

PEPTIDASAS ASPÁRTICAS DE FLORES DE ASTERACEAE CON POTENCIAL APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

María Laura COLOMBO ^{1,2}, Constanza LIGGIERI ^{1,3} & Sandra VAIRO CAVALLI ^{1,2,*}

¹CIProVe (Centro de Investigación de Proteínas Vegetales) Facultad de Ciencias Exactas-CICPBA, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. ²CONICET, ³Carrera de Personal de Apoyo a la Ciencia y a la Tecnología CICPBA.

* *Autora a quien dirigir la correspondencia. E-mail: svairo@biol.unlp.edu.ar*

RESUMEN	25
PALABRAS CLAVE: bioprospección, fitepsina, flores de cardo	26
SUMMARY	26
Aspartic peptidases from flowers of Asteraceae with potential biotechnological application	26
KEY WORDS: bioprospecting, phytepsins, thistle flowers.	26
INTRODUCCIÓN	26
ESPECIFICIDAD DE SECUENCIA MEDIADA POR ESPECIFICIDAD DE SUBSITIOS	27
MECANISMO CATALÍTICO DE LAS PEPTIDASAS ASPÁRTICAS	28
DISTRIBUCIÓN DE LAS PEPTIDASAS	29
PEPTIDASAS DE PLANTAS	29
Rol fisiológico de las peptidasas vegetales	29
Peptidasas aspárticas de plantas	30
ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PROTEASAS ASPÁRTICAS VEGETALES	30
Organización de la estructura primaria	30
Organización de la estructura terciaria	32
Mecanismos de procesamiento de peptidasas aspárticas	33
PEPTIDASAS ASPÁRTICAS EN FLORES DE CARDO	34
APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS PROTEASAS ASPÁRTICAS	35
Aplicaciones de las peptidasas aspárticas de plantas	36
CONCLUSIONES	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMEN

En las últimas décadas el interés por las peptidasas se ha incrementado significativamente. La gran mayoría de las enzimas comerciales que se emplean se obtienen principalmente de microorganismos. Sin embargo, también pueden ser extraídas de especies vegetales que se presentan como una fuente promisorio de estas moléculas. De hecho, las peptidasas vegetales son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica, biotecnológica y de detergentes, y son candidatas atractivas para el desarrollo de nuevos fármacos y en terapias combinadas. Están ampliamente distribuidas en los organismos vivos. Típicamente presentan un prodominio autoinhibitorio, que debe ser eliminado para activar la enzima. Si bien todas llevan a cabo la misma reacción que consiste en la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, difieren sin embargo, en la especificidad de sustrato, pH óptimo, la temperatura y otros parámetros que hacen que sus propiedades sean únicas, mostrando una gran diversidad funcional. Dentro de estas moléculas, las peptidasas aspárticas (PAs), constituyen una de las principales clases de peptidasas. Las flores de cardo (familia Asteraceae) son una fuente rica de PAs. Con el fin de asegurar una fuente continua de dichas enzimas, las mismas pueden ser obtenidas de su fuente natural o por métodos recombinantes. Debido a sus propiedades características se emplean en diversos procesos industriales. Ejemplos de aplicaciones tradicionales de estas

peptidasas como fabricación de queso así como otras aplicaciones promisorias como la obtención de péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana y citotóxica, acción en la remodelación de la matriz extracelular, inmovilización en esponjas de quitosano, catalizadores en medios orgánicos son discutidas en esta revisión.

PALABRAS CLAVE: bioprospección, fitepsina, flores de cardo

SUMMARY

Aspartic peptidases from flowers of Asteraceae with potential biotechnological application

The interest in peptidase has increased significantly in recent decades. The vast majority of commercial enzymes used in industry are mainly obtained from microorganisms. However, they can also be extracted from plant species that are considered as a promising source of these molecules. In fact, plant peptidasas are widely used in the food, detergent, pharmaceutical and biotechnological industry, and are attractive candidates for the development of new drugs and in combination therapies. They are widely distributed in living organisms. Typically they have a self-inhibitory prodomain, which must be removed to activate the enzyme. While all peptidasas carried out the same reaction, the hydrolysis of protein peptide bonds, they differ in substrate specificity, optimum pH and temperature as well as in other parameters that make their properties unique, showing a great functional diversity. Among these molecules, aspartic peptidasas (APs) are one of the major classes of proteolytic enzymes. Thistle flowers (family Asteraceae) are a rich source of APs. In order to ensure a continuous supply of APs from flowers, they can be obtained from its natural source or by recombinant methods. Because of their distinctive properties APs from thistle flowers are used in various industrial processes. Cheese-making is an example of traditional use of thistle APs, but also other promising applications such as production of bioactive peptides with antimicrobial and cytotoxic activity, remodelling of bone extracellular matrix, immobilization in chitosan sponges for drug delivery, and catalysis in organic media are discussed in this review.

KEY WORDS: bioprospecting, phytepsins, thistle flowers.

INTRODUCCIÓN

Las peptidasas (Rawlings & Barrett, 2014) son proteínas catalíticamente activas que escinden enlaces peptídicos por hidrólisis de proteínas y péptidos (Fig. 1).

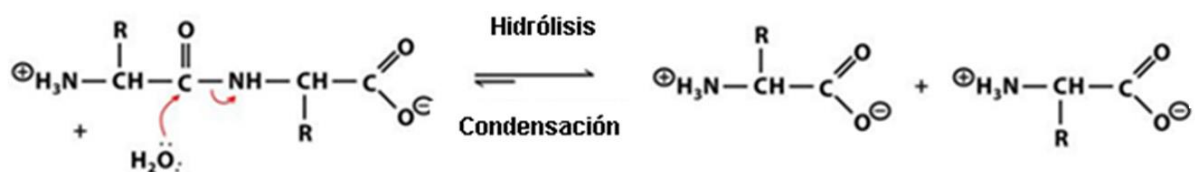


Figura 1. Mecanismo hidrolítico de las peptidasa

En términos evolutivos estas moléculas constituyen probablemente una de las más antiguas familias de enzimas. Casi todos los organismos, incluyendo virus, tiene al menos una peptidasa (Salvesen *et al.*, 2016). Estas enzimas producen el desensamblaje de moléculas proteicas para crear un *pool* de aminoácidos libres necesario para la síntesis de nuevas proteínas. Esta actividad resulta más familiar en el contexto de la digestión de las proteínas de los alimentos en el tracto digestivo de los animales, pero de hecho las peptidasas han evolucionado para realizar innumerables funciones vitales dentro y fuera de las células. Tal vez la más importante de estas funciones es la de procesar proteínas hidrolizando unos pocos clivajes específicos, con frecuencia sólo uno. De este modo, por proteólisis, algunas proteínas son enviadas a la ubicación subcelular correcta o son secretadas; otras proteínas se activan a partir de su precursor latente, lo que es especialmente importante para las enzimas; se liberan uno o más péptidos biológicamente activos a partir de algunas proteínas; mientras que otras proteínas se inactivan. Esta diversificación de funciones ha llevado a que los genes de peptidasas representen entre el 2% y el 5% del total de genes en todo tipo de organismos (Rawlings & Barrett, 2014).

El genoma humano contiene más de 550 genes de peptidasas. Los más abundantes, corresponden a metalo-, cisteín- y serin-proteasas, representados por 191, 178 y 161 genes, respectivamente. Las proteasas treonínicas y aspárticas son de abundancia relativamente baja con sólo 27 y 21 genes, respectivamente. Gracias a su diversidad estructural y funcional llevan a cabo una amplia gama de actividades críticas. La diversificación de sus funciones biológicas deriva de la evolución estructural, que converge en geometrías de sitios activos similares y con variados motivos de reconocimiento de sustrato. Desde el punto de vista de la industria, las peptidasas constituyen el grupo de enzimas con mayor relevancia en el mercado mundial, representando cerca del 60% del total de las enzimas comercializadas (Qing *et al.*, 2013). Debido a que la proteólisis cambia las propiedades químicas, físicas, biológicas e inmunológicas de las proteínas, las enzimas proteolíticas cumplen un rol muy importante en biotecnología (González-Rábade *et al.*, 2011), siendo muy diversos los campos de aplicación: tecnología alimentaria, industria farmacéutica y producción de detergentes, entre otros (Feijoo-Siota & Villa, 2011). La gran diversidad de los sitios activos de las peptidasas permite que presenten diferentes grados de selectividad y especificidad por el sustrato, por lo tanto estas enzimas son un marco prometedor para la ingeniería de nuevas actividades.

ESPECIFICIDAD DE SECUENCIA MEDIADA POR ESPECIFICIDAD DE SUBSITIOS

Tanto las exopeptidasas (cortan enlaces peptídicos a partir de los extremos del sustrato) como las endopeptidasas (cortan enlaces peptídicos internos del sustrato) exhiben “especificidad de secuencia”, es decir, muestran distintas preferencias por determinados aminoácidos cerca de los enlaces peptídicos que clivan. El sitio catalítico responsable de la hidrólisis del enlace peptídico se encuentra comúnmente en una ranura en la superficie de la molécula. La especificidad de la hidrólisis está determinada por las propiedades de los sitios de unión dispuestos a lo largo de la ranura en uno o ambos lados del sitio catalítico (Rawlings & Barrett, 2014). La especificidad de una peptidasa por su sustrato usualmente es descrita mediante el modelo propuesto por Schechter & Berger (1967), en el que cada subsitio específico es capaz de acomodar la cadena lateral de un solo residuo de aminoácido. Por convención, los residuos de aminoácidos de sustrato se denominan P (por péptido) y los subsitios en la peptidasa que interactúan con el sustrato se denominan S (por subsitio). Los sitios se numeran desde el sitio catalítico, S1, S2 y así sucesivamente hacia el extremo N-terminal

del sustrato y S1', S2' y así sucesivamente hacia el C-terminal (Fig. 2). Los aminoácidos del sustrato que se acomodan en estos subsitios se numeran P1, P2, etc. y P1', P2', etc., respectivamente (Schechter & Berger, 1967). Diferentes peptidasas tienen diferentes requisitos para las interacciones que se establecen en cada subsitio y esto determina la especificidad de la escisión.

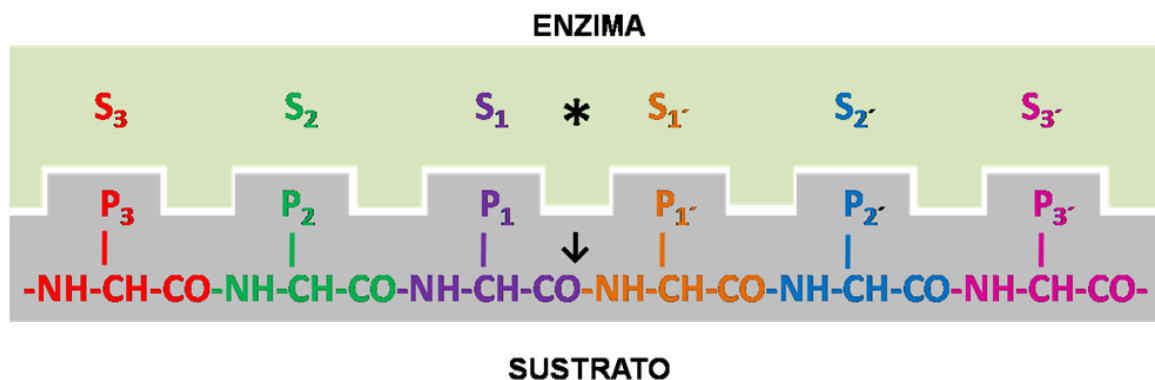


Figura 2: Nomenclatura propuesta por Schechter & Berger (1967) para la unión de un sustrato peptídico a una peptidasa. El área sombreada de gris representa la peptidasa. P1, P1', etc. son las cadenas laterales de los seis aminoácidos que rodean el enlace peptídico escindible (indicado por la flecha) en el sustrato. S1, S1', etc., son los subsitios correspondientes de la peptidasa (área sombreada de verde).

Los residuos de sustrato se representan a partir de una única cadena polipeptídica continua, mientras que los residuos de enzima pueden provenir de diferentes pliegues de la enzima, pero que tienen que disponerse en una adecuada posición espacial para permitir que los residuos de sustrato entren en el bolsillo de especificidad e interactúen con los residuos del sitio activo durante la escisión (Timmer & Salvesen, 2007).

En el caso de las PAs, éstas muestran especificidad por aquellos enlaces en los que participan residuos que presentan grandes cadenas laterales hidrófobas a cada lado de la unión escindible como Phe, Val, Ile, Leu en P1 y/o P1' (Dunn & Hung, 2000; Rawlings, *et al.*, 2012).

MECANISMO CATALÍTICO DE LAS PEPTIDASAS ASPÁRTICAS

En la gran mayoría de las PAs son dos los residuos de ácido aspártico (Asp32 y Asp215 en la numeración de pepsina) que actúan juntos para unir y activar una molécula de agua (díada catalítica), pero en otras, un residuo diferente reemplaza al segundo Asp (Rawlings & Barrett, 2004). El mecanismo de la hidrólisis del enlace peptídico ha sido establecido mediante estudios estructurales de estas enzimas unidas a compuestos que mimetizan estados de transición al unirse al sitio activo. El nucleófilo que escinde la unión peptídica es una molécula de agua activada a un ion hidróxido por el carboxilato, base general, del Asp215. El carboxilo del Asp33 protonado presta asistencia electrofílica a través de un puente de hidrógeno. Los grupos carboxílicos de los dos residuos aspartato se encuentran aproximadamente coplanares y la molécula de agua unida se ubica entre los dos, en ese plano común. Como consecuencia del ataque nucleofílico se forma un intermediario tetraédrico. A continuación se protona el átomo de nitrógeno del compuesto -NH₂ saliente conjuntamente con la regeneración del estado protonado del Asp33; esto está acoplado a la liberación de los nuevos grupos amino y carboxilo. Finalmente se reasocian los grupos carboxilo del sitio activo con una nueva

molécula de agua. En las peptidasas de la familia A1 del clan AA (nomenclatura de la base de datos de peptidasas MEROPS, <https://merops.sanger.ac.uk/>) la base de la hendidura de unión al sustrato abarca 7 u 8 aminoácidos (P5 a P3') con los Asp en posición central. Esta hendidura se forma donde se encuentran los dominios N y C terminales. Los dos residuos de Asp comúnmente se encuentran en el motivo Asp-Thr/Ser-Gly, lo cual es importante para establecer y mantener el ambiente del grupo carboxílico (James, 2004).

DISTRIBUCIÓN DE LAS PEPTIDASAS

En los organismos vivos, la amplia distribución de las peptidasas entre plantas, animales y microorganismos demuestra que son esenciales para todos ellos, llevando a cabo importantes roles fisiológicos. Las peptidasas fueron inicialmente reconocidas como enzimas proteolíticas del jugo gástrico involucradas en la degradación inespecífica de las proteínas dietarias. Sin embargo, avances posteriores han provisto una nueva visión del mundo proteolítico debido a que juegan un rol fundamental en la maduración de las proteínas. Las proteínas sintetizadas como un precursor se someten a escisión enzimática selectiva de ciertos enlaces peptídicos. Este proceso es crucial para la formación de la estructura tridimensional activa y/o correcta localización celular. Estas moléculas también participan en la degradación de proteínas durante el mantenimiento normal de células y la restructuración de los tejidos (Mutlu & Gal, 1999). Actúan reciclando polipéptidos en sus aminoácidos constitutivos, mientras que otras, intervienen escindiendo enlaces peptídicos de proteínas o péptidos para producir una modificación post-traducciona esencial que altera la vida media, el tráfico subcelular o la actividad de una amplia gama de proteínas. En consecuencia, las peptidasas están potencialmente implicadas en una multitud de procesos biológicos que van desde la simple digestión de las proteínas a las cascadas de señalización altamente reguladas (Olivares *et al.*, 2011).

PEPTIDASAS DE PLANTAS

Una amplia variedad de peptidasas están asociadas con procesos biológicos vitales, sin embargo, el origen y la evolución de su enorme diversidad no están bien definidos (Page & Di Cera, 2008). Los genomas de plantas codifican cientos de peptidasas, que representan a decenas de familias no relacionadas. Así el genoma de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L.) codifica más de 800 peptidasas que están distribuidas, de acuerdo a la clasificación MEROPS, en más de 62 familias de acuerdo a su homología de secuencia aminoacídica. Dichas proteasas pertenecen a 30 clanes diferentes de los cuales el más numeroso corresponde a las peptidasas serínicas, seguido en orden decreciente por cisteínicas, metalo-peptidasas, aspárticas, y treonínicas (Faro & Gal, 2005; Tsiatsiani *et al.*, 2011; van der Hoorn, 2008).

Rol fisiológico de las peptidasas vegetales

Las peptidasas vegetales están involucradas en muchos aspectos fisiológicos, incluyendo el desarrollo de la planta. Desempeñan un papel fundamental en procesos tales como recambio proteico, degradación de proteínas mal plegadas, senescencia y en la vía ubiquitina/proteasoma. Son también responsables de la modificación post-traducciona de proteínas por proteólisis limitada en sitios muy específicos. Están implicadas en una gran diversidad de procesos celulares, incluyendo la fotoinhibición en el cloroplasto y su biogénesis, muerte celular programada, fotomorfogénesis de la plántula en desarrollo, reproducción sexual.

de plantas, meiosis, supervivencia del gametofito, embriogénesis, formación de la cubierta de semillas, maduración y movilización de proteínas de reserva, formación del xilema, desarrollo del estoma, respuestas a estímulos ambientales y factores de virulencia y senescencia (Mendieta *et al.*, 2006; Simões & Faro, 2004; van der Hoorn, 2008). De esta manera, las peptidasas vegetales son reguladores claves de una enorme variedad de procesos biológicos que están involucrados en todos los aspectos del ciclo de vida de las plantas (González-Rábade *et al.*, 2011; Schaller, 2004; van der Hoorn, 2008) Peptidasas aspárticas de plantas

Las PAs de plantas han sido estudiadas en una vasta variedad de especies. En gimnospermas por ejemplo se las ha caracterizado en semillas de pino (*Pinus sylvestris* L.). También se las ha encontrado en especies de angiospermas. En monocotiledóneas se puede ejemplificar su presencia en cebada (*Hordeum vulgare* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* Conrad Moench) y maíz (*Zea mays* L.), (Asakura *et al.*, 1995; Asakura *et al.*, 1997; Sarkkinen *et al.*, 1992). Mientras que en eudicotiledóneas se las ha estudiado en girasol (*Helianthus annuus* L.), cacao (*Theobroma cacao* L.), *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., repollo (*Brassica oleracea*, L.), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), cardo de Castilla (*Cynara cardunculus* L.), abrepuños (*Centaurea calcitrapa* L.) y plantas carnívoras del género *Nepenthes* L. (Domingos *et al.*, 2000), entre otros ejemplos.

Los miembros de la familia A1 de la pepsina están presentes en una variedad de tejidos. Su diversidad ha provocado la redefinición de la clasificación de las PAs de plantas de la familia A1 en aspartilpeptidasas típicas, tipo nucelina y atípicas. Con respecto a su localización dentro de la planta, las PAs se han aislado, caracterizado y purificado a partir de diferentes órganos tales como semillas, flores y hojas (Lufrano *et al.*, 2012). Se expresan específicamente en tiempo y espacio y se acumulan en diferentes compartimentos subcelulares (Pesquet, 2012; Schaller, 2004; Tsiatsiani *et al.*, 2011; van der Hoorn, 2008). En cuanto a su localización subcelular, las PAs de plantas de la familia A1 caracterizadas se encuentran principalmente en las vacuolas líticas o en el compartimento vacuolar de almacenamiento. Sin embargo, algunas de ellas, se dirigen al retículo endoplasmático o se secretan a la pared celular o al apoplasto (Almeida *et al.*, 2012; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013; van der Hoorn, 2008). Algunos ejemplos de PAs secretadas a la matriz extracelular lo constituyen las PAs de hojas de tabaco (Rodrigo *et al.*, 1991), tomate (Rodrigo *et al.*, 1989) y cardosina B que se encuentra en la matriz extracelular del tejido floral de transmisión en el cardo de Castilla (Vieira *et al.*, 2001). Mendieta *et al.* (2006) demostraron que las PAs de papa (StAPs), inducidas por estrés biótico y abiótico, poseen localización extracelular. También se las ha encontrado en las membranas del fotosistema II de los plástidos de espinaca (Kuwabara & Suzuki, 1995) constituyendo así una localización celular diferente a las ya citadas. El análisis *in silico* de las señales de direccionamiento para la mayoría de las PAs putativas del genoma de *Arabidopsis* está de acuerdo con la localización esperada en la vía secretoria, pero también predice otros sitios, como cloroplasto o mitocondria, con varias PAs que se indican como unidas a membranas (Faro & Gal, 2005).

ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PROTEASAS ASPÁRTICAS VEGETALES

Organización de la estructura primaria

Como se indicó anteriormente, existen tres grupos bien diferenciados de PAs de plantas: PAs típicas, tipo nucelina y atípicas (Chen *et al.*, 2009; Faro & Gal, 2005) La estructura primaria es bien conservada entre

PAs vegetales típicas (Dunn *et al.*, 2004). Se sintetizan como precursores inactivos (proenzimas o zimógenos), los cuales son posteriormente convertidos en enzimas maduras, ya sea monoméricas o heterodiméricas. Los precursores de PAs tienden a tener un alto grado de similitud en términos de estructura primaria y se caracterizan por la presencia de una secuencia señal N-terminal hidrófoba (Pre), responsable de la translocación al retículo endoplasmático (RE) de la célula vegetal, seguida por un prosegmento (Pro) o propéptido presente en todas las PAs de alrededor de 40 aminoácidos. El Pro es responsable de la inactivación del zimógeno durante su tránsito a través del sistema de endomembranas, el plegamiento, la estabilidad o el direccionamiento intracelular de las proenzimas (Kervinen *et al.*, 1999; Simões & Faro, 2004). Por último, entre el dominio N-terminal y el dominio C-terminal, se puede encontrar un fragmento conocido como *inserto específico de planta* (PSI) situado entre los extremos amino y carboxilo terminales de la proteína madura, el cual abarca 100 aminoácidos (Guevara *et al.*, 2004). La mayoría de las PAs estudiadas y caracterizadas hasta el momento pertenecen a este grupo.

Las PAs atípicas muestran características intermedias entre las secuencias típicas y tipo nucleína. Éstas últimas codifican una proteína similar a la nucleína (número de acceso: U87148), que fue detectada en células nucleares de cebada y no contienen el dominio PSI (Faro & Gal, 2005). Las PAs atípicas de planta que han sido caracterizadas contienen un elevado número de cisteínas y muestran una localización diferente al de las PAs típicas, sin embargo, tienen una baja identidad de secuencia entre ellas y variadas funciones. Así, la proteína de unión al ADN del cloroplasto (CND41, número de acceso BAA22813.1), aislada de estos orgánulos a partir de células de tabaco (Kato *et al.*, 2004), está involucrada en la movilización de nitrógeno. Mientras que las PAs nepentesina I y nepentesina II (número de acceso: BAD07474 y número de acceso: BAD07475, respectivamente) aisladas de *Nepenthes alata* Blanco (Athauda *et al.*, 2004) son secretadas a los reservorios de la planta insectívora. En *Arabidopsis* la proteasa aspártica PSC1 (número de acceso: NP_195839) está involucrada en la regulación de la muerte celular y se localiza en el retículo endoplasmático (Olivares *et al.*, 2011). Con la excepción de CND41 y PCS1 (promotor de la supervivencia celular 1), todas las PAs atípicas caracterizadas hasta el momento tienen una arquitectura estructural particular con algunas variaciones: el péptido señal, seguido de un prosegmento y un dominio de codificación de la proteína madura. CND41 tiene un péptido de 120 aminoácidos que participa en el direccionamiento de la proteasa al cloroplasto (Nakano *et al.*, 1997). Además, la PA PCS1 parece carecer del prosegmento clásico. Después de la secuencia señal, presenta una secuencia rica en serinas, cuya función no ha sido descrita (Faro & Gal, 2005).

Si bien el PSI sólo se identificó en PAs típicas de plantas, su estructura es semejante a saposinas y proteínas tipo saposinas (SAPLIPs). La familia de las SAPLIPs es diversa, se trata de proteínas que interactúan con lípidos (Muñoz *et al.*, 2010, 2014) y que normalmente se eliminan durante la maduración de las PAs (Dunn, 2002; Simões & Faro, 2004). Existe una similitud significativa (alrededor del 40% de identidad) entre el PSI y las saposinas. Éstas últimas se generan a partir del precursor prosaposina. Químicamente son glicoproteínas estables a altas temperaturas con un peso molecular de 12-15 kDa que funcionan como activadores de hidrolasas lisosomales en el metabolismo de diversos esfingolípidos en seres humanos y animales (Kishimoto *et al.*, 1992; Schuette *et al.*, 2001). Se han identificado cuatro clases de saposinas (A, B, C y D) que tienen la capacidad de unirse a una variedad de esfingolípidos y gangliósidos. La especificidad y el modo de activación de las hidrolasas de esfingolípidos difieren entre las saposinas individuales. Las cuatro saposinas son estructuralmente similares entre sí en términos de la ubicación de seis cisteínas, un sitio de glicosilación conservado, y la presencia de residuos de prolina y una tirosina conservados. Estas características estructurales también se encuentran en los PSIs (Brodelius *et al.*, 2005; Faro & Gal, 2005; Simões & Faro, 2004). El PSI se pliega como un dominio independiente. La caracterización estructural del PSI de profitepsina

En los PSIs, la secuencia de aminoácidos revela una inversión entre los dominios amino y carboxilo terminal con respecto a las saposinas, dando lugar a la expresión “swaposin” (Ponting & Russel, 1995). Esta

y de otras proteínas de la familia SAPLIP muestra que comparten una estructura globular compacta, cinco alfa-hélices, unidos por tres enlaces disulfuro (Bryksa *et al.*, 2011; Simões & Faro, 2004). Egas *et al.* (2000) han demostrado la importancia de estas cisteínas y sus puentes, la cual se asocia con el mantenimiento de la estructura tridimensional del PSI en cardosina A, la unión del PSI a lípidos y las actividades de permeabilización de membranas. permutación resulta en una estructura tridimensional muy similar, con un patrón de conectividad algo diferente entre sus regiones (Bliven & Prlic, 2012).

El PSI ha sido propuesto como una señal de direccionamiento de proteínas. Originalmente fitepsina (*H. vulgare*) se acumula en la vacuola; con la delección de su dominio PSI, la fitepsina truncada es secretada, lo que lleva a pensar que el PSI estaría implicado en el direccionamiento de la proteína (Törmäkangas *et al.*, 2001). Los resultados con otras peptidasas, como soyAP2, una PA de soja, revelan información contradictoria. Esto puede deberse al hecho que diferentes dominios PSI podrían tener diferentes funciones fisiológicas (Terauchi *et al.*, 2005).

En el caso de cardosina A, se sabe que su dominio PSI no sólo posee información de direccionamiento hacia la vacuola, sino también que éste se lleva a cabo por una vía independiente al aparato de Golgi.

Organización de la estructura terciaria

La estructura terciaria de varios miembros de la familia A1 ha sido determinada, pero de éstas, sólo dos estructuras cristalinas corresponden a PAs vegetales, ambas pertenecientes al grupo de PAs típicas. Estas son la estructura de cardosina A madura (código de PDB: 1B5F, Frazão *et al.*, 1999) y profitepsina, precursor de la PA de cebada conteniendo el prosegmento junto con el dominio PSI (código de PDB: 1QDM, Kervinen *et al.*, 1999).

La homología de los dos lóbulos de las moléculas de peptidasas tipo pepsina se deduce por los dos residuos aspárticos, Asp94 y Asp277 (numeración de acuerdo al alineamiento de la familia A1, <http://merops.sanger.ac.uk>), los cuales se encuentran en motivos de secuencias muy similares. El motivo central se resume comúnmente como Asp-Thr-Gly (el motivo DTG), aunque una descripción más completa sería: Xaa-Xaa-**Asp**-Gly-Xbb, en la que Xaa es un residuo hidrofóbico y Xbb es Ser o Thr. En la familia A1 hay un tercer residuo importante para la catálisis, además de los dos residuos de ácido aspártico, este residuo se encuentra en una estructura flexible conocida como “flap”, ubicada a lo largo de la hendidura catalítica y juega un papel importante en la especificidad de la PA. El *flap* se proyecta hacia afuera sobre la hendidura del sitio activo y encierra a los sustratos y a los inhibidores en el sitio activo (Rawlings & Barrett, 1995; Simões & Faro, 2004; Vairo Cavalli *et al.*, 2013). El residuo es una Tyr conservada (Tyr 75, numeración de pepsina) que interactúa con los residuos del sustrato en el bolsillo catalítico (Andreeva & Rumsh, 2001).

La estructura cristalográfica de cardosina A madura de *C. cardunculus* fue determinada con una resolución de 1,7 Å. La molécula está compuesta por dos cadenas polipeptídicas glicosiladas de 31 y 15 kDa, respectivamente y presenta un plegamiento típico de la familia de las PAs. Esencialmente está formada por la duplicación de un motivo de cuatro cadenas β anti-paralelas y una α -hélice, lo que se repite dos veces en cada uno de los dominios (1B5F). El sitio activo, como ya ha sido mencionado precedentemente, se encuentra entre los dos dominios en la parte inferior de una gran hendidura. Las dos mitades de la enzima actúan como

estructuras plegadas independientes que se mueven una con relación a la otra y contribuyendo cada una con uno de los aspárticos catalíticos en una disposición coplanar de los carboxilatos (Frazão *et al.*, 1999). Una característica única de cardosina A, entre las peptidasas de plantas, es la presencia de dos motivos aminoacídicos Arg-Gly-Asp –RGD, residuos 246-248 (Frazão *et al.*, 1999) y Lys-Gly-Glu –KGE, residuos 455-457 (Simões *et al.*, 2005). RGD es una secuencia conocida de unión a las proteínas integrinas en tejidos de mamíferos en donde facilita funciones de reconocimiento celular tales como adhesión, migración, señalización, diferenciación y crecimiento. Es posible que cardosina A participe en mecanismos proteolíticos mediados por adhesión asociados con el crecimiento del tubo polínico, en forma similar a las peptidasas unidas a integrina que actúan durante la proliferación e invasión celular. Así, de acuerdo a la estructura cristalina de cardosina A, la secuencia RGD localizada en un giro que conecta dos cadenas β y proyectada por encima de la superficie molecular actuaría en la interacción polen-pistilo (Faro *et al.*, 1999). Se ha identificado a la enzima fosfolipasa D (FLD) como la proteína de unión a cardosina A mediante la interacción de su dominio C2 con los motivos RGD y KGE. Ambas proteínas, cardosina A y FLD, forman un complejo lo que sugiere que las mismas podrían llevar a cabo acciones concertadas y/o sinérgicas en procesos degenerativos, tales como los observados durante las respuestas al estrés, la senescencia de las plantas y/o las interacciones polen-pistilo. A su vez, la asociación de ambas proteínas podría facilitar la disgregación de las vacuolas en la fase de desmantelamiento que ocurre en el tipo de muerte celular dada por colapso vacuolar en las plantas. A pesar de la alta similitud existente entre las dos PAs de pistilos de flores de cardo, cardosina A y B, ninguna de estas dos secuencias se encuentran conservadas en cardosina B, la que contiene por su parte los motivos RGN y EGE (Simões *et al.*, 2005).

Mecanismos de procesamiento de peptidasas aspárticas

Tres tipos distintos de procesamiento han sido observados en los zimógenos de las PAs: autoprosesamiento total (intra o intermolecular); autoprosesamiento parcial asistido por diferentes peptidasas y procesamiento totalmente asistido. El pepsinógeno se incluye en la primer categoría, la procathepsina D en la segunda (requiere la acción de proteinasas cisteínicas lisosomales) y la prorrenina, en la tercera (Koelsch *et al.*, 1994). Sin embargo aún no se ha identificado ninguna enzima particular como responsable del inicio de los eventos de procesamiento de las PAs de plantas. Evidencias obtenidas mediante experimentos *in vitro* sugieren que la maduración completa de las PAs podría requerir la acción de otra(s) endopeptidasa(s) y exopeptidasa(s) en adición al procesamiento autocatalítico que requiere un descenso en el pH (Castanheira *et al.*, 2005; Domingos *et al.*, 2000; Sampaio *et al.*, 2008; Simões & Faro 2004; White *et al.*, 1999).

El procesamiento de las PAs de plantas en enzimas plenamente activas implica varios pasos proteolíticos que incluyen la eliminación del péptido señal (propéptido) y en la mayoría de los casos el PSI, originando formas heterodiméricas o monoméricas (Mutlu & Gal, 1999). La gran mayoría de las PAs de plantas son proteínas heterodiméricas con una subunidad mayor de 28-35 kDa y una subunidad menor de 11-16 kDa. Sólo un número reducido son proteínas monoméricas, que conservan el PSI aún en su forma madura, y presentan una masa molecular de 36-65 kDa (Balandin *et al.*, 2005; Mutlu & Gal, 1999). Tal es el caso de las

PAs aisladas de tomate (Rodrigo *et al.*, 1989), tabaco (Rodrigo *et al.*, 1991) y papa (Guevara *et al.*, 1999). En las PAs vegetales heterodiméricas, el PSI se elimina por proteólisis (Glathe *et al.*, 1998; Ramalho-Santos *et al.*, 1998). En general, el dominio PSI es escindido del precursor en forma parcial o total. Se ha sugerido que el procesamiento de las preproenzimas involucra una serie de clivajes proteolíticos secuenciales durante el tráfico hacia el aparato de Golgi, lo que origina una mezcla compleja de formas heterogéneas de PAs maduras en los tejidos de la planta (Duarte *et al.*, 2008).

PEPTIDASAS ASPÁRTICAS EN FLORES DE CARDO

Estudios de localización *in situ* han revelado que las PAs no se distribuyen al azar dentro de la planta, sino que están muy específicamente localizadas en diferentes tejidos según la especie (Simões & Faro, 2004).

Así por ejemplo, en las flores maduras de *Cynara cardunculus* L. (cardo de Castilla) se producen dos grupos de peptidasas, cardosinas y cyprosinas, identificadas como PAs típicas de plantas. Incluso cuando la actividad aspartilendopeptidasa se encuentra en niveles relativamente bajos en la planta, estas flores poseen actividad extremadamente alta de PAs en ciertos tejidos (Vairo Cavalli *et al.*, 2013). Cordeiro *et al.* (1994) demostraron la presencia de tres peptidasas glicosiladas con actividad coagulante de leche en extractos de flores secas de *C. cardunculus*, obtenidos a un pH alcalino de 8.3. Fueron llamadas cynarasas 1, 2, y 3, y luego, este nombre fue reemplazado por cyprosinas según las convenciones de nomenclatura de PAs (Cordeiro *et al.*, 1994). Las cardosinas se han purificado y caracterizado a partir de estigmas frescos de *C. cardunculus* (Verissimo *et al.*, 1995), sin embargo, cardosinas y cyprosinas nunca han sido co-purificadas (Pimentel *et al.*, 2007).

Las cyprosinas están específicamente localizadas en las células epidérmicas de los estilos de las flores de *C. cardunculus*. Los genes que codifican tanto para cyprosinas como para cardosinas se organizan como una familia de multigenes que se expresan en las etapas tempranas del desarrollo floral (Pimentel *et al.*, 2007). El ARNm de las cardosinas se detecta en inflorescencias jóvenes pero no en los pistilos de inflorescencias completamente abiertas (Faro *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2001). La expresión de cardosina A ocurre esencialmente en los pistilos, específicamente en las vacuolas de almacenamiento de proteínas de las papilas estigmáticas así como también en la gran vacuola central de las células del estilo desde el inicio del desarrollo floral (Ramalho-Santos *et al.*, 1998). Cardosina B se acumula en los pistilos hasta las últimas etapas del desarrollo floral localizándose en las paredes de las células y en la matriz extracelular del tejido de transmisión floral (Vieira *et al.*, 2001).

Las diferencias en actividad y localización, sugieren que las dos cardosinas cumplen funciones biológicas diferentes. De este modo, para cardosina B se ha propuesto un rol en defensa o en la interacción polen-pistilo. En el caso de cardosina A intervendría en mecanismos proteolíticos mediados por adhesión, los cuales estarían probablemente asociados con el crecimiento del tubo polínico.

Recientemente se ha propuesto que cardosina A sería una enzima bifuncional, ya que procardosina A tendría un rol en eventos que ocurren durante y luego de la germinación de las semillas de cardo. En los embriones, este zimógeno se acumula en cuerpos proteicos y paredes celulares. En cambio, cardosina B sólo es detectable en las primeras etapas luego de la imbibición de semillas, por lo que le cabría un rol en la pérdida de estructuras limitantes (Pereira *et al.*, 2008).

En estudios posteriores, Sarmiento *et al.* (2009) purificaron y caracterizaron cuatro nuevas PAs de pistilos de *C. cardunculus*, elevando así el número de PAs de esta especie a nueve. Estas cuatro enzimas: cardosina E, F, G, y H, son diméricas, glicosiladas y con actividad máxima de alrededor de pH 4,3. Estas enzimas se asemejan a cardosina A más de lo que se asemejan a cardosina B o a cyprosina.

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LAS PROTEASAS ASPÁRTICAS

Se conocen cerca de 4000 enzimas, y de éstas, aproximadamente 200 se utilizan comercialmente. Sin embargo, sólo alrededor de 20 enzimas se producen en escala verdaderamente industrial. Casi el 75% de todas las enzimas industriales son enzimas hidrolíticas, amilasas, peptidasas y lipasas dominan el mercado de enzimas, lo que representa más del 70% del total de ventas (Shuang *et al.*, 2012). Dicho mercado se valoró en 4,2 mil millones de dólares en el año 2014 y se prevé que crezca a una tasa anual del 7,0% entre 2015 y 2020.

Dentro de las enzimas hidrolíticas, las peptidasas constituyen el grupo más importante de enzimas industriales actualmente en uso, contribuyendo en gran medida a la industria química tradicional y moderna, mejorando de este modo los procesos existentes. Son utilizadas en variados procesos tecnológicos que incluyen la tiernización de carnes, la elaboración de cerveza y de quesos, la panificación, la industria de polvos detergentes, el procesado de fibras textiles y cueros, la industria farmacéutica, el tratamiento de efluentes industriales, cosméticos y como herramientas en investigación y desarrollo (González-Rábade *et al.*, 2011).

Una propiedad crítica en muchas aplicaciones como la industria de los detergentes o el tratamiento del cuero es la alta estabilidad térmica (Güracar, 2011) El aumento de las temperaturas puede romper las interacciones no covalentes dentro de una proteína plegada, lo que lleva a la desnaturalización de la misma. Durante este proceso, la exposición de los residuos hidrofóbicos puede potencialmente inducir la agregación de las proteínas. Además, estas moléculas también se pueden inactivar a través de algunos mecanismos covalentes, tales como la desamidación de los residuos de Asn y Gln, hidrólisis de enlaces peptídicos, beta-eliminación de los enlaces disulfuro, y la oxidación de residuos de Cys y Met (Qing *et al.*, 2013). El índice alifático es el volumen relativo ocupado por las cadenas laterales alifáticas (Ikai, 1980). Un alto valor de dicho índice indica que la proteína tiene un elevado contenido de cadenas alifáticas que le proveen termorresistencia y por lo tanto estabilidad en diferentes condiciones (Sivakumar *et al.*, 2007) y puede, por lo tanto, ser potencialmente empleada en estos procesos.

La medición de la actividad hidrolítica sobre sustratos sintéticos es una forma sencilla de conocer la especificidad de clivaje de las peptidasas, proporcionando información importante para aplicaciones biotecnológicas, como la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas de alimentos (Cimino *et al.*, 2015; Silva & Malcata, 2005). Algunos péptidos están ocultos e inactivos en las proteínas originales, pero cuando son liberados pueden tener diversas aplicaciones biomédicas, como agentes antihipertensivos o antioxidantes, entre otros (Bertucci *et al.*, 2015; Perpetuo *et al.*, 2003). Dado que la proteólisis cambia las propiedades químicas, físicas, biológicas e inmunológicas de las proteínas, juega un papel importante en la biotecnología. La hidrólisis de las proteínas de los alimentos mejora las características nutricionales, retarda el deterioro, modifica diferentes propiedades funcionales (solubilidad, formación de espuma, coagulación y capacidades emulsionantes), previene interacciones no deseadas, modifica el sabor y olor y elimina factores tóxicos o inhibidores, entre otros (González-Rábade *et al.*, 2011). Una de las aplicaciones más importantes de las peptidasas en la industria alimentaria es el uso como cuajo en la fabricación de queso. PAs tales como quimosina, pepsina y algunas enzimas fúngicas han sido utilizadas en el proceso de fermentación y en la producción de una variedad de productos, incluyendo la producción de queso, formación de sabor y producción de péptidos bioactivos como nutraceuticos (Horimoto *et al.*, 2009). Las PAs también han despertado un gran interés como dianas para el tratamiento farmacológico de varias condiciones fisiológicas

y patológicas humanas. Éstas incluyen el uso de la pepsina en la enfermedad de úlcera péptica, la renina en la hipertensión, la plasmepsina en la malaria, la catepsina D (CatD) en la metástasis en cánceres, la catepsina E (CatE) en el sistema inmunológico, la peptidasa del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y BACE (enzima que cliva la proteína precursora β -amiloide) en la enfermedad de Alzheimer (Horimoto *et al.*, 2009).

Aplicaciones de las peptidasas aspárticas de plantas

Se han estudiado diversas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas de PAs de flores de cardo. Éstas incluyen la manufactura de quesos junto con otros usos, algunos potenciales o en proceso de evaluación, absolutamente contemporáneos (Vairo Cavalli *et al.*, 2013).

Debido a la presencia de PAs con capacidad para coagular la leche, las flores de cardo del género *Cynara* se utilizan tradicionalmente en la región del Mediterráneo para la producción de quesos artesanales. Por otra parte, las limitaciones de los consumidores en el uso de los cuajos por razones religiosas, la dieta (por ejemplo, el vegetarianismo) o la oposición a los alimentos genéticamente modificados han conducido a focalizar el estudio de estas enzimas como sustitutos del cuajo (Vairo Cavalli *et al.*, 2013). La presencia de PAs con actividad coagulante de leche también se ha detectado en extractos acuosos de flores de varias especies de Asteraceae (Brutti *et al.*, 2012; Cimino *et al.*, 2010; Lufrano *et al.*, 2007; Vairo Cavalli *et al.*, 2005). Se encontró que el extracto acuoso de flores de *Onopordum acanthium* L. actúa como cuajo vegetal adecuado cuando se utiliza para obtener quesos semiduros de leche bovina (Brutti *et al.*, 2012). Se propusieron a las flores de *Silybum marianum* L. como una fuente alternativa de cuajo vegetal. Se observaron diferentes perfiles peptídicos en caseinatos de cabra y oveja a través de hidrólisis provocada por las PAs presentes en los extractos de cardo, con menor degradación que en la hidrólisis de caseínas bovinas (Vairo Cavalli *et al.*, 2005, 2008). Los extractos acuosos de las flores de *C. cardunculus* L., *C. Humilis* L., y/o *C. scolymus* L., han demostrado ser exitosos sustitutos catalíticos para el cuajo animal, y por lo tanto se han utilizado desde la antigüedad desde el período de dominación romana hasta el presente en la fabricación de quesos de oveja y cabra en varias zonas rurales de la Península Ibérica (Reis & Malcata, 2011; Reis *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2010). Se ha demostrado actividad coagulante de leche en las flores de *C. calcitrapa* L., pero la mayor limitación al uso de la PAs de esta especie en la preparación de quesos es el bajo rendimiento del producto final, junto con la heterogeneidad del perfil de sus peptidasas. Se ha propuesto el uso del cultivo de células de plantas con estas características para una producción significativa de biomasa como una alternativa para la producción intensiva de estas proteasas sin dependencia de floración estacional (Raposo & Domingos, 2008).

Los péptidos bioactivos presentes en la secuencia de aminoácidos de las proteínas de los alimentos son de particular interés en nutrición y ciencia de los alimentos, porque se ha demostrado que estos fragmentos de proteínas desempeñan funciones fisiológicas (Silva & Malcata, 2005). Estos péptidos se han encontrado en sistemas modelos similares al queso que imitan los quesos fabricados con leche de oveja y cabras que se han cuajado con las proteasas de *C. cardunculus*. Los quesos maduros contienen numerosos péptidos que se originan principalmente de la descomposición de las caseínas durante el proceso de maduración de los mismos. Las capacidades antioxidantes y de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) se encuentran entre las bioactividades atribuidas a estos péptidos. Tavares *et al.* (2012) propusieron que los concentrados de proteínas de suero lácteo hidrolizados por extractos de *C. cardunculus* serían un ingrediente nutracéutico eficaz para la formulación de alimentos funcionales destinados al control de la hipertensión.

Cardosina A (*C. cardunculus*) muestra una acción específica sobre el colágeno. El colágeno tipo I es el

a un 30% de la proteína total. Pertenece al grupo del colágeno fibrilar y constituye más del 95% de colágeno total de muchos tejidos, tales como piel, tendones y huesos. Su degradación es un problema fisiológico y patológico importante, ya que el mismo en estado nativo es resistente a la mayoría de las enzimas proteolíticas. Las moléculas de colágeno están compuestas por tres cadenas helicoidales: dos $\alpha 1$ y una $\alpha 2$. Los componentes del tejido conectivo son modulados por una matriz de metaloproteinasas, las cuales son críticas para la desintegración y remodelación de la ME (Miller & Gay, 1987). Trastornos en el equilibrio entre la producción y la degradación de la ME conduce a la formación de úlceras crónicas con la excesiva degradación de la ME o a la fibrosis, por ejemplo, las cicatrices hipertróficas o queloides se caracterizan por la acumulación excesiva de componentes de la ME. La fibrosis postquirúrgica y la consiguiente formación de adherencias es un problema cotidiano en la práctica clínica, y una causa ocasional de la mortalidad. (Holmdahl *et al.*, 1997). En estado nativo, el colágeno es resistente a la mayoría de las enzimas endógenas y exógenas. Se demostró que cardosina A puede hidrolizar *in vitro* el colágeno fibrilar dentro de las cadenas α . El patrón de hidrólisis de colágeno tipo I mediante la acción de cardosina A es definido y mantenido por al menos 24 horas de digestión, sugiriendo que la cardosina A puede hidrolizar colágeno en un pequeño número de uniones peptídicas específicas. Es por ello, que cardosina A ha sido propuesta como herramienta en procedimientos médicos que requieran la remodelación o un aumento de la degradación de la ME, siendo capaz de escindir el colágeno dentro de la triple hélice, similar a la acción colagenolítica de catepsina K en tejidos de mamíferos (Duarte *et al.*, 2005b). La inmovilización de cardosina A en esponjas de quitosano no indujo alteraciones en la especificidad de la enzima, manteniendo así la capacidad de hidrolizar el colágeno de tipo I. Por su biocompatibilidad esta forma de cardosina A inmovilizada resulta ser una herramienta promisoria en la prevención de la formación y reducción de adherencias en cirugías abdominales (Pereira *et al.*, 2005).

Además, esta peptidasa ha sido evaluada para disociar la corteza de embriones de ratas Wistar (línea albina de la rata parda) con el fin de establecer cultivos neuronales primarios (Duarte *et al.*, 2005a, 2007). Las neuronas tratadas con cardosina A exhiben morfología y función normales cuando se comparan con cultivos preparados con el método de disociación de tripsina ampliamente utilizado (Duarte *et al.*, 2007). Más aún, el uso de cardosina generó una mejora de la regeneración neuronal en las primeras etapas del cultivo después de la disociación celular (Duarte *et al.*, 2009). Otra aplicación de las cardosinas A y B que ha sido desarrollada exitosamente, se relaciona con la estabilidad de las mismas en sistemas bifásicos acuosos-orgánicos, lo cual posibilitó que exhiban la capacidad de catalizar la síntesis enzimática de dipéptidos y tripéptidos en dichos medios (Sarmiento *et al.*, 1998, 2004; Shmyrova *et al.*, 2006).

Para la mayoría de los organismos vivos, las proteínas y péptidos antimicrobianos (AMPPs) son componentes importantes para la defensa natural contra los patógenos invasores. Se encuentran en una amplia gama de organismos eucariotas, desde los vegetales a los seres humanos. Se ha demostrado que algunas de estas proteínas y péptidos ejercen actividad espermicida. Así, dichas moléculas se utilizan como componentes del medicamento *nonoxinol-9* que es utilizado actualmente como un agente espermicida vaginal. Su acción consiste en reducir la tensión superficial en la membrana del acrosoma del espermatozoide alterando, de esta manera, su permeabilidad y movilidad. Es decir, produce un aumento de su permeabilidad o la desestabilización de la misma cambiando, de esta manera, la carga neta del sistema. El descubrimiento de nuevos grupos de AMPPs como potenciales antibióticos naturales representa un prometedor descubrimiento hacia una nueva generación de fármacos para el tratamiento de infecciones bacterianas y fúngicas. Además, el amplio espectro de actividades antimicrobianas reportado para estas moléculas sugiere su potencial beneficio en el tratamiento de infecciones virales o parasitarias y el cáncer. En contraste con los antibióticos convencionales, actúan por perturbación física o por destrucción de la función de barrera de la membrana plasmática sin la participación de un receptor específico (Mendieta *et al.*, 2010).

Dos isoformas de la PAs de *S. tuberosum*, StAP1 y StAP3, presentan actividad antimicrobiana contra patógenos de papa y actividad citotóxica frente a patógenos de plantas y espermatozoides. Estas proteínas, así como otros AMPPs, son capaces de unirse a la superficie de las células microbianas y producir cambios en el flujo de iones de la membrana plasmática ocasionando de esta forma su posterior muerte celular. Los resultados mostraron que estas moléculas son compuestos espermicidas eficaces que inducen desestabilización de la membrana plasmática y la muerte celular de espermatozoides bovinos y humanos, sin ningún efecto perjudicial sobre las células vegetales y los eritrocitos humanos (Cesari *et al.*, 2007; Mendieta *et al.*, 2010).

Por otro lado, estas moléculas son capaces de tener también, un efecto citotóxico dependiente de la dosis sobre las células Jurkat T, una línea celular de leucemia humana, mientras que este efecto no se ejerce sobre los linfocitos T. Además, son capaces de producir alteraciones en la morfología celular de dichas células incubadas con diferentes cantidades de StAPs. Estos cambios implican la inducción de la apoptosis de las células Jurkat T (Mendieta *et al.*, 2010).

Muñoz *et al.* (2010) demostraron que el dominio PSI de la PAs de *S. tuberosum*, StAsp-PSI, al igual que las proteínas tipo saposinas (SAPLIPs) son capaces de interactuar con la membrana plasmática de células de mamíferos, aumentando la permeabilidad de la célula y produciendo muerte celular. Esta actividad citotóxica de StAsp-PSI es selectiva. Si bien estas proteínas son tóxicas para microorganismos patógenos humanos y de plantas, hongos, oomicetos, bacterias Gram (-) y Gram (+) y células cancerígenas, las mismas no son capaces de matar las células T humanas, los glóbulos rojos humanos y células vegetales. Egas *et al.* (2000) encontraron que el PSI recombinante es capaz de interactuar con vesículas fosfolipídicas y de inducir la fusión de su contenido. Aún así, el rol del PSI no ha sido completamente esclarecido. Simões y Faro (2004) propusieron que participaría en mecanismos de defensa contra patógenos y/o en la muerte celular, en base a su capacidad de interactuar con membranas lipídicas. Sin embargo, White *et al.* (1999) encontraron en la procyprosina recombinante que el PSI tiene como función asegurar que el polipéptido naciente de la proenzima esté correctamente plegado y sea capaz de activarse hasta ser una enzima madura.

CONCLUSIONES

Las PAs de plantas, conocidas colectivamente como fitepsinas (EC 3.4.23.40), son endopeptidasas bilobuladas presente en una amplia variedad de especies de plantas con actividad enzimática principalmente a pHs ácidos y tienen dos residuos de ácido aspártico situados a cada lado de una hendidura catalítica que son responsables de la catálisis. La expresión de las PAs no tiene una distribución aleatoria en las plantas sino más bien tejido-específica, pueden acumularse en diferentes compartimentos. Por otro lado, la misma proteína puede ser secretada al apoplasto o ser dirigida a la vacuola dependiendo del tipo de célula y estado de desarrollo de la misma, sugiriendo de este modo un mecanismo estricto en la regulación del tránsito celular. Más aún, algunas especies de plantas tienen múltiples genes de PAs que se expresan en distintos tejidos, lo que sugiere cierta especialización funcional. La presencia del dominio PSI ha sido vinculado al tránsito intracelular de las PAs heterodiméricas. Las flores de varias especies de la tribu *Cardueae* poseen actividad extremadamente alta de PAs en ciertos tejidos, incluso cuando la actividad aspartilendopeptidasa se encuentra en niveles relativamente bajos en la planta. Las flores de varias especies de la tribu *Cardueae* poseen actividad alta de PA en ciertos tejidos, aún cuando la actividad aspartilendopeptidasa en la planta es relativamente baja. Es por esta razón que en las dos últimas décadas, las PAs presentes en flores de cardo han sido objeto de estudio intensivo.

En los últimos años, se han encontrado que las proteasas de plantas exhiben propiedades prometedoras para su aplicación. Aunque las proteasas vegetales se emplearon originariamente a partir de extractos crudos o parcialmente purificados, hoy en día, son accesibles en forma purificada y con propiedades nuevas u optimizadas, gracias a la utilización de técnicas de ingeniería genética. Es probable que en el futuro existan proteasas con propiedades que en la actualidad constituyen sólo propuestas potenciales de empleo en diferentes áreas. Así, las PAs de flores de cardos son utilizadas en diversas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas que incluyen:

- ✓ . Manufactura de quesos, debido a la presencia de las PAs en las flores de cardo del género *Cynara* con capacidad para coagular la leche.
- ✓ Dada la acción específica de cardosina A de *C cardunculus L.* sobre el colágeno, esta enzima ha sido propuesta para la asistencia en procedimientos médicos o técnicos que requieran la remodelación de matriz extracelular.
- ✓ Inmovilización en esponjas de quitosano, resultando así una herramienta promisoría en la prevención de la formación y reducción de adherencias en cirugías abdominales.
- ✓ Como catalizadores en disolventes orgánicos con el fin de obtener productos intermedios de reacción que se consumen rápidamente en buffer acuosos.
- ✓ Actividad citotóxica frente a patógenos de plantas y espermatozoides, siendo candidatos adecuados en el desarrollo de ensayos de anticonceptivos microbicidas en el futuro, entre otras aplicaciones.

En las últimas dos décadas, las PAs presentes en flores de cardo han sido objeto de gran interés en la industria farmacéutica y biotecnológica. Recientes desarrollos biotecnológicos y, en particular, la ingeniería de proteínas predicen la aparición en el futuro cercano de proteasas de plantas con más y mejores propiedades industriales.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco de los Proyecto X-682 y X-746 de la UNLP (Programa de Incentivos a la Investigación). El texto es una ampliación y actualización de la Introducción del trabajo de Tesis Doctoral “Estudio de peptidasas aspárticas de flores de Asteraceae con potencial aplicación biotecnológica”, presentado por la Dra. María Laura Colombo el 7 de abril del 2016.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Almeida, C.M., C. Pereira, D. Soares da Costa, S. Pereira, J. Pissarra, C. Faro, *et al.* (2012) Chlapsin, a chloroplastidial aspartic proteinase from the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* 236: 283–96.
- Andreeva N.S. & L.D. Rumsh (2001) Analysis of crystal structures of aspartic proteinases: on the role of amino acid residues adjacent to the catalytic site of pepsin-like enzymes. *Protein Sci.* 10: 2439–50.
- Asakura, T., H. Watanabe, K. Abe, S. Arai, T. Asakura, H. Watanabe, *et al.* (1995) Rice aspartic proteinase, oryzasin, expressed during seed ripening and germination, has a gene organization distinct from those of animal and microbial aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* 232: 77–83.
- Asakura, T., H. Watanabe, K. Abe & S. Arai (1997) Oryzasin as an aspartic proteinase occurring in rice seeds: purification, characterization, and application to milk clotting. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1070–5.
- Athauda, S.B., K. Matsumoto, S. Rajapakshe, M. Kuribayashi, M. Kojima, N. Kubomura *et al.* (2004) Enzymic and structural characterization of Nepenthesin, a unique member of a novel subfamily of aspartic proteinases. *Biochem. J.* 381: 295–306.
- Balandin, M., J. Royo, E. Gomez, L.M. Muniz, A. Molina & G. Hueros (2005) A protective role for the embryo surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. *Plant Mol. Biol.* 58: 269–82.
- Bertucci, J.I., C.S. Liggieri, M.L. Colombo, S.E. Vairo Cavalli & M.A. Bruno (2015). Application of peptidases from *Maclura pomifera* fruit for the production of active biopeptides from whey protein. *LWT Food Sci. Technol.* 64: 157–63.
- Bliven, S. & A. Prlic (2012) Circular Permutations in Proteins. *PLoS Comput. Biol.* 8(3): e1002445.
- Brodelius, M., M. Hiraiwa, S. Marttila, S. Al Karadaghi, S. Picaud & P.E. Brodelius (2005) Immunolocalization of the saposin-like insert of plant aspartic proteinases exhibiting saposin C activity. Expression in young flower tissues and in barley seeds. *Plant Biochem.* 125: 405–18.
- Brutti, C.B., M.F. Pardo, N.O. Caffini & C.L. Natalucci (2012) *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT Food Sci. Technol.* 45: 172–9.
- Bryksa, B.C., P. Bhaumik, E. Magracheva, D.C. De Moura, M. Kurylowicz, A. Zdanov *et al.* (2011) Structure and mechanism of the saposin-like domain of a plant aspartic protease. *J. Biol. Chem.* 286: 28265–75.
- Castanheira, P., B. Samyn, K. Sergeant, J.C. Clemente, B.M. Dunn, E. Pires *et al.* (2005) Activation, proteolytic processing, and peptide specificity of recombinant Cardosin A. *J. Biol. Chem.* 280: 13047–54.
- Cesari, A., A.L. Falcinelli, J.R. Mendieta, M.R. Pagano, N. Mucci, G.R. Daleo *et al.* (2007) Potato aspartic proteases (StAPs) exert cytotoxic activity on bovine and human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 88: 1248–55.
- Chen, J., Y. Ouyang, L. Wang, W. Xie & Q. Zhang (2009) Aspartic proteases gene family in rice: gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation. *Gene* 442: 108–18.
- Cimino, C.V., M.L. Colombo, C.S. Liggieri, M.A. Bruno & S.E. Vairo-Cavalli (2015) Partial molecular characterization of *Arctium minus* aspartylendopeptidase and preparation of bioactive peptides by whey protein hydrolysis. *J. Med. Food* 18: 856-64.
- Cimino, C.V., C.S. Liggieri, N.S. Priolo, M.A. Bruno & S.E. Vairo-Cavalli (2010) *Arctium minus* (Hill) Bernh. (Asteraceae) aspartylendopeptidases with potential application in the formulation of nutraceutical products. *Mol. Med. Chem.* 21: 11–6.
- Cordeiro, M.C., X. Zhong-tian, M. Pietrzak, M.S. Pais & P.E. Brodelius (1994) Isolation and Characterization of a cDNA from flowers of *Cynara cardunculus* encoding Cyprosin (an aspartic proteinase) and its use to study the organ-specific expression of Cyprosin. *Plant Mol. Biol.* 24: 733–41.
- Delgado, F.J., J. González-Crespo, R. Cava, J. García-Parra & R. Ramírez (2010) Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening. *Food Chem.* 118: 182–9.
- Domingos, A., P.C. Cardoso, Z.T. Xue, A. Clemente, P.E. Brodelius & M.S. Pais (2000) Purification, cloning and autoproteolytic processing of an aspartic proteinase from *Centaurea calcitrapa*. *Eur. J. Biochem.* 267: 6824–31.
- Duarte, A.S., E.P. Duarte, A. Correia, E. Pires & M.T. Barros (2009) Cardosins improve neuronal regeneration after cell disruption: a comparative expression study. *Cell Biol. Toxicol* 25: 99–108.
- Duarte, A.S.A., O. Pereira, A.M.S. Cabrita, A.J.G. Moir, E.M.V. Pires & M.M.T. Barros (2005a) The characterisation of the collagenolytic activity of Cardosin a demonstrates its potential application for extracellular matrix degradative processes. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2: 37–44.

- Duarte, A.S., N. Rosa, E.P. Duarte, E. Pires & M.T. Barros (2007) Cardosins: a new and efficient plant enzymatic tool to dissociate neuronal cells for the establishment of cell cultures. *Biotechnol. Bioeng* **97**: 991–6.
- Duarte, P., J. Pissarra & I. Moore (2008) Processing and Trafficking of a Single Isoform of the aspartic proteinase Cardosin A on the vacuolar pathway. *Planta* **227**: 1255–68.
- Dunn, B.M. & S. Hung (2000) The two sides of enzyme substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases. *Engineering* **1477**: 231–40.
- Dunn B.M. (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem. Rev.* **102**: 4431–58.
- Dunn, T.M., D.V. Lynch, L.V. Michaelson & J.A. Napier (2004) A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* **93**: 483–97.
- Egas, C., N. Lavoura, R. Resende, R.M. Brito, E. Pires, M C de Lima *et al.* (2000) The saposin-like domain of the plant aspartic proteinase precursor is a potent inducer of vesicle leakage. *J. Biol. Chem.* **275**: 38190–6.
- Faro, C. & S. Gal (2005) Aspartic proteinase content of the *Arabidopsis* Genome. *Curr. Protein Peptide Sci.* **6**: 493–500.
- Faro, C.M., Ramalho-Santos, M. Vieira, A. Mendes, I. Simões, R. Andrade, *et al.* (1999) Cloning and characterization of cDNA encoding Cardosin A, an RGD-Containing Plant aspartic proteinase. *J. Biol. Chem.* **274**: 28724–9.
- Feijoo-Siota, L., & T.G. Villa (2011) Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food Bioprocess Technol.* **4**: 1066–88.
- Frazão, C.I., B.J. Costa, C.M. Soares, P. Veríssimo, C. Faro, E. Pires, *et al.* (1999) Crystal structure of Cardosin A, a glycosylated and Arg-Gly-Asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* L. *J. Biol. Chem.* **274**: 27694–701.
- Glathe, S., J. Kervinen, M. Nimtz, G.H. Li, G.J. Tobin, T.D. Copeland. *et al.* (1998) Transport and activation of the vacuolar aspartic proteinase phytepsin in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Biol. Chem.* **273**: 31230–36.
- González-Rábade, N., J.A. Badillo-Corona, J.S. Aranda-Barradas & M.C. Oliver-Salvador. (2011) Production of plant proteases *in Vivo* and *in Vitro*. Review. *Biotechnol. Adv.* **29**: 983–96.
- Guevara, M.G., C.R. Oliva, M. Machinandiarena & G.R. Daleo (1999) Purification and properties of an aspartic protease from potato tuber that is inhibited by a basic chitinase. *Physiol. Plant.* **106(2)**: 164–9.
- Guevara, M.G., P. Veríssimo, E. Pires, C. Faro & G.R. Daleo (2004) Potato aspartic proteases: induction, antimicrobial activity and substrate specificity. *J. Plant Pathol.* **86**: 233–8.
- Güracar, S. (2011) Production, purification and characterization of thermostable protease from alkaliphilic and thermophilic *Geobacillus* Sp. Master of Science In Chemistry Thesis. Graduate School of Engineering and Sciences of İzmir Institute of Technology. Disponible en: <<http://library.iyte.edu.tr/tezler/master/kimya/T000959.pdf>>.
- Holmdahl, L., B. Risberg, D.E. Beck, J.W. Burns, N. Chegini, G.S. di Zerega & H. Ellis (1997) Adhesions: pathogenesis and prevention panel discussion and summary. *Eur. J. Surg. Suppl.* **577**: 56–62.
- Horimoto, Y., D.R. Dee & R.Y. Yada (2009) Multifunctional aspartic peptidase prosegments. *New Biotechnol.* **25**: 318–24.
- Ikai, A.J. (1980) Thermostability and aliphatic index of Globular proteins. *J. Biochem.* **8**: 1895–8.
- James, M.N. (2004) *Catalytic Pathway of Aspartic Peptidases*, in: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Elsevier A, pp. 12–9.
- Kato, Y., S. Murakami, Y. Yamamoto, H. Chatani, Y. Kondo, T Nakano *et al.* (2004) The DNA-binding protease, CND41, and the degradation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase in senescent leaves of Tobacco. *Planta* **220**: 97–104.
- Kervinen, J.G., J. Tobin, J. Costa, D.S. Waugh, A. Wlodawer & A. Zdanov (1999) Crystal structure of plant aspartic proteinase prophyepsin: inactivation and vacuolar targeting. *EMBO J.* **18**: 3947–55.
- Kishimoto, Y., M. Hiraiwa & S.J. O'Brien (1992) Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J. Lipid Res.* **33**: 1255–67.
- Koelsch, G., M. Mares, P. Metcalf, & M. Fusek (1994) Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens *FEBS Lett.* **343**: 6–10.
- Kuwabara, T. & K. Suzuki (1995) Reversible changes in conformation of the 23-kDa protein of photosystem II and their relationship to the susceptibility of the protein to a proteinase from photosystem II membranes. *Plant Cell. Physiol.* **36**: 495–504.

- Lufrano, D., R. Faro, P. Castanheira, G. Parisi, P. Veríssimo, S. Vairo-Cavalli, *et al.* (2012) Molecular cloning and characterization of procirsin, an active aspartic protease precursor from *Cirsium vulgare* (Asteraceae). *Phytochemistry* **81**: 7–18.
- Lufrano, D., S. Vairo Cavalli & N. Priolo (2007) Acción de Peptidasas aspárticas de flores de *Carduus acanthoides* y *Carduus thoermeri* sobre caseinatos bovino y caprino. *Tecnol. Láctea Latinoam.* **48**: 52–5.
- Mazorra-Manzano, M.A., T.C. Perea-Gutiérrez, M.E. Lugo-Sánchez, J.C. Ramirez-Suarez, M.J. Torres-Llanez, A.F. González-Córdova, *et al.* (2013) Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chem.* **141**: 1902–7.
- Mendieta, J.R., C. Fimognari, G.R. Daleo, P. Hrelia & M.G. Guevara (2010) Cytotoxic effect of potato aspartic proteases (StAPs) on Jurkat T cells. *Fitoterapia* **81**: 329–35.
- Mendieta, J.R. M.R. Pagano, F.F. Muñoz, G.R. Daleo & M.G. Guevara (2006) Antimicrobial activity of potato aspartic proteases (StAPs) involves membrane permeabilization. *Microbiology* **152**: 2039–47.
- Miller, E.J. & S. Gay (1987) The collagens: an overview and update. *Methods Enzymol.* **144**: 3–41.
- Muñoz, F.F., J.R. Mendieta, M.R. Pagano, R.A. Paggi, G.R. Daleo & M.G. Guevara (2010) The swaposin-like domain of potato aspartic protease (StAsp-PSI) exerts antimicrobial activity on plant and human pathogens. *Peptides* **31**: 777–85.
- Muñoz, F., M.F. Palomares-Jerez, G. Daleo, J. Villalaín & M.G. Guevara (2014) Possible mechanism of structural transformations induced by StAsp-PSI in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1838**: 339–47.
- Mutlu, A. & S. Gal (1999) Plant Aspartic Proteinases : Enzymes on the way to a function. *Physiol. Plant.* **105**: 569–76.
- Nakano, T., S. Murakami, T. Shoji, S. Yoshida, Y. Yamada & F. Sato (1997) A novel protein with DNA binding activity from tobacco chloroplast nucleoids. *Plant Cell* **9**: 1673–82.
- Olivares, J.E., C. Díaz-Camino, G. Estrada-Navarrete, X. Alvarado-Affantranger, F.Z. Rodríguez-Kessler, M. Zamudio, *et al.* (2011) Nodulin 41, a novel late nodulin of common bean with peptidase activity. *BMC Plant Biol.* **11**: 134–47.
- Page, M.J., & E. Di Cera (2008) Evolution of peptidase diversity. *J Biol Chem.* **283**: 30010–4.
- Pereira, A.O., D.J. Cartucho, A.S. Duarte, M.H. Gil, A.M.S. Cabrita, J.A. Patricio & M.M.T. Barros (2005) Immobilisation of Cardosin A in chitosan sponges as a novel implant for drug delivery. *Curr. Drug Discov. Technol.* **2**: 231–8.
- Pereira, C., D.S. da Costa, S. Pereira, F. de Moura Nogueira, P.M. Albuquerque, J. Teixeira *et al.* (2008) Cardosins in postembryonic development of cardoon: towards an elucidation of the biological function of plant aspartic proteinases. *Protoplasma* **232**: 203–13.
- Perpetuo, E.A., L. Juliano & I. Lebrun (2003) Biochemical and pharmacological aspects of two bradykinin-potentiating peptidases obtained from tryptic hydrolysis of casein. *J. Protein Chem.* **22**: 601–6.
- Pesquet, E. (2012) Plant proteases: from detection to function. *Physiol. Plant.* **145**: 1–4.
- Pimentel, C.D., D. Van Der Straeten, E. Pires, C. Faro & C. Rodrigues-Pousada (2007) Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene Family of *Cynara cardunculus* L. *FEBS J.* **274**: 2523–39.
- Ponting, C.P. & R.B. Russel (1995) Swaposins: circular permutations within genes encoding saposin homologues. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 179–80.
- Qing, L., L. Yi., P. Marek & B.L. Iverson (2013) Commercial proteases: present and future *FEBS Lett.* **587**: 1155–63.
- Ramalho-Santos, M., P. Verissimo, L. Cortes, B. Samyn & C. Faro (1998) Identification and proteolytic processing of Procardosin A. *Biochemistry* **255**: 133–8.
- Raposo, S. & A. Domingos (2008) Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. *Process. Biochem.* **43**: 139–44.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barrett (2004) *Introduction: Aspartic Peptidases and Their Clans*, in: *Handbook of Proteolytic Enzymes* (A.J. Barrett, N.D. Rawlings & J. F. Woessner, eds.), Elsevier Academic Press, London, Pp. 3–12.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barrett (1995) Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods Enzymol.* **248**: 105–20.
- Rawlings, N.D. & A.J. Barrett (2014) *Peptidases*, in *Handbook of Proteolytic Enzymes* (R. Beynon & J.S. Bond, eds.). 2nd edn, pp, 1–9. Chichester Ltd: Encyclopedia of Life Sciences.
- Rawlings, N.D., A.J. Barrett & A. Bateman (2012) MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **40**: 343–50.

- Reis, P.J.M. & F.X. Malcata (2011) Current state of portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Res.* **101**: 122–33.
- Reis, P.M., P.L. Lourenço, A. Domingos, A.F. Clemente, M. Salomé Pais & X. Malcata (2000) Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese. *Int. Dairy J.* **10**: 775–80.
- Rodrigo, I., P. Vera & V. Conejero (1989) Degradation of Tomato Pathogenesis-Related Proteins by an Endogenous 37 kDa Aspartyl Endoproteinase. *Eur. J. Biochem.* **184**: 663–9.
- Rodrigo, I., P. Vera, L.C van Loon & V. Conejero (1991) Degradation of Tobacco Pathogenesis-Related Proteins: Evidence for Conserved Mechanisms of Degradation of Pathogenesis-Related Proteins in Plants. *Plant Physiol.* **95**: 616–22.
- Salvesen, G.S., A. Hempel, & N.S. Coll (2016) Protease signaling in animal and plant regulated cell death. *FEBS J.* **283**: 2577–98.
- Sampaio, P.N., A.M. Fortes, J.M.S. Cabral, M.S Pais & L.P. Fonseca (2008) Production and characterization of recombinant Cyprosin B in *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1A) strain. *J. Biosci. Bioeng.* **105**: 305–12.
- Sarkkinen, P., N. Kalkkinen, C. Tilgmann, J. Siuro, J. Kervinen & L. Mikola (1992) Aspartic proteinase from barley grains is related to mammalian lysosomal Cathepsin D. *Planta* **186**: 317–23.
- Sarmiento, A.C., H. Lopes, C.S. Oliveira, R. Vitorino, B. Samyn, K. Sergeant *et al.* (2009) Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus*. *Planta* **230**: 429–39.
- Sarmiento, A.C., L. Silvestre, M. Barros & E. Pires (1998) Cardosins A and B, two new enzymes available for peptide synthesis. *J. Mol. Catal. B* **5**: 327–30.
- Sarmiento, C., C. Oliveira, E. Pires, F. Amado & M. Barros (2004) Reverse hydrolysis by Cardosin A: specificity considerations. *J. Mol. Catal. B.* **28**: 33–7.
- Schaller, A. (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**: 183–97.
- Schechter, I. & A. Berger (1967) On the size of the active site in proteases: pronase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 157–62.
- Schuette, C.G, B. Pierstorff, S. Huettler & K. Sandhoff (2001) Sphingolipid activator proteins: proteins with complex functions in lipid degradation and skin biogenesis. *Glycobiology* **11**: 81–90.
- Shmyrova, A.V., C.S. Oliveira, A.C. Sarmiento, M.T. Barros, G.G. Zhadan, M.G. Roig *et al.* (2006) Effect of acetonitrile on *Cynara cardunculus* L. Cardosin A stability. *Int. J. Biol. Macromol.* **39**: 273–9.
- Shuang, L., X. Yang, S. Yang, M. Zhu & X. Wang (2012) Technology prospecting on enzymes: Application, Marketing and Engineering. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2**: 1–11.
- Silva, S.V. & F.X. Malcata (2005) Partial identification of water soluble peptides released at early stages of proteolysis in sterilized ovine cheese-like systems: influence of type of coagulant and starter. *J. Dairy Sci.* **88**: 1947–54.
- Simões, I. & C. Faro (2004) Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem./FEBS* **271**: 2067–75.
- Simões, I., E.C. Mueller, A. Otto, D. Bur, A.Y. Cheung, C. Faro, *et al.* (2005) Molecular analysis of the interaction between Cardosin A and Phospholipase D(alpha). Identification of RGD/KGE sequences as binding motifs for C2 domains. *FEBS J.* **272**: 5786–98.
- Sivakumar, K., S. Balaji & Gangaradhakrishnan (2007) In Silico characterization of antifreeze proteins using computational tools and servers. *J. Chem. Sci.* **119**: 571–9.
- Tavares, T., M.Á. Sevilla, M.J. Montero, R. Carrón & F.X. Malcata (2012) Acute effect of whey peptides upon blood pressure of hypertensive rats, and relationship with their Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**: 316–24.
- Terauchi, K., T. Asakura, H. Ueda, T. Tamura, K. Tamura, I. Matsumoto *et al.* (2005) Plant specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAP1 and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting. *J. Plant Physiol.* **163**: 856–62.
- Timmer, J.C. & G.S. Salvesen (2007) Caspase substrates *Cell Death. Differ.* **14**: 66–72.
- Törmäkangas, K., J.L. Hadlington, P. Pimpl, S. Hillmer, F. Brandizzi, T.H. Teeri *et al.* (2001) A vacuolar sorting domain may also influence the way in which proteins leave the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* **13**: 2021–32.
- Tsiatsiani, L., K. Gevaert & F. Van Breusegem (2011) Natural substrates of plant proteases: how can protease degradomics extend our knowledge? *Physiol. Plant.* **145**: 28–40.

- Vairo Cavalli, S., S. Claver, N. Priolo & C. Natalucci (2005) Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *J. Dairy Res.* **72**: 271–5.
- Vairo Cavalli, S., D. Lufrano, M.L. Colombo & N. Priolo (2013) Properties and applications of phytepsins from thistle flowers. *Phytochemistry* **92**: 16–32.
- Vairo Cavalli, S.S., V. Silva, C. Cimino, F.X. Malcata & N. Priolo (2008) Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chem.* **106**: 997–1003.
- van der Hoorn, R.A.L. (2008) Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 191–223.
- Verissimo, P., C. Esteves, C. Faro & E. Pires (1995) The vegetable Rennet of *Cynara cardunculus* L. contains two proteinases with Chymosin and Pepsin-like specificities. *Biotechnol. Lett.* **17**: 621–26.
- Vieira, M., J. Pissarro, P. Veríssimo, P. Castanheira, Y. Costa, E. Pires *et al.* (2001) Molecular Cloning and characterization of cDNA encoding Cardosin B, an aspartic proteinase accumulating extracellularly in the transmitting tissue of *Cynara cardunculus* L. *Plant Mol. Biol.* **45**: 529–39.
- White, P.C., M.C. Cordeiro, D. Arnold, P.E. Brodelius & J. Kay (1999) Processing, activity, and inhibition of recombinant Cyprosin, an aspartic proteinase from Cardoon (*Cynara cardunculus*). *J. Biol. Chem.* **274**: 16685–93.