



刘强, 1989年获南京大学生理学学士, 之后赴美留学, 并先后于1997年、2000年获美国伊利诺大学理学博士学位、临床医学博士学位。2000年至2003年, 于纽约西奈山医学中心担任临床住院医师。2003年, 任职哈佛大学医学院, 从事肿瘤治疗的基础研究。2006年回国, 任华南肿瘤学国家重点实验室分子靶向治疗实验室主任、中山大学血液病研究所所长等职。刘强教授入选科技部重大科学研究项目(973)首席科学家, 教育部“长江学者”特聘教授, 国家自然科学基金委杰出青年基金获得者, 科技部中青年科技创新领军人才, 教育部创新团队带头人, 人社部“百千万人才工程”国家级人选, 卫生部“有突出贡献中青年专家”等; 兼任中国病理生理学会免疫专业委员会主任委员、中国抗癌协会整合肿瘤分会/肿瘤精准治疗专业委员会/肿瘤转化医学专业委员会副主任委员、中国细胞生物学会肿瘤细胞专业委员会副主任委员、中华医学会理事、中国病理生理学会常务理事、美国医学及生物工程院(AIMBE) Fellow、美国中华医学基金会(CMB)杰出教授。作为首席科学家承担973项目、国自然重点项目等基金项目, 并获得中国抗癌协会科技奖等科技奖励。围绕肿瘤靶向治疗的转化医学研究, 先后在*Nat Med*、*J Clin Oncol*、*Cell Res*、*Nat Commun*、*J Clin Invest*、*Cancer Cell*、*PNAS*、*Blood*、*Autophagy*等国际知名学术期刊上发表论著120余篇, 授权发明专利5项。

超级增强子的转录相分离模型与肿瘤研究进展

雷鑫星 刘强*

(中山大学肿瘤防治中心, 华南肿瘤学国家重点实验室, 广州 510060)

摘要 超级增强子(super-enhancers, SEs)是驱动高转录水平的增强子簇。SEs驱动的网络在决定细胞身份方面发挥着重要作用。最近, 在SEs驱动的关键癌基因转录模型中引入了相分离(phase separation, PS)的概念。该文系统地讨论了转录PS模型里的主要元素, 通过分子间的作用力总结归纳了元素之间的关系, 并讲述了从SEs形成到转录激活延伸的事件。在表观遗传/基因改变下, SEs驱动的癌基因促进肿瘤的发生、进展、转移和耐药。生物物理学学科重新激发了科学家对肿瘤转录调控的思考。

关键词 超级增强子; 相分离; 转录; 癌症(肿瘤)

Transcriptional Phase Separation Model of Super-Enhancers and Advances in Cancer Research

LEI Xinxing, LIU Quentin*

(Sun Yat-Sen University Cancer Center, State Key Laboratory of Oncology in South China, Collaborative Innovation Center for Cancer Medicine, Guangzhou 510060, China)

收稿日期: 2022-02-07 接受日期: 2022-03-07

中国博士后科学基金(批准号: 2020TQ0375、2021M703716)资助的课题

*通讯作者。Tel: 020-87343177, E-mail: liuq9@mail.sysu.edu.cn

Received: February 7, 2022 Accepted: March 7, 2022

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2020TQ0375, 2021M703716)

*Corresponding author. Tel: +86-20-87343177, E-mail: liuq9@mail.sysu.edu.cn

Abstract SEs (super-enhancers) are clusters of enhancers that drive a high transcription level. SEs driven genes network play prominent roles in the decision of cell identity. Recently, PS (phase separation) of transcriptional machinery was reported as a model to explain high expression in proximal SEs. This review systematically discusses the principal factors in PS of transcriptional machinery. The relationship amongst factors by intermolecular force tells a story from SEs forming to transcriptional activation. Under epigenetic/genetic alterations, SEs driven oncogenes promote tumorigenesis, progression, metastasis, and drug resistance in cancer. Physical biology has renewed scientists' thinking on the regulation of cancer cells transcription.

Keywords super-enhancer; phase separation; transcription; cancer (tumor)

1 转录调控模型——超级增强子上的相分离

基因的表达需要在转录水平上被精确地调控,而超级增强子(super-enhancers, SEs)驱动基因决定了细胞的特征和功能^[1]。近些年来,科学家发现SEs位点附近出现相分离(phase separation, PS)现象,且其与转录水平高度相关^[2]。本章节我们将根据转录事件参与的元素以及发生顺序讲述SEs上的PS过程。

1.1 超级增强子“定位器”

普通增强子(typical enhancer, TE)包含一段短DNA区域(50~1 500 bp),它可以与特定基因启动子协调招募转录激活因子,增强转录活性^[3]。SE是一段包含多个TEs的脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)区域,它可以维持更高水平的基因转录,往往涉及决定细胞命运的基因^[4]。在讲述SE形成之前,我们提出了一个问题:谁决定了细胞中SEs的位置? DNA通常由4种碱基组成,在人体细胞中含有30亿碱基对。碱基的排列组合形成了特异的序列信号,那么我们通过检索已知的碱基序列可以很快比对到对应的DNA位置。如前所述,SE本质是DNA区域,当拥有了DNA二维坐标后,我们可以精确定位SEs的位置。

在细胞中有一类生物大分子可以行使DNA定位的功能,我们称之为“定位器”。很明显“定位器”需要拥有与带有特定碱基排列序列的DNA相互作用的能力,而转录因子(transcription factor, TF)中的DNA结合结构域(DNA-binding domain, DBD)具有这种能力,TFs通过DBDs识别特定的序列基序(motif)与DNA结合^[5]。带负电荷的DNA通过多种相互作用力来包裹带正电荷的组蛋白,而TFs通过DBDs与DNA互补结合,其中正电荷氨基酸[精氨酸(R)、组氨酸(H)和赖氨酸(K)]占据DBDs的主要部分。然而当TFs靠近DNA的同时也会靠近组蛋白,由于这

些组蛋白与DBDs具有相同的电荷特性,它们会产生一种排斥力。因此,TFs与DNA的结合具有高度的动态性,染色质的开放程度影响了TFs与DNA的结合。因为碱基序列在DNA上的位置是固定的,所以具有不同DBD类型的TFs能够选择性地定位到对应的位置上。例如在胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)中,YY1识别的DNA motif主要富集在启动子区,而OCT4则优先与增强子区结合^[6]。除了TFs外还存在另外一类特殊的“定位器”,包括锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶和基于聚类规则间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR-associated protein, Cas)的核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)引导DNA内切酶^[7]。它们主要用于基因编辑,虽然这些“定位器”经过改造后可以参与SE相关的转录事件,但是这些人为干预的行为超出了本篇综述的讨论范围。

“定位器”定位、结合在DNA后可以进一步在附近空间展现出广泛的功能,(1)增强子“定位器”通过招募DNA/组蛋白修饰“书写器”或“擦除器”进而添加或删除活跃的增强子和启动子标记。组蛋白包含大量的赖氨酸(K)残基,这些位点的修饰在细胞的表观遗传活动中具有重要意义。例如,在增强子区域的组蛋白H3的K27乙酰化(H3K27ac)、K4单甲基化(H3K4me1)修饰和在启动子区域的组蛋白H3的K4三甲基化(H3K4me3)修饰等能促进转录激活。在前B细胞中STAT5(TF)增加了Myc相关SE位点上H3K27ac的丰度,但是当IKAROS(TF)占领这个位置后增强子的标记会被抹去,依赖STAT5的组蛋白乙酰化和依赖IKAROS的组蛋白去乙酰化之间的平衡决定了细胞转化的方向^[8]。虽然SE“定位器”(STAT5和IKAROS)都定位到相似的DNA空间位置,但是由于它们招募“书写器”和“擦除器”的区别导致细胞的

最终命运截然相反。(2) 结构“定位器”影响染色质三维结构, 它们主要结合在增强子和启动子的空间, 为其他调控分子提供可及性。例如, CTCF在增强子和启动子区域显著富集, 与染色质调节蛋白Cohesin共同调节SEs并决定细胞命运走向^[9]。YY1是另一种结构调节分子, 它能产生一个环将DNA在三维空间中连接在一起, 介导增强子与启动子之间的相互作用^[10]。(3) PS“定位器”招募辅助因子诱导转录PS。例如, Arie是一种多功能TF, 分析显示Arie会富集在髓质胸腺上皮细胞的SE中。Aire(“定位器”)通过TOP1与参与转录的蛋白[BRD4、CDK9和RNA聚合酶II(RNA POL II)]相互作用^[11]。

由于“定位器”定位的DNA坐标是明确的, 那么“定位器”影响的下游基因转录也是特异的。转录调控因子和编程因子通过控制特异性的基因表达来建立和维持特定的细胞状态^[12]。少数关键TFs(master TFs)建立的转录控制程序对细胞身份起决定性作用。例如, SOX10被鉴定为乳腺细胞的细胞重编程因子, 它促进了基底样或管腔样乳腺肿瘤细胞向乳腺干/祖细胞的转化, 并参与肿瘤的侵袭和转移^[13]。我们根据功能总结了两种主要的TF类型。一类是参与SEs形成的TFs(详见小节“超级增强子‘书写器’和‘擦除器’”), 它们的激活结构域(transactivation domain, TAD)能与SE“书写器”相互作用。例如在结直肠癌细胞(colorectal cancer cells, CRCs)中, TCF4(Wnt通路的末端TF)占据了SEs区域并发挥重要作用, CRCs对Wnt通路的干扰非常敏感^[14], TCF4具有两个与p300相互作用的TAD, 而p300参与构建了新的增强子标记^[15]。另一类是直接决定细胞类型的TFs, 它们位于基因的启动子或SE上招募转录起始复合物(详见小节“超级增强子上的相分离”)。例如在神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)中, 两种类型的肿瘤细胞(肾上腺素能或间充质)是由不同的基因表达谱驱动的, SEs和相关的TFs网络在这两种细胞类型的相互转换中起着重要作用^[16]。

在这一小节中, 我们了解了DNA motif和SE“定位器”的关系, 接下来我们将介绍SE形成中的重要角色: “书写器”和“擦除器”。

1.2 超级增强子“书写器”和“擦除器”

当SE“定位器”到达目的地后, 就要开始它的下一步工作: 标记和擦除SEs(图1A)。SEs最常用的鉴定方法是利用master TF、辅助因子(如Mediator或

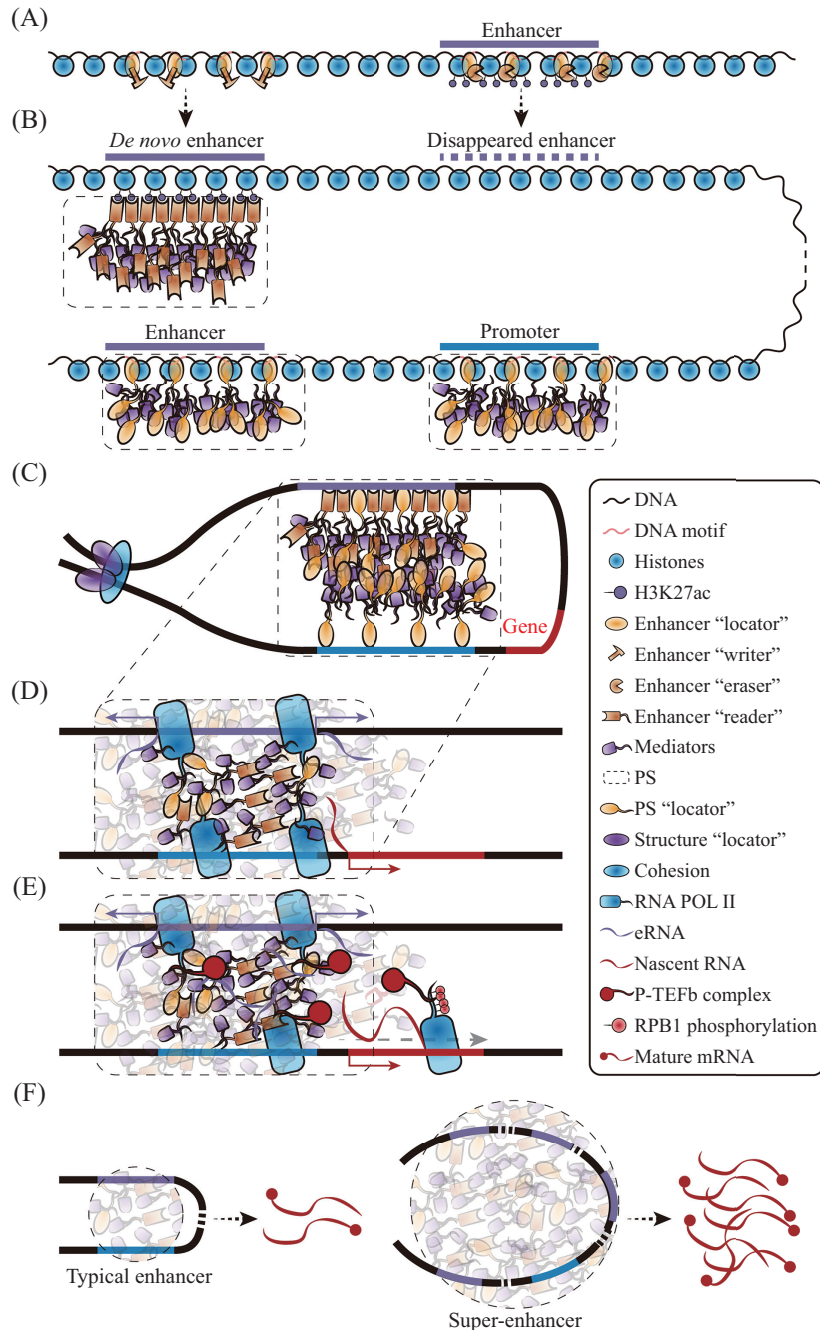
BRD4)或组蛋白修饰(H3K27ac)进行染色质沉淀-测序(chromatin immunoprecipitation-sequencing, ChIP-seq)实验。在乳腺分化过程中, STAT5在哺乳期间建立了Wap相关SE。ChIP-seq分析显示STAT5位于Wap相关SE的中心位置, 而H3K27ac标记的峰值则对称地位于距离前者中心200~500 bp的位置^[17], 这提示SE“定位器”(STAT5)占据DNA发生在SEs形成之前。Master TFs(SE“定位器”)在增强子产生之前首先识别DNA motif并与之结合, 因此这些TFs可以决定SEs形成或擦除的位置。SE“定位器”招募了SE“书写器”或SE“擦除器”(p300、HDAC等)并参与DNA或组蛋白的特定修饰(如H3K27ac), 这些修饰标记代表了SE的形成或消失。由于“书写器”或“擦除器”没有定位能力, 因此SE标记的过程是非特异的, 它取决于“定位器”的位置以及“定位器”能招募的分子类型。SE标记和DNA motif的区别在于是否可重写, 动态变化的SE标记位置决定了细胞的最终状态。

根据定义, SE覆盖的DNA区域范围比TE更广, 那么这种差异是怎么产生的呢? 以下是我们的三个假设, (1) “定位器”识别的DNA motif数量决定了TE和SE的长度。例如在ESC中SEs近端相关DNA motif比TEs更多, SEs更常被OCT4、SOX2、NANOG、SMAD3、STAT3和TCF3(“定位器”)占据^[14]。(2) 特定的染色质调节因子促进染色质重塑, 在开放染色质中“定位器”更容易进入参与SEs形成。(3) 特定的TF诱导PS, 招募更多的SE“书写器”并介导SEs标记。

在这一小节中, 我们了解了“书写器”、“擦除器”与SE的关系, 接下来我们将介绍SE标记后是如何被增强子“阅读器”识别的。

1.3 超级增强子“阅读器”

组蛋白富含带正电荷的赖氨酸, 而DNA中的磷酸盐具有很强的负电荷性质(pKa值在0附近)^[18], 它们通过离子键、氢键相互作用紧密结合。组蛋白的赖氨酸甲基化或乙酰化修饰可以消除原有正电荷并添加一个非极性基团。一方面, 在分子间相互作用力(如离子键、疏水效应等)的转换下, DNA和组蛋白结合变弱, 染色质变得疏松开放。另一方面, 组蛋白修饰可重建蛋白质表面构象, 并被“阅读器”识别并结合。增强子“阅读器”(识别H3K27ac修饰位点的BRD4)聚集在新生的TE或SE中。“阅读器”识别的过程也是非特异的, 它取决于“定位器”参与



A: 增强子的标记和擦除; B: 增强子的识别; C: 相分离形成; D: 转录起始; E: 转录延伸; F: 普通增强子与超级增强子的差异。

A: labelling and removing of enhancers; B: recognition of enhancers; C: formation of phase separation; D: transcription initiation; E: transcription elongation; F: difference between typical enhancer and super enhancer.

图1 转录相分离模型

Fig.1 Transcriptional phase separation model

的SE标记位置。

在细胞中, 含溴结构域蛋白(bromodomain-containing protein, BCP)作为“阅读器”负责识别、结合组蛋白特定赖氨酸(K)乙酰化修饰并激活转录信号。BRD4是含溴结构域和额外终端域(bromodomain and extraterminal, BET)蛋白家族成员之一, 它是一种广

谱性的转录辅助因子, 作为“阅读器”识别增强子并促进特异性位点的基因表达。BRD4(“阅读器”)识别、定位到SEs后, 通过招募转录辅助因子(如Mediators等)诱导PS发生(图1B)。BRD4的小分子抑制剂JQ1和iBET能够阻断组蛋白H3K27ac位点和BRD4溴结构域之间的相互作用^[19]。药物优先进入SEs的PS环

境,破坏了BRD4与增强子标记相互作用的稳定性,促进Mediator蛋白的解离,最终抑制RNA POL II的招募。在同样丰度的BRD4蛋白下,经过JQ1处理后原来结合在SEs区域的BRD4比TEs区域丢失更多。我们提出了两种可能的机制,(1) TEs的DNA或组蛋白修饰不同于SEs,具有特异性。TEs上可能存在其他“阅读器”与BRD4协同作用,因此即使抑制了BRD4的功能后,其他“阅读器”可能仍然占据在该空间影响转录功能。(2) TEs和SEs在增强子修饰上没有差异,但SEs对启动子近端空间构成了一个较大的转录PS环境。当JQ1进入细胞并随机扩散时,由于SEs空间范围广、形成PS较大,SEs自然是JQ1首当其冲的目标,其PS平衡更容易受到破坏。因此,SEs驱动的转录相对于TEs更容易受到影响。同样,当Master TFs和转录辅助因子(如Cohesion、Mediators等)活性降低时,SEs驱动的表达比TEs更加敏感^[20]。

在这一小节中,我们了解了“阅读器”与SE的关系,接下来我们将介绍SE上的PS是如何形成的。

1.4 超级增强子上的相分离

PS能够将细胞内的空间和时间细分为不同的生物功能亚区,它主要由包含固有无序区(intrinsically disordered region, IDR)的蛋白质组成^[21]。IDR的结构就像纱线一样,能够在特定的生理条件下纠缠在一起。空间内的环境(如盐浓度、温度、pH值)发生变化最终会影响IDRs之间的分子间相互作用力。例如,当IDRs富含某一类电荷时,自身蛋白倾向于相互排斥并且易溶于水,所以很难形成PS。研究表明,许多RNA结合蛋白在体外可自行形成PS的液滴,而在体内PS依赖于IDR和RNA的结合^[22]。FUS蛋白的IDR区域富含带正电荷的赖氨酸(K),而适当比例带负电荷的RNA相互作用达到电荷平衡后,它们便纠缠在一起形成PS。这类带电荷的IDR蛋白通常会与其他带相反电荷的配体分子共同参与PS的形成。另一项研究表明,DDX3X-IDR区域的去乙酰化修饰对液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)形成是必要的,赖氨酸(K)突变成谷氨酰胺(Q)(KQ突变)会破坏这种无膜细胞器,而赖氨酸(K)突变成精氨酸(R)(KR突变)对LLPS的稳定性影响非常小^[23]。赖氨酸(K)和精氨酸(R)是带正电荷的极性氨基酸,而谷氨酰胺(Q)是不带电荷的极性氨基酸。乙酰化修饰、KQ突变是IDR失去正电荷的过程,而KR突变后IDR在同

一段内仍然携带等量的电荷。因此,IDR的电荷变化对调控蛋白质进入或离开PS空间起着重要作用。

除了电荷因素外,IDR中的芳香族疏水残基也有助于PS形成。芳香族氨基酸有苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)和色氨酸(W),一些蛋白质内的结构域富含这类氨基酸并通过疏水效应形成PS结构^[24]。例如,Nephrin蛋白的胞内结构域通过酪氨酸(Y)和色氨酸(W)促进PS形成^[25]。RNA结合蛋白还包含一种特殊类型的IDR——朊病毒样结构域(prion-like domains, PLDs),这段区域不依赖于电荷极性吸引,具有自我组装和聚集的能力^[21]。因此,IDR蛋白之间可以通过疏水效应发生PS,它们不需要RNA或其他带电荷配体分子诱导形成。

LLPS主要通过分子间多价结合实现,其分子间相互作用力的模式已有比较详细的讨论^[26]。在细胞平均动能为98.6 °F(37 °C)时,一个共价键的断裂大约需要200~460 kJ/mol,而单个弱化学键很容易断裂,只需0.4~30 kJ/mol即可被打断^[18]。在弱化学键中,离子键和氢键相对较强,几个氢键的总和可以比两个硫原子之间的一个共价键更强。由于LLPS是通过多价弱化学键发生的,因此PS拥有足够的能量维持其独立的空间。但外界环境变化很容易使其中的蛋白结合或脱离,因此LLPS具有流动性,其内部的成分是动态变化的。一个含IDR的蛋白可以与另一个含IDR的蛋白相互作用,也可和同型蛋白发生PS^[27]。根据目前的证据,我们总结了SEs的PS发生应满足以下条件:(1)“定位器”和“阅读器”作为种子,核心空间的物质浓度达到PS的阈值(数量足够)。(2)含有IDRs结构域的蛋白质以保证足够的分子作用力维持PS稳定(多价结合)。(3)核心空间中IDR与IDR、核酸等配体之间的比例适当(电荷平衡)。(4)一个开放的染色质空间以能承载PS的体积(大小可控)。其中,增强子和启动子附近的“定位器”和“阅读器”是PS发生的起始因子,PS最终招募RNA POL II复合物并激活转录。

转录PS模型主要集中在几个关键元素(TFs、RNA POL II、Mediators、Cohesion、BRD4、p300和H3K27ac修饰),它们在基因组上的标记能够显示出SEs和TEs之间的差异^[4]。在前面的小节中,我们描述了SEs从TF(“定位器”)、p300(“书写器”)到H3K27ac修饰形成的时间轴。我们接下来继续讲述一个从

BRD4(“阅读器”)、Mediator到RNA POL II的事件。研究认为, TFs是SEs上PS的起始因子, BRD4、MED1等共激活因子是PS凝集物的主要成员^[2]。BRD4和MED1均含有较长的IDR区域, 在SEs中共同形成可逆的PS凝集物。BRD4-IDR中富含大量非极性脯氨酸(P)和极性谷氨酰胺(Q)^[28], 其中脯氨酸(P)使多肽链发生急剧弯折并降低了附近区域的结构灵活性, 同时对LLPS形成起到促进作用^[29-30]。MED1-IDR中含有大量带正电荷的赖氨酸(K), 缺乏带负电荷的天冬氨酸(D)和谷氨酸(E), 此时IDR区域处于偏向正电性质, PS发生需要相反的电荷与之匹配。磷酸化后的丝氨酸(S)和苏氨酸(T)会带上负电荷, 因此它们可以通过离子键吸引带正电荷的区域。磷酸化修饰在PS的调节过程发挥了重要作用^[31], 研究发现MED1-IDR富含丝氨酸(S)残基, 丝氨酸的磷酸化可以增加该区域负电荷以实现自身的电荷平衡并促进PS, 而当丝氨酸(S)突变为丙氨酸(A)后PS更难发生^[2]。最后MED1磷酸化促进了转录激活^[32]。

除BRD4外, 多个TFs(包括OCT4、SOX2、NANOG、RARa、GATA2、ER、p53和MYC等)也可与MED1相互作用形成PS, 其形成条件和广泛的LLPS类似。研究人员从TFs和共激活因子形成PS凝集物的模型中总结了三种类型的相互作用^[33]。(1) 电荷吸引。如前所述MED1-IDR含有大量带正电荷的赖氨酸(K), 而OCT4-IDR含有大量带负电荷的氨基酸[天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)], 在离子键作用下MED1-IDR和OCT4-IDR结合在一起。(2) 改变蛋白的构象。例如, 雌激素改变了ER的表面结构, 促进ER与MED1的结构互补并相互作用产生PS。(3) 利用疏水效应。例如, GCN4(TF)在TAD中包含大量疏水残基, 与MED15相互作用促进了PS。

PS“定位器”的DBD通过识别特定的DNA motif定位在一个空间上, 其TAD招募Mediators等辅助因子形成LLPS结构, 这种稳定独立的空间有利于随后的转录激活。例如, TEAD家族蛋白(“定位器”)的TAD片段本身不具有PS的能力, 而它通过招募YAP、TAZ诱导了LLPS^[34-35]。Master TFs占据SEs的位置, 招募Wnt信号通路共激活因子 β -catenin诱导LLPS并驱动具有显著细胞特征的基因表达^[36]。按功能分类, “定位器”分别参与形成了SEs的PS和SEs中转录的PS, 那么这两种PS是在独立的蛋白质复合物系统, 还是共享同一个PS凝集物? 在ChIP-seq分析中p300

占用的区域与TFs、H3K27ac、BRD4、Mediators存在高度重叠的关系^[4], 这提示SEs形成与转录激活事件同时也在同一个PS空间内完成。

在启动子和增强子区域产生了同性质的LLPS, 它们在二维坐标上距离很远, 而在三维空间中它们可以很近。如前所述, 染色质调节蛋白(如CTCF、Cohesion等)帮助DNA成环, 让启动子与增强子区域彼此接近。此时在启动子和增强子起始的LLPS接触并融合成一个大的LLPS, 因此能招募更多的RNA POL II复合物, 该空间的转录水平显著升高(图1C)。

在这一小节中, 我们了解了“阅读器”和“定位器”招募转录辅助因子(Mediators)发生PS, 接下来我们将介绍转录新生的RNA是如何影响PS的。

1.5 新生RNA与相分离

小RNA(18~30核苷酸)能稳定TFs与DNA motif的相互作用。ChIP-seq分析显示YY1能结合增强子和启动子的DNA, 但是如果没有近端启动子和增强子产生的新生RNA, 这种结合是不稳定的^[6]。通过CRISPR/dCas9系统将sgRNA(与小RNA连接)定位增强子的区域后, 结果发现YY1能更多结合在该区域。另外体外实验表明, YY1与30个核苷酸的RNA探针能够直接结合^[6]。

PS中的转录辅助因子(Mediators)进一步招募了RNA POL II复合物, 起始了启动子和增强子附近空间的转录。转录过程会产生新的元素: 新生RNA(nascent RNA), 它也会进入PS空间并反馈性调控转录的进程(图1D)。新生RNA是DNA上转录的一个带有核糖-磷酸“骨架”的单链分子, 并在局部空间中带有大量的负电荷。新生RNAs类似于小RNA能够增加TFs与DNA motif结合的稳定性, 但这种影响对新生RNAs的序列没有选择性, 而跟其长度密切相关^[37]。因此, 这种相互作用力的变化跟新生RNAs的碱基序列关系不大, 而更有可能与它的共性(负电荷)相关。新生RNA可能与组蛋白相互作用, 抵消了TFs和组蛋白之间的排斥力。另外, 新生RNAs和TFs的DBDs之间的吸引力也可能将TFs捕获到附近的DNA上, 并促进TFs对调控元件的占用。增强子RNAs(enhancer RNAs, eRNAs)是一类由增强子区域产生短的非编码RNA分子(50~2 000个核苷酸), 它们也能促进特定基因的转录。eRNAs类似于新生RNAs, 其转录激活功能不依赖于特异的DNA序列, 它们稳定了TFs和增强子区域DNA之间的相互作用

用。这些小RNAs符合LLPS的发生基础——多价结合,因此它们能稳定LLPS。它们捕获邻近带正电荷结构域的蛋白质并相互协调电荷平衡,维持着液滴中凝聚体的稳定^[37-38]。

新生RNA除了稳定LLPS外,它还能起到负反馈调节转录速率的作用,而这种负反馈机制也可以用LLPS的变化来解释^[37]。在转录起始的早期阶段,新生RNA(长度小、数量少)促进了LLPS容积,此时转录凝聚物增多,转录水平上升。在转录的晚期步骤,新生RNA(长度大、数量多)破坏了LLPS电荷平衡,转录速率发生逆转。这个负反馈机制保证了转录水平不会无限制增长,而始终保持在一个合适的水平波动。

在这一小节中,我们了解了新生RNAs和LLPS的关系,接下来我们将介绍转录延伸中RNA POL II是怎么离开LLPS的。

1.6 RNA聚合酶II与相分离

Mediators和RNA POL II在ESC中会形成短暂的小液滴和稳定的大液滴,它们在稳定的大液滴中有共定位。当细胞经过RNA POL II抑制剂处理后, RNA POL II不再停留在PS凝聚物上,而Mediators仍然存在于大液滴中^[39],这提示在RNA POL II聚集之前, Mediators就参与形成了PS。另外,许多TFs也同时包含DBD和IDR结构域,后者可能通过与RNA POL II中的RPB1亚基C-端结构域(C-terminal domain, CTD)结合来招募RNA POL II。RPB1-CTD的高度磷酸化是转录延伸和mRNA加工所必需的^[40]。而正转录延伸因子b(positive transcription elongation factor b, P-TEFb)蛋白激酶复合物(包含CDK9和CYCT1)可以使RPB1-CTD磷酸化。转录PS凝聚物中同时存在含富组氨酸结构域(histidine-rich domain, HRD)的蛋白(CYCT1)与RPB1,而RPB1-CTD区域和CYCT1-HRD中电荷需达到平衡才能稳定PS结构^[41]。研究证明, CYCT1-HRD能够稳定P-TEFb复合物并促进RPB1-CTD的高度磷酸化^[41]。CYCT1-HRD是一种IDR结构,含有HRD的同家族蛋白也能使CTD高度磷酸化。另外, CYCH蛋白虽然缺乏HRD区域,但它可以与CYCT1-HRD结合促进CDK7介导的RPB1-CTD磷酸化。当RPB1-CTD区域的丝氨酸(S)高度磷酸化后将获得负电荷、强亲水性,而亲水基团在水环境周围保持PS是不稳定的。因此, RNA POL II在电荷失衡、水溶性变化下会使其离开

PS凝聚物,转录延伸可以正常继续进行而不受PS的空间限制(图1E)。

许多研究表明, BRD4与MED1、TFs与Mediators、Mediators与POL RNA II、POL RNA II与P-TEFb、TFs与POL RNA II两两之间在体外均可分别形成PS凝聚物。由此可见,两种蛋白质之间的互补IDR-IDR相互作用可以决定PS的形成。在转录PS模型中, TFs(“定位器”)和BRD4(“阅读器”)是起始因子,干扰这两个因素后PS的形成不会发生,而当POL RNA II或P-TEFb被抑制时,我们仍然可以观察到PS凝聚物。在同一空间内,PS凝聚物中包含了多种元素,随着转录进行PS中的元素发生修饰打破了平衡并动态地进入与离开。PS发生的基础是有足够数量的起始因子,而启动子和增强子数量越多,招募的起始因子就越多。因此,我们能够看到SEs中的PS比TEs要大很多,最终转录出更多的RNA分子(图1F)。

在这一小节中,我们了解了RNA POL II和LLPS的关系,到此我们已经展现了一个清晰的转录PS模型。在下一部分,我们将围绕肿瘤中这些元素来讨论转录是如何失控的。

2 肿瘤转录调控

肿瘤自身的基因表达具有多样性、独特性,而SEs异常驱动的基因对肿瘤的发生、进展、转移和耐药性至关重要。在上一章节中,我们详细介绍了转录PS模型以及其参与元素。本章节我们继续围绕这些元素进一步剖析异常转录下的肿瘤。无论转录调控中如何变化,细胞最终以转录翻译后的蛋白质作为主要的效应分子。在肿瘤中,这些参与转录的元素始终和两大类下游效应分子关联。第一类是致癌因子,它的上调是肿瘤的直接表现形式,而转录是决定该结果的关键步骤。第二类是抑癌因子,它间接调控了致癌因子的活性,抑癌因子的功能失调也是肿瘤发生发展的起源。

在上一章节中,我们总结了三类功能性TFs(“定位器”)。(1)增强子“定位器”可以通过“书写器”添加增强子标记,促进附近致癌因子的表达。例如,在急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)和急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukaemia, ALL)中,HOXA9结合位点丰富的活跃增强子区域包含高水平的H3K4me1和H3K27ac修饰和低水平的组蛋白H3的K27三甲基化(H3K27me3)修饰。HOXA9(“定

位器”)通过招募组蛋白甲基转移酶MML3/MML4和PTIP(“书写器”)添加新的H3K4me1增强子标记,增强子驱动了附近参与白血病发生的特定基因表达^[42]。在雌激素受体阳性乳腺癌中,ER α (“定位器”)通过共激活因子PELP1与p300/CBP(“书写器”)等染色质修饰复合物相互作用参与构建SEs^[43]。(2) 结构“定位器”调控染色质结构,使致癌因子的启动子在空间上与SE接触。例如在正常细胞中,CTCF(“定位器”)通过构建邻近绝缘结构域限制了致癌因子的表达。在T细胞-ALL中存在DNA的微缺失,而缺失的区域含有CTCF的DNA motif,因此临近绝缘结构域被破坏后致癌因子表达失控^[44]。(3) PS“定位器”可以选择性定位在致癌基因附近,异常的“定位器”在调控关键癌基因表达方面发挥着重要作用^[45]。例如,在乳腺癌不同亚型中,TFs(包括Forkhead家族,FOSL1和PLAG1等)分别在染色质特定部位结合并构建关键基因调控网络^[46]。在NB中,交感去甲肾上腺素细胞样是由PHOX2B、HAND2和GATA3驱动的,而神经嵴细胞样是由AP-1决定的^[47],它们富集在SEs区域参与下游关键功能基因的表达。在胰腺癌中, Δ Np63(“定位器”)通过激活特异性的SEs,并与HIF1A、BHLHE40和RXRA(“定位器”)协调转录调控网络,决定了胰腺癌细胞亚型特征的走向^[48]。

肿瘤细胞除了利用已知的“定位器”促进自身发展外,它还能创造全新的“定位器”。例如,染色体易位可导致RNA结合蛋白(FUS/EWS/TAF15, FET)的IDR片段融合到多种不同的含DBD的基因上。在尤文氏肉瘤中,EWS-FLI1融合蛋白(“定位器”)的DBD定位到特定的增强子区域,其PLD诱导PS并激活了靶基因^[49]。除了“定位器”异常外,肿瘤中的基因组通常会出现紊乱,DNA定位系统出错也会引起致癌因子的上调。例如,在非编码序列上的小规模突变会产生新的DNA motif,并导致新生增强子的形成,从而促进肿瘤的发生^[20]。在基因组重排(染色体易位、缺失、局部扩增和病毒插入)下致癌基因附近出现SEs区域,从而促进转化成癌细胞或参与了抗肿瘤药物耐药的过程^[45]。在前列腺癌中,扩增的TEs片段成簇形成了SEs片段,此时会有更多的雄激素受体(“定位器”)进入该区域参与更高水平的转录^[50]。所以相对于正常细胞,癌症中的SEs变得更加复杂,我们不仅需要关注“定位器”的变化,而且需要进行基因组测序检测基因组的空间信息,两者的变化都可

能驱动致癌基因表达。

许多肿瘤细胞依赖SEs上的“阅读器”和PS。多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)、混合谱系白血病和T细胞白血病通常会发生基因组改变,而其下游高度依赖于BRD4^[45]。在MM中,BRD4和Mediators占据着巨大的SEs区域并驱动特征基因表达(如*Myc*癌基因)^[19]。经过JQ1治疗后能破坏SEs上的PS结构,这些SEs驱动基因会首先受到影响,因此BRD4抑制剂可以在适当的浓度下选择性地抑制肿瘤。研究报道了BET家族抑制剂通过抑制MYC转录水平达到强烈、广泛的抑制肿瘤,包括AML、ALL、MLL重排急性白血病、Burkitt淋巴瘤、MM、NB和髓母细胞瘤的效果^[51-57]。但是有一类三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)可以通过下调表达抑癌基因*PP2A*(一种靶向BRD4的磷酸酶)实现对JQ1的耐药作用^[58]。这提示了BRD4的高度磷酸化打破了原有的电荷平衡,耐药细胞不再依赖SEs上的PS。除了肿瘤进展外,BRD4还将SEs与癌症中的其他表型有联系。癌基因诱导的衰老与SEs驱动相关分泌表型基因表达有关,而BRD4也是这一进展过程所必需的^[59]。这提示了在染色质重构和创建SEs新标记后,细胞的命运走向可被预测。

转录延伸相关因子也是干预肿瘤生长的节点。例如,FET融合蛋白的IDR片段作为TAD与POL RNA II的非磷酸化RPB1-CTD相互作用^[60]。这些IDR和RPB1-CTD在体外相互作用能形成PS液滴,而当RPB1-CTD被CDK7或CDK9磷酸化后,RPB1不会再进入PS液滴内^[61]。在TNBC中CDK7被证明是一个关键转录调控因子,它作为PS的元素定位在SEs区域,通过磷酸化RNA POL II参与转录延伸,而THZ1(CDK7小分子抑制剂)能选择性靶向TNBC细胞^[62]。在成人T细胞白血病/淋巴瘤(adult T cell leukemia/lymphoma, ATLL)中,CDK7介导的SEs驱动了关键致癌基因(如*CCR4*、*TP73*和*PIK3R1*)的表达,而使用了THZ1后能显著减少ATLL原代细胞和一些细胞株的生长^[63]。此外,THZ1也能通过破坏SEs驱动下游转录抑制许多其他类型的肿瘤,包括MYCN扩增的NB和小细胞肺癌^[64-65]。这表明在肿瘤中CDK7作为一个普遍的转录辅助因子参与了SEs的功能。

除了促癌因子的激活外,抑癌因子的失调也是肿瘤发生的重要因素。例如,抑癌因子SPOP在PS内

通过泛素化降解致癌因子。SPOP中两个关键疏水性氨基酸[苯丙氨酸(F)和色氨酸(W)]的突变破坏了PS的形成,导致致癌因子积累,最终引起前列腺癌、乳腺癌和其他实体肿瘤的发生^[66]。DNA损伤应答缺陷是肿瘤的特征之一,其中53BP1蛋白能在DNA损伤区域中诱导LLPS发生并启动损伤修复,破坏LLPS能抑制下游p53的激活^[67]。目前,转录PS与肿瘤的关系研究主要关注致癌因子的激活,抑癌因子直接作用在SEs上PS的报道较少。

3 结束语

“定位器”和“阅读器”招募Mediators是LLPS形成所必需的步骤。由于PS的发生需要一类蛋白作为种子使PS能够在特定的空间内起始。在同一空间内这些种子的数量(密度)决定了PS液滴的大小(正相关)。在平衡状态下,液滴的大小不再发生变化,但液滴内部与外部的元素每一时刻都在进行速率相等的动态交换。当启动子和增强子在染色质调节因子(如CTCF、Cohesin等)的帮助下彼此靠近时,PS融合在一起,PS内部元素的数量和PS的大小都会增加。而当SEs接近一个启动子时,多个增强子聚集在一个空间中,最终形成一个巨大的转录PS机器。我们通过示意图描述了转录PS形成的过程(图1)。(1)增强子“定位器”分布于特定、大范围的DNA空间中,招募增强子“书写器”(如组蛋白乙酰化酶)在附近组蛋白赖氨酸上添加乙酰基,一个全新的增强子区域出现。相反,另外一些“定位器”靶向增强子区域并招募增强子“擦除器”(如组蛋白去乙酰化酶)清除增强子标记。(2)增强子进一步招募增强子“阅读器”,并通过与Mediators之间的相互作用诱发了转录PS的形成。同时,TFs(“定位器”)以启动子(或增强子)为靶点,也可招募Mediators来诱发转录PS形成。(3)两个区域起始的LLPS在染色质重构下彼此靠近,当它们接触到边缘时,两个液滴融合成一个大的液滴。同时,增强子和启动子上的DNA和组蛋白被拉到一起,在一个相对独立空间内激活转录。(4)Mediators将RNA POL II引入PS环境,转录起始复合物也准备进行组装。此时,初始转录的eRNAs和新生RNA在PS的稳定中发挥着重要作用。(5)RNA POL II停留在液滴中,转录若需进入延伸阶段则必须离开液滴。RNA POL II将P-TEFb复合物(通过Cyclin蛋白)招募到液滴中,然后P-TEFb(通过CDKs蛋白)使RPB1-

CTD结构域高度磷酸化。RNA POL II从PS凝集物中离开,转录延伸被激活。(6)在TEs空间中PS凝集物较小,具有较低的转录活性。而在SEs空间中PS凝集物较大,具有非常高的转录活性。

本综述主要关注了转录PS的两种关键元素:蛋白质和核酸。那么,代谢产物如多糖、脂质和无机离子是否参与了这一过程?与正常细胞相比,肿瘤细胞更倾向于利用有氧糖酵解的方式,瓦伯格效应在细胞内产生了大量的乳酸。酸化环境会影响IDR的离子键相互作用,从而改变LLPS的形成条件。肿瘤细胞特定的pH环境可能通过LLPS的改变促进肿瘤生长或抗衰老。然而,目前仍很少有相关研究提供证据。我们需要关注LLPS的来源和形成机制,才能更好地解释在SEs上发生的转录事件。生物物理学是我们解读这个机制的关键,因为LLPS的本质是在分子间相互作用力下动态地交换内部元素。什么决定了转录PS形成(时间)?转录PS出现的位置是否能被预测(空间)?不同类型的PS如何保持独立性(时空)?转录PS在生物体内如何保持适当的大小范围(干预手段)?如何利用转录PS机制去改善患者预后(临床意义)?目前仍有较多的问题等待我们去回答。

参考文献 (References)

- [1] HNISZ D, ABRAHAM B J, LEE T I, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease [J]. *Cell*, 2013, 155(4): 934-47.
- [2] SABARI B R, DALL'AGNESE A, BOIJA A, et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control [J]. *Science*, 2018, 361(6400): 387-92.
- [3] BLACKWOOD E M, KADONAGA J T. Going the distance: a current view of enhancer action [J]. *Science*, 1998, 281(5373): 60-3.
- [4] HNISZ D, SHRINIVAS K, YOUNG R A, et al. A phase separation model for transcriptional control [J]. *Cell*, 2017, 169(1): 13-23.
- [5] MITCHELL P J, TJIAN R. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins [J]. *Science*, 1989, 245(4916): 371-8.
- [6] SIGOVA A A, ABRAHAM B J, JI X, et al. Transcription factor trapping by RNA in gene regulatory elements [J]. *Science*, 2015, 350(6263): 978-81.
- [7] GAJ T, GERSBACH C A, BARBAS C F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397-405.
- [8] KATERNDAHL C D S, HELTEMES-HARRIS L M, WILLETTE M J L, et al. Antagonism of B cell enhancer networks by STAT5 drives leukemia and poor patient survival [J]. *Nat Immunol*

- nol, 2017, 18(6): 694-704.
- [9] ING-SIMMONS E, SEITAN V C, FAURE A J, et al. Spatial enhancer clustering and regulation of enhancer-proximal genes by cohesin [J]. *Genome Res*, 2015, 25(4): 504-13.
- [10] WEINTRAUB A S, LI C H, ZAMUDIO A V, et al. YY1 is a structural regulator of enhancer-promoter loops [J]. *Cell*, 2017, 171(7): 1573-88,e28.
- [11] BANSAL K, YOSHIDA H, BENOIST C, et al. The transcriptional regulator Aire binds to and activates super-enhancers [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(3): 263-73.
- [12] LEE T I, YOUNG R A. Transcriptional regulation and its misregulation in disease [J]. *Cell*, 2013, 152(6): 1237-51.
- [13] DRAVIS C, CHUNG C Y, LYTLE N K, et al. Epigenetic and transcriptomic profiling of mammary gland development and tumor models disclose regulators of cell state plasticity [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(3): 466-82,e6.
- [14] HNISZ D, SCHUIJERS J, LIN C Y, et al. Convergence of developmental and oncogenic signaling pathways at transcriptional super-enhancers [J]. *Mol Cell*, 2015, 58(2): 362-70.
- [15] FORREST M P, HILL M J, QUANTOCK A J, et al. The emerging roles of TCF4 in disease and development [J]. *Trends Mol Med*, 2014, 20(6): 322-31.
- [16] VAN GRONINGEN T, KOSTER J, VALENTIJN L J, et al. Neuroblastoma is composed of two super-enhancer-associated differentiation states [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(8): 1261-6.
- [17] LEE H K, WILLI M, SHIN H Y, et al. Progressing super-enhancer landscape during mammary differentiation controls tissue-specific gene regulation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(20): 10796-809.
- [18] NELSON D L, COX M M. *Lehninger principles of biochemistry*. 7th edition [M]. New York: W. H. Freeman, 2017.
- [19] LOVÉN J, HOKE H A, LIN C Y, et al. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers [J]. *Cell*, 2013, 153(2): 320-34.
- [20] VÄHÄRAUTIO A, TAIPALE J. Cancer by super-enhancer [J]. *Science*, 2014, 346(6215): 1291-2.
- [21] AGUZZI A, ALTMAYER M. Phase separation: linking cellular compartmentalization to disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(7): 547-58.
- [22] LIN Y, PROTTER D S W, ROSEN M K, et al. Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(2): 208-19.
- [23] SAITO M, HESS D, EGLINGER J, et al. Acetylation of intrinsically disordered regions regulates phase separation [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(1): 51-61.
- [24] SOŁTYS K, WYCISK K, OŻYHAR A. Liquid-liquid phase separation of the intrinsically disordered AB region of hRXY is driven by hydrophobic interactions [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 936-49.
- [25] PAK C W, KOSNO M, HOLEHOUSE A S, et al. Sequence determinants of intracellular phase separation by complex coacervation of a disordered protein [J]. *Mol Cell*, 2016, 63(1): 72-85.
- [26] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285-98.
- [27] CHONG S, DUGAST-DARZACQ C, LIU Z, et al. Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription [J]. *Science*, 2018, 361(6400): 1-16.
- [28] HAZAWA M, AMEMORI S, NISHIYAMA Y, et al. A light-switching pyrene probe to detect phase-separated biomolecules [J]. 2021, 24(8): 102865.
- [29] ZHANG X, VIGERS M, MCCARTY J, et al. The proline-rich domain promotes Tau liquid-liquid phase separation in cells [J]. *J Cell Biol*, 2020, doi: 10.1083/jcb.202006054.
- [30] LIN Y, CURRIE S L, ROSEN M K. Intrinsically disordered sequences enable modulation of protein phase separation through distributed tyrosine motifs [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(46): 19110-20.
- [31] MONAHAN Z, RYAN V H, JANKE A M, et al. Phosphorylation of the FUS low-complexity domain disrupts phase separation, aggregation, and toxicity [J]. *EMBO J*, 2017, 36(20): 2951-67.
- [32] BELAKAVADI M, PANDEY P K, VIJAYVARGIA R, et al. MED1 phosphorylation promotes its association with mediator: implications for nuclear receptor signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(12): 3932-42.
- [33] BOIJA A, KLEIN I A, SABARI B R, et al. Transcription factors activate genes through the phase-separation capacity of their activation domains [J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1842-55,e16.
- [34] LU Y, WU T, GUTMAN O, et al. Phase separation of TAZ compartmentalizes the transcription machinery to promote gene expression [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(4): 453-64.
- [35] CAI D, FELICIANO D, DONG P, et al. Phase separation of YAP reorganizes genome topology for long-term YAP target gene expression [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(12): 1578-89.
- [36] ZAMUDIO A V, DALL'AGNESE A, HENNINGER J E, et al. Mediator condensates localize signaling factors to key cell identity genes [J]. *Mol Cell*, 2019, 76(5): 753-66,e6.
- [37] HENNINGER J E, OKSUZ O, SHRINIVAS K, et al. RNA-mediated feedback control of transcriptional condensates [J]. *Cell*, 2021, 184(1): 207-25,e24.
- [38] LEWIS M W, LI S, FRANCO H L. Transcriptional control by enhancers and enhancer RNAs [J]. *Transcription*, 2019, 10(4-5): 171-86.
- [39] CHO W K, SPILLE J H, HECHT M, et al. Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates [J]. *Science*, 2018, 361(6400): 412-5.
- [40] PHATNANI H P, GREENLEAF A L. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(21): 2922-36.
- [41] LU H, YU D, HANSEN A S, et al. Phase-separation mechanism for C-terminal hyperphosphorylation of RNA polymerase II [J]. *Nature*, 2018, 558(7709): 318-23.
- [42] SUN Y, ZHOU B, MAO F, et al. HOXA9 reprograms the enhancer landscape to promote leukemogenesis [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(4): 643-58,e5.
- [43] VADLAMUDI R K, WANG R A, MAZUMDAR A, et al. Molecular cloning and characterization of PELP1, a novel human co-regulator of estrogen receptor α [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(41): 38272-9.
- [44] HNISZ D, WEINTRAUB A S, DAY D S, et al. Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods [J]. *Science*, 2016, 351(6280): 1454-8.
- [45] BRADNER J E, HNISZ D, YOUNG R A. Transcriptional addiction in cancer [J]. *Cell*, 2017, 168(4): 629-43.

- [46] FRANCO H L, NAGARI A, MALLADI V S, et al. Enhancer transcription reveals subtype-specific gene expression programs controlling breast cancer pathogenesis [J]. *Genome Res*, 2018, 28(2): 159-70.
- [47] BOEVA V, LOUIS-BRENNETOT C, PELTIER A, et al. Heterogeneity of neuroblastoma cell identity defined by transcriptional circuitries [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(9): 1408-13.
- [48] HAMDAN F H, JOHNSEN S A. DeltaNp63-dependent super enhancers define molecular identity in pancreatic cancer by an interconnected transcription factor network [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2018, 115(52): E12343-52.
- [49] JIANG S, FAGMAN J B, CHEN C, et al. Protein phase separation and its role in tumorigenesis [J]. *eLife*, 2020, 9: 1-27.
- [50] TAKEDA D Y, SPISÁK S, SEO J H, et al. A somatically acquired enhancer of the androgen receptor is a noncoding driver in advanced prostate cancer [J]. *Cell*, 2018, 174(2): 422-32, e13.
- [51] KNOECHEL B, RODERICK J E, WILLIAMSON K E, et al. An epigenetic mechanism of resistance to targeted therapy in T cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(4): 364-70.
- [52] MERTZ J A, CONERY A R, BRYANT B M, et al. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(40): 16669-74.
- [53] PUISSANT A, FRUMM S M, ALEXE G, et al. Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition [J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(3): 308-23.
- [54] BANDOPADHAYAY P, BERGTHOLD G, NGUYEN B, et al. BET bromodomain inhibition of MYC-amplified medulloblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(4): 912-25.
- [55] DAWSON M A, PRINJHA R K, DITTMANN A, et al. Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia [J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 529-33.
- [56] ZUBER J, SHI J, WANG E, et al. RNAi screen identifies BRD4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia [J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 524-8.
- [57] DELMORE J E, ISSA G C, LEMIEUX M E, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-MYC [J]. *Cell*, 2011, 146(6): 904-17.
- [58] SHU S, LIN C Y, HE H H, et al. Response and resistance to BET bromodomain inhibitors in triple-negative breast cancer [J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 413-7.
- [59] TASDEMIR N, BANITO A, ROE J S, et al. BRD4 connects enhancer remodeling to senescence immune surveillance [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(6): 612-29.
- [60] ZUO L, ZHANG G, MASSETT M, et al. Loci-specific phase separation of FET fusion oncoproteins promotes gene transcription [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 1-16.
- [61] KWON I, KATO M, XIANG S, et al. Phosphorylation-regulated binding of RNA polymerase II to fibrous polymers of low-complexity domains [J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 374.
- [62] WANG Y, ZHANG T, KWIATKOWSKI N, et al. CDK7-dependent transcriptional addiction in triple-negative breast cancer [J]. *Cell*, 2015, 163(1): 174-86.
- [63] WONG R W J, NGOC P C T, LEONG W Z, et al. Enhancer profiling identifies critical cancer genes and characterizes cell identity in adult T-cell leukemia [J]. *Blood*, 2017, 130(21): 2326-38.
- [64] CHRISTENSEN C L, KWIATKOWSKI N, ABRAHAM B J, et al. Targeting transcriptional addictions in small cell lung cancer with a covalent CDK7 inhibitor [J]. *Cancer Cell*, 2014, 26(6): 909-22.
- [65] CHIPUMURO E, MARCO E, CHRISTENSEN C L, et al. CDK7 inhibition suppresses super-enhancer-linked oncogenic transcription in MYCN-driven cancer [J]. *Cell*, 2014, 159(5): 1126-39.
- [66] BOUCHARD J J, OTERO J H, SCOTT D C, et al. Cancer mutations of the tumor suppressor SPOP disrupt the formation of active, phase-separated compartments [J]. *Mol Cell*, 2018, 72(1): 19-36, e8.
- [67] KILIC S, LEZAJA A, GATTI M, et al. Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments [J]. *EMBO J*, 2019, 38(16): e101379.