

## 生物大分子相分离及其在神经退行性疾病中的研究进展

崔理立 (广东省衰老相关心脑血管疾病重点实验室, 广东湛江 524001)



专家简介: 崔理立, 研究员, 博士生/ 博士后导师。广东省珠江学者青年学者, 广东省“扬帆计划”培养高层次人才, 广东医科大学附属第一医院登峰学者, 中国研究型医院学会神经科学专业委员, 中国老年学和老年医学学会抗衰老分会委员, 广东省医学会神经病学分会痴呆学组委员, 广东省医院协会科研实验室建设与管理专委会委员, 广东省衰老相关心脑血管疾病重点实验室主任, 广东省神经变性疾病与衰老研究医学重点实验室主任, 广东医科大学神经病学研究所所长, 《Schizophrenia Bulletin》等 30 余期刊的受邀审稿人, 《Frontiers in molecular Neuroscience》等客座编辑, 国家自然科学基金、广东省、浙江省、陕西省等多省市基金项目函审专家,

微信公众号“小崔和他的小伙伴们”创始人。主持科研项目 10 余项, 其中国家自然科学基金项目 3 项, 授权发明专利 3 项。共发表文章 70 余篇, 其中作为第一或通信作者在《Molecular Therapy》《Ageing Research Reviews》《Aging Cell》《Theranostics》等期刊共发表 SCI 论文 41 篇。主要研究方向为以阿尔茨海默病为主的认知障碍相关疾病的发病机制研究。E-mail: cuilili@gdmu.edu.cn。

**摘要:** 生物学进程中生物大分子会根据自身性质以及外界刺激出现相分离, 进而发挥独特的生物学功能, 如基因组的组装、转录调控、信号转导等。在一些疾病进程中一些关键生物大分子会在病理情况下也出现相分离变化。该文总结了相分离的发展、生物学机制及其在神经退行性疾病中的研究状况, 展望未来研究的发展方向。

**关键词:** 生物分子凝聚物; 相分离; 神经退行性疾病; Tau

中图分类号: R 363

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2022) 04-0361-07

### Phase separation of biological macromolecules and its research progress in neurodegenerative diseases

CUI Li-li (Guangdong Key Laboratory of Age-Related Cardiac and Cerebral Diseases, Zhanjiang 524001, China)

**Abstract:** Phase separation of biological macromolecules is an emerging intersectional field in biology and medical research in recent years. In the biological process, biological macromolecules will form phase separation according to their own properties and external stimuli, and then play unique biological functions, such as genome assembly, transcriptional regulation, signal transduction, etc. and play a crucial role in several disease processes. This review summarizes the development of phase separation, introduces the biological mechanism of phase separation, and reviewed the research progress of phase separation in neurodegenerative diseases, finally giving prospects and suggestions for the development of phase separation in future.

**Key words:** neurodegenerative disease; phase separation; biomolecular condensates; Tau

生物大分子的相分离现象是当前生物学领域的研究热点。自从第一个无膜的细胞器——核仁在细胞核被发现, 研究者们陆续在细胞中发现了许多形态、动力学以及组装的方式上极为类似的无膜或者半膜的“隔间”, 这就是生物大分子的液-液相分离现象(LLPS)。尽管它们的组成成分、定位及功能各不相同, 却大多具有与周围介质进行快速、高效物质交换的性质, 而如何

在物理及分子角度对此种现象的生物学机制作出解释一直未有突破性进展。2009年Brangwynne用相分离理论首次阐述了线虫受精卵细胞极化和不对称分裂机制, 研究者逐渐认识到相分离可能是一个细胞内无膜隔间形成的普遍机制且参与了生物分子的组织定位与功能调控。而今生命体通过生物分子相分离产生具有各种功能的高度动态且无膜细胞器的概念正被广泛接

收稿日期: 2022-06-28

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82071190), 广东医科大学冲补强学科建设类重大项目(4SG21230G)

受,相分离机制在正常生命活动及致病机制中的重要作用逐渐明晰。本文将简介相分离研究进展、生物学机制及其在神经退行性疾病中的研究状况,展望未来研究的发展方向。

## 1 相分离现象

“相”是物理化学中描述物质统一特性的名词,是指物质处于连续均一的聚集状态,比如气态、固态、液态就是最常见的相。相一般具有明确的边界界定,出现自主的分离或聚集的现象称之为“相分离”。常见的油水分离就是典型相分离现象,然而相分离并不局限于像水这样的小分子,生物大分子同样也可以经历类似的过程,其中液-液相分离是生物大分子相分离中的一种主要类别。LLPS本质上是指生物大分子的各种液滴在另一种液体(细胞质或核质)中自组装,即在大体积溶剂中分离成不同的液相,其通常发生在饱和浓度以上时,两个不同的相就会发生分离,从而导致一个相的分子高度集中,而另一个相则相对稀薄,结构类似于液滴一样的球状,当彼此接触时会结合成一个更大的球形组件,像水滴在疏水表面上形成的液珠一样<sup>[1]</sup>。这种微观物理化学现象贯穿于整个生命过程。

2009年,Brangwynne教授团队在研究秀丽隐杆线虫的发育机制时发现受精后的线虫胚芽细胞的细胞核周围出现许多发光的球状小点,即P颗粒<sup>[2]</sup>。P颗粒由蛋白质和RNA组成,能够快速地与细胞质进行持续的物质交换,并且能够在剪切力的作用下自由流动,相互碰撞并发生融合或分离。此研究提示生物体内同类物质之间存在一种新型的快速集散方式,在应力剪切的作用下可以发生形变并具有流动性,并首次通过相分离现象阐明线虫胚芽细胞极化和不对称分裂的机制。

细胞是生物体从事生理活动的场所和基本单位,细胞中蕴含着蛋白质、核酸、脂肪等复杂海量的生化物质,看似散漫却又能够井然有序的发生自主的相互作用,在细胞内行使各自的生物学功能。这些物质是如何找到各自的伙伴继而团结在一起有序的工作?经典的有膜细胞器如线粒体、高尔基体、内质网等似乎为此提供了解答,但却显然无法简单解释全部的工作过程。在细胞中还存在着一些无膜细胞器如核仁、中心体等“生物分子凝聚物”,它们具有类似液体的性质,可以自由地进行变形、重组和融合,方便物质的交换和聚集,能发生液-液相分离,在看似无序的细胞中形成秩序并能够高效地参与细胞的生理过程<sup>[3-4]</sup>。这类生物

分子凝聚物是如何自主地聚集在一起,又是如何根据不同的应激来改变状态发挥其生物学功能的,有待深入探讨。而在外界应激或者基因突变等情况下,即在错误的时空里,这类生物分子凝聚物出现相分离变化就可能诱发一些分子堵塞、聚集,由此形成的不良液滴,可能会形成特定的分子病理机制,且与某些疾病的发生、发展密切相关,如一些由蛋白质聚集引起的神经退行性疾病等[阿尔茨海默病(AD)、路易小体病等],因此探寻液-液相分离的分子机制对于了解生物大分子在体内的具体功能模式及疾病的发病机制和防治都具有重要意义。

## 2 生物大分子中相分离现象的基本影响条件

生物大分子的液-液相分离一般由多价相互作用如疏水相互作用、离子相互作用等介导形成,其中包含了蛋白质之间的相互作用以及蛋白与核酸之间的相互作用等。这些多价相互作用最终在细胞内的局部区域自主富集形成生物分子凝聚物,即无膜细胞器。目前已经报道的一些典型无膜细胞器包括P颗粒、中心体、纺锤体、应激颗粒、加工小体等<sup>[5]</sup>。然此类生物分子虽因自身的理化性质可发生相分离现象,但其凝聚物的形成与调控仍受众多微环境因素的影响。目前针对生物大分子相分离的研究主要是以蛋白质为核心的,具有相分离潜质的蛋白通常可以通过评估该蛋白是否包含低复杂度结构域(LCD)亦称低复杂度区域(LCR),也就是固有无序区域(IDR)来进行预测,这些无序区域可以释放更多的多价作用力,在蛋白功能和浓度变化时会出现相分离的现象。如一种RNA解旋酶—胚芽颗粒蛋白DDX4,其N端和C端都含有IDR,在体外表达纯化DDX4,仅N端的IDR就足以使其发生相分离,并且低温和低盐浓度都会促进相分离液滴的形成<sup>[5]</sup>。此外,肌萎缩侧索硬化症(ALS)和应激颗粒相关的蛋白hnRNPA1,肉瘤融合蛋白(FUS)和TAR DNA结合蛋白(TDP43)等<sup>[6-7]</sup>都富含IDR序列,能够在体外驱动液-液相分离的发生。研究发现具有高度保守结构域同时模块相对独立线性的蛋白能够通过固有模块的相互作用驱动相分离的发生,如Li等<sup>[8]</sup>发现Src同源3结构域(SH3)可与富含脯氨酸基序(PRM)配体之间存在相互作用,在高浓度时将SH3<sub>4</sub>和PRM<sub>4</sub>混合在一起后就会发生液-液相分离,证实多价大分子(包括多结构域蛋白质和RNA)之间的相互作用会产生明显的液-液相分离。

一般来说,相分离现象是生物大分子本身的理化

性质与微环境共同促成的。当生物大分子的浓度达到其本身相分离的最低浓度时,生物分子会由于相互的吸引作用而凝聚达到临界值,就可能发生相分离现象,而临界饱和浓度越低说明体系越易于发生相分离。除此之外,温度对于相分离的影响也不言而喻,相分离本质来说是体系熵减少的过程,温度升高认为不利于相分离的进行。离子强度对于相分离的影响主要体现在离子的静电作用,这取决于相分离体系中的哪种作用力起到主要作用。如果相分离体系中静电作用处于主导,那么提高离子强度则不利于相分离的发生,然不同的盐离子类型对于相分离影响是不同的,要具体情况具体分析<sup>[9]</sup>。此外,pH值也可通过影响蛋白质的非共价相互作用影响相分离。综上所述,在生物大分子的相分离体系中只有少部分关键大分子在分子内部或者分子之间通过多价相互作用主导着液-液相分离现象的发生,且此现象高度依赖于溶液中生物大分子的理化性质和浓度、温度、pH、离子类型、离子浓度及溶液中存在的其他物质等多种因素的准确配比和调控<sup>[9]</sup>。

### 3 生物大分子相分离现象背后的生物学及病理学机制

一些基因突变或环境干扰可导致凝聚体的形成和扰乱,进而影响生物学进程或者疾病的分子病理进程。目前已有多种影响蛋白大分子凝聚物的液-液相分离机制报道,如直接改变凝聚体组装的分子机制、改变凝聚反应的关键调节因子的活性、以及改变细胞内的理化条件等参与到细胞信号转导、基因转录调控、染色质聚集及DNA损伤调控这些生化或者病理进程中<sup>[10]</sup>。如一些蛋白的翻译后修饰能够抑制或者促进相分离过程。渐冻症的关键致病蛋白Fus蛋白在压力刺激或者突变下,其精氨酸残基可发生二甲甲基化修饰,使相关致病蛋白动态相分离调控紊乱,导致蛋白进行液-固相转化并产生高度稳定的致病淀粉样聚集体<sup>[11-12]</sup>。脆性X智力障碍蛋白(FMRP)固有无序区域的磷酸化可以影响其与核酸之间的多价作用力,进而影响神经元颗粒的形成<sup>[13]</sup>。与肿瘤密切相关的转录因子YAP相分离颗粒可以通过疏水作用凝集其相关转录因子和组蛋白修饰酶等复合体促进YAP靶基因高效表达<sup>[14]</sup>。转录共激活因子含溴结构域蛋白(BRD4)和介体复合体亚基1(MED1)可在体外形成相分离液滴,在超级增强子驱动的转录位点凝集而将转录装置分隔从而实现转录过程的区室化,使转录过程高效进行<sup>[15]</sup>。增强子RNA依赖性核糖核蛋白复合物在人类乳腺癌细胞中表现出液体样凝聚物的特性,提高了对转录程序

的反应速度和程度<sup>[16]</sup>。据报道相分离机制参与了一些信号通路的激活,如T细胞受体(TCR)信号通路被激活时,下游效应蛋白自发地相分离形成动态的膜相关cluster,从而放大传入信号<sup>[17]</sup>。抑制基因SPOP(斑点型BTB/POZ蛋白)突变可破坏SPOP底物的相互作用,进而破坏SPOP的相分离和无膜细胞器的定位,促进肿瘤的发生<sup>[18]</sup>。有研究发现相分离也参与调控传染病的发生和发展,如水疱性口炎病毒感染时形成的隔室具有类似液体的性质,参与复制的三种病毒蛋白质可通过相分离以驱动病毒隔室的形成<sup>[19]</sup>。狂犬病病毒感染的细胞胞质中形成的内基氏小体是由狂犬病病毒P蛋白中的IDR驱动形成的液滴,它能够进一步地促进病毒基因组的复制<sup>[20]</sup>。亦有研究提出在眼球晶状体内蛋白质的液态凝集物可致白内障形成<sup>[21]</sup>。可见,生物大分子中液-液相分离的本质是通过蛋白等生物大分子在胞内自发的凝集与分离从而高效地发挥生物学功能,此一精细物理化学现象的生物学阐释,对于了解复杂的细胞功能和某些疾病的发生、发展具有重要意义。

### 4 神经退行性疾病中的生物大分子相分离现象

神经退行性疾病是一类神经元进行性变性死亡导致中枢神经系统受损从而影响患者的认知及运动功能的疾病,主要包括AD、帕金森氏病、亨廷顿氏病、多发性硬化症、肌萎缩侧索硬化症(ALS)和额颞叶痴呆(FTD)等。此类疾病因大脑和脊髓神经元细胞的丧失而不可逆转,在临床上以发作迟缓和选择性神经元的功能障碍为主要表现特征<sup>[22]</sup>。大量研究表明上述神经退行性疾病均与错误折叠蛋白的聚合和沉积有关<sup>[23]</sup>,如AD中微管相关蛋白Tau(MAPT)的胞浆聚集,ALS和FTD中TAR DNA结合蛋白(TDP-43)或FUS胞浆内的包涵体,以及HD中的聚谷氨酰胺(PolyQ)聚集体等。这些蛋白的病理性聚集均被认为是导致各种神经退行性病变的最重要因素<sup>[24-25]</sup>。

神经退行性疾病中积聚的病理性蛋白大都属于内在无序蛋白质(IDP),如亨廷顿病中的亨廷顿蛋白、帕金森病中的 $\alpha$ -突触核蛋白、ALS中的TDP-43和FUS蛋白以及Tau相关病中的Tau蛋白。IDP没有明确的三级结构<sup>[26]</sup>,常表现出构象异质性。含有内在无序区域的蛋白质通常具有多种生物学功能<sup>[27]</sup>,它们在各种构象中波动,仅在展开时具有生物活性,从而能够参与多种信号通路的调节和信号的传导过程。然而这些波动也使ID容易受到环境变化的影响,并且由于它

们的疏水区没有埋在蛋白核心内,所以更倾向于通过异常构象聚集在淀粉样蛋白原纤维中,最初的蛋白质液滴是高度动态的,不稳定的分子聚合小液滴之间会融合成更大、更稳定的液滴,随着时间的推移会逐渐老化,而在老化过程的最后阶段是向固体样淀粉样蛋白纤维的转变,也就是形成蛋白聚集斑块<sup>[28-30]</sup>。淀粉样蛋白纤维是神经退行性疾病的特征,然而与疾病相关的淀粉样蛋白纤维是如何产生的又是如何导致神经退化的,这些问题随着LLPS在淀粉样原纤维形成机制研究中受到的关注日益增长,可能将会有新的解答。近年来的研究表明异常的相分离和液-固相变参与了病理性蛋白聚集体的形成,为这类难治之症的诊治提供了新的分子机制和潜在的治疗靶点。

#### 4.1 ALS和FTD

ALS和FTD是涉及异常相分离的神经退行性疾病中最突出的例子之一,其中RNA结合蛋白中的无膜细胞器和异常相变似在发病机制中发挥关键的作用<sup>[7]</sup>。TDP-43、FUS和hnRNPA1均属于异质性核糖核蛋白。研究发现TDP-43在ALS患者大脑和脊髓的病变区域异常聚集形成泛素阳性包涵体,这被广泛认为是散发性和大多数家族性ALS的标志性病理<sup>[31]</sup>。在TDP-43、FUS和hnRNPA1的低复杂度结构域中发现有与ALS发病相关的突变位点。这些突变损害无膜细胞器的动力学,导致疾病相关RNA结合蛋白发生相分离,进而加速了纤维化过程,最终形成沉积在细胞体和神经丛中的病理性淀粉样原纤维<sup>[32-35]</sup>。除了致病突变外,RNA结合蛋白及其结合伴侣上的异常翻译后修饰(PTM)在ALS和FTD的病理机制上也发挥重要作用<sup>[36]</sup>。研究表明FUS精氨酸甲基化的缺失促进了LLPS,并降低了体外和细胞中FUS凝聚体的动力,其基本机制为精氨酸和芳香族氨基酸残基间的相互作用增强,从而推动了FUS蛋白的缩合,提示PTM可以促进或抑制疾病相关蛋白的相分离<sup>[37-38]</sup>。可见,针对各自的PTM修饰酶影响关键相分离蛋白是一个很有前途的治疗策略,如已有研究发现PAR聚合酶抑制剂在TDP-43相关毒性的细胞和动物模型中具有神经保护作用<sup>[39]</sup>。研究表明亚细胞定位的改变可以改变蛋白质的相行为,从而导致ALS或FTD等疾病的发生,ALS疾病相关的FUS蛋白的核定位信号(NLS)突变后会抑制FUS与核输入受体Transportin的结合,可致核输入受损和FUS的胞浆积聚<sup>[40]</sup>。因此,纠正蛋白的错误定位和增强隔室特异性也可成为治疗ALS等疾病的一种潜在策略。

#### 4.2 AD以及其他TAU病

Tau是微管相关蛋白,在一系列神经退行性疾病的发病机制中起着关键作用。蛋白质聚集体是神经退行性疾病的标志,其中病理性Tau蛋白的聚集是多种神经退行性疾病的典型病理特征<sup>[41-43]</sup>。AD、进行性核上性麻痹、皮质基底膜变性、嗜银颗粒病、某些形式的FTD和慢性创伤性脑病等的关键组织病理学特征之一是在大脑中积累了不溶性的胞浆Tau包涵体,而这些包涵体的主要类型便是这类疾病的典型病理-神经原纤维缠结(NFT)<sup>[44]</sup>,因而这类疾病统称TAU病。

越来越多的证据表明,Tau可以依靠LLPS完成一些细胞功能。在健康的神经元中,Tau相分离具有重要的生理功能,即局部浓缩微管蛋白,从而形成微管束<sup>[45]</sup>。然而Tau异常聚集可导致从液体到固体的转变,这与神经退行性疾病病理机制密切相关。那么极易溶的Tau蛋白是如何转变为NFT中聚集的Tau?Tau从微管分离被认为是Tau病变的开始,与疾病相关的Tau突变或异常的PTM使其向凝集状态移动,并促进随后的聚集和硬化。而Tau的PTMs中最重要的是磷酸化<sup>[46-50]</sup>。为了应对病理压力,磷酸化的游离Tau不断错误地定位并在树突和胞体中积累,最终导致了Tau蛋白的聚集<sup>[51]</sup>。

相分离被认为是Tau蛋白聚集的初始步骤。有研究者提出可溶性Tau蛋白可以在细胞条件下进行LLPS,并且相分离的Tau液滴可以作为Tau聚集形成的中间体<sup>[52]</sup>。研究证明,具有LCD的几种无序蛋白质在增加溶液中的大分子拥挤剂时会经历LLPS,从而导致水溶液中液滴的形成<sup>[53]</sup>。虽然Tau蛋白质序列中不存在典型的LCD,但是全长Tau蛋白因存在的内在无序和不均匀的电荷分布<sup>[54]</sup>,Tau蛋白也可以在体外通过拥挤剂或RNA促进相分离的发生。在AD和FTDP-17患者中,Tau蛋白的异常过度磷酸化促进了Tau蛋白的相分离<sup>[55]</sup>。Tau蛋白与相分离相关的RNA结合蛋白之间存在密切联系,可单独或在RNA和/或蛋白质伴侣存在的情况下进行LLPS。研究表明在AD和FTDP-17患者或小鼠模型中,TIA1和其他RNA结合蛋白与Tau蛋白相互作用并参与Tau蛋白聚集<sup>[56-58]</sup>。鉴于Tau的PTM中磷酸化的最重要地位<sup>[59]</sup>,Tau的过度磷酸化是促使其通过相分离在突触定位错误而异常聚集的最主要因素。除此之外致病突变对Tau的LLPS也有重要作用,如17号染色体上编码Tau的microtubule-associated protein tau(MAPT)基因的突变诱发FTD并伴有帕金森综合征(FTDP-17),该突变可

通过Tau与微管结合能力降低和/或蛋白质聚集倾向增强等机制促进疾病的发生和发展<sup>[61-63]</sup>。在体外研究中大分子拥挤剂和高蛋白质浓度可促进Tau相分离,且离子强度和温度对其亦有影响<sup>[64-66]</sup>,如锌离子( $Zn^{2+}$ )会降低LLPS的Tau临界浓度<sup>[67]</sup>,而多价阴离子辅助因子如RNA或肝素等可通过带负电的聚电解质和带正电的中间/C末端Tau结构域之间的多价静电吸引产生凝聚<sup>[68-70]</sup>。

## 5 展望

从2009年线虫中P颗粒的相分离现象被报道,将相分离引入到生物学领域,至今此一新兴交叉领域的发展十分迅速。相分离的相关研究为深入理解生物体的生物学以及疾病的病理生理过程提供了新的启示。尽管如此,在相分离领域仍存在一些关键问题亟待解决。首先是目前相分离研究的技术手段仍然处于发展之中,主要依赖于体内的成像观察以及体外的理化性质评估与建模;主要的技术方法包括对相关蛋白或核酸分子荧光标记,体外组装进行荧光漂白恢复实验等。然而多数细胞内的相分离现象仍难以被直接观察捕捉到,研究这类有相分离性质的无膜细胞器在体内的精细的调控机制和动态过程,需要开发新的实验手段和表征方法。其次,生物大分子相分离作为新兴的研究领域虽然已经有了越来越多的共识,但仍需要更加统一的研究标准,其作为物理学中的基本概念也需要更多的跨学科交叉研究定义。

细胞内的相分离机制到底对于生物进程以及疾病进程有多大的影响,是否可作为某一些疾病的关键机制,仍会是未来研究的最主要科学问题之一。在疾病中相分离机制研究的最终导向是对疾病的机制理解和治疗。在明确相分离现象对于生理病理过程的影响后,如何对这一机制进行有效精准的干预是未来发展的重要问题。对于肿瘤的靶向治疗,传统的靶标大部分是具有明确活性口袋或活性位点,主要通过使用小分子占据驱动的药理学作用模式影响蛋白功能。然而有许多肿瘤的靶标如K-RAS、MYC和P53蛋白等由于缺乏可被小分子靶向的蛋白质口袋,传统上被认为是难以成药的<sup>[60]</sup>。鉴于已有研究发现一些不可成药的靶点受到相分离的调控,那么针对这类蛋白的无序区域的相分离靶点设计药物,有望成为治疗相关疾病的新型策略。如Prasad等<sup>[61]</sup>发现小分子吡啶衍生物AIM4有很强的抗TDP-43聚集作用,AIM4与TDP-43无序区的氨基酸残基结合以抑制其相分离。Dong等<sup>[62]</sup>

在SHP2突变体异常相分离现象中发现SHP2变构抑制剂ET070可将SHP2突变体锁定在特定构象以抑制其相分离。Li等<sup>[63]</sup>通过对SAS-CoV-2病毒核壳蛋白的二聚化结构域进行研究,设计出了一种特异靶向二聚化结构域的干扰肽来破坏其相分离,进而抑制病毒复制,恢复先天免疫。综上,由于相分离生物过程的高度复杂性,调节相分离的过程进而治疗疾病的分子种类也是多样的,包括小分子、抗体和人工合成肽等可以通过靶向无序区、结构域或调节变构等途径调节相分离,这对疾病的治疗也许会得到意想不到的突破。

尽管我们目前对于生物大分子相分离现象在生命过程中扮演的角色知之甚少,但我们相信随着科学家的不断探索和技术的不断进步,这一领域的进展将会真正推动疾病的机制研究和靶点的开发。

志谢:感谢课题组陆星宇硕士和李胜男博士对本文撰写的支持与协助。

## 参考文献:

- [1] SHIN Y, BRANGWYNNE C P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease[J]. *Science*, 2017, 357(6357): eaaf 4382.
- [2] BRANGWYNNE C P, ECKMANN C R, COURSON D S, et al. Germline p granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation[J]. *Science*, 2009, 324 (5935): 1729-1732.
- [3] ALBERTI S, HYMAN A A. Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22 (3): 196-213.
- [4] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(5): 285-298.
- [5] NOTT T J, PETSALAKI E, FARBER P, et al. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles[J]. *Mol Cell*, 2015, 57(5): 936-947.
- [6] DARLING A L, YUN L, OLDFIELD C J, et al. Intrinsically disordered proteome of human membrane-less organelles[J]. *Proteomics*, 2018, 18(5-6): e1700193.
- [7] TAYLOR J P, BROWN JR R H, CLEVELAND D W. Decoding ALS: From genes to mechanism[J]. *Nature*, 2016, 539(7628): 197-206.
- [8] LI P, BANJADE S, CHENG H C, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins[J]. *Nature*, 2012, 483(7389): 336-340.
- [9] ALBERTI S, GLADFELTER A, MITTAG T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates[J]. *Cell*, 2019, 176(3): 419-434.
- [10] ALBERTI S, DORMANN D. Liquid-liquid phase separation

- in disease[J]. *Annu Rev Genet*, 2019, 53: 171-194.
- [11] HOFWEBER M, HUTTEN S, BOURGEOIS B, et al. Phase separation of fus is suppressed by its nuclear import receptor and arginine methylation[J]. *Cell*, 2018, 173(3): 706-719.
- [12] QAMAR S, WANG G Z, RANDLE S J, et al. US phase separation is modulated by a molecular chaperone and methylation of arginine cation- $\pi$  interactions[J]. *Cell*, 2018, 173(3): 720-734.
- [13] KIM T H, TSANG B, VERNON R M, et al. Phospho-dependent phase separation of FMRP and CAPRIN1 recapitulates regulation of translation and deadenylation[J]. *Science*, 2019, 365(6455): 825-829.
- [14] MANNING S A, KROEGER B, HARVEY K F. The regulation of Yorkie, YAP and TAZ: New insights into the Hippo pathway [J]. *Development*, 2020, 147(8): dev179069.
- [15] SABARI B R, DALL'AGNESE A, BOIJA A, et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control[J]. *Science*, 2018, 361(6400): eaar3958.
- [16] NAIR S J, YANG L, MELUZZI D, et al. Phase separation of ligand-activated enhancers licenses cooperative chromosomal enhancer assembly[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26(3): 193-203.
- [17] SU X, DITLEV J A, HUI E, et al. Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction[J]. *Science*, 2016, 352(6285): 595-599.
- [18] BOUCHARD J J, OTERO J H, SCOTT D C, et al. Cancer mutations of the tumor suppressor spop disrupt the formation of active, phase-separated compartments[J]. *Mol Cell*, 2018, 72(1): 19-36.
- [19] HEINRICH B S, MALIGA Z, STEIN D A, et al. Phase transitions drive the formation of vesicular stomatitis virus replication compartments[J]. *mBio*, 2018, 9(5): e02290-17.
- [20] NIKOLIC J, LE BARS R, LAMA Z, et al. Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):58.
- [21] BENEDEK G B. Cataract as a protein condensation disease: the proctor lecture[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38(10): 1911-1921.
- [22] KHANAM H, ALI A, ASIF M, et al. Neurodegenerative diseases linked to misfolded proteins and their therapeutic approaches: A review[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 124: 1121-1141.
- [23] LIM J, YUE Z. Neuronal aggregates: formation, clearance, and spreading[J]. *Dev Cell*, 2015, 32(4) : 491-501.
- [24] GAN L, COOKSON M R, PETRACELLI L, et al. Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms[J]. *Nat neurosci*, 2018, 21(10): 1300-1309.
- [25] TAYLOR J P, HARDY J, FISCHBECK K H. Toxic proteins in neurodegenerative disease[J]. *Science*, 2002, 296(5575):1991-1995.
- [26] UVERSKY V N, OLDFIELD C J, DUNKER A K. Intrinsically disordered proteins in human diseases: Introducing the D2 concept[J]. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37: 215-246.
- [27] WRIGHT P E, DYSON H J. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(1): 18-29.
- [28] BOEYNAEMS S, ALBERTI S, FAWZI N L, et al. Protein phase separation: A new phase in cell biology[J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(6):420-435.
- [29] BRANGWYNNE C P. Phase transitions and size scaling of membrane-less organelles[J]. *J Cell Biol*, 2013, 203(6):875-881.
- [30] BOYKO S, SUREWICZ W K. Tau liquid-liquid phase separation in neurodegenerative diseases[J]. *Trends Cell Biol*, 2022, 32(7): 611-623.
- [31] NEUMANN M, SAMPATHU D M, KWONG L K, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Science*, 2006, 314(5796): 130-133.
- [32] PATEL A, LEE H O, JAWERTH L, et al. A liquid-to-solid phase transition of the als protein fus accelerated by disease mutation[J]. *Cell*, 2015, 162(5): 1066-1077.
- [33] MOLLIEUX A, TEMIROV J, LEE J, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization[J]. *Cell*, 2015, 163(1): 123-133.
- [34] LIN Y, PROTTER D S, ROSEN M K, et al. Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by rna-binding proteins[J]. *Mol Cell*, 2015, 60(2): 208-219.
- [35] MURAKAMI T, QAMAR S, LIN J Q, et al. ALS/FTD mutation-induced phase transition of fus liquid droplets and reversible hydrogels into irreversible hydrogels impairs rnp granule function[J]. *Neuron*, 2015, 88(4): 678-690.
- [36] HOFWEBER M, DORMANN D. Friend or foe-post-translational modifications as regulators of phase separation and RNP granule dynamics[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(18): 7137-7150.
- [37] QAMAR S, WANG G, RANDLE S J, et al. FUS phase separation is modulated by a molecular chaperone and methylation of arginine cation- $\pi$  interactions[J]. *Cell*, 2018, 173(3): 720-734.
- [38] WANG J, CHOI J M, HOLEHOUSE A S, et al. A molecular grammar governing the driving forces for phase separation of prion-like RNA binding proteins[J]. *Cell*, 2018, 174(3): 688-699.
- [39] MCGURK L, EDWARD G, GUO L, et al. Poly(ADP-ribose) prevents pathological phase separation of TDP-43 by promoting liquid demixing and stress granule localization[J]. *Mol Cell*, 2018, 71(5): 703-717.
- [40] DORMANN D, RODDE R, EDBAUER D, et al. ALS-associated fused in sarcoma (FUS) mutations disrupt T transportin-mediated nuclear import[J]. *EMBO J*, 2010, 29(16): 2841-2857.

- [41] GÖTZ J, HALLIDAY G, NISBET R M. Molecular pathogenesis of the tauopathies[J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 239-261.
- [42] KOVACS G G. Invited review: Neuropathology of tauopathies: Principles and practice[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2015, 41(1):3-23.
- [43] IQBAL K, LIU F, GONG C X. Tau and neurodegenerative disease: The story so far[J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 12(1):15-27.
- [44] BOYKO S, SUREWICZ W K. Tau liquid-liquid phase separation in neurodegenerative diseases[J]. *Trends Cell Biol*, 2022, 32(7): 611-623.
- [45] HERNÁNDEZ-VEGA A, BRAUN M, SCHARREL L, et al. Local nucleation of microtubule bundles through tubulin concentration into a condensed Tau phase[J]. *Cell Rep*, 2017, 20(10): 2304-2312.
- [46] MANDELKOW E M, MANDELKOW E. Biochemistry and cell biology of Tau protein in neurofibrillary degeneration[J]. *Cold Spring Harbor Perspect Med*, 2012, 2(7): a006247.
- [47] WANG Y, MANDELKOW E. Tau in physiology and pathology[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(1): 5-21.
- [48] ALQUEZAR C, ARYA S, KAO A W. Tau post-translational modifications: Dynamic transformers of Tau function, degradation, and aggregation[J]. *Front Neurol*, 2020, 11: 595532.
- [49] NOBLE W, HANGER D P, MILLER C C J, et al. The importance of Tau phosphorylation for neurodegenerative diseases[J]. *Front Neurol*, 2013, 4: 83.
- [50] WEGMANN S, BIERNAT J, MANDELKOW E. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2021, 69: 131-138.
- [51] BOYKO S, SUREWICZ W K. Tau liquid-liquid phase separation in neurodegenerative diseases[J]. *Trends Cell Biol*, 2022, 32(7): 611-623.
- [52] WEGMANN S, EFTEKHARZADEH B, TEPPER K, et al. Tau protein liquid-liquid phase separation can initiate Tau aggregation[J]. *EMBO J*, 2018, 37(7): e98049.
- [53] MITREA D M, KRIWACKI R W. Phase separation in biology; functional organization of a higher order[J]. *Cell Commun Signal*, 2016, 14:1.
- [54] LEE G, COWAN N, KIRSCHNER M. The primary structure and heterogeneity of Tau protein from mouse brain[J]. *Science*, 1988, 239(4837): 285-288.
- [55] AMBADIPUDI S, BIERNAT J, RIEDEL D, et al. Liquid-liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):275.
- [56] MAZIUK B F, APICCO D J, CRUZ A L, et al. RNA binding proteins co-localize with small Tau inclusions in tauopathy[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2018, 6(1):71.
- [57] VANDERWEYDE T, APICCO D J, YOUMANS-KIDDER K, et al. Interaction of Tau with the RNA-binding protein TIA1 regulates Tau pathophysiology and toxicity[J]. *Cell Rep*, 2016, 15(7):1455-1466.
- [58] VANDERWEYDE T, YU H, VARNUM M, et al. Contrasting pathology of the stress granule proteins TIA-1 and G3BP in tauopathies[J]. *Neurosci*, 2012, 32(24): 8270-8283.
- [59] HOOVER B R, REED M N, SU J, et al. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration[J]. *Neuron*, 2010, 68(6): 1067-1081.
- [60] WANG W, CHEN Y, XU A, et al. Protein phase separation: A novel therapy for cancer?[J]. *Br J Pharmacol*, 2020, 177(22): 5008-5030.
- [61] PRASAD A, BHARATHI V, SIVALINGAM V, et al. Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12:25.
- [62] DONG L, HAN D, MENG X, et al. Activating mutation of SHP2 establishes a tumorigenic phenotype through cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 630712.
- [63] LI Y, LU S, GU J, et al. SARS-CoV-2 impairs the disassembly of stress granules and promotes ALS-associated amyloid aggregation[J]. *Protein Cell*, 2022, 13(8): 602-614.
- [64] BOYKO S, SUREWICZ K, SUREWICZ W K. Regulatory mechanisms of Tau protein fibrillation under the conditions of liquid-liquid phase separation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(50): 31882-31890.
- [65] KANAAN N M, HAMEL C, GRABINSKI T, et al. Liquid-liquid phase separation induces pathogenic Tau conformations in vitro[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2809.
- [66] FERREON J C, JAIN A, CHOI K J, et al. Acetylation disfavors tau phase separation[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5): 1360.
- [67] ZHANG X, LIN Y, ESCHMANN N A, et al. RNA stores Tau reversibly in complex coacervates[J]. *PLoS Biol*, 2017, 15(7): e2002183.
- [68] UKMAR-GODEC T, HUTTEN S, GRIESHOP M P, et al. Lysine/RNA-interactions drive and regulate biomolecular condensation[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2909.
- [69] LIN Y, FICHOY Y, ZENG Z, et al. Electrostatically driven complex coacervation and amyloid aggregation of Tau are independent processes with overlapping conditions[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2020, 11(4): 615-627.
- [70] SINGH V, XU L, BOYKO S, et al. Zinc promotes liquid-liquid phase separation of Tau protein[J]. *Biol Chem*, 2020, 295(18): 5850-5856.