



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo A. C.**

**CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUTATIÓN S-TRANSFERASA
CLASE TAU (GSTU) DE MANGO Y SU FUNCIÓN EN EL
TRANSPORTE DE ANTOCIANINAS**

Por:

Ignacio Valenzuela Chavira

TESIS APROBADA POR LA

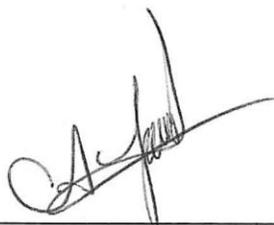
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE
ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

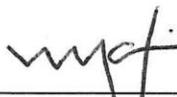
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

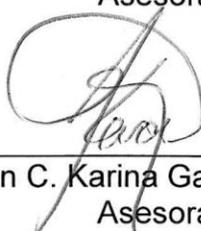
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ignacio Valenzuela Chavira, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Carmen A. Contreras Vergara
Directora de Tesis



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Asesora



M. en C. Karina García Orozco
Asesora



Dra. Rocío Sugich Miranda
Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

DEDICATORIA

A la memoria de mi Padre que siempre creyó en mí.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por la beca otorgada para los estudios de Maestría en Ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.) así como a la Coordinación de Tecnología en Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV) por el apoyo en la infraestructura y asesoría académica.

A CONACYT, por el proyecto #CB2012-01-178296, que hizo posible la realización de este trabajo.

A mi Directora de Tesis la Dra. Carmen A. Contreras Vergara, por su apoyo y asesoría.

A mis asesores del comité de tesis Dra. María A. Islas Osuna, Dra. Rocío Sugich Miranda y a la M.C. Karina D. García Orozco por su apoyo académico y asesoría en las técnicas utilizadas.

Al Dr. Aldo Arvizu Flores de la Universidad de Sonora por su colaboración en la modelación de estructuras y en el ensamblaje molecular.

A mis compañeros de laboratorio Leo, Lucia, Magda, Mitzuko y Karla que me ayudaron técnica y académicamente.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal del Dr. Miguel Angel Martínez Tellez., M.C. Emmanuel Aispuro y el Q. Francisco Soto por su apoyo técnico y por la colaboración para el ensayo de inhibición con antocianinas.

Al laboratorio del Dr. Martín Tiznado y al M.C. Javier Ojeda por el apoyo en el préstamo de equipos.

Al Laboratorio de Alimentos Funcionales del Dr. Gustavo González por la colaboración y préstamo de equipos, especialmente a la Q. Mónica Villegas.

Al Laboratorio de Proteínas Recombinantes del Dr. Rogerio Sotelo Mundo y a sus estudiantes por la asesoría técnica.

A mis amigas que me apoyaron Cinthya y Gaby que fueron muy importantes en este logro, así como a mis amigos Javier, Anna, Janeth y Dahlia (los TPs).

A mi novia Jacqueline, gracias por ser como eres.

A mi Madre y Hermanos que son un gran sustento.

CONTENIDO

Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	ix
Resumen	x
Abstract	xii
Intruducción	1
Antecedentes	3
Glutación S-Transferasa.....	3
Actividad Catalítica de GST.....	4
Isoenzimas de la GST	6
GST en Plantas.....	8
Transporte de Antocianinas.....	10
Función de las Antocianinas.....	10
Transporte de Antocianinas a la Vacuola	12
Función de la GST en el Transporte de Antocianinas a la Vacuola	14
El Mango como Modelo de Estudio	16
Importancia del Mango.....	16
Pigmentos en el Mango.....	17
GSTU de Mango	19
Hipotesis	22
Objetivos	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos	22
Materiales y Métodos	23
Sobreexpresión Heteróloga de GSTU de Mango	23
Gen Sintético de MiGSTU	23
Transformación de <i>E. coli</i> con el Gen Sintético.....	24
Detección de Clones Recombinantes	25
Sobreexpresión de la MiGSTU Recombinante.....	25
Purificación de la GSTU Recombinante	26

Preparación de Clarificado	26
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	26
Cromatografía de Intercambio Aniónico	27
Determinación de Actividad Enzimática de MiGSTU	27
Caracterización de GSTU de Mango	28
Caracterización Cinética de MiGSTU	28
Ensayo de Inhibición de GSTU con Antocianinas	28
Análisis Estructural de GSTU	29
Modelación de la Estructura de MiGSTU	29
Anclaje Molecular <i>in silico</i> (<i>Docking</i>) de MiGSTU con Antocianinas	29
Resultados y Discusión	30
Sobreexpresión Heteróloga de MiGSTU	30
Purificación de la MiGSTU Recombinante.....	31
Cinética Enzimática de MiGSTU.....	33
Ensayo de Inhibición de GST con Antocianinas	36
Análisis Estructural de GSTU	37
Unión de Antocianinas a MiGSTU	39
Conclusiones	41
Referencias	43

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Reacción catalizada por GST	4
2. Estructura general de una GST	5
3. Representación de las estructuras de diferentes clases de GST.....	7
4. Isoenzimas de GST y sus principales funciones	8
5. Ruta biosintética de antocianinas en Arabidopsis.....	12
6. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de GSTs	21
7. Gen sintético de MiGSTU	24
8. Sobreexpresión de MiGSTU	31
9. Purificación de MiGSTU.....	32
10. Fracciones puras de MiGSTU	33
11. Gráfico de Michaelis-Menten para MiGSTU.....	34
12. Regráfico a partir de la linearización de Lineweaver-Burk	34
13. Gráfico de Inhibición de Actividad de GST con Antocianinas	37
14. Estructura de MiGSTU	38
15. Sitios G, H y L de MiGSTU	39
16. Docking de MiGSTU con Antocianinas	40

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Contenido de antocianinas en cáscara de mango.....	19
2. Contenido de fenoles totales, carotenoides y antocianinas en extracto de acetona en cáscara de mango.....	19
3. Actividad específica de MiGSTU en diferentes pasos del proceso de purificación.....	35
4. Constantes Cinéticas para cada sustrato de MiGSTU.....	35

RESUMEN

La Glutación S-Transferasa (GST) es una enzima que participa en la detoxificación de compuestos xenobióticos y además permite el transporte intracelular de compuestos endógenos, como las antocianinas en plantas. Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles, responsables del color rojo, púrpura o azul en hojas, flores y frutos. En algunos cultivares de mango se desarrolla un rubor rojizo en la cáscara, que se ha atribuido a las antocianinas. El estudio de los compuestos participantes en los procesos de pigmentación ayudará a comprender el mecanismo de su movilización, el cual aún no se ha esclarecido totalmente. El objetivo de este trabajo fue caracterizar una GST de mango y determinar su interacción con antocianinas, como parte del mecanismo de transporte de antocianinas a la vacuola. En la presente investigación se muestra el análisis de la secuencia aminoacídica de una GST tipo Tau de mango (MiGSTU), con una masa molecular de 25.5 kDa. La MiGSTU recombinante se sobreexpresó de forma soluble y se purificó por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguida de una cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sefarosa). Se determinaron las constantes cinéticas de MiGSTU para sus sustratos obteniendo una K_m , V_{max} y K_{cat} para CDNB de 0.7918 mM, 80.58 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ y 68.49 s^{-1} respectivamente y para GSH 0.693 mM, 105.32 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ y 89.57 s^{-1} respectivamente, mostrando un comportamiento cinético de tipo Michales-Menten. La determinación de la interacción con antocianinas se realizó por medio de un ensayo de inhibición, con cianidina, peonidina, malvidina y delphinidina, observándose una mayor inhibición con cianidina (24.39%). Se realizó un análisis bioinformático mediante el Software MOE, donde se obtuvo un modelo estructural de la MiGSTU, por homología con una GST de trigo (1gwc) y se identificaron los sitios de unión a sustratos (G y H), además de los aminoácidos implicados en el transporte de antocianinas (sitio L). También se realizó un modelo *in silico* donde se observaron por medio de docking los posibles sitios de unión de las antocianinas en la MiGSTU, los cuales concuerdan con el sitio G. Lo anterior, aunado la inhibición de la

actividad de GST presentada al utilizar antocianinas en la reacción, sugiere que existe una interacción de la MiGSTU con las antocianinas, además de su posible función detoxificante.

Palabras Clave: Glutación S-Transferasa, Sobreexpresión heteróloga, Caracterización cinética, Antocianinas y Vacuola.

ABSTRACT

The Glutathione S-Transferase (GST) is an enzyme involved in xenobiotics detoxification, and also allows endogenous compounds intracellular transportation, such as anthocyanins, in plant cells. The anthocyanins are hydro-soluble pigments responsible for the red, purple or blue color in leaves, flowers and fruits. A red blush color, developed on the peel of some mango cultivars, has been attributed to anthocyanins. The study of the participant compounds in the pigmentation processes shall help to understand its mobilization mechanism, which has not been fully elucidated, yet. The study hereby is aimed to determine the interaction between GST and anthocyanins, as a model for studying their transportation mechanism to the vacuole. The analysis of a mango Tau class GST (MiGSTU) amino acid sequence, with a MW of 25 kDa, is shown in the study hereby. The recombinant GSTU was over-expressed in a soluble manner, purified by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and followed by an anion exchange chromatography (Q-sepharose).

The MiGSTU kinetic constants were determined for their substrates, obtaining a K_m , V_{max} and K_{cat} for CDNB of 0.7918 mM, 80.58 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ and 68.49 s^{-1} , respectively, as well as for GSH 0.693 mM, 105.32 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ and 89.57 s^{-1} respectively, showing a Michales-Menten type kinetic behavior. The anthocyanins interaction determination was performed by an inhibition essay with cyanidin, peonidin, malvidin and delphinidin; a greated inhibition was observed with cyanidin (24.39%). A bioinformatic analysis was carried through the MOE Software, where a MiGSTU structural model was obtained by homology with wheat GST (1gwc); moreover, the substrates binding sites (G and H) were identified, in addition to the aminoacids involved in anthocyanin transportation (L site). An *in silico* model by docking, where the potential anthocyanins binding sites in the MiGSTU were observed, was also performed, which are in accordance with the G site. An interaction of the MiGSTU with the anthocyanins is suggested by this, along with the GST activity inhibition

revealed as anthocyanins were used in the reaction, besides the possible detoxifying function of mango Tau class GST.

Keywords: Glutathione-s-Transferase, heterologous overexpression, kinetic characterization, anthocyanins and vacuole.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son proteínas con actividad catalítica que participan en diferentes reacciones producidas en todas las células procariotas y eucariotas. Las propiedades bioquímicas, termodinámicas y cinéticas de las enzimas son de gran importancia para su clasificación y comprensión de su actividad *in vivo* (Mueller et al., 2000). El estudio de la actividad de las enzimas tiene implicaciones prácticas en la industria, medicina, agricultura y en la producción de alimentos (Edwards et al., 2000).

Las Glutación-s-Transferasas (GSTs) constituyen un grupo de enzimas presentes en diversas especies de bacterias, animales, insectos y plantas. Su principal función es la detoxificación de xenobióticos mediante su conjugación con glutatión (Chronopoulou et al., 2012). Otras funciones reportadas para estas enzimas son la transducción de señales, la protección contra daños del ozono y metales pesados, entre otras. En plantas se han identificado siete clases diferentes de GSTs de las cuales solo dos, tau (GSTU) y phi (GSTF), son exclusivas de las plantas, siendo la clase tau la más abundante (Lan et al., 2009).

Además de las funciones mencionadas se ha reportado que las GSTs actúan como proteínas acompañantes no enzimáticas (ligandinas), que permiten el transporte intracelular de compuestos endógenos en plantas. Dentro de sus ligandos naturales en las plantas se incluye a pigmentos vegetales como las antocianinas. Una vez sintetizadas en el citoplasma las antocianinas necesitan ser transportadas a la vacuola, lo cual se puede realizar a través de dos mecanismos: el transportador ligandina (LT) mediado por GST y el transporte vesicular (VT).

El estudio de la movilización de estos compuestos coloridos, como las antocianinas, se vuelve más interesante en plantas y frutos donde el color es

primordial, como el mango, que es una de las frutas tropicales más importantes debido a sus excelentes características sensoriales (Ploy, 2006). Al ser un fruto climatérico tiene una maduración acelerada, que se caracteriza por cambios notables en la coloración (Neidhart et al., 2007). Algunas variedades de mango desarrollan un característico rubor rojizo de la cascara, que se ha atribuido a las antocianinas (Singh et al., 2013).

Los cambios durante la maduración afectan la composición de los pigmentos, por lo que es necesario comprender el mecanismo de movilización de estos pigmentos en las células vegetales de los frutos. El estudio de los compuestos participantes en estos procesos de pigmentación, tales como las GSTs, nos ayudará a comprender el mecanismo de su movilización, el cual aún no se ha esclarecido totalmente.

ANTECEDENTES

Glutación S-Transferasa

Las Glutación S-transferasas (GST, EC 2.5.1.18) o transferasas de glutación, son un grupo heterogéneo de enzimas detoxificantes celulares, que catalizan la conjugación del tripéptido glutación (Glu-Cys-Gly) con compuestos electrófilos reactivos. Entre estos se incluyen tanto compuestos endógenos como exógenos (xenobióticos), que son dirigidos a sitios específicos ya sea intra o extracelularmente (Marrs, 1996; Kampranis et al., 2000; Conn et al., 2008; Dixon y Edwards, 2010; Chronopoulou et al., 2012). Las GSTs son proteínas ubicuas, mayormente citosólicas, que se encuentran como dímeros de alrededor de 50 kDa, de las que existen diferentes clases (Dixon et al., 2002; Dixon et al., 2002). Algunas funciones de las GSTs son la detoxificación de herbicidas, transducción de señales, protección de plantas contra daños del ozono, metales pesados y xenobióticos (Mohsenzadeh et al., 2011).

La GST se requiere para la detoxificación de diversos sustratos exógenos, incluyendo muchos fármacos administrados a los animales y herbicidas aplicados a las plantas (Conn et al., 2008). Especies tolerantes o susceptibles a un amplio espectro de herbicidas (por ejemplo, triazinas, acetanilidas, tiocarbamatos) se caracterizan por tener niveles altos y bajos de GST, respectivamente (Lamoureux y Rusness, 1993); también, se ha reportado un aumento en la actividad específica de GST en respuesta a algún tratamiento herbicida (Edwards y Cole, 1996; Chronopoulou et al., 2012).

Actividad Catalítica de GST

Todas las GSTs tienen una amplia versatilidad catalítica, debido a la variabilidad de su dominio C-terminal que le confiere características específicas a cada clase de GST. Reaccionan mediante un ataque nucleofílico, casi con cualquier compuesto hidrofóbico que contenga un átomo electrofílico, como carbono (C), nitrógeno (N), azufre (S) y oxígeno (O). Cuando el ataque nucleofílico es sobre C, las GSTs actúan como S-alquiltransferasa, S-ariltransferasa, S-epoxidotransferasa o S-alquenotransferasa, de acuerdo al radical que transfieren; en ésteres orgánicos de nitrato, éste ataque ocurre sobre N; en tiocianatos orgánicos y disulfuros es sobre S, y en peróxidos orgánicos el ataque ocurre sobre O (Contreras-Vergara, 2007). Las GSTs catalizan la adición nucleofílica del glutatión en su estado reducido (GSH) a compuestos electrófilos por medio de mecanismos S_N2 , adición de Michael o S_NAr (Silverman, 2000). En la Figura 1 se muestra la reacción que cataliza GST utilizando a GSH como su sustrato natural y CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzenu) como sustrato modelo de un xenobiótico.

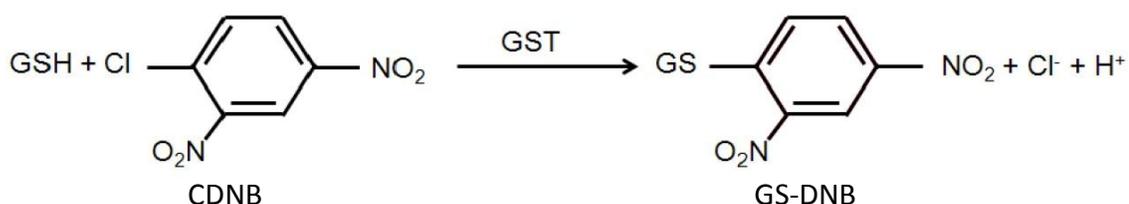


Figura 1. Reacción catalizada por GST. Se muestran la conjugación del glutatión reducido (GSH) y el sustrato modelo CDNB (1-Cloro-2,4-dinitrobenzenu), formando el producto conjugado GS-DNB.

Características Estructurales

A pesar de la baja identidad global entre las secuencias de las diferentes clases de GST, todas sus estructuras tienen un plegamiento similar. En la Figura 2 se muestra la estructura general de las GSTs, las cuales se encuentran naturalmente en forma de homodímero. Cada monómero consiste en dos dominios, el dominio N-terminal (dominio I, de los residuos 1 a 80) y el dominio C-terminal (dominio II, aproximadamente dos tercios de la proteína) (Wilce y Parker, 1994). Se han identificado dos sitios de unión a ligandos por subunidad, que son un sitio de unión específico a glutatión (sitio G), construido principalmente de los residuos del dominio I, y el sitio de unión al sustrato hidrofóbico (sitio H), que se forma principalmente por residuos con cadenas laterales no polares situadas en el dominio II (Mohsenzadeh et al., 2011). El dominio N-terminal es bastante conservado y contiene los residuos específicos críticos para la actividad catalítica y de unión al GSH.

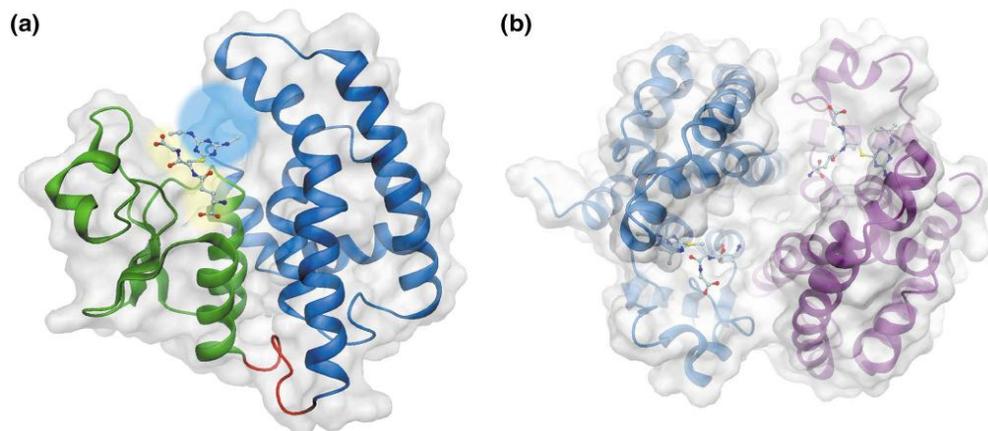


Figura 2. Estructura general de una GST unida a CDNB. (a) Representación en listón/superficie de una subunidad de GST típica (*Z. mays* GSTF1, 1BYE pdb), con el dominio amino-terminal en verde, la región de engarce en rojo, el dominio carboxilo-terminal en azul y la superficie de la proteína en gris. Se muestra un conjugado de GSH-antrazina en representación de bolitas y palitos en el sitio de unión a GSH (sitio G en amarillo) y el sitio hidrofóbico (sitio H en azul). (b) Representación en listón/superficie del homodímero de ZmGSTF1, las subunidades se muestran en azul y púrpura (Dixon et al., 2002).

En general se supone que la amplia especificidad de sustrato de las GSTs citosólicas se correlaciona con la flexibilidad estructural, que permite el reconocimiento de diversas estructuras con un costo energético mínimo (Hou et al., 2007). Según los estudios cinéticos, la eficiencia catalítica de la GST hacia xenobióticos es relativamente baja, comparada con la afinidad hacia el GSH (Armstrong, 1997; Hayes et al., 2005).

Isoenzimas de la GST

Las GSTs citosólicas se han clasificado en diferentes clases, que se encuentran en mamíferos, plantas, insectos, parásitos, hongos y bacterias (Chelvanayagam et al., 2001; Ketterer, 2001). En los mamíferos, las subunidades de GST se clasifican en las siguientes clases: alfa, mu, pi, sigma, theta, kappa y zeta (Figura 3) (Dixon et al., 1998; Hayes et al., 2005; Mohsenzadeh et al., 2011), basándose en la identidad de los aminoácidos, inmuno-reactividad cruzada y la especificidad por el sustrato (Conn et al., 2008; Mohsenzadeh et al., 2011). En las plantas se han reportado principalmente GSTs de las clases theta, zeta, phi y tau, siendo phi y tau las más abundantes, las clases theta y zeta también se encuentran en mamíferos. Además de las GSTs de plantas mencionadas, también se han reportado las isoformas lambda, dehidroascorbato reductasa (DHAR) y deshalogenasa tetraclorohidroquinona (TCHQD), obteniendo siete clases distintas en plantas (Edwards y Cole, 1996; Dixon et al., 2002; Lan et al., 2009; Chronopoulou et al., 2012).

También existe un grupo de GSTs microsomales, la cuales son proteínas asociadas a la membrana celular que participan en el metabolismo de glutatión (Dixon et al., 2002; Mohsenzadeh et al., 2011). Las plantas también contienen genes que codifican GSTs microsomales, que aunque no están relacionadas con la principal superfamilia de GSTs, tienen actividad similar dependiente de

glutación. En la Figura 4 se presentan las isoformas de GST con sus principales funciones, destacando la función ligandina o acompañante de las clases exclusivas de plantas tau y phi.

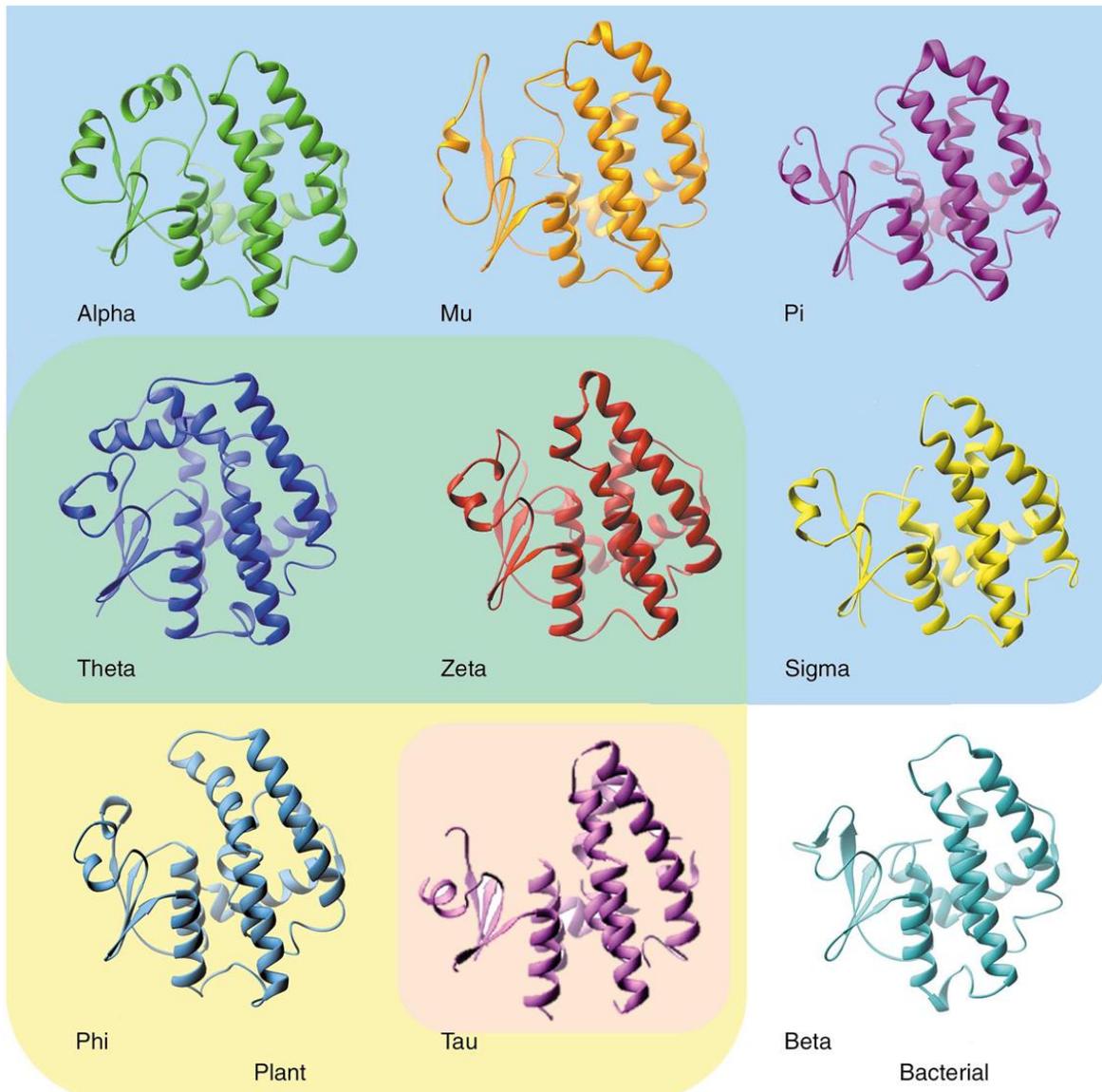


Figura 3. Representación de las estructuras de diferentes clases de GST. Las GSTs específicas para los mamíferos (alfa, mu, sigma y pi) tienen un fondo azul, la GST específica de bacterias (beta) con fondo blanco, GSTs específicas de plantas (phi y tau) de color amarillo, y las GSTs que tienen contrapartes en los animales y las plantas (theta y zeta) tienen fondos verdes. Aunque hay poca similitud de secuencia entre enzimas de diferentes clases, hay conservación significativa en la estructura general. Figura modificada de Dixon et al. (2002) y Thom et al. (2002).

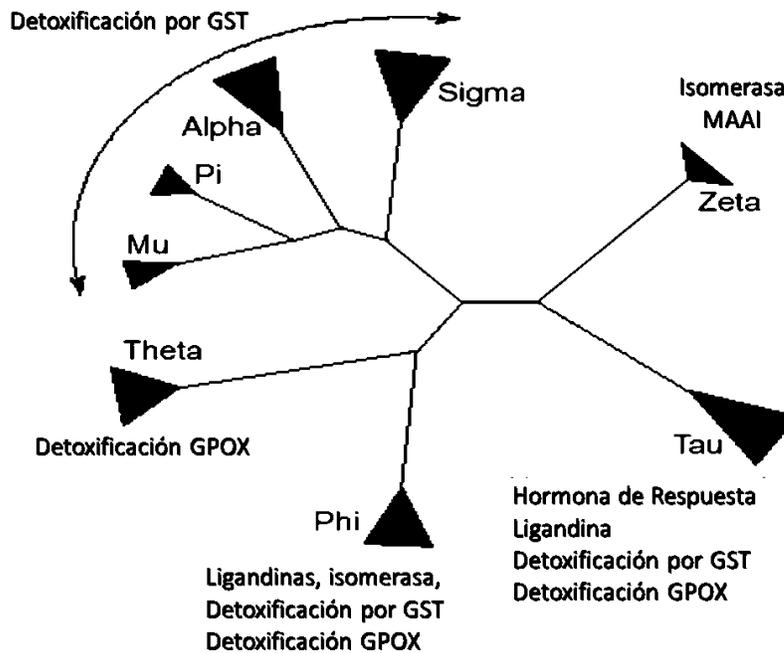


Figura 4. Isoenzimas de GST y sus principales funciones (Yilmaz, 2006).

GST en Plantas

Las plantas contienen una gran variedad de proteínas de unión a glutatión, incluyendo liasas de glutatión, peroxidasas, reductasas, y S-transferasas (GST) (Marrs, 1996). Las GSTs comprenden una gran familia de enzimas, que constituyen aproximadamente del 1-3% de la proteína soluble en las células vegetales (Marrs, 1996). En plantas las GSTs involucradas en las reacciones de detoxificación, también se han estudiado por su capacidad de conducir a la captura vacuolar de sustratos conjugados con el glutatión, tales como los herbicidas los cuales son ampliamente utilizados en la agricultura (Mueller et al., 2000).

Las GSTs como proteínas acompañantes no enzimáticas (ligandinas), permiten el transporte intracelular de compuestos endógenos (Marrs et al., 1995; Dean, JD et al., 2005). Dentro de las plantas, estos ligandos incluyen a pigmentos vegetales como las antocianinas (Marrs et al., 1995; Mueller et al.,

2000; Lederer y Böger, 2005). La actividad de las GSTs se ha caracterizado en muchas plantas, incluyendo maíz (Dixon et al., 1997), trigo (Edwards y Cole, 1996), tabaco (Droog et al., 1995), soya (Andrews et al., 1997), cebada (Romano et al., 1993), garbanzo (Hunaiti y Ali, 1990), cacahuete (Lamoureux et al., 1981), sorgo (Dean et al., 1990) y caña de azúcar (Singhal et al., 1991).

Hasta la fecha, se han resuelto las estructuras cristalinas de más de 300 GSTs solubles en diferentes tipos de organismos, todas reportadas en el PDB (Protein Data Bank). El análisis de genes y los proyectos de genómica indican que las plantas tienen más de 40 genes que codifican para GSTs y que las proteínas pueden compartir tan solo un 10% de identidad en sus aminoácidos (McGonigle et al., 2000). Además se ha reportado que el número de exones es diferente para cada clase de GST. Por ejemplo, los genes que codifican para la clase phi de GST contienen tres exones y para la clase tau contienen dos, mientras que en la clase zeta, que catalizan reacciones isomerasa, tienen diez exones en sus genes. Muchos de los genes de GST están presentes en unidades de repetición en los cromosomas de las plantas (Edwards et al., 2000; Mohsenzadeh et al., 2011).

La mayoría de los estudios sobre GSTs se centran en la caracterización enzimática, son pocos los estudios donde se abordan otras temáticas asociadas a la GST, como la señalización y el transporte de compuestos endógenos de la planta. Se conoce que las clases phi y tau de GST pueden ser inducidas por tratamientos que invocan reacciones de defensa de las plantas, así como por el estrés osmótico y temperaturas extremas (Marrs, 1996). Lo anterior sugiere que las GSTs están profundamente involucradas en el metabolismo de la planta durante la senescencia (Kunieda et al., 2005).

En un estudio realizado en *Phaseolus vulgaris* (frijol) por Chronopoulou et al. (2012), el tratamiento con el herbicida ariloxifenoxipropiónico fluazifop-p-butilo, resultó en la inducción de la actividad de GST; además, se identificaron tres isoenzimas de GST inducibles. El análisis de los clones de ADNc demostró que las secuencias deducidas de aminoácidos comparten una alta homología

con GSTs que pertenecen a las clases phi y tau. Los resultados mostraron que las GSTs inducidas con el herbicida fluazifop en *P. vulgaris* (PvGSTs) catalizan una amplia gama de reacciones y exhiben una variada especificidad de sustrato. Estos resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre la diversidad catalítica y estructural de las GSTs y el mecanismo de detoxificación utilizado por *P. vulgaris* (Chronopoulou et al., 2012).

Transporte de Antocianinas

La función de ligandina de las GSTs se ha asociado con el transporte de flavonoides a la vacuola, principalmente de las antocianinas, las cuales tienen implicación en el color de las plantas y frutos. Además del transporte de antocianinas a la vacuola mediado por ligandinas, se ha reportado un transporte asociado a vesículas. En diversas plantas modelo como *Arabidopsis* se han identificado las enzimas que participan en la ruta biosintética de las antocianinas y transportadores del tonoplasto, que ayudan a la acumulación de pigmentos dentro de la vacuola.

Función de las Antocianinas

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes en nuestra dieta; son metabolitos secundarios característicos de las plantas superiores, que juegan un papel importante en la protección contra el estrés (Lepiniec et al., 2006; Kitamura et al., 2012). Los flavonoides se pueden dividir en varias clases, dependiendo de su grado de oxidación como las flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanoles, antocianinas y protoantocianidinas. Estos se han encontrado en una diversidad de plantas, con funciones fisiológicas importantes como el transporte de auxinas (Winkel-Shirley, 2001), contribuyendo a la

adaptación individual de la planta en entornos variables (Kitamura et al., 2012). Las antocianinas y proantocianidinas (PA) son dos pigmentos importantes de la planta, pertenecientes a la familia de los flavonoides, que comparten intermediarios comunes hasta la formación de antocianidinas (Li et al., 2011). Las antocianidinas son sometidas a múltiples modificaciones que incluyen la glicosilación, la metilación y la acilación (Pourcel et al., 2010) obteniendo una gran diversidad de estructuras.

Las antocianinas son una de las principales clases de pigmentos de las plantas con múltiples funciones ecofisiológicas (Grotewold, 2006; Poustka et al., 2007), que forman pigmentos de color rojo, azul o violeta en un pH bajo, el cual se logra en la vacuola (Mueller et al., 2000; Gomez et al., 2011). En muchas plantas las antocianinas se concentran en inclusiones vacuolares de antocianinas (AVI) (Conn et al., 2003; Conn et al., 2008) donde se intensifica el color (Poustka et al., 2007). Se desempeñan como atractivos visuales para los polinizadores y diseminadores de semillas, que pueden participar en la protección contra estrés biótico y abiótico (Conn et al., 2008). Las antocianinas son sintetizadas por varios complejos de enzimas que se localizan en la cara citoplásmica del retículo endoplásmico (ER) (Winkel, 2004), y luego se transportan a la vacuola (Figura 5) (Conn et al., 2008; Gomez et al., 2011; Chronopoulou et al., 2012).

Los avances en las técnicas de biología molecular han hecho posible la identificación de genes participantes en la ruta biosintética de las antocianinas, no solo en plantas modelo como *Arabidopsis* y maíz, sino también en especies ornamentales importantes como la petunia (Koes et al., 2005). Se han identificado muchos de los genes que codifican para enzimas estructurales de la biosíntesis de antocianinas, así como sus factores de transcripción, y en consecuencia, se acepta que la ruta fundamental de la biosíntesis en antocianinas se conserva en el reino vegetal (Kitamura et al., 2012). Al igual que los genes de la biosíntesis de antocianinas se han identificado

transportadores (ABC, MATE y MRP), proteínas y enzimas como la GST involucradas en el transporte de las antocianinas a la vacuola.

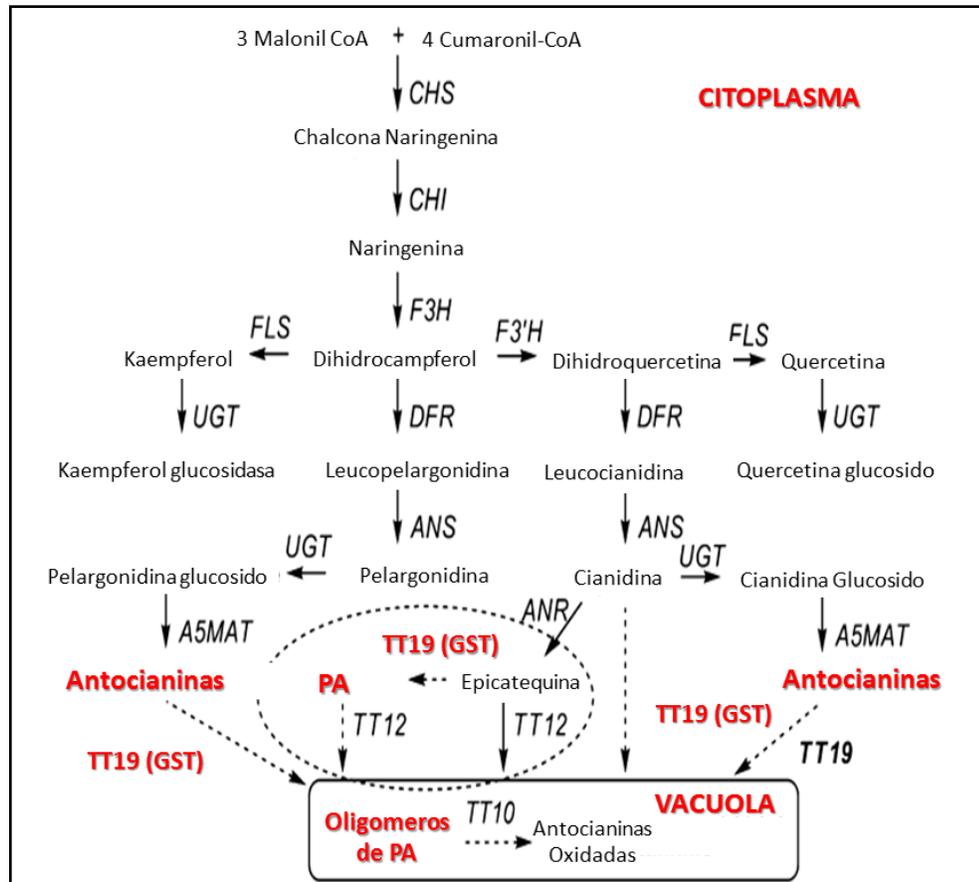


Figura 5. Ruta biosintética de protoantocianidinas (PA) y antocianinas en Arabidopsis. Las líneas punteadas indican regiones de la ruta que no están bien definidas. Tomado y modificado de Li et al. (2011).

Transporte de Antocianinas a la Vacuola

Las plantas acumulan grandes cantidades de compuestos especializados que necesitan ser transportados adecuadamente y almacenados hasta su utilización. Hasta ahora, existe un gran contraste con el conocimiento del metabolismo de la planta y sus rutas metabólicas (Buchanan et al., 2000), debido a que se conoce poco sobre los mecanismos utilizados por las plantas

para transportar y secuestrar compuestos especializados. Esta falta de conocimiento en el transporte de antocianinas a la vacuola puede obstaculizar los esfuerzos futuros para manipular racionalmente las rutas metabólicas de la planta obteniendo plantas con mejores características organolépticas (Pourcel et al., 2010).

Las antocianinas una vez sintetizadas deben ser transportadas y compartimentadas por la planta, acumulándose en la vacuola, esta localización es necesaria para evitar la oxidación y para que la planta pueda sobrevivir (Marrs, 1996; Mueller et al., 2000). El mecanismo de transporte de las antocianinas a la vacuola ha sido debatido por mucho tiempo, con numerosos modelos propuestos, como el transporte mediado por vesículas o transporte mediado por membranas (Grotewold y Davies, 2008; Gomez et al., 2011). Existe evidencia del tráfico mediado por vesículas, en donde las vesículas llenas de antocianinas y otros flavonoides viajan del RE al tonoplasto (Poustka et al., 2007; Gomez et al., 2011).

Para el transporte de antocianinas a la vacuola se han propuesto dos modelos: El transportador ligandina (LT) y los modelos de transporte vesicular (VT) (Grotewold y Davies, 2008). El modelo LT se basa en gran medida en la observación de las mutaciones en algunos genes de GST, tales como los genes del maíz (*BZ2*), petunia (*AN9*) y Arabidopsis (*TT19*), para inferir la localización vacuolar de las antocianinas. Curiosamente, la actividad enzimática de GST no se requiere para el secuestro vacuolar de antocianinas dependientes de GSTs, debido a que sirven como ligandinas, necesarias para la escolta de antocianinas, tales como cianidina 3-O-glucósido (C3G), desde el RE al tonoplasto (Mueller et al., 2000).

En la vacuola las antocianinas se distribuyen de manera uniforme en el lumen, sin embargo, en muchas especies de plantas, se acumulan en las estructuras subvacuolares discretas (Grotewold y Davies, 2008). Una de estas estructuras son los antocianoplastos, que han sido descritos como estructuras esféricas unidas a la membrana intravacuolar. En plántulas de rábano se

visualizaron antocianoplastos como vesículas membranosas citoplasmáticas llenas de antocianina. Otras estructuras llamadas AVI (Inclusiones Vacuolares de Antocianinas), se han observado en plantas de *Arabidopsis* inducidas a acumular una gran cantidad de antocianinas (Pourcel et al., 2010).

Dos grandes familias de transportadores, los ABC (ATP Binding Cassette) y MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) están involucrados en el transporte de antocianinas a la vacuola en el maíz (Goodman et al., 2004), *Arabidopsis* (Marinova et al., 2007) y vid (Gomez et al., 2009), pero su mecanismo aún no está del todo claro (Gomez et al., 2011). La identificación de la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos de maíz (ZmMRP3) localizada en el tonoplasto, forma parte del modelo que implica proteínas portadoras y de transporte en el tráfico de antocianinas a la vacuola (Goodman et al., 2004; Poustka et al., 2007).

Recientemente, se ha sugerido la participación de diferentes proteínas de la membrana en los mecanismos de transporte de antocianinas en vid y en la leguminosa *Medicago truncatula*. Estas proteínas, anthoMATE1 y anthoMATE3 en vid (Gómez et al., 2009) y MATE2 en *M. truncatula* (Zhao et al., 2011), se clasifican como proteínas transportadoras de la familia MATE. El descubrimiento de los diferentes transportadores vacuolares embebidos en su tonoplasto puede ayudar a desarrollar un modelo del transporte de las antocianinas más exacto donde se puede determinar el rol de la GST como ligandina.

Función de la GST en el Transporte de Antocianinas a la Vacuola

El transporte de antocianinas asociado a GSTs se ha identificado en diversas especies de plantas, como en petunia (Alfenito et al., 1998), en clavel (Mueller et al., 2000; Larsen et al., 2003), en *Arabidopsis* (Li et al., 2011), en vid (Conn et al., 2008), en perilla (Yamazaki et al., 2008) y en ciclamen (Kitamura et al., 2012).

La función de la GST en el transporte de antocianinas se ha estudiado mediante el uso de mutantes y GSH marcado con [³⁵S] (Mueller et al., 2000). En este trabajo la mutante knockout BZ2, cuando se complementaba con Bz2 y se exponía a GSH marcado, produciendo compuestos etiquetados con ³⁵S que migraron con las antocianinas, sugiriendo una glutationación covalente *in vivo*. En base a estos resultados, se propone un nuevo modelo donde la GST participa en el secuestro vacuolar de flavonoides. Mueller y colaboradores (2000) sugieren que AN9 (petunia) y BZ2 (maíz) son proteínas citoplasmáticas "escolta" para antocianina, y que el secuestro se lleva a cabo sin la formación de un conjugado de GSH en el citoplasma. En este sentido BZ2 y AN9 funcionan como ligandinas, cuya actividad de unión *in vivo* es necesaria, pero no cataliza directamente cualquier conversión enzimática (Edwards et al., 2000).

En la mutante knockout de GST BZ2 se observó una acumulación de antocianinas en el citosol (Mueller et al., 2000; Conn et al., 2008). Esta mutante mostró una pigmentación de marrón a bronce en las semillas, resultado de la interrupción de la capacidad de secuestrar antocianina en la vacuola (Marrs et al., 1995; Poustka et al., 2007; Li et al., 2011).

En *Arabidopsis*, las mutantes de la proteína TT19 (Transparent Testa19) que ha sido identificada como GST con actividad ligandina, afectan tanto la acumulación de antocianinas en los tejidos vegetativos como la acumulación de proantocianidinas (PA) en la testa. La mutante TT19 tiene un fenotipo particular en la testa, donde precursores de PA se acumulan en estructuras citoplasmáticas envueltas en una membrana (Poustka et al., 2007). Los resultados obtenidos con las mutantes TT19, AN9 y BZ2 son el sustento de la participación de la GST en el transporte de antocianinas a la vacuola, sin embargo se continúa realizando estudios a nivel molecular para esclarecer el mecanismo por el cual se unen estos pigmentos a la GST.

El Mango como Modelo de Estudio

Importancia del Mango

El mango es una de las frutas tropicales más importantes del mundo. Pertenece a la familia Anacardiaceae y su nombre científico es *Mangifera indica* L. (Salazar-Cisneros, 2000). Es originario de la India, pero fue introducido a nuestro país a través de los españoles en 1779. Como es el caso de muchos otros frutos, como el plátano y el limón, a pesar de no ser un cultivo nativo ha ocupado un lugar primordial en México (Gómez-Tagle, 2005). Por sus excelentes características sensoriales, el mango tiene gran demanda en todos los mercados (Ploy, 2006), siendo uno de los principales frutos exportados por México.

El peso del mango varía desde 150 g hasta 2 kg. Su forma también es variable, pero generalmente es ovoide-oblonga, notoriamente aplanada, u obtusa a ambos extremos. El color puede estar entre, verde, amarillo y diferentes tonalidades de rosa, rojo y violeta. La cascara es gruesa, frecuentemente con lenticelas blancas prominentes; la carne es jugosa y sabrosa, de color amarillo o anaranjado. Cada fruto de mango consta de una sola semilla, de forma ovoide u oblonga y están rodeadas por un endocarpio grueso y lechoso con una capa fibrosa externa, que se puede extender dentro de la carne (Gómez-Tagle, 2005).

El mango tiene diversas variedades comerciales, las más importantes son: Haden, Kent, Keitt, Tommy Atkins y Ataulfo. Por su sabor, resistencia y su relativa larga duración, estas variedades tienen aceptación reconocida y probada en el mercado internacional. En la actualidad ocupa el puesto 5 en la producción total mundial entre los principales cultivos frutales y el tercero entre los tropicales inmediatamente detrás del plátano y la piña, su cultivo se realiza

en más de 100 países (FAO, 2004). Es considerado actualmente como un producto exótico, y dentro de este grupo es la principal fruta producida mundialmente (Gómez-Tagle, 2005).

Al ser un producto altamente perecedero, requiere un traslado rápido debido a su acelerada maduración. Dicha maduración se caracteriza por cambios en la coloración, producción de compuestos volátiles, degradación del almidón y síntesis de azúcares (Neidhart et al., 2007). El color es una característica sensorial del mango indicativa de una buena calidad del fruto. El mango Haden es un fruto con gran atractivo visual con un color verde y amarillo con visos de rojo a oscuro los cuales son atribuidos a los pigmentos clorofila, carotenos y antocianinas. Los cambios durante la maduración afectan la composición de los pigmentos, que es uno de los atractivos de este fruto, siendo interesante comprender el mecanismo de la pigmentación en el mango, tanto en la cáscara como en la pulpa del fruto.

Pigmentos en el Mango

Los cambios de color en frutos de mango se deben a la desaparición de clorofila y aparición de otros pigmentos. Los cloroplastos se transforman en cromoplastos que contienen pigmentos de color amarillo o rojo (Parikh et al., 1990). Los diferentes pigmentos son antocianinas y carotenoides, tales como ésteres de xantofila, β -caroteno, licopeno y xantofilas, que se acumulan en la vacuola (Lizada, 1993). Dependiendo de la variedad y la acumulación de pigmento, el color de la cáscara puede cambiar de color verde oscuro a rojizo, amarillo-anaranjado o amarillento. Algunos cultivares desarrollan un rubor rojizo, que se ha atribuido a las antocianinas (Singh et al., 2013).

La pulpa de la fruta del mango contiene altas concentraciones de carotenoides (hasta 9 mg 100 g⁻¹), causando el desarrollo de un amarillo intenso a naranja. En cultivares de color amarillo, carotenoides y xantofilas son

los pigmentos predominantes, mientras que las antocianinas se producen en la cascara de algunos cultivares con tonalidades rojas (Proctor y Creasy, 1969; Singh et al., 2013). Durante el desarrollo del mango, los fenoles totales aumentan en la cáscara y en la pulpa en todas las etapas (Lakshminarayana, 1980), con un contenido de polifenoles totales en la cáscara del mango de 4,066 mg/kg de peso seco (Berardini et al., 2005). Las antocianinas han sido identificadas en la cáscara de mango y estimadas en un rango de 203 a 565 mg/100g (peso fresco) dependiendo de la variedad y el estado de madurez (Berardini et al., 2005; Masibo y He, 2008).

Investigaciones recientes han demostrado que la cáscara de mango de la variedad Tommy Atkins contienen un gran número de flavonoles O- y xantonas C-glicósidos (Schieber et al., 2003), que corroboran los resultados de otro estudio del perfil fenólico de un puré de mango comercial (Schieber et al., 2000). Berardini y colaboradores (2005), realizaron el perfil del contenido de flavonoides en mango, encontrando 14 tipos de antocianinas diferentes, con una variación del contenido total de antocianinas, en las cáscaras de cultivares de mango de color rojo, de 211 (Mango R2E2) a 3719 (Tommy Atkins) $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso seco (Tabla 1). Las antocianidinas hexosas se encontraron presentes en cantidades más altas en todas las muestras (Berardini et al., 2005). En la Tabla 2 se muestra el contenido de antocianinas en la cáscara de 2 variedades de mango maduro e inmaduro, encontrando en un rango de 203 a 326 mg/100 g en cáscara inmadura y 360 a 565 mg/100 g en cáscara madura (Ajila et al., 2007).

Tabla 1. Contenido de antocianinas en cáscara de cultivares de mango color rojo.
Fuente: Berardini et al. (2005).

	Cianidin 3-O-galactósido	Antocianidina hexosa	Antocianinas totales
Tommy Atkins	234 ± 15	3485 ± 290	3719 ± 291
R2E2	ND ^a	211 ± 7	211 ± 7
Kent	85 ± 4	422 ± 2	507 ± 5
José	4 ± 2	279 ± 20	283 ± 20
Haden	206 ± 10	1488 ± 15	1694 ± 18
Heidi	1165 ± 99	1755 ± 90	2930 ± 134
^a ND, no detectado			

Tabla 2. Contenido de fenoles totales, carotenoides y antocianinas en extracto de acetona en cáscara de mango. Fuente: Ajila et al. (2007).

Variedad	Contenido de Fenoles Total (mg/100g)	Contenido de Carotenoides (mg/100g)	Contenido de Antocianinas (mg/100g)
Raspuri inmadura	10,970 ± 82 ^d	7.35 ± 0.053 ^a	203 ± 5.03 ^a
Raspuri madura	10,000 ± 19 ^c	4.36 ± 0.022 ^d	360 ± 6.54 ^b
Badami inmadura	9,018 ± 57 ^b	8.10 ± 0.047 ^b	326 ± 3.05 ^c
Badami madura	5,467 ± 15 ^a	19.40 ± 0.026 ^c	565 ± 3.51 ^d

GSTU de Mango

El mango es un fruto muy estudiado por su gran contenido de compuestos antioxidantes, productos del metabolismo secundario, como las antocianinas. Sin embargo, aún no existen reportes de esta familia de enzimas ni de sus genes en mango. Recientemente en nuestro grupo de trabajo, a partir

de una genoteca de mango Haden, se ha identificado un gen que codifica para una GST clase tau (MiGSTU). Esta secuencia tiene un ORF de 690 nucleótidos, que codifican para una proteína deducida de 230 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 25.5 KDa, que corresponde al tamaño de algunas GSTs reportadas. En la secuencia de MiGSTU se identificaron por comparación con otras secuencias de GST depositadas en el GenBank (Figura 6), las regiones reportadas como sitio G y sitio H, las cuales son características en las GSTs de todas las clases y en todos los organismos. El sitio G en MiGSTU se localiza más hacia el amino terminal, el cual se encuentra entre los aminoácidos 14 y 69. El sitio H se localiza entre los aminoácidos 106 y 120, los cuales se encuentran más hacia el extremo carboxilo terminal.

Conn y colaboradores (2008) realizaron un estudio de las secuencias de cuatro GSTs de *V. vinifera*, donde reportan siete aminoácidos que se cree que tienen participación en el transporte de antocianinas. También existen estudios donde se reporta, además del sitio H y sitio G, un dominio al que denominan sitio L, al cual se le atribuye la función de ligandina (McTigue et al., 1995; Ji et al., 1996; Oakley et al., 1999; Conn et al., 2008). Sin embargo, no existe evidencia clara que afirme que los aminoácidos asociados al transporte de antocianinas pertenecen al sitio L de la GST (Conn et al., 2008). En la Figura 7 se muestra un alineamiento de la MiGSTU, con las secuencias aminoacídicas de diferentes GSTs de uva relacionadas con la función de ligandina. En este alineamiento se muestra que la MiGSTU, tiene cinco de los 7 aminoácidos asociados al sitio L, los otros dos aminoácidos tienen características químicas similares. Lo anterior, sugiere que la MiGSTU podría tener actividad de ligandina, al compartir dominios similares con GSTs que realizan esta función. Sin embargo, es necesario un estudio más profundo para conocer la interacción de esta GSTU con antocianinas, que pueda explicar su movilización en la célula.

```

                **                                     ***
MiGSTU      1 MA-KSDVKLIGAWPSPFVVRARIILNVKSVDYELLEETL---GSKSCLLLKSNPFVHKKIP
VvGSTU17    1 MA-ESEIKLIGAWPSPFVVRARIALNPKSVDYEFHQEKL---GSKSCLLLESNPFVHKKIP
PtGSTU5     1 MA-KSDVKLIGAWPSPFVVRARIALNPKSAGYEFLEETL---GSKSCLLLESNPFVHKKIP
PtGSTU22    1 MA-KSDVKLIGAWPSPFVVRARIALNPKSLGYEFLEEKL---GSKSCLLLESNPFVHKKIP
DkGST1      1 MA-KSDVKLIGAWPSPFVVRARIALNPKSVDYEFLEEKL---DNKSECLLLKSNPFVHKKIP
AtGSTU18    1 MA-TEDVKLIGAWPSPFVVRARIALHPKSISYEFLEETL---GSKSECLLLKSNPFVHKKIP
AtGSTU16    1 MGEKEEVKLVGNYSPYAIRPKIARLKSVDYDYVEENTL---FGSKSECLLLKSNPFVHKKIP
TT19        1 MV----VKLYGQVTAACPQRVLCFLEKGIETFEIILHIDLDTFEQKPEHLRLOPF-GQVP
AN9         1 MV----VKLHGSAMAACPQRVLCFLEKGIETFEIILHVDLDSLEQKPEFLVLOPF-GQVP

*           ****
MiGSTU      57 VLIHNDKPICESLIVHYIDEVW---SSGPSILPSDPYDRALARFWAAYLDEKWYPSLKG--
VvGSTU17    57 VLIHDQKPICESLIVQYVDEAW---SSGPSILPSDPYDRALARFWAAYLDDKWYFSLKG--
PtGSTU5     57 VLIHDGKPICESLIVIVEYIDEVW---SSGPTILPSDPYDRALARFWAAYLDEKGFPTMRS--
PtGSTU22    57 VLIHDGKPICESLIVIVEYIDEVW---SSGPTILPSDPYDRALARFWAAYLDEKWFPSMRS--
DkGST1      57 VLIHDDKPICESLIVQYVDEVW---TSGPSILPSDPYDRALARFWAAYLDDKWFPILRE--
AtGSTU18    57 VLIHADKPICESLIVHYIDEVW---SSGPSILPSDPYDRALARFWAAYLDDQWFLSIRS--
AtGSTU16    59 VLIHNNKPICESLIVIVEYIDEVW---SSAPSILPSDPYDRALARFWAAYLDDKWFPAIRM--
TT19        56 AIEDGDFKLFESRAIARYYATKADQGTNLLGKSLERAIVDQWADV-ETYYFNVLAQPL
AN9         56 VIEDGDFRIFESRAIRYYAAKLEVKGSKLTGTLLEKALVDQWLEVESNNYNDLYNMV

MiGSTU      114 -----IASAQGEFAKKAAMDQVGSIALIEDTVVRLSKGKPFFFGGERTGYLDIAFGSFLG
VvGSTU17    114 -----IARAQGEFAKKAAMDQVLEGLLLEEFKCSKSGKDFFFGGDRIGYLDIAFGSFLG
PtGSTU5     114 -----IATAKEEFAKALIEQAGEGVMLEDAFSCSKGKGFFFGGDQIGYLDIAFGSFLG
PtGSTU22    114 -----IATAKEEFAKALIEQAGEGVMLEDAFSCSKGKGFFFGGDQIGYLDIAFGSFLG
DkGST1      114 -----LRTTEGEFAKAEITKKNEGSILLEPAFTKCSKSGKGFFFGGERTGYLDIAFGSFLG
AtGSTU18    115 -----ILTAQGEFAKKAATAQVEERTKLEKAFNDCSQKGFFFNGDHIGYLDIAFGSFLG
AtGSTU16    117 -----AAITKSEDAKAKAMBEVEGLIQLEDAFVTSKSGKPFFFGGERTGEMDICFGSFLV
TT19        115 VINLIHKPRIGKCDVVLVEDIKVKLGVDLDMNRLSSNRFLAGEFTMADITHMPAVG
AN9         116 -LQLLVFPKMGQTSDLTLVTKCANKLQENVFDIMEORLSKSKYLAGEFFSLADLISH---LP

MiGSTU      169 WLRVTEKTSVKEFLNEAKTPELAKWAVRFCAVPAVKDVPET-EKLAEFAKLIA--KFA
VvGSTU17    169 WLRVSEKNGVKLLDAAKTPGLVGVADKFCGDDAVKDVMPET-DKLAEFAKLIFQAKANA
PtGSTU5     169 WLRATEKANGVKLIDETKTPSLKQWATSFSSHPAVKDVLPET-QKLEFAKLVIA--KFA
PtGSTU22    169 WLRTEKANGVKLIDETKTPSLKQWATSFSSHPAVKDVLPET-EKLEFAKLVIA--KFA
DkGST1      169 WLRAVEKTAGIKLVDEAVTPGLAWAERFRSHAVKGVLPET-DRLVEFAKIQA--AKLA
AtGSTU18    170 WWRVVELDANKKELDET KTPSLVKAERFCDDPAVKFIMPEI-TKLAEFARKLIF-P----
AtGSTU16    172 ILKAREKFKQKLLDESKTPSLCKWADRFLSDETVKRVAPET-EKVAEFLQELE-VQAQS
TT19        175 YLMSITDIN---QV-VKARGSFNRWVEEISDRSWSKLMV-----
AN9         172 SLRFLMNEGGFSDH-VTKRKOHEWYLDISSRDSWRKVLDMMKISETAASIP--AK-

```

Figura 6. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de GSTs. MiGSTU se alineó con otras secuencias donde se ha reportado la presencia del sitio L (función de ligandina). Se muestra una secuencia de *Vitis vinifera* identificada como VvGSTU17 (GeneBank XP_002273830), dos secuencias de *Populus trichocarpa*, PtGSTU5 y PtGSTU22 (ADB11375.1 y ADB11320.1 respectivamente); una secuencia de *Diospyros kaki*, DkGSTU1; tres secuencias de *Arabidopsis thaliana*, AtGSTU18, AtGSTU16 y TT19 (AEE28570.1, AEE33605.1 y NP_197224.1 respectivamente) y una secuencia de *Petunia*, AN9 (CAA68993.1). Se marcaron con * los aminoácidos del sitio L reportados por Conn et al. (2008), que también están presentes en MiGSTU.

HIPÓTESIS

La GSTU identificada en mango, además de su función como enzima detoxificante, interacciona con las antocianinas lo cual sugiere que está involucrada en el transporte de antocianinas, participando como ligandina.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar una GSTU de mango y determinar su interacción con antocianinas como un modelo de estudio del mecanismo de transporte de antocianinas a la vacuola.

Objetivos Específicos

- Obtener la GSTU de mango mediante sobreexpresión heteróloga y purificar por cromatografía de intercambio iónico.
- Caracterizar la GSTU de mango determinando sus constantes cinéticas.
- Demostrar la interacción de la GSTU con antocianinas.
- Obtener un modelo estructural de la GSTU y de la unión con antocianinas *in silico* (Docking).

MATERIALES Y MÉTODOS

Sobreexpresión Heteróloga de GSTU de Mango

Gen Sintético de MiGSTU

Se partió de una secuencia de cDNA obtenida de un banco de genes de mango (*Mangifera indica* L.) del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas. La secuencia deducida de aminoácidos se identificó como Glutación S-Transferasa clase Tau (MiGSTU) después de realizar un análisis por medio del algoritmo BLAST (Altschul et al., 1997) con secuencias de GSTs de otras plantas depositadas en el GenBank (NCBI). En este trabajo se utilizó un gen sintético (DNA 2.0) de la secuencia nucleotídica que codifica para MiGSTU optimizada para la lectura de codones en *E. coli*, clonado en el plásmido pJExpres404, incluyendo la secuencia del gen que codifica para MiGSTU optimizada para la lectura de codones en *E. coli*, tal como se muestra en la Figura 7.

```

1 ATGGCAAAATCTGACGTTAAATTATTGGGTGCCTGGCCGAGCCCTTACGTGATGCGCGCA
1 M A K S D V K L L G A W P S P Y V M R A
61 CGTATTACGCTGAACGTTAAGTCTGTGCGACTATGAGTTGCTGGAAGAAACCTGGGTTCC
21 R I T L N V K S V D Y E L L E E T L G S
121 AAAAGCGATCTGCTGTTGAAGTCAATCCGGTTCACAAAAGATCCCGGTTCTGATCCAT
41 K S D L L L K S N P V H K K I P V L I H
181 AATGACAAACCGATCTGCGAGAGCCTGATTTATCGTGCCTACATCGATGAGTTCTGGAGC
61 N D K P I C E S L I I V H Y I D E F W S
241 AGCGTCCATCCATTTTGGCCGAGCGACCCGTACGACCGTGCAATTGCTCGCTTCTGGGCA
81 S G P S I L P S D P Y D R A I A R F W A
301 GCGTATCTGGACGAGAAGTGGTACCCGAGCCTGAAGGTATCGCGAGCGCGCAAGGCGAA
101 A Y L D E K W Y P S L K G I A S A Q G E
361 GAAGCGAAAAAGCAGCGGTGGATCAGGTCGGTGAGAGCCTGGCTCTGATTGAGGATACC
121 E A K K A A V D Q V G E S L A L I E D T
421 TACGTTAACTGAGCAAGGCAAGCCGTTCTTTGGCGGTGAAAAGATCGGCTATCTGGAT
141 Y V K L S K G K P F F G G E K I G Y L D
481 ATTGCCTTCGGCTGTTTCTGGGTTGGCTGCGCGTCACCGAGAAAACCGCGGTGTCAAG
161 I A F G C F L G W L R V T E K T S G V K
541 TTTCTGAACGAAGCGAAAACCTCCGCACCTGGCGAAGTGGGCGTGCCTTCTGCGCGGAC
181 F L N E A K T P H L A K W A V R F C A D
601 CCAGCCGTGAAAGATGTTATGCCGAAACCGGAGAAGCTGGCTGAGTTCGCAAAACTGCTG
201 P A V K D V M P E T E K L A E F A K L L
661 GCGAAGTTTCGTGCGGGTCCGCCGAAATGATAA
221 A K F R A G P P K * *

```

Figura 7. Gen sintético de MiGSTU. Secuencia de aminoácidos optimizados para su expresión en *E. coli*.

Transformación de *E. coli* con el Gen Sintético

Para la sobreexpresión de la MiGSTU en células de *E. coli* BL21, se transformaron en las células BL21, mediante choque térmico con 20 ng del gen sintético en 50 µL de bacterias competentes, las cuales permanecieron en hielo por 10 min, y se incubaron por 1 min a 42 °C para realizar el choque térmico. Posteriormente se adicionaron 250 µL del medio SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) para su recuperación, incubando 1 hora a 37 °C con agitación constante. Las células transformadas con el constructo pJExpress404-MiGSTU se sembraron en placas con agar Luria-Bertani (LB), adicionadas con ampicilina (100 µg mL⁻¹), como método de selección para identificar las transformadas positivas, y se incubaron a 37°C por 24h.

Detección de Clones Recombinantes

Las colonias transformadas e identificadas como posibles positivas por su crecimiento selectivo en LB con ampicilina, se analizaron por medio de una reacción de amplificación por PCR con iniciadores específicos (GST-Fw 5'GGAATTCCATATGGCGAAAAGTGACGTG3'; y GST-Rv 5'CGGGATCCTTA TTTTGGAGGGCCAGCTC3') para verificar la presencia del inserto dentro del vector. Los productos de amplificación de las colonias positivas se observaron por electroforesis en agarosa al 1% con tinción de Gel Red (Biotium).

Sobreexpresión de la MiGSTU Recombinante

Una colonia de *E. coli* positiva se cultivó en matraces Fernbach a 37 °C con agitación constante (250 rpm) en 1 L de medio LB con ampicilina (100 µg mL⁻¹), hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.6 de absorbancia, a una longitud de onda de 600 nm (Chronopoulou et al., 2012). La inducción de la sobreexpresión se realizó con Isopropil-β-D-tiogalacto-piranosido (IPTG) (Invitrogen) 1 mM a 37 °C, por 6 horas. Para corroborar la sobreexpresión, se tomaron muestras del cultivo a diferentes tiempos a partir de la inducción y se obtuvieron los precipitados bacterianos. Se analizaron muestras recolectadas a las 0, 3 y 6 horas después de la inducción, para observar la sobreexpresión de la proteína de interés. Estos precipitados se resuspendieron en un buffer de lisis (PMSF 0.5 mM, benzamidina 0.005 mM, EDTA pH 8, 1 mM, Tris pH 7.5, 50 mM) y se realizó una lisis celular por sonicación (15 pulsos por tres ciclos) utilizando un sonicador Branson Sonifer 450 (EEUU). Los lisados obtenidos se centrifugaron a 15000 x g por 10 min, recolectando los sobrenadantes y los precipitados (debris celular y proteína insoluble) que posteriormente se analizaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) (Laemli, 1976), con tinción de azul de Coomassie. Se analizaron muestras recolectadas a las 0, 3 y 6 horas después de la inducción, para

observar la sobreexpresión de la proteína de interés, a las cuales también se les determinó concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) y actividad de GST (Habig et al., 1974). Paralelamente se realizó un ensayo con un cultivo sin inducir de las mismas células transformadas.

Purificación de la GSTU Recombinante

Preparación de Clarificado

Se resuspendió 1g de precipitado bacteriano por cada 4 mL de buffer de lisis Tris-HCl pH 8.0 con 100 mg/mL de lisozima y 10mM de PMSF. Después se realizó una lisis celular con el sonicador Branson Sonifer 450 (EEUU), con 10 pulsos por 3 ciclos. Se obtuvo el sobrenadante por centrifugación a 4 °C (Sorvall RC-2B, rotor SS-34) a una velocidad de 32,000 x g por 30 min. Después de la centrifugación se agregó 1% de estreptomina para precipitar los ácidos nucleicos y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones descritas previamente, recolectando el sobrenadante (clarificado).

Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

El clarificado obtenido se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturando al 50% y se centrifugó a 20,000 x g por 40 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante. Este sobrenadante se dializó utilizando una membrana de 10 KDa con el buffer de unión para la cromatografía (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0), realizando tres recambios. Se observó la presencia de la proteína de interés por SDS-PAGE y se determinó la concentración de proteína la y actividad de GST, como se describió anteriormente.

Cromatografía de Intercambio Aniónico

La purificación de la MiGSTU se realizó mediante una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna Q Sefarosa (HiTrap Q HP, GE Healthcare) con un volumen de columna de 5 mL. El buffer de unión utilizado fue Tris-HCl 20mM pH 8.0, y como buffer de elusión se utilizó Tris-HCl 20 mM pH 8.0 adicionado con NaCl 1 M. El protocolo de la cromatografía se realizó a 25°C, inyectando 10 mL de clarificado dializado con un flujo aproximado de 2 mL/min, recolectando fracciones de 2 mL. La matriz se equilibró con 10 volúmenes de columna (50 mL) del buffer de unión y se inyectaron 10 mL de la muestra, seguido de un lavado con el buffer de unión de 10 volúmenes de columna. Se analizaron por SDS-PAGE y se determinó la actividad específica, para identificar las fracciones con GST pura que se utilizarán para los ensayos de caracterización, las cuales se observaron por tinción con plata.

Determinación de Actividad Enzimática de MiGSTU

Se utilizó el método de Habig et al. (1974) basado en la conjugación del glutatión reducido (GSH) con el sustrato sintético 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB), formando el compuesto 2,4-dinitrofenil-S-conjugado que absorbe a 340 nm, y cuyo coeficiente de extinción molar es $9.6 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$. Se determinó espectrofotométricamente el cambio de absorbancia durante 2 minutos utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz. La mezcla de reacción de 1 ml de volumen final, estaba formada por CDBN 1 mM, GSH 1 mM y la muestra que contiene GST, en un buffer de NaH_2PO_4 0.1 M, pH 6.5. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando como proteína estándar, albúmina de suero bovino (1 mg mL^{-1}). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol de producto por min a 25 °C.

Caracterización de GSTU de Mango

Caracterización Cinética de MiGSTU

Los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de MiGSTU para los sustratos GSH y CDNB se midiendo la actividad enzimática de la MiGSTU pura como se describió anteriormente, utilizando un rango de concentración de 0.02-2.5 mM para ambos sustratos GSH y CDNB, variando la concentración de un sustrato y manteniendo la concentración constante del otro (Contreras-Vergara et al., 2007). Los datos experimentales se analizaron utilizando el modelo de Michaelis-Menten, usando un análisis de regresión no-lineal con el programa GraphPad Prism v5 (Erithacus Software).

Ensayo de Inhibición de GSTU con Antocianinas

Se utilizó el ensayo enzimático específico de GST con los sustratos GSH y CDNB. El volumen de reacción total fue de 25 μ L, el cual contiene buffer de NaH_2PO_4 0.1 M, pH 6.5, 0.5 mM de GSH, 0.5 mM de CDNB, 1 mg de MiGSTU pura y antocianina. Se utilizó 25 μ L de reacción total para alcanzar una concentración de antocianinas de 50 μ M debido a que el stock comercial es de 100 μ M. Se analizó una concentración de 50 μ M de las antocianinas Cianidina-3-glucosido, Peonidina-3-glucosido, Delfinidina-3-glucosido y Malvidina-3-glucosido en el ensayo enzimático con su respectivo control sin antocianinas. También se analizó un control sin antocianina de cada una. A cada reacción se le midió la actividad específica tal como se describe previamente. El porcentaje de inhibición se realizó considerando la actividad específica del control sin antocianinas como 100%, restándole la actividad específica del ensayo con antocianinas.

Análisis Estructural de GSTU

Modelación de la Estructura de MiGSTU

Se elaboró un modelo por homología de la estructura de MiGSTU utilizando la estructura de una GSTU de trigo reportada en el PDB (pdb 1gwc), por medio del programa MOE (Zhou et al., 2003).

Anclaje Molecular *in silico* (Docking) de MiGSTU con Antocianinas

Para el ensayo de anclaje molecular *in silico* (docking) se utilizó el modelo teórico de la estructura de MiGSTU obtenido en la modelación estructural con el software MOE. De acuerdo a la secuencia deducida de aminoácidos, se identificó el sitio catalítico de la enzima, donde también se encuentran los residuos identificados como sitio de unión a ligandos, donde se simuló la interacción con la estructura de las antocianinas cianidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido, utilizando el software MOE versión 2012.10. Previo al docking, se preparó el receptor y los ligandos, se asignaron cargas y se eligió el sitio G o L. Se inició con el análisis de 800 000 poses para cada conformero. Las 30 mejores poses se seleccionaron para un refinamiento mediante el método de campo de fuerza y la función dG de afinidad para el puntaje (500 iteraciones para cada una). De esta segunda fase se seleccionaron las mejores 30 poses para análisis posteriores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sobreexpresión Heteróloga de MiGSTU

La sobreexpresión resultó exitosa, tal como se muestra en la Figura 8, encontrándose la banda correspondiente a la proteína de interés (25 KDa) en la fracción soluble del lisado bacteriano. Se observó un aumento en la sobreexpresión conforme aumentó el tiempo, desde el inicio de la inducción (T0) con IPTG hasta las 24 h (T24). Se estableció el T6 (6 horas después de la inducción) como el óptimo para recolectar el pellet celular y purificar la proteína de interés. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Contreras-Vergara *et al.*, (2007) con una GST de camarón y por Chronopoulou *et al.*, (2012) con una GST de frijol; en ambos estudios se utilizó el mismo sistema de sobreexpresión heteróloga.

También se realizó un ensayo con una cepa BL21 transformada, sin inducir la sobreexpresión, y se comparó el perfil de proteínas con el del ensayo de la cepa BL21 transformada e inducida con IPTG. En la cepa de bacterias BL21 sin inducir no se observó un aumento en la sobreexpresión de la banda correspondiente a MiGSTU que es de 25 KDa. Por lo anterior se comprueba que la proteína que se observa a 25 kDa no es producto del metabolismo habitual de la bacteria sino de la inducción de la sobreexpresión.

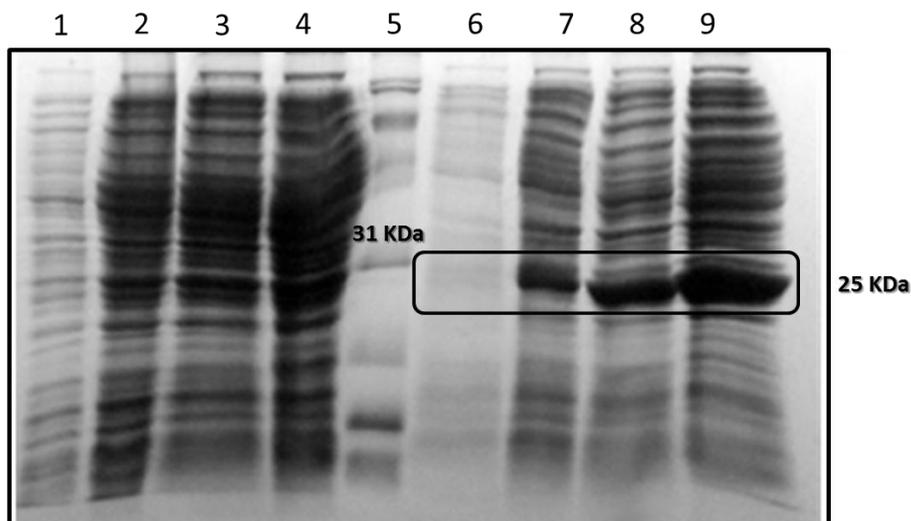


Figura 8. Sobreexpresión de GST. SDS-PAGE con geles al 15% de acrilamida, del ensayo de sobreexpresión de MiGSTU, teñida con azul de Coomassie. Se muestra el perfil de proteínas de la cepa BL21 transformada con el gen sintético PJExpress 404-MiGSTU. Carriles 1 al 4, cultivo sin inducir con muestras de los tiempos 0, 3, 6 y 24 h, respectivamente; carriles 6 al 9, cultivo inducido con IPTG, tiempos 0, 3, 6 y 24 h, respectivamente. En el carril 5 se muestra el marcador de PM resaltando la banda correspondiente a 31 KDa.

Purificación de la MiGSTU Recombinante

Para obtener la MiGSTU pura, después del clarificado se realizó una precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con una saturación al 50%, encontrándose la proteína de interés en el sobrenadante. Este resultado concuerda con lo reportado por Kunieda *et al.*, el 2005 en una GSTU de hojas de cebada y Rohman *et al.*, el 2009 en una GST de cebolla; quienes utilizaron la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como parte de su protocolo de purificación.

Los resultados de la cromatografía de intercambio aniónico se muestran en la Figura 9, donde se observa la banda correspondiente al tamaño esperado para MiGSTU de 25 kDa en el clarificado, el sobrenadante de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y las fracciones puras. Se distingue una clara disminución del número de bandas de proteína en el precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, comparado con el clarificado. Las fracciones de la cromatografía que se observaron puras se

utilizaron para realizar los análisis posteriores. Además de identificar a la proteína de interés por SDS-PAGE, también se monitoreó a la GST sobreexpresada siguiendo su actividad específica, desde el clarificado hasta obtener las fracciones puras. Los valores de actividad mostraron un aumento conforme aumenta el grado de purificación de la proteína, lo cual confirma que además de estar pura también es activa (Tabla 3). La purificación de GST por medio de intercambio aniónico ha sido reportada a partir de cebolla (Rohman et al., 2009), hojas de cebada (Kunieda et al., 2005) y trigo (Thom et al., 2002).

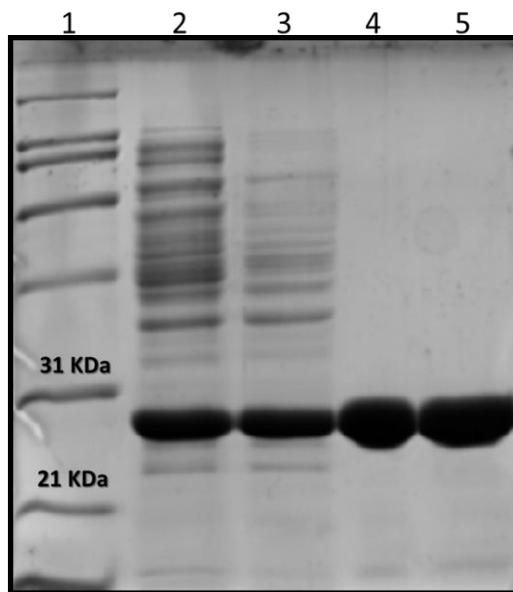


Figura 9. Purificación de MiGSTU. SDS-PAGE en gel al 15% teñido con azul de Coomassie. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, clarificado de proteínas; carril 3, sobrenadante obtenido de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado al 50% y carriles 3 y 4, fracciones de la cromatografía donde se encuentra MiGSTU.

Tabla 3. Actividad específica de MiGSTU en diferentes pasos del proceso de purificación.

Paso de purificación	Actividad Específica mmol/min/mg proteína
Clarificado	5.12
Precip. c/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	14.72
GST Pura-1	43.76

Para verificar el grado de pureza de la proteína se analizaron las fracciones de la cromatografía por tinción con plata. Se observaron varias fracciones puras, mostrando una sola banda, que se utilizaron posteriormente para su caracterización (Figura 10).

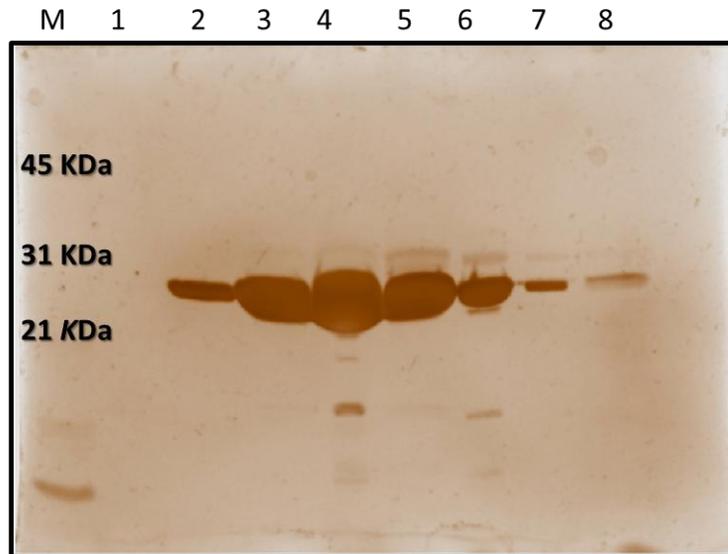


Figura 10. Fracciones puras de MiGSTU obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 al 9 fracciones de MiGSTU puras.

Cinética Enzimática de MiGSTU

Las gráficas de velocidad inicial (v) vs [GSH] o [CDNB] en el rango de 0.2 mM a 2.5 mM de cada sustrato, siguieron el comportamiento de una cinética de Michaelis-Menten (Figura 11). Las gráficas de doble recíprocos fueron lineales y resultaron con un punto de intersección en común, lo cual nos sugiere un tipo de mecanismo secuencial, que podría ser ordenado de acuerdo a lo reportado para otras GSTs (Contreras-Vergara et al., 2007). Los regráficos de los interceptos para cada sustrato también resultaron lineales (Figura 12), obteniendo de aquí las constantes cinéticas mostradas en la Tabla 4.

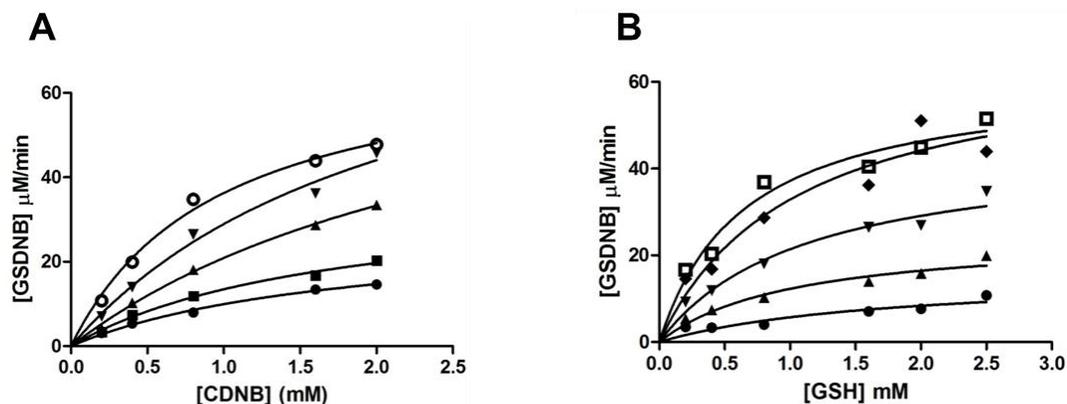


Figura 11. Gráfico de Michaelis-Menten para MiGSTU. Panel A: Ajuste de la cinética enzimática de MiGSTU para el producto formado utilizando CDNB como sustrato variando las concentraciones de GSH (● 0.2 mM, ■ 0.4 mM, ▲ 0.8 mM, ▼ 1.6 mM y ○ 2.5 mM). Panel B: Ajuste de la cinética enzimática de MiGSTU para el producto formado utilizando GSH como sustrato variando las concentraciones de CDNB (● 0.2 mM, ▲ 0.4 mM, ▼ 0.8 mM, ◆ 1.6 mM y □ 2.5mM).

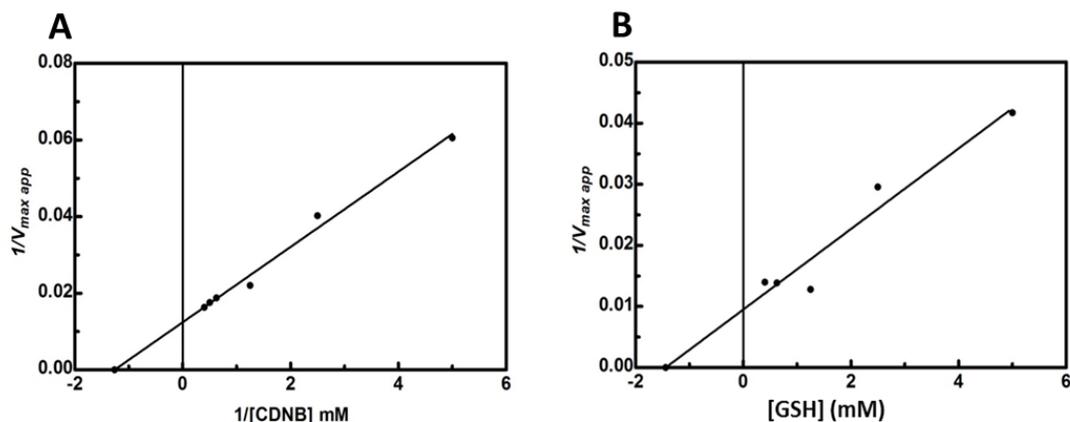


Figura 12. Re gráfico a partir de la linearización de Lineweaver-Burke mostrando el efecto de la variación de los sustratos para MiGSTU. Panel A: Re gráfico linearizado de MiGSTU utilizando como sustrato variable CDNB. Panel B: Re gráfico linearizado de MiGSTU utilizando como sustrato variable GSH.

En la determinación de las constantes cinéticas se puede observar que la K_m de GSH es menor que la K_m de CDNB, esta mayor afinidad hacia el GSH es debida a que el GSH es el sustrato natural de GST, mientras que CDNB es el sustrato modelo de xenobiótico utilizado en el ensayo de actividad. La velocidad

máxima teórica obtenida fue de $80.58 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ para CDNB y de $105.32 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ para GSH. La k_{cat} nos indica el número de ciclos catalíticos que la enzima puede realizar cada segundo, obteniendo para GSH un valor de 89.52 s^{-1} contra un 68.49 s^{-1} , por lo que la enzima procesa más rápido al sustrato GSH, lo cual concuerda con lo reportado en otras cinéticas. La razón k_{cat}/K_m conocida como la constante de especificidad de una enzima, define la eficiencia catalítica y el grado de evolución de una enzima. Esta permite comparar la eficiencia de una enzima con diferentes sustratos, en este caso obteniendo una mayor eficiencia catalítica para el sustrato GSH con $129 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ contra $86.52 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para CDNB.

Tabla 4. Constantes cinéticas para cada sustrato de MiGSTU

	CDNB	GSH
K_m (mM)	0.7918	0.693
V_{max} ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)	80.58	105.32
K_{cat} (s^{-1})	68.49	89.52
K_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	86.51	129

Los resultados obtenidos concuerdan en algunos parámetros con otros reportados en plantas como el trabajo de Lo Piero et al. (2005), donde determinan las constantes cinéticas de dos GSTs tipo Tau de naranja donde obtuvieron una K_m de 0.76 mM y 1.0 mM para CDNB en cada una de las GSTUs de naranja, y para GSH 0.5 mM para ambas enzimas, dichos valores son muy parecidos a los reportados en este estudio. Sin embargo los valores para el resto de los parámetros obtenidos por Lo Piero et al. (2005), contrastan con los determinados en este trabajo, resultando más pequeños los valores de MiGSTU. Chronopoulou et al. (2012) reportaron la caracterización cinética de dos GSTUs y una GSTF de frijol, mostrando valores de K_m más pequeños (K_m para PvGSTUF1 de $44.4 \mu\text{M}$ y $5,873.7 \mu\text{M}$ para GSH y CDNB respectivamente; y para PvGSTU2 de $49.6 \mu\text{M}$ y $864.6 \mu\text{M}$ GSH y CDNB respectivamente)

comparados con los valores de K_m de MiGSTU para los mismos sustratos, lo cual sugiere una mayor afinidad que MiGSTU; los valores de los demás parámetros cinéticos fueron más altos lo cual puede significar que son más eficientes y tienen mayor especificidad.

Ensayo de Inhibición de GST con Antocianinas

Se midió la actividad específica de GST con las modificaciones descritas para observar el efecto de las antocianinas en la actividad de GST. En la Figura 13 podemos observar la inhibición de las antocianinas utilizando en la reacción 50 μM de cada una de ellas. Se encontró una inhibición de la actividad específica del GST del 24.39% utilizando 50 μM de cianidina-3-glucósido (C3G), dicha concentración mostró la inhibición más alta dentro de las antocianinas ensayadas en este estudio. Este comportamiento es similar al obtenido también en la antocianina peonidinina-3-glucósido. En las antocianinas delphinidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido utilizando las mismas concentraciones se obtuvo una inhibición ligeramente menor.

Lo anterior muestra una posible interacción de las antocianinas en algunos de los sitios activos de la enzima ya sea el Sitio G o H, o el llamado Sitio L que comparte aminoácidos con el Sitio G. Además de los sitios activos de la enzima las antocianinas se podrían unir a otro sitio el cual puede generar un cambio conformacional en la estructura de la proteína impidiendo la unión de alguno de los sustratos, disminuyendo la actividad de la misma. Esta inhibición de la actividad de GST sugiere una posible participación de la enzima en el transporte de antocianinas.

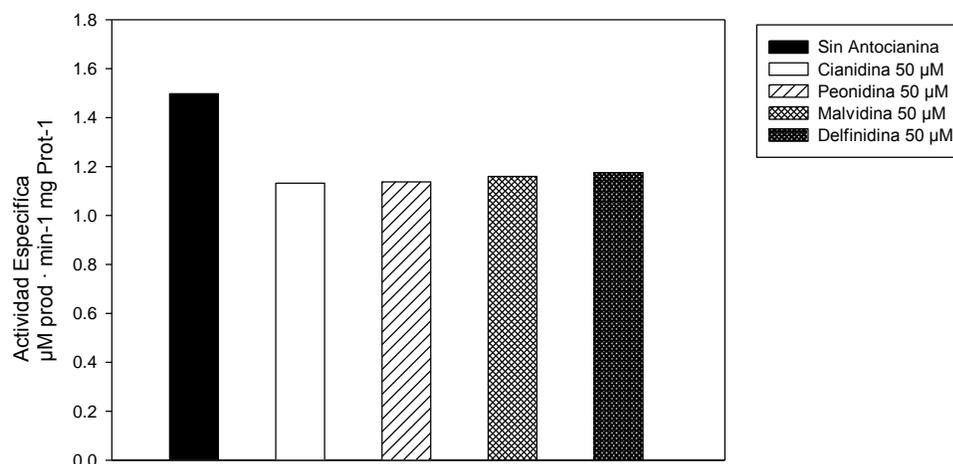


Figura 13. Gráfico de Inhibición de actividad de GST con antocianinas. La actividad específica esta expresada en $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. La inhibición de las antocianinas fue de 24.39 % para Cianidina-3-Glucósido (C3G), 24.05% para Peonidina-3-glucósido (P3G), 22.57% para Delfinidina-3-Glucósido (D3G) y 21.53% para Malvidina-3-Glucósido (M3G).

Análisis Estructural de GSTU

Se obtuvo la estructura de MiGSTU deducida con el software MOE, utilizando como molde una GST clase Tau de trigo (pdb: 1gcw). Hasta la fecha solo se han reportados dos estructuras cristalinas pertenecientes a GSTU, en trigo (pdb: 1gwc) y en arroz (pdb: 1OYJ), las cuales tienen una identidad de 53 y 46 % respectivamente con MiGSTU. En la Figura 11 se muestra el modelo de la estructura que corresponde al monómero de MiGSTU, que consta de nueve hélices- α y cuatro hojas- β . La representación de superficie muestra claramente dos cavidades, las cuales son indicadas en la Figura 12, donde se marca en un área de color gris (sitio G) los aminoácidos relacionados con la unión a GSH (S14, Y16, K41, K54, I55, E67, S68), y en amarillo el sitio H o de unión a compuestos hidrofóbicos (D104, Y108, P109, K112, G113, A115, S116, F166, W169, L213, F216, L220). Ambos sitios ya han sido ampliamente reportados en la literatura y se sabe claramente el mecanismo que cataliza la reacción. Los aminoácidos del sitios G y H han sido reportados en diversas plantas por ejemplo en frijol (Chronopoulou *et al.*, 2012) y naranja (Lo Piero *et al.*, 2009),

por mencionar algunos. La función catalítica del sitio G está asociado a la interacción de la serina (S14) con el grupo sulfhidrilo de la cisteína del glutatión, esta interacción ha sido reportada en otras GSTs clase Tau de plantas.

En algunas GSTs de plantas se ha reportado el sitio L (o unión a Ligando) como en petunia (Mueller *et al.*, 2000), Arabidopsis (Smith *et al.*, 2003), naranja (Lo Piero *et al.*, 2006) y en vid (Conn *et al.*, 2008), donde se ha reportado su posible interacción con diferentes ligandos, particularmente su interacción con antocianinas. En la Figura 12 también se muestra el sitio L (S14, 55I, 56P, 57V, E67, S68), identificado por comparación con las secuencias mencionadas anteriormente, el cual comparte algunos aminoácidos con el sitio G.

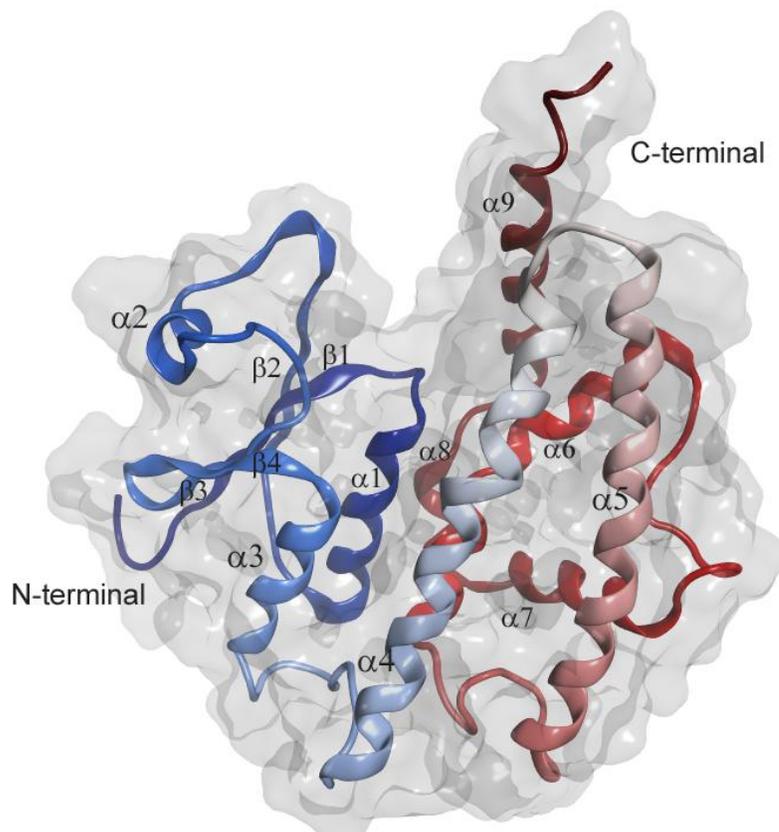


Figura 14. Estructura de MiGSTU realizada por homología a una GST de trigo (pdb: 1gwc) en representación de listón. El extremo amino terminal se muestra en azul y el extremo carboxilo terminal en rojo. También se observa en marca de agua la superficie de la proteína.

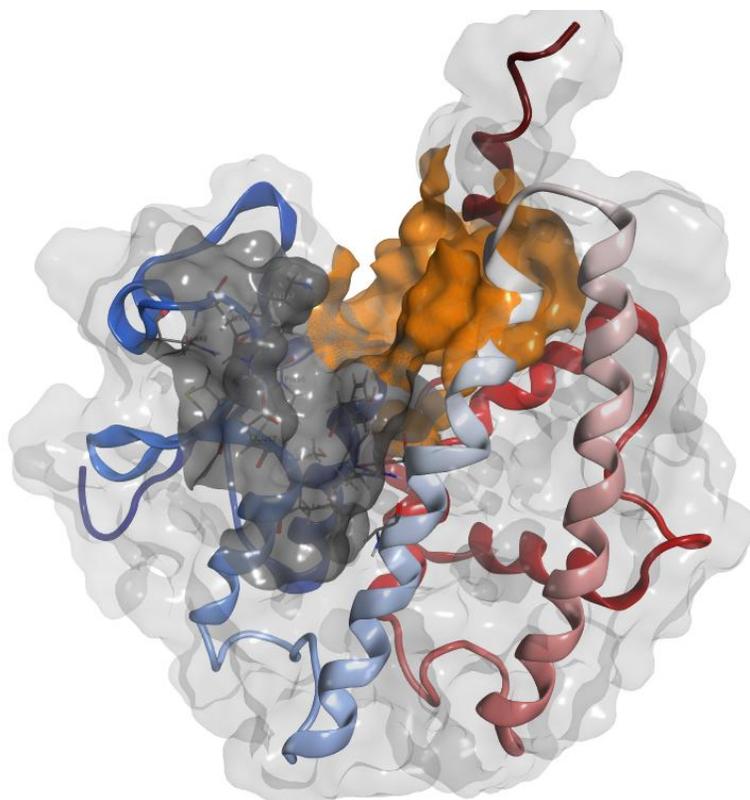


Figura 15. Sitios G, H y L de MiGSTU. Se indica el sitio G en color gris, el sitio H de color naranja y el sitio L se muestra por los residuos representados en palitos y bolitas. Algunos de los aminoácidos del sitio L coinciden con los aminoácidos del sitio G.

Unión de Antocianinas a MiGSTU

Los resultados del ensayo de anclaje molecular *in silico* se presentan en la Figura 13. El software muestra los probables sitios de interacción de las antocianinas con la proteína. Las cavidades en las que se encuentra el sitio activo de la enzima, resultaron las más probables para que se realice esta interacción. El anclaje de la antocianina en estas cavidades muestra una posible interacción con los aminoácidos descritos como parte del sitio L. El acomodo de la antocianina en estas cavidades, depende tanto de la conformación de la molécula como de las cargas o compatibilidad química entre los diferentes grupos sustituyentes. En la figura 13 se presenta la cavidad del sitio catalítico de la GST, en representación de superficie electrostática, con el

docking de antocianinas. Las cuatro poses mostradas, de los dos tipos de antocianinas diferentes se encuentran en la cavidad del sitio L (que comparte aminoácidos del sitio G) lo cual sugiere la existencia del sitio L en la MiGSTU y concuerda con lo reportado por Conn et al. (2008). El acomodo de las antocianinas C3G y P3G en el sitio L ocurre posiblemente por una interacción hidrofóbica con los aminoácidos I55 y V57 pertenecientes al sitio L y la antocianidina, quedando el glucósido fuera de la cavidad que es de carácter hidrofóbico.

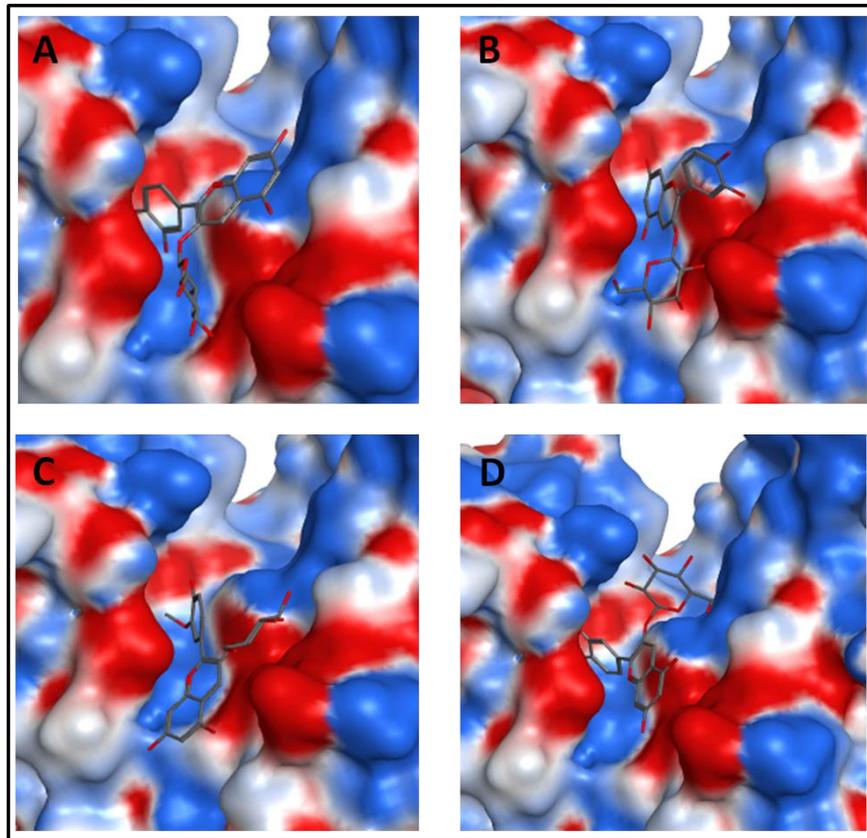


Figura 16. Docking de MiGSTU con Antocianinas. En los paneles A y B se muestran dos poses diferentes de la probable unión de MiGSTU con cianidina-3-glucósido; y en los paneles C y D se muestran otras dos posibles poses ahora con peonidina-3-glucósido.

CONCLUSIONES

Se obtuvo la GSTU de mango por sobreexpresión heteróloga, a las 6 horas después de su inducción utilizando 1 mM de IPTG, mostrando una banda de 25 kDa correspondiente al tamaño de MiGSTU. Dicha proteína sobreexpresada se logró purificar utilizando una precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con una saturación al 50% seguido de una cromatografía de intercambio aniónico.

El mecanismo que sigue esta enzima es de tipo Michealis-Menten. Las constantes cinéticas determinadas, muestran un comportamiento de tipo secuencial que quizá podría ser ordenado, ya que nos indican que GSH tiene mayor afinidad y es más eficiente que CDNB. Con la caracterización cinética de MiGSTU se puede afirmar que esta enzima cumple con su función detoxificante.

Se observó una inhibición con las antocianinas C3G, P3G, D3G y M3G, siendo C3G y P3G las antocianinas que presentaron mayor inhibición. Esta inhibición es debida a una interacción de las antocianinas con MiGSTU ya sea por la unión en alguno de los sitios activos u otro sitio que afecte la conformación de la proteína afectando la actividad específica de la enzima.

El modelo estructural de MiGSTU se obtuvo utilizando como molde la secuencia GSTU de trigo, identificándose los sitios G (de unión a GSH) y sitio H (de unión a compuestos hidrofóbicos), así como los aminoácidos relacionados al sitio L, lo cual concuerda con lo observado en las GSTs ya reportadas. Los ensayos *in silico* utilizando el modelo estructural de MiGSTU con las antocianinas del mango, proporcionan evidencia de la posible interacción de estas antocianinas con el Sitio L de la enzima. Estos resultados sugieren una posible unión de MiGSTU con las antocianinas cianidina-3-

glucósido y peonidina-3-glucósido que son las más abundantes en la cascara del mango Haden. Lo anterior nos sugiere la participación de este enzima en el transporte de antocianinas dentro de la célula vegetal, además de su función como enzima detoxificante. Para comprobar esta función de transporte, son necesarios mayores estudios, que podrían incluir el marcaje de la enzima y los compuestos participantes y su localización celular por técnicas de microscopía.

REFERENCIAS

Ajila, C., Bhat, S. y Prasada Rao, U. (2007). Valuable components of raw and ripe peels from two Indian mango varieties. *Food Chemistry*, 102(4): 1006-1011.

Alfenito, M. R., Souer, E., Goodman, C. D., Buell, R., Mol, J., Koes, R. y Walbot, V. (1998). Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *The Plant Cell Online*, 10(7): 1135-1149.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17): 3389-3402.

Andrews, C. J., Skipsey, M., Townson, J. K., Morris, C., Jepson, I. y Edwards, R. (1997). Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soybean. *Pesticide Science*, 51(2): 213-222.

Armstrong, R. N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10(1): 2-18.

Berardini, N., Fezer, R., Conrad, J., Beifuss, U., Carle, R. y Schieber, A. (2005). Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5): 1563-1570.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1): 248-254.

Buchanan, B., Gruissem, W. y Jones, R. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*.

Conn, S., Curtin, C., Bézier, A., Franco, C. y Zhang, W. (2008). Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. *Journal of Experimental Botany*, 59(13): 3621-3634.

Conn, S., Zhang, W. y Franco, C. (2003). Anthocyanic vacuolar inclusions (AVIs) selectively bind acylated anthocyanins in *Vitis vinifera* L.(grapevine) suspension culture. *Biotechnology Letters*, 25(11): 835-839.

Contreras-Vergara, C. A. (2007). Caracterización de las formas nativa y mutantes de la Glutathión-S-Transferasa clase mu de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Hermosillo, Sonora, México, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Tesis de Doctorado en Ciencias.

Contreras-Vergara, C. A., Valenzuela-Soto, E., García-Orozco, K. D., Sotelo-Mundo, R. R. y Yepiz-Plascencia, G. (2007). A Mu-class glutathione S-transferase from gills of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*: Purification and characterization. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 21(2): 62-67.

Chelvanayagam, G., Parker, M. y Board, P. (2001). Fly fishing for GSTs: a unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases. *Chemico-Biological Interactions*, 133(1-3): 256-260.

Chronopoulou, E., Madesis, P., Asimakopoulou, B., Platis, D., Tsaftaris, A. y Labrou, N. E. (2012). Catalytic and structural diversity of the fluazifop-inducible glutathione transferases from *Phaseolus vulgaris*. *Planta*, 235(6): 1253-1269.

Dean, Gronwald, J. W. y Eberlein, C. V. (1990). Induction of glutathione S-transferase isozymes in sorghum by herbicide antidotes. *Plant physiology*, 92(2): 467-473.

Dean, J., Goodwin, P. y Hsiang, T. (2005). Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. *Journal of Experimental Botany*, 56(416): 1525-1533.

Dixon, D., Cole, D. J. y Edwards, R. (1997). Characterization of multiple glutathione transferases containing the GST I subunit with activities toward herbicide substrates in maize (*Zea mays*). *Pesticide Science*, 50(1): 72-82.

Dixon, D., Laphorn, A. y Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biol*, 3(3): 3004.3001-3004.3010.

Dixon, D. P., Cole, D. J. y Edwards, R. (1998). Purification, regulation and cloning of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type-III GSTs. *Plant molecular biology*, 36(1): 75-87.

Dixon, D. P. y Edwards, R. (2010). Glutathione transferases. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8.

Dixon, D. P., Laphorn, A. y Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biol*, 3(3): 3004.3001-3004.3010.

Droog, F. N., Hooykaas, P. J. y van der Zaal, B. J. (1995). 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type-III tobacco glutathione S-transferases. *Plant Physiology*, 107(4): 1139-1146.

Edwards, R. y Cole, D. J. (1996). Glutathione Transferases in Wheat ("Triticum") Species with Activity toward Fenoxaprop-Ethyl and Other Herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 54(2): 96-104.

Edwards, R., Dixon, D. P. y Walbot, V. (2000). Plant glutathione-S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science*, 5(5): 193-198.

FAO, F. a. A. O. (2004). Socio-economic Analysis and Policy Implications of the Roles of Agriculture in Developing Countries. Summary Report, Roles of Agriculture Project. FAO. Rome, Italy.

Gómez-Tagle, M. G. (2005). Competitividad de los productores de mango en la Costa Grande en el Municipio de Técpan de Galeana, Estado de Guerrero. Escuela Superior de Comercio y Administración. Ciudad de México, 2005, Instituto Politecnico Nacional. Maestría en Ciencias.

Gomez, C., Conejero, G., Torregrosa, L., Cheynier, V., Terrier, N. y Ageorges, A. (2011). In vivo grapevine anthocyanin transport involves vesicle-mediated trafficking and the contribution of anthoMATE transporters and GST. *The Plant Journal*, 67(6): 960-970.

Gomez, C., Terrier, N., Torregrosa, L., Vialet, S., Fournier-Level, A., Verriès, C., Souquet, J.-M., Mazauric, J.-P., Klein, M. y Cheynier, V. (2009). Grapevine MATE-type proteins act as vacuolar H⁺-dependent acylated anthocyanin transporters. *Plant Physiology*, 150(1): 402-415.

Goodman, C. D., Casati, P. y Walbot, V. (2004). A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *The Plant Cell Online*, 16(7): 1812-1826.

Grotewold, E. y Davies, K. (2008). Trafficking and sequestration of anthocyanins. *Nat Prod Commun*, 3: 1251-1258.

Habig, W. H., Pabst, M. J. y Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, 249(22): 7130-7139.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U. y Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 51-88.

Hou, L., Honaker, M. T., Shireman, L. M., Balogh, L. M., Roberts, A. G., Ng, K.-c., Nath, A. y Atkins, W. M. (2007). Functional promiscuity correlates with conformational heterogeneity in A-class glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(32): 23264-23274.

Hunaiti, A. A. y Ali, B. R. (1990). Glutathione-S-transferase from oxadiazon treated chickpea. *Phytochemistry*, 29(8): 2431-2435.

Ji, X., Von Rosenvinge, E. C., Johnson, W. W., Armstrong, R. N. y Gilliland, G. L. (1996). Location of a potential transport binding site in a sigma class glutathione transferase by x-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16): 8208-8213.

Kampranis, S. C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsihchlis, P. N. y Makris, A. M. (2000). A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *Science Signaling*, 275(38): 29207.

Ketterer, B. (2001). A bird's eye view of the glutathione transferase field. *Chemico-Biological Interactions*, 138(1): 27.

Kitamura, S., Akita, Y., Ishizaka, H., Narumi, I. y Tanaka, A. (2012). Molecular characterization of an anthocyanin-related glutathione S-transferase gene in cyclamen. *Journal of Plant Physiology*, 169(6): 636-642.

Koes, R., Verweij, W. y Quattrocchio, F. (2005). Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science*, 10(5): 236-242.

Kunieda, T., Fujiwara, T., Amano, T. y Shioi, Y. (2005). Molecular cloning and characterization of a senescence-induced tau-class glutathione S-transferase from barley leaves. *Plant and Cell Physiology*, 46(9): 1540-1548.

Laemli, U. K. (1976). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680.

Lakshminarayana, S. (1980). Mango. *Tropical and Subtropical Fruits*: 184-257.

Lamoureux, G. L., Gouot, J. M., Davis, D. G. y Rusness, D. G. (1981). Pentachloronitrobenzene metabolism in peanut. 3. Metabolism in peanut cell suspension cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(5): 996-1002.

Lamoureux, G. L. y Rusness, D. G. (1993). Glutathione in the metabolism and detoxification of xenobiotics in plants. *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants*. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing: 221-237.

Lan, T., Yang, Z.-L., Yang, X., Liu, Y.-J., Wang, X.-R. y Zeng, Q.-Y. (2009). Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. *The Plant Cell Online*, 21(12): 3749-3766.

Larsen, E., Alfenito, M., Briggs, W. y Walbot, V. (2003). A carnation anthocyanin mutant is complemented by the glutathione S-transferases encoded by maize Bz2 and petunia An9. *Plant Cell Reports*, 21(9): 900-904.

Lederer, B. y Böger, P. (2005). A ligand function of glutathione S-transferase. *Zeitschrift für Naturforschung* 60c: 166-171.

Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.-M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. y Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57: 405-430.

Li, X., Gao, P., Cui, D., Wu, L., Parkin, I., Saberianfar, R., Menassa, R., Pan, H., Wertcott, N. y Gruber, M. Y. (2011). The *Arabidopsis* tt19-4 mutant differentially accumulates proanthocyanidin and anthocyanin through a 3' amino acid substitution in glutathione S-transferase. *Plant, cell & environment*, 34(3): 374-388.

Lizada, C. (1993). Mango. *Biochemistry of Fruit Ripening*, Springer: 255-271.

Marinova, K., Pourcel, L., Weder, B., Schwarz, M., Barron, D., Routaboul, J.-M., Debeaujon, I. y Klein, M. (2007). The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺-antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat. *The Plant Cell Online*, 19(6): 2023-2038.

Marrs, K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1): 127-158.

Marrs, K. A., Alfenito, M. R., Lloyd, A. M. y Walbot, V. (1995). A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2.

Masibo, M. y He, Q. (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(4): 309-319.

McGonigle, B., Keeler, S. J., Lau, S.-M. C., Koeppe, M. K. y O'Keefe, D. P. (2000). A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiology*, 124(3): 1105-1120.

McTigue, M. A., Williams, D. R. y Tainer, J. A. (1995). Crystal Structures of a Schistosomal Drug and Vaccine Target: Glutathione S-Transferase from *Schistosoma japonica* and its Complex with the Leading Antischistosomal Drug Praziquantel. *Journal of molecular biology*, 246(1): 21-27.

Mohsenzadeh, S., Esmaeili, M., Moosavi, F., Shahrtash, M., Saffari, B. y Mohabatkar, H. (2011). Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution. *Afr. J. Biotech*, 10: 8160-8165.

Mueller, L. A., Goodman, C. D., Silady, R. A. y Walbot, V. (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology*, 123(4): 1561-1570.

Neidhart, S., Vásquez-Caicedo, A. L., Mahayothee, B., Pott, I., Mühlbauer, W., Sruamsiri, P. y Carle, R. (2007). The control of postharvest ripening processes and its implications for the productivity of mango processing. *Sustainable Land Use in Mountainous Regions of Southeast Asia*, Springer: 134-146.

Oakley, A. J., Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Mazzetti, A. P. y Parker, M. W. (1999). The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *Journal of Molecular Biology*, 291(4): 913-926.

Parikh, H., Nair, G. y Modi, V. (1990). Some structural changes during ripening of mangoes (*Mangifera indica* var. Alphonso) by abscisic acid treatment. *Annals of Botany*, 65(2): 121-127.

Ploy, D. (2006). Mango. *University of Pretoria*, 35: 23-36.

Pourcel, L., Irani, N. G., Lu, Y., Riedl, K., Schwartz, S. y Grotewold, E. (2010). The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Molecular Plant*, 3(1): 78-90.

Poustka, F., Irani, N. G., Feller, A., Lu, Y., Pourcel, L., Frame, K. y Grotewold, E. (2007). A trafficking pathway for anthocyanins overlaps with the endoplasmic reticulum-to-vacuole protein-sorting route in *Arabidopsis* and contributes to the formation of vacuolar inclusions. *Plant Physiology*, 145(4): 1323-1335.

Proctor, L. T. A. y Creasy, L. L. (1969). The anthocyanins of the mango fruit. *Phytochemistry*, 8: 2108.

Rohman, M., Suzuki, T. y Fujita, M. (2009). Identification of a glutathione S-transferase inhibitor in onion bulb (*Allium cepa* L.). *Aust J Crop Sci*, 3: 28-36.

Romano, M., Stephenson, G., Tal, A. y Hall, J. (1993). The Effect of Monooxygenase and Glutathione S-Transferase Inhibitors on the Metabolism of Diclofop-methyl and Fenoxaprop-ethyl in Barley and Wheat. *Pesticide biochemistry and physiology*, 46(3): 181-189.

Salazar-Cisneros, E. (2000). Estudio Economico-Ambiental del sistema de cultivo del mango en la región de la sub-cuenca del Rio Daule. Escuela Superior Politecnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador, Escuela Superior Politecnica Nacional.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*, Cold spring harbor laboratory press New York.

Schieber, A., Berardini, N. y Carle, R. (2003). Identification of flavonol and xanthone glycosides from mango (*Mangifera indica* L. Cv. "Tommy Atkins") peels by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17): 5006-5011.

Schieber, A., Ullrich, W. y Carle, R. (2000). Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(2): 161-166.

Silverman, R. B. (2000). *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*. Press. Diego, CA.

Singh, Z., Singh, R. K., Sane, V. A. y Nath, P. (2013). Mango-Postharvest Biology and Biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(4): 217-236.

Singhal, S. S., Tiwari, N. K., Ahmad, H., Srivastava, S. K. y Awasthi, Y. C. (1991). Purification and characterization of glutathione S-transferase from sugarcane leaves. *Phytochemistry*, 30(5): 1409-1414.

Thom, R., Cummins, I., Dixon, D. P., Edwards, R., Cole, D. J. y Laphorn, A. J. (2002). Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry*, 41(22): 7008-7020.

Wilce, M. y Parker, M. W. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1205(1): 1.

Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126(2): 485-493.

Winkel, B. S. (2004). Metabolic channeling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 85-107.

Yamazaki, M., Shibata, M., Nishiyama, Y., Springob, K., Kitayama, M., Shimada, N., Aoki, T., Ayabe, S. i. y Saito, K. (2008). Differential gene expression profiles of red and green forms of *Perilla frutescens* leading to comprehensive identification of anthocyanin biosynthetic genes. *FEBS Journal*, 275(13): 3494-3502.

Yilmaz, C. (2006). Glutathiones-S-Transferase activity and glutathione levels in drought stressed *Pinus Brutia* Ten. Strees growing in ankara, Middle East Technical University.

Zhou, Z., Fisher, D., Spidel, J., Greenfield, J., Patson, B., Fazal, A., Wigal, C., Moe, O. A. y Madura, J. D. (2003). Kinetic and docking studies of the interaction of quinones with the quinone reductase active site. *Biochemistry*, 42(7): 1985-1994.