Weth O., Bartkuhn M., Bhonde R.R., Shouche Y.S., Renkawitz R. 2014. Ectopically tethered CP190 induces large-scale chromatin decondensation. *Sci. Repts.* **4**, 3917.
117. Hou C., Zhao H., Tanimoto K., Dean A. 2008. CTCF-dependent enhancer-blocking by alternative chromatin loop formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 20398–20403.
118. Raab J.R., Kamakaka R.T. 2010. Insulators and promoters: closer than we think. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 439–446.
119. Phillips-Cremens J.E., Corces V.G. 2013. Chromatin insulators: linking genome organization to cellular function. *Mol. Cell.* **50**, 461–474.
120. Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. 2013. Effective blocking of the white enhancer requires cooperation between two main mechanisms suggested for the insulator function. *PLoS Genet.* **9**, e1003606.
121. Tokuda N., Sasai M., Chikenji G. 2011. Roles of DNA looping in enhancer-blocking activity. *Biophys. J.* **100**, 126–134.
122. Kurukuti S., Tiwari V.K., Tavoosidana G., Pugacheva E., Murrell A., Zhao Z., Lobanenko V., Reik W., Ohlsson R. 2006. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 10684–10689.
123. Van Bortle K., Corces V.G. 2013. The role of chromatin insulators in nuclear architecture and genome function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 212–218.
124. Zlatanova J., Caiafa P. 2009. CTCF and its protein partners: divide and rule? *J. Cell. Sci.* **122**, 1275–1284.
125. Ghirlando R., Giles K., Gowher H., Xiao T., Xu Z., Yao H., Felsenfeld G. 2012. Chromatin domains, insulators, and the regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta.* **1819**, 644–651.
126. Vogelmann J., Valeri A., Guillou E., Cuvier O., Nollmann M. 2011. Roles of chromatin insulator proteins in higher-order chromatin organization and transcription regulation. *Nucleus.* **2**, 358–369.
127. Dean A. 2011. In the loop: long range chromatin interactions and gene regulation. *Brief Funct. Genomics.* **10**, 3–10.
128. Maksimenko O., Georgiev P. 2014. Mechanisms and proteins involved in long-distance interactions. *Front. Genet.* **5**, 28.
129. Li H.B., Ohno K., Gui H., Pirrotta V. 2013. Insulators target active genes to transcription factories and polycomb-repressed genes to polycomb bodies. *PLoS Genet.* **9**, e1003436.

130. Matzat L.H., Lei E.P. 2014. Surviving an identity crisis: a revised view of chromatin insulators in the genomics era. *Biochim. Biophys. Acta.* **1839**, 203–214.
131. Recillas-Targa F., Pikaart M.J., Burgess-Beusse B., Bell A.C., Litt M.D., West A.G., Gaszner M., Felsenfeld G. 2002. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 6883–6888.
132. Chung J.H., Bell A.C., Felsenfeld G. 1997. Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 575–580.
133. Chung J.H., Whiteley M., Felsenfeld G. 1993. A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell.* **74**, 505–514.
134. Dickson J., Gowher H., Strogantsev R., Gaszner M., Hair A., Felsenfeld G., West A.G. 2010. VEZF1 elements mediate protection from DNA methylation. *PLoS Genet.* **6**, e1000804.
135. West A.G., Huang S., Gaszner M., Litt M.D., Felsenfeld G. 2004. Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol. Cell.* **16**, 453–463.
136. Li X., Wang S., Li Y., Deng C., Steiner L.A., Xiao H., Wu C., Bungert J., Gallagher P.G., Felsenfeld G., Qiu Y., Huang S. 2011. Chromatin boundaries require functional collaboration between the hSET1 and NURF complexes. *Blood.* **118**, 1386–1394.
137. Bi X., Broach J.R. 1999. UASrpg can function as a heterochromatin boundary element in yeast. *Genes Dev.* **13**, 1089–1101.
138. Ferrari S., Simmen K.C., Dusserre Y., Muller K., Fourel G., Gilson E., Mermod N. 2004. Chromatin domain boundaries delimited by a histone-binding protein in yeast. *J. Biol. Chem.* **279**, 55520–55530.
139. Litt M.D., Simpson M., Recillas-Targa F., Prieleau M.N., Felsenfeld G. 2001. Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.* **20**, 2224–2235.
140. Bruce K., Myers F.A., Mantouvalou E., Lefevre P., Greaves I., Bonifer C., Tremethick D.J., Thorne A.W., Crane-Robinson C. 2005. The replacement histone H2A.Z in a hyperacetylated form is a feature of active genes in the chicken. *Nucl. Acids Res.* **33**, 5633–5639.
141. Ma M.K., Heath C., Hair A., West A.G. 2011. Histone crosstalk directed by H2B ubiquitination is required for chromatin boundary integrity. *PLoS Genet.* **7**, e1002175.
142. Litt M.D., Simpson M., Gaszner M., Allis C.D., Felsenfeld G. 2001. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken beta-globin locus. *Science.* **293**, 2453–2455.
143. Heger P., Wiehe T. 2014. New tools in the box: an evolutionary synopsis of chromatin insulators. *Trends Genet.* **30**, 161–171.