

## 特约综述



本实验室的主要研究方向是表观遗传调控的结构生物学研究,通过探究一系列重要表观遗传因子复合物的结构基础,以揭示它们在各种生物学过程发挥作用的分子机制,并为针对特定结构靶点的药物小分子设计奠定基础。研究内容包括:阐明组蛋白甲基化酶MLL1复合物的活性调节机制和产物特异性;揭示依赖ATP的染色体重塑复合物的分子作用机制;阐释端粒染色体组装的分子机制。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=147>

## 组蛋白甲基转移酶MLL1的结构与功能研究进展

黎彦璟 陈勇\*

(国家蛋白质科学中心,分子生物学国家重点实验室,中国科学院上海生命科学研究院  
上海生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031)

**摘要** 组蛋白甲基转移酶MLL1因其基因易位重排所引起的混合系白血病(mixed lineage leukemia)而得名。MLL1蛋白在基因调控、细胞增殖、生长分化等正常生理功能中发挥着重要作用,染色体易位重排所产生的MLL1融合蛋白则与急性白血病的发生发展密切相关。目前人们对MLL1蛋白的结构和功能研究取得了很大的进展,为以MLL1和其相互作用蛋白为靶点的新型MLL1白血病药物设计奠定了坚实的基础。

**关键词** 表观遗传调控;组蛋白甲基化;MLL1;MLL1白血病;药物靶点

## Progress in Structural and Functional Studies of Histone Methyltransferase MLL1

Li Yanjing, Chen Yong\*

(National Center for Protein Science Shanghai, State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** Histone H3K4 methyltransferase MLL1 has been intensively studied because of its involvement by chromosomal translocation in mixed lineage leukemia. MLL1 plays a pivotal role in gene regulation, development and differentiation. Chromosome translocations of MLL1 generate chimeric proteins containing MLL1 N-terminus fused in-frame with distinct partner proteins, which contribute to leukemogenesis. Recent progress has

中国科学院战略性先导科技专项(B类)(批准号: XDB08010201)和国家重大科学研究计划(批准号: 2013CB910400)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-20778196, E-mail: yongchen@sibcb.ac.cn

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (Grant No.XDB08010201) and the Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2013CB910400)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-20778196, E-mail: yongchen@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2014-07-01 16:49

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.9002.html>

begun to reveal the structures and functions of MLL1 protein, which, in turn, have provided new opportunities for therapeutic development towards mixed lineage leukemia.

**Key words** epigenetic regulation; histone methylation; MLL1; mixed lineage leukemia; therapeutic target

组蛋白甲基化在许多生物学过程中起到了关键作用,是表观遗传调控领域的主要研究内容。介导组蛋白甲基化的相关蛋白酶基因突变而导致的组蛋白甲基化异常是多种遗传疾病或癌症发生发展的重要原因<sup>[1-2]</sup>。其中组蛋白H3第4位赖氨酸的甲基转移酶MLL1就因其基因易位重排所引起的混合系白血病(mixed lineage leukemia)而得名。

早期人们发现涉及染色体带11q23的染色体易位是人类急性白血病中较为常见的一类染色体易位,在急性髓性白血病和急性淋巴细胞性白血病中均有发现,所以被称为混合系白血病,约占人类白血病总数的10%<sup>[3]</sup>。1991年,研究者通过对与11q23相关的四种染色体易位t(4;11)(q21;q23)、t(6;11)(q27;q23)、t(9;11)(p22;q23)、t(11;19)(q23;p13.3)的研究,定义了一种绝大部分染色体11q23易位所涉及的基因——混合系白血病基因MLL(mixed lineage leukemia)<sup>[4]</sup>。MLL基因编码一种组蛋白甲基转移酶蛋白MLL1,能特异性地对H3K4进行甲基化修饰<sup>[3]</sup>。MLL1蛋白在基因表达调控、细胞增殖、发育分化等方面发挥重要作用,其变异所引起的功能失调会导致细胞的非正常发育或功能丧失<sup>[3,5]</sup>。目前,人们对MLL1在正常造血和白血病发病中的作用已有了相当深入的了解,以MLL1和其相互作用蛋白为靶点的白血病药物设计也取得了较大的进展<sup>[6]</sup>。本文拟对MLL1的生理功能、结构特征、MLL1融合蛋白的致病机制和新型药物靶点设计的有关研究做一简要介绍。

## 1 MLL1蛋白的生理功能

### 1.1 MLL1调控Hox基因的表达

MLL1最重要的下游调节基因是Hox(Homeobox)家族基因<sup>[7]</sup>。Hox基因是一大类含有同源框的基因统称,对于干细胞自我更新和组织器官的形成具有重要的调控作用<sup>[8]</sup>。总的来说,MLL1蛋白正调控Hox基因的表达。在MLL基因敲除的小鼠中,Hox基因在胚胎期9.5天后表达异常,小鼠在胚胎期10.5天就死亡了<sup>[9-10]</sup>。致死原因是Hox基因表达异常所引起的鳃弧、颅神经、神经节中的一些神经嵴衍生结构

发育缺陷。同时,MLL基因敲除的小鼠也表现出造血异常,同时伴随着一些Hox基因(Hoxa7、Hoxa9、Hoxa10、Hoxa4)的表达下调<sup>[11]</sup>。所以,MLL1蛋白对于在生长发育中Hox基因的调控起着至关重要的作用。

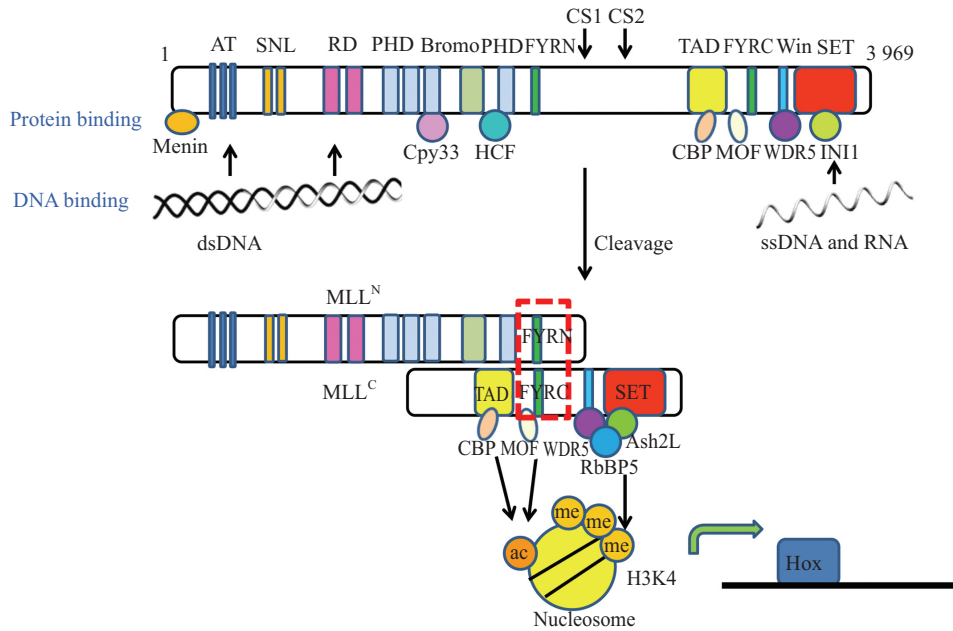
Hox基因的表达调控依赖于MLL1蛋白的甲基转移酶的活性<sup>[12]</sup>,然而仅仅切除掉MLL基因中的甲基转移酶活性结构域(SET结构域)的小鼠并不致死。这种突变的小鼠表现出骨骼发育缺陷和一些Hox基因的表达异常<sup>[13]</sup>,说明MLL1的甲基转移酶活性对在体内维持染色体的构象和Hox基因的表达是重要的,但不是唯一的决定性因素。

MLL1在造血干细胞和祖细胞中的重要作用也与其调控Hox基因的表达相关。虽然MLL1对成熟的造血系统的影响并不大,但是它在血细胞发生的早期起着至关重要的作用<sup>[14-15]</sup>。缺乏MLL基因的造血干细胞会因为进入细胞周期异常而损耗,缺乏MLL的髓红样祖细胞会出现增殖减少和细胞因子诱导的细胞周期减少的现象<sup>[14]</sup>,表明MLL1在造血系统中扮演着选择性和独立性的角色,主要是维持造血干细胞和促进祖细胞的增殖。

### 1.2 MLL1是广谱的转录调节器

虽然MLL1被广泛认为主要调控Hox基因,它对许多其他类型基因的转录调控作用也是不容忽视的。利用全基因组启动子结合分析方法发现,MLL1主要定位于转录活跃的启动子区域<sup>[16-17]</sup>,其下游调控基因非常广泛,包括在分化和器官生成途径中的基因(如COL6A3、DCoH、gremlin、GDID4、GATA-6和LIMK等)、肿瘤抑制因子(p27<sup>Kip1</sup>、p18<sup>Ink4c</sup>和GAS-1),以及多种白血病生成的相关基因(HNF-3/BF-1、Mlf1、FBJ、Tenascin C、PE31/TALLA-1)等<sup>[18-19]</sup>。

MLL1蛋白参与了细胞周期的调控。它可以和众多细胞周期调控转录因子结合,如E2F2、E2F4和E2F6等<sup>[20]</sup>。G<sub>1</sub>期的调控蛋白HCF-1招募MLL1到E2F响应的启动子上,从而导致G<sub>1</sub>期的组蛋白甲基化和转录激活<sup>[21]</sup>。MLL1的细胞核内定位也随着细胞周期而变化<sup>[22]</sup>。



MLL1全长为3 969个氨基酸,共有如图所示的15个结构域。前体MLL1蛋白合成后,在第2 666/2 667个氨基酸残基(CS1)和第2 718/2 719(CS2)处被taspase1切断,产生N端和C端两个多肽,MLL1<sup>N</sup>和MLL1<sup>C</sup>,两者通过FYRN和FYTC相互结合而形成一个完整的活性蛋白。MLL1可以与具有组蛋白乙酰转移酶活性的CBP和MOF结合,而MLL1-SET则可以甲基化组蛋白H3K4,二者都可以激活下游Hox基因的表达。

Wild type MLL1 protein has 3 969 residues with 15 structural domains as shown. The cleavage of nascent MLL1 by taspase1 will generate MLL1<sup>N</sup> and MLL1<sup>C</sup>, which associates to form an active protein by the binding of FYRN and FYRC. MLL1 can interact with the histone acetyltransferases CBP and MOF which can acetylate histone, while MLL1-SET can methylate H3K4. Both modifications can activate expression of Hox genes.

图1 MLL1蛋白的结构域组成和主要功能

Fig.1 The structural domains and main function of MLL1 protein

此外,MLL1在端粒修饰和转录<sup>[23]</sup>、逆境响应<sup>[24]</sup>、mRNA加工<sup>[25]</sup>、后天神经干细胞的神经形成<sup>[26]</sup>、海马突触可塑性<sup>[27]</sup>等过程中都发挥重要的作用。因此,MLL1不仅仅对Hox基因的表达至关重要,它还是一类广谱的转录调节器。

## 2 MLL1蛋白的结构

### 2.1 MLL1蛋白的结构域组成

MLL1的多功能发挥和它复杂的结构息息相关。MLL基因全长约为89 Kb,由37个外显子组成,这些外显子在着丝点至端粒方向上被转录,该基因能编码一个由3 969个氨基酸组成的多结构域蛋白<sup>[28]</sup>。前体MLL1蛋白合成后,在第2 666/2 667个氨基酸残基(CS1)和第2 718/2 719(CS2)处被taspase1切断,产生N端和C端两个多肽,MLL1<sup>N</sup>和MLL1<sup>C</sup>两者相互结合而形成一个完整的活性蛋白<sup>[29]</sup>(图1)。

目前发现,野生型MLL1蛋白从N端到C端共有15个结构域,依次为3个AT钩(AT hook)结构域、2个SNL(speckled nuclear localization)结构域、1个转录抑制域(repression domain, RD)、4个PHD(plant

homeo domain)锌指结构域、1个Bromo结构域(存在于第3个和第4个PHD锌指结构域之间)、2个FYR(F/Y-Rich)结构域(FYRN和FYRC)、1个转录激活域(transcription activation domain, TAD)和1个SET(Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax)结构域<sup>[29]</sup>。各个结构域具有不同的功能,从而赋予了MLL1的多功能特性(图1)。

AT钩是DNA结合结构域,常出现于HMG(high mobility group)蛋白中<sup>[8]</sup>。MLL1 AT钩包含一个核心的保守回文结构:脯氨酸-精氨酸-甘氨酸-精氨酸-脯氨酸。在这个核心序列的侧链上有很多带正电的残基,能够识别十字架型的双链DNA和富含AT的核基质结合区序列(scaffold attachment region)<sup>[30]</sup>。MLL1 AT钩还可以和一些蛋白如GADD34等结合<sup>[31]</sup>。AT钩结构域和DNA和蛋白结合特性使得其在促进髓单核细胞分化中发挥着重要作用<sup>[32]</sup>。

SNL结构域是一类在进化过程中高度保守的结构域,通常参与指导蛋白的细胞核定位。MLL1蛋白在细胞核内以不连续的点状方式分布(punctate pattern),这样独特的核内定位方式和MLL1的SNL结

构域的存在密切相关<sup>[33]</sup>。MLL1具有两个SNL结构域,包括SNL1和SNL2,它们对MLL1蛋白的染色体定位和功能发挥起到了重要的调节作用。

转录抑制域RD由两个转录抑制机制不同的区域RD1和RD2组成。RD1包含一个与哺乳动物DNA甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)具有同源性的CxxC锌指状结构域,富含半胱氨酸,结合含有非甲基化CpG的DNA,可以招募PcG家族的抑制蛋白HPC2、BM1-1以及协同抑制因子CtBP从而抑制基因转录<sup>[34]</sup>。RD2则通过招募组蛋白去乙酰化酶HDAC1和HDAC2来介导抑制作用<sup>[34]</sup>。

PHD锌指结构域是一个重要的结构域,通常被认为参与介导蛋白质之间的相互作用和识别甲基化的组蛋白<sup>[35]</sup>。MLL1共有四个PHD结构域,功能各不相同。MLL1蛋白的第2个PHD锌指能介导自身二聚化<sup>[36]</sup>,并且具有E3泛素连接酶的活性<sup>[37]</sup>。PHD2的E3泛素连接酶的活性对MLL1的稳定性起到了重要的调节作用<sup>[37]</sup>。MLL1的第3个PHD结构域则可以同时结合三甲基化的H3K4和细胞核亲环蛋白Cyp33<sup>[38]</sup>。PHD3和Cyp33的相互作用能进一步招募去乙酰化酶HDAC并抑制相关基因的表达<sup>[39]</sup>,从而阻碍了造血干细胞的无限增殖<sup>[39-40]</sup>。

MLL1在第3个和第4个PHD锌指结构域之间有一个Bromo结构域。Bromo结构域通常存在于一些染色质结合蛋白中,可以识别乙酰化的赖氨酸残基。虽然MLL1的Bromo结构域并不具备结合乙酰化的赖氨酸残基的能力,但是对PHD3结构域具有比较重要的功能调控作用。Bromo结构域能够极大地增强PHD3与H3K4me3的结合能力,与此同时,又能抑制PHD3和Cyp33的结合<sup>[38]</sup>。

FYRN和FYRC结构域是一类富含苯丙氨酸或酪氨酸的区域,它们由50到100个氨基酸组成,存在于多种染色质结合相关蛋白中,如MLL家族蛋白、TBRG1(transforming growth factor beta regulator 1)和TGFβ1等<sup>[41]</sup>。在大多数蛋白中,FYRN和FYRC结构域相隔很近,然而,在MLL1及MLL同源蛋白中,它们相聚较远(间隔1 590个氨基酸)。在体内,MLL1被taspase1切断,然后再通过FYRN和FYRC的结合形成稳定的异二聚体<sup>[42]</sup>。

转录激活域TAD是MLL1转录激活活性所需的最小结构域,仅有55个氨基酸(2 829-2 883)<sup>[43]</sup>。TAD可以和共活化因子CREB结合蛋白(cAMP-response

element binding protein, CBP)直接相互作用,而且MLL1 TAD与CBP的结合能够变构增强磷酸化的CREB结合CBP的能力。TAD和CBP之间的相互作用对于MLL1的转录激活活性是必需的,由于CBP具有乙酰基转移酶活性,因此可能通过乙酰化H3和H4来激活基因的表达<sup>[44]</sup>。

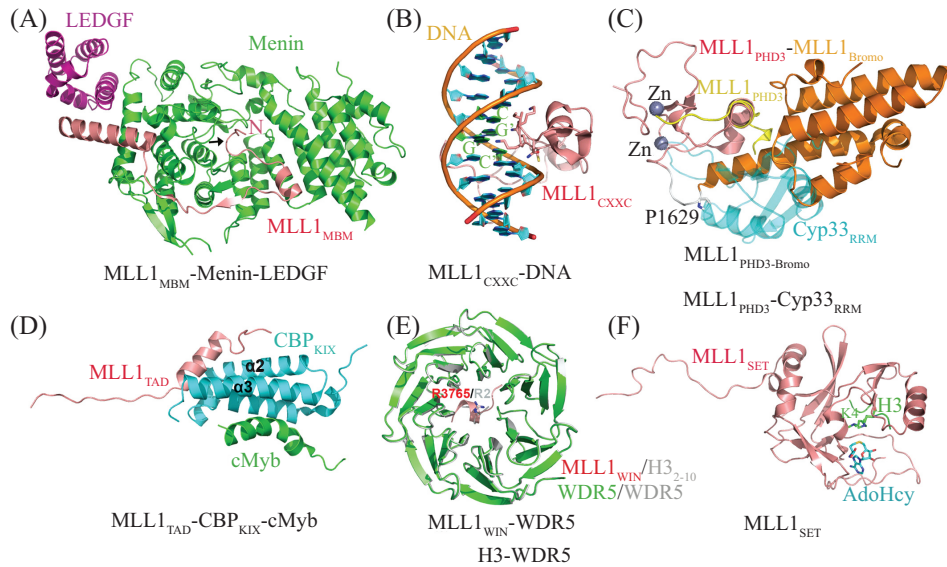
C端SET结构域则是主要的催化结构域,这也是目前发现的大多数组蛋白甲基转移酶都具有的保守催化结构域<sup>[45]</sup>,其名字来源于三个最早发现的组蛋白甲基转移酶成员Su(var)3-9、Enhancer-of-zeste及Trithorax<sup>[46]</sup>。MLL1 C端SET结构域具有H3K4单、双甲基化活性,但是否有三甲基化活性目前还存在争论<sup>[47-49]</sup>。和其他包含SET结构域的甲基转移酶不同,MLL1的SET结构域自身的甲基化活性很低,正常的生理活性发挥有赖于结合其他一系列的调节蛋白,包括WDR5、RbBP5、Ash2L等<sup>[47]</sup>。

## 2.2 MLL1蛋白的结构生物学研究

鉴于MLL1蛋白的重要性,目前国际上众多实验室都投入到该蛋白的结构生物学研究之中,目前MLL1若干结构域的结构都已经得到解析,包括N端肽段和Menin复合物、CXXC、TAD、PHD3-Bromo、WDR5结合肽段和WDR5复合物、SET结构域的结构<sup>[29]</sup>(图2)。这些结构信息为我们了解MLL1的功能机制提供了直接的线索,但仍然有许多尚待解决的问题。

MLL1 N端能够和I型多发性内分泌腺瘤蛋白Menin(Multiple Endocrine Neoplasia type 1)相互结合,其结合对于MLL1融合蛋白发挥其癌基因作用是极其重要的<sup>[50]</sup>。已经解出的MLL1-Menin以及MLL1-Menin-LEDGF结构显示,Menin和MLL1的结合区域是非常广泛的,涵盖了MLL1 N端150个氨基酸的多个位点<sup>[51]</sup>。其最重要的核心结合位点是8个氨基酸(6-13)组成的环状短肽,结合在左手手掌状Menin的拇指和掌心之间的口袋之中(图2A)。Menin和MLL1结合位点的定点突变,阻碍了两者的相互作用,并进而引起Hoxc6和Hoxc8的表达水平下降<sup>[51]</sup>。

MLL1转录抑制域中的CXXC结构域能识别非甲基化的CpG岛,对于MLL1融合蛋白的目标基因识别、转录活化和髓转化都是必需的<sup>[52]</sup>。MLL1<sub>CXXC</sub>和DNA的复合物结构很好地解释了其结合DNA的生化特性<sup>[53]</sup>。CXXC结构域垂直插入DNA的大沟内,



A: MLL1<sub>MBM</sub>-Menin-LEDGF(PDB:3U88)的结构。MLL1 MBM(menin binding motif)的N-端结合与Menin中心的凹槽内,是最重要的结合位点,用箭头标示出来; B: MLL1<sub>CXXC</sub>-DNA(PDB:2KKF)的结构,直接参与蛋白-DNA相互作用的CpG核苷酸碱基用绿色表示,氨基酸侧链用球棍模型表示出来; C: MLL1<sub>PHD3-Bromo</sub>(PDB: 3LQH)和MLL1<sub>PHD3-Cyp33<sub>RRM</sub></sub>(PDB:2KUJ)的结构。两个结构按照PHD3的 $\alpha 2$ 螺旋重叠到一起后,可见MLL1<sub>Bromo</sub>和Cyp33<sub>RRM</sub>是冲突的,即MLL1<sub>PHD3-Bromo</sub>的构象不可能兼容Cyp33的结合。只有当图中所示Pro1629从cis变为trans构象后,才能容纳Cyp33的结合; D: MLL1<sub>TAD</sub>-CBP<sub>KIX</sub>-cMyb (PDB:2AGH)的结构; E: MLL1<sub>WIN</sub>-WDR5(PDB:3EG6)和H3<sub>2-10</sub>-WDR5(PDB:2H13)的结构,两个结构按照WDR5重叠到一起后,可见MLL1<sub>WIN</sub>和H3肽段的构象完全一致,最重要的精氨酸MLL1R3765/H3R2也完全保守; F: MLL1<sub>SET</sub>的结构(PDB:2W5Z),其中H3的第四位赖氨酸的侧链被标示出来,晶体中该侧链有两种不同的构象。

A: structure of MLL1<sub>MBM</sub>-Menin-LEDGF (PDB:3U88). N-terminus of MLL1<sub>MBM</sub> (menin binding motif) is docked into the central pocket of Menin (indicated by arrow), which contributes most of the interactions between MLL1 and Menin; B: structure of MLL1<sub>CXXC</sub>-DNA (PDB: 2KKF). CpG bases on protein-DNA interface are colored in green, and protein residues which are involved in recognition of DNA are shown in stick models; C: superimposition of MLL1<sub>PHD3-Bromo</sub> (PDB:3LQH) and MLL1<sub>PHD3-Cyp33<sub>RRM</sub></sub> (PDB:2KUJ) according to  $\alpha 2$  of PHD3. It clearly shows that conformation of MLL1<sub>PHD3-Bromo</sub> is not compatible for Cyp33 binding, unless isomerization of Pro1629 in linker region between PHD3 and Bromo will facilitate PHD3 binding to Cyp33<sub>RRM</sub>; D: structure of MLL1<sub>TAD</sub>-CBP<sub>KIX</sub>-cMyb (PDB:2AGH); E: superimposition MLL1<sub>WIN</sub>-WDR5 (PDB:3EG6) and H3<sub>2-10</sub>-WDR5 (PDB:2H13) according to WDR5. MLL1<sub>WIN</sub> and H3 peptide adopt almost identical conformation. The conserved Arginines (MLL1R3765/H3R2) are the most important anchor sites for WDR5, which are indicated by stick models; F: structure of MLL1<sub>SET</sub> (PDB:2W5Z). As indicated, the side chain of H3 Lys4 has two different conformations.

图2 已知的MLL1结构域的结构(均用cartoon的格式表示)

Fig.2 Cartoon representations of current known 3D structures of conserved MLL1 domains

相互作用区域比较小(图2B),这和蛋白-DNA之间的低亲和力是相符的。碱基特异性的结合只来自于中心的CpG这两个碱基,这也能解释CXXC结构域结合DNA的特异性只由CpG来决定。另外,结构显示DNA CpG碱基和结合蛋白区域在空间上非常靠近,空间位阻效应决定了只能识别非甲基化的CpG<sup>[53]</sup>(图2B)。

MLL1的第3个PHD结构域能够和细胞核亲环蛋白Cyp33的RRM(RNA recognition motif)结构域相互作用,但串联的PHD3-Bromo结构域却无法结合Cyp33的RRM结构域<sup>[38]</sup>。PHD3-RRM的结构学研究显示,PHD3和Bromo之间的连接片段上有一个脯氨酸处于cis构象,使得PHD3和Bromo结构域之间存在着相互作用从而屏蔽了PHD3和Cyp33相互作用的

位点(图2C)<sup>[38]</sup>。Cyp33中存在着另外一个PPIase(脯氨酸异构酶)结构域,当在该酶活性的催化下脯氨酸发生异构化变为trans构象,MLL1 PHD3和Bromo结构域相互解离,才能使得MLL1 PHD3 C端的一段 $\alpha$ 螺旋结合到Cyp33的RRM结构域上<sup>[38]</sup>。这为MLL1构象变化和功能调节紧密结合提供了结构学的直接例证。

转录激活域TAD可以招募共活化因子CREB结合蛋白(CBP)并共同结合于Hox基因的启动子上,来发挥转录激活活性<sup>[44]</sup>。MLL1的TAD结构域结合CBP的KIX结构域,而KIX结构域是一个普适性的蛋白结合平台,能识别多种转录因子<sup>[54]</sup>。de Guzman等<sup>[54]</sup>解析了MLL1<sub>TAD</sub>、CBP<sub>KIX</sub>和C-Myb形成的三元复合物的结构。结构显示,MLL1<sub>TAD</sub>中的一段保守序列(2 845-2 853)形成 $\alpha$ 螺旋,同KIX的 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 螺旋

形成了一个 $\alpha$ 螺旋束, 并且MLL1的结合引起了 $\alpha 3$ 的构象变化, 从而增强了KIX和C-Myb的相互作用(图2D)。这个结果暗示, MLL1能通过CBP的协同作用来增强和其他转录活化因子的结合, 从而激活下游基因的转录。

MLL1和WDR5的相互作用对于MLL1复合物的组装和活性调节是至关重要的<sup>[47]</sup>。研究者鉴定了与WDR5直接结合的MLL1片段(3 762-3 770), 并解析了复合物结构<sup>[55]</sup>。MLL1的多肽形成 $3_{10}$ 螺旋, 结合到WDR5桶装结构的开口之中。其中最关键的是R3765, 其侧链插入WDR5的口袋之中, 介导了一系列氢键、范德华力、cation- $\pi$ 等作用网络的形成(图2E)。有趣的是, MLL1的结合模式与以前所报道的组蛋白H3-WDR5的结合模式高度类似, 复合物结构也几乎完全相同, 相关实验也揭示MLL1和组蛋白H3能竞争性地结合WDR5, 从而巧妙地使MLL1复合物的组装和活性进行调节<sup>[56]</sup>。

MLL1蛋白C端SET结构域的结构也已经得以解析<sup>[49]</sup>。该结构域和其他已知结构的SET结构域相比, 其中的SET-I模块相对于其他部分有一个明显的移动, 从而导致组蛋白结合口袋呈现出一个打开的构象。在蛋白-H3底物复合物的结构中, 底物呈现出多种构象, 也说明该蛋白并非处于一个最佳的结合底物的构象(图2F), 这能够解释为何MLL1蛋白自身的甲基转移酶活性很低<sup>[49]</sup>。目前研究结果表明, MLL1和WDR5、Ash2L、RbBP5形成复合物后才具有较高的甲基转移酶活性<sup>[47]</sup>。通过对体外重组MLL1复合物的研究, 人们建立了两种活性调节模型。一个是构象变化模型, 即与WDR5、Ash2L、RbBP5蛋白的结合影响了SET结构域的构象, 从而调节其活性<sup>[49]</sup>; 另外一个为双活性位点模型, 即WDR5、Ash2L、RbBP5这些调节蛋白中有一个新的活性位点, 和SET结构域的活性位点协同作用发挥功能<sup>[57]</sup>。两种模型都有一定的实验数据支持, 完全地解决这个分歧有赖于对MLL1复合物的结构生物学研究。

### 3 MLL1融合蛋白

#### 3.1 MLL1融合蛋白的分类

在白血病中发现的多种MLL基因易位重排的主要断裂点位于RD结构域和PHD结构域之间。易位发生后, 在11号染色体上形成融合基因, 所编码的融

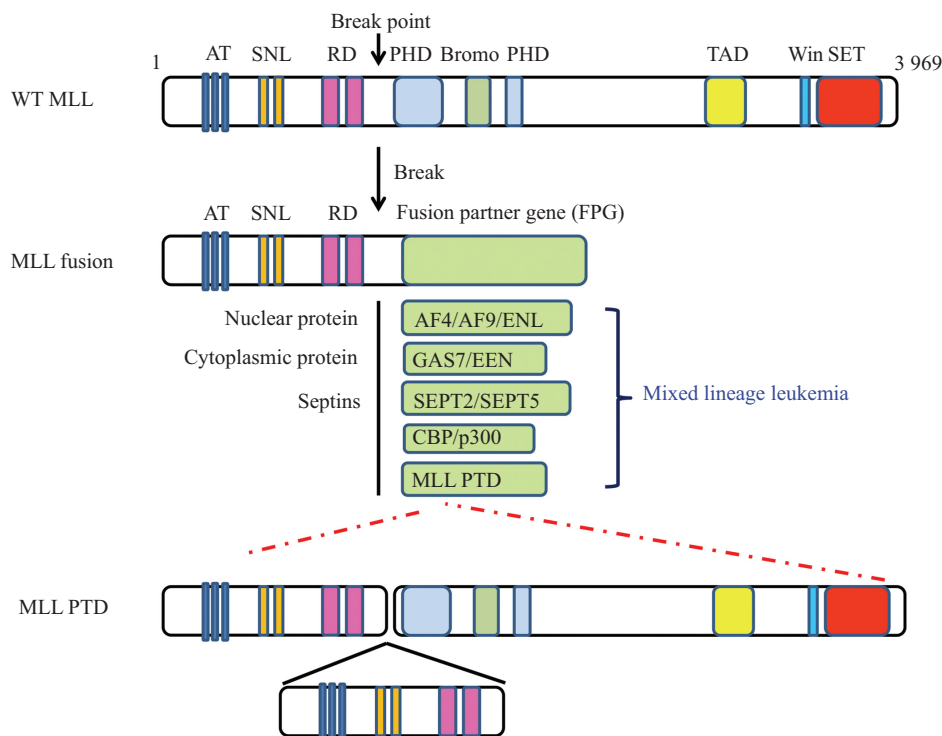
合蛋白由MLL1蛋白N端的AT钩结构域、SNL结构域和RD结构域与融合伙伴蛋白的C端组成。MLL1蛋白C端的PHD结构域、TA结构域和SET结构域均被融合伙伴蛋白序列替代(图3)。因此, 产生的MLL融合蛋白丧失了和C端结构域相关的部分功能, 但同时又获得了来自于伙伴蛋白的新功能, 从而引起了下游调控基因的异常表达。

迄今为止, 已经有60多种“伙伴”基因被发现可以与MLL1的N末端部分进行融合。其中, 最常见的五种融合蛋白为细胞核转录因子蛋白: MLL-AF4(t(4;11)(q21;q23)); MLL-AF9(t(9;11)(p22;q23)); MLL-ENL(t(11;19)(q23;p13.3)); MLL-AF10(t(10;11)(p12;q23)); MLL-ELL(t(11;19)(q23;p13.1))<sup>[58]</sup>。他们约占所有MLL1融合蛋白的80%。在ALL病例中最常见的伙伴基因是AF4, AML病例中最常见的伙伴基因是AF9, ENL在ALL和AML中都有发现。这些融合蛋白可以与一些RNA聚合酶II(RNA polymerase II, Pol II)相关延伸因子相互作用, 构成一种被称之为超级延伸复合物(super elongation complex, SEC)的大分子复合物<sup>[59]</sup>。该复合物通过Pol II使得MLL1所调控的Hox基因的表达异常, 进而引起一系列的严重后果, 诱发MLL白血病的发生。

第二类融合伙伴蛋白包括一些细胞质蛋白, 例如GAS7、EEN、AF1p或Eps15、AF6和AFX等。它们存在coiled-coil寡聚结构域, 这些结构域对于它们的转化潜能十分重要<sup>[60]</sup>。另外, 一类相对较小的种类是septins(SEPT2、SEPT5、SEPT6、SEPT9和SEPT11), 哺乳动物的septins家族是一种胞质蛋白, 他们在很多生理活动例如细胞周期调控、囊泡运输和细胞膜的划分中都起着十分重要的作用<sup>[61]</sup>。第四类融合伙伴蛋白包括组蛋白乙酰转移酶CBP和p300<sup>[62]</sup>。此外, 还有一种比较特殊的MLL基因重排MLL-PTD, 它是MLL基因的第5到第12位外显子发生部分串联重复所形成的MLL1自身融合蛋白(图3)<sup>[63]</sup>。可以预见, 将来还会有更多种类的MLL1融合蛋白被发现, 并且这些融合蛋白的致病机理将是非常复杂的。

#### 3.2 MLL1融合蛋白和MLL白血病

MLL1融合蛋白导致MLL白血病的分子机理目前尚未完全阐明。现在普遍认为, MLL1融合伙伴基因的存在对MLL1融合蛋白的致白血病能力不可或缺, 并且MLL1融合蛋白可以通过异常的表现遗传调控, 引起全基因组转录表达的紊乱。同时, 发生基因



MLL1基因易位重排会导致MLL1融合蛋白的产生,其主要断裂点位于RD结构域和PHD结构域之间。融合伙伴蛋白可以被分为五类, a: 细胞核转录因子蛋白,包括AF4、AF9、ENL、AF10和ELL; b: 细胞质蛋白,包括GAS7、EEN、AF1p或Eps15、AF6和AFX等; c: septins家族蛋白,包括SEPT2、SEPT5、SEPT6、SEPT9和SEPT11; d: 组蛋白乙酰转移酶CBP和p300; e: *MLL*基因重排MLL-PTD,它是*MLL*基因的第5到第12位外显子发生部分串联重复所形成的MLL自身融合蛋白。

Chromosome translocations of MLL1 generate chimeric proteins containing MLL1 N-terminus fused in-frame with distinct partner proteins. Partner proteins can be classified into five groups, a: the nuclear transcription factor protein AF4, AF9, ENL, AF10 and ELL; b: cytoplasmic proteins such as GAS7, EEN, AF1p or Eps15, AF6 and AFX; c: septins, including SEPT2, SEPT5, SEPT6, SEPT9 and SEPT11; d: histone acetyltransferases p300 and CBP; e: MLL-PTD, which is a result of internal tandem duplication from the fifth to the twelfth exons.

图3 MLL1融合蛋白

Fig.3 MLL1 fusion proteins

重排的MLL1蛋白丧失了很多其原先正常的功能,这些都可能是MLL白血病的诱因<sup>[7]</sup>。

目前,一些MLL1融合蛋白介导的白血病的动物模型已经被人们构建出来帮助我们更好地了解MLL白血病。第一例*MLL-AF9*融合基因敲入的小鼠模型表现出了AML的症状,同时也伴随着偶尔的ALL症状<sup>[64]</sup>。构建出的*MLL-ENL*融合基因敲入小鼠,也表现出了AML的症状<sup>[65]</sup>。而小鼠中敲入的*MLL-CBP*融合基因只有在另外的化学诱导或者是辐射诱导的基础上,才使髓单核细胞增生从而导致致命的骨髓增殖紊乱。这说明*MLL-CBP*融合和*MLL-ENL*或者*MLL-AF9*融合引起的发病机理可能是不同的<sup>[66]</sup>。*MLL-CBP*融合基因的小鼠模型表现出一系列造血相关疾病,包括AML、CMML(chronic myelomonocytic leukemia)或者MDS(myelodysplastic syndrome)。这些小鼠模型表现出的不同症状和在

人类白血病中相关融合蛋白引起的症状是相吻合的,比如*MLL-ENL*和*MLL-AF9*的融合通常在AML中发现,而*MLL-CBP*融合通常在MDS、t-MDS或t-AML中发现。

在人类白血病中,*MLL-AF4*多被发现存在于ALL的婴儿和成人的早期B细胞中,*MLL-AF4*融合基因敲入会导致淋巴/骨髓复合型增生和B细胞淋巴瘤<sup>[67]</sup>。有趣的是,持续表达*MLL-AF9*和*MLL-AF4*融合基因的小鼠,如果*MLL*的表达量不变,只会导致血液恶性肿瘤,这就预示着MLL1融合蛋白可能只和造血细胞中的肿瘤发生有关。

此外,小鼠骨髓中逆转录病毒介导的基因转移为了解MLL1融合蛋白的功能提供了一个很好的途径。用这种方法发现,*MLL-GAS7*可以诱导AML、ALL或者是急性混合型白血病的发生<sup>[68]</sup>,而*MLL-ENL*可以诱导ALL的发生<sup>[69]</sup>。这些动物模型对更好

地了解MLL融合蛋白和白血病发生发展的关系奠定了坚实的基础。

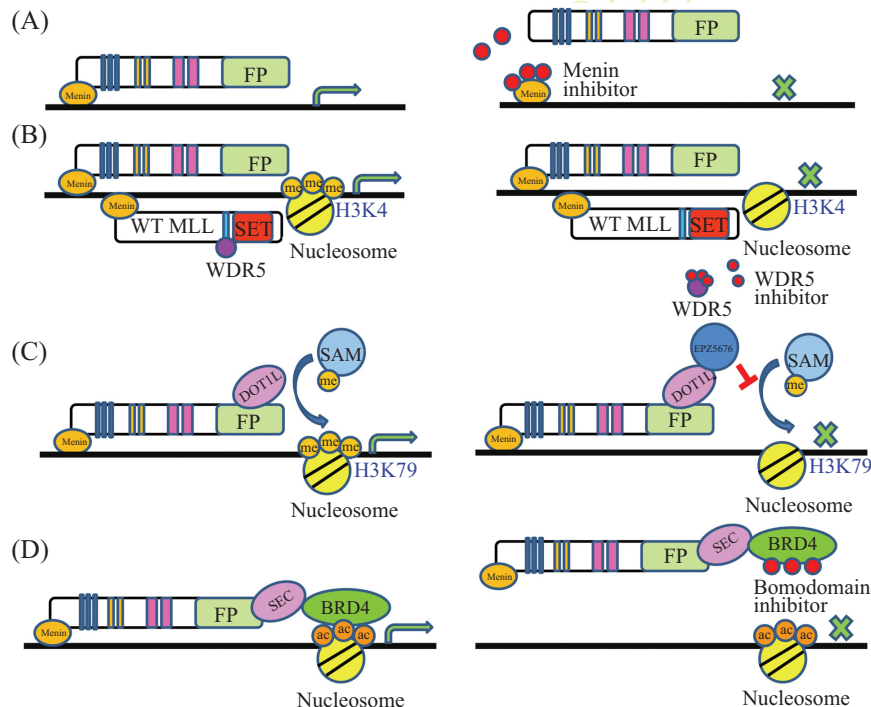
#### 4 针对MLL1的新型白血病治疗靶点

MLL白血病具有独特的临床特性, 常规化疗不理想, 预后不良, 所以需要针对MLL白血病的生物学性质开发新的治疗手段和药物。鉴于MLL1及MLL1融合蛋白在白血病中的关键作用, 针对于MLL1的相关药物设计是目前研究的一个热点<sup>[70]</sup>。MLL1和MLL1融合蛋白存在于一些调控转录激活的大分子复合物中, 这些复合物的形成对于促进MLL1融合蛋白诱导的白血病发生有十分重要的作用<sup>[6]</sup>。因此, 从

破坏这些大分子复合物的相互作用着手, 寻找新的药物靶点, 将为MLL1白血病的治疗提供新的思路。

##### 4.1 MLL1与Menin

Menin是将野生型MLL1和MLL1融合蛋白招募到靶基因的关键蛋白, 并能作为癌基因辅助因子参与上调特定基因的转录, 促进MLL1融合蛋白诱导的白血病的发生<sup>[71]</sup>。阻断MLL1融合蛋白和Menin的相互作用将完全破坏MLL1融合蛋白的致癌作用, 因此MLL1和Menin的作用位点是一个理想的药物靶点(图4A)。若干实验室已经开展了以阻断MLL1和Menin相互作用为目标的小分子化合物筛选以及设计基于MLL1结构的多肽类似物<sup>[72-74]</sup>。目前, 已经



A: MLL1与Menin: Menin是将野生型MLL1和MLL1融合蛋白招募到靶基因的关键蛋白, 一些以阻断MLL1和Menin相互作用为目标的小分子化合物可以破坏MLL1融合蛋白和Menin的相互作用, 从而使MLL1融合蛋白不能被招募到靶基因上; B: MLL1与WDR5: MLL1融合蛋白需要有活性的野生型MLL1的参与才能导致白血病的发生。而MLL1和WDR5的相互作用对于MLL1复合物的甲基转移酶活性是至关重要的, 因此破坏MLL1与WDR5的相互作用也是一个潜在的药物靶点; C: MLL1与DOT1L: MLL1融合蛋白可能通过招募DOT1L, 导致H3K79异常地高度甲基化, 从而引发白血病。EPZ5676作为一种SAM的结构类似物, 可以通过与SAM竞争性地结合DOT1L从而抑制H3K79的甲基化; D: MLL1与BRD4: BRD4一方面可以识别乙酰化的赖氨酸残基, 另一方面可以通过与SEC的相互作用招募MLL1融合蛋白到特定的染色体位点, 产生异常的转录调控。一些小分子抑制物能模拟乙酰化的赖氨酸残基, 从而阻碍BRD4与乙酰化的赖氨酸残基的相互作用。

A: MLL1 and Menin: Menin is a critical protein in the process of recruiting both the wild-type MLL1 and MLL1-fusion protein to their target genes. Some compounds can disrupt the interaction between MLL1 and Menin, thus inhibiting recruitment of MLL1. B: MLL1 and WDR5: MLL Leukemia needs both the activities from wild-type MLL1 and MLL1-fusion protein. The interaction between MLL1 and WDR5 is important for methyltransferase activity of MLL1 complex. Therefore blocking the MLL1-WDR5 interaction is a potential way for therapeutic development towards MLL; C: MLL1 and DOT1L: MLL1-fusion protein leads MLL by recruiting DOT1L to methylate H3K79. EPZ5676, as a cofactor (SAM) structural analog, mimics the binding of SAM to DOT1L and inhibits the aberrant hypermethylation of H3K79; D: MLL1 and BRD4: BRD4 recruits MLL1-fusion protein to particular chromosomal locus through SEC, resulting in aberrant transcriptional regulation. Some compounds will disrupt BRD4 binding to acetylated lysine and then block the recruitment of MLL1-fusion protein.

图4 MLL1白血病的药物靶点

Fig.4 Therapeutic targeting of mixed lineage leukemia



筛选并优化了一些小分子化合物,能够竞争性地抑制MLL1的结合,初步的细胞学实验显示,这些小分子化合物对MLL白血病细胞的生长起到了明显的抑制作用,诱导白血病细胞的凋亡和分化,下调了一些与致癌活性相关基因的表达,表明以MLL1和Menin相互作用为靶点筛选新的治疗药物是可行的<sup>[74]</sup>。

#### 4.2 MLL1与WDR5

在大部分情况下,MLL1的染色体易位只发生在单等位基因上,即还存在着一个野生型的MLL1。如果敲除野生型的MLL等位基因,单独的MLL1融合蛋白是不能导致白血病发生的,说明野生型MLL1的活性对MLL1融合蛋白导致的白血病生成是必需的<sup>[75]</sup>。因此特异性地抑制野生型MLL1的活性是一个可能的治疗白血病的途径(图4B)。目前,已知MLL1和WDR5的相互作用对于MLL1复合物的甲基转移酶活性是至关重要的,并且只有MLL1的复合物需要WDR5来维持活性,而其他的MLL家族蛋白(MLL2/MLL3/MLL4/Set1A/Set1B)不需要WDR5<sup>[76]</sup>。基于WDR5-MLL1的复合物结构信息,人们已经设计了多肽类似物可以特异性地阻断MLL1和WDR5的相互作用,抑制MLL1的甲基转移酶活性而对其他的MLL家族蛋白活性没有影响<sup>[77]</sup>。这个多肽类似物可以特异性地阻滞MLL白血病细胞的增殖,而不影响正常的骨髓细胞或者非MLL细胞,证明了MLL1-WDR5相互作用位点是一个潜在的药物靶点<sup>[77]</sup>。

#### 4.3 MLL1与Dot1L

Dot1L是一种催化组蛋白H3第79位赖氨酸(H3K79)甲基化的酶,是首个被发现的无SET结构域的组蛋白赖氨酸甲基转移酶。组蛋白H3K79甲基化对染色质沉默区域的建立、维持至关重要<sup>[78]</sup>。人们发现, DOT1L和多种MLL1融合蛋白例如AF4、AF9、AF10、AF17、ENL都有直接或者间接的相互作用<sup>[78-79]</sup>。MLL1融合蛋白可能通过招募DOT1L,导致H3K79异常的高度甲基化,从而引发白血病<sup>[78-79]</sup>。因此DOT1L可以作为治疗MLL白血病的一个很好的靶点。在这个方向上一个比较重要的进展是一种小分子药物EPZ5676<sup>[80]</sup>。它是一种SAM的结构类似物,通过与SAM竞争性地结合DOT1L从而抑制H3K79的甲基化(图4C)。它只特异性地识别DOT1L,而不识别其他的甲基转移酶。它能特异性地杀死带有MLL1易位的急性白血病细胞,而对不涉及MLL1重排的细胞系没有影响。在小鼠模型中该抑制剂可

以完全消除肿瘤而没有明显的副作用<sup>[80]</sup>。2012年9月,该药物进入一期临床试验,这也是第一个进入临床试验的甲基转移酶抑制物<sup>[81]</sup>。

#### 4.4 MLL1与BRD4

组蛋白的乙酰化/去乙酰化与基因调控密切相关,组蛋白乙酰化水平的异常在白血病细胞的发展、增殖和分化中起着很重要的作用<sup>[82]</sup>。乙酰化的赖氨酸残基可以被Bromo结构域识别,许多染色体相关蛋白都含有Bromo结构域,包括BET家族蛋白(BRD2、BRD3、BRD4)<sup>[83]</sup>。其中, BRD4已被证实和MLL1重排引起的白血病有关<sup>[84]</sup>。它一方面可以识别乙酰化的赖氨酸残基,另一方面可以与PAFc(polymerase-associated factor complex)和SEC(super elongation complex)相互作用,招募MLL1融合蛋白到特定的染色体位点,产生异常的转录调控。目前,已经有多种小分子抑制物模拟了乙酰化的赖氨酸残基,能够阻碍BRD4与乙酰化的赖氨酸残基的相互作用(图3)。比如在模型细胞中小分子药物I-BET151<sup>[85]</sup>或者JQ1<sup>[84]</sup>都能特异性地抑制白血病的发生,虽然发挥作用的具体分子机制还有争论。

此外,目前很多小分子抑制物都被发现能够抑制MLL白血病细胞的生长,包括DNMT抑制物<sup>[86]</sup>、PTEFb抑制物<sup>[87]</sup>、AF4-AF9相互作用抑制物<sup>[88]</sup>、GSK-3抑制物<sup>[89]</sup>和FLT3抑制物<sup>[90]</sup>。可以预料,随着人们对MLL1融合蛋白致病机制的进一步了解,还会有更多的靶点被鉴定出来。

## 5 总结

MLL1蛋白在基因调控和疾病发生中发挥着十分重要的作用。除了组蛋白甲基转移酶活性外,MLL1还具有很多其他的功能,极大地增加了它们修饰染色体和调节基因表达的复杂性。涉及MLL基因的染色体易位会导致产生MLL1融合蛋白,引起异常转录调控从而引发MLL白血病。对MLL1融合蛋白以及野生型MLL1蛋白结构和功能的研究将对我们深入了解MLL白血病的发生发展机理提供宝贵的线索。随着人们对MLL1蛋白的研究积累,一些新的治疗手段及小分子药物将逐步被发现,为治疗MLL白血病提供更多的可能性。

## 参考文献 (References)

- 1 Chi P, Allis CD, Wang GG. Covalent histone modifications—

- miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(7): 457-69.
- 2 Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR. Histone lysine methylation dynamics: Establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell* 2012; 48(4): 491-507.
  - 3 Krivtsov AV, Armstrong SA. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(11): 823-33.
  - 4 Zieminska-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R, 3rd, Patel Y, Harden A, *et al.* Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(23): 10735-9.
  - 5 Ansari KI, Mandal SS. Mixed lineage leukemia: Roles in gene expression, hormone signaling and mRNA processing. *FEBS J* 2010; 277(8): 1790-804.
  - 6 Ballabio E, Milne TA. Molecular and epigenetic mechanisms of MLL in human leukemogenesis. *Cancers (Basel)* 2012; 4(3): 904-44.
  - 7 Muntean AG, Hess JL. The pathogenesis of mixed-lineage leukemia. *Annu Rev Pathol* 2012; 7: 283-301.
  - 8 Soshnikova N, Duboule D. Epigenetic regulation of Hox gene activation: the waltz of methyls. *Bioessays* 2008; 30(3): 199-202.
  - 9 Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 1995; 378(6556): 505-8.
  - 10 Yu BD, Hanson RD, Hess JL, Horning SE, Korsmeyer SJ. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(18): 10632-6.
  - 11 Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* 1997; 90(5): 1799-806.
  - 12 Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, *et al.* MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 2002; 10(5): 1107-17.
  - 13 Terranova R, Agherbi H, Boned A, Meresse S, Djabali M. Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(17): 6629-34.
  - 14 Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher JK, Ernst P. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 324-37.
  - 15 McMahon KA, Hiew SY, Hadjur S, Veiga-Fernandes H, Menzel U, Price AJ, *et al.* Mll has a critical role in fetal and adult hematopoietic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 2007; 1(3): 338-45.
  - 16 Guenther MG, Jenner RG, Chevalier B, Nakamura T, Croce CM, Canaani E, *et al.* Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(24): 8603-8.
  - 17 Milne TA, Dou Y, Martin ME, Brock HW, Roeder RG, Hess JL. MLL associates specifically with a subset of transcriptionally active target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(41): 14765-70.
  - 18 Scharf S, Zech J, Bursen A, Schraets D, Oliver PL, Kliem S, *et al.* Transcription linked to recombination: A gene-internal promoter coincides with the recombination hot spot II of the human MLL gene. *Oncogene* 2007; 26(10): 1361-71.
  - 19 Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, *et al.* Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(3): 749-54.
  - 20 Takeda S, Chen DY, Westergaard TD, Fisher JK, Rubens JA, Sasagawa S, *et al.* Proteolysis of MLL family proteins is essential for topoisomerase-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev* 2006; 20(17): 2397-409.
  - 21 Tyagi S, Chabes AL, Wysocka J, Herr W. E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell* 2007; 27(1): 107-19.
  - 22 Mishra BP, Ansari KI, Mandal SS. Dynamic association of MLL1, H3K4 trimethylation with chromatin and Hox gene expression during the cell cycle. *FEBS J* 2009; 276(6): 1629-40.
  - 23 Caslini C, Connelly JA, Serna A, Broccoli D, Hess JL. MLL associates with telomeres and regulates telomeric repeat-containing RNA transcription. *Mol Cell Biol* 2009; 29(16): 4519-26.
  - 24 Ansari KI, Hussain I, Das HK, Mandal SS. Overexpression of human histone methylase MLL1 upon exposure to a food contaminant mycotoxin, deoxynivalenol. *FEBS J* 2009; 276(12): 3299-307.
  - 25 Zhu B, Mandal SS, Pham AD, Zheng Y, Erdjument-Bromage H, Batra SK, *et al.* The human PAF complex coordinates transcription with events downstream of RNA synthesis. *Genes Dev* 2005; 19(14): 1668-73.
  - 26 Lim DA, Huang YC, Swigut T, Mirick AL, Garcia-Verdugo JM, Wysocka J, *et al.* Chromatin remodelling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells. *Nature* 2009; 458(7237): 529-33.
  - 27 Akbarian S, Huang HS. Epigenetic regulation in human brain-focus on histone lysine methylation. *Biol Psychiatry* 2009; 65(3): 198-203.
  - 28 Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of *Drosophila* trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 1992; 71(4): 691-700.
  - 29 Cosgrove MS, Patel A. Mixed lineage leukemia: A structure-function perspective of the MLL1 protein. *FEBS J* 2010; 277(8): 1832-42.
  - 30 Zeleznik-Le NJ, Harden AM, Rowley JD. 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(22): 10610-4.
  - 31 Adler HT, Chinery R, Wu DY, Kussick SJ, Payne JM, Fornace AJ, Jr, *et al.* Leukemic HRX fusion proteins inhibit GADD34-induced apoptosis and associate with the GADD34 and hSNF5/INI1 proteins. *Mol Cell Biol* 1999; 19(10): 7050-60.
  - 32 Caslini C, Shilatfard A, Yang L, Hess JL. The amino terminus of the mixed lineage leukemia protein (MLL) promotes cell cycle arrest and monocytic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(6): 2797-802.
  - 33 Yano T, Nakamura T, Blechman J, Sorio C, Dang CV, Geiger B, *et al.* Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(6): 2797-802.

- Sci USA 1997; 94(14): 7286-91.
- 34 Xia ZB, Anderson M, Diaz MO, Zeleznik-Le NJ. MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(14): 8342-7.
- 35 Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. The PHD finger: Implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 1995; 20(2): 56-9.
- 36 Fair K, Anderson M, Bulanova E, Mi H, Tropschug M, Diaz MO. Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21(10): 3589-97.
- 37 Wang J, Muntean AG, Wu L, Hess JL. A subset of mixed lineage leukemia proteins has plant homeodomain (PHD)-mediated E3 ligase activity. *J Biol Chem* 2012; 287(52): 43410-6.
- 38 Wang Z, Song J, Milne TA, Wang GG, Li H, Allis CD, *et al.* Pro isomerization in MLL1 PHD3-bromo cassette connects H3K4me readout to CyP33 and HDAC-mediated repression. *Cell* 2010; 141(7): 1183-94.
- 39 Chen J, Santillan DA, Koonce M, Wei W, Luo R, Thirman MJ, *et al.* Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization. *Cancer research* 2008; 68(15): 6199-207.
- 40 Muntean AG, Giannola D, Udager AM, Hess JL. The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation. *Blood* 2008; 112(12): 4690-3.
- 41 Garcia-Alai MM, Allen MD, Joerger AC, Bycroft M. The structure of the FYR domain of transforming growth factor beta regulator 1. *Protein Sci* 2010; 19(7): 1432-8.
- 42 Hsieh JJ, Ernst P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol* 2003; 23(1): 186-94.
- 43 Prasad R, Yano T, Sorio C, Nakamura T, Rallapalli R, Gu Y, *et al.* Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(26): 12160-4.
- 44 Ernst P, Wang J, Huang M, Goodman RH, Korsmeyer SJ. MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* 2001; 21(7): 2249-58.
- 45 Herz HM, Garruss A, Shilatifard A. SET for life: Biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. *Trends Biochem Sci* 2013; 38(12): 621-39.
- 46 Qian C, Zhou MM. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(23): 2755-63.
- 47 Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL, *et al.* Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13(8): 713-9.
- 48 Patel A, Dharmarajan V, Vought VE, Cosgrove MS. On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex. *J Biol Chem* 2009; 284(36): 24242-56.
- 49 Southall SM, Wong PS, Odho Z, Roe SM, Wilson JR. Structural basis for the requirement of additional factors for MLL1 SET domain activity and recognition of epigenetic marks. *Mol Cell* 2009; 33(2): 181-91.
- 50 Yokoyama A, Somervaille TC, Smith KS, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Cleary ML. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* 2005; 123(2): 207-18.
- 51 Huang J, Gurung B, Wan B, Matkar S, Veniaminova NA, Wan K, *et al.* The same pocket in menin binds both MLL and JUND but has opposite effects on transcription. *Nature* 2012; 482(7386): 542-6.
- 52 Ayton PM, Chen EH, Cleary ML. Binding to nonmethylated CpG DNA is essential for target recognition, transactivation, and myeloid transformation by an MLL oncoprotein. *Mol Cell Biol* 2004; 24(23): 10470-8.
- 53 Cierpicki T, Risner LE, Grembecka J, Lukasik SM, Popovic R, Omonkowska M, *et al.* Structure of the MLL CXXC domain-DNA complex and its functional role in MLL-AF9 leukemia. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(1): 62-8.
- 54 De Guzman RN, Goto NK, Dyson HJ, Wright PE. Structural basis for cooperative transcription factor binding to the CBP co-activator. *J Mol Biol* 2006; 355(5): 1005-13.
- 55 Patel A, Dharmarajan V, Cosgrove MS. Structure of WDR5 bound to mixed lineage leukemia protein-1 peptide. *J Biol Chem* 2008; 283(47): 32158-61.
- 56 Song JJ, Kingston RE. WDR5 interacts with mixed lineage leukemia (MLL) protein via the histone H3-binding pocket. *J Biol Chem* 2008; 283(50): 35258-64.
- 57 Patel A, Vought VE, Swatkoski S, Viggiano S, Howard B, Dharmarajan V, *et al.* Automethylation activities within the mixed lineage leukemia-1 (MLL1) core complex reveal evidence supporting a "two-active site" model for multiple histone H3 lysine 4 methylation. *J Biol Chem* 2014; 289(2): 868-84.
- 58 Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, *et al.* New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 2009; 23(8): 1490-9.
- 59 Luo Z, Lin C, Shilatifard A. The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(9): 543-7.
- 60 So CW, Lin M, Ayton PM, Chen EH, Cleary ML. Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* 2003; 4(2): 99-110.
- 61 Hall PA, Russell SE. The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol* 2004; 204(4): 489-505.
- 62 Taki T, Sako M, Tsuchida M, Hayashi Y. The t(11;16)(q23;p13) translocation in myelodysplastic syndrome fuses the MLL gene to the CBP gene. *Blood* 1997; 89(11): 3945-50.
- 63 Schichman SA, Caligiuri MA, Gu Y, Strout MP, Canaani E, Bloomfield CD, *et al.* ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(13): 6236-9.
- 64 Corral J, Lavenir I, Impey H, Warren AJ, Forster A, Larson TA, *et al.* An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: A method to create fusion oncogenes. *Cell* 1996; 85(6): 853-61.
- 65 Forster A, Pannell R, Drynan LF, McCormack M, Collins EC, Daser A, *et al.* Ineering *de novo* reciprocal chromosomal translocations associated with Mll to replicate primary events of human cancer. *Cancer Cell* 2003; 3(5): 449-58.
- 66 Wang J, Iwasaki H, Krivtsov A, Febbo PG, Thorner AR, Ernst P, *et al.* Conditional MLL-CBP targets GMP and models therapy-

- related myeloproliferative disease. *EMBO J* 2005; 24(2): 368-81.
- 67 Chen W, Li Q, Hudson WA, Kumar A, Kirchhof N, Kersey JH. A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* 2006; 108(2): 669-77.
- 68 So CW, Karsunky H, Passegue E, Cozzio A, Weissman IL, Cleary ML. MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell* 2003; 3(2): 161-71.
- 69 Zeisig BB, Garcia-Cuellar MP, Winkler TH, Slany RK. The oncoprotein MLL-ENL disturbs hematopoietic lineage determination and transforms a biphenotypic lymphoid/myeloid cell. *Oncogene* 2003; 22(11): 1629-37.
- 70 Liedtke M, Cleary ML. Therapeutic targeting of MLL. *Blood* 2009; 113(24): 6061-8.
- 71 Cierpicki T, Grembecka J. Challenges and opportunities in targeting the menin-MLL interaction. *Future Med Chem* 2014; 6(4): 447-62.
- 72 Zhou H, Liu L, Huang J, Bernard D, Karatas H, Navarro A, *et al.* Structure-based design of high-affinity macrocyclic peptidomimetics to block the menin-mixed lineage leukemia 1 (MLL1) protein-protein interaction. *J Med Chem* 2013; 56(3): 1113-23.
- 73 Li L, Zhou R, Geng H, Yue L, Ye F, Xie Y, *et al.* Discovery of two aminoglycoside antibiotics as inhibitors targeting the menin-mixed lineage leukaemia interface. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24(9): 2090-3.
- 74 Grembecka J, He S, Shi A, Purohit T, Muntean AG, Sorenson RJ, *et al.* Menin-MLL inhibitors reverse oncogenic activity of MLL fusion proteins in leukemia. *Nat Chem Biol* 2012; 8(3): 277-84.
- 75 Thiel AT, Blessington P, Zou T, Feather D, Wu X, Yan J, *et al.* MLL-AF9-induced leukemogenesis requires coexpression of the wild-type Mll allele. *Cancer Cell* 2010; 17(2): 148-59.
- 76 Cao F, Chen Y, Cierpicki T, Liu Y, Basrur V, Lei M, *et al.* An Ash2L/RbBP5 heterodimer stimulates the MLL1 methyltransferase activity through coordinated substrate interactions with the MLL1 SET domain. *PLoS One* 2010; 5(11): e14102.
- 77 Cao F, Townsend EC, Karatas H, Xu J, Li L, Lee S, *et al.* Targeting MLL1 H3K4 methyltransferase activity in mixed-lineage leukemia. *Mol Cell* 2014; 53(2): 247-61.
- 78 Okada Y, Feng Q, Lin Y, Jiang Q, Li Y, Coffield VM, *et al.* hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* 2005; 121(2): 167-78.
- 79 Deshpande AJ, Chen L, Fazio M, Sinha AU, Bernt KM, Banka D, *et al.* Leukemic transformation by the MLL-AF6 fusion oncogene requires the H3K79 methyltransferase Dot1l. *Blood* 2013; 121(13): 2533-41.
- 80 Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Basavapathruni A, Jin L, Boriack-Sjodin PA, *et al.* Potent inhibition of DOT1L as treatment of MLL-fusion leukemia. *Blood* 2013; 122(6): 1017-25.
- 81 Basavapathruni A, Olhava EJ, Daigle SR, Therkelsen CA, Jin L, Boriack-Sjodin PA, *et al.* Nonclinical pharmacokinetics and metabolism of EPZ-5676, a novel DOT1L histone methyltransferase inhibitor. *Biopharm Drug Dispos* 2014; 35(4): 237-52.
- 82 Wang Z, Zang C, Cui K, Schones DE, Barski A, Peng W, *et al.* Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell* 2009; 138(5): 1019-31.
- 83 Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; 468(7327): 1067-73.
- 84 Zuber J, Shi J, Wang E, Rappaport AR, Herrmann H, Sison EA, *et al.* RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. *Nature* 2011; 478(7370): 524-8.
- 85 Dawson MA, Prinjha RK, Dittmann A, Giotopoulos G, Bantscheff M, Chan WI, *et al.* Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. *Nature* 2011; 478(7370): 529-33.
- 86 Schafer E, Irizarry R, Negi S, McIntyre E, Small D, Figueroa ME, *et al.* Promoter hypermethylation in MLL-r infant acute lymphoblastic leukemia: Biology and therapeutic targeting. *Blood* 2010; 115(23): 4798-809.
- 87 Mueller D, Garcia-Cuellar MP, Bach C, Buhl S, Maethner E, Slany RK. Misguided transcriptional elongation causes mixed lineage leukemia. *PLoS Biol* 2009; 7(11): e1000249.
- 88 Srinivasan RS, Nesbit JB, Marrero L, Erfurth F, LaRussa VF, Hemenway CS. The synthetic peptide PFWT disrupts AF4-AF9 protein complexes and induces apoptosis in t(4;11) leukemia cells. *Leukemia* 2004; 18(8): 1364-72.
- 89 Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somerville TC, Cleary ML. Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature* 2008; 455(7217): 1205-9.
- 90 Armstrong SA, Kung AL, Mabon ME, Silverman LB, Stam RW, Den Boer ML, *et al.* Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell* 2003; 3(2): 173-83.