

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas & Ambientales**

**"Caracterización de sitios de reconocimiento molecular vía  
métodos computacionales de dianas involucradas en  
mecanismos de defensa de las plantas"**

**Proyecto de investigación**

**Silvia Carolina Velasteguí Cabezas**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 17 de mayo de 2016

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y**  
**AMBIENTALES**

**HOJA DE CALIFICACIÓN**  
**DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**"Caracterización de sitios de reconocimiento molecular vía métodos computacionales de dianas involucradas en mecanismos de defensa de las plantas"**

**Silvia Carolina Velasteguí Cabezas**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Miguel Ángel Méndez, PhD.

Firma del profesor

---

Quito, 17 de mayo de 2016

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Silvia Carolina Velasteguí Cabezas

Código: 00104386

Cédula de Identidad: 1717263956

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mi familia por todo su apoyo incondicional.

Gracias Miguel Ángel por toda la guía a lo largo de la investigación

Gracias al Grupo de Química Computacional y Teórica por brindarme su ayuda, paciencia y conocimiento.

Gracias COCIBA y a todos sus profesores por enseñarnos con toda la pasión y energía lo que significa representar a un dragón USFQ.

Gracias amigos por ser partícipes de cada alegría y momento de angustia.

Gracias BTC'S 2010 por ser participe de una gran aventura universitaria. Ustedes, a parte de ser colegas somos hermanos.

## RESUMEN

El mecanismo de defensa de las plantas involucra una serie de rutas hormonales que desencadenan la transcripción de una gran variedad de genes asociados a la respuesta de defensa inducida de la planta. La ruta de señalización del ácido jasmónico es un ejemplo de ello. Significativamente, dicha respuesta protectora se ha estudiado muy ampliamente en *Arabidopsis thaliana* el cual requiere de una COI1 unida a una proteína F-box; una SKP1 unida a otra F-box y una proteína CUL1 para formar el complejo SCF(COI1) que selectivamente señala proteínas represoras (JAZ1) para su posterior ubiquitinación y degradación bajo el reclutamiento de JA-Ile o ácido jasmónico isoleucina. Por lo tanto, es importante determinar sitios importantes de unión entre proteínas para diseñar análogos que reemplacen o inhiban el efecto del ácido jasmónico en las plantas bajo un precio rentable. Para esto, fue necesario emplear herramientas que abarcan la biología computacional para entender la biología molecular del sistema y determinar regiones importantes que regulen la expresión del ácido jasmónico bajo criterios de conservación, sensibilidad mutacional y predicción de estructuras que no solamente sea viable en *Arabidopsis thaliana* sino también sea dirigido a otros grupos mediados por JA-Ile.

**Palabras clave:** ácido jasmónico, conservación, sensibilidad mutacional, BioLuminate, Phyre 2.

## ABSTRACT

The plants' defense mechanism involves a series of phytohormonal routes that trigger the transcription of a great variety of genes associated with the induced defense response of the plant. The signaling route of the jasmonic acid is an example. This protective response has been vastly studied in *Arabidopsis thaliana* that needs of a protein known as COI1 attached to a F-box protein, a SPK1 attached to another F-box, and a CUL1 protein in order to form the SCF(COI1) complex. This complex selectively signalizes the repressor protein (JAZ1) for its subsequent ubiquitination and degradation under the recruitment of JA- Ile or isoleucine jasmonic acid. A promising application of understanding this mechanism of plant defense is to determine important sites of union among proteins in order to help in the design of effective and economic agrochemicals that will work as analogs replacing or inhibiting the effect of the jasmonic acid. To help in achieving this goal, it is first necessary to characterize the system's molecular structure and to determine the most important regions for the formation and stability of the complex in the presence of JA-Ile. Here, the methodology used were tools that encompass computational biology. The objective is to clearly identify the influential sites (amino acid residues) using a combination of conservation criteria, mutational sensitivity criteria, and structure prediction. The most important results is the identification of sites that may be biologically meaningful not only for *Arabidopsis thaliana's complex* but that may be meaningful within a greater group of plants' JA-Ile mediated complexes.

**Key words:** jasmonic acid, conservation, mutational sensitivity, BioLuminate, Phyre2.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>17</b>
<b>MATERIALES.....</b>	<b>18</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>Preparación del complejo .....</b>	<b>21</b>
<b>Escaneo mutacional por residuos de alanina.....</b>	<b>21</b>
<b>SuSPect .....</b>	<b>23</b>
<b>Conservación .....</b>	<b>24</b>
<b>UniProt .....</b>	<b>24</b>
<b>Diagrama de interacción del ligando .....</b>	<b>25</b>
<b>Representaciones visuales .....</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>Escaneo mutacional por residuos de alanina.....</b>	<b>27</b>
<b>SuSPect .....</b>	<b>27</b>
<b>Conservación .....</b>	<b>27</b>
<b>UniProt .....</b>	<b>29</b>
<b>Diagrama de interacción del ligando .....</b>	<b>30</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>37</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Detalle esquemático sobre el número de residuos que posee la proteína "SKP1-like protein 1A" junto con la localización de la secuencia conservada: F-box. ....	45
Tabla 2. Detalle esquemático sobre el número de residuos que posee la proteína "Coronatine-insensitive protein 1" junto con la localización de sus motivos respecticos y unión a los jasmonatos. ....	46
Tabla 3. Detalle esquemático sobre el número de residuos que posee la proteína "JAZ1 incomplete degron peptide" junto con su respectivo motivo y sitio de unión a los jamsonatos. ....	46



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cluster de residuos importantes abarcando criterios de $\Delta affinity$ mayor o igual a 4 kcal mol <sup>-1</sup> y 80% o mayor del índice generado por SuSPect. ....	43
Figura 2. Resultados obtenidos a partir de "Conservation Analysis" de la proteína "SKP1-like protein 1A" .....	44
Figura 3. Resultados obtenidos a partir de "Conservation Analysis" de la proteína "Coronatine-insensitive protein 1" .....	45
Figura 4. Resultados obtenidos a partir de "Conservation Analysis" de la proteína "JAZ1 incomplete degron peptide" .....	45
Figura 5. Diagrama de Interacción del Ligando con respecto a los aminoácidos de interacción entre la proteína "Coronatine-insensitive protein 1" y el ácido jasmónico. ....	47
Figura 6. Blancos específicos identificados en el complejo SCF(COI1), JAZ1 y JA-Ile. ....	48

## INTRODUCCIÓN

El mecanismo de defensa de las plantas interactúa frente a una serie de agentes bióticos y abióticos. Dentro de los agentes bióticos, existen interacciones con organismos benéficos, organismos autótrofos vecinos, herbívoros y patógenos (Zamioudis & Pieterse, 2012). En cuanto se refiere a patógenos, existen tres clasificaciones de organismos que atacan a las plantas: biótrosos el cual obtienen nutrientes de tejido vivo; necrótrofos, organismos que obtienen nutrientes de tejido muerto; o hemibiótrosos, patógenos que se alimentan tanto de tejido vivo o muerto (Glazebrook, 2005). Dependiendo del ataque, el sistema de defensa se puede clasificar, de acuerdo al momento de su expresión, en constitutivos, si se encuentra presentes durante todo el ciclo de vida de la planta; e inducidos, si su expresión se prolifera en mayor instancia ante la presencia de un patógeno (Sels *et al.*, 2008). Dentro de la defensa constitutiva está generalizada por barreras físicas y químicas (Chehab *et al.*, 2008). Las barreras físicas abarcan a las características propias de las plantas como cutícula, depósitos de lignina, tricomas y pared celular; mientras que las barreras químicas involucran compuestos tales como fitoanticipinas con actividad antimicrobiana (Pedras, 2008; Sels *et al.*, 2008). De manera conjunta, estas estrategias constitutivas, también consideradas como mecanismos de defensa preformada, componen la primera línea de defensa existente en las plantas y pueden prevenir de manera eficiente la invasión de muchos agentes extraños a la planta (Sels *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2008). No obstante, esta primera línea de defensa de la planta no resulta suficiente contra invasores con mayor agresividad. Para ello, la planta genera otro mecanismo de defensa denominado inducido o sistema de defensa post-invasión, que funcionan a través de mecanismos directos, como la producción de proteínas catabólicas o antidigestivas y químicos tóxicos o repelentes; y mecanismos indirectos tales como la producción y liberación de compuestos orgánicos volátiles para marcar a los depredadores de los fitopatógenos que se

prese se encuentra cerca (Chehab *et al.*, 2008). Ejemplos de estos son: producción de especies de oxígenos reactivas (ROS) ante una respuesta de hipersensibilidad que induce la apoptosis en células infectadas, óxido nítrico, reforzamiento de la pared celular, acumulación de fitoalexinas, taninos y compuestos fenólicos, señalización por las rutas de señalización del ácido salicílico y ácido jasmónico, acumulación de fitohormonas, entre otras (Chehab *et al.*, 2008; De Paula *et al.*, 2008; Odintsova *et al.*, 2008; Sels *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2008).

De esta manera, para hacer frente a sus enemigos, las plantas poseen un sistema de defensa altamente sofisticada el cual reconoce moléculas no propias o señales procedentes de sus propias células dañadas y responde activando su sistema inmunitario ante el invasor existente (Howe & Jander, 2008; Jones & Dangl, 2006). Por lo tanto, la modulación de la inmunidad en las plantas es una cuestión de hormonas. Hormonas como ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) junto con sus derivados (conjuntamente llamado jasmonatos) han sido reconocidos como los mayores defensores hormonales (Browse, 2009; Vlot, Dempsey & Klessing, 2009). Sin embargo, no son las únicas hormonas existentes; otros moduladores como el etileno (ET), el ácido abscísico (ABA), las giberelinas (GAs), las auxinas, las citoquininas (CK), los brasinoesteroides y el óxido nítrico (NO) forman, de igual manera, parte de la señalización inmunitaria en las plantas (Moreau *et al.* 2010).

Se entiende que la respuesta de una planta frente a un estímulo, ya sea exógeno o endógeno, nunca es el resultado de acción de un solo mecanismo de defensa; por el contrario, es la activación de una compleja red de interacciones entre varias rutas de señalización. Sin embargo, en el presente estudio se centra en el estudio de señalización molecular del ácido jasmónico como ruta de defensa en las plantas.

La ruta del ácido jasmónico o de los jasmonatos involucra vías de señalización molecular relacionadas con el mecanismo de defensa asociado a patógenos necrótrofos y a herbívoros (Staswick P. & Tiryaki I., 2004). Dicha ruta inicia, en primera instancia, cuando existe un

daño en la planta; en esta caso, por ejemplo, el ataque de un herbívoro/insecto rompe la pared celular de la hoja desencadenando la liberación de ácido linolénico. De esta forma, el ácido linolénico inicia la síntesis de ácido jasmónico a través de la ruta de los octadecanoides. La síntesis de los jasmonatos (JA) se ha estudiado ampliamente en *Arabidopsis thaliana* en el cual se inicia en primer plano en el cloroplasto con la oxigenación del ácido  $\alpha$ -linolénico seguido por varios procesos de formación de anillo, reducción y oxidación dentro del cloroplasto y peroxisoma dando origen a (+)-7iso-JA (Staswick P. & Tiryaki I., 2004). JA se puede convertir enzimáticamente en un sin número de conjugados y derivados tales como metiljasmonatos, cis-jasmonatos y conjugados de ácido jasmónico. A diferencia de otras hormonas, la conjugación del ácido jasmónico con L-iso-leucina a través de la enzima Jasmonate-Resistant 1 (JAR1) es necesaria para que dicha hormona sea activa, dando como resultado la hormona (+)-7iso-L-Ile o jasmonoyl isoleucina (JA-Ile). Una vez que JA-Ile es activada no actúa sola, necesita de un conjunto de proteínas para regular la transcripción de genes. De esta manera, JA-Ile interactúa con COI1 (Coronatine Insensitive protein 1). COI1 posee una F-box que se une a un complejo de proteínas denominas SCF (SKIP-CUL1-F-box). Este conjunto multiproteico forma parte de un complejo de E3 ligasa de ubiquitina que destina su ubiquitinación a una degradación proteosomal. Dicha F-box es una secuencia que le confiere especificidad de unión y reconocimiento hacia las proteínas JAZs que en presencia de JA son inducidas a su degradación a través del proteosoma 26S. JAZs son el conjunto de proteínas represoras que inhiben la transcripción de genes al estar en contacto con el factor de transcripción, MYC2. Una vez que el conjunto de JAZs son degradadas, MYC2 queda sin represores liderando la respuesta sistemática inmunológica a través de la ruta transcripcional de genes mediado por JA-Ile (Staswick P. & Tiryaki I., 2004).

Un evento que sucede en la naturaleza de manera similar es el caso de coronatine, la fitotoxina bacteriana originalmente detallada en *Pseudomonas coronafaciens* por Ichihara et al. (1977,1979) el cual al imitar el efecto biológico de JA-Ile puede fácilmente proliferar más individuos durante varias generaciones a través del debilitamiento de la planta (Bender et al., 1987). Coronatine se compone de ácido coronafácico producido por la vía de policétidos, y ácido coronámico, un aminoácido raro el cual contiene un anillo de ciclopropano y es producido a partir de isoleucina (Ichihara et al., 1979; Mitchell, R., Young, S. & Bender, C., 1994). Esta estructura es muy semejante a la hormona natural jasmonyl; sin embargo, la estereoquímica en el anillo de ciclopentano es fijo y sin posibilidad de una epimerización. Adicionalmente, la  $\alpha$ -ramificación convierte al ácido coronámico resistente a la escisión del enlace amida. Esta característica le brinda a la fitotoxina la prevalencia en su hospedador puesto que la planta no puede atenuar la señal de coronatine a través de la transformación de una forma menos activa y reacciona de manera exagerada (Lauchli & Boland, 2003).

Sin duda, JA-Ile es un excelente elicitor natural que induce, en la planta, una respuesta inmunológica y es el principal protagonista dentro de la ruta de señalización de JA. De esta manera, al entender los procesos de señalización de los jasmonatos es posible diseñar elicitores artificiales que inhiban, reemplacen o potencializan su acción. Sin embargo, para ello, es necesario estudiar la biología molecular de la ruta de señalización de los jasmonatos para, a su vez, encontrar dianas, sitios importantes involucrados en el mecanismo de respuesta inmunológica en las plantas para que, de esta manera, el diseño de nuevos elicitores puedan unirse con éxito a estos sitios activos.

Una excelente herramienta para estudiar la biología molecular de la ruta de señalización del ácido jasmónico-isoleucina es a través de la biología computacional. Dicho conocimiento trata del desarrollo de algoritmos y el uso de computadores para facilitar el conocimiento de

la biología. De esta manera, es posible almacenar, organizar, recuperar y analizar datos biológicos que permitan ejecutar operaciones "tales como búsquedas o alineamientos de secuencias; predicción de expresiones genéticas; montaje genómico; alineamiento y predicción estructural de las proteínas; interacciones proteína-proteína; y modelado de la evolución" (Rosselló, 2007).

La gran cantidad de información que existe a nivel celular y molecular de la biología requiere el uso de la biología computacional para analizar en conjunto grandes bases de datos que , hoy por hoy, existen. Los avances de la biotecnología han llevado al crecimiento exponencial en cuanto se refiere al descubrimiento de información genómica y biomolecular (Rosselló, 2007). De esta manera, ya se han registrado más de

80 millones de secuencias de proteínas (Kelley *et al.* 2015), más de 100.000 estructuras de proteínas (Kelley *et al.* 2015), 400 genomas secuenciados, más de 100 Gb en secuencias de DNA, más de 300.000 secuencias de proteínas descritas, más de 40.000 estructuras de proteínas y más de 47.000 rutas metabólicas (Rosselló, 2007). Sin embargo, cabe recalcar que algunos de estos datos corresponden al 2007, siendo que, en la actualidad, dichos valores han incrementado de manera exponencial. Para ello, dependiendo del caso de estudio se desarrolla técnicas computacionales junto con la ayuda de bibliotecas biológicas que permitan modular computacionalmente procesos biológicos.

Dentro de las estrategias que se desarrolla en el presente estudio es la búsqueda e identificación de estructuras tridimensionales del complejo de proteínas SCF-COI1, JAZ y el ácido jasmónico, presentes en la base de datos llamado PDB (Protein Data Bank). Protein Data Bank es una base de datos que posee estructuras cristalográficas y de resonancia magnética nuclear de las coordenadas tridimensionales de los átomos en proteínas y ácidos nucleicos (Protein Data Bank, s/f).

En el estudio *in silico* se utiliza el software Schrödinger que tiene una implementación computacional del escaneo vía mutagénesis por alanina (Alanine Scanning Mutagenesis), el cual permite analizar cómo cambian las interacciones de las distintas proteínas dentro del complejo SCF-COI1 junto las proteínas represoras (JAZ) cuando se inducen mutaciones de residuos substituyéndolos por Alanina. De igual manera, otras herramientas informáticas que se usaron son: Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) junto con SuSPect el cual nos permitió predecir la conservación y comportamiento de los residuos de las proteínas diana: proteínas SCF-COI1 y JAZ. Estos métodos nos permitieron obtener resultados muy importantes que permiten evaluar las diferencias de energías de interacción proteína-proteína y sensibilidad mutacional que puedan afectar con la funcionalidad o estabilidad del complejo de proteínas SCF-COI1, JAZ y el ácido jasmónico.

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente una de las principales preocupaciones de la agroindustria es la reducción del uso de pesticidas para el control de plagas y patógenos (Yan, C. & Xie, D., 2015). Dentro de esa necesidad apremiante, una de las principales razones de analizar la estructura y mecanismo de señalización de los jasmonatos es su vital importancia para el diseño de nuevos elicitores que potencialicen o inhiban la respuesta inmunológica en la planta. El estudio de uno de los complejos proteicos involucrados en la ruta de señalización del ácido jasmónico usando métodos computacionales permitirá acelerar o reducir los costos de descubrimiento de nuevos agroquímicos más amigables con el ambiente (Zambrano, A. & Romero, N., 2012). A través de este proyecto se pretende rescatar (data mining) información útil encriptada en las estructuras tridimensionales de las proteínas involucradas (SCF(CO11), JAZ1 junto con el ácido jasmónico isoleucina). Específicamente a través de métodos de manera precisa y ordenada ayuden a definir criterios cualitativos y cuantitativos que permitan crear filtros más inteligentes y herramientas de análisis para indicar cuáles son las dianas que pueden unirse con facilidad a futuro con compuestos químicos o elicitores sintéticos; ya sea en una capacidad de inhibidores o de elicitores. La necesidad del presente estudio surgió a partir de la observación que el compuesto químico ácido jasmónico tiene un costo elevado para una posible aplicación agroindustrial; por ejemplo, el agricultor ecuatoriano difícilmente podría cubrir tal costo y preferiría continuar utilizando pesticidas (Zambrano, A. & Romero, N., 2012). La contribución en la búsqueda de compuestos más económicos del presente trabajo de titulación es el análisis detallado de cómo funciona el complejo; por ejemplo, identificar residuos a los que un compuesto se podría unir sin que interfiera con la estabilidad propia del complejo.



## ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó a través de varios métodos que abarcan la biología computacional, la cual emplea el uso de algoritmos y ordenadores utilizados para el entendimiento de problemas biológicos (Rosselló, 2007). De esta manera, para entender la biología molecular del complejo SCF-COI1, JAZ junto con el ácido jasmónico isoleucina es necesario emplear varios métodos computacionales como los disponibles en Schrödinger y Phyre2.

Schrödinger es una suite de programas líderes en química computacional la cual brinda un gran suministro de soluciones de software y servicios para las ciencias biológicas y ciencias de materiales (Schrödinger, 2016). Dentro de Schrödinger se encuentra una interfaz, denominada BioLuminate, que examina sistemas biológicos y proteínas con un modelado basado en algoritmos propietarios (Schrödinger, 2016). Dicha suite proporciona una gran solución de modelado de proteínas/anticuerpos, ingeniería y análisis en proteínas (Schrödinger Press, 2012).

Por otro lado, se encuentra la suite Phyre2 que consta de un conjunto de herramientas disponibles en la web para predecir y analizar proteínas basado en su estructura, función, o mutaciones (Kelley, *et al.* 2015). El enfoque brindado por Phyre2 da soluciones de última generación la cual utiliza métodos de detección de homología avanzadas con el fin de construir modelos 3D, predecir la unión del ligando, y analizar el efecto de las variantes de aminoácidos, como por ejemplo, polimorfismos de nucleótido único para la secuencia de proteínas (Kelley, *et al.* 2015).

De esta manera, el presente estudio está basado en técnicas *in silico* para entender las interacciones entre las proteínas que conforman el complejo SCF-COI1, JAZ junto con el ácido jasmónico isoleucina.

## MATERIALES

En cuanto se refiere a la revisión bibliográfica se utilizó una Laptop personal: Mac OS X 10.9.5 con un procesador 1.3 GHz Intel Core i5; memoria 4 GB 1600 Mhz DDR3; y un disco de arranque Macintosh HD. Por otro lado, para la caracterización de sitios de reconocimiento molecular de dianas involucradas en el mecanismo de señalización del ácido jasmónico y el análisis computacional se utilizó dos programas : Schrödinger y Phyre2.

En el caso de Schrödinger se usó la Suite BioLuminate, la cual es una herramienta que requiere de licencias y plataformas soportadas. Para la preparación del sistema se utilizó una desktop para simulación con un GPU con Graphic Processing Unit (Tesla K40); una pantalla LED marca BenQ, resolución 1920x1080 pixeles; un disco duro de almacenamiento marca Samsung con USB 3.0 y 3TB D3 Station. Dicha desktop o computadora para simulación se usó en base al sistema operativo: GNU/Linux. Dicho sistema es el conjunto de programas que requiere un ordenador para poder realizar varias tareas tales como leer y escribir datos en el disco duro; controlar el uso de la memoria; y ejecutar otros programas (Linux Online, Inc. 2007). GNU/Linux o comúnmente conocido como Linux es un sistema operativo libre el cual todo su “código fuente” puede ser utilizado, modificado y redistribuido libremente por terceros bajo los términos de la GLP (Licencia Pública General de GNU), y otra serie de licencias libres (Linux Online, Inc. 2007).

Adicionalmente, para correr los cálculos, BioLuminate requiere como input para el análisis de sus cálculos la estructura de cristalografía por difracción de rayos X y de resonancia magnética nuclear. Esta información está guardada en forma de coordenadas tridimensionales de los átomos del complejo de estructuras: SCF-CO11, JAZ1 junto con el ácido jasmónico isoleucina (JA-Ile) en este caso.

Por otro lado, para los análisis computacionales se usó Phyre 2. Dicha herramienta es una suite en línea - libre la cual requiere de la secuencia de aminoácido del complejo de proteínas a estudiar: SCF-COI1 y proteínas JAZ1.

Tanto las estructuras cristalográficas de difracción de rayos x y la secuencia de aminoácidos se encuentran disponibles en una biblioteca de datos llamada PDB o Protein Data Bank. Dicha base de datos posee su propio website donde están las moléculas reportadas en la literatura y cubre estructuras presentes en toda clase de organismos vivos (Protein Data Bank, s/f). De esta manera, se logró obtener el complejo SCF-COI1, JAZ1 junto con el ácido jasmónico isoleucina en tres dimensiones en formato de archivo PDB. En cuanto se refiere a las secuencias de aminoácidos se utilizó el formato FASTA.

Una vez obtenidos los resultados procedentes de Phyre2 y BioLuminate se analizó los datos a través de un programa de minería de datos denominado Orange.

## MÉTODOS

### Selección de modelo

Una vez conocido el complejo de proteínas a estudiar a través de la búsqueda en la literatura se buscó los inputs necesario para correr los distintos cálculos. Dentro de la base de datos de Protein Data Bank se encontró tres modelos, estructuras tridimensionales de proteínas involucradas en la ruta de señalización de defensa mediado por el ácido jasmónico isoleucina y coronatine (variante del ácido jasmónico). Sin embargo, se seleccionó un solo complejo conformado por el complejo SCF-COI1, JAZ1 y JA-Ile. Las estructuras tridimensionales del ácido jasmónico-isoleucina (JA-Ile), SCF-COI1 y las proteínas represoras JAZ1 se extrajeron de la estructura cristalográfica de difracción de rayos-X a partir de COI1-ASK1 en complejo con JA-isoleucina y el JAZ1 degenon (Sheard, L.B. *et al.* 2010) disponibles en un registro del Protein Data Bank (PDB) bajo el PDB ID: 3OGL. Dichas estructuras cristalográficas se obtuvieron por difracción de rayos X con una resolución reportada de 3.18 Å. La composición de dicha estructura se compone principalmente de 5 moléculas que en total poseen 46877 átomos: “SKP1-like protein 1A” conformada por 8 cadenas (A,C,E,G,I,K,M,O) con un total de 160 residuos por cadena; “Coronatine-insensitive protein 1” conformada por 8 cadenas (B,F,H,J,L,N,P,D) con un total de 592 residuos por cada cadena; “JAZ1 incomplete degenon peptide” con 7 cadenas (Q,S,U,V,W,X,R) y 21 residuos por cada cadena; N-({(1R,2S)-3-oxo-2-[(2Z)-pent-2-en-1-yl]cyclopentyl}acetyl)-L-isoleucine bajo el código 7JA; y iones fosfato con código  $PO_4$ .

## **Preparación del complejo**

Una vez seleccionado el modelo tridimensional se descarga los datos en formato.pdb. En dicho archivo se elimina aquellas cadenas repetidas de cada tipo de molécula. De esta manera, se analizó únicamente la cadena "C" perteneciente a "SKP1-like protein 1A" con 160 residuos, la cadena "D" perteneciente a "Coronatine-insensitive protein 1" con 592 residuos, la cadena "R" perteneciente a "JAZ1 incomplete degran peptide" con 21 residuos, 1 molécula de  $7JA$   $C_{18}H_{29}NO_4$  y 4 iones fosfato  $PO_4$ . De esta forma, se obtuvo un sistema con un total de 760 residuos.

Ya obtenido el modelo tridimensional de partida se comenzó a preparar computacionalmente el complejo. Se añadió los átomos de hidrógeno de cada proteína puesto que estos no aparecen en las estructuras cristalográficas por difracción de rayos. Lo que sucede es que el hidrógeno al tener masa atómica 1 forma enlaces con la mayoría de elementos atómicos; estos son enlaces covalentes donde el par de electrones que forman el enlace se desplaza hacia el átomo con mayor electronegatividad. El muy pequeño núcleo de hidrógeno ahora con una densidad electrónica mucho menor no puede ser observado por el método de cristalografía de rayos X. De esta manera, al no aparecer los hidrógenos en el cristal se los debe añadir *in silico* a través de la opción "Protein Preparation Wizard" procedente de BioLuminate en la sección de preparación de la estructura.

## **Escaneo mutacional por residuos de alanina**

La selección de residuos a mutar se realizó manualmente a través de la aplicación "Residue Scanning". Una vez elegidos los residuos se decide qué tipo de mutación se aplica al sistema. El escaneo mutacional o "Residue Scanning" de los residuos posee una lista de los 20 tipos de aminoácido que forman parte las proteínas. En este caso en particular, a cada residuo que conforma las proteínas SCF-CO11 & JAZ1 se los mutó por residuos de alanina.

Esto quiere decir, que en cada aminoácido perteneciente al complejo de proteínas SCF-COII & JAZ1 se reemplazó sus grupos funcionales presentes en la cadena lateral por residuos de alanina (que tiene un  $CH_3$  como cadena lateral) dando un total de 753 mutaciones posibles. Hay que poner atención que solo un residuo se muta a la vez y que además siempre existía una cadena que no contenía mutación alguna.

Una vez hecha la mutación varios análisis son posibles, el método principal de análisis que se utilizó es el cambio en la afinidad de unión entre las cadenas de la proteína debido a la mutación. Esto nos da una idea de qué tanto afectaría una mutación a la interacción de las proteínas (BioLuminate 1.0 User Manual, 2012). Se escogió el residuo de alanina puesto que al estar en contacto con cualquier otro residuo, todo tipo de interacción se pierde; interacciones como: puentes salinos, interacciones iónicas, puentes disulfuro o puentes de hidrógeno. Si, inicialmente, la interacción fue importante, la diferencia de energía va a ser alta puesto que el equilibrio del sistema se verá afectado. De acuerdo a la literatura, diferencias de afinidad mayores a  $4 \text{ kcal mol}^{-1}$  son considerados residuos "hot-spots". En realidad, para determinar las regiones determinantes de unión solo las regiones "hot-spots" son los que realmente importan (Gesto, D. *et al.* 2014). De esta forma, se realizó el cálculo termodinámico de cambio afinidad con respecto a cada una de las tres proteínas: SCF-COII y JAZ1. Una vez obtenido los resultados de las simulaciones, se seleccionaron aquellos residuos que presentaban valores mayores o iguales a  $4 \text{ kcal mol}^{-1}$  en  $\Delta$ afinidad ( $\Delta$ *ffinity*).

Sin embargo, para determinar residuos importantes dentro del complejo seleccionado en la ruta de señalización del ácido jasmónico es necesario incluir otros criterios como el de sensibilidad mutacional (descrito a continuación).

## SuSPect

Para la predicción de la sensibilidad mutacional de cada uno de los residuos existentes en el complejo proteico a partir de la secuencia de aminoácidos, se utilizó el algoritmo SuSPect o "Disease-Susceptibility based single amino acid variants Phenotype Prediction" basado en support vector machines SVMs (Kelley, *et al.* 2015). SuSPect utiliza criterios de conservación, accesibilidad del solvente e interacciones proteína-proteína utilizando una red de información para calcular la probabilidad de qué tanto afecta una mutación en un aminoácido en particular sobre la capacidad de que observe un efecto en la funcionalidad del sistema (Kelley, *et al.* 2015). Actualmente se ha reportado una precisión bien balanceada del 82% (Kelley, *et al.* 2015). Donde precisión es el número de predicciones positivas/correctas sobre el total de residuos predecidos como causantes de un efecto fenotípico. Esta herramienta es utilizada tanto para predicciones en proteínas humanas como en proteínas no humanas (Kelley, *et al.* 2015).

En cuanto a los resultados generados por SuSPect, se indican en una escala de valores de 0-100 los cuales representan niveles de confianza. Por ejemplo, valores con una puntuación de 50 o cercana indican una línea de corte entre las mutaciones neutras y las mutaciones causantes de pérdida de funcionalidad con una probabilidad de 50 por ciento. Por otro lado, valores localizados a los extremos de los índices 0-100 indican un alto nivel de confianza en las predicciones; valores de los extremos inferiores indican que la mutación individual ejercida en el sistema no afecta con la funcionalidad del complejo, es decir, el efecto es neutro. Por otra parte, valores de los extremos superiores indican que el efecto mutacional en el sistema proteico produce una pérdida funcional en el complejo.

Es por esta razón que se eligió resultados con un nivel de confianza del 80 por ciento o mayor; intervalo donde SuSPect predice sus resultados con un nivel bajo de error.

Posteriormente, se correlacionó los resultados tanto de afinidad como de sensibilidad mutacional dada por SuSPect, para encontrar residuos importantes en el complejo bajo estudio en la vía de señalización del ácido jasmónico.

## **Conservación**

Para realizar el análisis de conservación del complejo SCF-COI1, JAZ1 y JA-Ile se utilizó la función de Phyre2 de "Conservation Analysis". Esta aplicación requiere un input de la secuencia de aminoácido de la estructura puesto que primero se escanea dicha información contra una gran base de datos de secuencias utilizando PSI-BLAST. El perfil generado por PSI-BLAST es procesado a través de una red de predicción de estructura secundaria y factores como "SS confidence", "Disorder" y "Disorder confidence" (Capra, J. & Singh, M. 2007).

## **UniProt**

Con la finalidad de evaluar datos experimentales sobre el efecto de las mutaciones y conocer las estructuras presentes en el complejo SCF-COI1 y JA-Ile se usó UniProt, el cual brinda a la comunidad científica una fuente de libre acceso sobre secuencias de proteínas, taxonomías, proteomas, información funcional y reportes sobre datos mutacionales (UniProtKB/Swiss-Prot. 2016). De esta manera, en el buscador se las identificó a cada proteína bajo un código en específico: Q39255 (SKP1A\_ARATH) para "SKP1-like protein 1A", O04197 (COI1\_ARATH) para "Coronatine-insensitive protein 1", y Q9LMA8 (TI10A\_ARATH) para la proteína TIFY 10A el cual contenía información sobre "JAZ1 incomplete degra peptide".



## **Diagrama de interacción del ligando**

Dentro de la aplicación de BioLuminate se encuentra la opción Diagrama de interacción del ligando. Dicha aplicación requiere un input de las estructuras cristalográficas. Para comenzar a realizar los cálculos, es necesario seleccionar el área donde se pretende analizar la interacción entre las proteínas y/o el ligando de interés.

El análisis se realiza en la opción "Ligand Interaction Diagram" que se encuentra en la herramienta "Tools" en el proyecto que se está trabajando. El resultado es una visualización de las interacciones entre componentes, en este caso, ya sea interacción proteína-proteína o proteína-JA-Ile con sus aminoácidos o átomos cercanos.

## **Representaciones visuales**

Todas las representaciones gráficas relacionadas al material visual del complejo de señalización por el ácido jasmónico fueron creadas a través de BioLuminate y Visual Molecular Dynamics Software, versión 1.9.1. Por otro lado, las representaciones gráficas relacionadas al análisis del procesamiento de datos obtenidos fueron creadas a través de Orange. El enfoque visual que brinda dicho programa se basa en una red de flujos, diseñado por el usuario, el cual crea una vinculación de los widgets predefinidos o diseñados. De esta manera, es posible crear subconjuntos o conjuntos para su posterior procesamiento, evaluación empírica de algoritmos de aprendizaje y modelos de predicción (Demšar, J. & Blaž, Z. 2013).

Dentro de la red de flujos diseñados se utilizó la opción "Scatter Plot" el cual es un diagrama de dispersión que proporciona una visualización gráfica en 2 dimensiones estándar para atributos continuos y con valores discretos (Leban, G. *et al.* 2006). En este caso, se usaron: datos de afinidad versus posición de los residuos; y , de la misma manera, datos de afinidad versus sensibilidad mutacional, siendo estos los resultados más representativos. Los gráficas

obtenidas se muestra como una colección de puntos que, de acuerdo, a su tributo de clase tiene una coloración equivalente.

## RESULTADOS

### Escaneo mutacional por residuos de alanina

Se obtuvo los resultados energéticos de cada interacción proteica y se realizaron las gráficas correspondientes a través del programa Orange. De esta manera, se eligieron aquellos residuos con un  $\Delta affinity$  mayor o igual a 4 kcal mol<sup>-1</sup>, obteniendo un total de 33 residuos para la proteína “SKP1-like protein 1A”; con respecto a la proteína COI-1 o “Coronatine-insensitive protein 1” se obtuvo un total de 33 residuos; y con respecto a “JAZ1 incomplete degron peptide” se determinó un total de 14 residuos. Sin embargo, es necesario relacionar con la siguiente variable (SuSPect) para abarcar criterios de sensibilidad mutacional en el modelo computacional.

### SuSPect

Una vez obtenido los resultados de afinidad y de sensibilidad mutacional por BioLuminate y SuSPect, respectivamente, se ejecutaron las gráficas en Orange con lo que se identificaron 8 residuos importantes localizados en la proteína “SKP1-like protein 1A” y 1 residuo en la proteína “JAZ1 incomplete degron peptide”. Dichos resultados son aquellos que presentan, de manera simultanea, predicciones con SuSPect con un índice del 80 por ciento o mayor, y un  $\Delta affinity$  mayor o igual a 4 kcal mol<sup>-1</sup>. Esto correspondería a residuos donde, una mutación dada altera a la interacción que existe entre proteínas y a la funcionalidad del complejo (Ver Figura 1).

### Conservación

Dicha herramienta indica que no todos los residuos tienen la misma importancia (Capra, J. & Singh, M. 2007). Algunos son necesarios para mantener una correcta estructura y función en la proteína; mientras que otros pueden ser fácilmente sustituidos (Capra, J. & Singh, M. 2007).

El análisis de conservación es una de los métodos más usados para la predicción de residuos importantes en la secuencia de aminoácidos (Capra, J. & Singh, M. 2007). Puesto que "conservation analysis" se encuentra dentro de las funciones de Phyre, de igual manera, estudia el "multiple sequence alignment" como acción previa a los cálculos de conservación (Capra & Singh, 2007). Para evitar que la selección de las cadenas sean sesgada y se elijan demasiadas secuencias prácticamente idénticas o del mismo organismo, el método tiene incorporado un sequence weighting method propuesto por Henikoff & Henikoff (1994). A través de dicho método existe una especie de "premiación" hacia las secuencias no tan idénticas lo cual dan cabida a calcular diversidad en secuencias. "Multiple sequence alignment" alinea proteínas y sus secuencias homólogas para determinar qué regiones son preferentemente conservadas. Estos sitios se presumen que son estructural y funcionalmente importantes puesto que han presenciado pocas mutaciones con respecto a sus alineaciones.

Adicionalmente, "Conservation Analysis" brinda una fácil interpretación de datos el cual se basa en una galería de colores para medir los distintos niveles de conservación (Ver Figuras 2-4). En base a la secuencia de aminoácido enviado por el usuario se escanea dicha información contra una gran base de datos el cual engloba un sin número de secuencias de proteínas a lo largo del reino vegetal. Resultados como "SS confidence" indica los niveles de confianza conservativa interpretada a través de colores: el color rojo indica niveles altos; mientras que el color azul mide niveles bajos y colores como el naranja, amarillo y verde representan niveles tenues de confianza conservativa (Kelley, *et al.* 2015). Dichos resultados, como se mencionó anteriormente, calcula el "multiple sequence alignment"; por lo tanto, el "SS confidence" está midiendo niveles de conservación. En cuanto a los resultados dados por "Disorder", contiene las regiones de desorden asignadas como "?" (Kelley, *et al.* 2015). Dicho valor indica que, inicialmente, la secuencia de aminoácidos puesta en el ordenador de Phyre2 no encaja con el "multiple sequence alignment". Sin embargo, son pocos los

resultados a los que se les atribuye con este símbolo. Por otro lado, "Disorder confidence" indica una correlación con los resultados obtenidos en "SS confidence"; si estos valores son bajos o existe un bajo nivel de confianza de conservación en la estructura existirá un "Disorder confidence" con niveles altos de desorden expresados de color rojo (Kelley, *et al.* 2015).

Adicionalmente, los análisis de conservación o "conservation analysis" ha sido demostrado como un poderoso indicador de importancia funcional y se ha utilizado para detectar residuos involucrado en la unión del ligando (Liang *et al.*, 2006; Magliery & Regan, 2005), en el mantenimiento de la estructura (Karlin y Brocchieri, 1996; Schueler-Furman y Baker, 2003; Valdar y Thornton, 2001), y en la determinación de proteínas especificidad funcional (Hannenhalli y Russell, 2000; Kalinina, *et al.*, 2003; Lichtarge *et al.*, 1996).

## **UniProt**

Para la exploración de citas científicas sobre métodos experimentales de mutagénesis se obtuvieron las regiones a las cuales cada estructura es susceptible (Ver Tablas 1-3). De la misma manera, se determinó cuáles eran los motivos de cada estructura junto con la posición de aminoácido localizado. "SKP1-like protein 1A" o SCF (SKIP-CULLIN-F-box), como ya se mencionó anteriormente, posee una F-box a la cual se logró establecer la región en específico de su localización a lo largo de la cadena de aminoácidos. Del mismo modo, "Coronatine-insensitive protein 1" posee un motivo F-box. Por otro lado, se buscó la literatura científica sobre casos mutacionales en "JAZ1 incomplete degron peptide", sin embargo, no se logró encontrar información alguna. Por el contrario, se encontró la información completa de la proteína estructura de TIFY 10A el cual dentro de dicha secuencia se encontraba "JAZ1 incomplete degron peptide".

### **Diagrama de interacción del ligando**

Se obtuvieron los residuos vecinos entre: SCF-CO11, JAZ1 y JA-Ile. Sin embargo, los más representativos fueron en la proteína “Coronatine-insensitive protein 1” en unión con el ácido jasmónico isoleucina. Se logró identificar 24 tipos de residuos distribuidos de la siguiente manera: 15 residuos hidrofóbicos, 6 residuos con carga positiva , 2 con carga negativa y 1 residuo polar. Adicionalmente, se observó que existen 4 interacciones a través de puentes de hidrógenos con el esqueleto del aminoácido hacia los grupos carboxilos del ácido jasmónico isoleucina (Ver Figura 5).

## DISCUSIÓN

La proteína "SKP1-like protein 1A" está involucrada en la ubiquitinación y posterior degradación proteosomal de proteínas diana JAZ1. Junto con CUL1, SKIP y una proteína F-box forman un complejo ubiquitina ligasa denominada SCF(SKIP-CUL1-F-box) E3. Dentro del reino vegetal, dicho complejo interacciona con otras proteínas: SCF(UFO) el cual se requiere para el desarrollo vegetativo de órganos florales, así como también para la gametogénesis masculina; SCF(TIR1) se encuentra implicado en la vía de señalización de la auxina; SCF(COI1) regula la ruta de señalización de los jasmonatos; SCF(EID1) y SCF(AFR) están involucradas en el fitocromo A; SCF(ADO1), SCF(ADO2), SCF(ADO3) están relacionadas con el reloj circadiano; SCF(ORE9) parece estar implicado en la senescencia; SCF(EBF1/EBF2) regula la señalización de etileno (Liu, F. *et al.* 2004). La especificidad funcional de este complejo depende del tipo de proteína F-box. De acuerdo a los resultados obtenidos, dicha secuencia se encuentra entre los residuos 102 hasta el residuo 160 abarcando una extensión de 59 aminoácidos (Ver Tabla 1).

Por otro lado, se encuentra la proteína "Coronatine-insensitive protein 1". Dicha proteína se requiere para procesos de fertilidad de la planta y está involucrada en el mecanismo de defensa regulado por los jasmonatos, coronatina, y otros inductores de respuesta; se requiere para la regulación de la mayoría de genes inducidos por heridas; no se encuentra involucrado en el proceso de meiosis; y es un componente del conjunto de proteínas (SKIP-CUL1-F-box). Como ya se mencionó anteriormente, junto con SCF juegan un papel importante en la regulación de la respuesta al jasmonato, y sus interacciones con COP9 signalosoma; además, interactúa con TIFY 10A o también conocido como JAZ1, e inositol pentaquifosfato para formar una alta afinidad con los jasmonatos. Adicionalmente, juega un papel importante en la regulación de la expresión de genes de defensa durante las interacciones planta-patógeno,

como por ejemplo, al ataque de *Pseudomonas syringae* y *Brassicicola alternaria* (Xie *et al.*, 1998). El gen que codifica a COI1 contiene 16 dominios de repeticiones de leucina (LRR) y un motivo N-terminal F-box (Xie *et al.*, 1998). Dicha F-box se ha mantenido en el reino animal en organismos desde levaduras hasta el ser humano. Adicionalmente, la proteína F-box se asocia con las proteínas SKP1, cullin y F-box para formar el complejo SCF (Bai *et al.*, 1996; Deshaies, 1999). Solo en *Arabidopsis* se ha detectado 10 proteínas cullin (Bachmair *et al.*, 2001), 19 SKP1-like o ASKs (Farrás *et al.*, 2001), y 337 proteínas F-box (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Dentro de las proteínas F-box conocidas se encuentran en TIR1, involucrado en la respuesta mediada por auxinas (Ruegger *et al.*, 1998); UFO/FIM, requerido para el desarrollo floral (Ingram *et al.*, 1997); y FKF y ZTL, protagonizando el ciclo circadiano de las plantas (Nelson *et al.*, 2000; Somers *et al.*, 2000). Por otro lado, existe un sin número de proteínas F-box en *Arabidopsis* sin conocer exactamente su función (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Sin embargo, F-box brinda una gran especificidad al complejo SCF y se encuentra muy conservado a lo largo de la naturaleza. Este hecho fuertemente es respaldado en los resultados donde, a través de la información brindada por UniProt Knowledgebase (UniProtKB) se pudo identificar la posición de la secuencia de la proteína F-box (Ver Tabla 2) y su nivel de conservación (Ver Figura 3). F-box se encuentra en el residuo 16 hasta el residuo 57 con una extensión de 42 residuos; si se toma en cuenta dicha información y se observa en la Figura 3 se puede observar cómo dichas secuencias poseen un "SS confidence" de color rojo (altamente conservadas) y colores naranja, amarillo y verdes (medianamente conservadas).

En cuanto a las proteínas JAZ1 son homo y heterodímeros que interactúan con una serie de proteínas represoras como la JAZ2, JAZ3, JAZ4, JAZ5, JAZ6, JAZ8, JAZ9, JAZ10, JAZ11 y JAZ12. De la misma manera, lo hacen con COI1, MYC2, MYC3, MYC4, MYB21 y MYB24 (Thines, B. *et al.* 2007).



Las proteínas JAZs forman un gran grupo de proteínas ZIM llamadas así por el factor de transcripción "Zinc-finger inflorescence meristem (ZIM). Dichas proteínas contiene una región conservada de 28 aminoácidos localizados en el motivo ZIM, sin embargo, no todas tienen el sitio de unión GATA "Zinc-finger" ligado a la región de las proteínas ZIM originales; es por esto, debido a esta inconsistencia, existió un renombramiento por proteínas TIFY (Vanholme, B. *et al.* 2007) en el cual encajaban todas las proteínas a una región conservada en el dominio ZIM. A parte de ZIM, existe una secuencia conservada denominada motivo Jas (Yan, Y. *et al.* 2007) el cual 12 proteínas fueron tentativamente asignadas dentro de la familia JAZ basadas en dicho motivo y al dominio ZIM. Aparte de tener dos sitios conservados, las proteínas JAZ divergen considerablemente entre ellas variando entre 131 a 352 aminoácidos y, de igual manera, variando la posición ZIM y Jas entre ellas (Yan, Y. *et al.* 2007). Dentro de los resultados obtenidos a partir de las estructuras cristalográficas por difracción de rayos X registradas en el Protein Data Bank no se logró obtener la estructura completa de la proteína JAZ1, sin embargo, Sheard, L.B. *et al.* (2010) demuestra que la sección con estructura cristalográfica disponible es una región conservada entre la familia de proteínas JAZ denominada motivo Jas abarcando los residuos 205 hasta el 220. En cuanto a "JAZ1 incomplete degron peptide" posee residuos que abarcan desde el 200 hasta el 217 que, de la misma manera, corresponde a la secuencia conservada de las proteínas JAZs. Este hecho es fuertemente respaldado con la aplicación de Phyre2 al medir "Conservation Analysis". En la Figura 4 se observa claramente valores rojos los cuales indican altos niveles de conservación. De esta manera, se puede respaldar que "JAZ1 incomplete degron peptide" usa una secuencia mínima de las proteínas JAZ1 y estas se encuentran dentro del motivo Jas, en el cual consiste en una región altamente conservada en la región central y C-terminal y una región variable en la N-terminal, región en la cual interactúa con COI1 y percibe la señal de los jasmonatos.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Ver Figura 6), dichas secuencias conservadas como la F-box en COI1 y SCF; y el motivo Jas se logró determinar a través del modelado computacional el cual abarcó métodos de conservación, sensibilidad mutacional e interacciones entre proteínas.

De esta manera, se puede decir que la funcionalidad depende en gran manera de la interacción que existe entre proteína-proteína y proteína-ácido jasmónico. Es por esto la importancia de determinar cuáles son los residuos críticos que se mantienen de generación en generación a lo largo de la línea evolutiva de las plantas. Determinar cuáles son las regiones conservadas como la F-box tanto para COI1 y SCF; y el motivo Jas nos permitió identificar sitios a los cuales llevar a cabo un caso de mutagénesis bloquea la ruta de señalización del ácido jasmónico, que inhibiría la transcripción de genes ligados a la defensa protectora inducida a lo largo de la línea evolutiva de la plantas. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, dichas secuencias conservadas no solamente afectan a la ruta de señalización mediado por el ácido jasmónico, sino también, a una serie de rutas que involucra el sistema inmune de las plantas. Rutas mediadas por las auxinas, ruta de señalización mediada por el etileno, entre otras, se verán afectadas al realizar una mutación o bloquear dichas regiones con un compuesto químico. De esta manera, los resultados sugerirían que esas regiones importantes podrían ser blanco para el desarrollo de herbicidas que bloqueen la barrera protectora de la planta y sea muy fácil la colonización por patógenos. Este podría ser de vital importancia para controlar plantas invasoras en los cultivos agrícolas.

Por otro lado, se identificó cuáles son los residuos de los cuales el ácido jasmónico tiene contacto con los residuos de la proteína COI1, abarcando un total de 24 regiones importantes donde, hoy por hoy, en la literatura solo se han registrado 5 residuos (Ver Tabla 2) de los 24 obtenidos en el presente estudio. De esta manera, una vez encontradas dichas regiones se

puede pensar en diseñar análogos al ácido jasmónico para incrementar la barrera protectora de las plantas; análogos que deberían tener un menor costo que el del ácido jasmónico.

## CONCLUSIÓN

Se logró determinar las regiones importantes dentro del complejo SCF(COI1), JAZ1 y Ja-Ile en el cual en base a la literatura citada y el uso de métodos computacionales se abarcó criterios de conservación, sensibilidad mutacional y energías de afinidad entre proteína-proteína.

Una vez encontradas dichas regiones se puede empezar a la puesta en marcha de proyectos que involucren al diseño de fármacos que inhiban la ruta protectora de la planta o potencialicen el efecto de la ruta de señalización del ácido jasmónico.

## RECOMENDACIONES

Se debería incrementar el uso de métodos computacionales versus métodos convencionales (experimentales de laboratorio, *in vivo* o *in vitro*) debido a que los métodos de biología computacional, y química computacional son de gran utilidad en cuanto a reducción de costos, eliminación/reducción de la necesidad de permisos requeridos en cuanto a acceso a material biológico y fundamentalmente ahorro de tiempo. Caracterizar sitios importantes dentro de un complejo requiere de una serie de mutaciones dirigidas a los cuales a través de métodos convencionales como la ingeniería genética y técnicas de la biología molecular, dentro de un marco experimental, requieren una serie de pasos que se traduce en tiempo y altos costos. A través de la biología computacional es posible reducir dichas barreras puesto que se trabaja con ordenadores, y algoritmos que permiten simular el efecto biológico *in silico*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796–815.
- Bachmair, A., Novatchkova, M., Potuschak, T. and Eisenhaber, F. (2001). Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a posttranslational modification. *Trends Plant Sci.* 6, 463–470.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*, 86, 263–274.
- Bender, C.L., Stone, H.E., Sims, J.J., Cooksey, D.A., 1987. Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. tomato tn5 mutants defective in coronatine production. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30, 273–283.
- BioLuminate 1.0 User Manual. (2012). Binding Affinity Prediction. Schrödinger, LLC.
- Boland, J. S. (2010). Plant defense elicitors: Analogues of jasmonyl-isoleucine conjugate. *Elsevier* (71), 1445-1449.
- Boutet E, Lieberherr D, Tognolli M, Schneider M, Bansal P, Bridge AJ, Poux S, Bougueleret L, Xenarios I.
- Browse J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. PlantBiol.* 60:183–205.
- Capra, J. A., & Singh, M. (2007). Predicting functionally important residues from sequence conservation. *Bioinformatics*, 23(15), 1875-1882.
- Chehab E., Kaspi R., Savchenko T., Rowe H., Negre-Zakharov F. & Kliebenstein D. (2008). Distinct Roles of Jasmonates and Aldehydes in Plant-Defense Responses. *PLoS One*; 3(4):e1904.
- C., W. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal, transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot (Lond)* (100), 681-697.
- Deshaies, R.J. (1999). SCF and cullin/ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 15, 435–467.
- Demšar, Janez & Blaž Zupan. (2013). *Orange: Data Mining Fruitful and Fun - A Historical Perspective*, Informatica 37, pgs. 55-56.
- De Paula V, Razzera G., Medeiros L., Miyamoto C., Almeida M. & Kurtenbach. (2008). Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. *Plant Mol Biol.*;68:321-335.

- Farrás, R., Ferrando, A., László, R., et al. (2001). SKP1–SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* 20, 2742–2756.
- Gesto, D., Cerqueira, N., Ramos, M. & Fernandes, P. (2014). *Discovery of new druggable sites in the anti-cholesterol target HMG-CoA reductase by computational alanine scanning mutagenesis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Geyter, N., G. ,A. (2012). *Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism*. 17 (6), 349-351.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:205-27.
- Hannenhalli, S. and Russell, R. (2000) Analysis and prediction of functional subtypes from protein sequence alignments. *J. Mol. Biol.*, 303, 61–76.
- Henikoff, S. and Henikoff, J. (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 10915–10919.
- Howe GA & Jander G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59:41–66.
- Ichihara, A., Shiraishi, K., Sato, H., Sakamura, S., Nishiyama, K., Sakai, R., Furusaki, A. & Matsumoto, T., (1977). The structure of coronatine. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 636–637.
- Ichihara, A., Shiraishi, K. & Sakamura, S., (1979). On the stereochemistry of coronatine: revised absolute configuration of (+)-coronamic acid. *Tetrahedron Lett.* 20, 365–368.
- Ingram, G.C., Doyle, S., Carpenter, R., Schultz, E.A., Simon, R. and Coen, E.S. (1997). Dual role for fimbriata in regulating floral homeotic genes and cell division in *Antirrhinum*. *EMBO J.* 16, 6521–6534.
- I., S. P. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* (16), 2117-2127.
- Jones & Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323–29.
- Kalinina, O. et al. (2003) Automated selection of positions determining functional specificity of proteins by comparative analysis of orthologous groups in protein families. *Protein Sci.*, 13, 443–456.
- Karlin, S. and Brocchieri, L. (1996) Evolutionary conservation of recA genes in relation to protein structure and function. *J. Bacteriol.*, 178, 1881–1894.
- Kelley, Mezulis S., Yates C., Wass M. & Sternberg M. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10, 845-858.

- Lauchli, R. & Boland, W. (2003). Indanoyl amino acid conjugates: tunable elicitors of plant secondary metabolism. *Chem. Rec.* 3, 12–21.
- Leban G, Zupan B, Vidmar G, & Bratko I. (2006). VizRank: *Data Visualization Guided by Machine Learning*. *Data Mining and Knowledge Discovery* 13(2): 119-120.
- Liang,S. et al. (2006) Protein binding site prediction using and empirical scoring function. *Nucleic Acids Res.*, 34, 3698–3707.
- Lichtarge,O. et al. (1996) An evolutionary trace method defines binding surfaces common to protein families. *J. Mol. Biol.*, 257, 342–358.
- Linux Online, Inc. (2007). What is Linux. Extraído el 14 de abril de 2016 desde: <http://web.archive.org/web/20110315212542/http://www.linux.org/info/>
- Mitchell, R.E., Young, S.A. & Bender, C.L., (1994). *Coronamic acid, an intermediate in coronatine biosynthesis by Pseudomonas syringae*. *Phytochemistry* 35, 343–348.
- Liu, F., Ni, W., Griffith, M., Huang, Z., Chang, C., Peng, W., Ma, H. & Xie, D. (2004). The ASK1 and ASK2 genes are essential for *Arabidopsis* early development. *Plant Cell* 16:5-20.
- Magliery,T. and Regan,L. (2005) Sequence variation in ligand binding sites in proteins. *BMC Bioinformatics*, 6, 240.
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J & Klessig DF. (2010). NO synthesis and signaling in plants—Where do we stand? *Physiol. Plant.* 138:372–83.
- Nelson, D., Lasswell, J., Rogg, L., Cohen, M. and Bartle, B. (2000). FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in *Arabidopsis*. *Cell*, 101, 331–340.
- Nurnberger, T., & Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol. Plant Pathol.* 6, 335–345. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00279.x
- Odinstsova T., Rogozhin E., Baranov Y., Musolyamov A, Yalpani N. & Egorov T. (2008). Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. *Biochimie.*;90:1667-1673.
- Pauwels L., M. K. (2008). Mapping methyl jasmonate-mediated transcriptional reprogramming of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. *Proc Natl Acad Sci* (105), 1380-1385.
- Pedras Msc. (2008). The Chemical Ecology of Crucifers and Their Fungal Pathogens: Boosting Plant Defenses and Inhibiting Pathogen Invasion. *Chem Rec.*;8:109-115.
- Rosselló. (2007). *Biología Computacional para Informáticos*. Universitat de les Illes Balears, Dept. de Ciències Matemàtiques i Informàtica.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J. and Estelle, M. (1998). The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* 12, 198–207.



- Schueler-Furman, O. and Baker, D. (2003) Conserved residue clustering and protein structure prediction. *Proteins*, 52, 225–235.
- Sels J., Mathys J., De Coninck B., Cammue B. & De Bolle M. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol Biochem.* 46:941-950.
- Schrödinger. (2016). *Schrödinger*. Recuperado el 11 de 04 de 2016, de Schrödinger Products Suites: <http://www.schrodinger.com/>
- Schrödinger Press. (2012). *BioLuminate 1.0 User Manual*. Schrödinger Suite .
- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A. & Zheng, N. (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468: 400-405.
- Somers, D., Schultz, T., Milnamow, M. and Kay, S. (2000). ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell*, 101, 319–329.
- Staswick P. & Tiriyaki I. (2004). The oxypilin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16:2117-2127.
- Tavares L., Santos Mo., Viccini LF., Moreira Js., Miller R. & Franco O. (2008). Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides*;29:1842-1851.
- Tines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He S.Y., Howe, G.A. & Browse, J. (2007). Jas repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonates signalling. *Nature* 448:661-665.
- UniProtKB/Swiss-Prot. (2016). the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View Methods *Mol. Biol.* 1374:23-54
- UniProtKB/Swiss-Prot. (2014). The Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View Methods *Mol. Biol.* 1374:23-54
- Valdar, W. and Thornton, J. (2001) Conservation helps to identify biologically relevant crystal contacts. *J. Mol. Biol.*, 313, 399–416.
- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T. & Gheysen, G. (2007). The tify family previously known as ZIM. *Trends Plant Sci.* 12, 239-244.
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177–206.
- Xie, D., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M. and Turner, J.G. (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, 280, 1091–1094.

- Yan, C. & Xie, D. (2015). Jasmonate in plant defence: sentinel or double agent? *Plant Biotechnology Journal*, pp.1233-1235.
- Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L. & Farmer, E. (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* 19, 2470-2483.
- Zamioudis, C. & Pieterse, CMJ. (2012). Modulation of host immunity by beneficial microbes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:139-50.

## ANEXOS

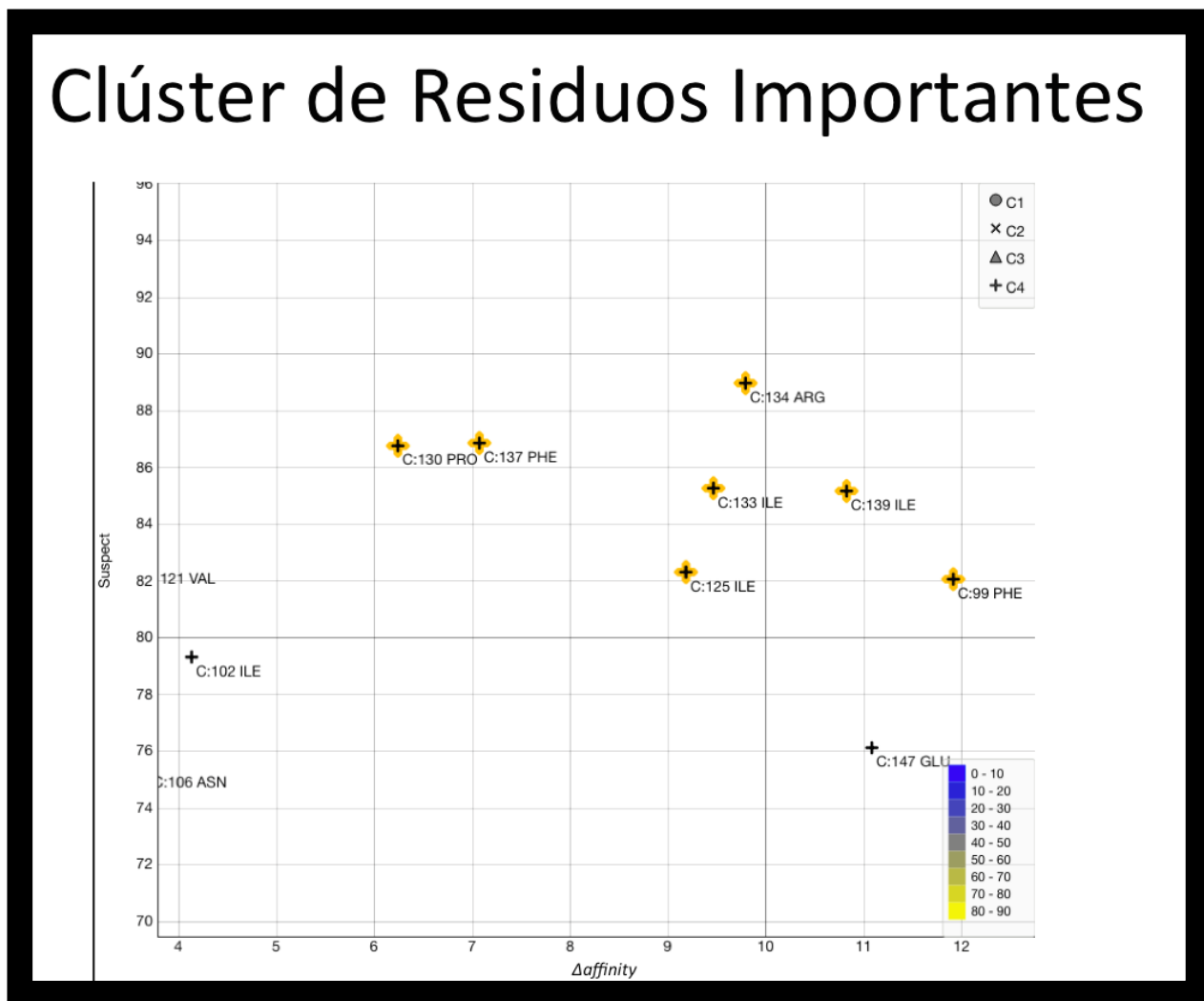


Figura 1. Cluster de residuos importantes abarcando criterios de  $\Delta affinity$  mayor o igual a 4 kcal mol<sup>-1</sup> y 80% o mayor del índice generado por SuSPect.

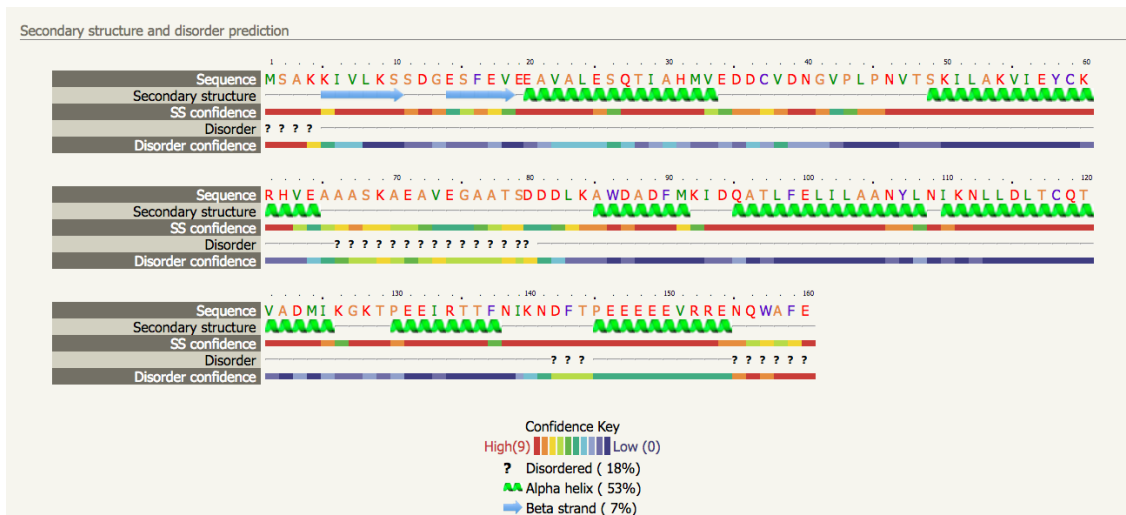
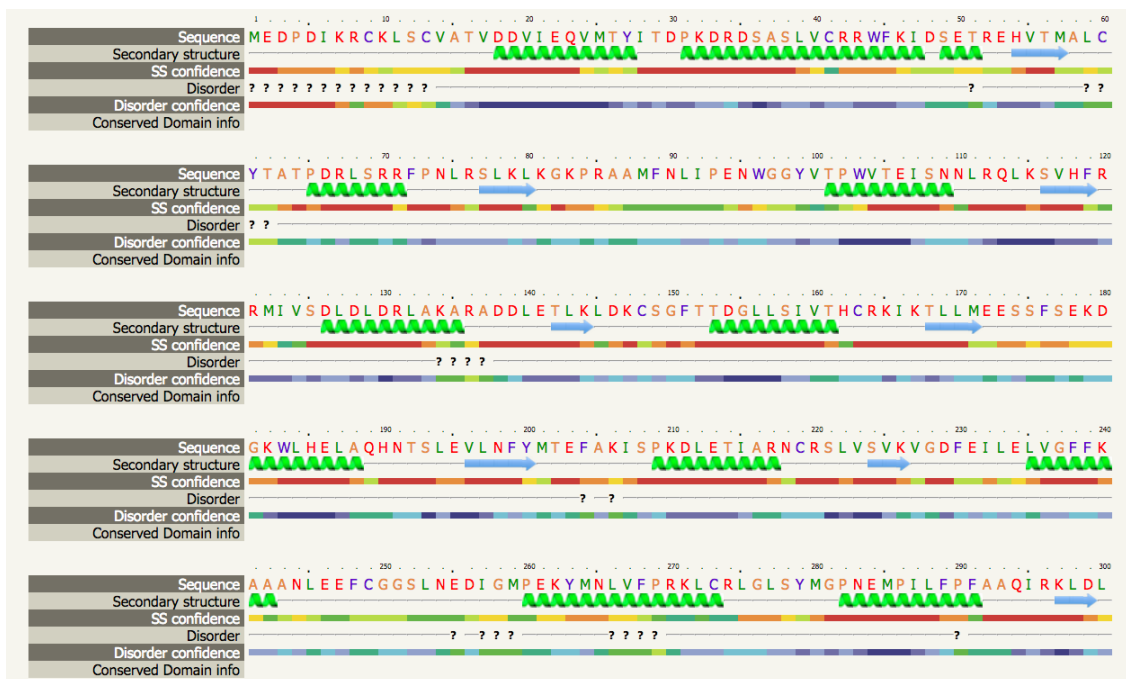


Figura 2. Resultados obtenidos a partir de "Conservation Analysis" de la proteína "SKP1-like protein 1A"



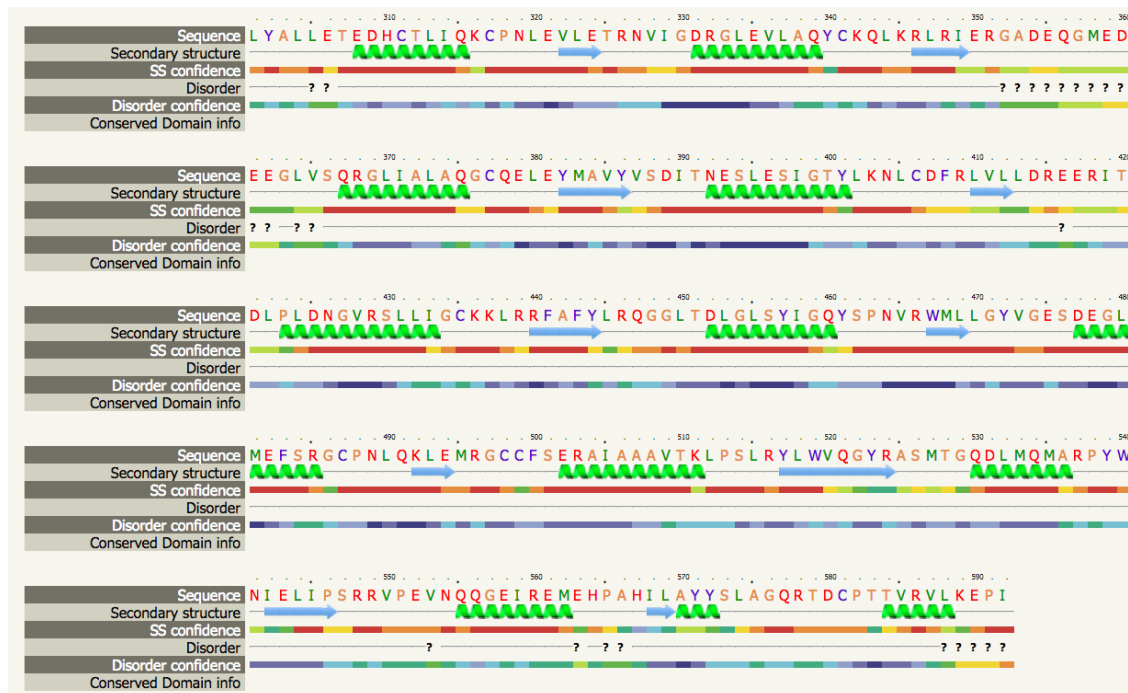


Figura 3. Resultados obtenidos a partir de "Conservation Analysis" de la proteína "Coronatine-insensitive protein 1".

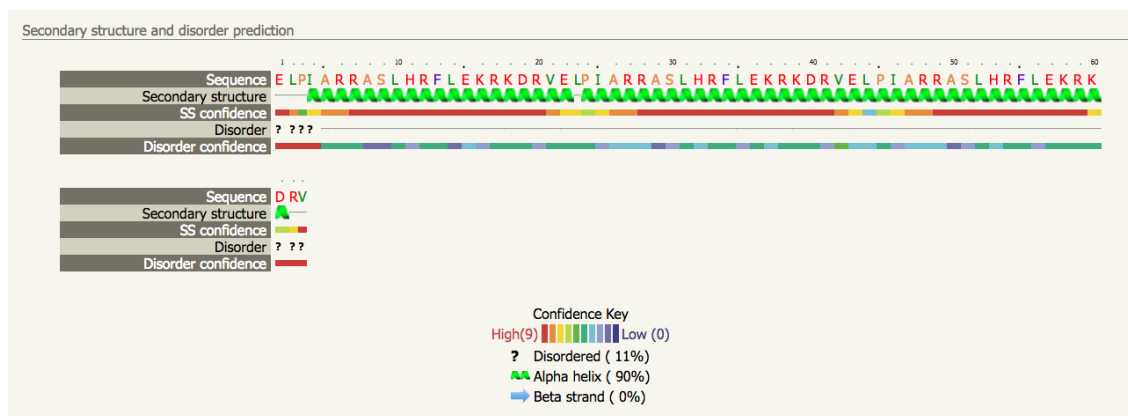


Figura 4. Resultados obtenidos a partir de "Conservation Analysis" de la proteína "JAZ1 incomplete degron peptide"

Tabla 1. Detalle esquemático sobre el número de residuos que posee la proteína "SKP1-like protein 1A" junto con la localización de la secuencia conservada: F-box.

Feature Key	Posición	Longitud	Descripción
Cadena	1-160	160	SKP1-like protein 1A
Motif	102-160	59	F-box

Fuente: (UniProtKB, 2014)

**Tabla 2. Detalle esquemático sobre el número de residuos que posee la proteína "Coronatine-insensitive protein 1" junto con la localización de sus motivos respectivos y unión a los jasmonatos.**

<b>Feature Key</b>	<b>Posición</b>	<b>Longitud</b>	<b>Descripción</b>
Cadena	1-592	592	Coronatine-insensitive protein 1
Motif	16-57	42	F-box
	58-524	467	LRR
Sitio de unión	85	1	Jasmonatos
	348		
	386		
	409		
	496		

*Fuente: (UniProtKB, 2014)*

**Tabla 3. Detalle esquemático sobre el número de residuos que posee la proteína "JAZ1 incomplete degron peptide" junto con su respectivo motivo y sitio de unión a los jamsonatos.**

<b>Feature Key</b>	<b>Posición</b>	<b>Longitud</b>	<b>Descripción</b>
Cadena	1-253	253	Protein TIF1 10A
Motif	205-220	16	Jas (Sheard, L. <i>et al.</i> 2010).
Sitio de unión	204	1	Jasmonatos

*Fuente: (UniProtKB, 2014)*

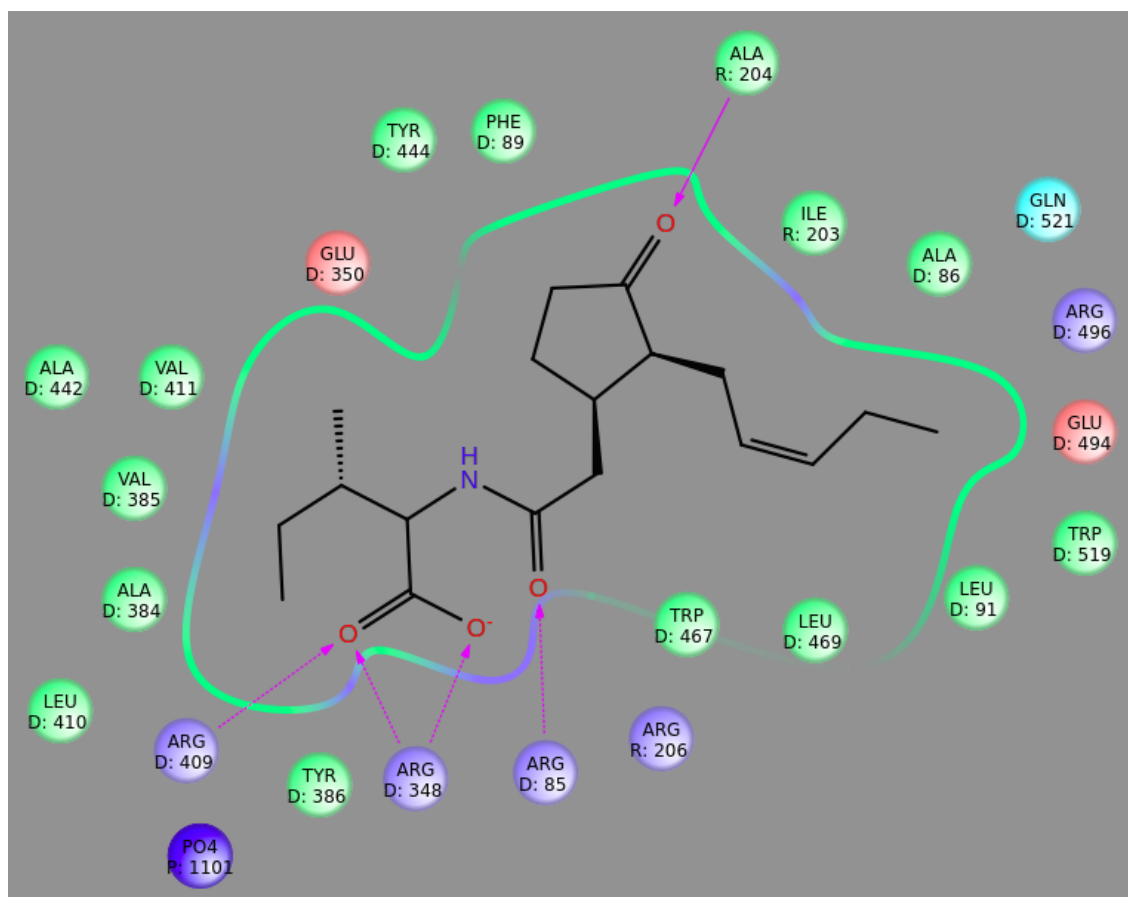
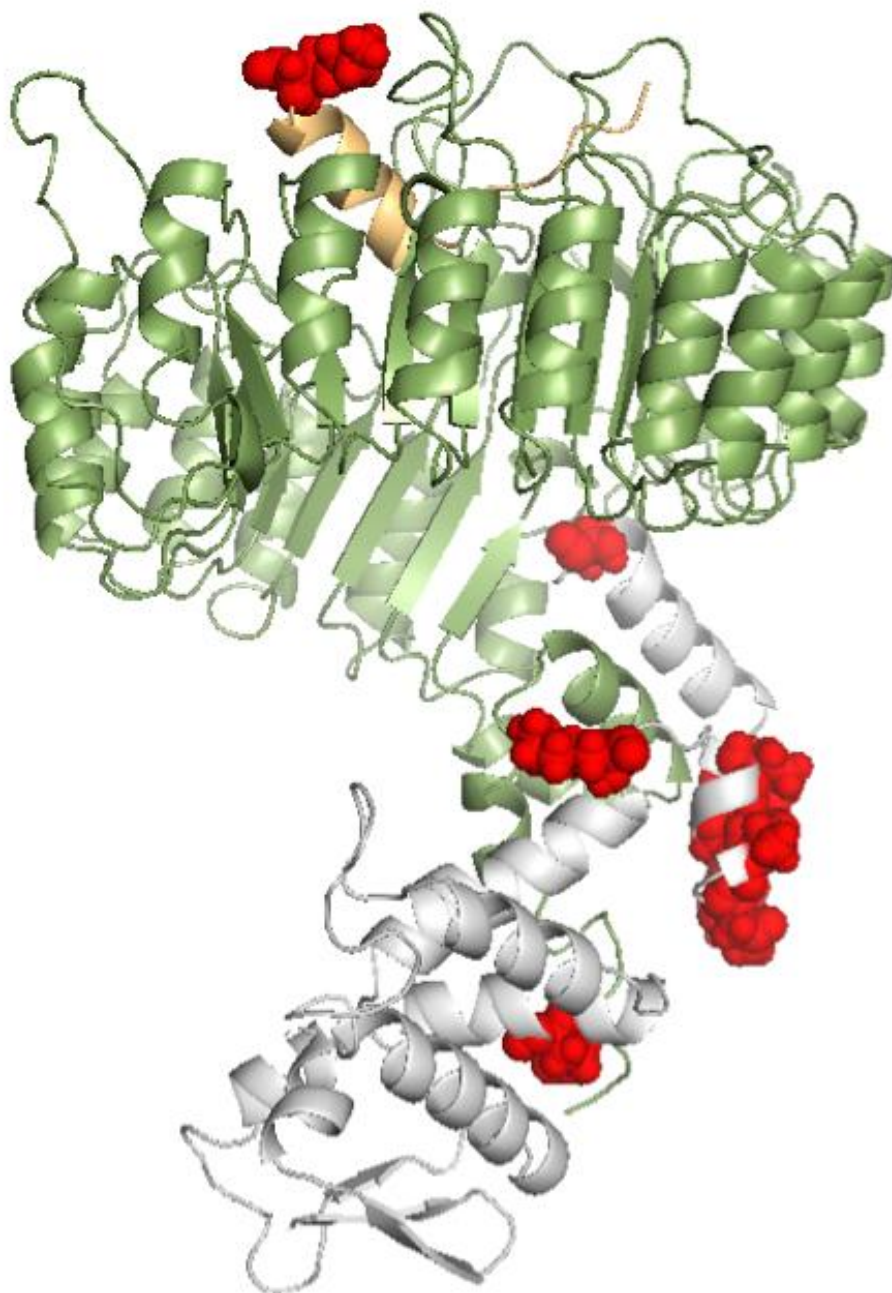


Figura 5. Diagrama de Interacción del Ligando con respecto a los aminoácidos de interacción entre la proteína "Coronatine-insensitive protein 1" y el ácido jasmónico.



**Figura 6.** Blancos específicos identificados en el complejo SCF(COI1), JAZ1 y JA-Ile.