

## **CHIP e o Controlo de Qualidade Proteico durante o Envelhecimento**

Jorge Simão<sup>1</sup>, Henrique Girão<sup>1</sup> e Carla Marques<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> CNC.IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Azinhaga de Sta Comba, Celas,  
3004-548 Coimbra, Portugal

\*Autor de correspondência:

Carla Marques

IBILI - Faculdade de Medicina

Azinhaga de Sta Comba, Celas,

3004-548 Coimbra

Portugal.

Tel: +(351) 239 480225

Fax: +(351) 239 480280

Email: cmarques@fmed.uc.pt

## Resumo

A catarata é clinicamente definida como a perda total ou parcial da transparência do cristalino, sendo associada a vários fatores de risco, como o envelhecimento. O cristalino possui um elevado teor proteico e as modificações das proteínas causam agregação proteica induzindo opacidade do cristalino. De modo a proteger as células de lesões proteicas existem mecanismos de controlo de qualidade proteico que promovem a reparação das proteínas lesadas ou em ultimo caso a degradação das proteínas lesadas. O CHIP é uma proteína que tem capacidade de fazer a ponte entre a reparação e a degradação. O objectivo deste trabalho consistiu em caracterizar um modelo animal que sobreexpressa o CHIP em células epiteliais do cristalino e avaliar o efeito do CHIP na prevenção da catarata. Foram objecto de estudo ratinhos selvagens e ratinhos transgénicos que sobreexpressam o CHIP em células epiteliais do cristalino, e a catarata foi induzida por injeção subcutânea de selénio. A formação de catarata foi avaliada por recurso a observação do cristalino numa lâmpada de fenda e de seguida avaliou-se a percentagem de proteínas insolúveis no cristalino. Os animais transgénico foram identificados através de PCR, usando primers específicos para o transgene inserido no genoma do animal. Os resultados obtidos demonstraram que o CHIP endógeno é expresso em diferentes tecidos mas a sobreexpressão é só detectada no cristalino. Por outro lado, os resultados mostraram que os animais transgénico injectados com selénio apresentavam uma diminuição da opacificação do cristalino em comparação com os ratinhos selvagens injectados com selénio. Os resultados sugerem que a sobreexpressão de uma proteína envolvida no controlo de qualidade proteico, CHIP, parece reduzir a insolubilização proteica e proteger da formação de catarata. Uma vez que muitas doenças relacionadas com o envelhecimento estão associadas à agregação proteica, um aumento dos níveis de CHIP pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

## **Abstract**

Cataracts are clinically defined as the total or partial loss of transparency of the lens, and they are associated with several risk factors, such as aging. The lens has a high protein content and modification of proteins cause protein aggregation that induce lens opacity. In order to protect the cells from protein injuries, there are protein quality control mechanisms that promote the repair of damaged proteins or, at the worst scenario, the degradation of damaged proteins. CHIP is a protein that has got the capacity of bridging the gap between repair and degradation. The aim of this study was to characterize an animal model that overexpresses CHIP lens epithelial cells and evaluates the effect of CHIP in the prevention of cataracts. The subjects of study were a wild mice and a transgenic mice, that overexpress CHIP only on lens epithelial cells, and cataract was induced by subcutaneous injection of selenium. The generation of cataract was evaluated by a slit lamp, and the percentage of insoluble proteins in the lens was then calculated. The transgenic animals were identified by PCR, using specific primers for the transgene inserted into the genome of the animal. The results showed that endogenous CHIP is expressed in different tissues, but the transgene is only detected in lens. Besides that, the results showed that transgenic animals injected with selenium had a decrease in lens opacity when compared with wild mice injected with selenium. The results suggest that overexpression of a protein involved in protein quality control, CHIP, seems to reduce the protein insolubility and protect the formation of cataracts. Once many aging related diseases are associated with protein aggregation, increased CHIP levels can contribute to the development of therapeutic strategies.

Palavras-chave: CHIP, catarata, via da ubiquitina-proteassoma, chaperones

## **Introdução**

O cristalino é um tecido natural, biconvexo e relativamente elástico que está localizado no interior dos olhos, atrás da íris. Histologicamente apresenta a seguinte constituição: cápsula, epitélio, fibras e ligamentos suspensos ou zónulas (1). As fibras mais recentes são progressivamente depositadas sobre as mais velhas em camadas, de modo que o núcleo contém as fibras mais antigas. Não possui enervação nem vascularização e a perda da transparência deste impede que a imagem atinja nitidamente a retina, e designa-se de catarata. A transparência do cristalino deve-se a uma combinação de factores, como a falta de vasos sanguíneos, a disposição compacta das fibras e proteínas, e a manutenção de um estado de relativa desidratação e auto-oxidação (2). O seu conteúdo proteico é superior ao de qualquer outro tecido (cerca de 35% do peso do cristalino), particularidade essencial à manutenção das propriedades ópticas (3). As proteínas estruturais do cristalino podem ser classificadas como solúveis ou insolúveis em água, e com a idade, as proteínas do olho são danificadas, agregam-se e acumulam-se no cristalino, gerando a opacidade do tecido. A perda de transparência do cristalino (catarata) resulta de agregação proteica, perturbações de fase proteica e distúrbios no regular alinhamento e deposição das fibras celulares (4).

A catarata é a principal causa de défices visuais no mundo (5), sendo um fenómeno multifactorial associado a diversos factores de risco, como a idade, condições genéticas, radiação solar (ultravioleta), exposição a tabaco, insultos químicos, entre outros (6). Existem vários modos de induzir a catarata, sendo a sobredosagem de selénio (mineral essencial no organismo humano, mas tóxico em doses elevadas) um dos métodos mais simples. Assim, a injeção de selénio num rato com idade inferior a 16 dias, período crítico de maturação da lente, activa a via proteolítica dependente de cálcio, indução de stress oxidativo e precipitação de

cristalinas (7). A catarata induzida pelo selénio é semelhante à catarata associada com a idade nos humanos (7).

O sistema de controlo de qualidade proteico das células permite que as mesmas, após um insulto, possam reparar as proteínas lesadas ou, em último caso, degradá-las, e desse modo impedir a acumulação de proteínas danificadas, que no caso do cristalino pode proteger da acumulação de proteínas insolúveis que induzam opacificação do cristalino. A capacidade de degradar proteínas é uma função essencial de todas as células eucariotas, desempenhando um papel importante no controlo de qualidade proteico ao eliminar rapidamente proteínas lesadas ou mal enroladas, que apresentam uma conformação tridimensional irregular e cuja acumulação pode interferir com a viabilidade celular. As principais vias proteolíticas das células são a via lisossomal, a via dependente de cálcio e a via da ubiquitina-proteossoma (UPP). A actividade da via UPP diminui com a idade, conduzindo a uma acumulação de cristalinas oxidadas, particularmente no núcleo da lente, contribuindo para agregação e difração da luz (8).

O CHIP consiste numa proteína que desempenha um papel fundamental no sistema de controlo de qualidade proteico das proteínas, nomeadamente porque tem capacidade de interagir com proteínas envolvidas na reparação proteica e na degradação das proteínas, uma vez que pode ubiquitinar as proteínas e dirigi-las para o proteossoma para a degradação e remoção (9, 10). Já foi demonstrado que a sobreexpressão de CHIP diminui a agregação proteica e a morte celular associada a doenças crónicas neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson e de Alzheimer (11-13).

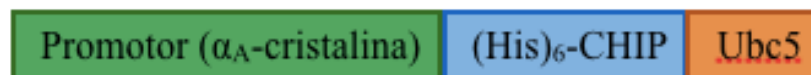
O conhecimento dos mecanismos de controlo de qualidade de proteína pode ajudar a compreender as possíveis falhas neste sistema, que resultam na acumulação de agregados de proteínas danificadas que são encontrados em várias doenças degenerativas assim como no

desenvolvimento de catarata. Neste trabalho pretende-se estabelecer a relação entre a sobre-expressão de CHIP e o controlo proteico.

## Material e Métodos

### Animais

Os animais transgênicos foram obtidos pela microinjeção nuclear de DNA (Figura 1) em ratinhos da estirpe C57BL6, no Instituto Gulbenkian da Ciência (Lisboa, Portugal). Os ratinhos foram mantidos no Biotério da Faculdade Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal, com acesso à ração ad libitum e a água. A temperatura foi mantida a  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e a humidade  $55\% \pm 5\%$ . Os animais foram sujeitos a ciclos de luz/escuridão de 12 horas/12 horas. O protocolo experimental foi conduzido de acordo com o Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, estando por isso de acordo com as normas nacionais para experimentação animal.



**Figura 1:** Representação esquemática do minigene usado na produção de ratinhos transgênicos. Para sobreexpressar CHIP em células epiteliais do cristalino usou-se o promotor  $\alpha$ -cristalina, e o minigene contém a sequência codificadora para o CHIP e de Ubc5.

### Genotipagem

A extracção do DNA dos animais foi obtida de um pedaço de cauda, a qual adicionou-se 500  $\mu\text{l}$  de tampão de extracção (100 mM Tris com e 5 mM EDTA a pH 8 0.2 % SDS) e 2  $\mu\text{l}$  de proteinase K (Invitrogene, Carlsband, CA, EUA). Após estarem durante a noite a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as amostras foram centrifugadas a 13 200 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se à fase superior obtida 500  $\mu\text{l}$  de uma mistura de clorofórmio/fenol (Sigma-Aldrich,

Alemanha). Seguidamente, centrifugou-se a 13 200 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se à fase superior obtida 500 µl de clorofórmio. Após uma nova centrifugação a 13 200 rpm durante 5 minutos, adicionou-se à fase superior 350 µL de isopropanol e 85 µL de acetato de sódio 3 M. Procedeu-se a nova centrifugação da mistura, durante 30 minutos a 13 200 rpm e a 4 °C, e o pellet obtido foi lavado com 500 µl etanol a 80% e centrifugou-se novamente a 13200 rpm durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e deixou-se evaporar o etanol à temperatura ambiente. De seguida o sedimento foi ressuspendido em 50 µL de tampão (10 mM de Tris-HCl a pH 8,5) e colocou-se durante 10 minutos a 70 °C. As amostras de DNA foram submetidas a PCR para detecção de DNA do minigene. O produto de PCR para um animal transgénico deve ter um fragmento de 300 bp. Resumidamente, para a amplificação por PCR, as amostras contendo desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP's), primers específicos (cadeia sense e cadeia antisense, Tabela 1), polimerase, DNA extraído dos ratinhos, foram sujeitas ao seguinte protocolo num termociclador: 2 minutos a 95°C, 32 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58 °C, 25 segundos a 72 °C), 10 minutos a 72 °C e deixar a 4 °C. As amostras foram posteriormente sujeitas a electroforese num gel de agarose (0,8 %) com brometo de etídeo e visualizadas num transluminador com luz UV e registadas as bandas com o auxílio do sistema GelDoc (BioRad, Hemel Hempstead, Reino Unido).

**Tabela 1 - Sequência dos primers usados no PCR**

Cadeia Sense	ATGATGAATTCATGCGGGCCCAGCAGGCCTGCATT
Cadeia Antisense	GCAGGTCGACTCAGTAGTCCTCCACCCAGCCATTCTA (final CHIP).

## **Indução de cataratas nos ratinhos com selênio**

Os animais com 10 dias de idade foram injectados subcutaneamente com uma solução salina (Grupo I) ou com uma solução de selênio 30  $\mu$ moles/kg peso corporal (Grupo II). Após 6 dias de injeção os animais foram anestesiados e os olhos observados numa lâmpada de fenda.

## **Homogeneização do cristalino e quantificação proteica**

Os animais foram sacrificados e os olhos enucleados para se retirar o cristalino. Os cristalinos foram homogeneizados em tampão de fosfato contendo 5 mM de EDTA, 2 mM de PMSF, 10 mM de Iodoacetamina e um Cocktail de inibidores proteolíticos (Roche) com um homogenizador mecânico a 4°C. As amostras foram de seguida centrifugadas a 10 000rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, separou-se o sobrenadante (proteínas solúveis, FS) do sedimento. O sedimento foi resuspendido em tampão de fosfato contendo 8 M de ureia suplementado com 2 mM de PMSF, 10 mM de Iodoacetamina e o Cocktail de inibidores proteolíticos sendo de seguida submetido a ultrasons. Após centrifugação a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi retirado e conservado, representando a fracção insolúvel (proteínas insolúveis, FI). Após homogeneização a proteína foi determinada na FS e FI pelo método de Bradford, distribuído pela BioRad (segundo as instruções do fabricante), sendo realizada a leitura de absorvância a 655 nm.

**Tabela 2: caracterização dos anticorpos primários utilizados na marcação dos western blots.**

<b>Anticorpo</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>	<b>Empresa</b>
$\alpha$ A-B cristalina	Rabitt	1:2000	Cell Signaling(Boston, MA, EUA)
CHIP	Goat	1:1000	abcam

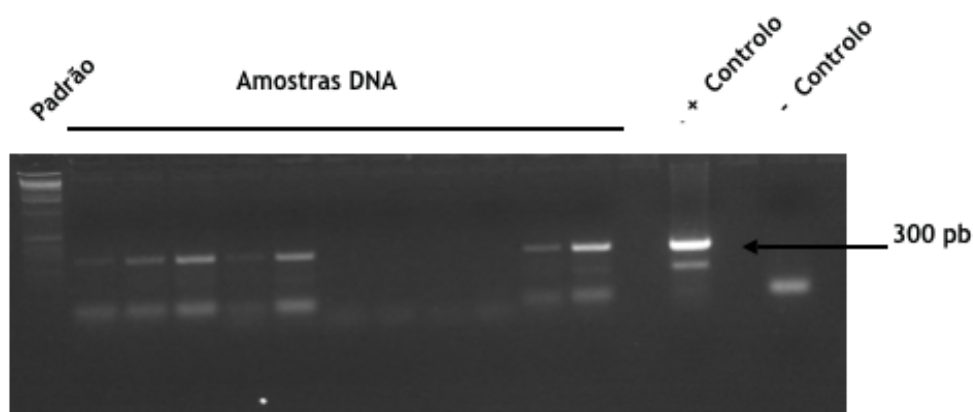


## **Western blot analysis**

As proteínas desnaturadas foram separadas num gel de 12% de poliacrilamida, em condições desnaturantes. As proteínas foram electrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad, Hemel Hempstead, Reino Unido) durante 90 minutos, a 100 V e a 4°C. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com 5% (m/v) de leite magro em tampão salino com Tween-20 (TST) à temperatura ambiente sob agitação. De seguida, foram incubadas durante 1 hora com um anticorpo primário (Tabela 2) diluído em TST com 5% (m/v) de leite magro. O anticorpo que não se ligou foi removido por lavagem das membranas durante 30 minutos em TST sob agitação. A membrana foi incubada com anticorpos conjugado com a peroxidase, diluídos em TST (1:25 000) e leite magro 5% (m/v), foi incubado com a membrana durante uma hora sob agitação e à temperatura ambiente. Após lavagem da membrana, os imunocomplexos foram visualizados por quimioluminescência utilizando o reagente ECL e o sistema VERSADOC Quantity one.

## Resultados

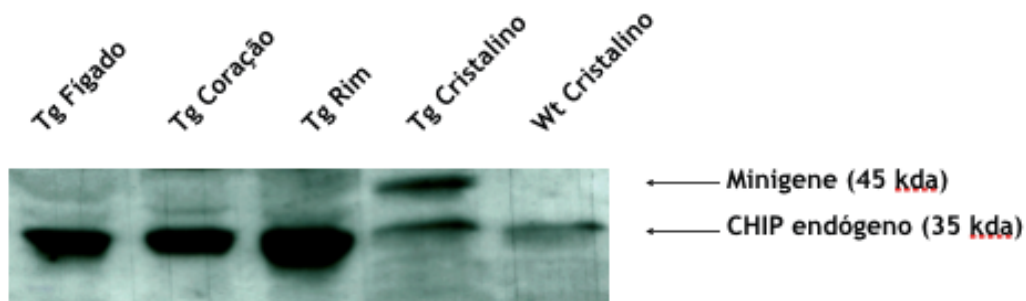
A linhagem de ratinhos utilizada é heterozigótica, pelo que se torna necessário genotipar os animais a cada ninhada. O DNA foi amplificado por PCR, após tratamento de um fragmento de cauda. Na figura 2 temos o exemplo de um gel de agarose das amostras obtidas após PCR, visualizado num transluminador de luz UV e fotografado. O fragmento que nos indica que se trata de um animal transgénico (Tg) tem o peso de 300 pb. Os ratinhos que não apresentam esse fragmento, são considerados normais (WT).



**Figura 2:** Genotipagem dos ratinhos. A extração de DNA é realizada segundo o método de fenol/clo-rofórmio, e a amostra precipitada com isopropanol/acetato de sódio. As amostras são amplificadas num termociclador e posteriormente corridas num gel de agarose a 0,8% com brometo de etídeo, e visualizadas num transluminador com luz UV. O segmento amplificado tem aproximadamente 300 pb.

A figura 3 mostra que a proteína CHIP é expressa em todos os tecidos analisados, nomeadamente no cristalino, fígado, coração e rins, mas o minigene introduzido no genoma do animal apenas é expresso no cristalino de animais Tg. O peso molecular do CHIP endógeno é de 35 KDa, no entanto, no caso dos cristalinos extraídos aos animais Tg verifica-se o aparecimento de mais uma banda de aproximadamente 45 kDa quando se usa o anticorpo contra a proteína CHIP, correspondente à parte do transgene que sobreexpressa CHIP. Esta mesma ban-

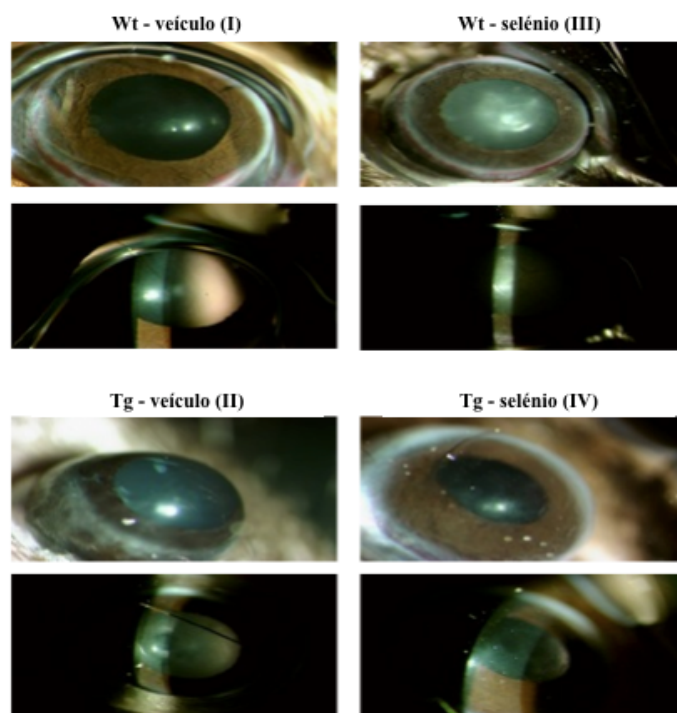
da não aparece nos outros tecidos analisados, o que comprova que a expressão do transgene é restrita ao cristalino.



**Figura 3:** Expressão do CHIP nos diferentes tecidos. Os tecidos de animais Tg e WT foram homogeneizados em tampão de Laemmli e submetidos a western blot e analisadas com um anticorpo contra CHIP. (Tg - transgênico; WT- selvagem).

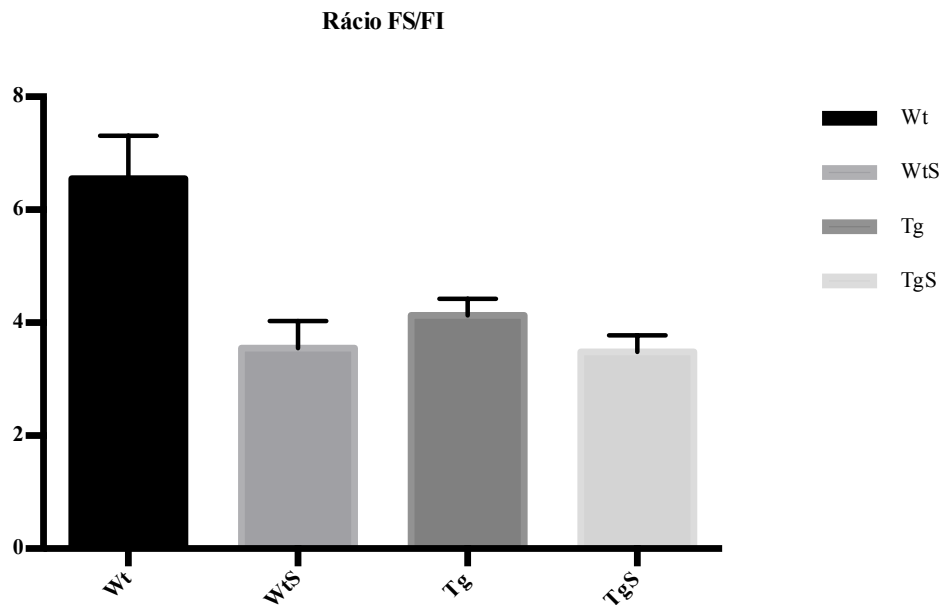
A indução da catarata foi realizada por injeção subcutânea de selênio, em animais WT e Tg, aos 10 dias de idade, tal como descrito na secção dos métodos. Após 6 dias avaliou-se numa lâmpada de fenda os olhos destes animais, e os resultados mostram que os animais Tg apresentam menos catarata comparados com os animais WT injectados com selênio (Figura 4).

As 4 imagens superiores correspondem aos grupos controlo e mostram o aumento da opacidade do cristalino quando se injecta selênio subcutâneo, em relação à injeção salina. Este é um resultado esperado, e que comprova a eficácia do método de selênio na indução de cataratas (7). Os resultados obtidos com os ratinhos Tg mostram um grau menor de opacificação, com injeção de selênio em comparação com os animais WT submetidos ao selênio.



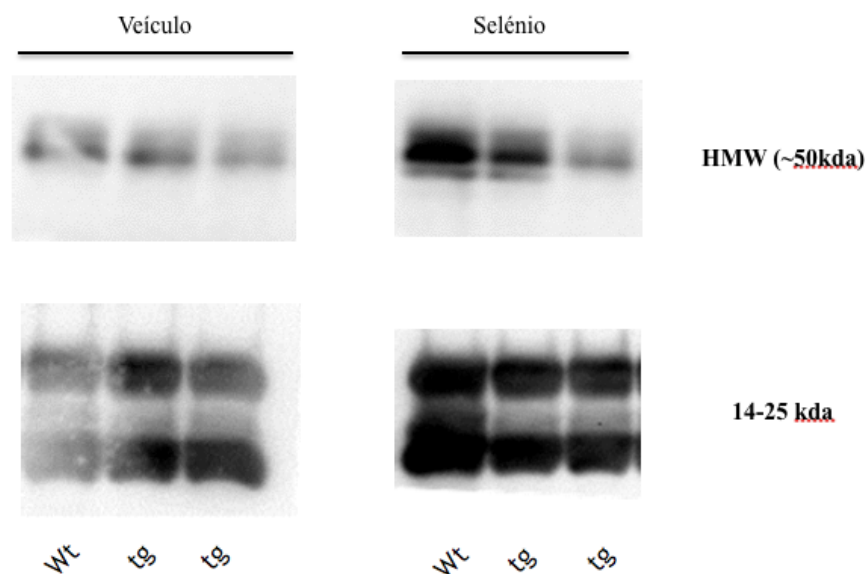
**Figura 4:** Avaliação da opacificação dos cristalinos de animais controlo (Wt) e transgénicos (tg) com uma lâmpada de fenda: Ratinhos controlo (I e III) e ratinhos transgénicos (II e IV) injectados com selénio (III e IV) com veículo (solução salina) (I e II). As fotografias foram tiradas aos 16 dias de idade, com recurso a uma lâmpada de fenda.

De seguida, procedeu-se à avaliação da solubilidade das proteínas de homogeneizados totais de cristalinos, quantificando a fracção de proteínas solúveis e insolúveis, quer dos animais Tg quer dos WT, injectados ora com uma solução salina de controlo ora com selénio. Os resultados mostram que a injeção de selénio, que mostrou induzir catarata (Figura 4), induz também uma diminuição da quantidade de proteínas solúveis em ratinhos WT, quando comparadas com os animais injectados com o veículo (Gráfico 1). Em ratinhos Tg, não foram observadas alterações significativas na razão de proteínas solúveis a insolúveis entre os ratinhos injectados com selénio ou com veículo (Gráfico 1).



**Gráfico 1:** Quantificação proteica em homogeneizados dos cristalinolitos dos ratinhos. As proteínas solúveis (FS) e insolúveis (FI) em água foram avaliadas. Resultados a partir de n=10 e apresentados através da média + EPM (p-value <0,05) (Wt - ratinhos normais sujeitos a injeção salina; WtS - ratinhos normais sujeitos a injeção de selênio; Tg - ratinhos transgênicos sujeitos a injeção salina; TgS - ratinhos transgênicos sujeitos a injeção de selênio).

Tem sido descrito que a actividade chaperone da  $\alpha$ -cristalina é essencial para manter a transparência do cristalino (14). A degradação destas proteínas devido aos mecanismos proteolíticos dependentes de cálcio que ocorrem no cristalino na catarata induzida por selênio (14, 15), pode comprometer a sua transparência óptica e resultar na insolubilização proteica. Os resultados apresentados na figura 5 mostram os níveis de  $\alpha$ -cristalina, e sugerem que um aumento da expressão de  $\alpha$ -cristalina nos Tg, em relação aos WT. No entanto, após injeção com selênio os ratinhos WT tem maior quantidade de  $\alpha$ -cristalina (figura 5).



**Figura 5:** Efeito do selênio nos níveis de  $\alpha$ -cristalina . Os cristalinos dos ratos foram homogeneizados e posteriormente desnaturados. De seguida procedeu-se à análise por western blot para  $\alpha$ -cristalina.

## Discussão

O controlo proteico surge como condição fundamental para um bom desempenho do metabolismo celular, surgindo na literatura imensas associações entre a desregulação desse fenómeno e o envelhecimento (16, 17). Neste trabalho usando um modelo animal transgénico que sobreexpressa uma proteína que faz a ligação entre os sistemas de reparação e de degradação, que constituem o sistema de controlo de qualidade das proteínas nas células, pretendeu-se avaliar o efeito na acumulação de proteínas lesadas. De facto, o cristalino é o tecido ideal para este tipo de estudo: maioritariamente constituído por proteínas; núcleo com baixa atividade metabólica e, conseqüentemente, com turnover proteico reduzido; com o envelhecimento vai ocorrendo deposição proteica de forma continuada (desde o período gestacional até à morte do organismo); além de que acumulação/agregação proteica é facilmente avaliada neste tecido.

A indução das cataratas em ratos de 10-14 dias com uma única injeção de selénio é um método já descrito na literatura e que conduz à formação de uma catarata semelhante á catarata associada ao envelhecimento (7). Através das imagens obtidas pela lâmpada de fenda (Figura 3), foi possível observar a opacificação do cristalino dos ratinhos normais, quando sujeitos à injeção de selénio, contrastando com o observado nos ratinhos transgênicos, nos quais se verifica uma menor perda de transparência do cristalino após injeção do selénio. Por outro lado, uma desregulação do sistema de controlo proteico leva a uma acumulação de proteínas lesadas, o que no caso do cristalino leva a uma perda de transparência e formação de catarata. Assim, os resultados obtidos dos níveis de proteínas solúveis e insolúveis mostram que no modelo animal com sobreexpressão da CHIP, existe uma maior capacidade do sistema de controlo de qualidade e por isso uma menor quantidade de proteínas insolúveis.

A  $\alpha$ -cristalina assume um papel fulcral na preservação da transparência do cristalino, não só por ser um dos principais constituintes das proteínas citoplasmáticas, mas também pela sua actividade de chaperona. Tem a capacidade de manter a conformação e estrutura de outras proteínas, conservando-as no seu estado nativo. A sua acção é particularmente relevante na preservação das  $\beta$ - e  $\gamma$ -cristalinas, formando com estas complexos solúveis, mas também se aplica a inúmeras enzimas e proteínas funcionais, como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase. Com a idade, e devido à ausência de síntese de nova proteína, ocorre uma depleção de  $\alpha$ -cristalina no núcleo do cristalino (2). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a sobreexpressão de CHIP conduz a uma diminuição dos níveis de  $\alpha$ -cristalina nas células do cristalino. Os mecanismos envolvidos na formação de catarata pelo selénio parece levar a um aumento dos níveis de  $\alpha$ -cristalina de alto peso molecular. Esse aumento de  $\alpha$ -cristalina, parece estar a ser combatido pela sobreexpressão de CHIP nos ratinhos transgênicos.

Hoje em dia sabe-se que muitas patologias relacionadas com o envelhecimento, incluindo a formação de catarata, estão associadas à acumulação de proteínas lesadas. São muitos os factores que naturalmente causam danos proteicos e em condições de stress as células podem responder realizando um controlo de qualidade através da actuação do sistema de chaperones moleculares ou da via do proteossoma dependente da ubiquitina, reconhecendo as proteínas mal enroladas ou parcialmente desnaturadas, impedindo a sua acumulação (18, 19). Alguns estudos descrevem que em condições de stress oxidativo ocorre a inibição do proteossoma, o que também é consistente com os resultados obtidos de aumento dos níveis de conjugados de ubiquitina com o stress (20). Através dos resultados obtidos pela observação da transparência do cristalino dos animais transgénicos e pela análise do perfil de proteínas, os resultados sugerem que a sobreexpressão da CHIP nas células epiteliais do cristalino pode reduzir a insolubilização proteica e proteger da formação de catarata. Uma vez que muitas doenças relacionadas com o envelhecimento estão associadas à agregação proteica, um aumento de CHIP pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de forma a preveni-las. É importante conhecer e aprofundar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no sistema de controlo de qualidade de proteínas, uma vez que pode ser usado de forma a evitar uma série de alterações fisiopatológicas associadas ao envelhecimento.



## Bibliografia

1. Augusteyn R. Growth of the human eye lens. *Molecular Vision*. 2007;Vol. 13:252-7.
2. Bron AJ, Michael R. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Phil Trans R Soc B*. 2011;Vol. 366:1278-92.
3. Petrash J. Aging and Age-Related Diseases of the Ocular Lens and Vitreous Body. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;Vol. 54 No. 14:ORSF54–ORSF9.
4. Beebe D, Holekamp N, Shui Y. Oxidative damage and the prevention of age-related cataracts. *Ophthalmic Res*. 2010;Vol. 44(3):155-65.
5. Ackland P. The accomplishments of the global initiative VISION 2020: The Right to Sight and the focus for the next 8 years of the campaign. *Indian J Ophthalmol*. 2012;60(5):380-6.
6. Gupta VB, Rajagopala M, Ravishankar B. Etiopathogenesis of cataract: an appraisal. *Indian J Ophthalmol*. 2014;62(2):103-10.
7. Shearer TR, Ma H, Fukiage C, Azuma M. Selenite nuclear cataract: review of the model. *Mol Vis*. 1997;3:8.
8. Santhoshkumar P, Sharma K. Lens Aging: Effects of Crystallins. *Biochim Biophys Acta*. 2009;Vol 1790 (10):1085-108.
9. Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY, et al. 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(6):4535-45.
10. Hohfeld J, Cyr DM, Patterson C. From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep*. 2001;2(10):885-90.
11. Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, Akagi T, Hashikawa T, Nakayama KI, et al. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*. 2002;10(1):55-67.
12. Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, et al. In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem*. 2005;94(5):1254-63.
13. Dickey CA, Patterson C, Dickson D, Petrucelli L. Brain CHIP: removing the culprits in neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*. 2007;13(1):32-8.
14. Kyselova Z. Different experimental approaches in modelling cataractogenesis: An overview of selenite-induced nuclear cataract in rats. *Interdiscip Toxicol*. 2010;3(1):3-14.
15. Nahomi RB, Wang B, Raghavan CT, Voss O, Doseff AI, Santhoshkumar P, et al. Chaperone peptides of alpha-crystallin inhibit epithelial cell apoptosis, protein insolubilization, and opacification in experimental cataracts. *J Biol Chem*. 2013;288(18):13022-35.
16. Morimoto RI. Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev*. 2008;22(11):1427-38.
17. Nillegoda NB, Bukau B. Metazoan Hsp70-based protein disaggregases: emergence and mechanisms. *Front Mol Biosci*. 2015;2:57.
18. Mattoo RU, Goloubinoff P. Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(17):3311-25.
19. Diaz-Villanueva JF, Diaz-Molina R, Garcia-Gonzalez V. Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):17193-230.
20. Pajares M, Jimenez-Moreno N, Dias IH, Debele B, Vucetic M, Fladmark KE, et al. Redox control of protein degradation. *Redox Biol*. 2015;6:409-20.