

综述

肌萎缩侧索硬化症相关肉瘤融合蛋白与应激颗粒

魏砚明* 栾智华 陈秀红 梁锐

(山西中医学院实验中心, 晋中 030619)

摘要 肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种以运动神经细胞死亡为特征的、致命性神经退行性疾病。作为一种RNA结合蛋白,肉瘤融合蛋白(fused in sarcoma, FUS)突变引起ALS。应激颗粒(stress granules, SG)是细胞在应激条件下产生的细胞质结构。FUS存在于SG中,SG标记物是FUS阳性聚集体的组分,提示FUS突变体可能干扰SG正常功能,并且SG可能作为病理性FUS聚集体的前体。该文探讨了SG募集FUS的机制与调控,分析了SG与FUS聚集体之间的关系,以期了解SG在FUS突变引起的ALS发生中的作用提供参考。

关键词 肌萎缩侧索硬化症;肉瘤融合蛋白;应激颗粒

Amyotrophic Lateral Sclerosis Associated FUS Protein and Stress Granule

Wei Yanming*, Luan Zhihua, Chen Xiuhong, Liang Rui

(Experimental Centre, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

Abstract Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a lethal neurodegenerative disorder characterized by loss of motor neurons. As a RNA binding protein, fused in sarcoma (FUS) mutations cause ALS. Stress granules (SG) are cytosolic structures formed normally in response to induced stressors. FUS assembles into SG, while SG marker proteins are constituents of pathological FUS aggregates, implying that mutant FUS could disturb the function of SG and FUS aggregates might arise from SG. This review will discuss the mechanisms and regulation that FUS recruit into SG, analyze the relationship between SG and FUS aggregates, and provide implications for the roles of SG in FUS mutants caused ALS.

Keywords amyotrophic lateral sclerosis; fused in sarcoma; stress granule

肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种致命性运动神经细胞疾病。绝大多数ALS病例为发病原因不明的散发性ALS,其余约10%为家族性ALS。肉瘤融合蛋白(fused in sarcoma, FUS)是近年来发现的一种家族性ALS致病蛋白质。作为RNA结合蛋白, FUS最初被发现为一种融合癌

蛋白,参与多种RNA代谢过程^[1-2]。目前对于FUS突变引起ALS的机制仍未阐明。

多种应激与ALS病理发生有关^[3-4]。例如,氧化应激是ALS的一种潜在致病因素^[5-6]。应激颗粒(stress granule, SG)构成一种细胞应激反应体系,是细胞在受到环境或代谢应激时形成的临时性、保护性、致

收稿日期: 2016-03-01 接受日期: 2016-05-03

山西中医学院博士科研启动基金(批准号: 2015BK16)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0351-3179717, E-mail: weiyanning2005@aliyun.com

Received: March 1, 2016 Accepted: May 3, 2016

This work was supported by the Scientific Research Fund for the Doctoral Young Scholars of Shanxi University of Traditional Chinese Medical (Grant No.2015BK16)

*Corresponding author. Tel: +86-351-3179717, E-mail: weiyanning2005@aliyun.com

网络出版时间: 2016-07-25 15:30:08 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160725.1530.002.html>

密、无膜细胞质结构^[7-8]。SG抑制应激条件下细胞内蛋白质翻译,其参与的细胞修复在神经细胞中较非神经细胞具有更重要的作用,并且SG的调控对于神经细胞生存尤其关键^[6,9],提示SG途径改变参与神经细胞损伤与死亡。迄今已经发现多种神经退行性疾病与SG途径异常有关^[10-12]。

应激促使FUS组装进SG,并且SG标记物与ALS病人脑组织中病理性FUS阳性聚集体共定位^[3,13-20],提示FUS与SG之间具有某些共同的作用途径,FUS参与调控SG途径,而突变引起的SG途径失调可能在神经退行过程中发挥作用,例如过量的SG可能作为FUS胞质聚集体的前体。本文将综述SG募集FUS的机制与调控,解析SG和FUS聚集体之间的可能联系,旨在为揭示SG在FUS突变体相关的ALS病理发生中的作用和寻找治疗ALS的潜在靶点提供线索。

1 FUS的组成特征

人FUS蛋白质由526个氨基酸残基组成,具有多个保守序列,包括N-端谷氨酰胺-甘氨酸-丝氨酸-酪氨酸富集区(glutamine-glycine-serine-tyrosine, QGSY)富集区、甘氨酸(glycine, G)富集区、RNA识别区(RNA recognition motif, RRM)、锌指结构区(zinc finger, ZnF)及C-端精氨酸-甘氨酸-甘氨酸(arginine-glycine-glycine, RGG)富集区等(图1)。FUS穿梭于细胞质-核之间,289~298位氨基酸为核输出序列(nuclear export signal, NES),C-端(514~526位氨基酸)为非典型性脯氨酸-酪氨酸核定位序列(proline-tyrosine nuclear localization signal, PY-NLS)^[2]。FUS N-端QGSY富集区和G富集区具有转录活化功能,可转位到其他染色体位点产生融合蛋白;RGG富集区、RRM区及ZnF区为RNA结合区。基于酵母朊蛋白的特征,预测FUS N-端1~239位氨基酸(包含QGSY富集区和部分G富集区)及第一个RGG区中的391~405

位氨基酸为朊蛋白样区(prion-like domain)^[21-22]。FUS主要定位于细胞核中,而ALS致病突变集中于C-端的核定位序列,阻碍了转运蛋白Transportin参与的核输入,引起FUS错误定位于细胞质中(包括体外培养的细胞系、诱导性多能干细胞、酵母、斑马鱼及人体患病组织等),形成胞质聚集体,并在应激条件下募集进SG^[3,13,16,19,23]。

2 SG的组装过程及主要功能

SG的组装过程受到高度调控^[6]。应激引起的eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α)磷酸化抑制全局性的蛋白质翻译,促进多聚核糖体解体,导致SG相关RNA结合蛋白及特定mRNA的初级成核化。初步聚集的RNA结合蛋白及翻译停滞的mRNA进一步通过蛋白质-蛋白质或蛋白质-mRNA相互作用,将其他的RNA结合蛋白或非RNA结合蛋白募集进SG。SG体积与形状变化明显,形成之初以大量小的细胞质点状物形式存在,随后逐渐合并成数量较少而体积较大的细胞质结构。应激消除后,SG迅速解聚^[11]。SG包含翻译停滞多聚腺苷酸mRNA、40S核糖体亚基、翻译起始因子和多种RNA结合蛋白,如TIA1、G3BP1、PABP、HuR、TTP及ALS致病蛋白质FUS与TDP43等^[8,24]。SG的组成具有不均一性和高度动态性的特点,不同应激条件形成的SG的组分不同,并且伴随着应激过程也逐渐变化^[8,25-26]。SG被认为是一种聚集体样结构,多种参与SG组成的RNA结合蛋白具有易聚集的朊蛋白样区,这些蛋白质以自身为模板,发生可逆的非特异性聚集^[8],形成的多聚蛋白质以一种称为“水凝胶”的不稳定中间体形式存在,这种特性决定了SG的组成是高度动态的^[27-28]。

作为应激诱导的细胞翻译抑制的一个关键组成部分,SG是mRNA贮存与分选位点,决定mRNA是否保留在SG中、在核糖体上翻译或被转运到临近

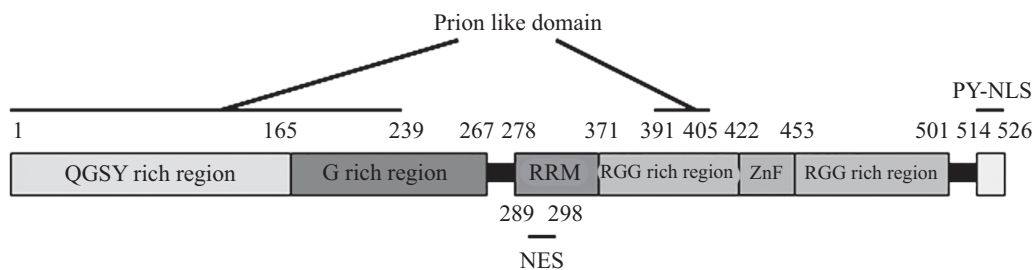


图1 FUS的结构域示意图(根据参考文献[2]修改)

Fig.1 The diagram of structural domain of FUS (modified from reference [2])

的P小体降解^[7]。SG也可以稳定某些特定mRNA,保障应激反应中必需mRNA的翻译;此外,SG通过结合促凋亡因子抑制细胞凋亡^[11,25],而某些蛋白质一旦进入SG其信号转导活性便发生改变^[29]。

3 SG募集FUS

野生型或突变体FUS均可被募集进SG中,但在不同细胞系中或应激条件下存在差异。例如,HT-1080细胞中瞬时过表达的野生型FUS促进SG的形成,并定位于SG中;氧化和热应激下,HT-1080细胞中稳定表达的野生型FUS定位于SG中^[18];应激条件下,斑马鱼细胞中野生型或突变体FUS均定位于SG中^[17]。利用未分化的诱导性多能干细胞或诱导性多能干细胞分化的运动神经细胞,观察到不同应激条件下FUS突变体定位于SG中^[3]。内源性FUS对于高渗应激的反应具有特异性。高渗应激引起体外培养的多种细胞系中核内FUS重定位于细胞质,并被组装进SG中,而其在应对其他应激时如氧化、内质网或热应激等未发生细胞质重定位^[15]。同样地,在诱导性多功能干细胞中,SG仅在高渗应激时募集内源性FUS^[3]。沉默内源性FUS导致高渗应激下细胞活性显著降低,提示FUS有可能协助多种编码DNA损伤修复和细胞周期调控蛋白质的mRNA进入SG中^[30],改变它们的表达,从而在应对高渗应激时发挥保护作用。

沉默内源性FUS的表达不影响应激条件下SG的形成、数量及体积^[6,15,31],表明FUS对于SG的形成及细胞应激反应不起关键作用,而FUS靶向SG很可能是应激时的下游反应。应激促使SG募集FUS,应激解除则FUS阳性SG解聚^[3,16],提示FUS被运输到SG中是一种细胞保护机制,可能对于mRNA分类起关键作用。由于SG中蛋白质翻译停滞^[7],FUS也可能参与调节应激条件下的蛋白质翻译。

与过表达野生型FUS相比,FUS突变体延缓氧化应激条件下SG的组装,加速去应激后SG的解体^[32]。这可能与FUS突变体在细胞质中自发聚集形成FUS颗粒(FUS granule, FG)相关^[33]。与不形成FG的细胞相比,具有FG的细胞中通常不形成或较少形成SG^[33],表明FG可能通过募集SG的正常组分,如参与SG成核的磷酸化的eIF2 α 及翻译停滞的mRNA,干扰细胞内SG的形成。此外,FUS突变体较野生型可显著增加SG的体积与丰度^[32]。应激条件下,体外培养的神

经细胞中FUS突变体阳性SG较野生型阳性SG丰度更高^[34];斑马鱼细胞中FUS突变体较野生型更易聚集于SG中,表达FUS突变体的细胞中SG的丰度更高,并且解体时间更长^[17],提示突变抑制FUS从SG中去组装,导致SG堆积。与野生型相比,FUS突变体结合多种不同mRNA^[35];同时,FUS突变体募集进SG后可减少某些已知的SG相关蛋白如G3BP和TIA-1结合到其中^[32],而异常的亚细胞定位也可能改变了其结合的蛋白质,因此,FUS突变体可能使SG相关蛋白质或mRNA的结合变得异常,影响SG的形态学特征,产生大而不稳定的结构,导致SG组装和去组装过程缺陷。由于SG的形态学与动力学特性与其功能有关,例如,SG体积增大是其发挥mRNA分选功能的先决条件^[7],应激条件下,FUS突变体可能获得异常的mRNA加工能力,改变细胞正常的应激反应。

细胞内形成的FUS阳性SG受自噬严格调控^[9,34]。自噬是高度保守并受严格调控的将底物运送至溶酶体中降解的过程。FUS阳性SG与自噬体共定位。抑制自噬引起FUS突变体阳性SG增多;诱导自噬减少FUS突变体阳性SG堆积,缓解氧化应激下FUS突变体引起的神经突断裂和神经细胞死亡^[34],表明FUS突变体阳性SG与神经退化有关。已经证实自噬失调与ALS疾病过程相关^[36],这可能引起了FUS突变体阳性SG在胞质和神经突中堆积,而参与ALS发生的各种应激进一步加剧SG的堆积,促进FUS突变体引起的神经突片段化和细胞死亡。

4 SG募集FUS的调控

FUS在细胞质中的错误定位是其募集进SG的前提条件^[4,13-14,16]。氧化应激下,胞质部分的FUS突变体募集进SG^[14],并且募集进SG的速度及程度与其在细胞质中的表达水平正相关,具有较高程度细胞质定位的FUS突变体更多地募集进SG,而主要定位于细胞核的FUS突变体则较少进入SG中^[16]。应激条件下,滞留于细胞质中的野生型FUS可被募集进SG中^[13]。因此,与野生型FUS相比,FUS突变体更易聚集于SG中,这与其在胞质中蛋白质绝对量的增多有关^[17]。SG的形成也影响FUS的细胞质定位,抑制SG的组装明显阻碍高渗导致的FUS在细胞质中的重定位,说明高渗引起的FUS细胞质定位需要SG的形成,SG可能通过多种途径将FUS滞留于细胞质中^[15]。

对于FUS突变体募集进SG是其定位到细胞质后的一种自发事件还是需要额外的应激存在争议^[3,13-14,16,19-20]。瞬时过表达FUS突变体引起SG形成;稳定转染的FUS突变体仅在应激条件下被募集进SG中。应激条件下,携带FUS突变体的病人成纤维细胞中FUS阳性SG数量明显增多^[14,16]。因此,瞬时表达的FUS突变体募集进SG不是其定位到细胞质后的自然结果,而与蛋白质过量表达相关,多项研究也证实FUS需要应激刺激才能募集进SG^[3,13-14,16]。

RNA结合能力参与FUS的亚细胞定位,FUS可能通过结合的RNA而被募集进SG中;直接或间接的蛋白质相互作用也可能参与了FUS定位于SG中^[4]。FUS与SG标记物PABP1共定位,并以RNA依赖的方式相互作用,而且突变引起的胞质FUS的增多导致更多的FUS与PABP1结合,说明RNA在SG募集FUS过程中发挥作用;突变引起的异常的蛋白质-mRNA相互作用有可能导致SG组成改变^[14,19]。应激条件下,缺失RNA结合能力的FUS突变体不被组装进SG中^[4,24,32,37]。利用构建的FUS截断突变体,发现RGG区对于其定位于SG中发挥至关重要的作用^[32]。而另一研究认为,除RGG区外,G富集区及RRM区同样在FUS组装进SG中发挥作用^[4],其中RGG区锌指结构起关键作用。由于RGG区具有较强的RNA结合能力,而G富集区和RRM区结合RNA能力相对较弱,提示FUS组装进SG依赖于RGG区的RNA结合能力,而G富集区及RRM区则可能通过蛋白质之间相互作用在其中发挥功效^[4]。酵母与果蝇模型中, RNA结合能力是FUS募集进SG及产生毒性效应所必需的^[38],该研究证实FUS的细胞毒性与其通过RNA定位于SG有关。某些蛋白质利用FUS的RNA结合能力定位于SG。例如,Sm蛋白质与FUS突变体共定位到SG依赖于FUS的RNA结合能力^[38],而FUS与Sm利用RNA结合^[39],因此Sm可能通过FUS以一种RNA依赖的方式被募集进SG中。由于Sm是构成剪接体U snRNP的核心组件,其被异常募集进SG中有可能引起剪接体功能缺陷。

甲基化修饰促进FUS的细胞质定位,抑制甲基化则引起FUS的细胞核定位^[15,40-42]。FUS与甲基转移酶PRMT1(protein arginine methyltransferase 1)相互结合,共定位于细胞核中,并被其甲基化。氧化应激引起内源性FUS及PRMT1募集进SG中^[42]。在体外培养细胞的SG及人体患病组织中检测到甲基化的FUS^[32,40],提示甲基化修饰可能影响FUS定位于

SG。利用全局水平的甲基转移酶抑制剂或过表达PRMT1可调控FUS募集进SG中,这可能是由于甲基化改变了FUS的亚细胞定位或者其与蛋白质或RNA的结合能力,从而影响其募集进SG^[12,42];而另外的研究认为,FUS突变体的甲基化不是其在氧化或高渗应激条件下募集进SG的先决条件,提示其他的翻译后修饰可能影响了FUS定位到SG中^[15,32],造成这种分歧的原因可能是由于细胞系、应激条件、突变体蛋白质水平或抗体应用的差异等引起的。

5 SG募集FUS突变体:获得性毒性或功能丧失

SG标记物是FUS聚集体的组成部分,提示SG失调在FUS突变引起的ALS发生中发挥作用,但仍不确定FUS突变体募集进SG是通过获得性毒性或功能丧失影响SG途径。FUS定位于SG属于正常的应激反应,其对于SG组装不是必需的,而当过多的FUS突变体定位于SG中,可能引起异常的纤维状聚集^[43],通过获得性毒性干扰SG动力学和形态学特征,导致SG不能及时解体而释放必要的mRNA或RNA结合蛋白,影响SG功能,最终抑制应激反应。另外,FUS突变体的持续表达可能引起SG形成大的病理性聚集体。尽管FUS对于SG的组装不是必需的,其很可能参与SG的功能调控,如mRNA分选或翻译调控等^[7],FUS突变体则具有异常的蛋白质-蛋白质或蛋白质-RNA相互作用,改变了某些已知的SG相关蛋白在SG中的定位^[14,19,32],从而丧失了调控SG的正常功能。

6 SG与FUS蛋白质聚集体的形成

SG通过一种高度调控的、可逆的并有益于生物学功能的蛋白质聚集途径形成^[10],其与病理性聚集体具有相似性。例如,两者的形成都由易聚集的朊蛋白样区介导,解体均需要分子伴侣,均具有泛素化蛋白质,均被蛋白质降解机器抑制剂所促进^[11],提示SG在包括ALS在内的多种蛋白质聚集体相关的神经退行性疾病中潜在的重要性。SG形成过程可能对过度聚集化比较敏感,SG组分发生易聚集化的突变或非特异结合神经退行性疾病中堆积的其他蛋白质聚集体均引起过度聚集化^[11]。

病理性FUS聚集体中出现SG标记物,提示其可能是因SG途径失调引起的。一种观点认为,聚集体

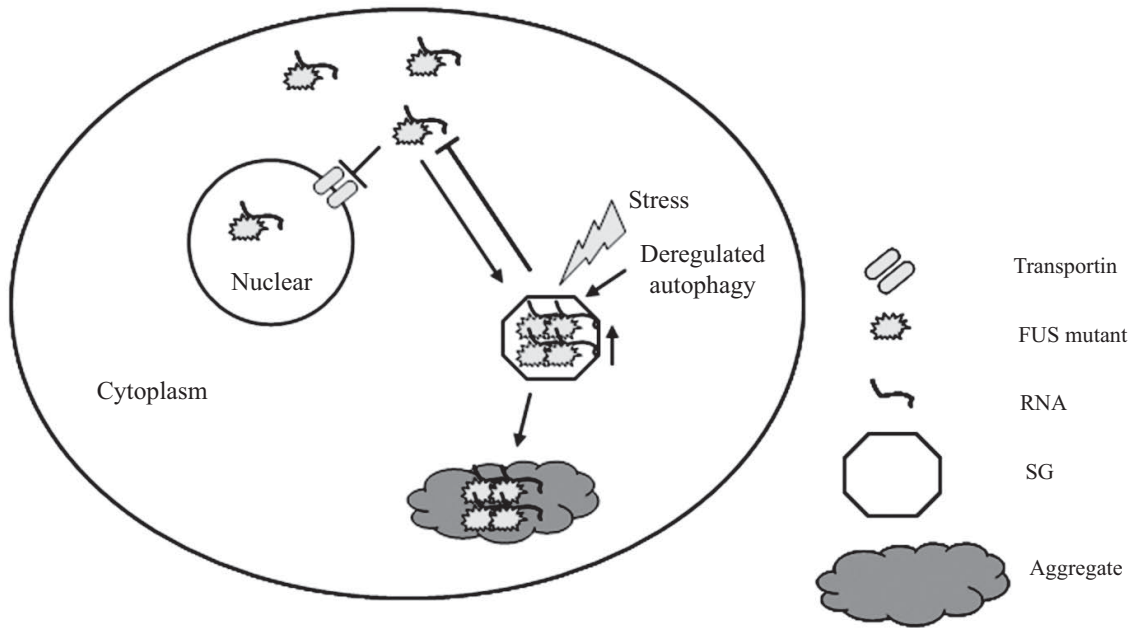


图2 FUS阳性SG参与FUS蛋白质聚集体的形成示意图

Fig.2 The proposed model of FUS positive SG involve in FUS aggregate

起源于不能有效解聚的SG^[8,10,12]。突变导致FUS核输入缺陷,堆积在细胞质中,应激引起定位于细胞质中的FUS突变体以RNA依赖的方式组装进SG^[14]。SG最初作为一种保护结构阻止胞质中FUS的聚集^[37],而高水平表达的FUS突变体和持续的应激可能克服了这种保护功能。FUS募集进SG后导致其在局部浓度升高,由于体外条件下高浓度FUS可以多聚化形成淀粉样纤维^[28],FUS在SG中的局部堆积可能促进其聚集。此外,FUS通过其朊蛋白样区发生聚集^[43],而突变打破了其在聚集和解聚之间的平衡,变得更易聚集,并可能以一种朊蛋白样的方式诱发了其他可溶性蛋白质的聚集^[4],进一步刺激SG的形成。随着疾病发展,自噬的失调伴有各种应激也能促进SG的过度形成,削弱SG的去组装^[9]。过度活化的SG可能募集其他功能蛋白质或翻译停滞mRNA,发展为大的胞质聚集体,干扰RNA加工,增强神经细胞对应激的易感性,开启神经退化^[10](图2)。

7 小结

FUS突变引起ALS的发生可能与异常定位于细胞质中的FUS突变体被募集进SG中引起SG生理功能失调有直接关系,但目前对于启动SG募集FUS的上游信号途径及FUS在SG中的具体功能的了解较

少。特异地抑制FUS突变体定位于SG中可能对ALS具有治疗作用,例如, RNA参与FUS定位于SG中,可以考虑通过抑制RNA依赖的方式阻断FUS的SG定位。由于SG的可逆性,在包含有可能是SG过度活化引起的病理性聚集体的神经退行性疾病中,如FUS突变引起的ALS,靶向抑制SG可能具有潜在的保护作用。自噬参与调控SG,因此通过操控自噬途径可能为与SG失调有关的神经退行性疾病的治疗提供新途径。但鉴于SG在应激反应中的关键作用,调控SG途径时需充分评估可能引起的严重副作用。

参考文献 (References)

- 1 Dormann D, Haass C. Fused in sarcoma (FUS): An oncogene goes awry in neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci* 2013; 56: 475-86.
- 2 Lagier-Tourenne C, Polymenidou M, Cleveland DW. TDP-43 and FUS/TLS: Emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 2010; 19(R1): R46-64.
- 3 Lenzi J, de Santis R, de Turris V, Morlando M, Laneve P, Calvo A, *et al.* ALS mutant FUS proteins are recruited into stress granules in induced pluripotent stem cell-derived motoneurons. *Dis Model Mech* 2015; 8(7): 755-66.
- 4 Bentmann E, Neumann M, Tahirovic S, Rodde R, Dormann D, Haass C. Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J Biol Chem* 2012; 287(27): 23079-94.
- 5 D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral

- sclerosis. *Free Radic Biol Med* 2013; 65: 509-27.
- 6 Aulas A, Stabile S, Vande Velde C. Endogenous TDP-43, but not FUS, contributes to stress granule assembly via G3BP. *Mol Neurodegener* 2012; 7: 54.
- 7 Anderson P, Kedersha N. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* 2008; 33(3): 141-50.
- 8 Aulas A, Vande Velde C. Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: A link to pathological inclusions in ALS? *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 423.
- 9 Lee JA. Autophagy manages disease-associated stress granules. *Oncotarget* 2015; 6(31): 30421-2.
- 10 Wolozin B. Regulated protein aggregation: Stress granules and neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 2012; 7: 56.
- 11 Vanderweyde T, Youmans K, Liu-Yesucevitz L, Wolozin B. Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: A mini-review. *Gerontology* 2013; 59(6): 524-33.
- 12 Bentmann E, Haass C, Dormann D. Stress granules in neurodegeneration—lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J* 2013; 280(18): 4348-70.
- 13 Dormann D, Rodde R, Edbauer D, Bentmann E, Fischer I, Hruscha A, *et al.* ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt transportin-mediated nuclear import. *EMBO J* 2010; 29(16): 2841-57.
- 14 Vance C, Scotter EL, Nishimura AL, Troakes C, Mitchell JC, Kathe C, *et al.* ALS mutant FUS disrupts nuclear localization and sequesters wild-type FUS within cytoplasmic stress granules. *Hum Mol Genet* 2013; 22(13): 2676-88.
- 15 Sama RR, Ward CL, Kaushansky LJ, Lemay N, Ishigaki S, Urano F, *et al.* FUS/TLS assembles into stress granules and is a prosurvival factor during hyperosmolar stress. *J Cell Physiol* 2013; 228(11): 2222-31.
- 16 Bosco DA, Lemay N, Ko HK, Zhou H, Burke C, Kwiatkowski TJ Jr, *et al.* Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules. *Hum Mol Genet* 2010; 19(21): 4160-75.
- 17 Acosta JR, Goldsbury C, Winnick C, Badrock AP, Fraser ST, Laird AS, *et al.* Mutant human FUS is ubiquitously mislocalized and generates persistent stress granules in primary cultured transgenic zebrafish cells. *PLoS One* 2014; 9(6): e90572.
- 18 Andersson MK, Stahlberg A, Arvidsson Y, Olofsson A, Semb H, Stenman G, *et al.* The multifunctional FUS, EWS and TAF15 proto-oncoproteins show cell type-specific expression patterns and involvement in cell spreading and stress response. *BMC Cell Biol* 2008; 9: 37.
- 19 Gal J, Zhang J, Kwinter DM, Zhai J, Jia H, Jia J, *et al.* Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants. *Neurobiol Aging* 2011; 32(12): 2323 e27-40.
- 20 Ito D, Seki M, Tsunoda Y, Uchiyama H, Suzuki N. Nuclear transport impairment of amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations in FUS/TLS. *Ann Neurol* 2011; 69(1): 152-62.
- 21 Cushman M, Johnson BS, King OD, Gitler AD, Shorter J. Prion-like disorders: Blurring the divide between transmissibility and infectivity. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 8): 1191-201.
- 22 Gitler AD, Shorter J. RNA-binding proteins with prion-like domains in ALS and FTL-D-U. *Prion* 2011; 5(3): 179-87.
- 23 Kino Y, Washizu C, Aquilanti E, Okuno M, Kurosawa M, Yamada M, *et al.* Intracellular localization and splicing regulation of FUS/TLS are variably affected by amyotrophic lateral sclerosis-linked mutations. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(7): 2781-98.
- 24 Daigle JG, Lanson NA Jr, Smith RB, Casci I, Maltare A, Monaghan J, *et al.* RNA-binding ability of FUS regulates neurodegeneration, cytoplasmic mislocalization and incorporation into stress granules associated with FUS carrying ALS-linked mutations. *Hum Mol Genet* 2013; 22(6): 1193-205.
- 25 Buchan JR, Parker R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 2009; 36(6): 932-41.
- 26 Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, Boccaccio GL. RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 2011; 23(2): 324-34.
- 27 Han TW, Kato M, Xie S, Wu LC, Mirzaei H, Pei J, *et al.* Cell-free formation of RNA granules: Bound RNAs identify features and components of cellular assemblies. *Cell* 2012; 149(4): 768-79.
- 28 Kato M, Han TW, Xie S, Shi K, Du X, Wu LC, *et al.* Cell-free formation of RNA granules: Low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell* 2012; 149(4): 753-67.
- 29 Wippich F, Bodenmiller B, Trajkovska MG, Wanka S, Aebersold R, Pelkmans L. Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling. *Cell* 2013; 152(4): 791-805.
- 30 Colombrina C, Onesto E, Megiorni F, Pizzuti A, Baralle FE, Buratti E, *et al.* TDP-43 and FUS RNA-binding proteins bind distinct sets of cytoplasmic messenger RNAs and differently regulate their post-transcriptional fate in motoneuron-like cells. *J Biol Chem* 2012; 287(19): 15635-47.
- 31 Blechingberg J, Luo Y, Bolund L, Damgaard CK, Nielsen AL. Gene expression responses to FUS, EWS, and TAF15 reduction and stress granule sequestration analyses identifies FET-protein non-redundant functions. *PLoS One* 2012; 7(9): e46251.
- 32 Baron DM, Kaushansky LJ, Ward CL, Sama RR, Chian RJ, Boggio KJ, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis-linked FUS/TLS alters stress granule assembly and dynamics. *Mol Neurodegener* 2013; 8: 30.
- 33 Shelkovnikova TA, Robinson HK, Southcombe JA, Ninkina N, Buchman VL. Multistep process of FUS aggregation in the cell cytoplasm involves RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. *Hum Mol Genet* 2014; 23(19): 5211-26.
- 34 Ryu HH, Jun MH, Min KJ, Jang DJ, Lee YS, Kim HK, *et al.* Autophagy regulates amyotrophic lateral sclerosis-linked fused in sarcoma-positive stress granules in neurons. *Neurobiol Aging* 2014; 35(12): 2822-31.
- 35 Hoell JI, Larsson E, Runge S, Nusbaum JD, Duggimpudi S, Farazi TA, *et al.* RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18(12): 1428-31.
- 36 Chen S, Zhang X, Song L, Le W. Autophagy dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Pathol* 2012; 22(1): 110-6.
- 37 Shelkovnikova TA, Robinson HK, Connor-Robson N, Buchman VL. Recruitment into stress granules prevents irreversible aggregation of FUS protein mislocalized to the cytoplasm. *Cell Cycle* 2013; 12(19): 3194-202.
- 38 Yu Y, Chi B, Xia W, Gangopadhyay J, Yamazaki T, Winkelbauer-Hurt ME, *et al.* U1 snRNP is mislocalized in ALS patient fibroblasts bearing NLS mutations in FUS and is required for

- motor neuron outgrowth in zebrafish. *Nucleic Acids Res* 2015; 43(6): 3208-18.
- 39 Yamazaki T, Chen S, Yu Y, Yan B, Haertlein TC, Carrasco MA, *et al.* FUS-SMN protein interactions link the motor neuron diseases ALS and SMA. *Cell Rep* 2012; 2(4): 799-806.
- 40 Dormann D, Madl T, Valori CF, Bentmann E, Tahirovic S, Abou-Ajram C, *et al.* Arginine methylation next to the PY-NLS modulates transportin binding and nuclear import of FUS. *EMBO J* 2012; 31(22): 4258-75.
- 41 Tradewell ML, Yu Z, Tibshirani M, Boulanger MC, Durham HD, Richard S. Arginine methylation by PRMT1 regulates nuclear-cytoplasmic localization and toxicity of FUS/TLS harbouring ALS-linked mutations. *Hum Mol Genet* 2012; 21(1): 136-49.
- 42 Yamaguchi A, Kitajo K. The effect of PRMT1-mediated arginine methylation on the subcellular localization, stress granules, and detergent-insoluble aggregates of FUS/TLS. *PLoS One* 2012; 7(11): e49267.
- 43 Sun Z, Diaz Z, Fang X, Hart MP, Chesi A, Shorter J, *et al.* Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS. *PLoS Biol* 2011; 9(4): e1000614.