
**ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GLUTATION
S-TRANSFERASA 3 DE *V. vinifera* (VvGST3) COMO
TRANSPORTADOR DE FLAVONOIDES.**

**JOSÉ ANTONIO MADRID ESPINOZA
INGENIERO EN BIOINFORMÁTICA**

RESUMEN

Estudio estructural y funcional de Glutation S-Transferasa 3 de *V. vinifera* (VvGST3) como transportador de flavonoides

Glutation S-Transferasa (GST) es una superfamilia de proteínas presentes en eucariontes y procariontes, involucradas en el metabolismo primario y secundario, detoxificación de compuestos xenobióticos y defensa ante patógenos. Se dividen en diez grupos de acuerdo a su porcentaje de identidad de secuencia, de los cuales dos, denominados tau y phi, participan en el transporte de flavonoides desde el retículo endoplasmático hasta el tonoplasto de vacuolas para su depósito. Dentro de ellas, la proteína TT19 de *Arabidopsis* y varias de sus homólogas, como AN9 en petunia, BZ2 en maíz, VvGST4 y VvGST1 en vid, se involucran en el transporte de antocianinas. Se ha evidenciado que TT19 además participa en el transporte de PAs.

En esta memoria, la proteína VvGST3 fue estructural y funcionalmente caracterizada. El modelo estructural de calidad presentó dos sitios de unión a flavonoides, afines a antocianinas y/o PAs, similares a los de TT19. Uno de estos sitios se estructura por los aminoácidos F10, A11, S12, V52, V53, E65, E66, H107, D111 e I115 y el otro por A175, D176, E185, K191, W194, D195, S198, S199, W203, K204 y F207, entre otros. Además, se evaluó el papel del aminoácido W203, mediante la mutación Trp203Leu. Este resultó ser fundamental para mantener la afinidad por PAs, tal como ha sido reportado experimentalmente en TT19. Funcionalmente, se evaluaron los niveles de transcritos del gen VvGST3 en distintos tejidos y etapas de desarrollo de la baya de vid. El gen presentó una expresión significativa en semillas, correlacionado con los periodos, lugares de síntesis y acumulación de PAs en frutos. Finalmente, se evaluó la capacidad de VvGST3, para complementar el fenotipo del mutante *tt19-1* de *A. thaliana*, mostrando su participación en el transporte de PAs en semillas.

ABSTRACT

Structural and functional studies of Glutathione S-Transferase 3 from *V. vinifera* (VvGST3) as flavonoids transporter

Glutathione S-transferase (GST) is a superfamily of proteins in prokaryotes and eukaryotes, involved in primary and secondary metabolism, detoxification of xenobiotics and defense against pathogens. They are divided into ten groups according to their percent identity, two of which, called tau and phi, are involved in the transport of flavonoids from the ER to the tonoplast of vacuoles for his deposit. Among them, the Arabidopsis TT19 protein and several of its counterparts, as AN9 in petunia, maize BZ2, VvGST4 and VvGST1 on vine, are involved in the anthocyanins transport. While TT19 also had been shown to be involved in the Pas transport.

Herein, the protein VvGST3 was structurally and functionally characterized. The structural model presented two flavonoids binding sites, related to anthocyanins and/or PAs, similar to the TT19. The amino acids, present in both, were: F10, A11, S12, V52, V53, E65, E66, H107, D111 and I115, and the other: A175, D176, E185, K191, W194, D195, S198, S199, W203, K204 and F207, respectively. Moreover, the role of the amino acid W203 was evaluated through of Trp203Leu mutation. This proved to be critical for maintaining affinity for PAs, as has been reported experimentally in TT19. Functionally, the levels of transcripts of the *VvGST3* gene were evaluated in different grape tissues and developmental stages. The gene expression was significantly seeds correlated with periods and sites of synthesis and accumulation of PAs in fruit. Finally, the capacity of VvGST3 was evaluated, to complement the mutant phenotype *tt19-1* from *A. thaliana*, showing their participation in the PAs transport in seeds.