

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.048

双分子荧光互补技术在神经系统变性疾病蛋白质寡聚化研究中的应用

范红波¹ 陈军芳¹ 许杰¹ 肖严¹ 黄欣媛^{2,△}

(1 湖北职业技术学院 湖北 孝感 432000; 2 湖北工程学院生命科学技术学院 湖北 孝感 432000)

摘要: 神经系统变性疾病(ND)的病理特征是蛋白质聚集在细胞内或细胞外形成异常的堆积体而导致神经毒性。双分子荧光互补技术(BiFC)是研究 ND 相关蛋白质寡聚化分子机制的重要工具。与其他技术不同的是, BiFC 不但可以在生理环境中对蛋白质-蛋白质之间的相互作用进行可视化检测, 而且能够提供详细的亚细胞定位信息。本文通过综述 BiFC 技术的原理、优缺点及其在 ND 研究领域中的应用进展, 探讨该技术对揭示寡聚体和包涵体形成原因方面的潜力, 为神经系统疾病开发新的治疗策略提供重要参考。

关键词: 双分子荧光互补; 神经变性疾病; 蛋白质寡聚化; 寡聚体

中图分类号: Q593.2; Q-33; R741.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)02-388-03

Bimolecular Fluorescence Complementation Method for the Study of Protein Oligomerization in Neurodegenerative Diseases

FAN Hong-bo¹, CHEN Jun-fang¹, XU Jie¹, XIAO Yan¹, HUANG Xin-yuan^{2,△}

(1 Hubei Polytechnic Institute, Xiaogan, Hubei, 432000, China;

2 College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan, Hubei, 432000, China)

ABSTRACT: Neurodegenerative diseases (ND) are characterized by the aberrant accumulation of misfolded and aggregated proteins inside or outside the cells which would lead to the neurotoxicity. It is proved that the bimolecular fluorescence complementation assay (BiFC) might be an excellent method of exploring the aberrant protein-protein interactions (PPI) that involved in ND. BiFC could provide detailed information for the subcellular localization of the PPI and can be carried out in a physiological environment which is different from other techniques. This review focused on the application and progression of BiFC in the field of ND by analyzing the formation of the characteristic oligomeric species, advantages and disadvantages and inclusion bodies in order to make some references for the treatment of ND.

Key words: Bimolecular fluorescence complementation assays (BiFC); Neurodegenerative diseases (ND); Protein oligomerization; Oligomeric species

Chinese Library Classification(CLC): Q593.2; Q-33; R741.02 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)02-388-03

细胞中的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interactions, PPI)决定着细胞的命运,许多疾病都与异常的 PPI 有关。神经系统变性疾病(neurodegenerative diseases, ND),如阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)、帕金森病(Parkinson disease, PD)、亨廷顿病(Huntington disease, HD)、脊髓小脑性共济失调(spino-cerebellar ataxia)等,它们的共同病理特征是细胞质、细胞核或细胞外出现大量蛋白质包涵体。这些包涵体由错误折叠的蛋白质聚集而成,最终形成不溶性的核或胞质淀粉样蛋白沉积物。在 ND 中, PPI 的类型和发生位置的改变可以促成蛋白质包涵体的形成,这一过程涉及多种多样的蛋白质,但却遵循类似的途径。因此,研究参与形成特征性包涵体的 PPI 对于理解 ND 发病的分子途径非常重要。双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)是新近开发出的一种研究活细胞中 PPI 的技术,它在 ND 病理过程中蛋白质寡聚化的分

子机制研究中发挥重要作用^[1]。

1 ND 中的蛋白质聚集和细胞毒性

ND 发病机制中广泛接受的“淀粉样蛋白假说(amyloid hypothesis)”认为:蛋白质错误折叠和聚集成有序的纤维状结构,引发异常 PPI,进而造成神经功能损伤^[2]。当蛋白质不具有正常的功能性结构时,就不能有效地被分子伴侣检测到,也不能被泛素-蛋白酶体系降解,因而发生异常和有害的相互作用。在这时,异常蛋白质一般可自发形成稳定富含 β -折叠的不溶性淀粉样蛋白沉积物,这一过程中产生一些被称为“寡聚体(oligomeric species)”的小一些的可溶性的蛋白聚合物,它们是形成淀粉样蛋白原纤维的前体,或是淀粉样蛋白形成级联途径所产生的中间体^[3]。研究表明,可溶性的淀粉样蛋白寡聚体很可能是主要的致病性结构,而不是成熟的淀粉样蛋白原纤维。不同 ND 中的淀粉样蛋白寡聚体都能穿透细胞膜和脂双分子层,使细胞出现功能异常或死亡,这可能是它们共同的和主要的细胞毒性作用^[4]。而疾病特异性蛋白的致病机理可能在于在上游途径中增加错误折叠的、潜在的淀粉样蛋白的量。

作者简介:范红波(1978-),男,硕士,助教,主要研究方向:临床医学, E-mail: lieslh@163.com

△通讯作者:黄欣媛, E-mail: huangxy5885@163.com

(收稿日期:2014-03-04 接受日期:2014-03-28)

已有很多研究来探索不同 ND 中蛋白质聚集的原因,虽然老化、蛋白酶体和线粒体功能异常和氧化应激等因素可促进 ND 发病^[5,6],导致形成寡聚体的异常 PPI,才是造成细胞毒性的最关键因素^[7]。现已发现基因突变、基因含量增加、翻译后修饰等因素与蛋白质聚集有关^[8],但是其中涉及的确切的分子细节仍然知之甚少。在多种 ND 疾病模型,如细胞培养物、果蝇和小鼠中有大的包涵体形成的现象早有报道^[9],然而直接在活细胞中检测包涵体形成前的寡聚体和原纤维体是近期才实现的^[10],这主要归功于 BiFC 技术的应用。

2 双分子荧光互补技术

双分子荧光互补技术(BiFC)诞生于 2002 年^[11],最初用于研究碱性亮氨酸拉链(bZIP)和 Rel 家族转录因子在 COS-1 细胞中的相互作用,后来经过不断发展,被成功应用到多种模式生物中,如哺乳动物细胞系、植物、线虫、酵母和细菌。同免疫共沉淀、蛋白质芯片等体外研究技术相比,BiFC 检测的是细胞环境中的 PPI,更能反映出蛋白质的生理功能^[12]。

2.1 BiFC 的原理

BiFC 将荧光蛋白拆分成两个没有功能的片段,分别和两个待检测的目标蛋白质融合,表达于同一个细胞中,若目标蛋白质之间有 PPI,就会带动两个片段互相靠近,两者互补折叠成准天然构象,从而重建出荧光蛋白活性。结合荧光共聚焦显微技术,就可以对 PPI 形成的蛋白聚合体进行检测和亚细胞定位^[13]。荧光信号强度反映出聚合体数量和结构信息,若 PPI 的调节因素存在,那么信号就会发生变化,这是 BiFC 作为筛选调节 PPI 的药物分子的依据。

2.2 BiFC 的优缺点

BiFC 主要有三个优点:(1)选择性强。荧光信号只能由两个蛋白片段在互补时生成,因而融合蛋白不需要过高的表达量,接近生理水平即可。(2)简洁直观。荧光复合物可以直接在活细胞中观测到,不需使用外源试剂来染色,对图像数据的后处理也很少。(3)灵敏度高。两个片段重建出完整荧光蛋白活性的过程是不可逆的,可对目标 PPI 起稳定化作用,因而特别适用于检测微弱和瞬时的相互作用。这在 ND 研究中是一个突出的优点,因为目标二聚/寡聚体可能是蛋白质聚集过程中产生的一些瞬时的中间体。

然而,荧光基团需要约 10-30 min 来成熟才能发光,因而 BiFC 不适用于对 PPI 进行严格意义上的实时监测。

2.3 BiFC 的报告蛋白

BiFC 常用的荧光报告蛋白有绿色、青色、黄色和红色荧光蛋白(GFP、CFP、YFP 和 RFP)^[14]等。最早使用的 GFP 需要 30℃ 预孵化,后来开发出一些改进的荧光蛋白,如 cerulean、Venus 以及 sfGFP^[15],其荧光基团在 37℃ 成熟,这点对于在哺乳动物细胞模型中研究 ND 特别有利。

多色 BiFC 技术同时使用具有不同发射光谱的荧光蛋白,在一次实验中可对多对 PPI 进行可视化^[16],可用于评估蛋白复合体的结合效率、分析 PPI 的调控因素、以及观测多蛋白复合体的动态变化。

2.4 BiFC 和其他技术联用

BiFC 能够在活细胞中显示出蛋白聚集体,但不能在视觉上区分出是二聚体还是寡聚体或其它聚合程度更高的聚合物。为了辨别它们,BiFC 技术可以和其它技术联用,如 SDS-PAGE^[17]、免疫沉淀^[17]、流式细胞术^[18]、FRET^[19]和 BRET^[20]等。这些联合技术能提供蛋白聚集体的化学计量组成信息,如 Gandia 等^[20]利用 BiFC-BRET 技术揭示出 G 蛋白偶联腺苷受体 A2A 寡聚物含有两个以上的原聚体。

3 BiFC 在神经变性疾病中的应用

ND 中异常的 PPI 是由蛋白质错误折叠和聚合引起,因此 ND 也被称为蛋白性疾病(proteinopathies)。尽管很多体外研究表明淀粉样蛋白假说是 ND 的主要发病机制,活细胞中蛋白质错误折叠和随后聚集的原因和分子机制目前仍不清楚。BiFC 技术在这一研究领域发挥出很大作用,是研究 ND 相关蛋白寡聚化过程的有力工具。

3.1 BiFC 在阿尔兹海默病研究中的应用

阿尔兹海默病(AD)是常见的一种因老化而造成的痴呆症,患者大脑出现严重的进行性神经元损失。AD 的病理特征是细胞外出现淀粉样蛋白斑块,斑块主要由 β -淀粉样肽(β -amyloid peptide, A β)和神经原纤维缠结组成^[21]。

AD 淀粉样蛋白斑块中的神经原纤维缠结主要由过度磷酸化的 tau 蛋白聚集而成,一些蛋白如 CHIP 可以调节 tau 的聚集^[22]。Chun 等^[23]开发出基于 GFP 的 BiFC 来定量检测 tau 蛋白在细胞内的聚集。他们将 GFP11 片段和 tau 融合,在细胞中和另一片段 GFP1-10 共表达,GFP 因此重建而发出荧光,可用荧光显微镜或光度仪进行检测或定量。预计此方法将成为研究 tau 装配过程及其调节因素的有力工具。

淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)是 A β 的前体,家族性 AD 患者体内 A β 水平升高致使发病提前,患者的 APP 基因在 GxxxG 和 GxxxA 二聚化结构域附近有突变。So 等^[24]使用 BiFC 结合流式细胞术定量测量了突变 APP 和野生型 APP 的二聚化作用,发现两者没有显著差别,说明突变不会影响到 APP 的二聚化,因而推测家族性 AD 患者 A β 水平的改变更可能是由于突变影响了 APP 的蛋白酶解加工途径所致。Oh 小组^[25,26]利用 BiFC 揭示 APP 和跨膜受体 NOTCH2(N2)相互作用的细节,不仅在活细胞中对 APP 二聚体和 APP-N2 异二聚体进行了可视化,而且显示这些相互作用发生在内质网、高尔基体和质膜上^[25]。此外,在早老素缺失的成纤维细胞中 APP-N2 相互作用依然存在,表明两者相互作用是早老素非依赖性的^[26]。这些例子证明 BiFC 在 AD 病因研究中是非常有价值的,不仅可以定量测定聚合物,识别相互作用配体,还可作为亚细胞定位研究的工具。

3.2 BiFC 在帕金森病研究中的应用

帕金森病(PD)的病理特征是黑质中的多巴胺能神经元发展出进行性损失,剩余神经元中出现被称为 Lewy 小体的胞浆包涵体。虽然多巴胺摄取疗法是研究热点,目前还没有能有效阻断 PD 进展的治疗方法^[27]。

α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)是 Lewy 小体的主要成分。野生型和突变型 α -syn 的错误折叠、寡聚化和纤维化在 PD

病理进展中起关键作用。 α -syn 纤维化过程中形成的单体或聚合体形式的各种中间体对细胞都有毒性,揭示这些中间体形成的分子机制是引人入胜的研究领域。BiFC 技术可以直接对活细胞中 α -syn 的寡聚化进行显像,荧光信号强度的变化还可用于研究调节 α -syn 聚合的因素,例如,发现将 α -syn 寡聚体稳定化导致细胞毒性增强,而 HSP70 以及格尔德霉素(HSP90 的抑制剂)则通过减少 α -syn 寡聚体的形成来降低这种毒性^[10,28]。此外,BiFC 技术还鉴定出 CHIP、NBB 衍生物和铁离子也能特异性抑制 α -syn 的寡聚化^[17,29]。这些研究可为开发针对阻断 α -syn 寡聚化的治疗药物提供指导,而 BiFC 则可作为来筛选和鉴定这些调节剂的工具。

Vidi 等^[30]用多色 BiFC 研究多巴胺 D2 和腺苷 A2A 受体的寡聚化以及一些神经系统调节药物对此造成的影响。发现用 D2 激动剂哌罗刺激后,A2A-D2 异二聚体减少了,而用 D2 拮抗剂螺哌隆或 A2A 激动剂 MECA 处理后则产生相反效果。因此提出长期接触药物可能导致 A2A-D2 受体寡聚化的改变。

3.3 BiFC 多聚谷氨酰胺病研究中的应用

多聚谷氨酰胺(polyQ)病包含 HD 和 6 个不同类型的脊髓小脑性共济失调,其特点是不同基因中的 CAG 束扩增,导致相应的蛋白质中含有过量的串联谷氨酰胺,它们在细胞核和 / 或细胞质中错误折叠和聚合,造成蛋白质正常功能受损,产生细胞毒性^[31]。在 HD 患者不同脑区分布的核聚集体的核心是由突变的 HTT 蛋白形成,聚集体周围环绕着 HTT、TATA 结合蛋白、CREB 结合蛋白、HSP70 以及一些其他的 polyQ 相互作用蛋白^[32]。因此,BiFC 可用于研究这些 PPI,为 HTT 聚集和毒性作用的分子机制研究提供新的重要线索。如 Herrera 等^[33]发现细胞内 HTT 和 α -syn 共聚集, α -syn 调节 HTT 的寡聚化,增加含 HTT 寡聚体的细胞数量,减少每个细胞中寡聚体的数目但是加大平均尺寸。这一研究表明各类 ND 中的关键致病蛋白之间能够共聚合并互相影响,共同推动神经变性的病理进程。

4 小结与展望

ND 中相关蛋白聚集沉积是其发病原因的关键,这些过程能够诱发异常的 PPI,扰乱多种生物学过程,最终导致神经元损伤。然而蛋白聚集体形成的分子机制仍不清楚。ND 治疗的主要限制是通常在非常后的病理阶段才确诊,此时已经发生了神经细胞重大和不可逆转的损失。普遍观点认为蛋白聚合过程中产生的中间二聚或寡聚物可能比最终聚合而成的蛋白包涵体的毒性更大,因此,研究二聚 / 寡聚化机制对开发新的 ND 早期诊断和治疗策略至关重要。BiFC 技术在这一领域已逐渐显现出巨大价值和潜力,可作为一种常规技术的有力补充,因为 BiFC 除了对聚合体进行可视化显像外,还能提供精细的亚细胞定位信息,以及对影响 PPI 的因素进行量化分析,为进行更有针对性的药物筛选提供指导。随着技术的进步,尤其是荧光报告蛋白的不断改进,BiFC 也将不断发展,可以预计,BiFC 的应用将为研发新的 ND 干预治疗方案做出重要贡献。

参考文献(References)

[1] Herrera F, Goncalves S, Outeiro TF. Imaging protein oligomerization in neurodegeneration using bimolecular fluorescence complementation[J]. *Methods Enzymol*, 2012, 506: 157-174

[2] Bandopadhyay R, de Bellerche J. Pathogenesis of Parkinson's disease: emerging role of molecular chaperones[J]. *Trends Mol Med*, 2010, 16(1): 27-36

[3] Pedersen JT, Heegaard NH. Analysis of protein aggregation in neurodegenerative disease[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(9): 4215-4227

[4] Glabe CG. Common mechanisms of amyloid oligomer pathogenesis in degenerative disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2006, 27(4): 570-575

[5] Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(7): 643-650

[6] Gubellini P, Picconi B, Di Filippo M, et al. Downstream mechanisms triggered by mitochondrial dysfunction in the basal ganglia: from experimental models to neurodegenerative diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(1): 151-161

[7] Fandrich M. Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity[J]. *J Mol Biol*, 2012, 421(4-5): 427-440

[8] Janer A, Werner A, Takahashi-Fujigasaki J, et al. SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7 [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(1): 181-195

[9] Feany MB, Bender WW. A Drosophila model of Parkinson's disease [J]. *Nature*, 2000, 404(6776): 394-398

[10] Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE, et al. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells [J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e1867

[11] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. *Mol Cell*, 2002, 9(4): 789-798

[12] Kodama Y, Hu CD. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): a 5-year update and future perspectives [J]. *Biotechniques*, 2012, 53(5): 285-298

[13] Kerppola TK. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells[J]. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37: 465-487

[14] Ventura S. Bimolecular fluorescence complementation: illuminating cellular protein interactions[J]. *Curr Mol Med*, 2011, 11(7): 582-598

[15] Zhou J, Lin J, Zhou C, et al. An improved bimolecular fluorescence complementation tool based on superfolder green fluorescent protein [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2011, 43(3): 239-244

[16] Gehl C, Waadt R, Kudla J, et al. New GATEWAY vectors for high throughput analyses of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation[J]. *Mol Plant*, 2009, 2(5): 1051-1058

[17] Tetzlaff JE, Putcha P, Outeiro TF, et al. CHIP targets toxic alpha-Synuclein oligomers for degradation [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(26): 17962-17968

[18] Berendzen KW, Bohmer M, Wallmeroth N, et al. Screening for in planta protein-protein interactions combining bimolecular fluorescence complementation with flow cytometry [J]. *Plant Methods*, 2012, 8(1): 25

[19] Shyu YJ, Suarez CD, Hu CD. Visualization of ternary complexes in living cells by using a BiFC-based FRET assay[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(11): 1693-1702

- mesenchymal cadherin-mediated regulation of cell motility and invasiveness[J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(7): 1087-1096
- [5] van Hengel J, Vanhoenacker P, Staes K, et al. Nuclear localization of the p120 (ctn) Armadillo-like catenin is counteracted by a nuclear export signal and by E-cadherin expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(14): 7980-7985
- [6] Fukumoto Y, Shintani Y, Reynolds A B, et al. The regulatory or phosphorylation domain of p120 catenin controls E-cadherin dynamics at the plasma membrane [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314(1): 52-67
- [7] Soto E, Yanagisawa M, Marlow L A, et al. p120 catenin induces opposing effects on tumor cell growth depending on E-cadherin expression[J]. *J Cell Biol*, 2008, 183(4): 737-749
- [8] Miyashita Y, Ozawa M. A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs beta-catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 24): 4395-4406
- [9] Ishiyama N, Lee S H, Liu S, et al. Dynamic and static interactions between p120 catenin and E-cadherin regulate the stability of cell-cell adhesion[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 117-128
- [10] Miyashita Y, Ozawa M. Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 11540-11548
- [11] Stairs D B, Bayne L J, Rhoades B, et al. Deletion of p120-catenin results in a tumor microenvironment with inflammation and cancer that establishes it as a tumor suppressor gene [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 470-483
- [12] Fang X, Ji H, Kim S W, et al. Vertebrate development requires ARVCF and p120 catenins and their interplay with RhoA and Rac[J]. *J Cell Biol*, 2004, 165(1): 87-98
- [13] Elia L P, Yamamoto M, Zang K, et al. p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins[J]. *Neuron*, 2006, 51(1): 43-56
- [14] Wood L D, Parsons D W, Jones S, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers [J]. *Science*, 2007, 318(5853): 1108-1113
- [15] Ireton R C, Davis M A, van Hengel J, et al. A novel role for p120 catenin in E-cadherin function[J]. *J Cell Biol*, 2002, 159(3): 465-476
- [16] Davis M A, Ireton R C, Reynolds A B. A core function for p120-catenin in cadherin turnover[J]. *J Cell Biol*, 2003, 163(3): 525-534
- [17] Mortazavi F, An J, Dubinett S, et al. p120-catenin is transcriptionally downregulated by FOXC2 in non-small cell lung cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(5): 762-774
- [18] Hamada S, Satoh K, Miura S, et al. miR-197 induces epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells by targeting p120 catenin[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(6): 1255-1263
- [19] Oas R G, Xiao K, Summers S, et al. p120-Catenin is required for mouse vascular development[J]. *Circ Res*, 2010, 106(5): 941-951
- [20] Davis M A, Reynolds A B. Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland[J]. *Dev Cell*, 2006, 10(1): 21-31

(上接第 390 页)

- [20] Gandia J, Galino J, Amaral OB, et al. Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(20): 2979-2984
- [21] Gilbert BJ. The role of amyloid beta in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(5): 362-366
- [22] Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, et al. In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation [J]. *J Neurochem*, 2005, 94(5): 1254-1263
- [23] Chun W, Waldo GS, Johnson GV. Split GFP complementation assay for quantitative measurement of tau aggregation in situ [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 670: 109-123
- [24] So PP, Khodr CE, Chen CD, et al. Comparable dimerization found in wildtype and familial Alzheimer's disease amyloid precursor protein mutants[J]. *Am J Neurodegener Dis*, 2013, 2(1): 15-28
- [25] Chen CD, Oh SY, Hinman JD, et al. Visualization of APP dimerization and APP-Notch2 heterodimerization in living cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. *J Neurochem*, 2006, 97(1): 30-43
- [26] Oh SY, Chen CD, Abraham CR. Cell-type dependent modulation of Notch signaling by the amyloid precursor protein [J]. *J Neurochem*, 2010, 113(1): 262-274
- [27] Gazewood JD, Richards DR, Clebak K. Parkinson disease: an update [J]. *Am Fam Physician*, 2013, 87(4): 267-273
- [28] Putcha P, Danzer KM, Kranich LR, et al. Brain-permeable small-molecule inhibitors of Hsp90 prevent alpha-synuclein oligomer formation and rescue alpha-synuclein-induced toxicity[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332(3): 849-857
- [29] Hillmer AS, Putcha P, Levin J, et al. Converse modulation of toxic alpha-synuclein oligomers in living cells by N'-benzylidene-benzohydrazide derivatives and ferric iron [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 461-466
- [30] Vidi PA, Chemel BR, Hu CD, et al. Ligand-dependent oligomerization of dopamine D (2) and adenosine A (2A) receptors in living neuronal cells[J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 74(3): 544-551
- [31] Bauer PO, Nukina N. The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies[J]. *J Neurochem*, 2009, 110(6): 1737-1765
- [32] Margulis BA, Vigont V, Lazarev VF, et al. Pharmacological protein targets in polyglutamine diseases: mutant polypeptides and their interactors[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(13): 1997-2007
- [33] Herrera F, Outeiro TF. alpha-Synuclein modifies huntingtin aggregation in living cells[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(1): 7-12