

Recebido em 15 de julho de 1987

Aspectos bioquímicos da degradação celular de proteínas

por

RICARDO M. BOAVIDA FERREIRA

Engenheiro Agrônomo, Ph. D., Departamento de Botânica
Instituto Superior de Agronomia

RESUMO

O "turnover" de proteínas é hoje reconhecido como um componente relevante na regulação dos sistemas biológicos. Porém, a importância fisiológica da degradação proteica só muito recentemente foi devidamente apreciada, embora as suas vias e mecanismos de regulação ainda sejam mal conhecidos. Neste trabalho é apresentada uma revisão dos conhecimentos actuais sobre as diversas vias de degradação celular de proteínas, quer em bactérias, quer em células animais e vegetais. É dada ênfase aos aspectos relacionados com as células vegetais, embora a grande maioria dos trabalhos até hoje realizados se refira ao caso das células animais.

SYNOPSIS

Protein turnover is now recognized as an importante component in the regulation of biological systems. However, the physiological significance of protein breakdown has only recently been appreciated. The physiological role of cellular protein degradation is discussed. Despite the physiological importance of protein breakdown, its pathways and regulation are still poorly understood. The pathways of cellular protein breakdown are reviewed, not only in bacteria, but also in animal and plant cells. Special reference is made in the case of plant cells, although most work has been concerned with animal cells.

1. O "TURNOVER" DE PROTEÍNAS

O "turnover" das proteínas é hoje reconhecido como um componente importante na regulação dos sistemas biológicos. Este processo implica a ocorrência simultânea de síntese e degradação de proteínas, tendo sido definido por HUFFAKER e PETERSON (1974) como "o fluxo de aminoácidos através de proteínas". A maioria das proteínas celulares estão sujeitas a intenso "turnover", isto é, estão continuamente a ser sintetizadas e degradadas e, mesmo quando a concentração de uma dada proteína se mantém constante durante um certo intervalo de tempo, ela está, no entanto, a ser sintetizada e degradada simultaneamente.

A degradação de proteínas é um mecanismo integrante do processo mais geral de "turnover" e consiste na hidrólise enzimática das proteínas com libertação dos seus aminoácidos constituintes. Tal como no caso da desintegração de isótopos radioactivos, a degradação de proteínas obedece a um modelo exponencial. Do mesmo modo, a semivida de uma proteína é definida como o tempo necessário para que seja degradada metade do número de moléculas de proteína inicialmente presentes. Uma das características importantes do "turnover" de proteínas é a sua natureza aleatória. Isto é, as moléculas de proteína (ou as suas subunidades) a serem degradadas são "seleccionadas" aleatoriamente, isto é, a probabilidade de uma molécula de uma dada proteína ser degradada é idêntica, quer ela tenha acabado de ser sintetizada quer não.

À semelhança do que acontece com as taxas de síntese proteica, as taxas de degradação das proteínas são reguladas com precisão, tanto em células eucariotas como em bactérias. As taxas a que as proteínas são degradadas variam dentro duma gama bastante ampla. Algumas proteínas, sintetizadas no embrião humano ainda se encontram presentes no olho, 70 ou mais anos após a sua formação. Outras proteínas existem durante toda a vida da célula em que ocorrem - a hemoglobina, por exemplo, é estável durante os 3 meses de vida média de um eritrócito (CREIGHTON, 1984). Mas são muito poucas as proteínas que têm uma duração tão longa como a dos exemplos acabados de referir.

As semividas das proteínas individuais de uma célula ou de um organito podem também variar algumas centenas de vezes.

Embora tenha sido estimada uma semivida média de 3,5 dias para as proteínas de fígado de rato, os valores conhecidos de semividas de enzimas específicas deste mesmo tecido variam de 11 min a 19 dias (GOLBERG e DICE, 1974). SHANKLIM *et al.* (1986) referem que as duas formas de fitocromo de aveia (interconvertíveis pela luz) têm semividas diferentes: 100 h para a forma fisiologicamente inactiva, que absorve luz vermelha, e 1 h para a forma fisiologicamente activa, que absorve luz no vermelho longínquo. A mesma proteína pode ter também semividas diferentes em tecidos diferentes do mesmo organismo. FRITZ *et al.* (1969), por exemplo, mostraram que são diferentes as semividas da isoenzima 5 da lactato desidrogenase de fígado de rato, de músculo do coração e de músculo estriado. A Tabela I mostra as taxas de degradação de algumas proteínas, determinadas em condições fisiológicas normais. Por outro lado, existem mecanismos nas células que regulam a taxa global de degradação proteica (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976).

TABELA I — Taxas de degradação de algumas proteínas

Proteína	Tecido	Semivida
Ornitina descarboxilase	Fígado de rato	11 min
RNA polimerase I	Fígado de rato	1,3 h
Tirosina aminotransferase	Fígado de rato	1,5 h
Triptofano oxigenase	Fígado de rato	2 h
Fosfoenolpiruvato carboxicinasase	Fígado de rato	6 h
Hexocinasase	Fígado de rato	1 dia
Acetil-CoA carboxilase	Fígado de rato	2 dias
Gliceraldeído fosfato desidrogenase	Fígado de rato	3-4 dias
Arginase	Fígado de rato	4-5 dias
α -Actinina	Músculo do coração de rato	5-6 dias
Miosina (subunidade grande)	Músculo do coração de rato	5-6 dias
Miosina (subunidade pequena)	Músculo do coração de rato	9 dias
Actina	Músculo do coração de rato	7-8 dias
Troponina	Músculo estriado de coelho	10-15 dias
α -Actinina	Músculo estriado de coelho	20-25 dias
Miosina	Músculo estriado de coelho	30 dias
Actina	Músculo estriado de coelho	>50 dias

Extraído de CREIGHTON (1984).

2. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DO "TURNOVER" DE PROTEÍNAS

Uma vez que tanto a síntese de proteínas como a sua degradação são energeticamente dispendiosos para a célula, para que a degradação não seja um processo exclusivamente dissipador de energia terá de prover os organismos vivos com algumas vantagens selectivas. Só recentemente foi devidamente apreciado o significado fisiológico da degradação de proteínas (GOLDBERG e DICE, 1974; GOLDBERG e ST. JOHN, 1976; DAVIES, 1982; HERSHKO e CIECHANOVER, 1982). Variações da concentração de proteínas intracelulares podem ser conseguidas por uma alteração regulada das suas taxas de síntese, de degradação, ou de ambas - e quanto maiores forem essas taxas, maior o grau de controlo possível do teor da proteína. GOLDBERG e DICE (1974) e GOLDBERG e ST. JOHN (1976) propuseram que as enzimas cujas actividades limitam o fluxo de substratos através de vias metabólicas desenvolveram semividas particularmente curtas, de tal modo que a sua concentração intracelular possa flutuar rapidamente e com precisão em resposta a alterações ambientais. A evidência necessária ao estabelecimento da correlação entre taxas de degradação e posicionamento das enzimas nas vias metabólicas teve base na observação de que, em fígado de rato, as 16 proteínas com semividas mais curtas (de entre as conhecidas) eram importantes pontos de controlo metabólico, o que não acontecia com as 10 proteínas cujas semividas eram especialmente longas (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976).

Consequentemente, o "turnover" contínuo de proteínas deve aumentar significativamente a capacidade do organismo se adaptar prontamente a alterações no seu meio ambiente (GOLDBERG e DICE, 1974). O processo de adaptação ocorre pela síntese de um conjunto de proteínas apropriado ao novo ambiente, assim como pela remoção daquelas que já não são necessárias - a degradação terá de ser selectiva para ser funcionalmente eficaz (BALLARD, 1978). Esta adaptação é especialmente importante em condições de carência de nutrientes (as quais aceleram a degradação de proteínas), para que as células possam degradar proteínas "de luxo", as quais vão fornecer os aminoácidos necessários à biossíntese das proteínas mais essenciais à sobrevivência. Assim, HUM-

PHREY *et al.* (1977) e COOKE *et al.* (1979b, 1980b) mostraram que a transferência de *Lemna minor* para condições adversas ou de stress conduz a um decréscimo na síntese proteica, a um grande aumento na degradação proteica e uma consequente perda de proteína solúvel. Com a gradual adaptação das plantas à situação de stress, a taxa de proteólise, inicialmente rápida, diminui à medida que o complemento enzimático mais apropriado é sintetizado. Aqueles autores verificaram ainda que quando as plantas submetidas a stress eram incubadas em meio completo (e, portanto, na ausência de stress), não se detectava qualquer alteração na taxa de degradação proteica. Este resultado sugere que a adaptação a boas condições de crescimento se processa por um aumento na taxa de síntese proteica, a partir de um fornecimento abundante de precursores, ao contrário do que se passa em condições de stress, em que a síntese é reduzida e o fornecimento de aminoácidos está limitado aos que se libertam pela degradação proteica.

As taxas de degradação das proteínas celulares podem também variar sob condições que afectem a fisiologia da célula, tais como crescimento, diferenciação, etc. (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976). É o que se passa, por exemplo, com a maturação dos reticulócitos em animais (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982), ou com a formação do septo e esporulação na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (JONES, 1984). Nas plantas, a degradação da proteína de reserva durante a germinação de sementes é um pré-requisito nutricional para a planta em desenvolvimento, ao passo que a degradação da proteína foliar durante a senescência da folha fornece aminoácidos que são exportados e armazenados de uma ou outra forma para reutilização no ciclo vegetativo seguinte (DAVIES, 1982; MATILE, 1982).

Existe actualmente consenso sobre a importância da degradação proteica, em células eucariotas e bacterianas, no reconhecimento selectivo e na hidrólise rápida de proteínas estruturalmente anormais e potencialmente perigosas, as quais podem ser originadas por mutações (PLATT *et al.*, 1970), por erros na expressão genética (GOLDBERG, 1972; GOFF e GOLDBERG, 1986), por terminação prematura das cadeias polipeptídicas devido à incorporação de puromicina (GOLDBERG, 1972), por incorporação de certos análogos de aminoácidos (GOLDBERG, 1972; CANUT *et al.*, 1986), ou através de engenharia genética (GOFF e GOLDBERG, 1985).

Uma outra função fisiológica do catabolismo proteico resulta

da utilização de proteínas e aminoácidos na gluconeogénese ou directamente como fonte de energia, em situações de adaptação à fome (GOLDBERG e DICE, 1974; GOLDBERG e ST. JOHN, 1976; DAVIES, 1982). Tal parece ocorrer à custa de proteínas que não são essenciais à sobrevivência do organismo (BALLARD, 1978). Sabe-se, há muito tempo, que o fornecimento de hidratos de carbono a um organismo em jejum protege a proteína do corpo (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976). Embora seja necessária energia metabólica para a proteólise intracelular, SHECHTER *et al.* (1973) e PINE (1975) mostraram, em bactérias, que condições susceptíveis de provocar um decréscimo moderado nos níveis celulares de ATP podem estimular a degradação proteica. GOLDBERG e ST. JOHN (1976) sugeriram que este aumento na proteólise vai fornecer substratos para o metabolismo energético.

Existe, actualmente, uma lista longa de proteases conhecidas (RECHSTEINER, 1985). Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, as proteases distribuem-se por vários compartimentos celulares, nos quais ocorre proteólise, incluindo o vacúolo, mitocôndrio, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, membrana plásmica, periplasma e citoplasma (JONES, 1984). Contudo, nas células e nos organismos decorre uma variedade de processos que dependem da acção de proteases, para além dos envolvidos no "turnover" de proteínas. É o caso da maturação pós-traducional de proteínas, digestão de proteínas exógenas, etc. As peptidases de trânsito, por exemplo, são necessárias para remover a pré-sequência ou sequência sinal, indispensável ao transporte das proteínas dentro da célula e sua distribuição pelos diferentes organelos celulares. Por outro lado, outras proteases são necessárias à remoção da pró-sequência, assegurando o correcto enrolamento da proteína e a expressão da sua actividade biológica (PONTREMOLI e MELLONI, 1986). Por isso, a identificação de uma protease não implica, necessariamente, o seu envolvimento no "turnover" proteico.

3. AS VIAS DE DEGRADAÇÃO PROTEICA

Apesar da grande importância fisiológica da degradação proteica, as suas vias e regulação estão ainda muito mal esclarecidas. Nas células eucariotas e bacterianas existem sistemas degradativos distintos, os quais podem hidrolisar classes diferentes de proteínas ou manifestarem actividade apenas em certas condições fisiológicas ou em situações patológicas (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976). A hipótese da presença de mais de uma via catabólica é apoiada por observações que mostram terem os inibidores da síntese proteica, tais como puromicina, cicloheximida e cloranfenicol, efeitos diferenciais no nível básico da degradação proteica e na degradação estimulada pelo stress (HERSHKO e TOMPKINS, 1971; KNOWLES e BALLARD, 1976; AMENTA e BROCHER, 1980). Em células eucariotas é principalmente sob condições de carência nutricional que se observa uma significativa degradação lisossomal da proteína intracelular, enquanto que os mecanismos não-lisossomais, dependentes do ATP, são provavelmente responsáveis pela maior parte do "turnover" altamente selectivo das proteínas intracelulares em condições metabólicas normais (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976; HERSHKO e CIECHANOVER, 1982; CIECHANOVER *et al.*, 1984).

3.1. A VIA DEPENDENTE DA UBIQUITINA

Reconhece-se, hoje em dia, a existência de sistemas não-lisossomais de degradação de proteínas numa grande variedade de células (PONTREMOLI e MELLONI, 1986). Um sistema proteolítico, dependente do ATP, presente num homogenato obtido a partir de reticulócitos, foi primeiramente demonstrado por ETLINGER e GOLDBERG (1977). Esta via não-lisossomal de degradação proteica é dependente da ubiquitina e ocorre não só em reticulócitos mas também em vários outros tipos de células eucariotas, tanto animais (HERSHKO *et al.*, 1982; FINLEY *et al.*, 1984; HAAS e BRIGHT, 1985) como vegetais (VIERSTRA *et al.*, 1985a, b, 1986). SHANKLIN *et al.* (1986) mostraram recentemente que a degradação do fitocromo de aveia se processa pela via proteolítica dependente da ubiquitina.

A ubiquitina é um polipéptido pequeno (76 aminoácidos; peso molecular = 8600), resistente às altas temperaturas. Foi, pela primeira vez, isolado intacto e a sua função proteolítica identificada por HERSHKO e colaboradores (CIECHANOVER *et al.* 1980; HERSHKO e CIECHANOVER, 1982; HAAS e BRIGHT, 1985).

Tal como o seu nome sugere, a ubiquitina tem sido encontrada em todos os eucariotas examinados até à data, incluindo algumas espécies de plantas (GOLDSTEIN *et al.*, 1975; VIERSTRA *et al.*, 1985a, b, 1986). VIERSTRA e colaboradores detectaram a presença de ubiquitina em folhas verdes, caules estiolados e sementes secas de aveia. Parece estar bem estabelecido que os procariotas não possuem ubiquitina (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982; KOLATA, 1986), embora GOLDSTEIN *et al.* (1975) tenham referido a sua detecção em bactérias, por ensaio radioimunológico (utilizando anticorpos produzidos em coelho contra a ubiquitina bovina). A sua sequência de aminoácidos mostra um elevado grau de conservação ao longo da evolução e, embora os genes de ubiquitina sejam significativamente diferentes no que respeita à sequência de nucleótidos, eles codificam sequências de aminoácidos idênticas devido à redundância do código genético (FINLEY e VARSHAVSKY, 1985). A ubiquitina é idêntica em todos os animais examinados até ao presente, desde insectos ao homem (VIERSTRA *et al.*, 1986). Apenas a ubiquitina de aveia e de levedura apresentam sequências de aminoácidos diferentes (em 3 posições) da sequência animal, totalmente conservada no decurso do processo evolutivo (RECHSTEINER, 1985; VIERSTRA *et al.*, 1986). A sua ocorrência generalizada e o elevado grau de conservação da sua sequência sugerem fortemente uma função celular fundamental e básica, de ocorrência universal (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982; HERSHKO, 1983).

A ubiquitina é uma proteína com múltiplas funções (RECHSTEINER, 1985) e com vários papéis regulatórios importantes (Tabela II), que resultam da sua capacidade de se ligar covalentemente a uma larga gama de outras proteínas, tanto citoplasmáticas como nucleares (CIECHANOVER *et al.*, 1984; FINLEY e VARSHAVSKY 1985). Na realidade, a ubiquitina ocorre nas células tanto na forma livre como ligada covalentemente a outras proteínas. Esta ligação dá-se entre o grupo carboxílico da glicina terminal da ubiquitina e grupos amina livres das outras proteínas, constituindo uma ligação peptídica (caso do grupo amina livre ser α) ou uma ligação isopeptídica (caso do grupo amina livre ser ϵ). O conteúdo total

de ubiquitina em cultura de células humanas foi referido como sendo 0.2% (p/p) da proteína total (HAAS e BRIGHT, 1986).

No núcleo, a ubiquitina tem sido encontrada conjugada a duas proteínas específicas, as histonas H2A e H2B (GOLDKNOFF e BUSH, 1977). Uma vez que esta associação é aparentemente reversível, com libertação enzimática de moléculas livres e não degradadas

TABELA II — *Algumas propriedades da ubiquitina.*

Proteína constituída por 76 aminoácidos
Elevado grau de conservação ao longo da evolução
Forma ligações covalentes com histonas
Necessária para a proteólise intracelular
Proteína de choque térmico
Possui actividade proteolítica

de ubiquitina e histona (ANDERSEN *et al.*, 1981a, b), o processo deve representar um tipo especial de modificação proteica que não está envolvido na degradação de proteínas. Tem sido sugerido que a ubiquitinação de histonas pode desempenhar um papel regulatório na expressão genética (VIERSTRA *et al.*, 1985b, 1986).

No citoplasma, a conjugação da ubiquitina parece ser um passo obrigatório para a degradação dependente do ATP de muitas proteínas, particularmente das que exibem semividas curtas (CIECHANOVER *et al.*, 1984; HERSHKO *et al.*, 1984). Este sistema proteolítico não é lisossomal, tem um pH óptimo levemente alcalino, e não é sensível aos inibidores das proteases lisossomais (GOLDBERG *et al.*, 1978; HERSHKO e CIECHANOVER, 1982). O sistema é constituído por vários componentes essenciais (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982; HERSHKO *et al.*, 1986). A ubiquitina liga-se covalentemente aos substratos proteicos numa reacção dependente do ATP, na qual várias moléculas do polipéptido se associam a uma molécula de proteína por ligações isopeptídicas. O sistema

de ligação ubiquitina-proteína é formado por 3 elementos: uma enzima activadora da ubiquitina (E_1), proteínas transportadoras da ubiquitina (E_2), e uma terceira enzima (E_3), a qual contém o centro de ligação da proteína. Contudo, têm sido descritos outros tipos de sistemas de ligação ubiquitina-proteína (PICKART e ROSE, 1985; CIECHANOVER *et al.*, 1986; FERBER e CIECHANOVER, 1986). Assim que uma molécula de proteína é marcada com uma ou mais moléculas de ubiquitina, ela pode seguir duas vias diferentes: (i) ser rapidamente degradada por uma protease de elevado peso molecular, dependente do ATP e inibida por hemina, com libertação de moléculas de ubiquitina livres e reutilizáveis (HERSHKO *et al.*, 1984), ou (ii) ser reciclada para a forma nativa por uma isopeptidase que quebra apenas as ligações isopeptídicas (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982; RECHSTEINER, 1985). As três enzimas do sistema de ligação são também necessárias na degradação dos conjugados ubiquitina-proteína (HERSHKO, 1983).

Embora a importância fisiológica da via da ubiquitina em plantas superiores não seja ainda conhecida (VIERSTRA *et al.*, 1985b), evidência bioquímica e genética recentemente obtida indica que, em animais, esta via é essencial para a degradação selectiva das proteínas intracelulares e, conseqüentemente, para a viabilidade das células (CIECHANOVER *et al.*, 1984; FINLEY *et al.*, 1984; FINLEY e VARSHAVSKY, 1985). De facto, estes autores usaram uma linha de células de rato, mutante na via da ubiquitina, para mostrar que nestas células eucariotas aquela via é responsável pela degradação das proteínas estruturalmente anormais e pela maioria (>90%) das proteínas de semivida curta.

O modo pelo qual a ubiquitina aumenta a taxa de degradação das proteínas é ainda desconhecido. Pode servir como um sinal que permite que os conjugados ubiquitina-proteína sejam reconhecidos por proteases específicas, ou pode diminuir a estabilidade da estrutura das proteínas após a conjugação, de maneira a aumentar a sua susceptibilidade a proteases não-específicas (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982; FINLEY e VARSHAVSKY, 1985).

3.2. OUTRAS VIAS PROTEOLÍTICAS NÃO-LISSOSSOMAS

Para além da via proteolítica descrita, dependente da ubiquitina e ATP, têm sido encontradas, noutros sistemas biológicos, outras vias proteolíticas não-lissossomais, dependentes do ATP. Um

processo proteolítico dependente do ATP em *Escherichia coli* está envolvido na inativação proteolítica do repressor do bacteriófago lambda (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982). A enzima responsável por esta reacção é o produto do gene *recA*, sendo uma proteína com múltiplas funções (ROBERTS *et al.*, 1978).

Outra protease de *E. coli* dependente do ATP é o produto do gene *lon* (CHARETTE *et al.*, 1981; CHUNG e GOLDBERG, 1981), denominada protease La (GOLDBERG *et al.*, 1982), a qual parece catalisar um passo inicial na degradação *in vivo* da maioria das proteínas estruturalmente anormais e também de certas proteínas normais (WAXMAN e GOLDBERG, 1986). GOFF e GOLDBERG (1985) mostraram, em *E. coli*, que a indução da síntese de polipéptidos estruturalmente anormais causa um aumento de 2 a 3 vezes na expressão do gene *lon*. Além disso, mutações do gene *lon* que codificam uma protease La defeituosa, não têm efeito na degradação da grande maioria das proteínas normais de *E. coli* (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976), mas decrescem 2 a 4 vezes a taxa de degradação das proteínas estruturalmente anormais (KOWIT e GOLDBERG, 1977; GOTTESMAN e ZIPSER, 1978). A protease La é uma proteína citossólica, que contém centros de ligação para péptidos, proteínas, ATP e DNA (CHIN *et al.*, 1986; KLEMES *et al.*, 1986). WAXMAN e GOLDBERG (1986) mostraram recentemente que a protease La pode hidrolisar tanto péptidos pequenos como proteínas grandes, mas enquanto que a enzima requer a hidrólise do ATP para a degradação de proteínas, no caso de oligopeptidos ela requer apenas a ligação de ATP.

VOELLMY e GOLDBERG (1981) mostraram a presença de uma actividade proteolítica dependente do ATP associada com a membrana plásmica de *E. coli*, a qual se encontra presente em níveis normais em mutantes do gene *lon* que não possuem uma protease La funcional (KLEMES *et al.*, 1986).

A protease La difere da protease dependente do ATP presente nos reticulócitos nos seguintes aspectos (RECHSTEINER, 1985): a enzima de reticulócitos requer a conjugação prévia dos substratos proteicos com moléculas de ubiquitina, não utiliza trifosfato de uridina, e requer uma concentração igual ou superior a 2 mM de vanádio para ser inibida (em contraste com a protease La, a qual é inibida por concentrações tão baixas como 10 μ M de vanádio - WAXMAN e GOLDBERG, 1982). A protease La e a ubiquitina são ambas proteínas de choque térmico (ANANTHAN *et al.*, 1986).

Embora a protease La seja diferente da produzida pelo gene *recA*, ambas possuem algumas características idênticas (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982): qualquer delas se liga ao DNA e exibe uma actividade de ATPase que é estimulada pelo DNA e outros polinucleótidos, sendo ambas proteínas com múltiplas funções. Contudo, enquanto que a hidrólise do ATP não é necessária para a actividade da proteína do gene *recA* (GRAIG e ROBERTS, 1980), ela é essencial à proteólise catalisada pela protease do gene *lon* (CHARETTE *et al.*, 1981; CHUNG e GOLDBERG, 1981).

À semelhança do que acontece no caso das bactérias e citoplasma das células eucariotas, os mitocôndrios também contêm uma via dependente do ATP para a degradação completa das suas proteínas, assim como uma protease dependente da hidrólise do ATP, a qual está presente na matriz mitocondrial e é apenas activa a pH alcalino. Esta protease difere da protease dependente do ATP do citoplasma das células eucariotas, mas é semelhante à protease La de *E. coli* (DESAUTELS e GOLDBERG, 1982a, b). Estes autores referem que 30 a 50% das várias proteínas sintetizadas em mitocôndrios isolados de fígado de rato são degradadas a aminoácidos no período de 1 h após a sua síntese, mas que as proteínas estruturalmente anormais são degradadas ainda mais depressa (80% por h). Assim sendo, esta via parece remover selectivamente as proteínas estruturalmente anormais.

Está hoje bem assente que os cloroplastos possuem um sistema proteolítico, dependente do ATP, capaz de degradar as suas próprias proteínas. Uma vez que mitocôndrios e cloroplastos têm muitas características em comum com os procariotas (DESAUTELS e GOLDBERG, 1982b; MATILE, 1982), tal via poderá estar relacionada com os sistemas degradativos encontrados em bactérias e mitocôndrios, podendo ter funções idênticas. DALLING *et al.* (1983) e TANG e HUFFAKER (1985) detectaram actividades proteolíticas associadas com todas as subfracções de cloroplastos de cevada, e LIU e JAGENDORF (1984) e MALEK *et al.* (1984) mostraram, em cloroplastos isolados de ervilheira, que proteínas acabadas de sintetizar são degradadas por um processo proteolítico estimulado pelo ATP. SCHMIDT e MISHKIND (1983) detectaram um mecanismo proteolítico que está constitutivamente presente em cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*, o qual degrada rápida e selectivamente a subunidade menor (importada do citoplasma) da ribulose bifsosfato carboxilase na ausência da subunidade maior (sinteti-

zada nos cloroplastos) desta enzima.

3.3. A VIA LISSOSSOMAL DE DEGRADAÇÃO PROTEICA

3.3.1. CÉLULAS ANIMAIS

O lisossoma foi durante muito tempo considerado como o principal local da degradação de proteínas em células animais, devido ao seu muito elevado conteúdo em enzimas proteolíticas. Contudo, é importante notar que certas células, tais como reticulócitos e bactérias, contêm poucos ou nenhuns lisossomas, respectivamente (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976). Os lisossomas são organelos delimitados por membrana, contendo uma série de enzimas hidrolíticas apenas activas a pH ácido. A matriz intralissossomal é mantida a pH 4,6 - 5,0 devido à actividade de uma bomba de prótons (uma ATPase; MELLMAN *et al.*, 1986). Estudos vários sobre o papel dos lisossomas na degradação intracelular de proteínas mostraram que: (i) as proteases lisossomais são sensíveis a alguns inibidores pouco comuns, tais como a leupeptina, pepstatina, antipainá, quimostatina (LIBBY *et al.*, 1980; LIBBY e GOLDBERG, 1981; CREIGHTON, 1984); (ii) a autofagia lisossomal é inibida por inibidores da síntese proteica (puromicina, cicloheximida) e por inibidores da formação dos microtúbulos (vimblastina, colchicina) (AMENTA *et al.*, 1977; ROTE e RECHSTEINER, 1983); (iii) bases fracas, tais como cloreto de amónio, cloroquina ou metilamina, são inibidores das proteases lisossomais. O mecanismo desta inibição resulta da natureza relativamente lipofílica das formas não protonadas daquelas bases, que podem, por isso, penetrar rapidamente as membranas de células e vacúolos. Uma vez dentro do ambiente ácido do lisossoma, as bases tornam-se protonadas e demasiadamente polares para que possam escapar. O equilíbrio favorece a sua acumulação dentro do organelo e, como consequência, o pH deste aumenta 1 a 2 unidades, o que inibe as proteases lisossomais (ROTE e RECHSTEINER, 1983; MELLMAN *et al.*, 1986).

A absorção directa de proteínas por parte dos lisossomas não tem sido observada. Muito provavelmente, estes organismos actuam nas proteínas intracelulares por autofagia celular, em que um volume discreto de citoplasma ou um organelo é sequestrado por membrana e depois fundido com um lisossoma. Tal

mecanismo não apresenta selectividade em relação às proteínas sequestradas (BALLARD, 1978; DICE *et al.*, 1978). Esta sequência de acontecimentos está bem documentada por estudos de microscopia electrónica.

A principal dificuldade em admitir que toda a degradação basal de proteína é levada a cabo pela via lisossomal resulta da observada selectividade da degradação proteica que ocorre em condições metabólicas normais. Se se assumir que a taxa de proteólise no lisossoma é maior do que a taxa de entrada das proteínas naquele organito, a obtenção de diferentes taxas de degradação para as proteínas terá que envolver especificidade no mecanismo autofágico de absorção, adsorção selectiva das proteínas às membranas lisossomais, etc. Contudo, até ao presente não existe evidência para a ocorrência de qualquer daquelas hipóteses (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976). Se, por outro lado, se assumir que a taxa de entrada das proteínas no lisossoma é maior do que a taxa de proteólise, então a selectividade da degradação proteica será determinada pelas propriedades estruturais das proteínas em degradação e independente da natureza do sistema proteolítico do lisossoma. Este modelo requer um equilíbrio entre as proteínas dentro e fora do lisossoma, com a sua concentração no citoplasma a exercer grandemente a concentração lisossomal. Foi obtida alguma evidência em favor desta hipótese pela observação, em vacúolos de plantas (os quais, segundo a hipótese de MATILE, são equivalentes aos lisossomas), que uma quantidade significativa de proteínas acabadas de sintetizar aparecem no vacúolo num período de 18 h após a sua síntese (CANUT *et al.*, 1985).

Accepta-se, hoje em dia, que as proteínas associadas a membranas e as que entram nas células por endocitose são degradadas dentro dos lisossomas. Este ponto de vista é apoiado pela observação de que inibidores do funcionamento dos lisossomas inibem selectivamente a degradação de várias proteínas de membranas e a hidrólise de um número de proteínas extracelulares importadas pela célula, sem afectarem a degradação da proteína celular (LIBBY *et al.*, 1980; LIBBY e GOLDBERG, 1981; ROTE e RECHSTEINER, 1983). No entanto, não se conhece até que ponto os lisossomas participam no "turnover" contínuo das proteínas intracelulares solúveis em condições metabólicas normais. É interessante notar que algumas proteases lisossomais desempenham um papel importante na proteólise limitada de algumas enzimas

citossólicas. É o caso, por exemplo, da cathepsina M, a qual, localizada na superfície externa dos lisossomas, tem acesso directo a substratos citossólicos, catalisando uma proteólise limitada na aldolase (PONTREMOLI e MELLONI, 1986).

HERSHKO e CIECHANOVER (1982) definiram várias classes de proteínas celulares com características distintas de degradação: (i) proteínas de vida longa, constituindo a maior parte da proteína celular, com taxas de "turnover" relativamente baixas; (ii) proteínas de vida curta, uma classe de proteínas com uma taxa de "turnover" excepcionalmente elevada; (iii) proteínas estruturalmente anormais, degradadas ainda mais rapidamente que as proteínas de vida curta. Nas células animais, a informação existente sugere fortemente que a degradação das proteínas de vida curta e das proteínas estruturalmente anormais se dá pela via dependente da ubiquitina (HERSHKO, 1983; CIECHANOVER *et al.*, 1984; FINLEY e VARSHAVSKY, 1985). Na verdade, a degradação destas duas classes de proteínas não é afectada pela carência de nutrientes, por inibidores da síntese proteica, ou por inibidores das proteases lisossomais (EPSTEIN *et al.*, 1975; AMENTA *et al.*, 1980; HERSHKO e CIECHANOVER, 1982).

Nas células animais, o aumento da degradação das proteínas de vida longa causado por carência de nutrientes parece ser da responsabilidade da via lisossomal (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982; CIECHANOVER *et al.*, 1984; GRONOSTAJSKI *et al.*, 1985). Contudo, a situação não é clara no que diz respeito ao envolvimento desta via na degradação basal (i.e., na ausência de stress) das proteínas de vida longa, havendo mesmo resultados que levam a conclusões opostas. Em células em fase de crescimento rápido, os inibidores do funcionamento dos lisossomas não têm praticamente efeito na degradação das proteínas de vida longa, sugerindo o envolvimento de uma via catabólica não-lisossomal (GRONOSTAJSKI *et al.*, 1985). A maior parte da evidência que sugere o envolvimento dos lisossomas na degradação basal das proteínas de vida longa provém de estudos que utilizaram células que não estavam em fase activa de crescimento (NEFF *et al.*, 1979; HERSHKO e CIECHANOVER, 1982). É possível que a proporção de proteínas de vida longa que são degradadas pela via lisossomal aumente em tecidos cujas células não estejam em crescimento (sendo a carência de nutrientes um caso extremo), de tal modo que as con-

tribuições relativas dos sistemas lisossomal e não-lisossomal não seja uma característica fixa da célula, mas dependa da sua taxa de crescimento (LIBBY e GOLDBERG, 1981; GRONOSTAJSKI, 1985). Também é possível que a proporção relativa de funcionamento destas duas vias varie com o tecido ou espécie. No fígado, por exemplo, as proteases lisossomais parecem constituir o sistema proteolítico dominante (MORTIMORE *et al.*, 1983; TANAKA *et al.*, 1984), ao passo que os reticulócitos contêm muito poucos lisossomas (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976). Contudo, a evidência actual não exclui a possibilidade de que uma pequena fracção da proteína celular seja degradada dentro dos lisossomas em todas as condições de crescimento. De facto, em células em crescimento, há várias referências que sugerem a ocorrência de uma baixa mas significativa taxa de proteólise no sistema lisossomal (AMENTA e BROCHER, 1980; HERSHKO e CIECHANOVER, 1982).

Poucas dúvidas restam, em células de mamíferos, que a maior parte ou a totalidade da intensificação da degradação proteica devida a carência de nutrientes é levada a cabo pelo sistema lisossomal (HERSHKO e CIECHANOVER, 1982). Esta conclusão é baseada na observação de fortes correlações entre as taxas globais de degradação proteica e alterações nas características estruturais e funcionais do sistema lisossomal (NEELY *et al.*, 1974; GOLDBERG e ST. JOHN, 1976; HERSHKO e CIECHANOVER, 1982), assim como na inibição selectiva da intensificação da degradação proteica por inibidores do funcionamento dos lisossomas (EPSTEIN *et al.*, 1975; KNOWLES e BALLARD, 1976; AMENTA e BROCHER, 1980; ROTE e RECHSTEINER, 1983; GRONOSTAJSKI *et al.*, 1985). WARD *et al.* (1977) e AMENTA e BROCHER (1980) mostraram, sob condições de carência nutricional, que a autofagia lisossomal pode ser estimulada até níveis que correspondem a mais de metade da degradação proteica total da célula. Esta intensificação da degradação observada em condições de privação de nutrientes parece ser prontamente reversível. Na verdade, naquelas condições, o fornecimento de nutrientes (EPSTEIN *et al.*, 1975) ou a inibição do sistema lisossomal (AMENTA e BROCHER, 1980) decrescem rapidamente a taxa de proteólise para o nível basal de degradação.

3.3.2. CÉLULAS BACTERIANAS

Em *E. coli*, a degradação proteica é também muito acelerada sob condições de carência de alguns nutrientes essenciais (Tabela III). Esta intensificação da taxa de proteólise afecta a degradação das proteínas de vida longa, mas não parece afectar a degradação das proteínas de vida curta ou das proteínas estruturalmente anormais. De modo semelhante ao que acontece com as células animais, em *E. coli*, os inibidores de síntese proteica inibem especificamente esta intensificação, a qual é também prontamente reversível (GOLDBERG e ST. JOHN, 1976). Infelizmente não há ainda informação no que se refere ao efeito da carência de nutrientes nas taxas de degradação das proteínas mitocondriais e cloroplásticas.

TABELA III — *Efeito de algumas deficiências nutricionais na degradação proteica e síntese do RNA de Escherichia coli.*

Deficiência	Degradação proteica	Síntese do RNA
Glucose	aumenta	diminui
Azoto	aumenta	diminui
Fósforo	aumenta	diminui
Potássio	aumenta	diminui
Magnésio	aumenta	diminui
Enxofre	aumenta	diminui

Extraído de GOLDBERG e ST. JOHN (1976).

3.3.3. CÉLULAS VEGETAIS

Em 1967, os vacúolos das leveduras foram identificados por MATILE e WIEMKEN como os lisossomas destas células, por conterem uma série de enzimas hidrolíticas. Em 1978, MATILE estendeu este conceito ao vacúolo das plantas superiores, com base em observações morfológicas que mostravam a presença de material citoplásmico parcialmente degradado em vacúolos de plantas,

e no facto da maior parte da actividade proteásica estar localizada nestes compartimentos. Desde então, têm sido publicados numerosos resultados consistentes com esta hipótese, obtidos a partir de vacúolos isolados de uma grande variedade de tecidos vegetais (BOLLER e WIEMKEN, 1986). A maior parte da actividade celular de muitas hidrolases típicas dos lisossomas tem sido encontrada no vacúolo central das células vegetais (BOLLER, 1982). HUFFAKER e colaboradores, por exemplo, verificaram que duas endoproteases (EP1 e EP2) constituem mais de 99% daquela actividade em folhas de cevada, encontrando-se ambas exclusivamente localizadas no vacúolo (MILLER e HUFFAKER, 1982; THAYER e HUFFAKER, 1984). Por outro lado, WIEMKEN *et al.* (1979) verificaram, em células de levedura, que mais de 95% da actividade endoproteolítica total está localizada nos vacúolos. Contudo, VAN DER WILDEN *et al.* (1983) encontraram uma endoprotease altamente activa em folhas de faveira, a qual está exclusivamente presente na parede celular. Tal como acontece no caso dos lisossomas, os vacúolos de leveduras, *Neurospora* e coleóptilos de milho, possuem uma bomba de protões dependente do ATP (MELLMAN *et al.*, 1986).

Estudos com linhas mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que as proteínas vacuolares não estão envolvidas em processos que requeiram especificidade enzimática. Na realidade, elas parecem estar envolvidas na proteólise não específica induzida por carência de azoto (JONES, 1984). CANUT *et al.* (1985, 1986) sugeriram também um papel não específico para o sistema proteolítico dos vacúolos das plantas superiores.

A primeira demonstração directa da função proteolítica dos vacúolos das plantas superiores foi apresentada em 1979 por NISHIMURA e BEEVERS. Estes autores isolaram vacúolos do endosperma de plântulas de *Ricinus communis*, tendo verificado que eles continuam a degradar as proteínas de reserva *in vitro*. Além de estarem envolvidos na degradação das proteínas de reserva durante a germinação de sementes, os vacúolos também parecem estar implicados na degradação proteica estimulada pelo stress (ver abaixo). No entanto, no caso das plantas, existe muito pouca in-

formação no que diz respeito ao papel dos vacúolos na degradação de proteínas em condições metabólicas normais.

CANUT *et al.* (1985) mostraram recentemente que ocorre rápida degradação de proteínas nos vacúolos de culturas de células de *Acer pseudoplatanus* em crescimento activo. Estes autores referem que vacúolos isolados de células previamente marcadas com ^3H -leucina durante 18 h, continham 30% da ^3H -proteína acabada de sintetizar, e que degradaram metade dessa proteína durante 6 h *in vitro*. Subsequentemente, CANUT *et al.* (1986) mostraram, naquelas células, que as proteínas estruturalmente anormais eram degradadas mais rapidamente que as normais, e que a degradação de uma parte importante das proteínas estruturalmente anormais ocorria dentro dos vacúolos. Estas observações contrastam com a situação presente nos animais (ver acima), mas é semelhante ao que se verifica em leveduras (LIU *et al.*, 1984). Uma vez dentro do vacúolo, as proteínas normais e as estruturalmente anormais foram degradadas à mesma taxa por um sistema proteolítico não específico, sugerindo uma transferência preferencial das proteínas estruturalmente anormais para dentro dos vacúolos.

A degradação de proteínas nas células vegetais é estimulada por uma variedade de "stresses" (MOTHES, 1931; HUMPHREY *et al.*, 1977; COOKE *et al.*, 1979a, b). Assim, em condições normais de crescimento, a enzima ribulose bisfosfato carboxilase de plantas C_3 não parece sofrer degradação, sendo rapidamente degradada quando as plantas são submetidas a algumas situações de stress (Tabela IV).

Por outro lado, a semivida média da proteína solúvel de *Lemna minor* é 7,1 dias em condições normais de crescimento, decrescendo para 2,1 dias quando as plantas são incubadas na ausência de nutrientes, para 2,8 dias quando as plantas são incubadas na ausência de azoto, e para 2,5 dias quando as plantas são submetidas a um stress osmótico (COOKE *et al.*, 1979b). Contrariamente ao que se passa com as células animais e bacterianas, em *Lemna minor*, a cicloheximida inibe parcialmente a degradação proteica estimulada pelo stress, mas também inibe parcialmente a taxa

basal do catabolismo proteico (COOKE *et al.*, 1980b). Estes autores mostraram que a intensificação da degradação proteica devida ao stress não parece ser devida a um aumento na actividade de enzimas proteolíticas solúveis. Evidência bioquímica e ultra-estrutural levou COOKE *et al.* (1980a, b) a proporem um modelo geral para a degradação proteica estimulada pelo stress em *Lemna minor*, segundo o qual o stress afectaria a permeabilidade de certas membranas, particularmente o tonoplasto, permitindo uma interacção entre enzimas proteolíticas vacuolares e proteínas citoplasmáticas.

TABELA IV — *Comportamento da ribulose bisfosfato carboxilase de várias espécies no que diz respeito à sua degradação in vivo.*

Espécie	Condições de incubação das plantas	Padrão de degradação	Referências
Trigo e cevada (C ₃)	normais	não se degrada	HUFFAKER e MILLER (1978)
Trigo e cevada (C ₃)	escuro	degrada-se	PETERSON e HUFFAKER (1975) WITTENBACH (1979)
<i>Lemna minor</i> (C ₃)	normais	não se degrada	FERREIRA e DAVIES (1987a)
<i>Lemna minor</i> (C ₃)	escuro	não se degrada	FERREIRA e DAVIES (1987a)
<i>Lemna minor</i> (C ₃)	ausência de azoto	não se degrada	FERREIRA e DAVIES (1987b)
<i>Lemna minor</i> (C ₃)	ausência total de nutrientes, com luz	degrada-se ⁽¹⁾	FERREIRA e DAVIES (1987b)
<i>Lemna minor</i> (C ₃)	ausência total de nutrientes, às escuras	degrada-se ⁽¹⁾	FERREIRA e DAVIES (1987b)
<i>Lemna minor</i> (C ₃)	stress osmótico	não se degrada	DAVIES e FERREIRA (1987)
Milho (C ₄)	normais	degrada-se	SIMPSON <i>et al.</i> (1981)

(¹) Com ambos os tipos de subunidades a serem degradados à mesma taxa.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho procurou fazer-se uma revisão actual dos conhecimentos sobre diversos aspectos da degradação celular de proteínas. Foi dada ênfase aos aspectos relacionados com as plantas, embora a quase totalidade dos trabalhos até hoje realiza-

dos sobre este assunto se refira a células animais e bacterianas. Devido à grande extensão deste tema, vários aspectos ficaram por abordar, nomeadamente a dependência energética das vias de degradação proteica, os mecanismos que regulam e regem a elevada heterogeneidade das taxas de degradação das proteínas, etc.

Uma das áreas menos conhecidas do "turnover" de proteínas está relacionada com a selectividade da degradação proteica. Embora tenha sido publicado um grande número de trabalhos durante as duas últimas décadas, existem hoje vários laboratórios a trabalhar no sentido de tentar conhecer a resposta a perguntas aparentemente simples, como qual o sinal que faz com que uma proteína seja degradada, ou qual o mecanismo pelo qual as proteínas são degradadas a taxas diferentes.

A observação de que a degradação celular de proteínas em condições metabólicas normais é altamente selectiva levou GOLDBERG e ST. JOHN (1976) a proporem que a susceptibilidade ao ataque proteolítico é determinada pelas propriedades físicas das proteínas a serem degradadas, e não pela especificidade do sistema proteolítico. Assim sendo, a semivida de uma proteína é geneticamente determinada e especificada na sua sequência de aminoácidos, a qual prescreve as propriedades estruturais reconhecidas pelo sistema proteolítico. A maior parte da evidência a favor desta hipótese geral foi obtida sob a forma de fortes correlações entre as taxas de degradação *in vivo* de proteínas, determinadas pelo método de dupla marcação radioactiva de ARIAS *et al.* (1969), e propriedades físicas das proteínas, tais como tamanho e carga eléctrica. Contudo, essas correlações nem sempre são fortes, como acontece com as proteínas de *Lemna minor* (FERREIRA e DAVIES, 1986). BACHMAIR *et al.* (1986) propuseram recentemente que a semivida *in vivo* de uma proteína é uma função do aminoácido na extremidade NH₂ da sua cadeia polipeptídica. Usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, aqueles autores conseguiram sintetizar moléculas de β -galactosidase contendo um aminoácido extra na sua extremidade N (X- β gal). Utilizando diferentes aminoácidos X foi possível determinar a taxa de degradação *in vivo* das várias proteínas X- β gal (Tabela V). No entanto, esta questão está longe de ser resolvida, e a resposta não parece ser tão simples como tem vindo a ser proposto.

TABELA V — *Relação entre a semivida in vivo das proteínas de Saccharomyces cerevisiae e o aminoácido da extremidade N das suas cadeias polipeptídicas.*

Resíduo X na extremidade N da proteína X- β gal	semivida da proteína X- β gal
Metionina } Serina } Alanina } Treonina } Valina } Glicina }	>20 h
Isoleucina } Ácido glutâmico }	~30 min
Tirosina } Glutamina }	~10 min
Fenilalanina } Leucina } Ácido aspártico } Lisina }	~ 3 min
Arginina }	~ 2 min

Estão presentemente a decorrer trabalhos em vários laboratórios, os quais irão, sem dúvida, ajudar a tentar desbravar os complexos mecanismos envolvidos na degradação celular das proteínas.

BIBLIOGRAFIA

- AMENTA, J.S., BROCHER, S.C. (1980) — Role of lysosomes in protein turnover: catch-up proteolysis after release from NH_4Cl inhibition. *J. Cell. Physiol.* 102: 259-266.
- AMENTA, J.S., SARGUS, M. J., BACCINO, F.M. (1977) — Effect of microtubular or translational inhibitors on general cell protein degradation: evidence for a dual catabolic pathway. *Biochem. J.* 168: 223-227.
- AMENTA, J.S., SARGUS, M. J., BROCHER, S.C. (1980) — Protein synthesis and degradation in growth regulation in rat embryo fibroblasts: role of fast-turnover and slow-turnover protein. *J. Cell. Physiol.* 105: 51-61.
- ANANTHAN, J., GOLDBERG, A.L., VOELLMY, R. (1986) — Abnormal proteins serve as eucaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232: 522-524.
- ANDERSEN, M.W., BALLAL, N.R., GOLDKNOPF, I.L. BUSCH, H. (1981a) — Protein A24 lyase activity in nucleoli of thioacetamide-treated rat liver releases histone 2A and ubiquitin from conjugated protein A24. *Biochemistry* 20: 1100-1104.
- ANDERSEN, M.W., GOLDKNOPF, I.L. BUSCH, H. (1981b) — Protein A24 lyase is an isopeptidase, *FEBS Lett.* 132: 210-214.
- ARIAS, I.M., DOYLE, D., SCHIMKE, R.T. (1969) — Studies on the synthesis and degradation of proteins of the endoplasmic reticulum of rat liver. *J. Biol. Chem.* 244: 3303-3315.
- BACHMAIR, A., FINLEY, D., VARSHAVSKY, A. (1986) — *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179-186.
- BALLARD, F.J. (1978) — Intracellular protein degradation. *Essays Biochem.* 13: 1-37.
- BOLLER, T. (1982) — Enzymatic equipment of plant vacuoles. *Physiol. Veg.* 20: 247-257.
- BOLLER, T., WIEMKEN, A. (1986) — Dynamics of vacuolar compartmentation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 137-164.
- CANUT, H., ALIBERT, G., BOUDET, A.M. (1985) — Hydrolysis of intracellular proteins in vacuoles isolated from *Acer pseudoplatanus* L. cells. *Plant Physiol.* 79: 1090-1093.

- CANUT, H., ALIBERT, G., CARRASCO, A., BOUDET, A.M. (1986) — Rapid degradation of abnormal proteins in vacuoles from *Acer pseudoplatanus* L. cells. *Plant Physiol.* 80: 460-463.
- CHARETTE, M.F., HENDERSON, G.W., MARKOVITZ, A. (1981) — ATP-dependent protease activity of the *lon* (*cap R*) protein of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4728-4732.
- CHIN, D.T., GOFF, S., TIZARD, D., GOLDBERG, A. L. (1986) — DNA sequence of the *lon* gene, which encodes the ATP-dependent protease La in *Escherichia coli*. *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* 45: 1600.
- CHUNG, C.H., GOLDBERG, A.L. (1981) — The product of the *lon* (*cap R*) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4931-4935.
- CIECHANOVER, A., ELIAS, S., HELLER, H., FERBER, S., HERSHKO, A. (1980) — Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system in reticulocytes. *J. Biol. Chem.* 255: 7525-7528.
- CIECHANOVER, A., FINLEY, D., VARSHAVSKY, A. (1984) — Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 37: 57-66.
- CIECHANOVER, A., WOLIN, S.L., STEITZ, T.A., LODISH, H. F. (1985) — Transfer RNA is an essential component of the ubiquitin and ATP-dependent proteolytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1341-1345.
- COOKE, R.J., GREGO, S., OLIVER, J. DAVIES, D.D. (1979a) — The effect of deuterium oxide on protein turnover in *Lemna minor*. *Planta* 146: 229-236.
- COOKE, R.J., OLIVER, J., DAVIES, D.D. (1979b) — Stress and protein turnover in *Lemna minor*. *Plant Physiol.* 64: 1109-1113.
- COOKE, R.J., GREGO, S., ROBERTS, K., DAVIES, D.D. (1980a) — The mechanism of deuterium oxide-induced protein degradation in *Lemna minor*. *Planta* 148: 374-380.
- COOKE, R.J., ROBERTS, K., DAVIES, D.D. (1980b) — Model for stress-induced protein degradation in *Lemna minor*. *Plant Physiol.* 66: 1119-1122.
- CRAIG, N.L., ROBERTS, J.W. (1980) — *E. coli* *recA* protein-directed cleavage of phage lambda repressor requires polynucleotide. *Nature* 283: 26-30.

- CREIGHTON, T.E. (1984) — *In: Proteins. Structure and molecular principles.* W.H. Freeman and Co., New York.
- DALLING, M.J. TANG, A.B., HUFFAKER, R.C. (1983) — Evidence for the existence of peptide hydrolase activity associated with chloroplasts isolated from barley mesophyll protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 111: 311-318.
- DAVIES, D.D. (1982) — Physiological aspects of protein turnover. *In: Encyclopedia of plant physiology (N.S.), vol. 14A: Nucleic acids and proteins in plants I*, pp 189-228. D. Boulter and B. Parthier eds., Springer-Verlag, Berlin.
- DAVIES, D.D., FERREIRA, R.B. (1987) — Protein turnover under conditions of osmotic stress. Proceedings do Congresso "Drought resistance in plants: physiological and genetic aspects", pp 215-232. Monti, L. e Porceddu, E., eds. Comunidade Económica Europeia (EUR 10700 EN), Luxemburgo.
- DESAUTELS, M., GOLDBERG, A.L. (1982a) — Liver mitochondria contain an ATP-dependent, vanadate sensitive pathway for the degradation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1869-1873.
- DESAUTELS, M., GOLDBERG, A.L. (1982b) — Demonstration of an ATP-dependent, vanadate-sensitive endoprotease in the matrix of rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257: 11673-11679.
- DICE, J.F., WALKER, C.D., BYRNE, B. CARDIEL, A. (1978) — General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 2093-2097.
- EPSTEIN, D., ELIAS-BISLIKO, S., HERSHKO, A. (1975) — Requirement for protein synthesis in the regulation of breakdown in cultured hepatoma cells. *Biochemistry* 14: 5199-5204.
- ETLINGER, J.D., GOLDBERG, A.L. (1977) — A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 54-58.
- FERBER, S., CIECHANOVER, A. (1986) — Transfer RNA is required for conjugation of ubiquitin to selective substrates of the ubiquitin and ATP-dependent proteolytic system. *J. Biol. Chem.* 261: 3128-3134.
- FERREIRA, R.B., DAVIES, D.D. (1986) — Is protein degradation correlated with either the charge or size of *Lemna* proteins? *Planta* 169: 278-288.

- FERREIRA, R.B., DAVIES, D.D. (1987a) — Protein degradation in *Lemna* with particular reference to ribulose biphosphate carboxylase I. The effect of light and dark. *Plant Physiol.* 88: 869-877.
- FERREIRA, R.B., DAVIES, D.D. (1987b) — Protein degradation in *Lemna* with particular reference to ribulose biphosphate carboxylase II. The effect of nutrient starvation. *Plant Physiol.* 89: 878-883.
- FINLEY, D., VARSHAVSKY, A. (1985) — The ubiquitin system: functions and mechanisms. *Trends Biochem. Sci.* 10: 343-347.
- FINLEY, D., CIECHANOVER, A., VARSHAVSKY, A. (1984) — Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* 37: 43-55.
- FRITZ, P.J., VESSELL, E.S., WHITE, E.L., PRUITT, K.M. (1969) — The roles of synthesis and degradation in determining tissue concentrations of lactate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62: 558-562.
- GOFF, S.A., GOLDBERG, A.L. (1985) — Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* 41: 587-595.
- GOLDBERG, A.L. (1972) — Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 422-426.
- GOLDBERG, A.L., DICE, J.F. (1974) — Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Ann. Rev. Biochem.* 43: 835-869.
- GOLDBERG, A.L., ST. JOHN, A.C. (1976) — Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 747-803.
- GOLDBERG, A.L., KOWIT, J., ETLINGER, J. KLEMES, Y. (1978) — In: Protein turnover and lysosome function, pp 171-196. H.L. Segal and D.J. Doyle eds., Academic Press, New York.
- GOLDBERG, A.L., SWAMY, K.H.S., CHUNG, C.H., LARIMORE, F. (1982) — Proteinases in *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* 80: 680-702.
- GOLDKNOPF, I.L., BUSCH, H. (1977) — Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugated-protein A24. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 865-868.

- GOLDSTEIN, G., SCHEID, M., HAMMERLING, U., BOYSE, E.A. SCHLESINGER, D.H., NIAL, H. D. (1975) — Isolation of a peptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 11-15.
- GOTTESMAN, S., ZIPSER, D. (1978) — *Deg* phenotype of *Escherichia coli*. lon mutants. *J. Bacteriol.* 139: 844-851.
- GRONOSTAJSKI, R.M., PARDEE, A.B., GOLDBERG, A. L. (1985) — The ATP dependence of the degradation of short- and long-lived proteins in growing fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 260: 3344-3349.
- HAAS, A.L., BRIGHT, P.M. (1985) — The immunochemical detection and quantitation of intracellular ubiquitin-protein conjugates. *J. Biol. Chem.* 260: 12464-12473.
- HAAS, A.L., BRIGHT, P.M. (1986) — Ubiquitin pool dynamics within cultured lung fibroblasts. *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* 45: 1598.
- HERSHKO, A. (1983) — Ubiquitin: roles in protein modification and breakdown. *Cell* 34: 11-12.
- HERSHKO, A., CIECHANOVER, A. (1982) — Mechanisms of intracellular protein breakdown. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 335-364.
- HERSHKO, A., TOMKINS, G.M. (1971) — Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cell culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. *J. Biol. Chem.* 246: 710-714.
- HERSHKO, A., EYTAN, E., CIECHANOVER, A., HAAS, A.L. (1982) — Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. *J. Biol. Chem.* 257: 13964-13970.
- HERSHKO, A., LESHINSKY, E., GANOTH, D., HELLER, H. (1984) — ATP-dependent degradation of ubiquitin protein conjugates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1619-1623.
- HERSHKO, A., HELLER, H., EYTAN, E., REISS, Y. (1986) — The protein substrate binding site of the ubiquitin-protein ligase system. *J. Biol. Chem.* 261: 11992-11999.
- HUFFAKER, R.C., MILLER, B.L. (1978) — Reutilization of ribulose biphosphate carboxylase. *In: Photosynthetic carbon assimilation*, pp 139-152. H.W. Siegelman e G. Hind Eds., Plenum Press, Londres.

- HUFFAKER, R.C., PETERSON, L.W. (1974) — Protein turnover in plants and possible means of its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 363-392.
- HUMPHREY, T.J., SARAWEK, S., DAVIES, D.D. (1977) — The effect of nitrogen deficiency on the growth and metabolism of *Lemna minor* L. *Planta* 137: 259-264.
- JONES, E.W. (1984) — The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces*: genetic approaches. *Ann. Rev. Genet.* 18: 233-270.
- KLEMES, Y., VOELLMY, R.W., GOLDBERG, A.L. (1986) — A membrane-associated proteolytic activity in *Escherichia coli* that is stimulated by ATP. *Fed Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* 45: 1598.
- KNOWLES, S.E., BALLARD, F.J. (1976) — Selective control of the degradation of normal and aberrant proteins in Reuber H35 hepatoma cells. *Biochem. J.* 156: 609-617.
- KOLATA, G. (1986) — New rule proposed for protein degradation. *Science* 234: 151-152.
- KOWIT, J.D., GOLDBERG, A.L. (1977) — Intermediate steps in the degradation of a specific abnormal protein in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 252: 8350-8357.
- LIBBY, P., GOLDBERG, A.L. (1981) — Comparison of the control and pathways for degradation of the acetylcholine receptor and average protein in cultured muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 107: 185-194.
- LIBBY, P., BURSZTAJN, S., GOLDBERG, A.L. (1980) — Degradation of the acetylcholine receptor in cultured muscle cells. *Cell.* 19: 481-491.
- LIU, X.-Q., JAGENDORF, A.T. (1984) — ATP-dependent proteolysis in pea chloroplasts. *FEBS. Lett.* 166: 248-252.
- LIU, C.J., CHOPRA, A.K., STRNADOVA, M., CHALOUPKA, J. (1984) — Degradation of abnormal proteins in growing yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 21: 313-317.
- MALEK, L., BOGORAD, L., AYERS, A.R., GOLDBERG, A.L. (1984) — Newly synthesized proteins are degraded by an ATP-stimulated proteolytic process in isolated pea chloroplasts. *FEBS Lett.* 166: 253-257.
- MATILE, P. (1978) — Biochemistry and function of vacuoles. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 193-213.

- MATILE, P. (1982) — Protein degradation. *In: Encyclopedia of plant physiology (N.S.)*, vol. 14A: Nucleic acids and proteins in plants I, pp 169-188. D. Boulter and B. Parthier eds., Springer-Verlag, Berlin.
- MATILE, P., WIEMKEN, A. (1967) — The vacuole as the lysosome of the yeast cell. *Arch. Mikrobiol.* 56: 148-155.
- MELLMAN, I., FUCHS, R., HELENIUS, A. (1986) — Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 663-700.
- MILLER, B.L. HUFFAKER, R.C. (1982) — Hydrolysis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by endoproteinases from senescing barley leaves. *Plant Physiol.* 69: 58-62.
- MORTIMORE, G.E., HUTSON, N.J., SURMACZ, C.A. (1983) — Quantitative correlation between proteolysis and macro and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2179-2183.
- MOTHES, K. (1931) — Nitrogen metabolism in higher plants. III. Effect of age and water content of the leaf. *Planta* 12: 686-731.
- NEELY, A.N., NELSON, P.B., MORTIMORE, G.E. (1974) — Osmotic alterations of the lysosomal system during rat liver perfusion: reversible suppression by insulin and amino acids. *Biochem. Biophys. Acta* 938: 458-472.
- NEFF, N.T., MARTINO, G.N., GOLDBERG, A.L. (1979) — The effect of protease inhibitors and decreased temperature on the degradation of different classes of proteins in cultured hepatocytes. *J. Cell. Physiol.* 101: 439-458.
- NISHIMURA, M., BEEVERS, H. (1979) — Hydrolysis of protein in vacuoles isolated from higher plant tissue. *Nature.* 277: 412-413.
- PETERSON, L.W., HUFFAKER, R.C. (1975) — Loss of ribulose 1,5-diphosphate carboxylase and increase in proteolytic activity during senescence of detached primary barley leaves. *Plant. Physiol.* 55: 1009-1015.
- PICKART, C.M., ROSE, I.A. (1985) — Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. *J. Biol. Chem.* 260: 1573-1581.
- PINE, M.J. (1975) — *In: Intracellular protein turnover*, pp 65-76. R.T. Schimke and N. Katunuma eds., Academic Press, New York.

- PLATT, T., MILLER, J.H., WEBER, K. (1970) — *In vivo* degradation of mutant *Lac* repressor. *Nature*. 228: 1154-1156.
- PONTREMOLI, S., MELLONI, E. (1986) — Extralysosomal protein degradation. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 455-481.
- RECHSTEINER, M. (1985) — Ubiquitin-dependent proteolysis in eukaryotic cells. *In: Current topics in plant biochem. and physiol.*, vol. 4. pp 15-24. D.D. Randall, D.G. Blevins and R.L. Larson eds., University of Missouri, Columbia, USA.
- ROBERTS, J.W., ROBERTS, C.W., CRAIG, N.L. (1978) — *Escherichia coli recA* gene product inactivates phage lambda repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4714-4718.
- ROTE, K.V., RECHSTEINER, M. (1983) — Degradation of microinjected proteins: effects of lysosomotropic agents and inhibitors of autophagy. *J. Cell. Physiol.* 116: 103-110.
- SCHMIDT, G.W., MISHKIND, M.L. (1983) — Rapid degradation of unassembled ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunits in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2632-2636.
- SHANKLIN, J., JABEN, M., VIERSTRA, R.D. (1986) — Red light induced formation of phytochrome-ubiquitin conjugates during *in vivo* phytochrome degradation in oats. *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* 45: 1599.
- SHECHTER, Y., RAFAELI-ESHKOL, D., HERSHKO, A. (1973) — Influence of protease inhibitors and energy metabolism on intracellular protein breakdown in starving *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 54: 1518-1524.
- SIMPSON, E., COOKE, R.J., DAVIES, D.D. (1981) — Measurement of protein degradation in leaves of *Zea mays* using [³H] acetic anhydride and tritiated water. *Plant Physiol.* 67: 1214-1219.
- TANAKA, K., WAXMAN, L., GOLDBERG, A.L. (1984) — Vanadate inhibits the ATP-dependent degradation of proteins in reticulocytes without affecting ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* 259: 2803-2809.
- TANG, A.B., HUFFAKER, R.C. (1985) — Proteolytic activities associated with barley chloroplasts. *In: Current topics in plant biochem. and physiol.*, vol. 4, pp243. D.D. Randall, D.G. Blevins and R.L. Larson eds., University of Missouri, Columbia, USA.

- THAYER, S.S., HUFFAKER, R.C. (1984) — Vacuolar localization of endoproteinases EP1 and EP2 in barley mesophyll cells. *Plant Physiol.* 75: 70-73.
- VAN DER WILDEN, W., SEGERS, J.H.L., CHRISPEELS, M.J. (1983) — Cell walls of *Phaseolus vulgaris* leaves contain the azocoll-digesting proteinase. *Plant Physiol.* 79: 576-578.
- VIERSTRA, R.D., LANGAN, S.M., HAAS, A.L. (1985a) — Purification and initial characterization of ubiquitin from the higher plant *Avena sativa*. *J. Biol. Chem.* 260: 12015-12021.
- VIERSTRA, R.D., LANGAN, S.M., SCHALLER, G.E., COLBERT, J.T., HAAS, A.L. (1985b) — Initial characterization of the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in higher plants. In: Current topics in plant biochem. and physiol., vol 4, pp 25-33. D.D. Randall, D.G. Blevins and R.L. Larson eds., University of Missouri, Columbia, USA.
- VIERSTRA, R.D., LANGAN, S.M., SCHALLER, G.E. (1986) — Complete amino acid sequence of ubiquitin from the higher plant *Avena sativa*. *Biochemistry* 25: 3105-3108.
- VOELLMY, R.W., GOLDBERG, A.L. (1981) — ATP-stimulated endoprotease is associated with the cell membrane of *E. coli*. *Nature* 290: 419-421.
- WARD, W.F., COX, J.R., MORTIMORE, G.E. (1977) — Lysosomal sequestration of intracellular proteins as a regulatory step in hepatic proteolysis. *J. Biol. Chem.* 252: 6955-6961.
- WAXMAN, L. GOLDBERG, A.L. (1982) — Protease La from *Escherichia coli* hydrolysis ATP and proteins in a linked fashion *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4883-4887.
- WAXMAN, L. GOLDBERG, A.L. (1986) — Selectivity of intracellular proteolysis: protein substrates activate the ATP-dependent protease (La). *Science* 232: 500-503.
- WIEMKEN, A., SCHELLENBERG, M., URECH, K. (1979) — Vacuoles: the sole compartments of digestive enzymes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)? *Arch. Mikrobiol.* 129: 23-35.
- WITTENBACH, V.A. (1979) — Ribulose biphosphate carboxylase and proteolytic activity in wheat leaves from anthesis through senescence. *Plant Physiol.* 64: 884-887.

