

生物大分子“液-液相分离”调控染色质三维空间结构和功能

高晓萌^{1,2}, 张治华^{1,2}

1. 中国科学院北京基因研究所, 基因组科学与技术重点实验室, 北京 100101

2. 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

摘要: 生物大分子的相分离聚集(简称相分离)是驱动细胞内无膜细胞器形成的主要机制, 参与众多生物学过程并和多种人类疾病密切相关, 如神经退行性疾病等。近年来, 研究人员围绕相分离现象的分子机制和生物学功能, 发现了相分离与信号传导、染色质结构、基因表达、转录调控等一系列生物学过程存在紧密关联, 为理解细胞命运决定和疾病发生提供了新的视角, 为疾病治疗和新药研发开辟了新的可能途径。本文在回顾了相分离研究的发展过程、相分离现象在生物学中的应用, 以及相分离与疾病的关系的基础上, 重点分析了近年来相分离与染色质结构关联方面的研究突破, 包括相分离如何感知并重塑染色质结构、超级增强子如何通过相分离调节基因表达、共转录激活因子如何通过相分离参与基因表达调控等, 以期为进一步理解相分离与染色质空间结构的关系提供参考。

关键词: 相分离; 染色质结构; 基因表达; 转录调控; 疾病

Three-dimensional structure and function of chromatin regulated by “liquid-liquid phase separation” of biological macromolecules.

Xiaomeng Gao^{1,2}, Zhihua Zhang^{1,2}

1. CAS Key Laboratory of Genome Sciences and Information, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2. Life Sciences College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Phase separation drives biomacromolecule condensation (phase separation) and is the main mechanism for the formation of membrane-less organelles in cells. Phase separation is involved in many biological processes and is closely associated to various human diseases, e.g., neurodegenerative diseases. Focusing on the molecular mechanism and functions, researchers have recently revealed close associations between phase separation and various biological functions, such as

收稿日期: 2019-09-04; 修回日期: 2019-11-04

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2018YFC2000400)和国家自然科学基金项目(编号: 31871331, 31671342)资助 [Supported by the National

Key R&D Program of China (No. 2018YFC2000400), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31871331, 31671342)]

作者简介: 高晓萌, 硕士研究生, 专业方向: 三维基因组结构研究。E-mail: gaomiaomeng2018m@big.ac.cn

通讯作者: 张治华, 博士, 研究员, 研究方向: 三维基因组结构研究。E-mail: zhangzhihua@big.ac.cn

DOI: 10.16288/j.yczs.19-266

网络出版时间: 2019/12/19 14:30:42

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20191218.1615.003.html>

signal transduction, chromosome structure, gene expression, and transcriptional regulation. These findings have provided new perspectives in understanding cell fate decisions and disease processes, thereby offering novel approaches for future drug discovery and development of disease treatments in medicine. In this review, we summarized the current progress in the field of phase separation research. We focused on its application on understanding how phase separation remodels the chromatin structure, assembles co-activators and super-enhancers in regulation of gene expression, in order to further understand the relationship between phase separation and chromatin spatial structures. Finally, we also outline the challenges in reference to future research directions in the field.

Keywords: phase separation; chromosome structure; gene expression; transcriptional regulation; diseases

细胞发达的内膜系统将细胞内部划分成许多功能区块,形成具有各种特定功能的细胞器。除了这类具膜细胞器之外,细胞内还存在许多无膜细胞器,如中心体(centriole)、应力颗粒(stress granules)、核小斑点(nuclear speckles)等^[1]。研究表明,生物大分子的相分离(phase separation)凝聚是驱动无膜细胞器形成的主要机制^[2]。物质的相分离是在自然界中普遍存在的物理现象,通常指的是在均匀的混合液/气态物质中自发形成的不同相。在体外,相分离是可逆的,受到诸如温度、离子强度、翻译后修饰等物理或化学因素的影响,从而形成或者解离液滴^[3]。在体内相分离通常是一个动态的过程,并且通常指的是“液-液相分离”(liquid-liquid phase separation),在不引起歧义的情况下,以下简称相分离。

2009年,德国马普研究所 Tony Hyman 教授与其博士后研究员 Cliff Brangwynne 发现线虫(*Caenorhabditis elegans*)胚胎中的 RNA 和包含蛋白质的结合体 P 颗粒(P granules)实际上是由蛋白质通过相分离形成的凝聚小球^[4]。体外实验显示,在过饱和溶液中会自发地分成一种浓相和一种稀相并且稳定地共存。2011年,该实验室对核仁进行了类似的研究,证实了相分离是核仁发生的基础^[5]。此后,研究人员开始对细胞中的相分离现象进行广泛而深入的研究。细胞内的相分离是由弱多价相互作用引起的,通常由内在无序蛋白质、内在无序区域或者低序列复杂结构域介导^[6-8]。基因组的活性与相分离现象有关,相分离发生部位通常与染色质密度较低区域相关联。越来越多的研究表明相分离现象对细胞核的染色质空间结构的组织调控非常重要。而染色质的组织结构是细胞核内生命活动,包括基因表达、DNA

复制、损伤修复、基因组稳定性以及转座子沉默等的基本物理平台^[9],因此,探究相分离现象与染色质的结构和功能的关系具有重要的意义。本文从相分离的形成、生物学意义以及相分离与染色质空间结构和转录调控的关系入手,结合最前沿的研究进展,介绍了相分离研究在当前生物学研究中的重大突破,为全面了解相分离研究领域提供参考。

1 相分离现象及实验检测

1.1 相分离的形成

2009年,Brangwynne 等^[4]在研究秀丽隐杆线虫中无膜 P 颗粒的形成过程时,发现其具备以下特征: P 颗粒游离状态下为球形,附着在细胞核表面时为非球形,颗粒间有明显的边界;在压力状态下可以流动,并可由小液滴融合形成大的液滴; P 颗粒具有很强的黏性和表面张力;光脱色荧光恢复实验表明 P 颗粒内部分子可与外部溶液中的分子快速交换。结合其他生物分子凝聚体与 P 颗粒的相似特征,推测这是一种相分离现象。

生物大分子可以通过多价相互作用形成液-液相分离(图 1)^[8]。多价相互作用是指一个多价配体与一个或多个功能亲和(表观亲和)增强的受体结合并协同作用的过程。细胞内生物大分子的多价相互作用形成方式主要包括线性重复功能性的结构域、寡聚化蛋白和多个位点蛋白的表观修饰(磷酸化、甲基化、乙酰化和泛素化等)^[10]。内在无序蛋白(intrinsically disordered proteins)或内在无序区域(intrinsically disordered regions)是一种重要的多价相互作用来源。内在无序蛋白和内在无序区域与相分离的

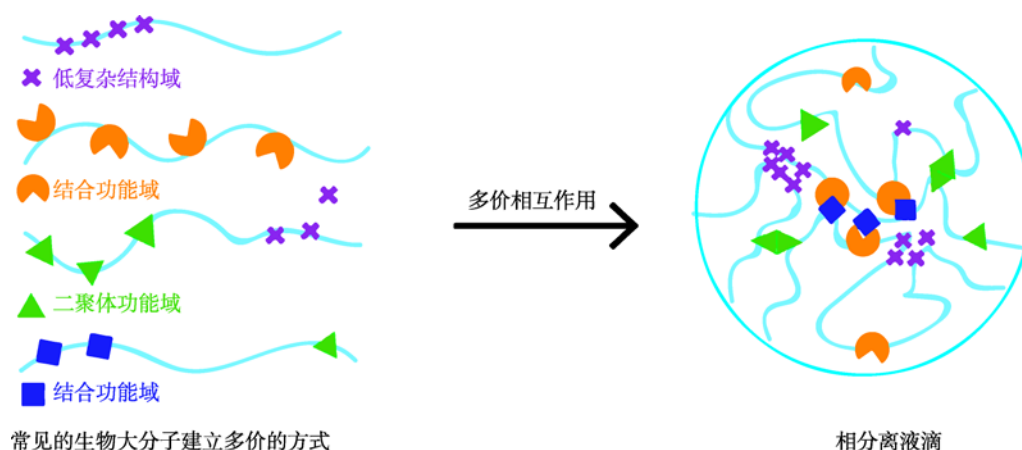


图 1 相分离现象形成过程

Fig. 1 The formation of phase separation

形成密切相关,其磷酸化会导致凝聚物的降解。很多内在无序蛋白和内在无序区域都含有低序列复杂结构域(low-complexity domains)。低序列复杂结构域通常仅富集 Gly、Ser、Tyr 和 Gln 等残基类型,即具有强氨基酸偏好性和自我维持聚集潜力^[11,12]。这种序列特性赋予其特殊的生物化学与生物物理性质。例如,朊病毒样结构域是一种富含不带电极性氨基酸的低序列复杂结构域,具有自组装和形成凝聚物的趋势^[13]。朊病毒样结构域富含参与生理相分离和病理蛋白聚集的蛋白。与其他蛋白质相比,内在无序蛋白和内在无序区域缺乏明确的蛋白质折叠构象,具有高度的灵活性,从而违背了经典的结构-功能范式,这种结构可塑性使它们能够动态地采用不同的构象,并经历混杂的多价形式和异型相互作用^[8]。在体外实验中,低序列复杂结构域当与它们的多价同源配体混合时,可以发生寡聚和相分离,如低序列复杂结构域中的 RNA 结合域会与重复 RNAs 结合发生寡聚作用^[14,15]。内在无序区域还可以通过静电、极性和疏水作用以及产生淀粉样纤维和其他潜在玻璃结构相互作用等模式来实现自缔结^[7]。

1.2 相分离的实验检测技术

体外的相分离现象可以使用普通的光学显微镜观察。发生相分离的体系具有溶液从澄清变浑浊的特点,在镜检中可见油滴状颗粒。目前被广为接受的相分离检测标准是:形成球状液滴结构的生物分子凝聚体;液滴具有流动性,可以发生融合现象;

使用光脱色荧光恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching),可见荧光漂白恢复。建立可操控的体内相分离体系是相关研究的基础。CasDrop 系统(图 2)是由普林斯顿大学 Brangwynne 实验室开发的基于 Cas9 基因编辑技术的细胞内相分离系统^[16]。该系统由 3 部分组成:(1) SunTag 标记的 dCas9 蛋白,用于将体系锚定到特定的基因位点;(2) scFv 标记的 ST 同源物、sfGFP 和光发生二聚蛋白 iLID,用于构建光敏的多聚体。前两种结构可以自组装成一个多聚体蛋白复合物(dCas9-ST-GFP-iLID),从而实现位点的可视化,同时为招募各种蛋白复合物(包括包含内在无序区域的蛋白)提供了光诱导的结合支架;(3) sspB 标记的目的蛋白内在无序区域,用于检测相变行为。当 sgRNA 表达时,scFv-GFP-iLID 蛋白被 SunTag 募集到 SunTag-dCas9 结合的基因位点处,形成 dCas9-ST-GFP-iLID 蛋白的多聚体;当 sgRNA 不表达时,dCas9-ST-GFP-iLID 蛋白在胞内则成弥散状。在蓝光刺激下,sspB 结合到 iLID 上,目的蛋白内在无序区域相分离使得液滴快速凝结,频繁合成。该体系可以定量、定位地研究多种蛋白的相分离现象。

2 生命体内的相分离及生物意义

2.1 相分离调节信号转导

由于相分离形成蛋白质分子的聚集,使得它在

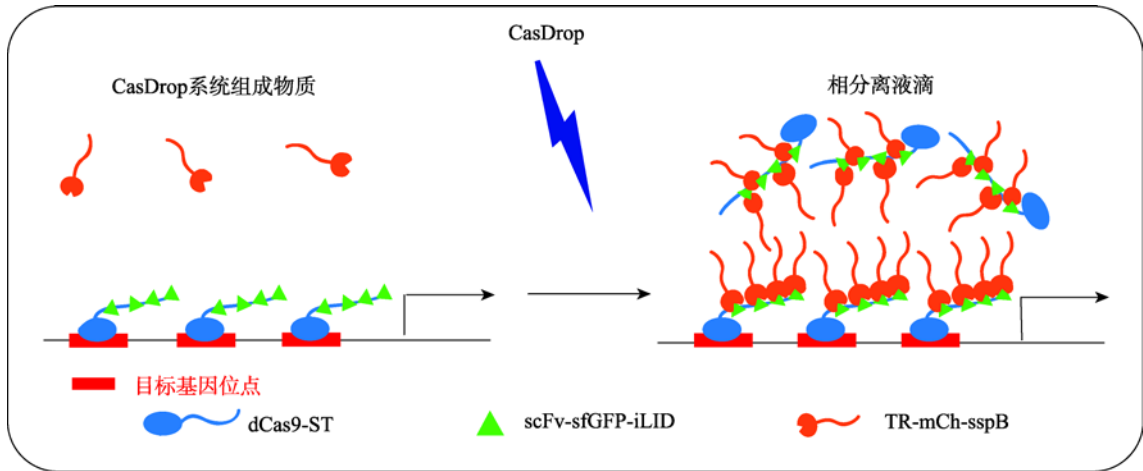


图 2 CasDrop 相分离检测系统

Fig. 2 The phase separation detection system—CasDrop
根据文献[16]修改绘制。

信号传导过程中起到重要作用。例如, Ras 蛋白是在真核细胞中对细胞生长和信号传导发挥着重要作用的因子, T 细胞使用 Ras 作为发起保护性反应的入侵者报警通道的分子开关。Ras 蛋白的激活需要通过相分离形成的凝聚液滴维持充分的反应时间^[17]。T 细胞与 Ras 的相互作用依赖于 LAT、GRB2 和 SOS 三种中间蛋白而起作用^[18]。其中 SOS 是一种重要的 Ras 激活剂, 它通过 GRB2 蛋白招募并激活膜上受体蛋白, 随后激活 Ras 蛋白^[19]。膜信号受体的激活促进 LAT 磷酸化, 生成的多价磷酸化酪氨酸位点作为 GRB2 的结合位点招募 GRB2^[20]。LAT-GRB2-SOS 复合体通过相分离在膜上形成二维生物分子凝聚液滴或凝胶^[21,22], 从而增加了 SOS 在细胞膜上停留时间。研究人员通过设计体外重组试验测量单 SOS 分子的膜招募动力学和 Ras 激活动力学, 使用显微镜来观察膜上的 T 细胞受体请求单个 SOS 分子活化时, 发现 SOS 不会立即响应, 而是等待 10~30 s 才进入活性状态并发挥作用, 因此由于相分离现象导致的 SOS 膜结合时间增加可以促进 Ras 蛋白完全激活^[17]。

2.2 相分离帮助细胞适应环境

相分离对生理环境中的微小变化(pH 改变等)非常敏感, 因此相分离为细胞感知环境变化提供了一种高效的方式^[3]。例如, 朊蛋白样结构域可以感知环境条件的变化, 通过改变相分离的状态, 保护细

胞内的生物活动^[6,23]。出芽酵母的翻译终止因子 Sup35 是一种典型的朊病毒蛋白。细胞内一组带负电荷的氨基酸可感知环境的 pH 变化, 通过 pH 诱导, Sup35 经过液相分离形成一种保护性蛋白凝胶。相分离受到相邻两个应激传感器(即朊蛋白样结构域)的调节。这种朊蛋白样结构域之间的协同作用使得翻译终止因子 Sup35 在应激期间快速地形成保护性凝聚物。缺乏朊病毒样结构域的细胞在从应激状态恢复时表现出翻译活性受损和生长缺陷。朊蛋白样结构域改变了 Sup35 的鸟苷三磷酸酶结构域的不可逆聚集状态, 从而确保这种翻译终止因子在恶劣的环境条件下保持功能^[24]。总之, Sup35 的朊蛋白样结构域是一种受到高度调节的分子装置, 具有感知和响应细胞内物理化学变化的能力, 允许细胞对特定的环境条件作出反应。

2.3 相分离与疾病

相分离和多种疾病相关。细胞内相分离倾向于凝聚蛋白质, 该过程伴随着潜在的危险。蛋白质浓度过高往往会引起聚合反应或发生堵塞, 形成固体凝胶甚至晶体, 不再为细胞内化学反应提供必要的环境。由于在神经退行性疾病中经常发生病变的几个关键蛋白是无膜细胞器的组成部分, 因此, 这些装配体在形成、维持或清除方面的失调就可能导致疾病的发生^[11,25]。例如, 许多神经退行性疾病的特

征都包含大量致病蛋白的聚集, 比如阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 中的淀粉样蛋白和 tau 蛋白的聚集^[26], 帕金森综合征 (Parkinson's disease, PD) 中的突触核蛋白斑块^[27], 或者肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 中的斑块^[28]。基因的相关突变可以促进这种液体到固体的相分离。例如, FUS 的朊病毒样结构域内的 G156E 突变最近被证明可以加速从液滴到蛋白质捕获纤维水凝胶和神经毒性蛋白聚集物的转变^[29,30], 而 hnRNPA2B 和 hnRNPA1 的类朊病毒样结构域发生致病突变, 加剧了蛋白内在聚集趋势, 形成自种原纤维, 从而促进细胞聚集体的形成^[31]。当这些突变存在于内在无序区的 β 拉链结构域时, 其更加倾向于折叠为稳定的类淀粉蛋白结构^[32]。致病突变还可以通过产生异常的蛋白质或 RNA 来影响相分离。例如, 由 FUS (TLS)、EWS (EWSR1) 和 TAF15 组成的 FET 蛋白家族, 参与 RNA 存储位点的相变^[33], 并通过 RNA 刺激的过程组装成高阶结构^[34,35], 这些功能在人类受损从而造成疾病。RNA 重复序列扩增也会导致功能异常, 重复的 RNA 位点可以捕获 RNA 结合蛋白导致其功能丧失。研究人员已经发现一些 RNA 重复序列可以进行翻译过程^[36], 如肌萎缩侧索硬化症致病重复序列 GGGGCC 可以产生不同的二肽重复, 其中的甘氨酸-精氨酸、脯氨酸-精氨酸二肽重复序列定位于不同的无膜细胞器^[37]。线粒体功能紊乱也会促进衰老和神经退化性疾病的发生, 它可能导致 ATP 水平下降^[38]。有证据表明, 细胞 ATP 可以作为化学助溶物直接阻止相分离和聚合。因此在老化和疾病中, 线粒体呼吸功能的缺陷可能促进蛋白质聚集。

近年来, 很多研究人员开始探讨癌症与相分离之间的关系。肿瘤抑制因子 SPOP 突变可导致前列腺、乳腺和其他实体肿瘤^[39]。SPOP 是 cullin3 环泛素连接酶的底物的配体, 定位于核斑点处^[40]。癌症相关的 SPOP 突变会干扰连接酶底物募集, 底物在体外可触发 SPOP 的相分离和细胞内无膜细胞器的共定位。酶活性与细胞共定位和体外中尺度的 SPOP-底物组装形成有关。疾病相关的 SPOP 突变可导致原癌蛋白的积累, 从而干扰无膜细胞器的相分离和共定位, 这表明该 E3 连接酶的底物相分离是泛素依赖蛋白稳定的再泛素化的基础^[41]。在某些癌症

中^[42], 易位会破坏 FET 蛋白的低复杂度区域, 从而改变融合蛋白的核酸结合特性。

以上简单介绍了相分离与疾病之间的重要关系, 但是相分离的很多具体的致病机理还不是非常明确。研究人员发现染色质三维结构与相分离有关, 研究相分离与基因组结构之间的关系有助于人们进一步揭示相分离的致病机理。

2.4 相分离的其他生物学功能

相分离因为将参与相变的分子进行了局部浓缩, 提高了细胞内关键酶或蛋白复合物的局部浓度, 所以在细胞内, 相分离还具有促进信号传导^[5]等生化反应过程、引导蛋白质定位和隔离分子防止反应失活等诸多作用^[43]。随着研究手段的进步, 更多的相分离生物学功能正在逐渐被解释出来。

3 相分离与染色质结构

3.1 染色质结构

染色质是细胞核内生命活动的物质环境, 染色质的空间结构和细胞核内的诸多生命过程息息相关。在高通量基因组测序技术高速发展的推动下, 以染色质免疫共沉淀测序 (chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)^[44,45]、高通量染色质构象捕获测序 (high input chromosome conformation capture, Hi-C)^[46,47] 和转座酶可接近性核染色质序列测序 (assay for transposase accessible chromatin, ATAC-seq)^[48,49] 等技术为代表的一系列技术推动了染色质三维结构的研究迅速发展。近年来, 研究人员发现, 细胞核内不仅有大量相分离现象的存在, 并且相分离现象与染色质的空间结构具有重要的联系。2019 年, Gibson 等^[50]甚至发现, 在体外纯化的串联核小体可以通过其核心蛋白内的无序区域间的多价相互作用形成相分离凝聚, 并且在组蛋白 H1 的帮助下, 这一相分离凝聚可以更加高效的发生。由于核小体的串联是染色质的最基本结构单元, 这一发现为细胞核中染色质的整体结构形成提供了一个“基态”。也就是说, 更精细的染色质结构形成很可能是在这一相分离凝聚体之上发生的^[50]。这一发现同时对常见的染色质多聚体物理模型提出了挑战^[51]。

3.2 相分离感知并重塑染色质结构

相分离感知并重塑染色质结构的研究工作目前主要是 Brangwynne 实验室利用其所建立的 CasDrop 系统通过对 FUS、BRD4 和 TAF15 蛋白的研究做出的。他们的研究发现, 内在无序区域组装而成的凝聚体具有广泛的序列特征, 它们不仅在低密度染色质区域优先成凝聚核, 而且在成核和生长过程中会排斥该区域的染色质^[52]。首先, 3 种蛋白均可在 CasDrop 系统诱导下发生“液-液相分离”现象, 其中 BRD4 中的一个长内在无序区域 BRD4 Δ N 形成液滴的能力最强。其次, 以 H2B-miRFP670 荧光强度作为测定染色质密度的指标, 测定相分离液滴在液滴凝聚前后以及整个细胞核中染色质的密度分布。通过比较发现, 在液滴区域, H2B 强度的分布明显低于整个核中 H2B 的分布, 并且 H2B-miRFP670 在相变处的荧光强度随时间延长而逐步下降。这暗示着, 随着液滴的增长, 液滴所在区域的染色质会被推出该区域。与此相一致的是, 细胞核内的无膜结构, 像核仁、Cajal 体和 PML 体等也倾向于在染色质低密度区域形成^[53]。

为进一步研究为什么倾向于排斥染色质的液滴会在低染色质密度区域优先生成, Shin 等^[16]建立了凝聚物与可变形染色质网络的力学相互作用的数学模型, 液滴成核时的自由能损耗 ΔF 可通过下式描绘:

$$\Delta F(R) = 4\pi\gamma R^2 - \frac{3}{4}\pi R^3 \left(\Delta\mu \cdot C_{\text{drop}} - \frac{5}{6}G \right)$$

其中 R 、 γ 、 $\Delta\mu$ 、 C_{drop} 和 G 分别代表液滴半径、液滴表面张力、过饱和溶液中分子与液滴相的化学势差、液滴内分子的饱和浓度、形变区域的杨氏 (Young's) 弹性模量。

该模型认为较小液滴在所有染色质密度区域都可以形成, 当液滴增大到光学显微镜可分辨大小时则倾向于在染色质密度低的区域形成。在染色质密度足够的区域, 机械变形能阻止液滴的生长超过临界尺寸。利用 CasDrop 体系观察了 BRD4 在微卫星序列区、端粒和致密异染色质区的相分离现象, 发现 BRD4 在染色质低密度区域能够被诱导形成液滴, 而在染色质高密度区, BRD4 的液滴则仅在其周围形成液滴。当 CasDrop 体系将 BRD4 的液滴锚定在异染色质区域内 HP1 α 密度相对较低的区域时, 随

着液滴的增大, HP1 α 被逐步剔除出该区域; 而部分增大的 BRD4 液滴则可以扰乱异染色质的结构, 使得该区域形成染色质密度下降。这些发现表明在相变发生的过程中, 其周围的染色质提供了一定的机械阻力。

相分离形成的液滴对染色质具有排斥作用, 导致染色质结构重塑; 同时, 染色质结构对相分离现象也有一定的影响, 相分离液滴倾向于在染色质结构疏松、低密度区域形成, 周围染色质对液滴的形成具有一定的机械阻力。相分离的这些性质被总结为一个染色质过滤模型, 即结合在特定基因位点的蛋白质的相分离能够将距离较远的基因拉近, 且排斥不含结合位点的基因区域。这保证了超级转录因子在染色质结构疏松的区域的聚积、对染色质的折叠、和促进活跃基因的表达。

3.3 相分离驱动异染色质区域的形成

组成型异染色质是真核生物基因组的重要组成部分, 在细胞核结构、DNA 修复、基因组稳定性、转座子沉默以及基因表达中起着重要作用^[9]。一个异染色质形成模型认为 HP1 α 蛋白发生液-液相分离, 形成容纳染色质而排斥 RNA 聚合酶等分子的液相稳定区室, 是异染色质形成的第一步, 并通过对果蝇、小鼠的体内体外实验进行验证。果蝇 HP1 α 蛋白尾部富集内在无序域和低复杂结构域。为确定 HP1 α 蛋白是否可以在体外发生相分离, 研究人员纯化了果蝇 HP1 α 蛋白, 发现在 22% 高蛋白浓度和低盐状态下, HP1 α 的水溶液自动分解形成液滴并在 37℃ 时溶解。为探究相分离现象与体内异染色质现象的相关性, 研究人员分析了早期果蝇胚胎异染色质形成的第一阶段, 发现异染色质在受精后第 11~13 个核周期开始形成, 但直到第 14 个周期才成熟为稳定的结构域。在每一个周期中 GFP-HP1 α 都表现出与相分离的液相区相关联的成核、生长和聚变相关的动态变化。在第 13~14 个周期早期胚胎中, HP1 α 液滴在融合后聚集并保持圆形。随着第 14 个周期的进展, 其圆度较低。通过光漂白后荧光恢复实验测量 10~14 个周期和原肠胚形成后的 HP1 α 蛋白活动和静止的组分比率, 表明液滴圆度的丧失伴随着 HP1 α 静止组分的显著增加, 由此推测这可能是 HP1 α 与

染色质聚合物的结合程度增多的结果^[52]。

大分子间弱疏水相互作用可以促进相分离。例如, 在果蝇 S2 和小鼠 NIH3T3 细胞中加入 1,6-己二醇(特异性破坏疏水相互作用力) 培养 2 min 后, HP1 在异染色质区明显但不完全分散; 去除 1,6-己二醇区域内的 HP1 富集部分恢复。与野生型对照组相比, 含有破坏二聚作用(I191E)或非组蛋白结合体(W200A)的点突变的 GFP-HP1 α 蛋白的迁移率显著增加。这一体外实验说明, 成熟异染色质结构域的完整性依赖于弱疏水相互作用, 而二聚作用和与非组蛋白结合体的相互作用有助于 HP1 的固定, 由此推断成熟异染色质形成与相分离有关并且包括固定(静态)和移动(液态) HP1 α 区域。为进一步验证通过相分离产生异染色质结构域的假设, 研究人员详细分析了这些结构域内外的 HP1 α 动态变化。数据表明 HP1 α 和其他异染色质蛋白在相界面上协调运动。在果蝇和哺乳动物细胞中, HP1 α 的动态变化与包含异染色质蛋白的相分离成分动态变化一致。通过果蝇 S2 细胞 HP1 α 去除实验发现 GFP-HP1 α 失去协调运动并在细胞内呈分散状态。

基于一系列体内和体外数据的组合, 研究人员提出一个由相分离驱动异染色质结构域形成的模型, 从整体上将异染色质结构域的涌现特性与局部分子相互作用联系起来。该模型认为异染色质的形成始于相分离的成核。起初, 所有的 HP1 α 都是可自由移动的, 通过多个 HP1 分子与其他异染色质组分之间形成多价、弱疏水相互作用, 开始形成原始液滴。随着时间的推移, 这些液滴发生了生长。在此期间, 球型液滴通过招募更多的 HP1 α 和变粗而变得更大, 一些 HP1 α 移动性丧失。HP1 α 液滴圆度的丧失随着固定的、染色质结合的 HP1 α 的增加而降低, 从而形成由液体和稳定的腔室组成的成熟异染色质区域^[52]。

3.4 形成染色质亚区室(subcompartement)的相分离机制

真核细胞中染色质可被划分为生物学功能不同的亚区室, 关于亚区室形成方式有两种不同的基于相分离的解释。一个是交联不同染色质区段的染色质相关蛋白可以诱导聚合物-聚合物相分离, 它产生一个有序的折叠小球^[54]; 另一个是染色质相关蛋白

与蛋白通过多价相互作用促进液-液相分离的发生^[3]。

聚合物-聚合物相分离机制基于可溶性桥连因子的结合, 这些桥因子组装成类似于一个塌陷的聚合物球的动态交联的染色质支架。在分子水平上, 桥接和染色质环的形成可以通过核小体间相互作用介导。由于染色质相关蛋白和转录因子含有两个或多个染色质、DNA 识别结构域, 因此具有桥联不同核小体的潜力^[55]。桥接可以驱动相应染色质区域与不同类型的桥接因子相互作用的相分离。

液-液相分离驱动相分离主要通过多价相互作用形成液滴, 并围绕染色质上的各个结合位点组装成亚区室。聚合物-聚合物相分离中的桥接作用可能间接地产生于多价结合染色质之间的相互作用。因此, 尽管在不同的分子基础上, 聚合物-聚合物相分离和液-液相分离原则上都可以促进紧凑染色质组分的形成, 通过聚合物-聚合物相分离形成的亚区室严格依赖于染色质支架, 在没有染色质的情况下会进行拆卸, 而通过液-液相分离形成的亚区可以独立于染色质支架而存在。

4 相分离和基因表达调控

4.1 超级增强子通过相分离调节基因表达

超级增强子(super enhancer)由一组连续排列的增强子组成, 具有比典型增强子更高水平的调控基因转录的能力^[56], 然而其调控基因表达的具体分子机制还不是很清楚。2017 年, Richard Young 实验室提出一个解释超级增强子通过相分离参与基因调控的模型^[57]。在该模型中, 增强子的蛋白质和核酸成分被表示为链状分子, 每个分子都含有一组残基, 这些残基可能与其他链发生相互作用。这些残基代表那些链状分子中可以进行可逆化学修饰的位点, 其上的化学修饰与它们形成链之间非共价交联的能力相关。例如, RNA Pol II 的 C 端结构域(C-terminal domain, CTD)七肽重复序列, 以及转录因子、共作用因子都有可能是这样的长链分子。这些分子上的磷酸化或去磷酸化修饰, 或者组蛋白和其他蛋白质上的乙酰化、甲基化或其他类型的化学修饰, 都会影响大分子之间的相互作用, 多个链分子相互作用, 交联形成网状聚集体。

2018 年,该实验室通过实验证明了上述的超级增强子基因调控模型^[58]。他们发现胚胎干细胞中的转录共激活因子 MED1 和 BRD4 可以在超级增强子处形成相分离的凝聚体,并将转录物质富集在超级增强子周围,形成转录过程中的区室化^[58]。转录共激活因子 MED1 和 BRD4 是超级增强子的重要组成部分,超级增强子与 MED1 和 BRD4 的凝聚物相关联。在稳定表达 mEGFP-BRD4/mEGFP-MED1 的 mESC 细胞系中, MED1 和 BRD4 在细胞核中呈现亮斑状且细胞核中的超级增强子与 MED1 和 BRD4 共定位,说明 MED1 与 BRD4 与超级增强子的功能有关。通过对 BRD4 与 MED1 形成的亮斑进行荧光漂白恢复实验,发现 BRD4 和 MED1 可以迅速恢复荧光性,当细胞内 ATP 被消耗时, BRD4 和 MED1 的荧光恢复效果显著降低;当用 3% 1,6-己二醇处理细胞后,细胞内的 BRD4 和 MED1 亮斑数目明显减少。这些现象说明 BRD4 和 MED1 亮斑具有相分离凝聚物的性质。通过 ChIP-seq 实验发现, 1,6-己二醇处理后的细胞中, BRD4 和 MED1 在超级增强子处的结合能力显著下降,同时由超级增强子调控的基因表达水平也显著降低。说明转录共激活因子 BRD4 与 MED1 在细胞中通过相分离形式在超级增强子处成簇分布,并且起到调控基因表达的作用。BRD4 和 MED1 中均检测到具有长的内在无序区域。通过对 BRD4 与 MED1 的内在无序区域进行纯化,发现它们在体外可自发组装形成液滴。这些液滴表现出弱蛋白-蛋白相互作用网络凝聚物的特征。液滴的大小与蛋白浓度、缓冲体系的盐浓度及疏水性等因素有关。在体内,利用蓝光报告系统 OptoDroplet 证明内在无序区域可以发生相分离,在蓝光刺激的情况下可以观察到细胞内亮斑的形成,并且亮斑之间有融合的现象。这些现象说明内在无序区域参与了与超级增强子共定位的 BRD4 和 MED1 的相分离现象,且 BRD4 和 MED1 相分离凝聚物具有普通相分离液滴的性质。这一系列的实验显示, BRD4 和 MED1 形成了相分离液体,参与了超级增强子的基因表达调控。

4.2 转录因子通过相分离参与基因表达调控

转录因子由 DNA 结合域(DNA-binding domains)

和激活域(activation domains)组成^[59]。对转录因子的 DNA 结合域已经有比较深入的研究^[60],但对激活域行使功能的机制,到目前为止仍然了解甚少。研究发现激活域可以与介质共激活剂共同作用发生相分离,激活基因表达^[61]。

OCT4 是对胚胎干细胞的多能状态维持至关重要的主要转录因子,也是胚胎干细胞超级增强子中的一个转录因子^[56]。OCT4 可以与转录中介体复合物(mediator)的亚基 MED1 相互作用,在胚胎干细胞中的超级增强子上形成相分离凝聚物^[62]。新生 RNA 荧光原位杂交的免疫荧光成像显示,在关键的多能性基因 *Esrrb*、*Nanog*、*Trim28* 和 *Mir290* 的超级增强子处存在不连续的 OCT4 斑点。ChIP-seq 结果显示 OCT4 和 MED1 在超级增强子附近共定位。以 *Nanog* 基因为研究对象,当 OCT4 暴露于小分子 dTag 中时, OCT4 发生迅速泛素化并降解,凝聚在超级增强子处的 MED1 和 *Nanog* 的基因表达也随之下落。在胚胎干细胞的分化过程中, *Mir290* 超级增强子附近的 OCT4 的丢失, MED1 和 *Mir290* 的基因表达也显著降低。这些结果说明 MED1 在超级增强子处的凝聚依赖于 OCT4,且 OCT4 和 MED1 与基因转录水平有关。

转录因子 OCT4 的激活域通过与 MED1-IDR 相互作用激活基因表达。OCT4-GFP 自身不形成相分离液滴,而 MED1-IDR-GFP 可以形成相分离液滴,且液滴大小与溶液浓度相关。当将两种蛋白混合时, OCT4-GFP 蛋白可以被招募进入 MED1-IDR-GFP 液滴中,并显示出液滴的性质。通过分析 OCT4 中氨基酸频率和电荷偏好性发现 OCT4 内在无序区域中富含脯氨酸和甘氨酸,并且具有全部的酸性氨基酸。由于转录因子的激活域中富含酸性氨基酸和脯氨酸,作者推测激活域中的脯氨酸或酸性氨基酸可能促进与相分离的 MED1-IDR 液滴的相互作用。通过设计荧光标记实验发现具有酸性氨基酸基序的多肽容易进入 MED1 液滴中,且 MED1-IDR 和转录中介体复合物招募 OCT4 要依赖于激活域酸性氨基酸提供的静电作用力。OCT4 激活域的酸性氨基酸基序对于其进入 MED1 的液滴以及基因激活功能都是必需的,它通过与 MED1 聚集形成液滴发挥其基因激活功能。这个例子展示了转录因子可以和转录中介体复合物

发生液-液相分离从而激活基因表达。

4.3 一种新的相分离调控基因转录模型

最近研究人员提出了一种新的基因转录模型解释 RNA 聚合酶 II (Pol II) 在起始和延伸阶段的调控机制^[63]。该模型认为基因的转录受控于两个相分离凝聚体。一个是在启动子附近形成的启动子动态凝聚体, 由包含转录因子、共激活因子、非磷酸化的 Pol II 和启动因子组成。另一个是在基因体中的瞬时凝聚体, 由磷酸化 Pol II、新生 RNA、延伸因子、RNA 加工因子以及特异性延伸共激活因子组成。启动子凝析体促进转录起始、RNA 合成和 Pol II 磷酸化。Pol II 的 C 端非结构区域的磷酸化驱使 Pol II 从启动子凝聚体中析出, 进入基因体凝聚体中。当 Pol II 到达基因的末端时, C 端非结构区域脱磷使得 Pol II 从基因体凝析液中释放出来, 并转移回启动子凝聚物。简单的说, 就是 Pol II 通过 C 端非结构区域的磷酸化调控其在不同功能聚集体之间的穿梭, 完成高效并且可控的转录。该模型假说提出后不久, Richard Young 实验室发表了跟上述模型一致的实验结果^[64]。在 Young 的结果中, 更明确的指出了剪接复合物在基因体凝聚体中的关键性作用, 即 Pol II 的 C 端非结构区域的磷酸化驱动从转录起始复合物到 RNA 加工复合物的转换。这也进一步强调了 C 端非结构区域磷酸化作为调节 Pol II 结合不同复合物偏好性的机制。

5 结论与展望

从发现相分离现象与无膜细胞器形成之间的联系之后, 研究人员一直致力于相分离的形成和功能机制的研究, 在相分离与染色质结构、基因表达、转录调控、信号传导等方面取得了重要突破。相分离现象与神经退行性疾病、癌症等复杂疾病密切关联的研究结果有助于研究人员进一步了解疾病的致病机理, 进而促进新的药物开发。但是相分离研究中仍然存在诸多困难与挑战。首先, 目前并没有广泛接受的标准来定义发生相分离的染色质结构; 其次, 简单的光学观测还不足以区分相分离。例如, 体外过表达一种蛋白质并看到一个大的球形液滴是

常见的, 内源性表达的蛋白质也可能存在类似的液滴。在实验方法方面, 细胞内相分离物质纯化比较困难, 很多体外验证的实验难以在体内进行开展。在未来的研究中, 除了对新的实验方法以解决细胞内实验困难有迫切需求之外, 新的影像分析识别算法, 建立分子层面的组学和宏观的相分离之间的联系, 也是一个重要的待解决问题。另外, 对于相分离在染色质构象形成, 相分离对细胞核内的生命过程的功能性作用是不是具有普遍性等一些基本的问题, 在学界仍然存在很多不同的声音。这一方面说明相分离的确是一个重要的, 受到广泛关注的生理现象。而另一方面, 也说明相分离的研究还需要被更深入全面的检视。在可预见的未来, 相分离的研究将在实验技术和计算技术的双重推动下, 揭示更深入的生命科学问题。

参考文献(References):

- [1] Mitrea DM, Kriwacki RM. Phase separation in biology; functional organization of a higher order. *Cell Commun Signal*, 2016, 14: 1. [DOI]
- [2] Uversky VN. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 44: 18–30. [DOI]
- [3] Banani SF, Lee OH, Hyman AA, Rosen MK. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285–298. [DOI]
- [4] Brangwynne CP, Eckmann CR, Courson DS, Rybarska A, Hoege C, Gharakhani J, Jülicher F, Hyman AA. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science*, 2009, 324(5935): 1729–1732. [DOI]
- [5] Brangwynne CP, Mitchison TJ, Hyman AA. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(11): 4334–4339. [DOI]
- [6] Kato M, Han TW, Xie S, Shi K, Du X, Wu LC, Mirzaei H, Goldsmith EJ, Longgood J, Pei J, Grishin MV, Frantz DE, Schneider JW, Chen S, Li L, Sawaya MR, Eisenberg D, Tycko R, McKnight SL. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell*, 2012, 149(4): 753–767. [DOI]
- [7] Nott TJ, Petsalaki E, Farber P, Jervis D, Fussner E,

- Plochowietz A, Craggs TD, Bazett-Jones DP, Pawson T, Forman-Kay JD, Baldwin AJ. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles. *Mol Cell*, 2015, 57(5): 936–947. [DOI]
- [8] Li P, Banjade S, Cheng HC, Kim S, Chen B, Guo L, Llaguno M, Hollingsworth JV, King DS, Banani SF, Russo PS, Jiang QX, Nixon BT, Rosen MK. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, 2012, 483(7389): 336–340. [DOI]
- [9] Deichmann U. Chromatin: its history, current research, and the seminal researchers and their philosophy. *Perspect Biol Med*, 2015, 58(2): 143–164. [DOI]
- [10] Wu RB, Li PL. Liquid-liquid separation and biomolecular condensation. *Chin Sci Bull*, 2019, 64(22): 2285–2291. 吴荣波, 李丕龙. 液-液相分离与生物分子凝集体. *科学通报*, 2019, 64(22): 2285–2291. [DOI]
- [11] Ramaswami M, Taylor JP, Parker R. Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. *Cell*, 2013, 154(4): 727–736. [DOI]
- [12] King OD, Gitler AD, Shorter J. The tip of the iceberg: RNA-binding proteins with prion-like domains in neurodegenerative disease. *Brain Res*, 2012, 1462: 61–80. [DOI]
- [13] Alberti S, Halfmann R, King O, Kapila A, Lindquist S. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell*, 2009, 137(1): 146–158. [DOI]
- [14] Fromm SA, Kamenz J, Nöldeke ER, Neu A, Zocher G, Sprangers R. In vitro reconstitution of a cellular phase-transition process that involves the mRNA decapping machinery. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(28): 7354–7359. [DOI]
- [15] Zeng M, Shang Y, Araki Y, Guo T, Haganir RL, Zhang M. Phase transition in postsynaptic densities underlies formation of synaptic complexes and synaptic plasticity. *Cell*, 2016, 166(5): 1163–1175.e12. [DOI]
- [16] Shin Y, Chang YC, Lee DSW, Berry J, Sanders DW, Ronceray P, Wingreen NS, Haataja M, Brangwynne CP. Liquid nuclear condensates mechanically sense and structure the genome. *Cell*, 2018, 175(6): 1481–1491.e13. [DOI]
- [17] Huang WYC, Alvarez S, Kondo Y, Lee YK, Chung JK, Lam HYM, Biswas KH, Kuriyan J, Groves JT. A molecular assembly phase transition and kinetic proofreading modulate Ras activation by SOS. *Science*, 2019, 363(6431): 1098–1103. [DOI]
- [18] Houtman JC, Yamaguchi H, Barda-Saad M, Braiman A, Bowden B, Appella E, Schuck P, Samelson LE. Oligomerization of signaling complexes by the multipoint binding of GRB2 to both LAT and SOS1. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(9): 798–805. [DOI]
- [19] Bandaru P, Kondo Y, Kuriyan J. The interdependent activation of Son-of-Sevenless and Ras. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2019, 9(2): a031534. [DOI]
- [20] Nag A, Monine MI, Faeder JR, Goldstein B. Aggregation of membrane proteins by cytosolic cross-linkers: theory and simulation of the LAT-Grb2-SOS1 system. *Biophys J*, 2009, 96(7): 2604–2623. [DOI]
- [21] Huang WYC, Ditlev JA, Chiang HK, Rosen MK, Groves JT. Allosteric modulation of Grb2 recruitment to the intrinsically disordered scaffold protein, LAT, by Remote Site Phosphorylation. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(49): 18009–18015. [DOI]
- [22] Huang WYC, Chiang HK, Groves JT. Dynamic scaling analysis of molecular motion within the LAT:Grb2:SOS protein network on membranes. *Biophys J*, 2017, 113(8): 1807–1813. [DOI]
- [23] Riback JA, Katanski CD, Kear-Scott JL, Pilipenko EV, Rojek AE, Sosnick TR, Drummond DA. Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response. *Cell*, 2017, 168(6): 1028–1040.e19. [DOI]
- [24] Franzmann TM, Jahnel M, Pozniakovsky A, Mahamid J, Holehouse AS, Nüske E, Richter D, Baumeister W, Grill SW, Pappu RV, Hyman AA, Alberti S. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. *Science*, 2018, 359(6371): eaa05654. [DOI]
- [25] Li YR, King OD, Shorter J, Gitler AD. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. *J Cell Biol*, 2013, 201(3): 361–372. [DOI]
- [26] Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(4): 301–307. [DOI]
- [27] Shulman JM, De Jager P, Feany MB. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6(1): 193–222. [DOI]
- [28] Robberecht W, Philips T. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(4): 248–264. [DOI]
- [29] Patel A, Lee HO, Jawerth L, Maharana S, Jahnel M, Hein MY, Stojnov S, Mahamid J, Saha S, Franzmann TM, Pozniakovski A, Poser I, Maghelli N, Royer LA, Weigert M, Myers EW, Grill S, Drechsel D, Hyman AA, Alberti S. A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. *Cell*, 2015, 162(5): 1066–

1077. [\[DOI\]](#)
- [30] Kim HJ, Kim NC, Wang YD, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, MacLea KS, Freibaum B, Li S, Molliex A, Kanagaraj AP, Carter R, Boylan KB, Wojtas AM, Rademakers R, Pinkus JL, Greenberg SA, Trojanowski JQ, Traynor BJ, Smith BN, Topp S, Gkazi AS, Miller J, Shaw CE, Kottlors M, Kirschner J, Pestronk A, Li YR, Ford AF, Gitler AD, Benatar M, King OD, Kimonis VE, Ross ED, Weihl CC, Shorter J, Taylor JP. Mutations in prion-like domains in hnRNPA2B1 and hnRNPA1 cause multisystem proteinopathy and ALS. *Nature*, 2013, 495(7442): 467–473. [\[DOI\]](#)
- [31] Murakami T, Qamar S, Lin JQ, Schierle GS, Rees E, Miyashita A, Costa AR, Dodd RB, Chan FT, Michel CH, Kronenberg-Versteeg D, Li Y, Yang SP, Wakutani Y, Meadows W, Ferry RR, Dong L, Tartaglia GG, Favrin G, Lin WL, Dickson DW, Zhen M, Ron D, Schmitt-Ulms G, Fraser PE, Shneider NA, Holt C, Vendruscolo M, Kaminski CF, St George-Hyslop P. ALS/FTD mutation-induced phase transition of FUS liquid droplets and reversible hydrogels into irreversible hydrogels impairs RNP granule function. *Neuron*, 2015, 88(4): 678–690. [\[DOI\]](#)
- [32] Thompson MJ, Sievers SA, Karanicolas J, Ivanova MI, Baker D, Eisenberg D. The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(11): 4074–4078. [\[DOI\]](#)
- [33] Han TW, Kato M, Xie S, Wu LC, Mirzaei H, Pei J, Chen M, Xie Y, Allen J, Xiao J, McKnight SL. Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies. *Cell*, 2012, 149(4): 768–779. [\[DOI\]](#)
- [34] Schwartz JC, Wang X, Podell ER, Cech TR. RNA seeds higher-order assembly of FUS protein. *Cell Rep*, 2013, 5(4): 918–925. [\[DOI\]](#)
- [35] Schwartz JC, Cech TR, Parker RR. Biochemical properties and biological functions of FET proteins. *Annu Rev Biochem*, 2015, 84: 355–379. [\[DOI\]](#)
- [36] Cleary JD, Ranum LP. Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(R1): R45–51. [\[DOI\]](#)
- [37] Mori K, Weng SM, Arzberger T, May S, Rentzsch K, Kremmer E, Schmid B, Kretschmar HA, Cruts M, Van Broeckhoven C, Haass C, Edbauer D. The C9orf72 GGGGCC repeat is translated into aggregating dipeptide-repeat proteins in FTL/ALS. *Science*, 2013, 339(6125): 1335–1338. [\[DOI\]](#)
- [38] Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006, 443(7113): 787–795. [\[DOI\]](#)
- [39] Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov*, 2012, 2(5): 401–404. [\[DOI\]](#)
- [40] Klock TI, Kurys P, Elbi C, Nagaich AK, Hendarwanto A, Slagsvold T, Chang CY, Hager GL, Saatcioglu F. Ligand-specific dynamics of the androgen receptor at its response element in living cells. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(5): 1823–1843. [\[DOI\]](#)
- [41] Bouchard JJ, Otero JH, Scott DC, Szulc E, Martin EW, Sabri N, Granata D, Marzahn MR, Lindorff-Larsen K, Salvatella X, Schulman BA, Mittag T. Cancer mutations of the tumor suppressor SPOP disrupt the formation of active, phase-separated compartments. *Mol Cell*, 2018, 72(1): 19–36.e8. [\[DOI\]](#)
- [42] Wojciechowska M, Krzyzosiak WJ. Cellular toxicity of expanded RNA repeats: focus on RNA foci. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(19): 3811–3821. [\[DOI\]](#)
- [43] Feric M, Vaidya N, Harmon TS, Mitrea DM, Zhu L, Richardson TM, Kriwacki RW, Pappu RV, Brangwynne CP. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell*, 2016, 165(7): 1686–1697. [\[DOI\]](#)
- [44] Rotem A, Ram O, Shores N, Sperling RA, Goren A, Weitz DA, Bernstein BE. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(11): 1165–1172. [\[DOI\]](#)
- [45] Shankaranarayanan P, Mendoza-Parra MA, Walia M, Wang L, Li N, Trindade LM, Gronemeyer H. Single-tube linear DNA amplification (LinDA) for robust ChIP-seq. *Nat Methods*, 2011, 8(7): 565–567. [\[DOI\]](#)
- [46] Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES, Dekker J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 2009, 326(5950): 289–293. [\[DOI\]](#)
- [47] Rao SS, Huntley MH, Durand NC, Stamenova EK, Bochkov ID, Robinson JT, Sanborn AL, Machol I, Omer AD, Lander ES, Aiden EL. A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, 2014, 159(7): 1665–1680. [\[DOI\]](#)

- [48] Buenrostro JD, Wu BJ, Chang HY, Greenleaf WJ. ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015, 109: 21.29.1–21.29.9. [DOI]
- [49] Buenrostro JD, Giresi PG, Zaba LC, Chang HY, Greenleaf WJ. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat Methods*, 2013, 10(12): 1213–1218. [DOI]
- [50] Gibson BA, Doolittle LK, Schneider MWG, Jensen LE, Gamarra N, Henry L, Gerlich DW, Redding S, Rosen MK. Organization of chromatin by intrinsic and regulated phase separation. *Cell*, 2019, 179(2): 470–484.e21. [DOI]
- [51] Xu BX, Zhang ZH. Computational inference of physical spatial organization of eukaryotic genomes. *Quant Biol*, 2016, 4(4): 302–309. [DOI]
- [52] Strom AR, Emelyanov AV, Mir M, Fyodorov DV, Darzacq X, Karpen GH. Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, 2017, 547(7662): 241–245. [DOI]
- [53] Mao YS, Zhang B, Spector DL. Biogenesis and function of nuclear bodies. *Trends Genet*, 2011, 27(8): 295–306. [DOI]
- [54] Erdel F, Rippe K. Formation of chromatin subcompartments by phase separation. *Biophys J*, 2018, 114(10): 2262–2270. [DOI]
- [55] Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(12): 983–994. [DOI]
- [56] Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, Abraham BJ, Lin CY, Kagey MH, Rahl PB, Lee TI, Young RA. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 2013, 153(2): 307–319. [DOI]
- [57] Hnisz D, Shrinivas K, Young RA, Chakraborty AK, Sharp PA. A phase separation model for transcriptional control. *Cell*, 2017, 169(1): 13–23. [DOI]
- [58] Sabari BR, Dall'Agnese A, Boija A, Klein IA, Coffey EL, Shrinivas K, Abraham BJ, Hannett NM, Zamudio AV, Manteiga JC, Li CH, Guo YE, Day DS, Schuijers J, Vasile E, Malik S, Hnisz D, Lee TI, Cisse II, Roeder RG, Sharp PA, Chakraborty AK, Young PA. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science*, 2018, 361(6400): eaar3958. [DOI]
- [59] Brent R, Ptashne M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell*, 1985, 43(3 Pt 2): 729–736. [DOI]
- [60] Fulton DL, Sundararajan S, Badis G, Hughes TR, Wasserman WW, Roach JC, Sladek R. TFcat: the curated catalog of mouse and human transcription factors. *Genome Biol*, 2009, 10(3): R29. [DOI]
- [61] Boija A, Klein IA, Sabari BR, Dall'Agnese A, Coffey EL, Zamudio AV, Li CH, Shrinivas K, Manteiga JC, Hannett NM, Abraham BJ, Afeyan LK, Guo YE, Rimel JK, Fant CB, Schuijers J, Lee TL, Taatjes DJ, Young RA. Transcription factors activate genes through the phase-separation capacity of their activation domains. *Cell*, 2018, 175(7): 1842–1855.e16. [DOI]
- [62] Apostolou E, Ferrari F, Walsh RM, Bar-Nur O, Stadtfeld M, Cheloufi S, Stuart HT, Polo JM, Ohsumi TK, Borowsky ML, Kharchenko PV, Park PJ, Hochedlinger K. Genome-wide chromatin interactions of the Nanog locus in pluripotency, differentiation, and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2013, 12(6): 699–712. [DOI]
- [63] Cramer P. Organization and regulation of gene transcription. *Nature*, 2019, 573(7772): 45–54. [DOI]
- [64] Guo YE, Manteiga JC, Henninger JE, Sabari BR, Dall'Agnese A, Hannett NM, Spille JH, Afeyan LK, Zamudio AV, Shrinivas K, Abraham BJ, Boija A, Decker TM, Rimel JK, Fant CB, Lee TI, Cisse II, Sharp PA, Taatjes DJ, Young RA. Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature*, 2019, 572(7770): 543–548. [DOI]

(责任编辑: 史岸冰)