

3.- PEPTIDASAS ASPÁRTICAS EN PLANTAS

3.1. INTRODUCCIÓN

En la *Tabla 1* se resumen algunas propiedades de la mayoría de las peptidasas aspárticas de plantas descritas hasta el presente.

Tabla 1.- Caracterización de peptidasas aspárticas de plantas

Especie	Localización	P.M. (kDa)	Sub-unidad	pH		Referencias
				Óptimo	Sustrato	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Semillas secas		H: 31, 28,5, 15 y 6	3,5		D'Hondt <i>et al.</i> (1993, 1997) Mutlu & Gal (1999) Mutlu <i>et al.</i> (1999)
<i>Brassica napus</i> (colza)	Semillas	28 y 35 (SDS-PAGE)	M	3,5 3,7	Albúmina Hb	D'Hondt <i>et al.</i> (1997)
<i>Brassica oleracea</i> (coliflor)	Semillas	322 Aac (cADN)	221 Aac. 285 Aac.			Fujikura & Karssen (1995)
<i>Cannabis sativa</i> (cáñamo)	Semillas	20 (ultracentrifugación)	1-4	3,4 4,3	Hb Edestina	St Angelo <i>et al.</i> (1969) St Angelo & Ory (1970)
<i>Centaurea calcitrapa</i>	Flores frescas Flores secas	50		4-5		Domingos <i>et al.</i> (1998)
<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	Semillas	40-42 (gel filtración)		3,2	Hb	Polanowski <i>et al.</i> (1985)
<i>Cucurbita ficifolia</i> (alcayota)	Semillas	30 y 11 (SDS_PAGE)	H: 2	3,6	Hb	Stachowiak <i>et al.</i> (1994)

<i>Cucurbita maxima</i> (zapallo)	Semillas	40-42 (gel filtración)		3,6	Hb	Polanowski <i>et al.</i> (1985)
<i>Cynara cardunculus</i> L. (cardo de Castilla)	Flores	46-49 (PAGE y cADN) SDS-PAGE	32,5+16,5 33,5+16,5 35,5+13,5	5,1	FTC-caseína	Heimgartner <i>et al.</i> (1990) Cordeiro <i>et al.</i> (1992; 1994a, b; 1998) White <i>et al.</i> (1999)
		64-67 (Western) SDS-PAGE	31+15 34+14	5	péptido cromóforo	Faro <i>et al.</i> (1992, 1998, 1999) Macedo <i>et al.</i> (1993) Verissimo <i>et al.</i> (1995,1996)
<i>Dieffenbachia maculata</i>	Tallos			5,5	Leche	Padmanabhan <i>et al.</i> (1993)
<i>Drosera peltata</i>	Hojas Tallos Organos trampa			2,3	Caseína	Amagase (1972)
<i>Fagopyrum esculentum</i>	Semillas	28 (gel filtración)		3,5	Albúmina	Belozersky <i>et al.</i> (1984)
<i>Hordeum vulgare</i> L. (cebada)	Semillas	48 y 40	H: 2	3,5- 3,9	Hb	Runeberg-Roos <i>et al.</i> (1991, 1994) Sarkkinen <i>et al.</i> (1992)
	Hojas Raíz	(cADN, SDS-PAGE)	31+16 29+11	3,8- 4,5	Edestina	Kervinen <i>et al.</i> (1993) Törmäkangas <i>et al.</i> (1994) Zhang & Jones (1995)
	Raíz	53 (Western)	31+15 26+ 9			Glathe <i>et al.</i> (1998)
<i>Lycopersicum esculentum</i> L.(tomate)	Hojas	37 (SDS-PAGE)	M	2,5- 3,5	FTC-Hb	Rodrigo <i>et al.</i> (1989) Schaller & Ryan (1996)
<i>Nelumbo nucifera</i> (loto)	Semillas	36-37 (ultracentrif. y gel filtración)		2,4- 3,8	Caseína Hb	Shinano & Fukushima (1971)

<i>Nepenthes macferlanei</i>	urna o ascidia	59 (gel filtración)		2,2	Albúmina Fibrina	Amagase (1969,1972) Takahashi <i>et al.</i> (1974) Tokes <i>et al.</i> (1974)
<i>tabacum</i> (tabaco)		36-40 (gel filtración)	M?	3,0	FTC-Hb	Rodrigo <i>et al.</i> (1991)
<i>Oryza sativa</i> L. (arroz)	Semillas	filtración)	M	2,5	Hb	Doi <i>et al.</i> (1980)
		48 (cADN)		4,2	Caseína	Hashimoto <i>et al.</i> (1992)
		57 (SDS-PAGE)	H? 25+35	3,0	Hb	Asakura <i>et al.</i> (1995a, 1995b, 1997)
<i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto)	Semilla Cotiledo- nes			3,7	Hb	Mikkonen (1986)
<i>Pinus banksiana</i>	Semillas			3,5	Hb	Burgeois & Malek (1991)
<i>Pinus sylvestris</i>	Semillas			3,7	Hb	Salmia (1981) Salmia <i>et al.</i> (1978)
<i>Ricinus communis</i> (ricino)	Semillas	48 29 (SDS-PAGE)	H: 32+16 M	3,0	péptido sintético	Hiraiwa <i>et al.</i> (1997)
<i>Solanum tuberosum</i> L. (papa)	Tubérculo	40 (SDS- PAGE y gel filtración)	M	4 a 5	Hb	Guevara <i>et al.</i> (1999)
<i>Sorghum vulgare</i> (sorgo)	Semillas	80 (gel filtración)		3,6	Albúmina	Garg & Virupaksha (1970)
<i>Spinacia oleracea</i>	Hojas	51	M			Kuwabara & Suzuki (1995)

Theobroma cacao (cacao)	Semillas	45 (SDS-PAGE)	2	3,4	Albúmina	Biehl <i>et al.</i> (1993) Voigt <i>et al.</i> (1994)
Triticum aestivum (trigo)	Hojas verdes	89 (gel filtración)		4,5	Hb	Frith <i>et al.</i> (1978)
	Semilla	50 (gel filtración) 58 (SDS-PAGE)	M	3,0 4,5	Albúmina Gliadina	Belozersky <i>et al.</i> (1989)
xHaynaldosticum sardoum	Semillas	60-100 (gel filtración)		4	Hb	Galleschi <i>et al.</i> (1989)
		66 (gel filtración)		3.1	Péptido cromóforo	Kervinen <i>et al.</i> (1995)
Zea mays L. (maíz)	Polen	33 (SDS-PAGE) 60 (HPLC)	M H: 2?	5,6	FITC-caseína	Radlowski <i>et al.</i> (1996)

H: heterodímero - M: monómero - Hb: hemoglobina.

3.2. ESTRUCTURA PRIMARIA Y TRIDIMENSIONAL

Muchas peptidasas, incluyendo las aspárticas, son sintetizadas como cadenas simples de zimógenos inactivos. Procesamientos proteolíticos postraduccionales producen la enzima madura activa (Tang & Wong, 1987). Así, en la mayoría de las APs se remueve un segmento N-terminal del propéptido y en la catepsina D y en algunas peptidasas de plantas se producen procesamientos posteriores de la cadena simple que generan un dímero activo.

Las secuencias de aminoácidos de las APs de plantas obtenidas a partir de los cADN pueden ser divididas en tres regiones: dominio amino terminal, inserto específico de plantas (PSI) y dominio carboxilo terminal. Los dominios N- y C-terminal muestran alta homología con los correspondiente dominios de las APs microbianas y de mamíferos. La región N-terminal contiene los dos ácidos aspárticos del sitio activo en las secuencias Asp-Thr-Gly y Asp-Ser-Gly. Estas secuencias se conservan en todos los Reinos, aunque

algunas enzimas microbianas y de mamíferos tienen Asp-Thr-Gly en ambos sitios (Mutlu & Gal, 1999).

El PSI es un inserto de alrededor de 100 aminoácidos que no se ha detectado en las APs de mamíferos, hongos, levaduras, protozoarios y virus conocidas. La función de este PSI es desconocida pero la secuencia presenta una considerable homología con la de todas las saposinas conocidas, en cuanto a la conservación y posición de los seis residuos de cisteína, del sitio de glicosilación y del patrón de residuos hidrofóbicos (Vaccaro *et al.*, 1993; Guruprasad *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1997). Las saposinas son un grupo de proteínas activadoras de la β -galactosil ceramidasa y de la β -galactosidasa, enzimas lisosomales de mamíferos. Guruprasad *et al.* (1994) han sugerido que el PSI se uniría a ciertos lípidos y dirigiría a la forma precursora de la AP hacia el compartimiento citomorfológico apropiado, constituyendo por lo tanto la señalización vacuolar de las APs vegetales. Además Zhu & Conner (1994), al detectar que una proteína con similitud antigénica a una saposina se une transitoriamente con la catepsina D humana, proponen que esa interacción podría facilitar el marcado lisosomal de la catepsina en la vía de la manosa 6-fosfato.

También Mutlu & Gal (1999) postulan que el PSI parece no cumplir una función crítica en la actividad enzimática, pues es procesado en algunas APs de plantas y no está presente en las APs de animales. Sugieren que el PSI puede estar involucrado en el marcado o procesamiento de las APs o en alguna otra función específica, como la tolerancia a la desecación de las semillas.

La no exigencia del PSI para que las APs desarrollen su actividad peptidásica es señalada también por Ramalho-Santos *et al.* (1998a, b). Estos autores postulan otras funciones para el PSI de cardosina A; la alta similitud entre las secuencias C-terminal de cardosina A y la señal de marcado vacuolar de la lectina de cebada les sugiere que la señalización estaría dada por el C-terminal y no por el PSI. Proponen que el PSI podría bloquear el sitio activo del cardosinógeno A impidiendo la proteólisis indeseada o actuar como una chaperona intramolecular que permita el correcto plegado de la peptidasa. También plantean que la similitud con las saposinas podría indicar que durante la biosíntesis o la ejecución del rol fisiológico de la peptidasa se requiera el PSI para unir glicoesfingolípidos y/o glicosidasas o que el inserto participe de la vía de transducción de señales.

Al encontrar que la cadena precursora de la cardosina A está asociada con las membranas microsomales de las yemas florales, mientras que la enzima activa generada por remoción del PSI es soluble, Faro *et al.* (1999) proponen que la función primaria del

PSI sería la de facilitar la asociación de los precursores a las membranas del retículo endoplásmico y plasmática.

En un trabajo reciente White *et al.* (1999) describen la obtención de la ciprosina recombinante y observan que cuando se expresa una construcción de nucleótidos carente del PSI se acumula un precursor inactivo (prociprosina), sugiriendo que el PSI cumple el rol de asegurar que el polipéptido naciente sea plegado adecuadamente y susceptible de ser activado para generar la ciprosina madura activa.

Los estudios cristalográficos de la profitepsina, zimógeno de una peptidasa aspártica vacuolar de cebada, indican que esta proteína presenta la estructura bilobulada típica de las enzimas de la familia de la pepsina con el sitio activo entre los dos lóbulos. El PSI forma un dominio independiente unido a la región del C-terminal (Kervinen *et al.*, 1999). Por otro lado, la estructura cristalográfica de la cardosina A incluye dos moléculas glicosiladas que se mantienen unidas por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno y que está formada por la duplicación de un motivo de hojas β antiparalelas y α -hélices (Frazão *et al.*, 1999).

3.3. ROL FISIOLÓGICO

Las APs de plantas identificadas hasta el momento son vacuolares o proteínas secretadas. Precisamente, la aspartil peptidasa de cebada (HvAP) está presente en las vacuolas de granos, flores, tallos, hojas y raíces (Runeberg-Roos *et al.*, 1994; Törmäkangas *et al.*, 1994), las APs de cáñamo (St. Angelo *et al.*, 1969) y las de trigo (Elpidina *et al.*, 1990) están asociadas con cuerpos proteicos intracelulares y aquellas de plantas insectívoras como *Nepenthes* son secretadas en el fluido de la urna (Tökes *et al.*, 1974).

El conocimiento sobre el rol biológico de las APs de plantas es escaso. Se ha propuesto que están involucradas en la hidrólisis de proteínas almacenadas y extracelulares, pero no hay pruebas concluyentes al respecto. Algunos estudios realizados con la finalidad de dilucidar el rol biológico de las APs son mencionados a continuación.

En hojas de tomate y tabaco, las APs se colocalizan con proteínas relacionadas con la patogénesis y podrían regular su acción biológica (Rodrigo *et al.*, 1989, 1991). En semillas de trigo se las asocia con la hidrólisis de proteínas almacenadas (Belozersky *et al.*, 1989; Dunaevsky *et al.*, 1989), al igual que en semillas de cacao (Voigt *et al.*, 1994) y de *Arabidopsis*, donde procesan albúminas 2S almacenadas (D' Hondt *et al.*, 1993). En cebada, la HvAP procesa *in vitro* el C-terminal del precursor de la lectina de cebada y,

dado que las dos proteínas están colocalizadas en las vacuolas de las células de la raíz de embriones en desarrollo, Runeberg-Roos *et al.* (1994) sugieren que la HvAP vacuolar participa en el procesamiento *in vivo* de la lectina. Además, la amplia distribución tisular de la peptidasa de cebada (granos, flores, tallos, hojas y raíces) y su localización intracelular (vacuolar) sugiere que HvAP cumple funciones relacionadas con el procesamiento e intercambio de proteínas en las células vegetales, en forma similar al rol propuesto para enzimas vacuolares/lisosomales de la peptidasa A de levaduras y de la catepsina de mamíferos (Törmäkangas *et al.*, 1994).

La intervención de las APs en los procesos de senescencia se ha mencionado en el caso de las peptidasas encontradas en hojas de naranjo, donde hidrolizan las subunidades larga y corta de la enzima Rubisco (ribulosa-1,5-bis-fosfato carboxilasa/oxigenasa) involucrada en la fotosíntesis (García-Martínez & Moreno, 1986), en la senescencia de hojas y raíces de cebada (Kervinen *et al.*, 1993, Runeberg-Roos & Saarma, 1998) y de flores de cardo (Heimgartner *et al.*, 1990; Cordeiro *et al.*, 1994a). Según Ramalho-Santos *et al.* (1997), la participación de cardosina A en la senescencia floral de *C. cardunculus* L. parece ser una función secundaria, interviniendo en estadios terminales al romperse la membrana vacuolar; esto explicaría la presencia de actividad proteolítica durante varios años en flores secas.

La identificación de la tríada Arg-Gly-Asp (RGD) en la secuencia de aminoácidos deducida del cADN de cardosina A y su interacción con una proteína de 100 kDa del polen llevó a Faro *et al.* (1999) a postular que la cardosina A puede cumplir un rol en los mecanismos de reconocimiento del polen. La secuencia RGD es bien conocida en tejidos de mamíferos por facilitar funciones de reconocimiento celular tales como adhesión, migración, señalización, diferenciación y crecimiento.

3.4. GENES Y EVOLUCION

3.4.1. Estructura de los genes AP

Se ha elucidado la secuencia de los genes que codifican peptidasas aspárticas (genes AP) en cebada (Runeberg-Ross *et al.*, 1991; Sarkkinen *et al.*, 1992), arroz (Asakura *et al.*, 1995b), flores de cardo: ciprosinas y cardosinas (Cordeiro *et al.*, 1994b; Veríssimo *et al.*, 1996), tomate (Schaller & Ryan, 1996), colza (D'Hondt *et al.*, 1997) y *Arabidopsis thaliana* (D'Hondt *et al.*, 1997; Mutlu *et al.*, 1999).

Al comparar la estructura de los genes AP de plantas, animales y hongos, Asakura *et al.* (1995b) concluyen que las peptidasas aspárticas tienen estructuras

genotípicas diferentes, dependiendo de su origen. Llegan a esta conclusión al estudiar la organización del gen orizasina1 de una AP del arroz que consta de 14 exones y 13 intrones y que presenta posiciones de inserción de los intrones totalmente diferentes a las de las APs de origen animal y fúngico (Figura 3). Además, la orizasina1 presenta un exón en el extremo 5' no codificante, estructura nunca descrita en otros genes AP.

En los genes AP de animales (catepsina D humana, quimosina bovina, pepsinógeno humano) se ha encontrado una organización común que consta de 9 exones y 8 intrones, con la sola excepción del gen de la renina humana, que tiene 10 exones y 9 intrones.

Los genes AP de hongos también presentan una diferente organización. La peptidasa A fúngica carece de intrones, la AP de *Rhizopus niveus* (RNAP) tiene un intrón y la aspergil pepsina A de *Aspergillus awamori* está codificada por cuatro exones y tres intrones (Figura 3).

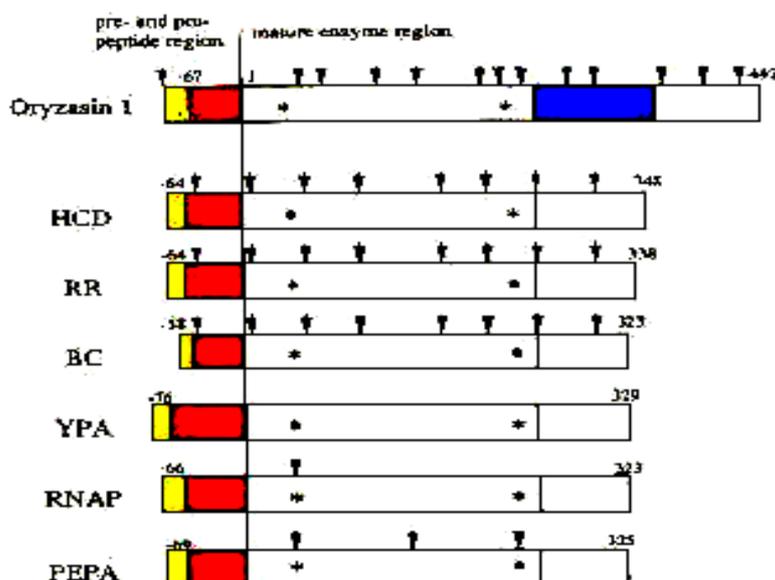


Figura 3.- Esquema de genes de peptidasas aspárticas (Asakura *et al.*, 1995b)

Oryzasin 1: AP de arroz. *HCD*: catepsina D humana. *RR*: renina de rata. *BC*: quimosina bovina.

YPA: AP de levadura. *RNAP*: AP de *Rhizopus niveus*. *PEPA*: aspergil pepsina A.

Las flechas indican las posiciones de los intrones. Los asteriscos señalan la ubicación de los ácidos aspárticos del centro activo. En amarillo se muestra la región del péptido señal, en rojo la región del propéptido y en azul el inserto específico de plantas (PSI).

3.4.2. Posibles procesos evolutivos de los genes AP

La duplicación génica a partir de un gen AP ancestral, durante la evolución molecular de estas peptidasas, ha sido propuesta por varios autores (Asakura *et al.*, 1995b; Veríssimo *et al.*, 1996). Barrett *et al.* (1998) afirman que los dos lóbulos que componen las AP de la familia A1 han derivado por un evento de duplicación, dado que cada lóbulo contiene una secuencia de aminoácidos conservada alrededor del residuo aspártico del centro catalítico y que las estructuras tridimensionales son muy similares.

Asakura *et al.* (1995b) sugieren que los genes APs de animales han retenido la mayoría del genotipo ancestral y si bien los genes APs microbianos han divergido durante la evolución, mantienen alguna similitud con los de animales.

En cuanto a los genes AP de plantas, aunque la conservación de los residuos aspárticos del centro activo indicaría que también son el resultado de una duplicación, la organización génica presenta divergencias en cuanto a la posición de los intrones con los genes AP animales y microbianos. La ubicación de los intrones es muy similar en *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* y *Oriza sativa* pero muy diferente de la localización en las APs de mamíferos (Mutlu & Gal, 1999).