

Received: 2008.02.19
Accepted: 2008.05.13
Published: 2008.06.20

Wielofunkcyjność białka CHIP w systemie kontroli jakości białek

The multifunctionality of CHIP protein in the protein quality-control system

Robert Lenartowski, Krzysztof Gumowski, Anna Goc

Uniwersytet Mikołaja Kopernika

Streszczenie

Wybiórcza degradacja białek jest procesem ściśle powiązanym z komórkowym systemem kontroli ich jakości. CHIP (carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein), białko o właściwościach ligazy ubikwitylowej E3 oraz koczaperonu, odgrywa główną rolę w integracji czaperonowych, proteasomowych i lizosomalnych składowych mechanizmu kontrolnego. W niniejszej pracy skupiono się na molekularnej charakterystyce białka CHIP, mechanizmie jego działania, roli w metabolizmie komórkowym oraz powiązaniu dysfunkcji ligazy z procesem neurodegeneracji.

Słowa kluczowe:

CHIP • ligaza E3 • system kontroli jakości białek • ubikwitylacja

Summary

Selective protein degradation depends on their quality being controlled by the cellular system, which includes chaperones involved in protein folding and two degradation systems, the proteasomal and lysosomal. CHIP (carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein), an E3 ubiquitin ligase and co-chaperone, serves as a chaperone-degradation system interface. This article reviews the molecular characteristics of CHIP protein, the mechanism of its action, and its role in cellular metabolism and discusses how CHIP dysfunction may lead to neurodegenerative diseases.

Key words:

CHIP • E3 ligase • protein quality-control system • ubiquitination

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=861861>

Word count: 7446

Tables: –

Figures: –

References: 53

Adres autora:

dr Robert Lenartowski, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Genetyki, ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń; e-mail: rlenart@umk.pl

Wykaz skrótów:

ER – receptor estrogenu; siRNA – małe interferujące RNA; AR – receptor androgenów; SBMA – rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni; PD – choroba Parkinsona; Hsp/Hsc – białka szoku cieplnego; CFTR – kanał jonowy, którego defekty wywołują mukowiscydozę

WSTĘP

Utrzymanie homeostazy komórkowej warunkuje poprawne działanie mechanizmu wybiórczej degradacji białek, w którym każdy peptyd zostaje wielokrotnie poddawany procesowi kontroli jakości. Sprawny przebieg procesu kontrolnego jest wynikiem aktywności enzymatycznej dwóch systemów – czaperonowego oraz proteasomowego. W pierwszym z wymienionych systemów czaperony nadają niesfałdowanym bądź niepoprawnie sfałdowanym peptydom, ekspozującym na powierzchni hydrofobowe reszty aminokwasowe, odpowiednią konformację przestrzenną. Białka o odtworzonym prawidłowym układzie swych domen zostają uwolnione z kompleksu białek opiekuńczych wzbogacając pulę poprawnie zbudowanych białek komórki. Peptydy o zaburzonej strukturze stają się substratami ligaz ubikwitylowych E3/E4, będących częścią składową drugiego systemu – proteasomowego, przyłączających do ich sekwencji łańcuch złożony z ubikwityn. Modyfikacja jest związana z przeniesieniem peptydu na proteasom, gdzie ulega on degradacji. Mechanizm molekularny decydujący o fałdowaniu lub skierowaniu białka na drogę proteolitycznej degradacji pozostaje wciąż mało poznany. Wydaje się, że podstawą tego mechanizmu jest stan dynamicznej równowagi aktywności systemu proteasomowego i czaperonowego. Odkrycie białek o właściwościach enzymów ubikwitylujących oraz właściwościach koczaperonowych sprawiło, że to właśnie im przypisano rolę integrującą działanie obu systemów. Należy do nich białko CHIP, ligaza ubikwitylowa z rodziny U-box. Obecność w jego cząsteczce domeny umożliwiającej interakcje z czaperonami oraz domeny o aktywności ligazy ubikwitylowej E3 sprawia, że CHIP jest doskonałym przykładem swoistego „przełącznika molekularnego” w procesie fałdowania/degradacji peptydu. Stwierdzono ponadto, że zaburzenia jego funkcji prowadzą do pojawiania się chorób neurodegeneracyjnych.

W pracy zebrano wyniki badań, wskazujące na istotną rolę białka CHIP w procesie fałdowania białek oraz ich degradacji, jak i wpływu ligazy na metabolizm komórkowy. Wyniki zebranych badań zdają się sugerować potencjalne możliwości zastosowania tego enzymu w terapii chorób neurodegeneracyjnych.

1. GEN *CHIP*

Przeszukanie biblioteki cDNA serca człowieka sondą komplementarną do sekwencji domeny TPR (tetratricopeptide repeat) ludzkiego białka Cyp-40 umożliwiło odnalezienie, a następnie sklonowanie sekwencji genu *CHIP*. Domena TPR jest motywem strukturalnym spotykanym w białkach U-box, pośredniczącym w oddziaływaniach białko-białko [7].

Ligazę *CHIP* człowieka koduje gen o długości 2653 pz, znajdujący się na krótkim ramieniu chromosomu 16, w *locus* 13.3. Gen buduje 7 eksonów oraz odpowiadająca im liczba intronów (GeneID: 10273). Produkt genu *CHIP* jest obecny niemal we wszystkich komórkach organizmu ludzkiego. Najwyższy poziom jego ekspresji stwierdzono w tkance nerwowej oraz w mięśniach poprzecznie prążkowanych. Ponadto transkrypt *CHIP* wykryto w trzustce, płucach, wątrobie oraz nerkach. Jego homologi odnajdywane są w organizmach odległych filogenetycznie, takich jak mysz, muszka owocowa, czy rzodkiewnik.

2. BUDOWA ORAZ WŁAŚCIWOŚCI ENZYMU *CHIP*

Ludzkie białko *CHIP* jest dimerem o masie cząsteczkowej 70 kDa, którego monomer jest zbudowany z 303 reszt aminokwasowych [7]. W sekwencji aminokwasowej białka zmapowano kilka funkcjonalnych domen, w tym położoną na jego N-końcu domenę zawierającą trzy powtórzenia zbudowane z 34 reszt aminokwasowych – domenę TPR (tetratricopeptide repeat) [53]. Wyniki doświadczeń Ballingera i wsp. dowodzą, że TPR jest odpowiedzialna za oddziaływanie z domenami akceptorowymi białek czaperonowych Hsc/Hsp70 i Hsp90, umiejscowionymi na ich końcach karboksylowych [7]. Reszty aminokwasowe domeny TPR krytyczne dla interakcji *CHIP* z białkami HSP są zachowane w toku ewolucji [44]. Do oddziaływań *CHIP* z białkami z rodziny HSP niezbędna jest również środkowa silnie naładowana część polipeptydu [53]. Mutanty pozbawione domeny TPR i/lub części naładowanego regionu nie były zdolne do takich oddziaływań [7]. W środkowym regionie ligazy zmapowano domenę coiled coil odpowiedzialną za proces dimeryzacji białek. Wyniki doświadczeń, w których sprzęgano peptydy pełnej długości oraz pozbawione motywu coiled coil, dokumentowały, że domena ta jest zaangażowana w dimeryzację białka *CHIP* [37]. Na karboksylowym końcu białka *CHIP*, konserwowanym rejonie peptydu, znajduje się domena U-box. Analiza sekwencji aminokwasowej wykazała, że domena U-box jest domeną homologiczną do domeny RING finger, zarówno pod względem strukturalnym, jak i funkcjonalnym. Konserwowane hydrofobowe reszty aminokwasowe są odpowiedzialne za interakcję domeny U-box z enzymami E2 koniugującymi ubikwitynę [5]. Funkcjonalna cząsteczka ligazy *CHIP* w obecności enzymów klasy E1, E2 oraz ubikwityny katalizowała tworzenie koniugatów ubikwitylowych, podczas gdy fragment białka *CHIP* pozbawiony domeny U-box lub z substytucją konserwowanej w pozycji 270 U-box proliny nie wykazywał takiej aktywności [20]. Według Aravind i Koonin ligazy U-box nie tworzą wysokoenergetycznego wiązania tioestrowego z ubikwityną, lecz stanowią łącznik pomiędzy enzymem koniugującym i substratem [5]. Umożliwiają w ten sposób transfer ubikwityny z enzymu E2 na białko rozpoznane przez kompleks ubikwitylujący, którego składnikiem jest *CHIP*.

W trakcie procesu ubikwitylacji domena U-box współdziała z innymi domenami białka *CHIP*. Zaobserwowano, że białko pozbawione domeny dimeryzacyjnej traciło jednocześnie aktywność ligazy. Przywrócenie właściwości ligazy E3 wiązało się z wydłużeniem sekwencji peptydu tak, by obejmował sekwencję coiled coil. Obserwacje te sugerują, że aktywną postacią enzymu *CHIP* jest jedynie homodimer [37].

3. CHARAKTERYSTYKA FUNKcjONALNA BIAŁKA *CHIP*

Ligaza *CHIP* wykazuje bardzo szeroki zakres działania w porównaniu z innymi ligazami ubikwitylowymi E3 [24,27]. *CHIP* rozpoznaje samodzielnie część swoich substratów, w tym substraty нефизjologiczne, takie jak lucyferaza [31,32,40]. Aby wyjaśnić zdolność białka *CHIP* do rozpoznawania tak wielu substratów należy zwrócić uwagę, że w eksperymentach *in vitro* dodanie do próby białek czaperonowych Hsp90 lub Hsp70 wraz z Hsp40 (Hsp40 ułatwia załadowanie niepoprawnie sfałdowanych pepty-



dów na Hsp70) znacznie zwiększało poziom ubikwylacji substratu [32,36,40]. Część wyników wręcz wskazuje, że w odtworzonych systemach ubikwylujących, białka opiekuńcze są najważniejszym elementem umożliwiającym zajście reakcji. CHIP tworzy bowiem kompleks z ubikwylowanym białkiem głównie za pośrednictwem członków rodziny HSP [36]. Dalszych dowodów dokumentujących ten pogląd dostarczyły badania nad wpływem ligazy CHIP na modelowe substraty białek Hsp70 i Hsp90, którymi są CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) oraz receptor glikokortykoidów. W obu przypadkach współdziałanie ligazy z rodziną białek HSP w trakcie procesu ubikwitynozależnej degradacji białek odbywało się przez domenę TPR [11,34]. Wyniki powyższych eksperymentów pozwoliły na postawienie tezy, że CHIP jest enzymem ubikwylującym, a także umożliwiły poznanie mechanizmów pozwalających ligazie na degradację różnorodnych substratów. Nie tłumaczyły jednak, w jaki sposób białko CHIP oddziałuje na maszynę czaperonową tak, że ta staje się integralnym składnikiem systemu proteolitycznej degradacji białek. Ballinger i wsp. zbadali wzajemne relacje białka CHIP z białkiem Hsc70 oraz jego postacią Hsp70 podlegającą ekspresji w warunkach stresowych [7]. Fizjologiczną funkcją Hsc70 jest promowanie poprawnej konformacji nowo syntetyzowanych polipeptydów, natomiast Hsp70 zapobiega agregacji i renaturuje uszkodzone białka. Oba czaperony współdziałają z białkiem Hsp40, które ułatwia przyłączenie peptydu do kompleksu Hsc/Hsp70 [21]. W doświadczeniach ubikwylacji *in vitro* białek rodanazy oraz lucyferazy, do znacznego obniżenia aktywności renaturującej kompleksu Hsc/Hsp70-Hsp40 dochodziło jedynie w obecności ligazy CHIP. W tym kontekście pojawia się pytanie, w którym momencie reakcji dochodzi do zaburzenia procesu renaturacji katalizowanego przez białka Hsc/Hsp70? Badania funkcjonalne domeny ATP-azowej białek czaperonowych w kompleksie z ligazą CHIP wykazały, że białko to nie wpływa na wiązanie, hydrolizę, ani uwalnianie nukleotydów z centrum aktywnego czaperonów. Wysunięto więc wniosek, że CHIP hamuje kaskadę wydarzeń następującą po związaniu substratu przez Hsc/Hsp70, obniżając powinowactwo kompleksu czaperonów do denaturowanego peptydu [7].

Ligaza CHIP może wypełniać swą funkcję niezależnie od interakcji z białkiem Hsp70. CHIP moduluje aktywność białka opiekuńczego Hsp90, będącego jednym ze składników kompleksów remodulujących strukturę białek. Za bezpośrednie interakcje CHIP z Hsp90, i innych białek HSP, odpowiadają miejsca akceptorowe obecne w domenie TPR ligazy. Badania, w których posłużono się białkowymi lizatami retikulocytów królika, pozwoliły określić, w jaki sposób CHIP wpływa na funkcjonowanie Hsp90 [11]. Okazało się, że ligaza CHIP zmienia skład heterokompleksu tworzonego przez czaperon promując częściową lub całkowitą dysocjację jego składników - białek Hop (Hsp70/Hsp90-organizing protein) oraz p23. Włączenie CHIP do kompleksu powoduje dysocjację wspomnianych czynników białkowych, podobnie jak w przypadku kompleksu Hsc/Hsp70, prowadzi do zablokowania funkcji Hsp90 i umożliwia ubikwylację peptydu zasocjowanego z białkiem opiekuńczym [11].

W procesie ubikwylacji ligaza CHIP wykorzystuje również inne reszty lizyny niż 48, np. lizynę 29 oraz 63 ubi-

kwityny. Ten nietypowy wzorec modyfikacji obserwowano w przypadku monoubikwylacji czaperonu Hsp70 [27]. W przypadku ligaz E3 ubikwylacja poprzez 29 lub 63 resztę lizynową najprawdopodobniej ma znaczenie regulacyjne [50]. W przypadku Hsc70 funkcja tego procesu jest nieznaną. Niektórzy badacze sugerują, że jego ubikwylacja może odgrywać rolę w czasie transportu ubikwylowanego substratu do proteasomu. To przypuszczenie wydaje się o tyle zasadne, że inny składnik maszynery czaperonowej BAG-1 ulega również nietypowej modyfikacji ubikwityną. Białko BAG-1 bierze udział w wymianie nukleotydów w Hsp70. Może ono tworzyć trójskładnikowe kompleksy z białkiem CHIP i białkiem czaperonowym, których powstanie promuje ich transport do proteasomu i degradację substratu Hsp70 [3].

Aktywność ligazy E3 białka CHIP wynika z jego zdolności do tworzenia koniugatów z ligazami klasy E2. Do partnerów ligazy CHIP należą ssące ligazy UbcH5a, b i c oraz ich homolog Ubc4 wyizolowany z drożdży [27]. Enzymy te ulegają podwyższonej ekspresji w warunkach stresowych i są zaangażowane w proteolizę uszkodzonych białek oraz peptydów o krótkim okresie półtrwania. Funkcjonalnie są powiązane z białkami systemu czaperonowego. Wiązanie ligazy CHIP z enzymami E2 pozwala na przyłączanie reszt ubikwityny do substratu ligazy [27]. Aktywność enzymatyczna CHIP nie zawsze prowadzi do ubikwylacji peptydu, a w konsekwencji jego degradacji w proteasomie. Badania krystalograficzne prowadzone przez Zhanga i wsp. dowiodły, że białko CHIP formuje stabilny kompleks z enzymem Ubc13, katalizując tworzenie wiązań pomiędzy cząsteczkami ubikwityny za pomocą lizyny 63 [53]. Takie nietypowe koniugaty ubikwitylowe mają znaczenie regulacyjne w procesie naprawy DNA, czy endocytozy [50]. Pozwala to ligazie CHIP na modulowanie metabolizmu komórkowego.

3.1. Regulacja metabolizmu komórkowego przez CHIP

Kierowanie przez CHIP substratów białek czaperonowych na drogę proteolitycznej degradacji skłoniło badaczy do zdefiniowania substratów tej ligazy. Celem było zweryfikowanie hipotezy, że CHIP poprzez swą aktywność ligazy E3 może wpływać na metabolizm komórkowy.

3.1.1. Wpływ ligazy CHIP na poziom receptorów na przykładzie receptora estrogenów

W świetle doniesień dokumentujących zaangażowanie CHIP w degradację receptora glikokortykoidów istotną stała się odpowiedź na pytanie, czy białko to może także wpływać na poziom innych receptorów, w tym związków steroidowych. Receptor estrogenów ER należy do nadrodziny receptorów jądrowych i jest czynnikiem transkrypcyjnym aktywowanym przez przyłączenie liganda. Wyniki wielu prac eksperymentalnych wskazują na powiązanie aktywacji receptorów cytosolowych z ich degradacją w proteasomie [49]. W badaniach nad wpływem CHIP na receptor estrogenów posłużono się linią ludzkich komórek 293 niewykazującą ekspresji endogennej postaci ER. Kotransfekcja plazmidami kodującymi CHIP i ER wywoływała podwyższoną degradację receptora. Wprowadzenie ligazy zmutoowanej w domenie TPR (mutacja ta uniemożliwiała oddzia-

tywanie z Hsp90) hamowało proces rozkładu receptora, co wskazywało na bezpośredni udział ligazy w tym procesie oraz wymóg interakcji CHIP z białkami czaperonowymi w trakcie ubiquitylacji substratu [49]. Bezpośredniego zaangażowania CHIP w degradację ER dowiodły wyniki eksperymentów, w których wyciszono ekspresję CHIP poprzez siRNA (small interfering RNA). Doświadczenia przeprowadzono na ludzkiej linii komórek nowotworowych MCF7, która wykazuje endogenną ekspresję obu genów. Zastosowanie interferującego RNA powodowało zwiększenie ilości ER [18]. Zauważono, że stymulacja komórek estrogenem hamowała degradację receptora zależną od CHIP. Obserwacje doprowadziły do wniosku, że ER podlega degradacji przez dwa różne szlaki, w zależności od tego, czy jest on w stanie wolnym, czy też pozostaje połączony z ligandem. To, że CHIP jest zaangażowany w degradację ER niepołączonego z ligandem nasunęło pytanie, czy jest on zaangażowany w kontrolę jego konformacji. Przesłanką do sprawdzenia tej hipotezy było tworzenie przez ER i CHIP kompleksu wraz z białkami opiekuńczymi. W tym celu linię komórkową 293 transfekowano plazmidami niosącymi zmutowane wersje receptora. Substytucje aminokwasowe wywołujące termolabilność białka sprawiły, że w podwyższonej temperaturze ligaza preferencyjnie obniżała ilość niepoprawnie sfałdowanego receptora. Analogiczne doświadczenia przeprowadzono na fibroblastach izolowanych z dzikich oraz transgenicznych myszy. W liniach komórkowych z nokautem genu *CHIP* nie stwierdzano degradacji cieplnie zdenaturowanej postaci receptora, co obserwowano w linii komórek pochodzących z osobników dzikich. Wyniki jednoznacznie potwierdziły rolę białka CHIP w kontroli jakości receptora estrogenu [49].

Opublikowane wyniki jednoznacznie wykazują zaangażowanie białka CHIP w kontrolę jakości cytoplazmatycznych receptorów związków steroidowych (o receptorze androgenów mowa w ustępie 3.2.1.3). Możliwość degradacji receptorów niepołączonych z ligandem może w pewnym stopniu modulować odpowiedź komórki na bodźce endokrynne.

3.1.2. Rola CHIP w regulacji czynników transkrypcyjnych i szlaku przekazywania sygnału

3.1.2.1. Białka Smad 1, 3 i 4

Badania szlaku przekazywania sygnału TGF- β (transforming growth factor- β) wykazały, że CHIP jest czynnikiem modulującym poziom wtórnych przekaźników sygnału. Czynniki TGF- β należy do nadrodziny cytokin wpływających na rozwój, różnicowanie i przebieg procesu apoptozy w komórce. Niepoprawne działanie szlaku odpowiedzi na TGF- β wiąże się z występowaniem wielu chorób u człowieka [51]. W kaskadzie przekazywania sygnału z receptora TGF- β zaangażowane są białka z rodziny Smad. Po indukcji szlaku przesyłania sygnału, część białek Smad ulega fosforylacji i translokacji do jądra komórkowego, gdzie pełnią rolę czynników transkrypcyjnych łącząc się ze swoimi koaktywatorami i korepresorami. Transdukcja sygnału podlega kontroli poprzez degradację różnych jej składników przez system proteasomowy [31]. Intensywna degradacja poszczególnych jej przekaźników może być sposobem wyciszenia odpowiedzi na TGF- β . Dlatego podjęto próbę zba-

dania wpływu, jaki wywiera białko CHIP na tę drogę przesyłania sygnału w komórce. Stwierdzono, że nadekspresja CHIP powoduje niewrażliwienie komórek na indukcję TGF- β [51]. Eksperymenty polegały na transfekcji linii komórkowych plazmidem niosącym gen reporterowy pod kontrolą promotora zawierającego elementy odpowiedzi na TGF- β . Stymulacja komórek przez podanie TGF- β do pożywki aktywowała transkrypcję genu reporterowego, której nie obserwowano w komórkach kotransfekowanych cDNA CHIP [51]. Natomiast wyciszenie endogennego CHIP za pomocą transfekcji plazmidami kodującymi siRNA CHIP zwiększało aktywność genu reporterowego po stymulacji komórek cytokiną. Czynniki szlaku przesyłania sygnału, na aktywność których wpływa CHIP, są białka rodziny Smad – Smad1, Smad3 oraz Smad4. W przypadku białek Smad1 i Smad4 ustalono bezpośrednie powiązanie między drogą przesyłania sygnału TGF- β a interakcjami z ligazą CHIP [31]. Nadekspresja CHIP istotnie obniża ekspresję genów indukowanych przez czynnik wzrostu TGF- β , w tym genu *junB* [51]. Regulacja stężenia przekaźników przez ligazę CHIP w znaczący sposób moduluje poziom wrażliwości na bodziec, wpływając na poziom pobudzenia szlaku przesyłania sygnału.

3.1.2.2. Kinaza ASK1

Badania Dai i wsp. wykazały, że komórki transgenicznych myszy z nokautem genu ligazy CHIP wykazują zwiększoną wrażliwość na stres termiczny [13]. Sprawdzone w jaki sposób ligaza CHIP wpływa na przebieg procesu apoptozy. Do badań wytypowano białko ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) ze względu na jego interakcje z białkami czaperonowymi oraz to, że uczestniczy ono w programowanej śmierci komórek po indukcji stresu [24].

Kinaza ASK1 jest składnikiem jednej z kaskad MAPK (mitogen-activated protein kinase). Kaskady te składają się z 3 sekwencyjnie aktywowanych klas kinaz MAPK, MAPKK (MAPK kinases), MAPKKK (MAPKK kinases). Kinazy MAPKKK aktywują MAPKK, a te z kolei aktywują MAPK. Te ostatnie w aktywnej postaci wywołują efekt plejotropowy w komórce, wpływając jednocześnie na przebieg wielu procesów. Regulują indukcję podziałów, różnicowanie, diapedezę oraz apoptozę wywołaną stresem. ASK1 jest serynowo-treoninową kinazą białkową, należy do klasy MAPKKK. Aktywuje ona kinazy MAPK: JNK (c-Jun N-terminal kinase) i p38 aktywowane w odpowiedzi na stres. ASK1 odgrywa główną rolę w apoptozie indukowanej przez stres oksydacyjny. Aktywność tej kinazy jest regulowana na wielu poziomach. Podczas aktywacji ASK1 ulega dimeryzacji i autofosforylacji [48]. Oprócz tego kinaza wchodzi w interakcje z wieloma białkami, które wpływają na jej aktywność. Białka czaperonowe oraz białko 14-3-3 hamują aktywność ASK1 [39,52].

Hwang i wsp. wykazali, że CHIP efektywnie obniża stężenie kinazy ASK1. Inhibicja proteasomu, zastosowana w jednym z wariantów doświadczeń kotransfekcji, stabilizowała poziom ASK1 [24]. Transfekcja komórek sekwencją kodującą defektywną wersję białka CHIP wywoływała efekt podobny do obserwowanego po podaniu inhibitora proteasomu sugerując, że motyw TPR poddany delekcji jest niezbędny w ubiquitylacji substratu. Ponieważ kinaza ASK1 wpływa na aktywność kinazy JNK1, zbadano



czy proces proteolitycznej degradacji ASK1 przez ligazę CHIP może być jednym z mechanizmów kontrolujących aktywność kinazy JNK1. Aktywność JNK1 badano w lizatach białkowych linii komórkowej COS-7, eksprymującej ligazę CHIP oraz kinazę ASK1, traktowanej nadlenkiem wodoru – czynnikiem indukującym apoptozę. Ekspresja CHIP poprzez ubikwitylację ASK1 hamowała aktywność kinazy JNK1 [24].

Aktywacja kinazy ASK1 wiąże się ze wstecznym transportem białka Daxx (death-associated protein) z obszaru jądra do cytoplazmy. Dochodzi wówczas do zniesienia antyapoptotycznego działania Daxx w jądrze i jednocześnie do aktywacji ASK1 [29]. Zbadano subkomórkowe umiejscowienie białka Daxx w komórkach transfekowanych wektorem niosącym pełne sekwencje ligazy CHIP oraz tego białka. Wykazano preferencyjną lokalizację Daxx w jądrze komórkowym. Utrata aktywności enzymu E3 przez wprowadzenie substytucji reszty aminokwasowej do białka CHIP w pozycji 260 zwiększała ilość Daxx we frakcji cytoplazmatycznej [24]. Otrzymane wyniki wskazują, że CHIP pośrednio zaangażowany w przebieg procesu apoptozy komórkowej.

3.1.2.3. Białko p53

Białko supresorowe p53 – „strażnik genomu” – w stanie fizjologicznym w komórce ulega ekspresji na stałym, niskim poziomie. W warunkach stresowych, wywołanych np. uszkodzeniem DNA, jego poziom gwałtownie rośnie powodując zahamowanie cyklu komórkowego, a nawet apoptozę komórki. Białko p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który przez aktywację docelowych genów wstrzymuje proces proliferacji uszkodzonych komórek. Jego mutacje wywołują nieprawidłową odpowiedź komórki na warunki stresowe, co w konsekwencji może prowadzić do transformacji nowotworowej [17].

Ponieważ zmutowane białka p53 łączą się *in vitro* z białkami czaperonowymi, może to sugerować zaangażowanie białka CHIP w degradację białka supresorowego. Nadekspresja białka CHIP (w nowotworowej linii komórkowej H1299) powodowała degradację zarówno prawidłowego p53, jak i jego zmutowanej wersji. By potwierdzić bezpośredni udział ligazy CHIP w ubikwitylacji tego białka przeprowadzono próby w odtworzonym *in vitro* systemie ubikwitylującym. Obecność białka CHIP zwiększała stężenie ubikwitylowanego p53. Wzmocnienie procesu ubikwitylacji obserwowano po dodaniu do próby białek czaperonowych Hsp70 i Hsp40, co wskazuje na ich współdziałanie z ligazą CHIP podczas ubikwitylacji p53. Badanie aktywności genu lucyferazy, będącego pod kontrolą promotora niosącego elementy rozpoznawane przez p53, wykazało znaczne obniżenie ekspresji genu reporterowego po transfekcji komórek plazmidem kodującym białko CHIP. Oznacza to, że CHIP wpływa na ekspresję genów regulowanych przez p53 [17].

Białko p53 jest kolejnym czynnikiem włączonym w przekazywanie sygnału w komórce przez oddziaływanie z ligazą CHIP. Wykazano, że niepoprawnie sfałdowane białko supresorowe tworzy stabilne kompleksy z białkami czaperonowymi oraz CHIP. Preferencyjna degradacja niepoprawnego p53 dostarcza kolejnych dowodów na zaangażowanie ligazy CHIP w kontrolę jakości białek.

3.2. Substraty CHIP zaangażowane w patogenezę chorób neurodegeneracyjnych

Niektóre choroby neurodegeneracyjne charakteryzuje akumulacja nieprawidłowo sfałdowanych białek w komórkach nerwowych. Proces ten może być wynikiem mutacji w sekwencji genów, co powoduje konformacyjną niestabilność peptydów powstających na ich matrycy. W konsekwencji nieprawidłowo sfałdowane białka mają tendencję do akumulacji w komórce i tworzenia złogów białkowych. Głównym mechanizmem zapobiegającym temu zjawisku jest degradacja białek w proteasomie. Wśród przyczyn neuropatii wymienia się zaburzenia aktywności systemu czaperonowego, a tym samym zaburzenia w komórkowym obrocie białek, którym zawiadują białka opiekuńcze. Agregaty nieprawidłowo sfałdowanych białek, zwane ciałkami inkluzyjnymi, są charakterystycznym obrazem klinicznym m.in. choroby Parkinsona, Alzheimerera czy Huntingtona. W inkluzjach tych odnajdywane są białka Hsc/Hsp70 oraz Hsp90, co dało podstawy do szczegółowych badań nad udziałem systemu czaperonowego w etiologii chorób neurodegeneracyjnych [15].

3.2.1. Choroby związane z wydłużonymi ciągami glutaminowymi w białkach

Piętnaście schorzeń neurologicznych, z których 9 to choroby neurodegeneracyjne, jest wywoływanych niestabilnością trójnukleotydowych powtórzeń w rejonie kodującym genów. Wśród nich wyróżniamy: chorobę Huntingtona, rdzeniowo-opuszkową atrofię mięśniową (SBMA, X-linked spinal bulbar muscular atrophy), zanik jąder zębatach, czerwieniach, gałek białych i jąder podwzgórzowych Luysa (DRPLA, dentatorubral pallidoluysian atrophy) oraz wiele ataksji rdzeniowo-mózdkowych. Wszystkie te choroby z wyjątkiem SBMA, są postępującymi, dziedzicznymi w sposób dominujący chorobami, występującymi około 50–60 roku życia. Charakteryzują się dysfunkcjami układu nerwowego oraz wzmoczoną śmiercią neuronów. Zwiększenie liczby powtórzeń kodonu CAG, powoduje wydłużenie regionów bogatych w glutaminę w peptydzie i koreluje z wcześniejszym pojawieniem się choroby oraz jej zaostrozonym przebiegiem. Wydłużone powtórzenia glutaminowe zwiększają podatność białek na agregację powodując powstanie wewnątrzkomórkowych inkluzji [26].

3.2.1.1. Choroba Huntingtona

Choroba Huntingtona jest chorobą jednogenną, wywołaną przez powielenie kodonu CAG w genie *huntingtyny*. Ponieważ w wewnątrzkomórkowych agregatach białkowych stwierdzono obecność białek czaperonowych, części składowych proteasomu oraz ubikwitylowanych inkluzji, Jana i wsp. zbadali mechanizm ubikwitylacji i degradacji białek z wydłużonymi regionami kodującymi glutaminę (poliQ) [26]. Posłużono się mysimi komórkami linii neuro2a transfekowanymi plazmidem kodującym N-końcowy fragment *huntingtyny*, zawierający wydłużony ciąg powtórzeń glutaminy (150Q) lub niosący prawidłową liczbę kodonów CAG (16Q). Stwierdzono, że jedynie postać *huntingtyny* 150Q podlegała ubikwitylacji, a proces ten był selektywnie katalizowany przez ligazę CHIP. Ponadto zaobserwowano, że nadekspresja ligazy CHIP wiąże się ze zwiększeniem tempa ubikwitylacji nieprawidłowej postaci *huntingtyny* 150Q, obniża poziom jej agregacji oraz

zwiększa przeżywalność komórek. Delecja domeny U-box białka CHIP zaburzała proces ubikwitylacji [26]. Miller i wsp. w analogicznych doświadczeniach posłużyli się ssaczymi liniami komórkowymi COS-7, PC-12, embrionami Danio pręgowanego oraz linią transgeniczną myszy ze zmutowanym allelem genu *CHIP* [35]. Transgeniczne myszy wykształcały fenotyp charakterystyczny dla choroby Huntingtona. Obserwowano m.in. zaburzenia kinetyki, obniżenie przeżywalności osobników dorosłych, tworzenie licznych złogów białkowych w neuronach oraz zaburzenia w strukturze mózgu [35]. Do linii komórkowych oraz embrionów Danio wprowadzano wektory z sekwencjami kodującymi peptydy o różnej ilości reszt glutaminy oraz defektywne bądź aktywne enzymatycznie postaci białka CHIP. We wszystkich typach eksperymentów, w których zachodziła ekspresja peptydów o właściwościach patogennych i ekspresja poprawnej postaci lizazy CHIP dochodziło do hamowania procesu formowania agregatów białkowych. W liniach komórkowych obserwowano zwiększenie rozpuszczalności peptydów poliQ, natomiast w przypadku neuronów oraz zarodków Danio ekspresja lizazy zwiększała ich przeżywalność. Zastosowanie skróconych wersji lizazy, pozbawionych domeny U-box lub TPR, nie działało ochronnie, gdyż dochodziło do agregacji produktu transgenu. Wyniki doświadczeń z CHIP z delecją TPR wskazują na wagę białek opiekuńczych w procesie degradacji peptydów z wydłużonymi powtórzeniami glutaminowymi.

3.2.1.2. Ataksje rdzeniowo-mózdkowe

Ataksje rdzeniowo-mózdkowe to postępujące, dziedziczne w sposób dominujący choroby, które w ciężkich przypadkach prowadzą do śmierci [10]. Szczegółowa analiza ataksji SCA1 i SCA3 wykazała, że charakterystyczną cechą obu schorzeń jest występowanie w jądrach neuronów ciałek inkluzyjnych, składających się ze zmutowanych białek. Najczęstszym objawem chorobowym są zaburzenia motoryczne spowodowane utratą komórek nerwowych [10,38]. Biorąc pod uwagę zdolność białka CHIP do degradacji niepoprawnie sfałdowanych białek, Al-Ramahi i wsp. zbadali, czy lizaza ta jest zaangażowana w rozkład zmutowanych postaci ataksyny [4]. Stwierdzono, że białko CHIP oddziałuje zarówno z prawidłową jak i zmutowaną ataksyną1 (*atax-1*) promując proces ich ubikwitylacji. Na kinetykę procesu wpływa obecność czaperonu Hsp70, dlatego też delecja domeny TRP zniżyła zdolność lizazy do przyłączania reszt ubikwityny do *atax-1* [4]. W badaniach wzajemnych zależności między CHIP a *atax-1* wykorzystano także zwierzęcy model SCA1. Ekspresja ataksyny1 zawierającej 82 reszty glutaminy w komórkach siatkówki oczu *Drosophila* powodowała zaburzenia w ich budowie. Nadekspresja CHIP obniżała stężenie poliglutaminowej postaci *atax-1*, przez co chroniła przed rozwojem patologicznego fenotypu wywołanego ekspresją zmutowanego białka [4]. Wyniki eksperymentów z użyciem ataksyny 3 zawierającej ciąg 130 reszt glutaminy potwierdziły, że redukcja jej poziomu wiąże się z procesem ubikwitylacji przez lizazę CHIP [26].

3.2.1.3. Rdzeniowo-opuszkowy zanik mięśni

W rdzeniowo-opuszkowym zaniku mięśni (SBMA) powstałe w wyniku mutacji wydłużenie regionu z powtórzeniami

CAG w 1 eksonie receptora androgenów (AR) powoduje odkładanie monomerów kodowanych przez ten gen w postaci eozynofilnych ciałek w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym. Akumulacja białek prowadzi do obumierania neuronów motorycznych w pniu mózgu i rdzeniu kręgowym. W inkluzjach, będących często spotykaną cechą patologiczną, dochodzi do nagromadzenia AR oraz białek systemu proteasomowego oraz czaperonowego. Obserwacje te sugerują, że przyczyną SBMA mogą być zaburzenia działania systemów odpowiedzialnych za ochronę neuronów przed skutkami agregacji białek z wydłużonymi ciągami poliglutaminowymi [1]. Cardozo i wsp. wykazali, że CHIP ubikwityluje prawidłowy AR kierując go na drogę proteolitycznej degradacji [9].

Na podstawie uzyskanych wyników istotnym wydawało się ustalenie, czy lizaza CHIP odpowiada również za ubikwitylację zmutowanego receptora androgenów. Ludzkie komórki linii SH-SY5Y transfekowano wzrastającymi stężeniami plazmidowego DNA niosącego sekwencję lizazy [1]. Stwierdzono, że spadek stężenia zarówno zmutowanej, jak i prawidłowej postaci receptora był proporcjonalny do ilości wektora użytego do transfekcji. Degradacja AR z nieprawidłową liczbą reszt glutaminy postępowała szybciej niż jego natywnej postaci. Preferencyjną ubikwitylację zmutowanego receptora obserwowano też w tkankach transgenicznych myszy wykazujących SBMA. Krzyżowano osobniki niosące natywną lub zmutowaną ludzką sekwencję genu CHIP z osobnikami z prawidłowym genem AR (z 24 glutaminami, *AR-24Q*) oraz jego zmutowaną wersję zawierającą 97 reszt glutaminy. Osobniki potomne, będące podwójnymi mutantami wykazywały cechy typowe dla SBMA, w tym skrócony czas przeżywalności, postępującą atrofię mięśniową, ogólne osłabienie oraz zaburzenia kinetyki. Kolejne krzyżówki myszy *AR-97Q* lub *AR-24Q* z myszami z nadekspresją CHIP, w których potomstwo miało 2, 1 lub 0 alleli ludzkiego CHIP – poddawano testom motorycznym oraz sprawdzano długość życia poszczególnych osobników. W liniach transgenicznych myszy, w których dochodziło do ekspresji lizazy przynajmniej z jednego allelu obserwowano spowolnienie procesu chorobowego bądź całkowity jego zanik. Badania histologiczne wykazały różnice w tempie akumulacji zmutowanej, monomerycznej postaci AR. U osobników z nadekspresją lizazy widoczne było spowolnienie procesu akumulacji *AR97Q*. Stwierdzono, że zachowanie funkcji motorycznych myszy było związane z prawidłową ekspresją genu CHIP [1].

Lizaza CHIP odgrywa ważną rolę w etiologii chorób neurodegeneracyjnych wywołanych akumulacją białek z wydłużonymi ciągami poliglutaminowymi. Jej wyjątkowa zdolność do kierowania substratów białek HSP na drogę proteolizy pozwala chronić neurony przed degradacją. Wyniki badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych z nadekspresją CHIP wskazują na potencjalną możliwość zastosowania lizazy w terapii SBMA.

3.2.2. Choroba Parkinsona

Choroba Parkinsona (Parkinson's disease – PD) jest jedną z najczęstszych chorób neurodegeneracyjnych charakteryzującą się utratą neuronów dopaminergicznych. Zanik tej klasy neuronów jest charakterystyczny dla istoty czarnej mózgu odpowiedzialnej za wykonywanie ruchów za-



leżnych od woli. Mimo znacznych wysiłków badaczy etiologia choroby pozostaje wciąż nieznana. Wydaje się, że mutacje genów *α-synukleiny* oraz *parkiny* występujące w dziedzicznej odmianie PD, mają związek z zaburzeniami funkcjonowania mechanizmów leżących u podstawy śmierci komórek nerwowych [25].

3.2.2.1. *α-synukleina*

Mutacje genu *α-synukleiny* są odpowiedzialne za rzadkie przypadki autosomalnej, dziedzicznej w sposób dominujący odmiany PD. Zmutowana postać białka tworzy cytoplazmatyczne agregaty zwane ciałkami Lewy'ego, które spychając organella komórkowe w region peryferycznej cytoplazmy wywołują dysfunkcję, a w efekcie apoptozę komórki. Innym powodem degradacji neuronów mogą być mutacje białka *α-synukleiny* prowadzące do utraty fizjologicznej funkcji peptydu. Białko to współdziała z białkiem czaperonowym CSP α (cystein string protein α) zaangażowanym w obrót pęcherzyków wypełnionych neuroprzebieżnikami znajdujących się w przestrzeni presynaptycznej komórki. W ten sposób mutacje *α-synukleiny* przekładają się na zaburzenia aktywności i integralności połączeń synaptycznych w drogach nerwowych [8].

Ciałka Lewy'ego wykazują też obecność epitopów charakterystycznych dla ubikwityny, czaperonów oraz ligazy ubikwitylowej CHIP. Akumulacja tych peptydów wywołuje spadek ich wewnątrzkomórkowego stężenia prowadząc do niewydolności systemu kontroli jakości białek i rozwoju choroby. Najistotniejszym, oprócz *α-synukleiny* składnikiem tworzonych inkluzji jest białko CHIP. Stwierdzono, że nadekspresja CHIP hamuje agregację niepoprawnie ufałdowanych białek [46]. Ekspresja natywnej postaci ligazy w ludzkich komórkach linii H4, oraz postaci pozbawionej domeny U-box, prowadziła do zmian w morfologii oraz liczebności powstających inkluzji. W obu typach doświadczeń w miejsce nielicznych, dużych skupisk białek powstawało wiele mniejszych. Proces ten był zależny od oddziaływań CHIP z białkami czaperonowymi, gdyż użycie zmutowanego białka pozbawionego domeny TPR (Δ TPR) zaburzało ten efekt. Doniesienia o zdolności białka CHIP do ubikwitylacji substratów białek czaperonowych skłoniły badaczy do sprawdzenia hipotezy, że ligaza ta jest w stanie wpływać na poziom *α-synukleiny*. Dowiedziono, że nadekspresja ligazy CHIP podwyższała poziom jej degradacji. Podobne działanie, jednak o mniejszym natężeniu, wykazywały mutanty delecyjne pozbawione domeny U-box i TPR. Ponadto, zastosowanie inhibitorów proteasomu spowalniało, ale nie blokowało całkowicie proces degradacji *α-synukleiny* zależnej od CHIP i jej mutantu Δ TPR. Natomiast zablokowanie aktywności lizosomu znosiło degradację *α-synukleiny* obserwowaną w trakcie ekspresji Δ TPR CHIP [46].

W kontroli wewnątrzkomórkowego poziomu *α-synukleiny* wykorzystywane są oba szlaki degradacji białek – proteasomowy oraz lizosomowy. Bez wątplenia wyniki powyższych doświadczeń sugerują główną rolę ligazy CHIP w metabolizmie *α-synukleiny* oraz patologii PD. Białko CHIP nie tylko moduluje aktywność białek czaperonowych decydując o wejściu substratu na drogę degradacji, lecz decyduje również o proteasomowym lub lizosomowym rozkładzie nieprawidłowego białka.

3.2.2.2. Parkina

Pael-R, receptor należący do rodziny receptorów sierocych, jest substratem parkiny należącej do rodziny ligaz ubikwitylowych z motywem RING. Mutacje w genie kodującym parkinę wywołują warunkowaną autosomalnie recesywnie PD, obserwowaną w około 50% przypadków młodzieńczej odmiany tej choroby. Dysfunkcja ligazy wywołuje nieefektywną degradację receptora Pael-R [25]. Konsekwencją tego stanu może być stres retikulum endoplazmatycznego, w tym jego rodzaj spowodowany obecnością nieułałdowanych białek – UPR (unfolded protein response). Po przekroczeniu punktu krytycznego zostaje indukowana kaskada zdarzeń prowadząca do śmierci neuronów dopaminergicznych istoty czarnej. Neuronów tej struktury mózgu wydają się szczególnie wrażliwe na akumulację białek wynikającą z dysfunkcji systemu proteasomowego [33]. Niepoprawnie sfałdowany Pael-R jest fałdowany przez kompleks Hsc/Hsp70-Hdj-2, a gdy nie osiąga poprawnej konformacji przestrzennej podlega ubikwitylacji przez parkinę [25]. W oparciu o wyniki pozyskane z wielu eksperymentów, w tym transfekcji przejściowych linii komórkowych, reakcji ubikwitylacji *in vitro*, immunoprecypitacji białek i analizy typu Western stwierdzono, że w procesie degradacji Pael-R zależnej od parkiny uczestniczy ligaza CHIP. Ekspresja CHIP wzmacniała aktywność ligazową parkiny powodując efektywną ubikwitylację Pael-R. Analiza delecyjna CHIP nie dała jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, która z jej domen jest odpowiedzialna za interakcję z parkiną. Stwierdzono jedynie, że CHIP może się wiązać z nią bezpośrednio lub za pośrednictwem Hsc/Hsp70. Przyłączenie CHIP do kompleksu wydaje się najważniejszym momentem w decyzji o degradacji substratu. W warunkach stresu retikulum, wywołanego zablokowaniem glikozylacji, a przez to fałdowania białek, obserwowano dysocjację białek opiekuńczych Hsc/Hsp70-Hdj-2 z kompleksu z parkiną/Pael-R. Dysocjacja indukowana obecnością CHIP prowadziła do utworzenia nowego kompleksu CHIP/parkin/Pael-R/ligaza E2 efektywnie ubikwitylującego Pael-R. Ponowna zmiana aktywności kompleksu ubikwitylującego wymaga białka Hsp70. Jego obecność znosi zdolność ubikwitylacji substratu przez kompleks ligaz, wskazując na kompetycyjne oddziaływanie pomiędzy ligazami CHIP i parkiną a Hsc/Hsp70. Proces ten może mieć znaczenie w mechanizmie przywracania homeostazy w komórkach narażonych na stres retikulum. Liczba przeżywających komórek, w których indukowano ten rodzaj stresu przez ekspresję defektywnej postaci Pael-R, wzrastała po ekspresji obu typów ligaz ubikwitylowych, jak i Hsp70. Analiza składu frakcji białkowych wykazała, że degradacja postaci rozpuszczalnej bądź nierozpuszczalnej receptora Pael-R zależy od rodzaju użytej ligazy oraz obecności białek czaperonowych. Ligaza CHIP obniżała stężenie receptora Pael-R w obu frakcjach, podczas gdy parkina wraz z Hsp70 jedynie we frakcji rozpuszczalnej, ułatwiając fałdowanie receptora [25].

Badania roli ligazy CHIP w indukcji chorób neurodegeneracyjnych wskazują, że nie jest ona bezpośrednio odpowiedzialna za ubikwitylację i degradację patogennych białek w kompleksie parkina/HSP. Jej interakcje z białkami opiekuńczymi, zwłaszcza Hsp70, nadają jej rolę „przełącznika molekularnego”, który decyduje o tym, czy substrat powinien być ponownie fałdowany, czy też ulec nieodwracal-

nej degradacji. Proces ten jest szczególnie ważny w trakcie niwelowania skutków stresu komórkowego i powrotu komórki nerwowej do stanu homeostazy.

3.2.3. Tauopatie

Akumulacja nieprawidłowego białka tau jest przyczyną wielu chorób neurodegeneracyjnych, do których zalicza się chorobę Picka, otępienie korowo-podkorowe, postępujące porażenie nadjądrowe, czy otępienie skroniowo-czołowe z parkinsonizmem sprzężone z chromosomem 17. Akumulacja tau w komórce jest cechą charakterystyczną w obrazie klinicznym choroby Alzheimera. Białko tau jest zaangażowane w tworzenie mikrotubul oraz ich stabilizację, odgrywa ważną rolę w utrzymywaniu integralności komórek nerwowych i bierze udział w transporcie aksonalnym. Tau jest kodowane przez pojedynczy gen położony na chromosomie 17 człowieka [41]. W wyniku alternatywnego składania transkryptu, tau może zawierać 3 lub 4 powtórzone sekwencje zdolne do wiązania mikrotubul [30]. W regionach flankujących te sekwencje znajdują się liczne miejsca fosforylacji. Wydaje się, że jedną z funkcji procesu fosforylacji jest regulacja siły wiązania tau z mikrotubulami. Fosforylacja tau jest kontrolowana przez wiele szlaków przekazywania sygnału. Ponieważ w patologicznych tkankach peptyd ten był silnie ufosforylowany wnioskowano, że tego typu modyfikacja może być odpowiedzialna za etiologię choroby. Eksperymenty przeprowadzone na organizmach transgenicznym pozwoliły na identyfikację wielu enzymów fosforylujących i defosforylujących białko tau. Szeroka sieć wzajemnych zależności wpływa na mechanizm patologii związany z tym białkiem i utrudnia definiowanie czynników zaangażowanych w proces chorobowy [30]. Dou i wsp. wykazali udział białek czaperonowych Hsp70 i Hsp90 w biologii białka tau [16]. Zaobserwowano, że indukcja ekspresji białek opiekuńczych obniża ilość agregatów tau, wpływając na uwolnienie pewnej jego ilości do frakcji białek rozpuszczalnych. Zmiana właściwości biochemicznych korelowała ze zwiększeniem puli białka tau związanego z mikrotubulami. Poza tym badania te sugerują, że tauopatie mogą być wynikiem obniżenia aktywności białek czaperonowych. Wykazano ujemną korelację między występowaniem agregatów patologicznego białka, a poziomem białek opiekuńczych Hsp70 oraz Hsp90 w neuronach tkanek dotkniętych zmianami chorobowymi [16].

Właściwości ligazy CHIP oraz jej zdolność do ubikwitylacji substratów Hsp 70 skłoniły Petrucelliego i wsp. do zdefiniowania roli kompleksu Hsp70/CHIP w procesie ubikwitylacji, degradacji i agregacji tau [41]. Wstępem do badań było stwierdzenie istnienia kompleksu, w skład którego wchodziły białko tau i ligaza CHIP [41]. Próby mapowania domeny zaangażowanej w powstawanie kompleksu ligaza-Hsp70 nie dały jednoznacznych wyników. Zarówno delekcja domeny TRP, jak i U-box zaburzała interakcję obu białek, co może sugerować udział obu domen w formowaniu kompleksu. W przypadku białka tau stwierdzono, że region wyznaczony przez reszty aminokwasowe od 256 do 367 zawiera miejsce konieczne do wiązania CHIP [19]. W eksperymentach z użyciem transfekowanej ludzkiej linii komórkowej HEK293 pozytywnie zweryfikowano zdolność ligazy CHIP do ubikwitylacji tau [41]. Shimura i wsp. wykazali, że warunkiem niezbędnym do zajęcia ubi-

kwitylacji promowanej przez CHIP jest fosforylacja białka tau [45]. Wyniki eksperymentów *in vivo* prowadzonych na organizmach transgenicznym zwierząt wskazują, że nokaut białka CHIP zwiększa ilość nierozpuszczalnej postaci tau [43], natomiast ekspresja Hsp70 powoduje zmniejszenie liczności agregatów [41]. Analiza tkanek pobranych *post mortem* od osób dotkniętych chorobą Alzheimera wykazywała kolokalizację CHIP i białka tau. Ligaza CHIP wzbogacała agregaty składające się z postaci tau zawierającej 3 powtórzenia domeny wiążącej mikrotubule. Nie stwierdzano obecności tego białka w złogach zbudowanych z postaci tau zawierającej 4 powtórzenia opisanej domeny. Agregaty formowane przez obie odmiany tau wykazywały pośrednie ilości białka CHIP [41]. Ponadto stwierdzono ujemną korelację pomiędzy występowaniem agregatów białka tau, a ilością białka CHIP w badanych fragmentach tkanki nerwowej [43].

Dane te pozwoliły wysunąć hipotezę na temat mechanizmu patologii wywoływanej przez białko tau. Prawdopodobnie rozpuszczalna, ufosforylowana postać tau jest toksyczna dla komórki. CHIP we wczesnych fazach procesu chorobowego ubikwityluje tau, co wywołuje jego akumulację w postaci nierozpuszczalnych agregatów, ale jednocześnie chroni przed toksycznością ufosforylowanego tau. W tym samym czasie tau może ulegać powolnej degradacji przez system proteasomowy [45].

3.3. Funkcje CHIP niepowiązane z jej aktywnością jako ligazy E3

3.3.1. Czynniki transkrypcyjny HSF1

HSF1 (heat shock factor 1) jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za ekspresję białek szoku cieplnego. Elementy odpowiedzi na ten peptyd (heat shock elements – HSE) mieszczą się w promotorach genów *hsp*. HSF1 jest aktywowany w odpowiedzi na różne czynniki stresogenne. Po aktywacji ulega on trimeryzacji, fosforylacji oraz ewentualnej translokacji do jądra. W warunkach fizjologicznych Hsp70 łączy się z domeną transaktywacyjną HSF1, co powoduje zahamowanie aktywności czynnika na dwa sposoby. Hsp70 blokuje formowanie kompleksu transkrypcyjnego oraz stabilizuje konformację monomeru HSF1 [13].

Nadekspresja CHIP w komórkach linii COS-7 indukowała wzrost poziomu białka Hsp70 [13]. Poziom jego ekspresji był porównywalny, ale nie addytywny, z poziomem osiąganym po zadziałaniu szoku cieplnego, co wskazuje, że CHIP i szok cieplny indukują ekspresję genów *hsp* przez ten sam szlak aktywacji transkrypcyjnej. Mechanizm regulacji Hsp70 przez CHIP zbadano poprzez kotransfekcję konstruktem z genem reporterowym pod promotorem genu *hsp70* obejmującym element HSE. Nadekspresja CHIP powodowała aktywację transkrypcyjną genu reporterowego, a mutacje sekwencji HSE blokowały ten proces. Wyniki eksperymentów wykazały, że ekspresja CHIP nie indukuje warunków stresowych w komórce, a w aktywacji genu *hsp70* uczestniczą białka rozpoznające element HSE. Badania EMSA (electrophoretic mobility shift assay), czy „supershift” wykazały, że nadekspresja CHIP wzmacnia swoiste wiązanie białek jądrowych do sekwencji HSE. Skład oraz masa kompleksów białkowych różni-



ły się w zależności od warunków w jakich hodowano komórki. Jedynie w warunkach stresu komórkowego białko HSF1 występowało w postaci trimeru połączonego z CHIP oraz Hsp70. Eksperymenty z mutantami delecyjnymi CHIP w domenach TRP lub U-box wykazały, że do indukcji ekspresji genu *hsp70* wymagana jest domena odpowiedzialna za interakcję ligazy z białkami HSP [13].

Po stwierdzeniu, że aktywacja ekspresji białek czaperonowych jest swoista i wymaga wiązania CHIP z jednym z nich, zrodziło się pytanie o molekularny mechanizm tego oddziaływania. Analiza tempa migracji białka HSF1 wykazała, że ekspresja CHIP prowadzi do trimeryzacji i fosforylacji HSF1. Ponieważ HSF1 w warunkach fizjologicznych wiąże Hsp70 sprawdzono czy CHIP, który także wiąże Hsp70, wpływa na modelowanie składu tego kompleksu. Wykazano, że CHIP formuje stabilny kompleks z białkami HSF1-Hsp70, w którym rolę łącznika spełnia białko Hsp70. Trójskładnikowy kompleks nie był tworzony przez ligazę ze zmutowaną domeną TRP. Subkomórkowa dystrybucja HSF1 oraz CHIP wykazała wspólne umiejscowienie w komórkach indukowanych szokiem cieplnym. Białka te ulegały translokacji do jądra komórkowego, w którym tworzyły skupiska. Do rozpadu heterokompleksów dochodziło po zaniku bodźca stresowego. Ponieważ oddziaływania te dokumentują rolę białka CHIP w odpowiedzi na szok cieplny, zbadano jakie mogą być ewentualne następstwa wyciszenia ekspresji tego białka. W badaniach wykorzystano linię transgeniczną myszy z nokautem genu *CHIP*. Białko to wydaje się niezwykle istotne w prawidłowym rozwoju płodu, gdyż jego brak zwiększał śmiertelność okołoporodową. Fibroblasty izolowane z transgenicznych myszy wykazywały obniżoną żywotność w odpowiedzi na stres termiczny oraz obniżoną pobudliwość ekspresji Hsp70. Brak zdolności do ochrony przed szokiem cieplnym powodował całkowitą śmiertelność myszy poddanych hipertermii [13].

Konkludując, HSF1 w warunkach fizjologicznych pozostaje w kontakcie z czaperonem Hsp70, który utrzymuje go w konformacji nieodpowiedniej do trimeryzacji i aktywacji transkrypcji genów *HSP*. CHIP przyłączając się do kompleksu zaburza funkcjonowanie Hsp70 i umożliwia indukcję transkrypcji przez HSF1.

3.3.2. Receptor aktywowany przez proliferatory peroksyosomów- α

PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) należy do nadrodziny jądrowych receptorów aktywowanych ligandem. Poznano trzy izoformy tego receptora: PPAR α , β i γ . Receptory te wykazują zróżnicowaną swoistość tkankową oraz odmienne funkcje fizjologiczne. PPAR α podlega ekspresji w ludzkiej wątrobie, mięśniu sercowym, jelitach oraz w części korowej nerek. Jego funkcją jest regulowanie odpowiedzi immunologicznej i katabolizmu kwasów tłuszczowych. Receptor wpływa również na metabolizm aminokwasów i węglowodanów. Izofорма β jest peptydem powszechnie występującym, biorącym udział w zagnieżdżaniu zarodka, wstecznym transporcie cholesterolu, karcynogenezie skóry i jelita grubego oraz zabliznianiu uszkodzeń naskórka. Największą ekspresję PPAR α wykazuje tkanka tłuszczowa, zarówno żółta jak i brązowa. Receptor ten jest odpowiedzialny za różnicowanie

adipocytów oraz magazynowanie tłuszczu w komórkach tej tkanki. Aktywacja tej grupy receptorów jest procesem bardzo złożonym. Łączą się one z wieloma koaktywatorami i korepresorami. Podczas procesu aktywacji mogą oddziaływać z innymi receptorami i czynnikami transkrypcyjnymi. Złożone, czasem nakładające się mechanizmy aktywacji tych dość powszechnie ekspresjonowanych receptorów (zdolność wszystkich izoform PPAR do odpowiedzi na ten sam ligand) rodzą pytania na temat mechanizmów różnicowania ich funkcji.

Stwierdzono, że receptory PPAR tworzą kompleksy z białkami szoku cieplnego Hsp70 i Hsp90 [47]. Interakcje receptor-czaperon mogą być jednym z mechanizmów kontroli aktywacji PPAR. By potwierdzić tę zależność w doświadczeniach użyto syntetyczny ligand PPAR α oraz geldanamycynę – antybiotyk kotwiczący w domenie białka Hsp90 wiążącej adenozynotrójfosforany. Pomiar ilości transkryptu genu aktywowanego przez PPAR α wykazał, że poziom aktywacji zależy od kolejności podania obu wymienionych czynników. Maksymalny poziom aktywacji osiągnęto po podaniu geldanamycyny przed ligandem, niezależnie od linii komórkowej. Wiązanie izoformy α receptora z białkiem Hsp90 prowadziło do jego inaktywacji. Określono wpływ ligazy CHIP, jako białka hamującego aktywność czaperonową Hsp90, na aktywację transkrypcyjną genów kontrolowanych przez PPAR α . Wykazano, że białko CHIP w znacznym stopniu wzmacnia podstawowy i indukowany poziom transkrypcji genów [47]. Wyniki te kontrastowały z doniesieniami na temat innych receptorów jądrowych, w przypadku których CHIP obniżał ich aktywność transkrypcyjną [11]. W stosunku do PPAR α CHIP najprawdopodobniej wykazuje jedynie aktywność koczaperonową bez funkcji ligazy E3 [47].

3.3.3. Dokowanie izoform czynnika transkrypcyjnego E2A do SCF

Czynniki transkrypcyjne E12 i E47 są izoformami powstającymi w wyniku alternatywnego składania transkryptów genu E2A [23]. Należą one do rodziny białek E, które regulują wczesne etapy rozwoju limfocytów. Czynniki te pozostają pod kontrolą kaskady przesyłania sygnału Notch. Aktywacja receptorów tego szlaku przyspiesza degradację E12 i E47 przez proteasom. Czynnikiem niezbędnym jest fosforylacja tych białek przez kinazy MAP. Mechanizm degradacji wywołanej przez kaskadę Notch nie został dotąd dokładnie poznany. Wykazano, że kompleks ligazy ubikwitylowej SCF^{Skp2} jest odpowiedzialny za degradację tych białek [23]. Wiązanie białek E12 i E47 przez podjednostkę Skp2 ligazy wymaga ich uprzedniej fosforylacji. Jako dodatkowy składnik kompleksu SCF^{Skp2} zidentyfikowano ligazę CHIP [23]. W eksperymentach, w których badano mechanizm degradacji E47 wykazano, że CHIP oddziałuje poprzez domenę TPR z kompleksem ligazy SCF^{Skp2} niezależnie od wiązania z substratem. Peptydem wiążącym CHIP w kompleksie ligazy jest białko kulina1 (Cul1). Immunoprecypitacja białek izolowanych z komórek transfekowanych pojedynczymi plazmidami lub mieszaniną wektorów kodujących Cul1, Skp2 i CHIP wykazała tworzenie pośredniego wiązania między CHIP a Skp2. Kompleks ten nie wykazywał powinowactwa do składników ligazy SCF^{Skp2} – Cul1 i Skp1. Stwierdzono ponadto, że nadekspresja Skp2 powodowała zwiększenie puli Hsp70

wytrącanego z tym białkiem. Na podstawie otrzymanych wyników oraz właściwości Hsc70 wiążącego CHIP jak i Skp2 stwierdzono, że białko czaperonowe może być pośrednikiem w powstawaniu kompleksu Skp2/ligaza CHIP. Eksperymenty kontrolne, w których posłużono się zmutowanymi postaciami białka CHIP, wykazały całkowity zanik oddziaływań pomiędzy składnikami kompleksu E47, Skp2 i Hsp70. Ponadto stwierdzono, że proces fosforylacji E47 przez kinazy Erk1 i 2 wpływa na siłę wiązania z Skp2 i powoduje stabilizację tworzonego kompleksu. Analiza wzajemnych relacji białek rezydentów kompleksu ligazy SCF^{Skp2} prowadzi do następujących wniosków:

- CHIP tworzy kompleks preubikwitylujący, w którym wraz z białkiem czaperonowym Hsc70 stanowi rusztkowanie pomiędzy E47 i Skp2,
- fosforylacja E47 powoduje silne związanie z nim Skp2, co stabilizuje kompleks preubikwitylujący,
- heterotetramer może się przyłączać do ligazy SCF^{Skp2} dzięki bezpośredniemu oddziaływaniu CHIP z Cull1 i Skp2 z Skp1.

CHIP nie wykazuje aktywności ligazy ubikwitylowej względem E47, jest jedynie częścią adaptorową niezbędną do jego degradacji [23].

Podsumowując, ligaza CHIP jest integralnym składnikiem systemu kontroli jakości białek. Bierze udział w procesach, w których nie przejawia aktywności ligazy ubikwitylowej. Wpływa na system czaperonowy modulując aktywność białek szoku cieplnego oraz reguluje dostępność jego składników w komórce, wpływając tym samym na metabolizm komórkowy.

3.4. Regulacja aktywności CHIP

Ligaza CHIP ubikwityluje wiele substratów białkowych [14,31,32,40]. W rozpoznaniu, regulację ich aktywności oraz pośrednio degradację zaangażowane są białka czaperonowe [11,34,36]. Opisanie właściwości ligazy CHIP zrodziło pytanie, w jaki sposób jest regulowana jej aktywność. W wyniku intensywnych poszukiwań zidentyfikowano czynniki białkowe modulujące właściwość CHIP [2,3,12].

3.4.1. BAG 1

BAG-1 (*Bcl-2 associated-athenogene-1*) jest kofaktorem odpowiedzialnym za wymianę nukleotydów w domenie ATP-azowej Hsp70. Stymuluje on wymianę ADP na ATP, prowadzącą do obniżenia powinowactwa Hsp70 do substratu [22]. Budowa peptydu BAG-1 sugeruje, że może on brać udział w kierowaniu substratów białka opiekuńczego na drogę degradacji proteasomowej. Na aminowym końcu białka zmapowano domenę UBL (*ubiquitin like*) uczestniczącą w dokowaniu kompleksu czaperonowego do proteasomu [14]. Demand i wsp. wykazali, że koczaperony CHIP i BAG-1 wchodzi w interakcję bezpośrednio i zależnie od Hsp70 [14]. Białka te mogą tworzyć trójskładnikowy kompleks, gdyż Hsp70 ma odrębną domenę akceptorową dla CHIP i BAG-1 [22]. Wykazano też, że BAG-1 wiąże się z ubikwitylowanymi białkami, wśród których zidentyfikowano substraty ligazy CHIP, takie jak kinaza Raf-1 oraz receptor glikokortykoidów. Proces wiązania BAG-1 z ubikwitylowanym białkiem jest wybiórczy (np. nie wiąże się z poliubikwitylowaną postacią S-transferazy glutationu).

Jest on więc swoistym receptorem substratów ligazy CHIP. BAG-1 jest włączony w transport ubikwitylowanych substratów białek czaperonowych do proteasomu, gdyż ubikwitylacja substratu zwiększa powinowactwo tego białka do kompleksu proteolitycznego [14].

W reakcji renaturacji receptora glikokortykoidów (GR) prowadzonej *in vitro* w obecności białek Hsp70, Hsp40 i ATP, dodanie do próby BAG-1 przyspieszało przebieg procesu. Dowodów bezpośredniej współpracy BAG-1 i CHIP w promowaniu degradacji dostarczyły doświadczenia kotransfekcji linii komórkowych COS7 wektorami z sekwencjami kodującymi CHIP, BAG-1 i receptor glikokortykoidów. Wspólna ekspresja BAG-1 i CHIP znacznie podwyższała poziom degradacji GR w odniesieniu do poziomu promowanego samodzielnie przez CHIP [14]. Dlatego BAG-1 jest czynnikiem promującym ubikwitylację przez ligazę CHIP, a w następstwie tego procesu degradację jej substratu.

3.4.2. BAG-2

Kolejnym białkiem, które zostało pierwotnie zidentyfikowano jako czynnik regulujący wymianę nukleotydów podczas cyklu Hsp70 i wchodzący w interakcje z ligazą CHIP jest białko BAG-2. Funkcja tego białka w komórce, jak dotąd nie została poznana. Wiadomo, że należy ono do tej samej rodziny, co białko BAG-1 i zawiera charakterystyczną domenę umożliwiającą oddziaływanie z Hsp70. Badania prowadzone przez dwa niezależne zespoły wykazały, że białka te *in vivo* tworzą wspólny kompleks, którego integralnym składnikiem jest białko opiekuńcze Hsp70 [6,12]. W badaniach przeprowadzonych przez Arndta i wsp. BAG-2 nie asocjował bezpośrednio z CHIP, ale jego podwyższona ekspresja wywoływała zwiększenie ilości kompleksów CHIP-Hsp70 [6]. Sugeruje to, że BAG-2 zmienia konformację białka czaperonowego tak, że faworyzuje ono wiązanie ligazy. Trójskładnikowy heterokompleks może rekrutować także inne białka, może też tworzyć kompleksy o znacznej masie cząsteczkowej. Zdolność oligomeryzacji kompleksu wynika z właściwości białek BAG-2 i CHIP do tworzenia przez nie homodimerów [6]. Dodanie BAG-2 w trakcie reakcji ubikwitylacji *in vitro* zaburzało aktywność ligazową białka CHIP. Stwierdzono obniżenie zdolności przyłączania łańcuchów ubikwitynowych do Raf-1, CFTR i Hsp70 [6,12]. Zmianie ulegał również proces auto-ubikwitylacji CHIP – stwierdzano jego niższy poziom [6]. W hodowlach komórkowych nadekspresja BAG-2 wydłuża okres półtrwania CFTR prawdopodobnie promując jego dojrzewanie. Dalsze badania potwierdziły, że białko to wiąże się do niedojrzałej (nieufaludowanej) domeny NBD1 (*nucleotide-binding domain 1*) stabilizując CFTR [6]. Ponieważ doświadczenia nie odpowiedziały na pytanie, jaki wpływ wywiera BAG-2 na aktywność katalityczną ligazy CHIP, Dai i wsp. przeprowadzili wiele eksperymentów, na podstawie których wysunięto hipotezę o wzajemnych relacjach tych białek [12]. Stwierdzono, że BAG-2 hamuje proces ubikwitylacji promowanej przez CHIP poprzez dysocjację kompleksu CHIP-enzym E2, lecz nie zaburza procesu dimeryzacji samej ligazy CHIP. Badania wpływu nukleotydów na modelowanie kompleksu BAG-2-Hsp70-CHIP wykazały, że po związaniu cząsteczki ATP przez Hsp70 następuje jego oddysocjowanie od BAG-2, a hydroliza nukleotydu zależna od HSP70 ułatwia bezpośrednią interakcję BAG-2 z CHIP. Prowadzi to do obniżenia aktywności



enzymatycznej CHIP prawdopodobnie w wyniku zniesienia oddziaływań z Hsp70, który umożliwia ligazie rozpoznanie substratu. Alternatywnym mechanizmem inhibicji może być kompetycyjne współzawodnictwo BAG-2 z enzymem klasy E2 – UBCH5a o miejsce wiązania w obrębie domeny U-box ligazy CHIP. Podmiana ligazy E2 na BAG-2 w kompleksie z CHIP powoduje zablokowanie jego właściwości enzymatycznych [12].

Wydaje się, że białko BAG-2 wywiera odmienny wpływ niż BAG-1 na kinetykę reakcji ubikwitylacji katalizowanej przez CHIP. BAG-2 hamuje aktywność enzymatyczną CHIP przez zaburzenie procesu rozpoznania substratu przez ligazę lub uniemożliwia jej wiązanie z enzymem E2.

3.4.3. HspBP1

Podczas przeszukiwania biblioteki cDNA ludzkiego serca w poszukiwaniu partnerów oddziałujących z czaperonem Hsp70 zidentyfikowano białko o unikalnej sekwencji, które nazwano HspBP1 (Hsp70 binding protein 1). Konsekwencją wiązania tego białka do ATP-azowej domeny Hsp70 jest znaczne obniżenie aktywności renaturującej kompleksu czaperonowego [42]. Wyniki doświadczeń Kabanego i wsp., w których badano zależność pomiędzy tempem renaturacji promowanej przez Hsp70, a dysocjacją ATP, sugerują, że HspBP1 jest członkiem grupy białek pośredniczących w wymianie nukleotydów podczas cyklu

Hsp70 [28]. Alberti i wsp. zbadali wpływ białek NEF (nucleotide exchange factor) na aktywność ligazy ubikwitylowej CHIP [2]. Zaobserwowano, że białka te tworzą heterokompleks z Hsc70 dzięki wiązaniu do odmiennych domen białka czaperonowego. HspBP1 wykazuje podobny mechanizm działania jak białko BAG-2 hamując aktywność E3 CHIP. Ubikwitylacja substratów CHIP, takich jak kinaza białkowa Raf-1, lucyferaza oraz Hsc70, zachodzi mniej efektywnie w obecności HspBP1. Do inhibicji CHIP dochodzi tylko w przypadku jednoczesnego wiązania CHIP i HspBP1 do białka opiekuńczego. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych *in vitro* zweryfikowano *in vivo* w eksperymentach transfekcji przejściowej. Stwierdzono, że nadekspresja HspBP1 w komórkach linii HEK293 zwiększa stabilność CFTR – substratu ligazy CHIP. Podobnie w przypadku zmutowanej postaci CFTR, z delecją 508 reszty aminokwasowej, białko HspBP1 blokowało degradacyjną aktywność ligazy CHIP. Wyciszenie ekspresji endogennego HspBP1 w wyniku transfekcji plazmidem kodującym komplementarny shRNA (short hairpin RNA) powodowało znaczne obniżenie ilości CFTR.

Wydaje się, że HspBP1 i ligaza CHIP odgrywają ważną rolę w dojrzewaniu receptora CFTR. Efekt biochemicznej aktywności obu białek jest przeciwstawny i prowadzi do wzmocnienia procesu degradacji CFTR w obecności ligazy lub jego stabilizacji po przyłączeniu do niego białka HspBP1.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Adachi H., Waza M., Tokui K., Katsuno M., Minamiyama M., Tanaka F., Doyu M., Sobue G.: CHIP overexpression reduces mutant androgen receptor protein and ameliorates phenotypes of the spinal and bulbar muscular atrophy transgenic mouse model. *J. Neurosci.*, 2007; 27: 5115–5126
- [2] Iberti S., Böhse K., Arndt V., Schmitz A., Höhfeld J.: The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol. Biol. Cell*, 2004; 15: 4003–4010
- [3] Alberti S., Demand J., Esser C., Emmerich N., Schild H., Höhfeld J.: Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 45920–45927
- [4] Al-Ramahi I., Lam Y.C., Chen H.K., de Gouyon B., Zhang M., Pérez A.M., Branco J., de Haro M., Patterson C., Zoghbi H.Y., Botas J.: CHIP protects from the neurotoxicity of expanded and wild-type ataxin-1 and promotes their ubiquitination and degradation. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 26714–26724
- [5] Aravind L., Koonin E.V.: The U box is a modified RING finger – a common domain in ubiquitination. *Curr. Biol.*, 2000; 10: R132–R134
- [6] Arndt V., Daniel C., Nastainczyk W., Alberti S., Höhfeld J.: BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol. Biol. Cell*, 2005; 16: 5891–5900
- [7] Ballinger C.A., Connell P., Wu Y., Hu Z., Thompson L.J., Yin L.Y., Patterson C.: Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol. Cell. Biol.*, 1999; 19: 4535–4545
- [8] Bonini N.M., Giasson B.I.: Snaring the function of α -synuclein. *Cell*, 2005; 123: 359–361
- [9] Cardozo C.P., Michaud C., Ost M.C., Fliess A.E., Yang E., Patterson C., Hall S.J., Caplan A.J.: C-terminal Hsp-interacting protein slows androgen receptor synthesis and reduces its rate of degradation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003; 410: 134–140
- [10] Colomer Gould V.F.: Mouse models of Machado-Joseph disease and other polyglutamine spinocerebellar ataxias. *NeuroRx*, 2005; 2: 480–483
- [11] Connell P., Ballinger C.A., Jiang J., Wu Y., Thompson L.J., Höhfeld J., Patterson C.: The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 93–96
- [12] Dai Q., Qian S.B., Li H.H., McDonough H., Borchers C., Huang D., Takayama S., Younger J.M., Ren H.Y., Cyr D.M., Patterson C.: Regulation of the cytoplasmic quality control protein degradation pathway by BAG2. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 38673–38681
- [13] Dai Q., Zhang C., Wu Y., McDonough H., Whaley R.A., Godfrey V., Li H.H., Madamanchi N., Xu W., Neckers L., Cyr D., Patterson C.: CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *EMBO J.*, 2003; 22: 5446–5458
- [14] Demand J., Alberti S., Patterson C., Höhfeld J.: Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr. Biol.*, 2001; 11: 1569–1577
- [15] Dickey C.A., Patterson C., Dickson D., Petrucelli L.: Brain CHIP: removing the culprits in neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.*, 2007; 13: 32–38
- [16] Dou F., Netzer W.J., Tanemura K., Li F., Hartl F.U., Takashima A., Gouras G.K., Greengard P., Xu H.: Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 721–726
- [17] Esser C., Scheffner M., Höhfeld J.: The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 27443–27448
- [18] Fan M., Park A., Nephew K.P.: CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) promotes basal and geldanamycin-induced degradation of estrogen receptor- α . *Mol. Endocrinol.*, 2005; 19: 2901–2914
- [19] Hatakeyama S., Matsumoto M., Kamura T., Murayama M., Chui D.H., Planel E., Takahashi R., Nakayama K.I., Takashima A.: U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates polyubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy. *J. Neurochem.*, 2004; 91: 299–307
- [20] Hatakeyama S., Yada M., Matsumoto M., Ishida N., Nakayama K.I.: U-box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 33111–33120
- [21] Hendrick J.P., Hartl F.U.: The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J.*, 1995; 9: 1559–1569

- [22] Höhfeld J., Jentsch S.: GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. *EMBO J.*, 1997; 16: 6209–6216
- [23] Huang Z., Nie L., Xu M., Sun X.H.: Notch-induced E2A degradation requires CHIP and Hsc70 as novel facilitators of ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 8951–8962
- [24] Hwang J.R., Zhang C., Patterson C.: C-terminus of heat shock protein in 70-interacting protein facilitates degradation of apoptosis signal-regulating kinase 1 and inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1-dependent apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, 2005; 10: 147–156
- [25] Imai Y., Soda M., Hatakeyama S., Akagi T., Hashikawa T., Nakayama K.I., Takahashi R.: CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell*, 2002; 10: 55–67
- [26] Jana N.R., Dikshit P., Goswami A., Kotliarova S., Murata S., Tanaka K., Nukina N.: Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 11635–11640
- [27] Jiang J., Ballinger C.A., Wu Y., Dai Q., Cyr D.M., Höhfeld J., Patterson C.: CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 42938–42944
- [28] Kabani M., McLellan C., Raynes D.A., Guerriero V., Brodsky J.L.: HspBP1, a homologue of the yeast Fes1 and Sls1 proteins, is an Hsc70 nucleotide exchange factor. *FEBS Lett.*, 2002; 531: 339–342
- [29] Ko Y.G., Kang Y.S., Park H., Seol W., Kim J., Kim T., Park H.S., Choi E.J., Kim S.: Apoptosis signal-regulating kinase 1 controls the proapoptotic function of death-associated protein (Daxx) in the cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 39103–39106
- [30] Kosik K.S., Shimura H.: Phosphorylated tau and the neurodegenerative foldopathies. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005; 1739: 298–310
- [31] Li L., Xin H., Xu X., Huang M., Zhang X., Chen Y., Zhang S., Fu X.Y., Chang Z.: CHIP mediates degradation of Smad proteins and potentially regulates Smad-induced transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 2004; 24: 856–864
- [32] Marques C., Guo W., Pereira P., Taylor A., Patterson C., Evans P.C., Shang F.: The triage of damaged proteins: degradation by the ubiquitin-proteasome pathway or repair by molecular chaperones. *FASEB J.*, 2006; 20: 741–743
- [33] McNaught K.S., Belzair R., Jenner P., Olanow C.W., Isacson O.: Selective loss of 20S proteasome alpha-subunits in the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 2002; 326: 155–158
- [34] Meacham G.C., Patterson C., Zhang W., Younger J.M., Cyr D.M.: The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat. Cell Biol.*, 2001; 3: 100–105
- [35] Miller V.M., Nelson R.F., Gouvion C.M., Williams A., Rodriguez-Lebron E., Harper S.Q., Davidson B.L., Rebagliati M.R., Paulson H.L.: CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci.*, 2005; 25: 9152–9161
- [36] Murata S., Minami Y., Minami M., Chiba T., Tanaka K.: CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep.*, 2001; 2: 1133–1138
- [37] Nikolay R., Wiederkehr T., Rist W., Kramer G., Mayer M.P., Bukau B.: Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 2673–2678
- [38] Orr H.T., Zoghbi H.Y.: SCA1 molecular genetics: a history of a 13 year collaboration against glutamines. *Hum. Mol. Genet.*, 2001; 10: 2307–2311
- [39] Park H.S., Cho S.G., Kim C.K., Hwang H.S., Noh K.T., Kim M.S., Huh S.H., Kim M.J., Ryoo K., Kim E.K., Kang W.J., Lee J.S., Seo J.S., Ko Y.G., Kim S., Choi E.J.: Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.*, 2002; 22: 7721–7730
- [40] Peng H.M., Morishima Y., Jenkins G.J., Dunbar A.Y., Lau M., Patterson C., Pratt W.B., Osawa Y.: Ubiquitylation of neuronal nitric-oxide synthase by CHIP, a chaperone-dependent E3 ligase. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 52970–52977
- [41] Petrucelli L., Dickson D., Kehoe K., Taylor J., Snyder H., Grover A., De Lucia M., McGowan E., Lewis J., Prihar G., Kim J., Dillmann W.H., Browne S.E., Hall A., Voellmy R., Tsuboi Y., Dawson T.M., Wolozin B., Hardy J., Hutton M.: CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum. Mol. Genet.*, 2004; 13: 703–714
- [42] Raynes D.A., Guerriero V. Jr.: Inhibition of Hsp70 ATPase activity and protein renaturation by a novel Hsp70-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 32883–32888
- [43] Sahara N., Murayama M., Mizoroki T., Urushitani M., Imai Y., Takahashi R., Murata S., Tanaka K., Takashima A.: *In vivo* evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J. Neurochem.*, 2005; 94: 1254–1263
- [44] Scheufler C., Brinker A., Bourenkov G., Pegoraro S., Moroder L., Bartunik H., Hartl F.U., Moarefi I.: Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell*, 2000, 101, 199–210
- [45] Shimura H., Schwartz D., Gygi S.P., Kosik K.S.: CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 4869–4876
- [46] Shin Y., Klucken J., Patterson C., Hyman B.T., McLean P.J.: The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates α -nuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 23727–23734
- [47] Sumanasekera W.K., Tien E.S., Davis J.W. II, Turpey R., Perdev G.H., Vanden Heuvel J.P.: Heat shock protein-90 (Hsp90) acts as a repressor of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) and PPAR β activity. *Biochemistry*, 2003; 42: 10726–10735
- [48] Takeda K., Matsuzawa A., Nishitoh H., Ichijo H.: Role of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct. Funct.*, 2003; 28: 23–29
- [49] Tateishi Y., Kawabe Y., Chiba T., Murata S., Ichikawa K., Murayama A., Tanaka K., Baba T., Kato S., Yanagisawa J.: Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J.*, 2004; 23: 4813–4823
- [50] Woelk T., Sigismund S., Penengo L., Polo S.: The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div.*, 2007; 2: 11
- [51] Xin H., Xu X., Li L., Ning H., Rong Y., Shang Y., Wang Y., Fu X.Y., Chang Z.: CHIP controls the sensitivity of transforming growth factor- β signaling by modulating the basal level of Smad3 through ubiquitin-mediated degradation. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 20842–20850
- [52] Zhang L., Chen J., Fu H.: Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 8511–8515
- [53] Zhang M., Windheim M., Roe S.M., Peggie M., Cohen P., Prodromou C., Pearl L.H.: Chaperoned ubiquitylation – crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Mol. Cell*, 2005; 20: 525–538

