

МОДЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ FUS-ПРОТЕИНОПАТИИ: СИСТЕМАТИЧЕСКИЙ ОБЗОР

©2024 г.

**А. П. РЕЗВЫХ^{1#}, Д. А. ШТЕЙНБЕРГ^{2#},
Е. В. БРОНОВИЦКИЙ³, А. А. УСТЮГОВ²,
С. Ю. ФУНИКОВ^{1*}**

¹ *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Москва,*

² *Институт физиологически активных веществ
Федерального исследовательского центра проблем химической
физики и медицинской химии РАН, Черноголовка,*

³ *Государственный университет просвещения, Мытищи*

I. Введение. II. РНК-связывающий белок FUS и его функции. III. Участие FUS в патогенезе БАС. IV. Моделирование FUS-протеинопатии в живых организмах. V. Перспективы исследования FUS-протеинопатии и лечения БАС. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Боковой амиотрофический склероз (БАС, болезнь Шарко или болезнь Лу Герига) – это тяжелое нейродегенеративное заболевание с неуклонно прогрессирующим течением, в результате которого происходит гибель верхних и нижних двигательных нейронов. Развитие БАС приводит к мышечной атрофии, прогрессирующему параличу, а смерть пациента наступает вследствие полной потери двигательной активности и дыхательной функции в течение нескольких лет после проявления первых симптомов и постановки диагноза. К настоящему времени БАС неизлечим, а пациентам предлагается только поддерживающая терапия.

*Адрес для корреспонденции: sergeifunikov@mail.ru

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-74-10050).

Равный вклад авторов.

БАС относится к орфанным заболеваниям; частота встречаемости БАС составляет 1.5 случая на 100000 человек в популяции США [1, 2], и 2.6–3.8 – в европейской популяции [3], 0.8 – в Китае [4] и 1.2 – в Южной Корее [5]. Для российской популяции частота встречаемости БАС оценивалась в ряде исследований в отдельно взятых регионах. В центральном регионе заболеваемость была оценена как 1,25 на 100 000 населения в год, что близко к показателям заболеваемости в США и Южной Корее [6, 7].

Примерно 10% случаев БАС имеет наследственный характер (семейные формы БАС), остальные – спорадический (спорадические формы БАС). К настоящему времени известно более 60 генов, мутации в которых считаются определяющими или ассоциированными с БАС (согласно базе данных ClinVar) [8]. Чаще всего среди наследственных семейных форм БАС встречаются мутации в генах *SOD1* (Супероксиддисмутаза 1), *C9orf72* (Chromosome 9 open reading frame 72), а также в генах ДНК/РНК-связывающих белков *TARDBP* (TAR DNA binding protein) и *FUS* (Fused in sarcoma) [9]. Большинство описанных БАС-ассоциированных мутаций выявлено у пациентов с семейной формой БАС, однако часть из них в редких случаях определяется и у пациентов со спорадической формой заболевания [10, 11]. Несмотря на различные причины развития БАС, ключевыми молекулярными признаками как наследственных, так и спорадических форм БАС являются: 1) образование патогистологических белковых агрегатов в цитоплазме двигательных нейронов [12–15]; 2) дисфункция РНК-связывающих белков и нарушение метаболизма РНК, включая процессинг и альтернативный сплайсинг РНК [16–18]; 3) нарушение транспорта белков и РНК между ядром и цитоплазмой нейронов [19, 20]; и 4) нарушение белкового гомеостаза и клиренса поврежденных и окисленных белков [21–23].

Детальное исследование функций aberrантных изоформ белковых молекул, этапов их патологической агрегации и связанных с ней токсических эффектов несомненно является ключом к пониманию патогенеза БАС и разработки подходов к его терапии. В данном обзоре будет проанализирован опыт моделирования патогенеза БАС на животных. Основное внимание будет уделено характеристике патологической агрегации РНК-связывающего белка FUS в двигательных нейронах, нарушению его функции в процессинге и альтернативном сплайсинге РНК, наблюдаемых у пациентов с семейными формами БАС.

II. РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК FUS И ЕГО ФУНКЦИИ

FUS/TLS (Fused in sarcoma/Translocated in Liposarcoma), EWSR1 (Ewing Sarcoma), TAF15 (TATA binding associated factor 15), а также их ортолог у дрозофилы Cabeza, составляют семейство РНК-связывающих белков FET (аббревиатура от первых букв их названий). Белки FET высококонсервативны, а их экспрессия наблюдается во всех тканях организма человека [24]. Структура белков этого семейства похожа и включает N-концевой мотив (S/G–Y–S/G)n (QSGY-богатая область у белка FUS); несколько аргинин-глицин-богатых доменов RGG и домен RRM (РНК-распознающий мотив, от англ. RNA recognition motif), участвующие в связывании с РНК; домен «цинковый палец» (ZnF); и NLS (сигнал ядерной локализации, от англ. nuclear localization signal) (Рисунок 1А). Существуют также данные о присутствии домена NES (сигнал ядерного экспорта, от англ. nuclear export signal) [25], ответственного за экспорт белков из ядра в цитоплазму, однако последние исследования ставят под сомнение его функциональную роль [26]. Домены QSGY и RGG1 вместе образуют прионо-подобный участок в белке FUS, наиболее склонный к агрегации [27, 28]. Трёхмерная структура FUS-белка на данный момент не установлена, однако, исходя из предсказанной трёхмерной структуры белка с помощью программы AlphaFold 2 [29], прионо-подобный участок QSGY и RGG1 не имеет регулярной структуры, такой как альфа-спираль или бета-слой (Рисунок 1Б, номер в базе данных AF-P35637-F1). Наконец, уровень внутренней неупорядоченности области QSGY максимален среди всех доменов белка FUS [30]. Примечательно, FUS занимает 15 место по уровню прионных свойств аминокислотной последовательности среди всех белков протеома человека согласно критериям, данным в работе [27].

Белок FUS имеет преимущественно ядерную локализацию в клетках, где его функции весьма обширны. Одной из основных функций FUS является регуляция альтернативного сплайсинга мРНК и участие в процессинге первичных транскриптов [31–33]. Белок FUS способен связывать транскрипты более чем 5500 генов [32], узнавая мотив GGUG/GUGGU [34]. Участок связывания FUS чаще всего расположен в 3'-нетранслируемых областях и интронах генов, включая консервативные интроны 6/7 своего собственного транскрипта [35]. Связываясь с интронами 6/7, FUS ограничивает поступление своей мРНК в цитоплазму. Таким образом, FUS регулирует собственную экспрессию в клетках. Нарушение механизма саморегуляции экспрессии FUS и изменение альтернативного сплайсинга мРНК – одни из наиболее частых событий, происходящих в нервных клетках

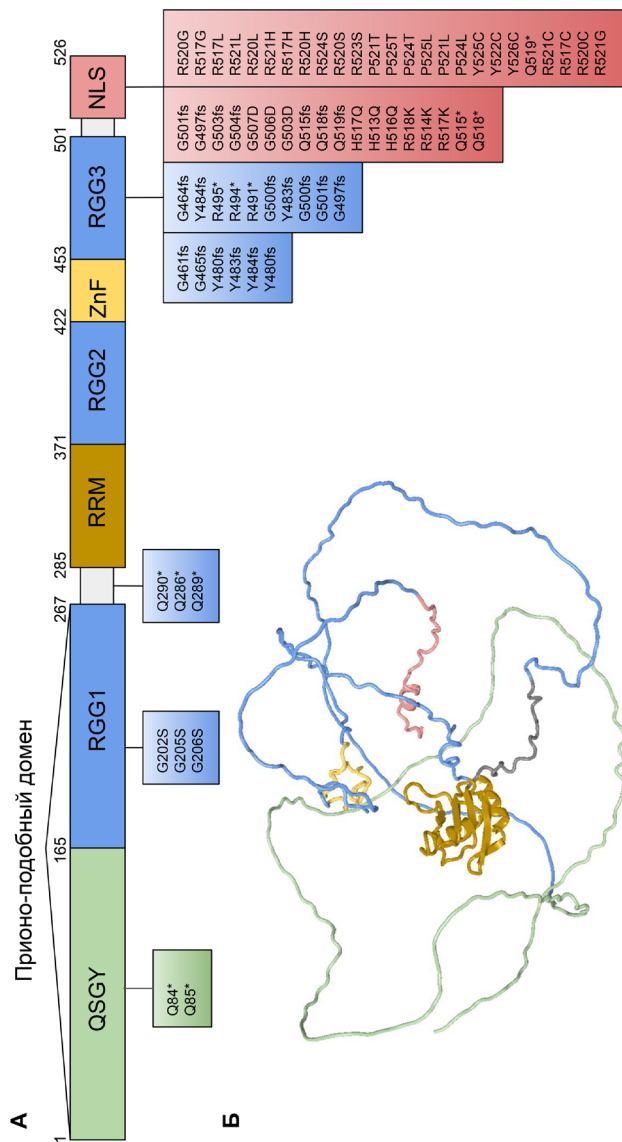


Рис. 1. Структура белка FUS человека.

А) Доменная организация белка FUS человека. QSGY – Gln-Gly-Ser-Tyr-богатый мотив, RGG – Arg-Gly-Gly-богатый мотив, RRM – РНК-связывающий мотив (от англ. RNA recognition motif), ZnF – домен «цинковый палец», NLS – сигнал ядерной локализации. На рисунке указаны БАС-ассоциированные мутации согласно базе данных Clin Var. * – нонсенс-мутация, приводящая к формированию преждевременного стоп-кодона; fs – мутация, приводящая к сдвигу рамки считывания (от англ. frameshift).

Б) Трёхмерная структура белка FUS, предсказанная с помощью алгоритма AlphaFold 2. Цвета белковых доменов соответствуют рисунку А.

при мутациях FUS [36–39]. Белок FUS взаимодействует с компонентом сплайсосомы РНК U1 [40, 41]. Показано, что нокаут белка FUS в клетках нейробластомы человека приводит к нарушению работы малых ядерных РНК U11 и U12 и нарушению сплайсинга интронов ряда ключевых генов нейрогенеза (*PPP2R2C*, *ACTL6B*, *SCN8A*, *SCN4A*) [42]. FUS обеспечивает стабильность транскриптов длинных некодирующих РНК [43], а также мРНК генов *GLUA1* и *SynGAP2*, играющих ключевые роли в функционировании глутаматергических синапсов [44, 45]. Тем не менее, механика работы FUS в регуляции метаболизма РНК во многом не ясна. Предполагается, что FUS участвует в стабилизации первичных мРНК и регулирует функционирование сплайсосомы, в результате чего достигается динамическое равновесие между непроцессированными транскриптами в ядре и зрелыми транскриптами в цитоплазме, доступными для трансляции. Функции FUS в процессинге РНК не ограничиваются регуляцией альтернативного сплайсинга. Белок FUS может также регулировать длину транскрипта, непосредственно влияя на полиаденилирование. В работе Масуда и соавторов на клетках нейробластомы мыши N2A показано, что локализация FUS в 3'-нетранслируемых областях транскриптов приводит к остановке движения РНК-полимеразы II [46]. Связывание FUS обычно происходит вблизи сайта альтернативного полиаденилирования образующегося транскрипта. В зависимости от нахождения этого сайта выше либо ниже района связывания FUS будет происходить формирование короткого либо удлиненного поли(А)-хвоста транскрипта. Образование укороченного поли(А)-хвоста связано с привлечением фактора CPSF160. Данный механизм регуляции длин мРНК с помощью FUS наблюдается у более чем 60% транскриптов нервной ткани [46]. FUS участвует в регуляции полиаденилирования транскриптов, в том числе связываясь с белками CPSF6, PAN2 и PABPC1 [44].

Белок FUS также участвует в биогенезе микроРНК, привлекая фактор Drosha к первичным транскриптам микроРНК (при-микроРНК) [47]. Кроме того, белок FUS может связываться с ДНК, гистондеацетилазой HDAC1 и принимать участие в репарации ДНК [48]. Показано, что БАС-ассоциированная мутация FUS-R521C приводит к нарушению связывания FUS и HDAC1, снижению эффективности репарации ДНК и повреждению генома [49]. Несмотря на преимущественно ядерную локализацию [50], предполагается, что FUS принимает участие в транспорте транскриптов и постоянно перемещается между ядром и цитоплазмой. Ядерный импорт белка FUS хорошо изучен и осуществляется с помощью белка Транспортин-1

(TRN1), который узнает NLS домен FUS [25, 51]. Механизм экспорта белка детально не изучен, однако, в работе Эдерле и соавторов показано, что он происходит по Экспортин-1 (XPO1)-независимому механизму [26]. В цитоплазме FUS локализован в пресинаптических окончаниях нервно-мышечных синапсов [52], постсинаптических окончаниях дендритов [53], а также в терминалях аксонов [54]. В пре- и постсинаптических окончаниях FUS находится в непосредственной близости с белком синаптофизин (Synaptophysin-1) и возможно принимает участие в работе везикулярного транспорта между нейронами [53, 54].

Белковые домены с низкой аминокислотной сложностью (от англ. low complexity domains), состоящие из многочисленных повторов как отдельных аминокислот, так и целых аминокислотных мотивов, подобно структуре доменов QSGY и RGG белка FUS, участвуют в формировании безмембранных компартментов. Такими надмолекулярными комплексами являются тельца процессинга (P-тельца, от англ. Processing bodies) и стресс-гранулы, образующихся под действием окислительного стресса или теплового шока [55–57]. В последнее время все больше исследований показывает, что подобные надмолекулярные структуры ведут себя подобно жидким каплям, находящимся в постоянном обмене с окружающей цитоплазмой или нуклеоплазмой. В исследовании Патель и соавторов показано, что белок FUS образует жидкие капли *in vitro* и *in vivo* в культуре клеток, формируя небольшие скопления в нуклеоплазме [58]. Интересно, что в условиях стресса, например, при воздействии теплового шока, FUS переходит в цитоплазму, где формирует жидкие гранулы, колокализирующиеся со стресс-гранулами [58]. Концентрация белка влияет на динамику формирования белковых капель: чем больше белка FUS поступает в цитоплазму, тем больше капель образуется. Причем растет не только количество капель, но и их размер. Со временем эти капли могут перейти из жидкого состояние в твердое, а скорость этой конверсии существенно увеличивается если в аминокислотную последовательность белка FUS внесена БАС-ассоциированная мутация. Интересно, что эти структуры напоминают амилоидные агрегаты, выявленные в предыдущей работе [59]. Важно отметить, что мутация в РНК-связывающем домене делает белок более склонным к агрегации, а мутации в домене NLS усиливают агрегацию за счет повышения концентрации белка в цитоплазме [58, 60].

III. УЧАСТИЕ *FUS* В ПАТОГЕНЕЗЕ БАС

Впервые мутации гена *FUS* независимо друг от друга обнаружили две группы исследователей в 2009 году в семьях пациентов с БАС 6-го типа (ALS6, Amyotrophic Lateral sclerosis type 6) [18, 61]. Посмертный анализ тканей пациентов позволил установить ряд ключевых молекулярных признаков патологии, в том числе аномальную локализацию мутантного белка *FUS* в цитоплазме двигательных нейронов и наличие *FUS*-положительных включений, а также дегенерацию преимущественно нижних двигательных нейронов [18, 61]. К настоящему времени обнаружено более 50 БАС-ассоциированных мутаций гена *FUS*, подавляющее большинство из которых являются гетерозиготными мутациями с аутосомно-доминантным типом наследования (Рисунок 1). Согласно оценке, проведенной в исследовании Фархан и соавторов, частота встречаемости мутаций в гене *FUS* составляет 0.001552795 [62]. Большинство из известных мутаций *FUS* являются точечными миссенс-мутациями, приводящими к замене аминокислоты в полипептидной цепи. Однако известны примеры мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания или к формированию преждевременного стоп-кодона (нонсенс-мутация), а также к нарушению сайтов сплайсинга [63–66]. В результате происходит образование aberrантных изоформ белка *FUS*, лишенных целых функциональных доменов, в частности, RRM и NLS. Большая группа мутаций гена *FUS* находится в С-концевом NLS домене. Мутации в NLS приводят к нарушению связывания с белком Транспортном-1 и ингибированию ядерного импорта мутантного *FUS* [67, 68]. Мутации в NLS в разной степени влияют на перемещение мутантного *FUS* из цитоплазмы в ядро, и те из них, которые оказывают наиболее сильное ингибирование ядерного импорта, связаны с более ранним началом заболевания и его быстрым развитием [69]. Патологическая агрегация мутантного белка *FUS*, подобная той, которая наблюдается у пациентов с семейными формами БАС, также характерна для ряда случаев лобно-височной деменции (ЛВД) [70]. Кроме того, *FUS*-положительные включения выявляются и в спорадических формах БАС [71, 72], хотя эти события достаточно редки.

Цитоплазматическая локализация мутантного *FUS* – это ключевое звено в цепи патогенеза БАС, ассоциированного с мутациями гена *FUS*. С одной стороны, нарушение ядерного импорта *FUS* приводит к невозможности осуществления его ядерных функций (от англ. loss of function) и сопутствующему нарушению метаболизма РНК, одного из ключевых признаков БАС [73, 74]. С другой стороны, накопление

мутантных изоформ FUS в цитоплазме приводит к формированию патологических включений, которые приобретают новые свойства и функции (от англ. gain of function) несовместимые с нормальной физиологией нейронов [14, 75]. Однако какой именно процесс – нарушение метаболизма РНК вследствие потери ядерной функции FUS или цитоплазматическая агрегация aberrантных изоформ FUS – является причиной развития патологии, остается одним из наиболее важных вопросов. Недавно был описан еще один механизм, в ходе которого происходит аномальная цитоплазматическая локализация FUS дикого типа. Исследуя образцы мотонейронов, полученных из плюрипотентных стволовых клеток человека (от англ. induced pluripotent stem cells, iPSCs) с мутацией белка VCP, ученые обнаружили белок FUS в цитоплазме этих клеток [76]. Далее они обнаружили aberrантный сплайсинг транскрипта гена *SFPQ*, вследствие которого в составе транскрипта удерживается интрон. Белок FUS связывается с удержанным интроном в транскрипте *SFPQ* и транслоцируется из ядра в цитоплазму, в результате чего происходит накопление FUS в цитоплазме нервных клеток. [76, 77]. Более того, аномальная локализация FUS была обнаружена не только в клетках с мутацией VCP, но и в образцах тканей пациентов со спорадическими формами БАС [76]. Стоит отметить, что нарушение альтернативного сплайсинга РНК и, в частности, изменение количества транскриптов в составе которых сохраняются интроны, наблюдается не только в нервных клетках, несущих мутацию *FUS*, но и в образцах тканей пациентов с мутациями генов *TARDBP*, *SOD1*, *C9orf72*, а также спорадических форм БАС неизвестной этиологии [37, 78-83].

Цитоплазматические агрегаты, образованные мутантными изоформами белка FUS, токсичны для клеток. В работе Камельгарн и соавторов на основании целого ряда экспериментов получены доказательства, что мутантный FUS (авторы исследовали мутации P525L и R495X, в которой отсутствует домен NLS) подавляет общую трансляцию белка и приводит к нарушению механизма нонсенс-опосредованного распада мРНК (от англ. nonsense-mediated decay) [84]. В недавней работе Севиньи и соавторов установили, что FUS участвует в mTOR-зависимой регуляции трансляции [85]. Исследователи показали, что ассоциация FUS с полирибосомами усиливается при ингибировании mTOR с помощью Torin1 или в условиях аминокислотного голодания. Внесение БАС-ассоциированных мутаций R521G и P525L в последовательность белка FUS увеличивало ассоциацию FUS с полирибосомами и снижало общий уровень биосинтеза белка [85]. Важно отметить, что ингибирующий

эффект FUS на трансляцию становится слабее при мутациях белка, снижающих его связывание с РНК [85].

Патологическая агрегация белков и, в частности, FUS тесно связана с патогенезом БАС. Как сам мутантный FUS, так и сформированные FUS-агрегаты связывают и рекрутируют в свой состав множество белков, приводя к их истощению и нарушению специфических функций в клетке. В результате скрининговых исследований по поиску белков-партнеров мутантного FUS было показано, что мутантный FUS связывается со множеством РНК-связывающих белков, участвующих в процессинге и сплайсинге РНК, в сборке рибосом и трансляции, а также белков, участвующих в репарации ДНК и факторов транскрипции (Рисунок 2) [40, 86–88]. Таким образом, патологическая агрегация aberrантных изоформ белка FUS провоцирует нарушение функции множества других белков вследствие их захвата в нерастворимые белковые агрегаты.

Различные формы стресса приводят к остановке трансляции вследствие фосфорилирования eIF2 α и формированию стресс-гранул – специальных внутриклеточных структур, предохраняющих мРНК от деградации в условиях стресса [89, 90]. Целый ряд работ указывает на рекрутирование цитоплазматического FUS в состав стресс-гранул [91–95]. Причем, рекрутирование в состав стресс-гранул, возможно, предотвращает необратимую агрегацию FUS. По-видимому, рекрутирование в состав стресс-гранул требует того, чтобы FUS был связан с РНК. Если внести мутацию или удалить РНК-связывающий домен из полипептидной цепи FUS, то ассоциация мутантного FUS со стресс-гранулами пропадает. С другой стороны, в работе Шелковниковой и соавторов показано, что образование FUS-агрегатов может идти и без связывания мутантного FUS с РНК [96]. Так или иначе, накопление мутантного FUS в составе стресс-гранул может изменять динамику их образования и влиять на взаимодействия между компонентами стресс-гранул [91, 97, 98]. Но можно ли считать рекрутирование мутантного FUS в состав стресс-гранул патологическим звеном БАС или оно носит адаптивное значение для физиологии клетки, до конца не понятно. В ряде работ приводятся сведения, что мутантный FUS спонтанно образует новый тип рибонуклеопротеидных структур, FUS-гранул, которые не входят в состав стресс-гранул, а скорее нарушают их образование [88]. FUS-гранулы формируют цитоплазматические микроагрегаты, которые в условиях стресса, могут объединяться в большие скопления, включающие в свой состав стресс-гранулы, и образовывать нерастворимые FUS-положительные включения

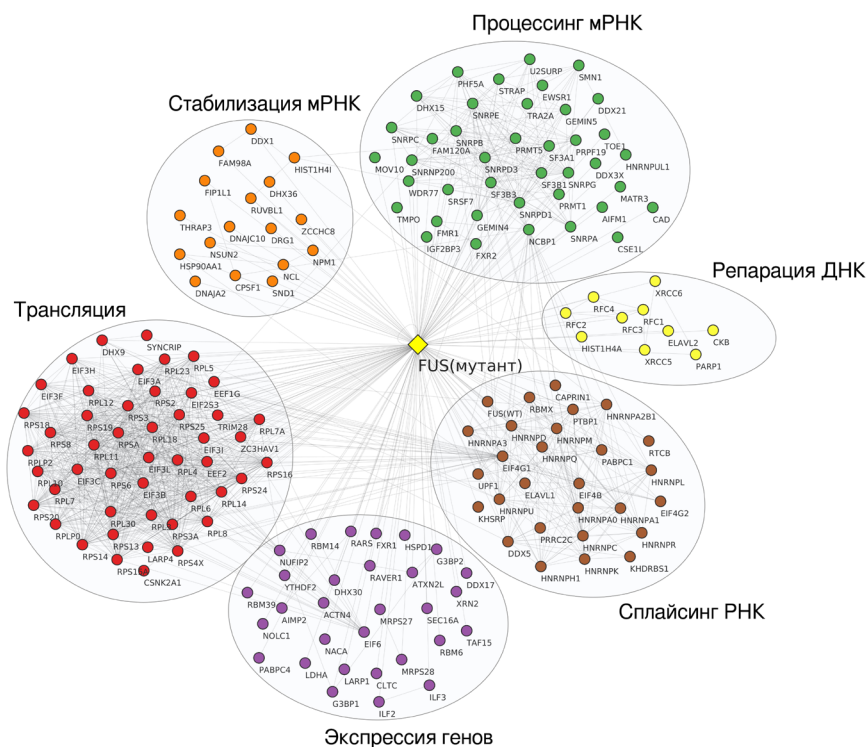


Рис. 2. Сеть регуляторных взаимодействий мутантного FUS и его белков-партнеров.

Белки-партнеры мутантного FUS взяты из работ Блохуйс и соавторов [86], Камельгарн и соавторов [87], Сан и соавторов [40], а также Эн и соавторов [88]. Только те белки-партнеры FUS, которые были выявлены не менее чем в 2 исследованиях, использованы для построения регуляторной сети. Связи между белками-партнерами получены из базы данных String-DB v11.5 при заданных параметрах поиска (физические взаимодействия (physical subnetwork), основанные на экспериментальных данных и анализе существующих баз данных (experiments + databases), коэффициент достоверности высокий – 0.7 (interaction score – high confidence 0.7).

[96, 99, 100]. Авторы предполагают, что стресс может выступать в роли вторичного стимула, усиливающего протеинопатию. В другой недавней работе Шелковниковой и соавторов показано, что одним из таких стимулов, приводящих к образованию FUS-агрегатов, может выступать ответ клеток на вирусную инфекцию [101]. Исследователи воздействовали двуцепочечной синтетической поли(I:C) на клетки с мутацией FUS, имитируя заражение двуцепочечными молекулами вирусной РНК. В результате происходила индукция интерферонов I типа и многократное усиление образования FUS-агрегатов [101]. Но что может выступать в качестве фактора, стимулирующего протеинопатию в двигательных нейронах в организме, остается неизвестным.

IV. МОДЕЛИРОВАНИЕ FUS-ПРОТЕИНОПАТИИ В ЖИВЫХ ОРГАНИЗМАХ

Важным инструментом для исследования молекулярных изменений, ведущих к развитию протеинопатий, является их моделирование *in vivo* с использованием клеточных линий и генетически модифицированных лабораторных животных. Моделирование заболевания *in vivo* позволяет, во-первых, изучать физиологические функции и нарушения метаболизма склонных к агрегации белков, а, во-вторых, могут быть использованы для первичного отбора эффективных терапевтических средств. В следующих разделах мы рассмотрим различные экспериментальные модели FUS-ассоциированной патологии в ретроспективе их получения – от самых первых и наиболее часто используемых до наименее распространенных; опишем ключевые молекулярные и клинические признаки БАС, которые они воспроизводят, и обобщим знания, полученные благодаря работе с модельными животными.

При моделировании БАС на животных исследователи, как правило, руководствуются двумя основными критериями – генетическим и фенотипическим. Оба критерия определяют, насколько точно в модельном организме воспроизводится патогенез БАС человека, исходя из генетических детерминант заболевания, молекулярно-физиологических изменений в нейронах и клинического проявления патологии [102]. Выделяют три основных пути генетической модификации генома для моделирования и изучения БАС: 1) внесение в геном генетической конструкции, кодирующей мутантную изоформу белка [49, 103]; 2) редактирование последовательности собственного гена в геноме, при которой вносится миссенс или нонсенс мутация в коди-

рующую последовательность (knock-in мутация) [75, 104]; 3) замена последовательности собственного гена на его человеческий ортолог, содержащий мутацию, для создания так называемого гуманизированного организма [105, 106].

Мышинные модели FUS-протеинопатии. Несмотря на то, что семейные формы БАС встречаются реже, чем спорадические, именно они являются фундаментом в изучении этого нейродегенеративного заболевания. После обнаружения мутаций у пациентов с семейными формами БАС появилась возможность воспроизвести заболевание человека в живых организмах. Первыми о создании трансгенной линии мышей, моделирующих патологические процессы происходящие при БАС, сообщили ученые из США в 2012 году. Им удалось создать две линии мышей, несущих мутации FUSR521C, наиболее часто встречающуюся мутацию гена *FUS* у пациентов с семейными формами БАС, и FUS Δ 14, у которой полностью удален сигнал ядерной локализации NLS [107]. Обе aberrантные изоформы FUS накапливались в цитоплазме двигательных нейронов и присутствовали в составе нерастворимой белковой фракции. Исследователям не удалось обнаружить FUS-положительные включения в двигательных нейронах мышей, однако они были выявлены в клетках коры головного мозга у 3-месячных особей. FUS-положительные включения, в состав которых также входил убиквитин, встречались примерно в 20% нейронов. В возрасте 3-х месяцев в обеих линиях мышей, FUSR521C и FUS Δ 14, не наблюдалось никаких локомоторных нарушений. Количество двигательных нейронов в поясничном отделе спинного мозга животных уменьшилось на 14% в возрасте 12 месяцев и на 20% в возрасте 18 месяцев [107]. Таким образом, ученые получили первые доказательства, позволившие связать аномальную локализацию FUS и развитие нейродегенеративного процесса.

Следующая трансгенная линия мышей, несущая мутацию R521C, была получена в 2014 году [49]. В первом поколении мышей этой линии наблюдалось чрезвычайно быстрое развитие патологии, характерное для БАС 6-го типа человека. Уже к концу первого месяца жизни у мышей происходила гибель до 20% холинергических нейронов спинного мозга, сопровождающаяся локомоторными нарушениями, включая аномальное сгибание задних конечностей при поднятии мыши за хвост. В возрасте 60 дней гибель нейронов спинного мозга составляла около 50%. До 3-месячного возраста доживало менее 20% особей. Следует отметить, что в следующих поколениях мышей патология развивалась медленнее, а средняя продолжительность жизни увеличилась более чем в 2 раза и составляла 130 дней [49]. Ученые показали, что мутантный белок FUS-R521C образует

комплексы с белком FUS дикого типа. При этом в клетках спинного мозга FUS-R521C локализован преимущественно в ядре, а формирование цитоплазматических FUS-положительных включений происходило менее чем в 10% нейронов. Авторы работы полагают, что FUS-R521C приобретает ряд новых токсических свойств, приводящих к нарушению связывания FUS с гистон-деацетилазой HDAC1 и повреждению ДНК, а также aberrantному сплайсингу ряда транскриптов [49]. В сравнении с более ранней мышшиной моделью, также несущей мутацию FUS-R521C, патологический процесс у особей данной линии имеет более агрессивную форму развития по не вполне понятной причине. Авторы отмечают, что экспрессия трансгенной кассеты была сопоставима с уровнем экспрессии эндогенного FUS дикого типа [49].

Мутация FUS-R495X впервые была обнаружена в 2010 году [66]. Эта мутация приводит к образованию преждевременного стоп-кодона и образованию белка FUS, лишённого домена NLS. Дебют заболевания происходит в 31–36 лет с быстрым прогрессированием патологии (продолжительность жизни 12–18 месяцев с момента появления первых симптомов). Позднее эту мутацию обнаружили и у пациентов со спорадическими формами БАС [108, 109]. У носителей этой мутации детектировали гибель моторных нейронов в передних рогах спинного мозга, демиелинизацию нервных волокон, а также цитоплазматическую локализацию мутантного FUS с образованием FUS-положительных включений [110, 111]. Используя мутацию FUS-R495X было создано несколько клеточных и мышшиных моделей [40, 112–114]. В исследовании на мышшиной модели FUS-R495X Тибиш-рани и соавторы показали, что метилирование аргинина в белке FUS с помощью белка PRMT1 регулирует ядерно-цитоплазматический транспорт FUS [114]. Цитоплазматическое накопление FUS-R495X приводит к снижению PRMT1 в ядре и невозможности метилирования его ядерных субстратов [114]. Ввиду визуального отсутствия локомоторных нарушений, было проведено электромиографическое исследование и обнаружена фибрилляция, а также денервация мышц, характерная для БАС, у экспериментальных животных 12-месячного возраста [114, 115]. У мышшей этой линии также наблюдался паралич толстой кишки, а средняя продолжительность жизни животных составляла 118 дней у гетерозиготных особей по мутантной аллели *FUS^{R495X/+}*, и 59 дней у гомозиготных особей *FUS^{R495X/R495X}* (по данным Jackson lab, JAX stock #019728). В исследовании на культуре клеток HEK293 ученые показали, что мутантная изоформа FUS-R495X вовлекает в состав агрегатов эндогенный FUS [111]. Мутация FUS-R495X также нарушает тип связывания белка с мРНК – FUS-R495X в

основном связывает границы «экзон–экзон» в зрелых мРНК, тогда как FUS дикого типа связывает преимущественно интроны непротранскрибированных транскриптов [113].

Мутация FUS-P525L впервые открыта в 2011 году [63]. Наряду с мутацией FUS-R495X, мутация FUS-P525L относится к наиболее агрессивным ювенильным формам БАС [116]. Исследование мышечных тканей выявило образование выраженных FUS агрегатов [117], а также необычные для БАС гипертрофические изменения мышечных волокон, сопровождающиеся появлением липидных капель. В 2016 году Шарма и соавторы создали трансгенную мышиную модель, несущую мутацию FUS-P525L [118]. Несмотря на то, что у трансгенных мышей наблюдалась гибель до 30% двигательных нейронов к 12-месячному возрасту и снижение силы мышц передних и задних лап, продолжительность жизни животных не отличалась от контрольной группой. Учитывая, что мутация FUS-P525L у человека приводит к крайне агрессивной форме БАС, эти результаты неожиданны [63, 116]. Исследование морфологии нейронов показало, что мутантный FUS-P525L имеет выраженную цитоплазматическую локализацию. Этот результат подтверждался также исследованием клеток микроглии, дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток, несущих мутацию FUS-P525L [119]. Тем не менее, авторам не удалось обнаружить агрегацию FUS-P525L в клетках спинного мозга [118].

На основании этих исследований ученые пришли к выводу, что цитоплазматической локализации мутантного FUS достаточно, чтобы вызвать нейродегенеративные изменения в двигательных нейронах спинного мозга. Поскольку полное удаление NLS повышает вероятность накопления мутантного FUS в цитоплазме нейронов, вызывая быстрое, и, главное, воспроизводимое течение патологии, при создании модельных животных исследователи стали чаще использовать именно этот тип мутации. В 2016 году Шишаши и соавторы получили трансгенную мышиную модель Δ NLS-FUS, полностью убрав сигнал ядерной локализации из полипептидной цепи FUS [14]. У мышей этой линии первые клинические симптомы, такие как нарушение походки, начинают появляться к 3-месячному возрасту. Массовая гибель двигательных нейронов моторной коры головного мозга развивается к первому году жизни, а средняя продолжительность жизни животных составляет 14 месяцев. Иммуногистохимический анализ срезов ткани показал образование убиквитин и p62-положительных включений, образованных мутантным FUS, в нейронах моторной коры головного мозга [14].

Цитоплазматические FUS-агрегаты токсичны для клеток. Но как развивается нарушение метаболизма РНК при дисфункции ядерного FUS? Является ли агрегация мутантного белка единственным фактором патогенеза или же нарушение ядерной функции FUS вносит дополнительный вклад в нейродегенеративный процесс? Попытка разделить функцию ядерного FUS и цитоплазматического мутантного белка были предприняты Шелковниковой и соавторами в 2013 году [103]. Внесенный в геном трансген содержал укороченную изоформу белка FUS человека (FUS1-359), в которой удалены сразу несколько доменов – NLS, цинковый палец, домены RGG2 и RGG3, а также поврежден домен RRM. С момента появления первых клинических симптомов патологический процесс развивается быстро и воспроизводит ряд ключевых признаков БАС человека, включая образование массивных FUS-положительных включений в двигательных нейронах, асимметричный паралич конечностей, истощение мышц и денервацию, а также гибель мотонейронов спинного мозга [103]. Средняя продолжительность жизни мышей FUS(1–359) составляет 4 месяца. Важно отметить, что экспрессия aberrантной изоформы белка FUS(1–359) приводит к агрессивному развитию FUS-протеинопатии и формированию не только цитоплазматических, но также и ядерных включений в моторных нейронах [103, 120]. Примечательно, что в состав новообразованных ядерных агрегатов попадает эндогенный мышинный белок FUS и наблюдаются множественные изменения в паттерне альтернативного сплайсинга мРНК [103, 120]. Ввиду того, что aberrантная изоформа FUS(1-359) накапливается преимущественно в цитоплазме нейронов, а ее РНК-связывающие функции нарушены мутацией RRM и двух RGG доменов, аномальный паттерн сплайсинга мРНК вызван связыванием aberrантной изоформы FUS(1–359) и эндогенного FUS. Исследуя паттерн изменения альтернативного сплайсинга в динамике развития патологии было показано, что уменьшение удержания интронов транскриптов, ассоциированных с FUS, является следствием взаимодействия трансгена FUS(1–359) и эндогенного FUS в цитоплазме нейронов, которое приводит к утрате ядерной функции эндогенного белка [37]. К таким же выводам пришли Хамфри и соавторы при анализе нарушений альтернативного сплайсинга на нескольких knock-in моделях FUS, в которых удален NLS (об этих моделях мы поговорим далее) [36]. Причем уменьшение количества транскриптов с удержанными интронами и связанных с FUS является одним из самых ранних молекулярных событий в ходе развития FUS-протеинопатии [37]. По мере увеличения агрегации мутантного FUS паттерн изменений сплайсинга РНК становится

более сложным, наблюдается уменьшение включения микроэкзонов специфичных для нервной ткани в состав мРНК и происходит индукция криптического сплайсинга экзонов из-за попадания в состав FUS-агрегатов дополнительных РНК-связывающих белков, таких как HNRPK [37]. Проведенные исследования позволили установить, каким образом цитоплазматическая агрегация мутантного FUS приводит к нарушению регуляции сплайсинга РНК в двигательных нейронах при БАС [36, 37].

Развитие молекулярно-генетических технологий привело к появлению методов геномного редактирования, позволяющих вносить изменения в последовательность ДНК гена *FUS* без внесения в составе трансгена дополнительного генетического материала. Впервые о создании мышинной knock-in модели сообщила группа ученых из Франции и Германии в 2016 году [75]. У мышей этой линии полностью удален NLS в гене *FUS* мыши. У особей гомозиготных по аллели *Fus^{ΔNLS/ΔNLS}* удаление NLS вызвало быстрое накопление мутантного FUS в цитоплазме, дегенерацию двигательных нейронов и привела к внутриутробной смерти животных. Наряду с knock-in мутацией, авторы получили линию мышей нокаутных по гену *FUS* и обнаружили, что полное удаление FUS также приводит к внутриутробной смерти, однако, при отсутствии дегенерации мотонейронов [75]. Это важное наблюдение позволяет сделать вывод о том, что именно аномальная локализация белка в цитоплазме, а не дисфункция ядерного FUS приводит к нейродегенеративному процессу. Кроме того, авторы показали, что неправильная локализация FUS в цитоплазме приводит к сильному изменению в профиле экспрессии генов и изменениям в альтернативном сплайсинге мРНК. Ряд этих изменений являются общими между линиями knock-in и полным нокаутом FUS. Несмотря на агрессивное развитие патологии, формирование FUS-агрегатов не происходит ни в мотонейронах, ни в нейронах коры головного мозга [75]. Далее авторы исследовали гетерозиготных мышей по аллели *Fus^{ΔNLS/+}* [121]. Более мягкое течение болезни позволило дать детальную характеристику физиологическим изменениям в ходе развития патологии. У мышей данной линии слабые локомоторные нарушения, такие как изменения походки животных, начинались в возрасте 10 месяцев. К возрасту 22 месяцев более чем в 2 раза снижалась мышечная сила передних и задних лап. В этом же возрасте появлялись FUS-положительные включения в цитоплазме и происходило уменьшение количества мотонейронов спинного мозга примерно на 30%. Продолжительность жизни животных была сопоставима с особями из контрольной группы [121].

В 2020 году группа ученых из Китая создала мышиную модель *FUS*-протеинопатии, изменив последовательность собственного гена *FUS* мыши [122]. Аминокислотная последовательность NLS на С-конце белка *FUS* идентична у человека и мыши, но сами белки отличаются по общей длине полипептидной цепи. Авторы заменили аминокислотный остаток аргинина на цистеин в положении 513 (R513C) и таким образом имитировали человеческую мутацию *FUS*-R521C в гене мыши [122]. У полученной линии мышей первые изменения в поведении проявлялись в возрасте 4-х месяцев, авторы определяли снижение количества вертикальных стоек (англ. rearing). Еще через 3 месяца наблюдалось снижение мышечной силы животных. К 24-месячному возрасту у мышей снижалось количество холинергических нейронов в передних рогах спинного мозга и развивался паралич конечностей. В нервных клетках авторы не обнаружили выраженной цитоплазматической локализации мутантного *FUS*. Причем, количество мутантного *FUS* было повышено в 3-4 раза по сравнению с уровнем *FUS* дикого типа в контрольной группе мышей. Однако в условиях индуцированного стресса в результате воздействия арсенитом натрия, *FUS*-R513C переходил в цитоплазму и попадал в состав стресс-гранул [122]. Примечательно, что авторы описывают локомоторную активность мышей на основании анализа поведения, в частности, подсчета «вертикальных стоек» животных. Этот параметр может также обозначать уровень когнитивных способностей и социального поведения у животных [123]. Часто снижение числа вертикальных стоек наблюдается у мышей, моделирующих две сочетанных патологии – БАС и ЛВД [123–125].

В 2017 году получена первая модель, в которой мышинный ген *FUS* был полностью заменен на его человеческий ортолог, несущий мутацию *FUS*delta14 [105]. Впервые мутация *FUS*delta14 была обнаружена в 2010 году [65]. Данная мутация (g.10747A>G) нарушает акцепторный сайт сплайсинга в интроне 13, в результате чего происходит пропуск экзона 14 и синтез укороченной с С-конца изоформы *FUS* [65]. У гетерозиготных особей этой гуманизированной линии мышей (*FUS*delta14) экспрессия мутантной изоформы *FUS* находится в пределах физиологического уровня, наблюдается прогрессирующая гибель двигательных нейронов спинного мозга и денервация нервно-мышечных соединений. Причем нейродегенеративный процесс протекает в отсутствие агрегации белка *FUS* [105]. Цитоплазматическая локализация *FUS* увеличивается по мере прогрессирования заболевания и мутантный *FUS* накапливается в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме. У мышей этой линии наблюдается

нарушение функции задних конечностей к 15-месячному возрасту, а преждевременная гибель животных начинается с 19-го месяца жизни. Транскриптомный анализ показал прогрессирующие изменения в профиле экспрессии генов, кодирующих рибосомные белки, и нарушение альтернативного сплайсинга, в том числе изменения сплайсинга интронов у FUS-ассоциированных генов на ранней стадий заболевания [36, 105].

В 2018 году еще одну гуманизованную мышиную модель, несущую мутантный ген *FUS* (варианты R521C и R521H) человека, получили исследователи из Калифорнийского университета [106]. Авторы не обнаружили мутантный FUS в цитоплазме: агрегация белка отсутствовала даже у 24-месячных животных. В этом возрасте количество холинергических нейронов спинного мозга снижалось на 20%, также наблюдалось снижение мышечной силы экспериментальных животных. Продолжительность жизни мышей при этом не уменьшалась и была сопоставима с контрольной группой. Авторы показали, что мутантные изоформы человеческого FUS активируют комплексную реакцию на стресс, ингибируют локальный синтез белка в аксонах нейронов гиппокампа и вызывают когнитивные нарушения, характерные для ЛВД [106].

В таблице приведена характеристика основных мышинных моделей FUS-протеинопатии, полученных к настоящему времени.

Моделирование FUS-протеинопатии у других позвоночных животных. Параллельно предпринимаются попытки создать модель БАС, основанную на линиях других животных. Так, группой учёных из Филадельфии была создана модельная линия крыс, в геном которой внесён ген *FUS* человека, несущий мутацию R521C [126]. Исследователи показали, что мутантный человеческий FUS R521C у крыс вызывает дегенерацию аксонов моторных нейронов и прогрессирующий паралич конечностей, гибель нейронов в коре головного мозга и гиппокампе, агрегацию белков и нейровоспаление в раннем возрасте. Несмотря на то, что экспрессия трансгенной кассеты была повышена по сравнению с экспрессией эндогенного FUS, патология развивалась бессимптомно до 12-месячного возраста. С этого возраста у животных развивались нарушения в пространственном обучении и памяти, а также дегенерация нейронов коры головного мозга и гиппокампа [126, 127].

Боско и соавторы в 2010 году одними из первых обнаружили, что экспрессия человеческого FUS-R495X, у которого отсутствует NLS, вызывает большее накопление белка в цитоплазме нейронов спинного мозга рыбок *Danio Rerio* по сравнению с миссенс мутациями FUS-H517Q и FUS-R521G [92]. Кроме того, они показали, что в ответ на

Таблица. Клиническая эффективность *L. reuteri* против *H. pylori*

Модель	Мутация	Тип введения мутации	Линия мышей	Фенотип: гибель моторных нейронов	Фенотип: цитоплазматические включения	Фенотип: локомоторные нарушения	Фенотип: продолжительность жизни	Ссылка
	2	3	4	5	6	7	8	9
FUS-R521C	FUS R521C	Вирус-опосредованный трансгенез	B6C3F1	Количество мотонейронов в поясничном отделе спинного мозга снижено на 14% у мышей 12-месячного возраста и на 20% у 18-месячного	Не обнаружено в мотонейронах спинного мозга, к 3-месячному возрасту в 20% нейронов коры головного мозга появились цитоплазматические включения	У мышей 3-месячного возраста локомоторных нарушений обнаружено не было	Снижение продолжительности жизни не выявлено	[107]
FUS-R521C	FUS R521C	Трансген	Получена в B6SJL, далее переведена на C57BL/6	В 16-дневном возрасте происходит гибель ~20% ChAT-положительных нейронов в передних рогах шейного отдела спинного мозга. В возрасте 2 месяцев гибель нейронов составляет уже ~50%	Менее 10% мотонейронов спинного мозга имеют цитоплазматические включения.	Ранние двигательные нарушения, включая аномальное стибание задних конечностей при поднятии за хвост, нарушение походки	Большинство особей первого поколения не дожило до 100 дней, особи следующих поколений проживали дольше, средняя продолжительность жизни составляла 200 дней	[49]
FUS-R495X	FUS R495X	Трансген	C57BL/6J	Исследований морфологии спинномозговых нейронов не проводилось	Мутантный человеческий FUS образует граунулярные включения в цитоплазме нейронов	Денервация мышц у животных 12-месячного возраста	Средняя продолжительность жизни 118 дней у гетерозиготных особей и 59 дней у гомозиготных особей	[114]
FUS-dNLS	FUS ΔNLS	Трансген	C57BL/6J	Массовая гибель двигательных нейронов моторной коры головного мозга развивается к первому году жизни	Обнаружены убиквитин и p62-положительные включения, образованные мутантным FUS, в нейронах моторной коры головного мозга	Нарушение походки животных развивается к 3-месячному возрасту	Средняя продолжительность жизни животных составляет 14 месяцев	[14]

Окончание табл. см. на сл. стр.

Оконание табл.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
FUS(1-359)	FUS Δ360-526	Транстен	Получена в C57Bl/6l, позже переведена на CDI	К 4 месяцам гибнет до 50% мотонейронов спинного мозга	Цитоплазматические и ядерные включения в мотонейронах спинного мозга	Нарушение походки в возрасте 90 дней, асимметричный парез конечностей в возрасте 110–120 дней	Средняя продолжительность жизни животных составляет 4 месяца	[103, 120]
FUS-R521C	FUS R513C	Кнопк-In (мышинный ген FUS)	C57Bl/6l	К 24-месячному возрасту у мышей снижалось количество холинэргических нейронов в передних рогах спинного мозга и развивался паралич конечностей	При нормальных физиологических условиях выраженной цитоплазматической локализации мутантного FUS в нервных клетках не обнаружено	Снижение мышечной силы животных к 7-месячному возрасту	Данные отсутствуют	[122]
FUS-P525L	FUS P525L	Транстен	C57Bl/6	Гибель до 30% двигательных нейронов к 12-месячному возрасту	FUS-положительных включений не обнаружено	Снижение силы мышц передних и задних лап	Никаких отклонений в возрасте 360 дней	[118]
FUSDelta14	FUS Delta14	Кнопк-In (человеческий ген FUS)	C57Bl6/l	Количество мотонейронов в поясничном отделе спинного мозга уменьшилось на 14% через 12 месяцев и на 20% к 18 месяцам	Признаков агрегации FUS не обнаружено	Нормальная двигательная активность в возрасте 3 месяцев, но нарушение функции задних конечностей к 15 месяцам	Преждевременная смерть животных наблюдается с 19-месячного возраста	[105]
FUS-R521C	FUS R521C	Кнопк-In (человеческий ген FUS)	C57Bl/6	Гибель до 20% холинэргических нейронов к 24 месяцам	Агрегация мутантного FUS отсутствует	Снижение мышечной силы к 24 месяцам	Продолжительность жизни мышей не снижалась	[106]
FUS-dNLS	FUS dNLS	Кнопк-In	C57Bl/6	Примерно на 30% уменьшается количество мотонейронов спинного мозга	FUS-положительные включения в цитоплазме в возрасте 22 месяцев	Изменения походки животных начались в возрасте 10 месяцев. К возрасту 22 месяцев более чем в 2 раза снижалась мышечная сила передних и задних лап	Снижение продолжительности жизни не обнаружено	[75, 121]

окислительный стресс или воздействие теплового шока мутантные изоформы FUS, но не FUS дикого типа, собирались в стресс-гранулах в количестве пропорциональном уровням их цитоплазматической экспрессии [92].

Другие две группы учёных использовали миссенс-мутации FUS-R521H и FUS-R521C для моделирования FUS-протеинопатии у рыбок данио [128, 129]. В одной из полученных модельных систем человеческий FUS, как дикого типа, так и его мутантная изоформа, накапливались в цитоплазме клеток и входили в состав стресс-гранул [128]. Причем, аномальная локализация обеих изоформ FUS происходила не только в двигательных нейронах, но и в других типах клеток [128]. Одновременно с агрегацией мутантного FUS, у рыб наблюдались повреждение нервно-мышечных соединений и двигательные нарушения [78].

Недавно французскими учеными был получен делеционный мутант ортолога гена *FUS* человека у рыбок данио *fus*^{-/-} [130]. В отличие от мыши, у которой полное удаление гена *FUS* вызывает раннюю эмбриональную смертность, но не сопровождается гибелью моторных нейронов, у линии рыбок данио, наоборот, нокаут гена *fus* не приводит к гибели организма, но вызывает двигательные нарушения, анатомические дефекты в двигательных нейронах и нервно-мышечных соединениях. Кроме того, нокаут *fus* у рыб влияет на сплайсинг транскриптов *tau*, в результате чего увеличивается экспрессия малых изоформ белка tau [130].

Моделирование FUS-ассоциированной патологии на беспозвоночных. Благодаря определению генов, мутации в которых вызывают развитие семейных форм БАС, и воспроизведению патологии на модельных организмах, ученым удалось сформулировать общую концепцию развития БАС: мутации ряда генов вызывают синтез aberrантных изоформ белковых молекул с их последующей агрегацией, токсичной для мотонейронов. Однако большинство случаев БАС у человека развивается спонтанно по неизвестной причине, поэтому роль первичных факторов, являющихся причиной патологии, и вторичных факторов, усиливающих развитие болезни, по-прежнему основная тема дискуссий ученых и врачей в области патогенеза БАС. Учитывая многочисленные сценарии развития патологии, существует острая потребность в генетических системах для быстрого и эффективного анализа функций мутантных изоформ белковых молекул. Благодаря относительной легкости в содержании и короткому жизненному циклу, беспозвоночные организмы является удобным инструментом для изучения нейродегенеративных заболеваний, в том числе БАС.

Модели FUS-протеинопатии у Дрозофил. Важной особенностью, которая делает *Drosophila melanogaster* удобной генетической моделью, является адаптация системы UAS/Gal4, позволяющая обеспечить тканеспецифичную контролируемую экспрессию трансгена [131, 132]. Ген *cabeza (caz)* является единственным ортологом гена *FUS* у *Drosophila melanogaster* [133]. При подавлении экспрессии *caz* у Дрозофилы наблюдается нарушение морфологии глаза, сокращается продолжительность жизни, возникают дефекты ползания и лазания, уменьшается количество синаптических ветвей [134, 135]. Примечательно, что селективная инактивация *caz* в нейронах взрослых мух не влияет на двигательную активность и продолжительность жизни, указывая на то, что функция *caz* необходима для развития нервной системы на эмбриональной и личиночной стадиях, но не для поддержания функции нейронов во взрослом организме имаго [135]. В другом исследовании с применением UAS/Gal4 системы исследователи вызвали экспрессию человеческого белка FUS дикого типа, а также его мутантных изоформ R524S и P525L в клетках фоторецепторов, грибовидном теле и двигательных нейронах [136]. У полученных трансгенных линий наблюдалось прогрессирующее с возрастом повреждение нервных клеток, морфологические и функциональные изменения в мотонейронах [136].

Интересные данные получили американские ученые. Они, во-первых, подтвердили, что экспрессия человеческого FUS дикого типа и мутантного белка FUS-R521G в моторных нейронах нарушает двигательную активность личинок и взрослых особей [137]. Ученые обнаружили, что пресинаптические структуры в нервно-мышечном соединении разрушаются, а двигательные нейроны подвергаются апоптозу у трансгенных мух. Во-вторых, показали, что при перераспределении FUS из ядра в цитоплазму вследствие удаления NLS полностью блокировало токсический эффект человеческого FUS [137]. Таким образом, было показано, что именно ядерная локализация FUS, но не цитоплазматическая, вызывает нейродегенеративный процесс в клетках Дрозофилы.

Модели FUS-протеинопатии у нематод. Нематода *Caenorhabditis elegans* – еще одна широко используемая животная модель БАС. В силу объективных причин моделирование нейродегенеративного процесса у *C. elegans* может дать лишь ограниченную характеристику патологии человека. С другой стороны, детально изученная нервная система нематоды дает возможность манипулировать экспрессией трансгенных кассет в определенных нервных клетках [138]. Работ, посвященных моделированию FUS-протеинопатии у *C. elegans* относи-

тельно мало, однако данные, полученные в рамках исследований существующих моделей, подтверждают патологическую роль мутантных изоформ FUS человека в развитие нейродегенерации клеток и нарушению фундаментальных клеточных процессах, таких как транскрипция и регуляция сплайсинга РНК [139–141].

На моделях *C. elegans*, несущих наиболее распространенные у пациентов с БАС мутации гена *FUS* человека (R514G, R521G, R522G, R524S, P525L), а также укороченные изоформы белка FUS513 и FUS501 под пан-нейрональным промотором и промотором, работающим в ГАМК-эргических нейронах, было продемонстрировано накопление нерастворимых FUS-агрегатов в цитоплазме нервных клеток [142, 143]. Мутантный FUS обнаруживался в виде агрегированных скоплений белка в ядре и цитоплазме двигательного нейрона, в то время как сигналы FUS дикого типа были диффузными и ограничивались только ядром клетки [144]. Одновременная экспрессии FUS дикого типа и мутантных изоформ FUS не останавливало агрегацию последних, причем, FUS дикого типа не вовлекался в процесс образования агрегатов [142, 143]. Кроме того, в работе Ваккаро и соавторов было показано развитие структурных и функциональных нарушений нервной системы, таких как передача нервных импульсов и дегенерация опорно-двигательного аппарата, в зависимости от возраста нематод [143].

В 2016 году группа канадских ученых исследовала роль белка FUST-1, ортолога FUS у *C. elegans* [145]. Ученые внесли делецию небольшого участка гена *fust-1(tm4439)*, в результате чего происходил синтез изоформы FUST-1, укороченной на 75 аминокислотных остатков в N-концевой части белка. Используя делеционный мутант *fust-1(tm4439)*, исследователи показали, что FUST-1 является компонентом инсулин/IGF-подобного сигнального пути и участвует в регуляции целостности нейронов, поддержании долголетия и повышает устойчивость нематоды к воздействию стресса [145].

В другой недавней работе были получены knock-in мутации гена *fust-1*, R446S и P447L, эквивалентные человеческим мутациям гена *FUS* R524S и P525L, соответственно [146]. Внесение мутаций в ген *fust-1* привело не только к неправильной локализации мутантного белка FUST-1 и его диффузному накоплению в цитоплазме, но и к нарушению аутофагии в нервных и мышечных клетках. Причем, knock-in мутации *fust-1* нарушали именно процесс аутофагии в нервных и мышечных клетках, но не деградацию белков с помощью убиквитин-протеасомной системы. В работе показали, что нарушение аутофагии в двигательных нейронах происходит при воздействии стрессовых факторов и повышении экспрессии SQST-1/p62 [146].

Дрожжевые модели FUS-протеинопатии. Фундаментальные клеточные процессы, такие как система контроля качества белков, высококонсервативны у всех эукариот от человека до одноклеточных микроскопических грибов. Поскольку дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* имеют около 6000 общих с человеком генов, 500 из которых ассоциированы с человеческими болезнями, они могут быть использованы для изучения нарушений белкового гомеостаза в ходе развития человеческих нейродегенеративных заболеваний, в том числе и БАС [147].

Дрожжи не имеют ортолога гена *FUS* человека, поэтому моделирование FUS-протеинопатии ограничено эктопической экспрессией человеческого белка FUS дикого типа и его aberrантных изоформ [148]. Исследования на дрожжах подтвердили все характерные молекулярные признаки FUS-ассоциированной патологии, в том числе аномальную цитоплазматическую локализацию FUS. Так, перераспределение FUS из ядра в цитоплазму вызывает его агрегацию и поступление FUS в состав стресс-гранул и Р-телец [93, 149, 150]. Кроме того, в работе Парка и соавторов показано, что экспрессия белка FUS ингибирует убиквитин-протеасомную систему [151]. Увеличение экспрессии молекулярного шаперона Sis1, входящего в семейство Hsp40, смягчает токсический эффект FUS и стимулирует работу убиквитин-протеасомной системы в условиях патологической белковой агрегации [151]. В работе Сан и соавторов показано, что удаление РНК-связывающего домена RRM из полипептидной цепи FUS не влияет на формирование агрегатов, но снижает токсический эффект от их образования [150]. Это наблюдение подчеркивает важность взаимодействия между FUS и РНК при развитии FUS-протеинопатии. В ходе масштабного скринингового исследования, включающего 13570 человеческих генов, обнаружили 37 генов снижающих токсический эффект экспрессии FUS у дрожжей [151].

V. ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ FUS-ПРОТЕИНОПАТИИ И ЛЕЧЕНИЯ БАС

На основании накопленных сведений можно утверждать, что нарушение функции FUS вследствие мутаций и его агрегация в двигательных нейронах является одним из ключевых звеньев патогенеза БАС. Во-первых, мутации гена *FUS* обнаружены у пациентов с наследственной семейной формой БАС и в редких случаях у пациентов со спорадической формой БАС, во-вторых, экспрессия aberrантных изоформ белка FUS воспроизводит ряд ключевых молекулярных

признаков БАС человека на модельных организмах, в том числе аномальную локализацию мутантного FUS в цитоплазме нервных клеток, нарушение функции других РНК-связывающих белков вследствие их захвата в нерастворимые белковые агрегаты, а также нарушения метаболизма РНК, в том числе, процессинга и сплайсинга РНК, транспорта РНК между ядром и цитоплазмой нейронов.

На сегодняшний день БАС остается одной из неразрешимых проблем современной медицины. Однако достижения последних лет, особенно в области генетики БАС и опыта моделирования заболевания на модельных организмах, намного расширили представления о патогенезе этого нейродегенеративного заболевания. Это позволяет надеяться на появление в скором будущем лекарственных препаратов, направленных на ключевые звенья патологии, способных замедлить течение заболевания, а в перспективе и остановить его развитие.

Используемые в современной врачебной практике препараты от БАС не являются этиотропными и способны лишь облегчать симптоматические проявления заболевания, не обеспечивая длительного эффекта, а основа лечения и ведения пациентов с БАС сосредоточена на паллиативной помощи. Единственными широко применяющимися препаратами для лечения БАС являются Рилузол и Эдаравон [152]. Рилузол – первый препарат для лечения БАС; был зарегистрирован на территории США в 1995 году. Рилузол является антагонистом NMDA рецепторов, т.е. его механизм фармакологического действия лежит в плоскости подавления эксайтотоксичности [153]. На основании данных мета-анализа рандомизированных контролируемых испытаний Рилузола было показано, что прием препарата позволяет увеличить выживаемость пациента на 2–3 месяца, а вероятность увеличения длительности жизни на год составляет около 9%, но данные реальной клинической практики демонстрируют, что медиана выживаемости у пациентов, принимающих Рилузол, может увеличиваться до 19 месяцев [154]. Вторым, одобренным к лечению БАС в ряде стран, является препарат Эдаравон. Также как и Рилузол, Эдаравон является низкомолекулярным соединением и показан для терапии всех типов БАС [155]. Предполагается, что улучшение у пациентов с БАС на фоне приема препарата обусловлены его антиоксидантными свойствами. В некоторых исследованиях было продемонстрировано достоверное увеличение медианы общей выживаемости [156, 157]. Ретроспективный анализ большой когорты пациентов с БАС позволил продемонстрировать что медиана общей выживаемости у пациентов, получающих Эдаравон, была больше на 6 месяцев, чем у пациентов, его не получавших, а риск смерти был ниже на 27% [158]. В течение

последних 20 лет [159] было проведено множество клинических исследований препаратов, обладающих анти-глутаматергической [160, 161], противовоспалительной [162, 163], антиоксидантной [164, 165] и нейропротекторной активностями [166, 167], однако, ни один из них не показал должной эффективности.

Перспективными методами лечения БАС являются трансплантация аутологичных стволовых клеток [168], и терапия антисмысловыми олигонуклеотидами [169, 170], направленными на подавление экспрессии генов *SOD1* [171], *C9orf72* [172], *FUS* [173], и *ATXN2* [174] у пациентов с детерминированными причинами развития и формами БАС. В мае 2023 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) на основании результатов клинических исследований одобрило к применению для пациентов с БАС с мутациями в гене *SOD1* препарат тоферсен. Тоферсен – это первый препарат, основанный на действии антисмыслового олигонуклеотида к последовательности мРНК *SOD1*, в результате которого происходит деградация транскрипта *SOD1* по механизму РНК-интерференции [175]. Еще одним препаратом, основанным на подавлении экспрессии гена *FUS* с помощью антисенс-терапии и находящимся на стадии клинических испытаний, является препарат ION363 [173].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы провели анализ основных экспериментальных моделей FUS-протеинопатии на различных организмах, выделив молекулярные особенности и клинические симптомы, связанные с патогенными функциями мутантных изоформ белка FUS и патогенезом БАС. В качестве спускового механизма патогенеза следует выделить aberrantную цитоплазматическую локализацию FUS. Это обстоятельство создает сразу два условия для развития патофизиологического состояния нервных клеток – 1) утрата основной функции FUS вследствие недостатка белка в ядре клеток и 2) возникновение токсических эффектов, вызванных накоплением белка в цитоплазме и его агрегацией. Оба условия влияют на целый ряд процессов, тонкая регуляция которых необходима для нормальной физиологии нервных клеток. Эти процессы включают трансляцию белка, регуляцию альтернативного сплайсинга и нонсенс-опосредованного распада мРНК, эпигенетическую регуляцию активности генов и репарацию ДНК, а также формирование надмолекулярных структур, таких как стресс-гранулы. Динамика развития и тяжесть течения патологии,

опосредованной активностью мутантных изоформ белка FUS, во многом зависит от типа мутации и количества гена (гетеро- или гомозиготные аллельные варианты), а также скорости накопления белка в цитоплазме нейронов. В зависимости от этих факторов патология может развиваться стремительно, достигая проявления клинической картины БАС уже в возрасте 3-4 месяцев (мышинные модели FUS-R495X, FUS(1-359)) [103, 114], либо развиваться в течение всей жизни и не сопровождаться видимыми нарушениями в локомоторной активности (мышинные модели FUS-R521C, FUS-P525L, FUS-dNLS) [106, 107, 118, 121].

Как уже сформированные гистопатологические структуры, так и отдельные этапы агрегации таких белков как FUS являются потенциальными мишенями для разработки терапевтических подходов и создания лекарственных препаратов. Вероятно, именно изучение механики процесса агрегации мутантных изоформ белковых молекул в динамике развития клинической картины БАС на клеточных культурах и модельных животных будет иметь решающее значения в исследовании не только FUS-опосредованной патологии, но и других форм БАС, в основе которых лежит патологическая агрегация белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mehta, P., Raymond, J., Punjani, R., Larson, T., Han, M., Bove, F., and Horton, D. K. (2022) Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in the United States, 2014–2016, *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, **23**, 378–382, doi: 10.1080/21678421.2021.2023190.
2. Mehta, P., Kaye, W., Raymond, J., Punjani, R., Larson, T., Cohen, J., Muravov, O., and Horton, K. (2018) Prevalence of Amyotrophic Lateral Sclerosis – United States, 2015, *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, **67**, 1285–1289, doi: 10.15585/mmwr.mm6746a1.
3. Longinetti, E., and Fang, F. (2019) Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: an update of recent literature, *Current opinion in neurology*, **32**, 771–776, doi: 10.1097/wco.0000000000000730.
4. Zhou, S., Zhou, Y., Qian, S., Chang, W., Wang, L., and Fan, D. (2018) Amyotrophic lateral sclerosis in Beijing: Epidemiologic features and prognosis from 2010 to 2015, *Brain and behavior*, **8**, e01131, doi: 10.1002/brb3.1131.
5. Jun, K. Y., Park, J., Oh, K. W., Kim, E. M., Bae, J. S., Kim, I., and Kim, S. H. (2019) Epidemiology of ALS in Korea using nationwide big data, *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **90**, 395–403, doi: 10.1136/jnnp-2018-318974.
6. Abramychева, N. Y., Lysogorskaia, E. V., Stepanova, M. S., Zakharova, M. N., Kovrazhkina, E. A., Razinskaya, O. D., Smirnov, A. P., Maltsev, A. V., Ustyugov, A. A., Kukharsky, M. S., Khritankova, I. V., Bachurin, S. O., Cooper-Knock, J., Buchman, V. L.,

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

- Illarioshkin, S. N., Skvortsova, V. I., and Ninkina, N. (2015) C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion in ALS patients from the Central European Russia population, *Neurobiology of aging*, **36**, 2908–2909, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.07.004.
7. Brylev, L., Ataulina, A., Fominykh, V., Parshikov, V., Vorobyeva, A., Istomina, E., Shikhirimov, R., Salikov, A., Zakharova, M., Guekht, A., and Beghi, E. (2020) The epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis in Moscow (Russia), *Amyotrophic lateral sclerosis & frontotemporal degeneration*, **21**, 410–415, doi: 10.1080/21678421.2020.1752252.
8. Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Karapetyan, K., Katz, K., Liu, C., Maddipatla, Z., Malheiro, A., McDaniel, K., Ovetsky, M., Riley, G., Zhou, G., Holmes, J. B., et al. (2018) ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence, *Nucleic acids research*, **46**, D1062–d1067, doi: 10.1093/nar/gkx1153.
9. Brenner, D., and Weishaupt, J. H. (2019) Update on amyotrophic lateral sclerosis genetics, *Current opinion in neurology*, **32**, 735–739, doi: 10.1097/wco.0000000000000737.
10. Taylor, J. P., Brown, R. H., Jr., and Cleveland, D. W. (2016) Decoding ALS: from genes to mechanism, *Nature*, **539**, 197–206, doi: 10.1038/nature20413.
11. Cooper-Knock, J., Hewitt, C., Highley, J. R., Brockington, A., Milano, A., Man, S., Martindale, J., Hartley, J., Walsh, T., Gelsthorpe, C., Baxter, L., Forster, G., Fox, M., Bury, J., Mok, K., McDermott, C. J., Traynor, B. J., Kirby, J., Wharton, S. B., Ince, P. G., et al. (2012) Clinico-pathological features in amyotrophic lateral sclerosis with expansions in C9ORF72, *Brain : a journal of neurology*, **135**, 751–764, doi: 10.1093/brain/awr365.
12. Farr, G. W., Ying, Z., Fenton, W. A., and Horwich, A. L. (2011) Hydrogen-deuterium exchange in vivo to measure turnover of an ALS-associated mutant SOD1 protein in spinal cord of mice, *Protein science : a publication of the Protein Society*, **20**, 1692–1696, doi: 10.1002/pro.700.
13. McAlary, L., Plotkin, S. S., Yerbury, J. J., and Cashman, N. R. (2019) Prion-Like Propagation of Protein Misfolding and Aggregation in Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Frontiers in molecular neuroscience*, **12**, 262, doi: 10.3389/fnmol.2019.00262.
14. Shiihashi, G., Ito, D., Yagi, T., Nihei, Y., Ebine, T., and Suzuki, N. (2016) Mislocated FUS is sufficient for gain-of-toxic-function amyotrophic lateral sclerosis phenotypes in mice, *Brain : a journal of neurology*, **139**, 2380–2394, doi: 10.1093/brain/aww161.
15. Xu, Y. F., Gendron, T. F., Zhang, Y. J., Lin, W. L., D'Alton, S., Sheng, H., Casey, M. C., Tong, J., Knight, J., Yu, X., Rademakers, R., Boylan, K., Hutton, M., McGowan, E., Dickson, D. W., Lewis, J., and Petrucelli, L. (2010) Wild-type human TDP-43 expression causes TDP-43 phosphorylation, mitochondrial aggregation, motor deficits, and early mortality in transgenic mice, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**, 10851–10859, doi: 10.1523/jneurosci.1630-10.2010.
16. Nussbacher, J. K., Tabet, R., Yeo, G. W., and Lagier-Tourenne, C. (2019) Disruption of RNA Metabolism in Neurological Diseases and Emerging Therapeutic Interventions, *Neuron*, **102**, 294–320, doi: 10.1016/j.neuron.2019.03.014.
17. Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B.,

- Ackerley, S., Durnall, J. C., Williams, K. L., Buratti, E., Baralle, F., de Belleruche, J., Mitchell, J. D., Leigh, P. N., Al-Chalabi, A., Miller, C. C., Nicholson, G., and Shaw, C. E. (2008) TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Science (New York, N.Y.)*, **319**, 1668–1672, doi: 10.1126/science.1154584.
18. Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., de Belleruche, J., Gallo, J. M., et al. (2009) Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6, *Science (New York, N.Y.)*, **323**, 1208–1211, doi: 10.1126/science.1165942.
19. Boeynaems, S., Bogaert, E., Van Damme, P., and Van Den Bosch, L. (2016) Inside out: the role of nucleocytoplasmic transport in ALS and FTLN, *Acta neuropathologica*, **132**, 159–173, doi: 10.1007/s00401-016-1586-5.
20. Burk, K., and Pasterkamp, R. J. (2019) Disrupted neuronal trafficking in amyotrophic lateral sclerosis, *Acta neuropathologica*, **137**, 859–877, doi: 10.1007/s00401-019-01964-7.
21. Ho, W. Y., Agrawal, I., Tyan, S. H., Sanford, E., Chang, W. T., Lim, K., Ong, J., Tan, B. S. Y., Moe, A. A. K., Yu, R., Wong, P., Tucker-Kellogg, G., Koo, E., Chuang, K. H., and Ling, S. C. (2021) Dysfunction in nonsense-mediated decay, protein homeostasis, mitochondrial function, and brain connectivity in ALS-FUS mice with cognitive deficits, *Acta neuropathologica communications*, **9**, 9, doi: 10.1186/s40478-020-01111-4.
22. Ramesh, N., and Pandey, U. B. (2017) Autophagy Dysregulation in ALS: When Protein Aggregates Get Out of Hand, *Frontiers in molecular neuroscience*, **10**, 263, doi: 10.3389/fnfmol.2017.00263.
23. Wang, Q., Conlon, E. G., Manley, J. L., and Rio, D. C. (2020) Widespread intron retention impairs protein homeostasis in C9orf72 ALS brains, *Genome research*, **30**, 1705–1715, doi: 10.1101/gr.265298.120.
24. Grünewald, T. G. P., Cidre-Aranaz, F., Surdez, D., Tomazou, E. M., de Álava, E., Kovar, H., Sorensen, P. H., Delattre, O., and Dirksen, U. (2018) Ewing sarcoma, *Nature reviews. Disease primers*, **4**, 5, doi: 10.1038/s41572-018-0003-x.
25. Lorenzo-Betancor, O., Ogaki, K., Soto-Ortolaza, A., Labbé, C., Vilariño-Güell, C., Rajput, A., Rajput, A. H., Pastor, P., Ortega, S., Lorenzo, E., Strongosky, A. J., van Gerpen, J. A., Uitti, R. J., Wszolek, Z. K., and Ross, O. A. (2014) Analysis of nuclear export sequence regions of FUS-Related RNA-binding proteins in essential tremor, *PLoS one*, **9**, e111989, doi: 10.1371/journal.pone.0111989.
26. Ederle, H., Funk, C., Abou-Ajram, C., Hutten, S., Funk, E. B. E., Kehlenbach, R. H., Bailer, S. M., and Dormann, D. (2018) Nuclear egress of TDP-43 and FUS occurs independently of Exportin-1/CRM1, *Scientific reports*, **8**, 7084, doi: 10.1038/s41598-018-25007-5.
27. Gitler, A. D., and Shorter, J. (2011) RNA-binding proteins with prion-like domains in ALS and FTLN-U, *Prion*, **5**, 179–187, doi: 10.4161/pri.5.3.17230.
28. Udan, M., and Baloh, R. H. (2011) Implications of the prion-related Q/N domains in TDP-43 and FUS, *Prion*, **5**, 1–5, doi: 10.4161/pri.5.1.14265.
29. Skolnick, J., Gao, M., Zhou, H., and Singh, S. (2021) AlphaFold 2: Why It Works and Its Implications for Understanding the Relation-

- ships of Protein Sequence, Structure, and Function, *Journal of chemical information and modeling*, **61**, 4827–4831, doi: 10.1021/acs.jcim.1c01114.
30. Mészáros, B., Erdos, G., and Dosztányi, Z. (2018) IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding, *Nucleic acids research*, **46**, W329–w337, doi: 10.1093/nar/gky384.
31. Ishigaki, S., Masuda, A., Fujioka, Y., Iguchi, Y., Katsuno, M., Shibata, A., Urano, F., Sobue, G., and Ohno, K. (2012) Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions, *Scientific reports*, **2**, 529, doi: 10.1038/srep00529.
32. Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K. R., Vu, A. Q., Baughn, M., Huelga, S. C., Clutario, K. M., Ling, S. C., Liang, T. Y., Mazur, C., Wancewicz, E., Kim, A. S., Watt, A., Freier, S., Hicks, G. G., Donohue, J. P., Shiue, L., Bennett, C. F., Ravits, J., Cleveland, D. W., et al. (2012) Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs, *Nature neuroscience*, **15**, 1488–1497, doi: 10.1038/nn.3230.
33. Rogelj, B., Easton, L. E., Bogni, G. K., Stanton, L. W., Rot, G., Curk, T., Zupan, B., Sugimoto, Y., Modic, M., Haberman, N., Tollervy, J., Fujii, R., Takumi, T., Shaw, C. E., and Ule, J. (2012) Widespread binding of FUS along nascent RNA regulates alternative splicing in the brain, *Scientific reports*, **2**, 603, doi: 10.1038/srep00603.
34. Hoell, J. I., Larsson, E., Runge, S., Nusbaum, J. D., Duggimpudi, S., Farazi, T. A., Hafner, M., Borkhardt, A., Sander, C., and Tuschl, T. (2011) RNA targets of wild-type and mutant FET family proteins, *Nature structural & molecular biology*, **18**, 1428–1431, doi: 10.1038/nsmb.2163.
35. Nakaya, T., Alexiou, P., Maragkakis, M., Chang, A., and Mourelatos, Z. (2013) FUS regulates genes coding for RNA-binding proteins in neurons by binding to their highly conserved introns, *RNA (New York, N.Y.)*, **19**, 498–509, doi: 10.1261/rna.037804.112.
36. Humphrey, J., Birsa, N., Milioto, C., McLaughlin, M., Ule, A. M., Robaldo, D., Eberle, A. B., Kräuchi, R., Bentham, M., Brown, A. L., Jarvis, S., Bodo, C., Garone, M. G., Devoy, A., Soraru, G., Rosa, A., Bozzoni, I., Fisher, E. M. C., Mühlemann, O., Schiavo, G., et al. (2020) FUS ALS-causative mutations impair FUS autoregulation and splicing factor networks through intron retention, *Nucleic acids research*, **48**, 6889–6905, doi: 10.1093/nar/gkaa410.
37. Rezvykh, A. P., Ustyugov, A. A., Chaprov, K. D., Teterina, E. V., Nebogatikov, V. O., Spasskaya, D. S., Evgen'ev, M. B., Morozov, A. V., and Funikov, S. Y. (2023) Cytoplasmic aggregation of mutant FUS causes multistep RNA splicing perturbations in the course of motor neuron pathology, *Nucleic acids research*, **51**, 5810–5830, doi: 10.1093/nar/gkad319.
38. Sanjuan-Ruiz, I., Govea-Perez, N., McAlonis-Downes, M., Dieterle, S., Megat, S., Dirrig-Grosch, S., Picchiarelli, G., Piol, D., Zhu, Q., Myers, B., Lee, C. Z., Cleveland, D. W., Lagier-Tourenne, C., Da Cruz, S., and Dupuis, L. (2021) Wild-type FUS corrects ALS-like disease induced by cytoplasmic mutant FUS through autoregulation, *Molecular neurodegeneration*, **16**, 61, doi: 10.1186/s13024-021-00477-w.
39. Zhou, Y., Liu, S., Liu, G., Oztürk, A., and Hicks, G. G. (2013) ALS-associated FUS mutations result in

- compromised FUS alternative splicing and autoregulation, *PLoS genetics*, **9**, e1003895, doi: 10.1371/journal.pgen.1003895.
40. Sun, S., Ling, S. C., Qiu, J., Albuquerque, C. P., Zhou, Y., Tokunaga, S., Li, H., Qiu, H., Bui, A., Yeo, G. W., Huang, E. J., Eggan, K., Zhou, H., Fu, X. D., Lagier-Tourenne, C., and Cleveland, D. W. (2015) ALS-causative mutations in FUS/TLS confer gain and loss of function by altered association with SMN and U1-snRNP, *Nature communications*, **6**, 6171, doi: 10.1038/ncomms7171.
41. Yu, Y., and Reed, R. (2015) FUS functions in coupling transcription to splicing by mediating an interaction between RNAP II and U1 snRNP, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 8608–8613, doi: 10.1073/pnas.1506282112.
42. Reber, S., Stettler, J., Filosa, G., Colombo, M., Jutzi, D., Lenzken, S. C., Schweingruber, C., Bruggmann, R., Bachi, A., Barabino, S. M., Mühlemann, O., and Ruepp, M. D. (2016) Minor intron splicing is regulated by FUS and affected by ALS-associated FUS mutants, *The EMBO journal*, **35**, 1504–1521, doi: 10.15252/embj.201593791.
43. Lourenco, G. F., Janitz, M., Huang, Y., and Halliday, G. M. (2015) Long noncoding RNAs in TDP-43 and FUS/TLS-related frontotemporal lobar degeneration (FTLD), *Neurobiology of disease*, **82**, 445–454, doi: 10.1016/j.nbd.2015.07.011.
44. Udagawa, T., Fujioka, Y., Tanaka, M., Honda, D., Yokoi, S., Riku, Y., Ibi, D., Nagai, T., Yamada, K., Watanabe, H., Katsuno, M., Inada, T., Ohno, K., Sokabe, M., Okado, H., Ishigaki, S., and Sobue, G. (2015) FUS regulates AMPA receptor function and FTLD/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization, *Nature communications*, **6**, 7098, doi: 10.1038/ncomms8098.
45. Yokoi, S., Udagawa, T., Fujioka, Y., Honda, D., Okado, H., Watanabe, H., Katsuno, M., Ishigaki, S., and Sobue, G. (2017) 3'UTR Length-Dependent Control of SynGAP Isoform $\alpha 2$ mRNA by FUS and ELAV-like Proteins Promotes Dendritic Spine Maturation and Cognitive Function, *Cell reports*, **20**, 3071–3084, doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.100.
46. Masuda, A., Takeda, J., Okuno, T., Okamoto, T., Ohkawara, B., Ito, M., Ishigaki, S., Sobue, G., and Ohno, K. (2015) Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length, *Genes & development*, **29**, 1045–1057, doi: 10.1101/gad.255737.114.
47. Morlando, M., Dini Modigliani, S., Torrelli, G., Rosa, A., Di Carlo, V., Caffarelli, E., and Bozzoni, I. (2012) FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment, *The EMBO journal*, **31**, 4502–4510, doi: 10.1038/emboj.2012.319.
48. Wang, W. Y., Pan, L., Su, S. C., Quinn, E. J., Sasaki, M., Jimenez, J. C., Mackenzie, I. R., Huang, E. J., and Tsai, L. H. (2013) Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons, *Nature neuroscience*, **16**, 1383–1391, doi: 10.1038/nn.3514.
49. Qiu, H., Lee, S., Shang, Y., Wang, W. Y., Au, K. F., Kamiya, S., Barmada, S. J., Finkbeiner, S., Lui, H., Carlton, C. E., Tang, A. A., Oldham, M. C., Wang, H., Shorter, J., Filiano, A. J., Roberson, E. D., Tourtellotte, W. G., Chen, B., Tsai, L. H., and Huang, E. J. (2014) ALS-associated mutation FUS-R521C causes DNA damage and RNA splicing defects, *The Journal of clinical investigation*, **124**, 981–999, doi: 10.1172/jci72723.

50. Zinszner, H., Sok, J., Immanuel, D., Yin, Y., and Ron, D. (1997) TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling, *Journal of cell science*, **110** (Pt 15), 1741–1750, doi: 10.1242/jcs.110.15.1741.
51. Baade, I., Hutten, S., Sternburg, E. L., Pörschke, M., Hofweber, M., Dormann, D., and Kehlenbach, R. H. (2021) The RNA-binding protein FUS is chaperoned and imported into the nucleus by a network of import receptors, *The Journal of biological chemistry*, **296**, 100659, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100659.
52. So, E., Mitchell, J. C., Memmi, C., Chennell, G., Vizcay-Barrena, G., Allison, L., Shaw, C. E., and Vance, C. (2018) Mitochondrial abnormalities and disruption of the neuromuscular junction precede the clinical phenotype and motor neuron loss in hFUSWT transgenic mice, *Human molecular genetics*, **27**, 463–474, doi: 10.1093/hmg/ddx415.
53. Aoki, N., Higashi, S., Kawakami, I., Kobayashi, Z., Hosokawa, M., Katsuse, O., Togo, T., Hirayasu, Y., and Akiyama, H. (2012) Localization of fused in sarcoma (FUS) protein to the post-synaptic density in the brain, *Acta neuropathologica*, **124**, 383–394, doi: 10.1007/s00401-012-0984-6.
54. Schoen, M., Reichel, J. M., Demestre, M., Putz, S., Deshpande, D., Proepper, C., Liebau, S., Schmeisser, M. J., Ludolph, A. C., Michaelis, J., and Boeckers, T. M. (2015) Super-Resolution Microscopy Reveals Presynaptic Localization of the ALS/FTD Related Protein FUS in Hippocampal Neurons, *Frontiers in cellular neuroscience*, **9**, 496, doi: 10.3389/fncel.2015.00496.
55. Han, T. W., Kato, M., Xie, S., Wu, L. C., Mirzaei, H., Pei, J., Chen, M., Xie, Y., Allen, J., Xiao, G., and McKnight, S. L. (2012) Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies, *Cell*, **149**, 768–779, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.016.
56. Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E., and Anderson, P. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling, *The Journal of cell biology*, **169**, 871–884, doi: 10.1083/jcb.200502088.
57. Wippich, F., Bodenmiller, B., Trajkovska, M. G., Wanka, S., Aebersold, R., and Pelkmans, L. (2013) Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling, *Cell*, **152**, 791–805, doi: 10.1016/j.cell.2013.01.033.
58. Patel, A., Lee, H. O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M. Y., Stoyanov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T. M., Pozniakovski, A., Poser, I., Maghelli, N., Royer, L. A., Weigert, M., Myers, E. W., Grill, S., Drechsel, D., Hyman, A. A., and Alberti, S. (2015) A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation, *Cell*, **162**, 1066–1077, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.047.
59. Kato, M., Han, T. W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L. C., Mirzaei, H., Goldsmith, E. J., Longgood, J., Pei, J., Grishin, N. V., Frantz, D. E., Schneider, J. W., Chen, S., Li, L., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., Tycko, R., and McKnight, S. L. (2012) Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels, *Cell*, **149**, 753–767, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.017.
60. Maltseva, D., Chatterjee, S., Yu, C. C., Brzezinski, M., Nagata, Y., Gonella, G., Murthy, A. C., Stachowiak, J. C., Fawzi, N. L., Parekh, S. H., and Bonn, M. (2023) Fibril formation

- and ordering of disordered FUS LC driven by hydrophobic interactions, *Nature chemistry*, doi: 10.1038/s41557-023-01221-1.
61. Kwiatkowski, T. J., Jr., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., Davis, A., Gilchrist, J., Kasarskis, E. J., Munsat, T., Valdmanis, P., Rouleau, G. A., Hosler, B. A., Cortelli, P., de Jong, P. J., Yoshinaga, Y., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Yan, J., Ticozzi, N., et al. (2009) Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis, *Science (New York, N.Y.)*, **323**, 1205–1208, doi: 10.1126/science.1166066.
62. Farhan, S. M. K., Howrigan, D. P., Abbott, L. E., Klim, J. R., Topp, S. D., Byrnes, A. E., Churchhouse, C., Phatnani, H., Smith, B. N., Rampersaud, E., Wu, G., Wu, J., Shatunov, A., Iacoangeli, A., Al Khleifat, A., Mordes, D. A., Ghosh, S., Eggan, K., Rademakers, R., McCauley, J. L., et al. (2019) Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis implicates a novel gene, DNAJC7, encoding a heat-shock protein, *Nature neuroscience*, **22**, 1966–1974, doi: 10.1038/s41593-019-0530-0.
63. Conte, A., Lattante, S., Zollino, M., Marangi, G., Luigetti, M., Del Grande, A., Servidei, S., Trombetta, F., and Sabatelli, M. (2012) P525L FUS mutation is consistently associated with a severe form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis, *Neuromuscular disorders : NMD*, **22**, 73–75, doi: 10.1016/j.nmd.2011.08.003.
64. Corrado, L., Del Bo, R., Castellotti, B., Ratti, A., Cereda, C., Penco, S., Sorarù, G., Carlomagno, Y., Ghezzi, S., Pensato, V., Colombrita, C., Gagliardi, S., Cozzi, L., Orsetti, V., Mancuso, M., Siciliano, G., Mazzini, L., Comi, G. P., Gellera, C., Ceroni, M., et al. (2010) Mutations of FUS gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Journal of medical genetics*, **47**, 190–194, doi: 10.1136/jmg.2009.071027.
65. DeJesus-Hernandez, M., Kocerha, J., Finch, N., Crook, R., Baker, M., Desaro, P., Johnston, A., Rutherford, N., Wojtas, A., Kennelly, K., Wszolek, Z. K., Graff-Radford, N., Boylan, K., and Rademakers, R. (2010) De novo truncating FUS gene mutation as a cause of sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Human mutation*, **31**, E1377–1389, doi: 10.1002/humu.21241.
66. Waibel, S., Neumann, M., Rabe, M., Meyer, T., and Ludolph, A. C. (2010) Novel missense and truncating mutations in FUS/TLS in familial ALS, *Neurology*, **75**, 815–817, doi: 10.1212/WNL.0b013e3181f07e26.
67. Notaro, A., Messina, A., and La Bella, V. (2021) A Deletion of the Nuclear Localization Signal Domain in the Fus Protein Induces Stable Post-stress Cytoplasmic Inclusions in SH-SY5Y Cells, *Frontiers in neuroscience*, **15**, 759659, doi: 10.3389/fnins.2021.759659.
68. Zhang, Z. C., and Chook, Y. M. (2012) Structural and energetic basis of ALS-causing mutations in the atypical proline-tyrosine nuclear localization signal of the Fused in Sarcoma protein (FUS), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 12017–12021, doi: 10.1073/pnas.1207247109.
69. Dormann, D., Rodde, R., Edbauer, D., Bentmann, E., Fischer, I., Hruscha, A., Than, M. E., Mackenzie, I. R., Capell, A., Schmid, B., Neumann, M., and Haass, C. (2010) ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt Transportin-mediated nuclear import, *The EMBO journal*, **29**, 2841–2857, doi: 10.1038/emboj.2010.143.

70. Olszewska, D. A., Lonergan, R., Fallon, E. M., and Lynch, T. (2016) Genetics of Frontotemporal Dementia, *Current neurology and neuroscience reports*, **16**, 107, doi: 10.1007/s11910-016-0707-9.
71. Deng, H. X., Zhai, H., Bigio, E. H., Yan, J., Fecto, F., Ajroud, K., Mishra, M., Ajroud-Driss, S., Heller, S., Sufit, R., Siddique, N., Mugnaini, E., and Siddique, T. (2010) FUS-immunoreactive inclusions are a common feature in sporadic and non-SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis, *Annals of neurology*, **67**, 739–748, doi: 10.1002/ana.22051.
72. Ikenaka, K., Ishigaki, S., Iguchi, Y., Kawai, K., Fujioka, Y., Yokoi, S., Abdelhamid, R. F., Nagano, S., Mochizuki, H., Katsuno, M., and Sobue, G. (2020) Characteristic Features of FUS Inclusions in Spinal Motor Neurons of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **79**, 370–377, doi: 10.1093/jnen/nlaa003.
73. Fallini, C., Khalil, B., Smith, C. L., and Rossoll, W. (2020) Traffic jam at the nuclear pore: All roads lead to nucleocytoplasmic transport defects in ALS/FTD, *Neurobiology of disease*, **140**, 104835, doi: 10.1016/j.nbd.2020.104835.
74. Kim, W., Kim, D. Y., and Lee, K. H. (2021) RNA-Binding Proteins and the Complex Pathophysiology of ALS, *International journal of molecular sciences*, **22**, doi: 10.3390/ijms22052598.
75. Seckic-Zahirovic, J., Sendscheid, O., El Oussini, H., Jambeau, M., Sun, Y., Mersmann, S., Wagner, M., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., Drenner, K., Birling, M. C., Qiu, J., Zhou, Y., Li, H., Fu, X. D., Rouaux, C., Shelkownikova, T., Witting, A., Ludolph, A. C., et al. (2016) Toxic gain of function from mutant FUS protein is crucial to trigger cell autonomous motor neuron loss, *The EMBO journal*, **35**, 1077–1097, doi: 10.15252/embj.201592559.
76. Tyzack, G. E., Luisier, R., Taha, D. M., Neeves, J., Modic, M., Mitchell, J. S., Meyer, I., Greensmith, L., Newcombe, J., Ule, J., Luscombe, N. M., and Patani, R. (2019) Widespread FUS mislocalization is a molecular hallmark of amyotrophic lateral sclerosis, *Brain : a journal of neurology*, **142**, 2572–2580, doi: 10.1093/brain/awz217.
77. Luisier, R., Tyzack, G. E., Hall, C. E., Mitchell, J. S., Devine, H., Taha, D. M., Malik, B., Meyer, I., Greensmith, L., Newcombe, J., Ule, J., Luscombe, N. M., and Patani, R. (2018) Intron retention and nuclear loss of SFPQ are molecular hallmarks of ALS, *Nature communications*, **9**, 2010, doi: 10.1038/s41467-018-04373-8.
78. Arnold, E. S., Ling, S. C., Huelga, S. C., Lagier-Tourenne, C., Polymeridou, M., Ditsworth, D., Kordasiewicz, H. B., McAlonis-Downes, M., Platoshyn, O., Parone, P. A., Da Cruz, S., Clutario, K. M., Swing, D., Tessarollo, L., Marsala, M., Shaw, C. E., Yeo, G. W., and Cleveland, D. W. (2013) ALS-linked TDP-43 mutations produce aberrant RNA splicing and adult-onset motor neuron disease without aggregation or loss of nuclear TDP-43, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, E736–745, doi: 10.1073/pnas.1222809110.
79. Brown, A. L., Wilkins, O. G., Keuss, M. J., Hill, S. E., Zanovello, M., Lee, W. C., Bampton, A., Lee, F. C. Y., Masino, L., Qi, Y. A., Bryce-Smith, S., Gatt, A., Hallegger, M., Fagegaltier, D., Phatnani, H., Newcombe, J., Gustavsson, E. K., Seddighi, S., Reyes, J. F., Coon, S. L., et al. (2022) TDP-43 loss and ALS-risk SNPs drive mis-splicing and depletion of UNC13A, *Nature*, **603**, 131–137, doi: 10.1038/s41586-022-04436-3.

80. Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L. A., Boulting, G. L., Moccia, R., Wainger, B. J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., Mellin, C., Merkle, F. T., Davis-Dusenbery, B. N., Ziller, M., Oakley, D., Ichida, J., Di Costanzo, S., Atwater, N., Maeder, M. L., Goodwin, M. J., et al. (2014) Pathways disrupted in human ALS motor neurons identified through genetic correction of mutant SOD1, *Cell stem cell*, **14**, 781–795, doi: 10.1016/j.stem.2014.03.004.
81. Krach, F., Batra, R., Wheeler, E. C., Vu, A. Q., Wang, R., Hutt, K., Rabin, S. J., Baughn, M. W., Libby, R. T., Diaz-Garcia, S., Stauffer, J., Pirie, E., Saberi, S., Rodriguez, M., Madrigal, A. A., Kohl, Z., Winner, B., Yeo, G. W., and Ravits, J. (2018) Transcriptome-pathology correlation identifies interplay between TDP-43 and the expression of its kinase CK1E in sporadic ALS, *Acta neuropathologica*, **136**, 405–423, doi: 10.1007/s00401-018-1870-7.
82. Prudencio, M., Belzil, V. V., Batra, R., Ross, C. A., Gendron, T. F., Pregent, L. J., Murray, M. E., Overstreet, K. K., Piazza-Johnston, A. E., Desaro, P., Bieniek, K. F., DeTure, M., Lee, W. C., Biendarra, S. M., Davis, M. D., Baker, M. C., Perkerson, R. B., van Blitterswijk, M., Stetler, C. T., Rademakers, R., et al. (2015) Distinct brain transcriptome profiles in C9orf72-associated and sporadic ALS, *Nature neuroscience*, **18**, 1175–1182, doi: 10.1038/nn.4065.
83. Prudencio, M., Gonzales, P. K., Cook, C. N., Gendron, T. F., Daugherty, L. M., Song, Y., Ebbert, M. T. W., van Blitterswijk, M., Zhang, Y. J., Jansen-West, K., Baker, M. C., DeTure, M., Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., Petrucelli, L., and Link, C. D. (2017) Repetitive element transcripts are elevated in the brain of C9orf72 ALS/FTLD patients, *Human molecular genetics*, **26**, 3421–3431, doi: 10.1093/hmg/ddx233.
84. Kamelgarn, M., Chen, J., Kuang, L., Jin, H., Kasarskis, E. J., and Zhu, H. (2018) ALS mutations of FUS suppress protein translation and disrupt the regulation of nonsense-mediated decay, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **115**, E11904–e11913, doi: 10.1073/pnas.1810413115.
85. Sévigny, M., Bourdeau Julien, I., Venkatasubramani, J. P., Hui, J. B., Dutchak, P. A., and Sephton, C. F. (2020) FUS contributes to mTOR-dependent inhibition of translation, *The Journal of biological chemistry*, **295**, 18459–18473, doi: 10.1074/jbc.RA120.013801.
86. Blokhuis, A. M., Koppers, M., Groen, E. J. N., van den Heuvel, D. M. A., Dini Modigliani, S., Anink, J. J., Fumoto, K., van Diggelen, F., Snelting, A., Sodaar, P., Verheijen, B. M., Demmers, J. A. A., Veldink, J. H., Aronica, E., Bozzoni, I., den Hertog, J., van den Berg, L. H., and Pasterkamp, R. J. (2016) Comparative interactomics analysis of different ALS-associated proteins identifies converging molecular pathways, *Acta neuropathologica*, **132**, 175–196, doi: 10.1007/s00401-016-1575-8.
87. Kamelgarn, M., Chen, J., Kuang, L., Arenas, A., Zhai, J., Zhu, H., and Gal, J. (2016) Proteomic analysis of FUS interacting proteins provides insights into FUS function and its role in ALS, *Biochimica et biophysica acta*, **1862**, 2004–2014, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.07.015.
88. An, H., Litscher, G., Watanabe, N., Wei, W., Hashimoto, T., Iwatsubo, T., Buchman, V. L., and Shelkovnikova, T. A. (2022) ALS-linked cytoplasmic FUS assemblies are compositionally different from physiological stress granules and sequester hnRNP A3,

- a novel modifier of FUS toxicity, *Neurobiology of disease*, **162**, 105585, doi: 10.1016/j.nbd.2021.105585.
89. Anderson, P., and Kedersha, N. (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage, *Trends in biochemical sciences*, **33**, 141–150, doi: 10.1016/j.tibs.2007.12.003.
90. Kedersha, N., Ivanov, P., and Anderson, P. (2013) Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase?, *Trends in biochemical sciences*, **38**, 494–506, doi: 10.1016/j.tibs.2013.07.004.
91. An, H., Tan, J. T., and Shelkovernikova, T. A. (2019) Stress granules regulate stress-induced paraspeckle assembly, *The Journal of cell biology*, **218**, 4127–4140, doi: 10.1083/jcb.201904098.
92. Bosco, D. A., Lemay, N., Ko, H. K., Zhou, H., Burke, C., Kwiakowski, T. J., Jr., Sapp, P., McKenna-Yasek, D., Brown, R. H., Jr., and Hayward, L. J. (2010) Mutant FUS proteins that cause amyotrophic lateral sclerosis incorporate into stress granules, *Human molecular genetics*, **19**, 4160–4175, doi: 10.1093/hmg/ddq335.
93. Gal, J., Zhang, J., Kwinter, D. M., Zhai, J., Jia, H., Jia, J., and Zhu, H. (2011) Nuclear localization sequence of FUS and induction of stress granules by ALS mutants, *Neurobiology of aging*, **32**, 2323.e2327–2340, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.010.
94. Li, Y. R., King, O. D., Shorter, J., and Gitler, A. D. (2013) Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis, *The Journal of cell biology*, **201**, 361–372, doi: 10.1083/jcb.201302044.
95. Shelkovernikova, T. A., Robinson, H. K., Connor-Robson, N., and Buchman, V. L. (2013) Recruitment into stress granules prevents irreversible aggregation of FUS protein mislocalized to the cytoplasm, *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, **12**, 3194–3202, doi: 10.4161/cc.26241.
96. Shelkovernikova, T. A., Robinson, H. K., Southcombe, J. A., Ninkina, N., and Buchman, V. L. (2014) Multi-step process of FUS aggregation in the cell cytoplasm involves RNA-dependent and RNA-independent mechanisms, *Human molecular genetics*, **23**, 5211–5226, doi: 10.1093/hmg/ddu243.
97. Aulas, A., and Vande Velde, C. (2015) Alterations in stress granule dynamics driven by TDP-43 and FUS: a link to pathological inclusions in ALS?, *Frontiers in cellular neuroscience*, **9**, 423, doi: 10.3389/fncel.2015.00423.
98. Baron, D. M., Kaushansky, L. J., Ward, C. L., Sama, R. R., Chian, R. J., Boggio, K. J., Quaresima, A. J., Nickerson, J. A., and Bosco, D. A. (2013) Amyotrophic lateral sclerosis-linked FUS/TLS alters stress granule assembly and dynamics, *Molecular neurodegeneration*, **8**, 30, doi: 10.1186/1750-1326-8-30.
99. Japtok, J., Lojewski, X., Naumann, M., Klingenstein, M., Reinhardt, P., Sternecker, J., Putz, S., Demestre, M., Boeckers, T. M., Ludolph, A. C., Liebau, S., Storch, A., and Hermann, A. (2015) Stepwise acquisition of hallmark neuropathology in FUS-ALS iPSC models depends on mutation type and neuronal aging, *Neurobiology of disease*, **82**, 420–429, doi: 10.1016/j.nbd.2015.07.017.
100. Takanashi, K., and Yamaguchi, A. (2014) Aggregation of ALS-linked FUS mutant sequesters RNA binding proteins and impairs RNA granules formation, *Biochemical and biophysical research communications*, **452**, 600–607, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.08.115.
101. Shelkovernikova, T. A., An, H., Skelt, L., Tregoning, J. S., Humphreys, I. R., and Buchman, V. L. (2019) Antiviral Immune Response as a

- Trigger of FUS Proteinopathy in Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Cell reports*, **29**, 4496–4508.e4494, doi: 10.1016/j.celrep.2019.11.094.
102. Bonifacino, T., Zerbo, R. A., Balbi, M., Torazza, C., Frumento, G., Fedele, E., Bonanno, G., and Milanesi, M. (2021) Nearly 30 Years of Animal Models to Study Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Historical Overview and Future Perspectives, *International journal of molecular sciences*, **22**, doi: 10.3390/ijms222212236.
103. Shelkownikova, T. A., Peters, O. M., Deykin, A. V., Connor-Robson, N., Robinson, H., Ustyugov, A. A., Bachurin, S. O., Ermolkevich, T. G., Goldman, I. L., Sadchikova, E. R., Kovrazhkina, E. A., Skvortsova, V. I., Ling, S. C., Da Cruz, S., Parone, P. A., Buchman, V. L., and Ninkina, N. N. (2013) Fused in sarcoma (FUS) protein lacking nuclear localization signal (NLS) and major RNA binding motifs triggers proteinopathy and severe motor phenotype in transgenic mice, *The Journal of biological chemistry*, **288**, 25266–25274, doi: 10.1074/jbc.M113.492017.
104. Capauto, D., Colantoni, A., Lu, L., Santini, T., Peruzzi, G., Biscarini, S., Morlando, M., Shneider, N. A., Cafarella, E., Laneve, P., and Bozzoni, I. (2018) A Regulatory Circuitry Between Gria2, miR-409, and miR-495 Is Affected by ALS FUS Mutation in ESC-Derived Motor Neurons, *Molecular neurobiology*, **55**, 7635–7651, doi: 10.1007/s12035-018-0884-4.
105. Devoy, A., Kalmar, B., Stewart, M., Park, H., Burke, B., Noy, S. J., Redhead, Y., Humphrey, J., Lo, K., Jaeger, J., Mejia Maza, A., Sivakumar, P., Bertolin, C., Soraru, G., Plagnol, V., Greensmith, L., Acevedo Arozana, A., Isaacs, A. M., Davies, B., Fratta, P., et al. (2017) Humanized mutant FUS drives progressive motor neuron degeneration without aggregation in 'FUSDelta14' knockin mice, *Brain : a journal of neurology*, **140**, 2797–2805, doi: 10.1093/brain/awx248.
106. López-Erauskin, J., Tadokoro, T., Baughn, M. W., Myers, B., McAlonis-Downes, M., Chillon-Marin, C., Asiaban, J. N., Artates, J., Bui, A. T., Vetto, A. P., Lee, S. K., Le, A. V., Sun, Y., Jambeau, M., Boubaker, J., Swing, D., Qiu, J., Hicks, G. G., Ouyang, Z., Fu, X. D., et al. (2018) ALS/FTD-Linked Mutation in FUS Suppresses Intra-axonal Protein Synthesis and Drives Disease Without Nuclear Loss-of-Function of FUS, *Neuron*, **100**, 816–830.e817, doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.044.
107. Verbeeck, C., Deng, Q., DeJesus-Hernandez, M., Taylor, G., Ceballos-Diaz, C., Kocerha, J., Golde, T., Das, P., Rademakers, R., Dickson, D. W., and Kukar, T. (2012) Expression of Fused in sarcoma mutations in mice recapitulates the neuropathology of FUS proteinopathies and provides insight into disease pathogenesis, *Molecular neurodegeneration*, **7**, 53, doi: 10.1186/1750-1326-7-53.
108. Yu, X., Zhao, Z., Shen, H., Bing, Q., Li, N., and Hu, J. (2018) Clinical and Genetic Features of Patients with Juvenile Amyotrophic Lateral Sclerosis with Fused in Sarcoma (FUS) Mutation, *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, **24**, 8750–8757, doi: 10.12659/msm.913724.
109. Zou, Z. Y., Cui, L. Y., Sun, Q., Li, X. G., Liu, M. S., Xu, Y., Zhou, Y., and Yang, X. Z. (2013) De novo FUS gene mutations are associated with juvenile-onset sporadic amyotrophic lateral sclerosis in China,

- Neurobiology of aging*, **34**, 1312. e1311–1318, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.005.
110. Bäumer, D., Hilton, D., Paine, S. M., Turner, M. R., Lowe, J., Talbot, K., and Ansoorge, O. (2010) Juvenile ALS with basophilic inclusions is a FUS proteinopathy with FUS mutations, *Neurology*, **75**, 611–618, doi: 10.1212/WNL.0b013e3181ed9cde.
111. Matsumoto, T., Matsukawa, K., Watanabe, N., Kishino, Y., Kunugi, H., Ihara, R., Wakabayashi, T., Hashimoto, T., and Iwatsubo, T. (2018) Self-assembly of FUS through its low-complexity domain contributes to neurodegeneration, *Human molecular genetics*, **27**, 1353–1365, doi: 10.1093/hmg/ddy046.
112. Gonzalez, A., Mannen, T., Çağatay, T., Fujiwara, A., Matsumura, H., Niesman, A. B., Brautigam, C. A., Chook, Y. M., and Yoshizawa, T. (2021) Mechanism of karyopherin-β2 binding and nuclear import of ALS variants FUS(P525L) and FUS(R495X), *Scientific reports*, **11**, 3754, doi: 10.1038/s41598-021-83196-y.
113. Nakaya, T., and Maragkakis, M. (2018) Amyotrophic Lateral Sclerosis associated FUS mutation shortens mitochondria and induces neurotoxicity, *Scientific reports*, **8**, 15575, doi: 10.1038/s41598-018-33964-0.
114. Tibshirani, M., Tradewell, M. L., Mattina, K. R., Minotti, S., Yang, W., Zhou, H., Strong, M. J., Hayward, L. J., and Durham, H. D. (2015) Cytoplasmic sequestration of FUS/TLS associated with ALS alters histone marks through loss of nuclear protein arginine methyltransferase 1, *Human molecular genetics*, **24**, 773–786, doi: 10.1093/hmg/ddu494.
115. Joyce, N. C., and Carter, G. T. (2013) Electrodiagnosis in persons with amyotrophic lateral sclerosis, *PM & R: the journal of injury, function, and rehabilitation*, **5**, S89–95, doi: 10.1016/j.pmrj.2013.03.020.
116. Eura, N., Sugie, K., Suzuki, N., Kiriyama, T., Izumi, T., Shimakura, N., Kato, M., and Aoki, M. (2019) A juvenile sporadic amyotrophic lateral sclerosis case with P525L mutation in the FUS gene: A rare co-occurrence of autism spectrum disorder and tremor, *Journal of the neurological sciences*, **398**, 67–68, doi: 10.1016/j.jns.2019.01.032.
117. King, A., Troakes, C., Smith, B., Nolan, M., Curran, O., Vance, C., Shaw, C. E., and Al-Sarraj, S. (2015) ALS-FUS pathology revisited: singleton FUS mutations and an unusual case with both a FUS and TARDBP mutation, *Acta neuropathologica communications*, **3**, 62, doi: 10.1186/s40478-015-0235-x.
118. Sharma, A., Lyashchenko, A. K., Lu, L., Nasrabad, S. E., Elmaleh, M., Mendelsohn, M., Nemes, A., Tapia, J. C., Mentis, G. Z., and Shneider, N. A. (2016) ALS-associated mutant FUS induces selective motor neuron degeneration through toxic gain of function, *Nature communications*, **7**, 10465, doi: 10.1038/ncomms10465.
119. Kerk, S. Y., Bai, Y., Smith, J., Lalgudi, P., Hunt, C., Kuno, J., Nuara, J., Yang, T., Lanza, K., Chan, N., Coppola, A., Tang, Q., Espert, J., Jones, H., Fannell, C., Zambrowicz, B., and Chiao, E. (2022) Homozygous ALS-linked FUS P525L mutations cell- autonomously perturb transcriptome profile and chemoreceptor signaling in human iPSC microglia, *Stem cell reports*, **17**, 678–692, doi: 10.1016/j.stemcr.2022.01.004.
120. Funikov, S. Y., Rezvykh, A. P., Mazin, P. V., Morozov, A. V., Maltsev, A. V., Chicheva, M. M., Vikhareva, E. A., Evgen'ev, M. B., and Ustyuy-

- gov, A. A. (2018) FUS(1–359) transgenic mice as a model of ALS: pathophysiological and molecular aspects of the proteinopathy, *Neurogenetics*, **19**, 189–204, doi: 10.1007/s10048-018-0553-9.
121. Scekic-Zahirovic, J., Oussini, H. E., Mersmann, S., Drenner, K., Wagner, M., Sun, Y., Allmeroth, K., Dieterlé, S., Sinniger, J., Dirrig-Grosch, S., René, F., Dormann, D., Haass, C., Ludolph, A. C., Lagier-Tourenne, C., Storkebaum, E., and Dupuis, L. (2017) Motor neuron intrinsic and extrinsic mechanisms contribute to the pathogenesis of FUS-associated amyotrophic lateral sclerosis, *Acta neuropathologica*, **133**, 887–906, doi: 10.1007/s00401-017-1687-9.
122. Zhang, X., Wang, F., Hu, Y., Chen, R., Meng, D., Guo, L., Lv, H., Guan, J., and Jia, Y. (2020) In vivo stress granule misprocessing evidenced in a FUS knock-in ALS mouse model, *Brain : a journal of neurology*, **143**, 1350–1367, doi: 10.1093/brain/awaa076.
123. White, M. A., Kim, E., Duffy, A., Adalbert, R., Phillips, B. U., Peters, O. M., Stephenson, J., Yang, S., Massenzio, F., Lin, Z., Andrews, S., Segonds-Pichon, A., Metterville, J., Saksida, L. M., Mead, R., Ribchester, R. R., Barhomi, Y., Serre, T., Coleman, M. P., Fallon, J. R., et al. (2018) TDP-43 gains function due to perturbed autoregulation in a Tardbp knock-in mouse model of ALS-FTD, *Nature neuroscience*, **21**, 552–563, doi: 10.1038/s41593-018-0113-5.
124. Ittner, L. M., Fath, T., Ke, Y. D., Bi, M., van Eersel, J., Li, K. M., Gunning, P., and Götz, J. (2008) Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 15997–16002, doi: 10.1073/pnas.0808084105.
125. Vernay, A., Therreau, L., Blot, B., Risson, V., Dirrig-Grosch, S., Waegaert, R., Lequeu, T., Sellal, F., Schaeffer, L., Sadoul, R., Loeffler, J. P., and René, F. (2016) A transgenic mouse expressing CHMP2Bintron5 mutant in neurons develops histological and behavioural features of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, *Human molecular genetics*, **25**, 3341–3360, doi: 10.1093/hmg/ddw182.
126. Huang, C., Tong, J., Bi, F., Wu, Q., Huang, B., Zhou, H., and Xia, X. G. (2012) Entorhinal cortical neurons are the primary targets of FUS mislocalization and ubiquitin aggregation in FUS transgenic rats, *Human molecular genetics*, **21**, 4602–4614, doi: 10.1093/hmg/dds299.
127. Huang, C., Zhou, H., Tong, J., Chen, H., Liu, Y. J., Wang, D., Wei, X., and Xia, X. G. (2011) FUS transgenic rats develop the phenotypes of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration, *PLoS genetics*, **7**, e1002011, doi: 10.1371/journal.pgen.1002011.
128. Acosta, J. R., Goldsbury, C., Winnick, C., Badrock, A. P., Fraser, S. T., Laird, A. S., Hall, T. E., Don, E. K., Fifita, J. A., Blair, I. P., Nicholson, G. A., and Cole, N. J. (2014) Mutant human FUS is ubiquitously mislocalized and generates persistent stress granules in primary cultured transgenic zebrafish cells, *PLoS one*, **9**, e90572, doi: 10.1371/journal.pone.0090572.
129. Armstrong, G. A., and Drapeau, P. (2013) Loss and gain of FUS function impair neuromuscular synaptic transmission in a genetic model of ALS, *Human molecular genetics*, **22**, 4282–4292, doi: 10.1093/hmg/ddt278.

130. Bourefis, A. R., Campanari, M. L., Buee-Scherrer, V., and Kabashi, E. (2020) Functional characterization of a FUS mutant zebrafish line as a novel genetic model for ALS, *Neurobiology of disease*, **142**, 104935, doi: 10.1016/j.nbd.2020.104935.
131. Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes, *Development (Cambridge, England)*, **118**, 401–415, doi: 10.1242/dev.118.2.401.
132. Liguori, F., Amadio, S., and Volonté, C. (2021) Fly for ALS: Drosophila modeling on the route to amyotrophic lateral sclerosis modifiers, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **78**, 6143–6160, doi: 10.1007/s00018-021-03905-8.
133. Stolow, D. T., and Haynes, S. R. (1995) Cabeza, a Drosophila gene encoding a novel RNA binding protein, shares homology with EWS and TLS, two genes involved in human sarcoma formation, *Nucleic acids research*, **23**, 835–843, doi: 10.1093/nar/23.5.835.
134. Baldwin, K. R., Godena, V. K., Hewitt, V. L., and Whitworth, A. J. (2016) Axonal transport defects are a common phenotype in Drosophila models of ALS, *Human molecular genetics*, **25**, 2378–2392, doi: 10.1093/hmg/ddw105.
135. Frickenhaus, M., Wagner, M., Mallick, M., Catinozzi, M., and Storkbaum, E. (2015) Highly efficient cell-type-specific gene inactivation reveals a key function for the Drosophila FUS homolog cabeza in neurons, *Scientific reports*, **5**, 9107, doi: 10.1038/srep09107.
136. Chen, Y., Yang, M., Deng, J., Chen, X., Ye, Y., Zhu, L., Liu, J., Ye, H., Shen, Y., Li, Y., Rao, E. J., Fushimi, K., Zhou, X., Bigio, E. H., Mesulam, M., Xu, Q., and Wu, J. Y. (2011) Expression of human FUS protein in Drosophila leads to progressive neurodegeneration, *Protein & cell*, **2**, 477–486, doi: 10.1007/s13238-011-1065-7.
137. Xia, R., Liu, Y., Yang, L., Gal, J., Zhu, H., and Jia, J. (2012) Motor neuron apoptosis and neuromuscular junction perturbation are prominent features in a Drosophila model of Fus-mediated ALS, *Molecular neurodegeneration*, **7**, 10, doi: 10.1186/1750-1326-7-10.
138. Therrien, M., and Parker, J. A. (2014) Deciphering genetic interactions between ALS genes using *C. elegans*, *Worm*, **3**, e29047, doi: 10.4161/worm.29047.
139. Taylor, M., Marx, O., and Norris, A. (2023) TDP-1 and FUST-1 co-inhibit exon inclusion and control fertility together with transcriptional regulation, *bioRxiv : the preprint server for biology*, doi: 10.1101/2023.04.18.537345.
140. Vèrièpe, J., Fossouo, L., and Parker, J. A. (2015) Neurodegeneration in *C. elegans* models of ALS requires TIR-1/Sarm1 immune pathway activation in neurons, *Nature communications*, **6**, 7319, doi: 10.1038/ncomms8319.
141. Zhang, T., Wu, Y. C., Mullane, P., Ji, Y. J., Liu, H., He, L., Arora, A., Hwang, H. Y., Alessi, A. F., Niaki, A. G., Periz, G., Guo, L., Wang, H., Elkayam, E., Joshua-Tor, L., Myong, S., Kim, J. K., Shorter, J., Ong, S. E., Leung, A. K. L., et al. (2018) FUS Regulates Activity of MicroRNA-Mediated Gene Silencing, *Molecular cell*, **69**, 787–801.e788, doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.001.
142. Murakami, T., Yang, S. P., Xie, L., Kawano, T., Fu, D., Mukai, A.,

- Bohm, C., Chen, F., Robertson, J., Suzuki, H., Tartaglia, G. G., Vendruscolo, M., Kaminski Schierle, G. S., Chan, F. T., Moloney, A., Crowther, D., Kaminski, C. F., Zhen, M., and St George-Hyslop, P. (2012) ALS mutations in FUS cause neuronal dysfunction and death in *Caenorhabditis elegans* by a dominant gain-of-function mechanism, *Human molecular genetics*, **21**, 1–9, doi: 10.1093/hmg/ddr417.
143. Vaccaro, A., Tauffenberger, A., Aggad, D., Rouleau, G., Drapeau, P., and Parker, J. A. (2012) Mutant TDP-43 and FUS cause age-dependent paralysis and neurodegeneration in *C. elegans*, *PloS one*, **7**, e31321, doi: 10.1371/journal.pone.0031321.
144. Markert, S. M., Skoruppa, M., Yu, B., Mulcahy, B., Zhen, M., Gao, S., Sendtner, M., and Stigloher, C. (2020) Overexpression of an ALS-associated FUS mutation in *C. elegans* disrupts NMJ morphology and leads to defective neuromuscular transmission, *Biology open*, **9**, doi: 10.1242/bio.055129.
145. Therrien, M., Rouleau, G. A., Dion, P. A., and Parker, J. A. (2016) FET proteins regulate lifespan and neuronal integrity, *Scientific reports*, **6**, 25159, doi: 10.1038/srep25159.
146. Baskoylu, S. N., Chapkis, N., Unsal, B., Lins, J., Schuch, K., Simon, J., and Hart, A. C. (2022) Disrupted autophagy and neuronal dysfunction in *C. elegans* knockin models of FUS amyotrophic lateral sclerosis, *Cell reports*, **38**, 110195, doi: 10.1016/j.celrep.2021.110195.
147. Monahan, Z. T., Rhoads, S. N., Yee, D. S., and Shewmaker, F. P. (2018) Yeast Models of Prion-Like Proteins That Cause Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveal Pathogenic Mechanisms, *Frontiers in molecular neuroscience*, **11**, 453, doi: 10.3389/fnmol.2018.00453.
148. Kryndushkin, D., and Shewmaker, F. (2011) Modeling ALS and FTL D proteinopathies in yeast: an efficient approach for studying protein aggregation and toxicity, *Prion*, **5**, 250–257, doi: 10.4161/pri.17229.
149. Ju, S., Tardiff, D. F., Han, H., Divya, K., Zhong, Q., Maquat, L. E., Bosco, D. A., Hayward, L. J., Brown, R. H., Jr., Lindquist, S., Ringe, D., and Petsko, G. A. (2011) A yeast model of FUS/TLS-dependent cytotoxicity, *PLoS biology*, **9**, e1001052, doi: 10.1371/journal.pbio.1001052.
150. Sun, Z., Diaz, Z., Fang, X., Hart, M. P., Chesi, A., Shorter, J., and Gitler, A. D. (2011) Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS, *PLoS biology*, **9**, e1000614, doi: 10.1371/journal.pbio.1000614.
151. Park, S. K., Arslan, F., Kanneganti, V., Barmada, S. J., Purushothaman, P., Verma, S. C., and Liebman, S. W. (2018) Overexpression of a conserved HSP40 chaperone reduces toxicity of several neurodegenerative disease proteins, *Prion*, **12**, 16–22, doi: 10.1080/19336896.2017.1423185.
152. Jaiswal, M. K. (2019) Riluzole and edaravone: A tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs, *Medicinal research reviews*, **39**, 733–748, doi: 10.1002/med.21528.
153. Doble, A. (1996) The pharmacology and mechanism of action of riluzole, *Neurology*, **47**, S233–S241, doi: 10.1212/wnl.47.6_suppl_4.233s.
154. Hinchcliffe, M., and Smith, A. (2017) Riluzole: real-world evidence supports significant extension of median survival times in patients with amyotrophic lateral sclerosis, *Degenerative neurological and neuromuscular disease*, **7**, 61–70, doi: 10.2147/dnnd.s135748.

155. Cruz, M. P. (2018) Edaravone (Radicaava): A Novel Neuroprotective Agent for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis, *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*, **43**, 25–28.
156. Cho, H., and Shukla, S. (2020) Role of Edaravone as a Treatment Option for Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis, *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, **14**, doi: 10.3390/ph14010029.
157. Okada, M., Yamashita, S., Ueyama, H., Ishizaki, M., Maeda, Y., and Ando, Y. (2018) Long-term effects of edaravone on survival of patients with amyotrophic lateral sclerosis, *eNeurologicalSci*, **11**, 11–14, doi: 10.1016/j.ensci.2018.05.001.
158. Brooks, B. R., Berry, J. D., Ciepielewska, M., Liu, Y., Zambrano, G. S., Zhang, J., and Hagan, M. (2022) Intravenous edaravone treatment in ALS and survival: An exploratory, retrospective, administrative claims analysis, *EClinicalMedicine*, **52**, 101590, doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101590.
159. Petrov, D., Mansfield, C., Moussy, A., and Hermine, O. (2017) ALS Clinical Trials Review: 20 Years of Failure. Are We Any Closer to Registering a New Treatment?, *Frontiers in aging neuroscience*, **9**, 68, doi: 10.3389/fnagi.2017.00068.
160. Berry, J. D., Shefner, J. M., Conwit, R., Schoenfeld, D., Keroack, M., Felsenstein, D., Krivickas, L., David, W. S., Vriesendorp, F., Pestronk, A., Caress, J. B., Katz, J., Simpson, E., Rosenfeld, J., Pascuzzi, R., Glass, J., Reznia, K., Rothstein, J. D., Greenblatt, D. J., and Cudkovicz, M. E. (2013) Design and initial results of a multi-phase randomized trial of ceftriaxone in amyotrophic lateral sclerosis, *PLoS one*, **8**, e61177, doi: 10.1371/journal.pone.0061177.
161. de Carvalho, M., Pinto, S., Costa, J., Evangelista, T., Ohana, B., and Pinto, A. (2010) A randomized, placebo-controlled trial of memantine for functional disability in amyotrophic lateral sclerosis, *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, **11**, 456–460, doi: 10.3109/17482968.2010.498521.
162. Cudkovicz, M. E., Shefner, J. M., Schoenfeld, D. A., Zhang, H., Andreasson, K. I., Rothstein, J. D., and Drachman, D. B. (2006) Trial of celecoxib in amyotrophic lateral sclerosis, *Annals of neurology*, **60**, 22–31, doi: 10.1002/ana.20903.
163. Meininger, V., Drory, V. E., Leigh, P. N., Ludolph, A., Robberecht, W., and Silani, V. (2009) Glatiramer acetate has no impact on disease progression in ALS at 40 mg/day: a double-blind, randomized, multicentre, placebo-controlled trial, *Amyotrophic lateral sclerosis: official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, **10**, 378–383, doi: 10.3109/17482960902803432.
164. Ferrante, K. L., Shefner, J., Zhang, H., Betensky, R., O'Brien, M., Yu, H., Fantasia, M., Taft, J., Beal, M. F., Traynor, B., Newhall, K., Donofrio, P., Caress, J., Ashburn, C., Freiberg, B., O'Neill, C., Paladenech, C., Walker, T., Pestronk, A., Abrams, B., et al. (2005) Tolerance of high-dose (3,000 mg/day) coenzyme Q10 in ALS, *Neurology*, **65**, 1834–1836, doi: 10.1212/01.wnl.0000187070.35365.d7.
165. Rosenfeld, J., King, R. M., Jackson, C. E., Bedlack, R. S., Barohn, R. J., Dick, A., Phillips, L. H., Chapin, J., Gelinas, D. F., and Lou, J. S. (2008) Creatine monohydrate in ALS: effects on strength,

- fatigue, respiratory status and ALSFRS, *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, **9**, 266–272, doi: 10.1080/17482960802028890.
166. Cudkovicz, M. E., van den Berg, L. H., Shefner, J. M., Mitumoto, H., Mora, J. S., Ludolph, A., Hardiman, O., Bozik, M. E., Ingersoll, E. W., Archibald, D., Meyers, A. L., Dong, Y., Farwell, W. R., and Kerr, D. A. (2013) Dexpramipexole versus placebo for patients with amyotrophic lateral sclerosis (EMPOWER): a randomised, double-blind, phase 3 trial, *The Lancet. Neurology*, **12**, 1059–1067, doi: 10.1016/s1474-4422(13)70221-7.
167. Lenglet, T., Lacomblez, L., Abitbol, J. L., Ludolph, A., Mora, J. S., Robberecht, W., Shaw, P. J., Pruss, R. M., Cuvier, V., and Meininger, V. (2014) A phase II–III trial of olesoxime in subjects with amyotrophic lateral sclerosis, *European journal of neurology*, **21**, 529–536, doi: 10.1111/ene.12344.
168. Nam, J. Y., Lee, T. Y., Kim, K., Chun, S., Kim, M. S., Shin, J. H., Sung, J. J., Kim, B. J., Kim, B. J., Oh, K. W., Kim, K. S., and Kim, S. H. (2022) Efficacy and safety of Lenzumestrocel (Neuronata-R® inj.) in patients with amyotrophic lateral sclerosis (ALSUMMIT study): study protocol for a multicentre, randomized, double-blind, parallel-group, sham procedure-controlled, phase III trial, *Trials*, **23**, 415, doi: 10.1186/s13063-022-06327-4.
169. Amado, D. A., and Davidson, B. L. (2021) Gene therapy for ALS: A review, *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, **29**, 3345–3358, doi: 10.1016/j.ythm.2021.04.008.
170. Boros, B. D., Schoch, K. M., Kreple, C. J., and Miller, T. M. (2022) Antisense Oligonucleotides for the Study and Treatment of ALS, *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, **19**, 1145–1158, doi: 10.1007/s13311-022-01247-2.
171. Miller, T., Cudkovicz, M., Shaw, P. J., Andersen, P. M., Atassi, N., Bucelli, R. C., Genge, A., Glass, J., Ladha, S., Ludolph, A. L., Maragakis, N. J., McDermott, C. J., Pestronk, A., Ravits, J., Salachas, F., Trudell, R., Van Damme, P., Zinman, L., Bennett, C. F., Lane, R., et al. (2020) Phase 1–2 Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS, *The New England journal of medicine*, **383**, 109–119, doi: 10.1056/NEJMoa2003715.
172. Sareen, D., O'Rourke, J. G., Meera, P., Muhammad, A. K., Grant, S., Simpkinson, M., Bell, S., Carmona, S., Ornelas, L., Sahabian, A., Gendron, T., Petrucelli, L., Baughn, M., Ravits, J., Harms, M. B., Rigo, F., Bennett, C. F., Otis, T. S., Svendsen, C. N., and Baloh, R. H. (2013) Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion, *Science translational medicine*, **5**, 208ra149, doi: 10.1126/scitranslmed.3007529.
173. Korobeynikov, V. A., Lyashchenko, A. K., Blanco-Redondo, B., Jafar-Nejad, P., and Shneider, N. A. (2022) Antisense oligonucleotide silencing of FUS expression as a therapeutic approach in amyotrophic lateral sclerosis, *Nature medicine*, **28**, 104–116, doi: 10.1038/s41591-021-01615-z.
174. Scoles, D. R., Meera, P., Schneider, M. D., Paul, S., Dansithong, W., Figueroa, K. P., Hung, G., Rigo, F., Bennett, C. F., Otis, T. S., and Pulst, S.

- M. (2017) Antisense oligonucleotide therapy for spinocerebellar ataxia type 2, *Nature*, **544**, 362–366, doi: 10.1038/nature22044.
175. Blair, H. A. (2023) Tofersen: First Approval, *Drugs*, **83**, 1039–1043, doi: 10.1007/s40265-023-01904-6.