

DISCUSSIÓ DE RESULTATS: CAPÍTOL 2

CONFORMACIÓ ACTIVA DELS BR<sub>s</sub>



## PART I: Obtenció.

### 1. Introducció.

Les propietats físico-químiques d'una molècula estan íntimament relacionades amb la seva estructura. Si la seva estructura és flexible, les propietats també dependran de la seva conformació. En el cas dels estudis de relació estructura-activitat (SAR i/o QSAR) aquesta dependència és molt important, ja que un compost presenta una determinada activitat en la mesura que és capaç d'unir-se al seu receptor biològic. Recordar que aquesta unió es dóna en una conformació preferent que s'anomena "conformació activa". Per tant, l'estudi de l'espai conformacional, la variació de les propietats físico-químiques amb la conformació, i l'elecció de la conformació activa són un dels punts claus en tota aquesta estratègia. A més a més, l'estudi dels BRs és, computacionalment parlant, dels pitjors casos possibles ja que: a) no es coneix l'estructura del receptor, b) no es disposa de cap anàleg agonista o antagonista amb estructura rígida, i c) els BRs són extremadament flexibles. Cal aplicar doncs, mètodes indirectes d'estudi. Recordar que fer-los servir comporta assumir tres hipòtesis: 1) tota la informació està inclosa dins de les molècules d'estudi, 2) totes les molècules, sense excepció, s'uneixen a un únic receptor, i 3) l'acoblament es dóna mitjançant els mateixos punts d'unió. Des d'un punt de vista químic aquests punts d'unió no només són els grups funcionals implicats, sinó també la seva distribució en l'espai 3D.

#### **1.1. Etapes en l'elecció de la conformació activa.**

L'elecció de la conformació activa dels BRs es realitza en dos etapes.

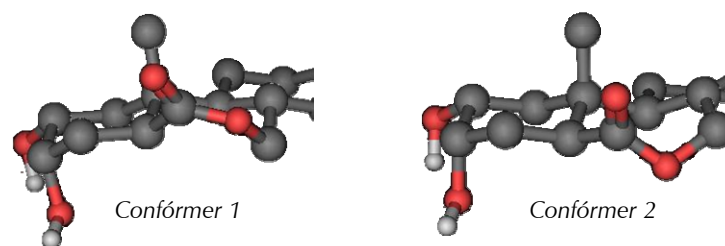
##### 1) Anàlisi conformacional.

Es realitza un estudi en l'espai de coordenades internes, i més concretament en el subespai dels angles de torsió. Es considera que les distàncies i els angles d'enllaç no varien. D'aquesta forma els graus de llibertat queden reduïts al nombre d'angles de torsió.<sup>193,194</sup>

Els brassinoesteroides presenten dos punts estructurals amb flexibilitat conformacional: L'anell B de set membres amb funcionalitat lactona, i la cadena lateral amb fins a sis angles de torsió. Es va demostrar que degut a que aquests dos punts estan suficientment separats en l'espai, es pot considerar que el seu moviment és independent.<sup>87</sup> Això permet estudiar l'anell B i la cadena lateral per separat.

- *Anell B.*

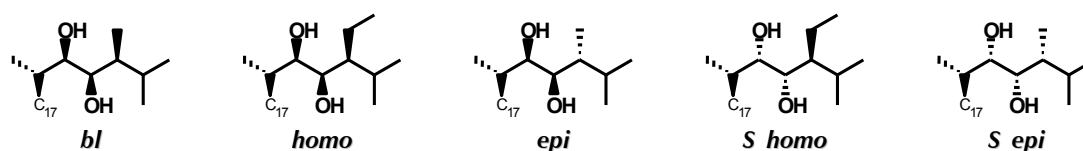
L'anell de set membres lactònic presenta 2 conformacions possibles (*Figura 63*) amb una diferència d'energia entre elles inferior a 5 kcal/mol, sent de menor energia el confórmer 1.<sup>87</sup> Aquest concorda amb la geometria de la 22S,23S-homobrassinolida (S\_hbl) determinada per RX.<sup>195</sup> A més a més, aquesta conformació presenta una major similitud amb la conformació rígida de l'anell B de sis membres amb funcionalitat cetona. Per aquests motius es va triar el confórmer 1 per dur a terme l'anàlisi conformacional de les cadenes laterals.



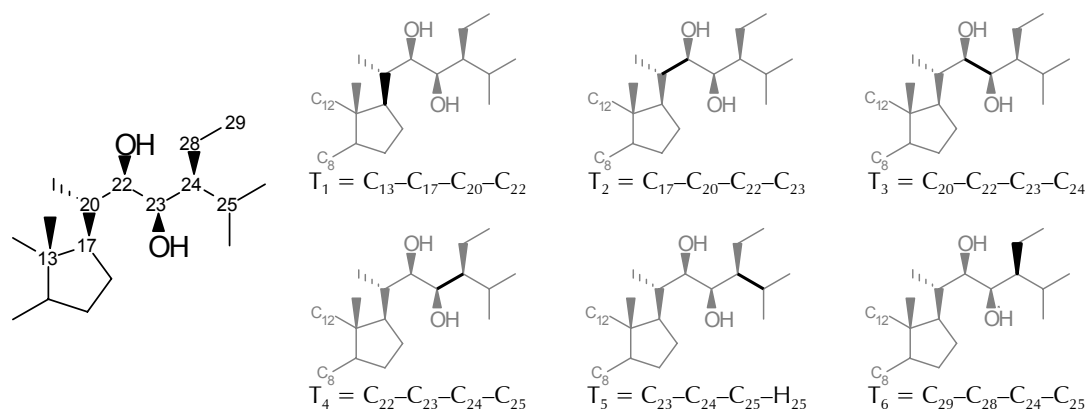
**Figura 63:** Conformacions de l'anell B amb funcionalitat 7-oxolactona.

- *Cadena lateral.*

Malgrat que els BRs presenten força diversitat de cadenes laterals (Figura 8, pàgina 21), en aquest estudi es treballa només amb 5 cadenes laterals tipus (Figura 64). En funció de la cadena hi haurà 5 o 6 angles de torsió. Aquests es defineixen progressivament començant des de l'esquelet esteroide per endinsar-se progressivament en la cadena lateral (Figura 65).



**Figura 64:** Cadenes laterals dels BRs emprades en aquesta tesi.



**Figura 65:** Definició dels angles de torsió de la cadena *homo*.  $T_1 - T_5$  és comú a totes les cadenes laterals tipus i  $T_6$  és exclusiu de les cadenes *homo* i *S\_homo*.

## 2) Selecció de la conformació activa.

Es pot procedir de diverses maneres:

- Mitjançant un conjunt de regles empíriques per veure si els grups funcionals es troben a la distància adequada sense necessitat de fer un anàlisi conformational.
- Realitzar un anàlisi conformational i, de entre tot el conjunt de confòrmers, seleccionar-ne un que serà la conformació activa. Aquesta és l'opció triada en l'estudi del BRs.
- Realitzar un anàlisi conformational alhora que es comparen dos molècules. En aquest cas, l'algorisme optimitza conjuntament l'energia del sistema i un índex de similitud molecular. És necessari disposar prèviament d'una conformació activa de referència, i no és el cas dels BRs.

Remarcar, que aquest pas és crític ja que de la conformació seleccionada dependran els estudis posteriors de relació estructura-activitat.

## 1.2. Conformacions actives dels BRs.

En la present tesi s'ha treballat amb 4 conformacions actives dels BRs. Dos d'elles van ser desenvolupades anteriorment en l'equip,<sup>95,97,106,107</sup> i les dos restants en aquesta tesi.<sup>196</sup> Les 4 conformacions s'identifiquen amb les sigles *SQR*, *IZR*, *MVP* i *HIP* (Figura 66). Les tres primeres es diferencien en l'anàlisi conformacional:

- *SQR*: Anàlisi conformacional sistemàtic en forma d'arbre.
- *IZR*: Anàlisi conformacional aleatori implementat en SYBYL.
- *MVP*: Anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular controlada per un sistema de fusió simulada.

S'han fet servir dos criteris de selecció de la conformació activa:

- *SQR*: Comparació d'índex de similitud basant-se en l'aproximació a l'anàleg actiu.
- *IZR* i *MVP*: Fent servir models de GRID flexible.

La quarta de les conformacions actives (*HIP*) és una revisió de la tercera (*MVP*) motivada per un canvi del software a nivell de centre.



**Figura 66:** Sigles i logotip de les 4 conformacions actives. El logotip conté informació tant de l'anàlisi conformacional com del criteri de selecció de la conformació activa.

A continuació s'explicarà com s'han obtingut cadascuna de les quatre conformacions actives seguint un ordre cronològic.

## 2. Conformació Activa *SQR*.

### 2.1. Anàlisi conformacional.

Les cadenes laterals dels BRs presenten entre 5 i 6 angles de torsió. Això va fer descartar una anàlisi sistemàtica exhaustiva degut al problema de l'explosió combinatoria (augment exponencial del temps de càlcul en funció del nombre de torsions) i es va plantejar una anàlisi sistemàtica en forma d'arbre.<sup>197</sup> Per tal de reduir la possible dependència entre els enllaços es va procedir (Figura 67):<sup>95,97,106,107</sup>

1. Estudi de  $T_1$  mitjançant un gir de l'enllaç amb un pas de  $10^\circ$  i posterior optimització de l'energia. És el que es va denominar *Best*. Es seleccionen els mínims d'energia que estan allunyats més de  $20^\circ$ . Aquest mateix criteri de selecció s'utilitza en els dos passos següents.
2. Estudi de  $T_5$  i en el cas de les cadenes *homo* i *S\_homo*  $T_6$ , mitjançant un gir de l'enllaç amb un pas de  $20^\circ$  i posterior optimització de l'energia.
3. Estudi de  $T_2$ ,  $T_3$  i  $T_4$  mitjançant un gir de l'enllaç amb un pas de  $30^\circ$  sense optimització de l'energia. És el que es va denominar *Scan*.
4. Optimització de la geometria.

Un cop obtinguts tots els confòrmers, es van seleccionar aquells que estan en un marge de 10 kcal/mol respecte el mínim absolut d'energia. El nombre de confòrmers obtinguts per cada cadena lateral tipus es mostren en la Figura 68.

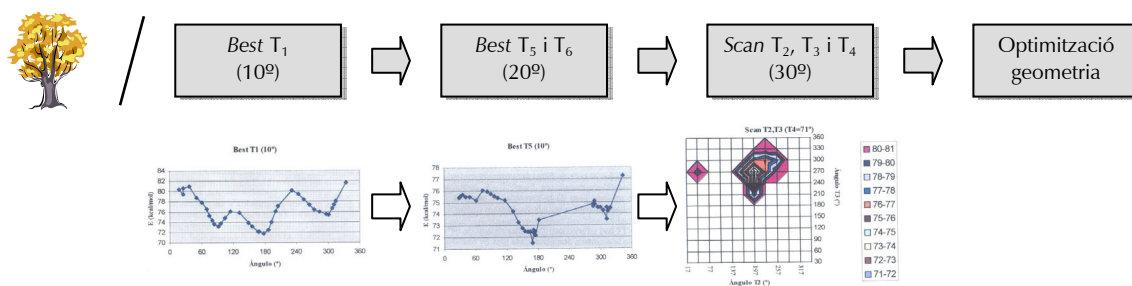


Figura 67: Etapes de l'anàlisi conformacional en forma d'arbre. Exemples dels resultats sobre la brassinolida.

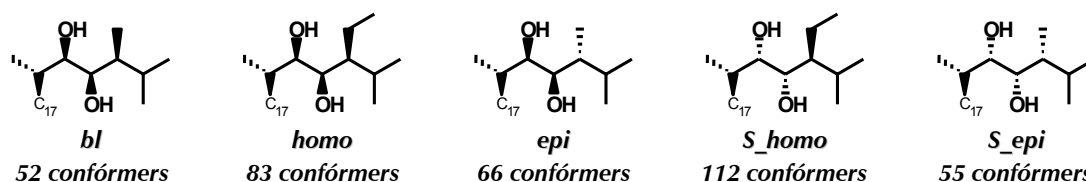


Figura 68: Resultats de l'anàlisi conformacional en forma d'arbre.

## 2.2. Selecció de la conformació activa.

En aquest estudi, es van fer servir tres criteris de similitud. Dos tenien en compte la geometria i el tercer el volum dels compostos.

- **Criteri SQR (SQuares Residue):** Criteri geomètric que compara la distància entre els àtoms d'oxigen, i la distància d'aquests als plans formats per la unió dels anells A i B, l'esquelet esteroide i el pla perpendicular a l'esquelet esteroide (Figura 69). Quan menor és el valor major és la similitud. Per facilitar la interpretació els valors es van escalar entre 0 i 1 de forma que quan major fóra el valor major fos la similitud. Aquest criteri és el que dóna nom a la primera de les conformacions actives.

$$SQR_{AB} = \sum_{k=1}^n (d_{k,A} - d_{k,B})^2$$

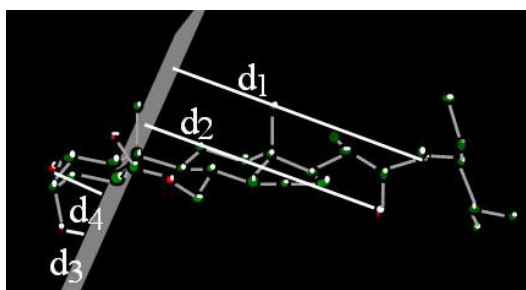
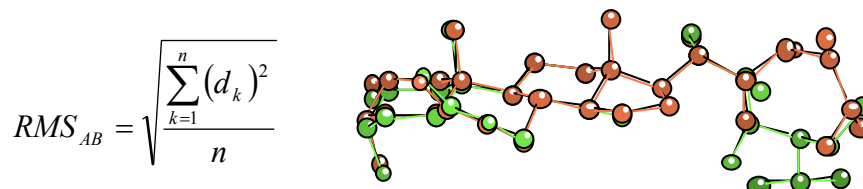


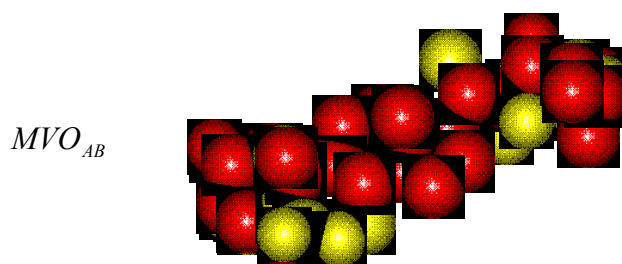
Figura 69: Criteri SQR. Fórmula i exemple de distàncies dels oxígens al pla format per la unió dels anells A i B.

- **Criteri RMS (Root Mean Square):** Criteri geomètric que compara la distància entre els àtoms equivalents de la cadena lateral un cop alineats els compostos per l'anell C (Figura 70). Quan menor és el valor major és la similitud. Els valors també es van escalar entre 0 i 1 de forma que quan major fóra el valor major fos la similitud.



**Figura 70:** Criteri RMS. Fórmula i exemple.

- **Criteri MVO (Molecular Volume Overlay):** Criteri volumètric que compara el volum de superposició molecular de la cadena lateral un cop alineats els compostos per l'anell C (Figura 71). Quan major és el valor major és la similitud. Els valors també es van escalar entre 0 i 1.



**Figura 71:** Criteri MVO.

La metodologia aplicada per seleccionar la conformació activa SQR es basava en l'aproximació a l'anàleg actiu (AAA) i es va realitzar en dos etapes:

1. Selecció de la conformació activa del compost de referència (brassinolida).
2. Selecció de la conformació activa de la resta de compostos per comparació amb la de referència.

#### 1) Conformació activa de la brassinolida.

Per seleccionar la conformació activa de la brassinolida, calia buscar la conformació que fóra comuna a tots els compostos actius. Això es va realitzar mitjançant la comparació dels 52 confòrmers de la brassinolida amb tots els confòrmers dels BRs més actius. En l'estudi es van utilitzar els 6 BRs més actius segons les dades del bioassaig realitzat en l'equip. Tres tenen la cadena tipus *homo* (hbl, hcs i hcs\_cis), dos la cadena tipus *epi* (epibl i epics) i un la cadena tipus *S\_epi* (S\_epibl).

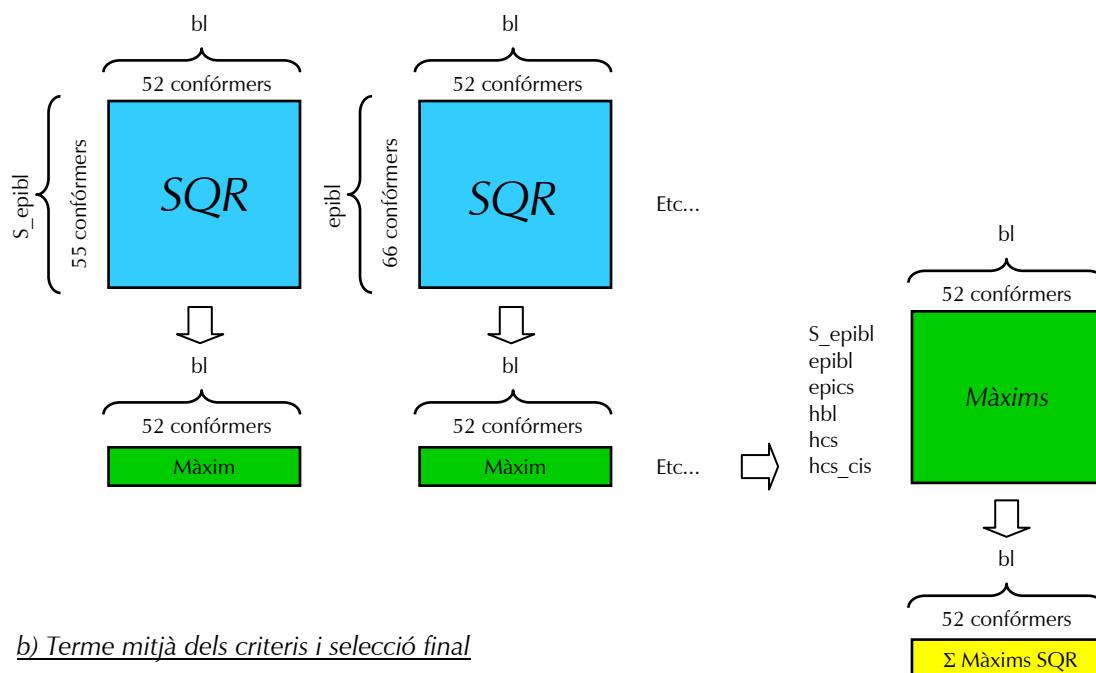
Per cadascun dels tres criteris de similitud convenientment escalats es va seguir el següent protocol (Figura 72):

1. Es van comparar els 52 confòrmers de la bl amb, per exemple, els 55 de la S\_epibl i es va calcular la matriu (55x52) de similitud.
2. Per cada confórmers de la bl, es va seleccionar el valor màxim de similitud donant lloc al vector de màxims (1x52).
3. Es va calcular el vector de màxims per tots els compostos i es van juntar en la matriu de màxims (6x52).
4. Per cada confórmers de la bl es van sumar els 6 valors de la matriu de màxims, donant lloc al vector suma de màxims (1x52).
5. Si hi hagués hagut un únic criteri de similitud, la conformació activa de la bl hauria estat el confórmers que tingués el valor màxim dins del vector suma de màxims.

Com es van fer servir tres criteris de similitud.

6. Per cada confórmers de la bl es va calcular la mitjana aritmètica dels tres criteris i es va seleccionar el confórmers que presenta un valor màxim.

a) Càlcul del “vector de suma de màxims” per cada criteri de similitud



b) Terme mitjà dels criteris i selecció final

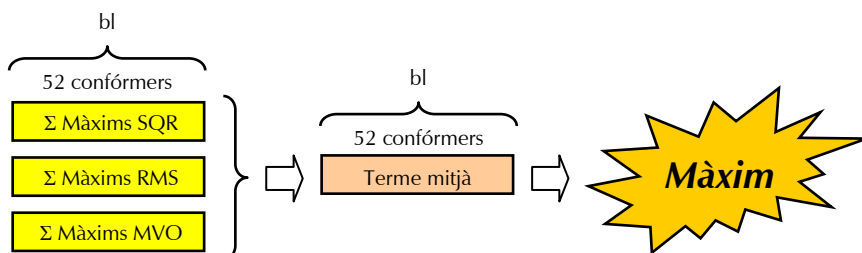


Figura 72: Esquema del procés de selecció de la conformació activa de la brassinolida.

Aquest protocol era i és d'aplicació universal. Els motius són:

- No depèn del nombre de confòrmers dels compostos. Mitjançant la selecció dels valors de similitud màxims es redueix progressivament el nombre de confòrmers fins a obtenir-ne només un, la conformació activa.
- No depèn del nombre de compostos. Afegir o treure compostos només afectarà a la matriu de màxims, però no així al vector suma de suma de màxims, ni a la resta de matrius o vectors.
- No depèn del nombre de criteris de similitud, ja que al final es calcula la mitjana de tots ells. No obstant, mitjançant el vector suma de màxims es pot veure si un criteri és més selectiu que un altre.

Els resultats d'aplicar aquest protocol es mostren en la Figura 73. En els dos criteris geomètrics (SQR i RMS) hi ha moltes conformacions amb índex molt similars i superiors a 0,80 (veure vectors de suma de màxims). Això és degut a que es basen en el càlcul de distàncies i aquestes presenten poca variació entre conformacions. Per tant, aquests criteris són poc eficaços per si sols, ja que no són gaire selectius. Entre tots dos, el criteri SQR és lleugerament més selectiu que el RMS. En canvi el criteri MVO és el més selectiu ja que d'una banda només té en compte la cadena lateral i de l'altre la variació de volum entre conformacions és major que la variació de distàncies.

Tant si es fa servir únicament el criteri MVO com el promig dels tres, s'obté la mateixa conformació activa de la brassinolida (Figura 74).



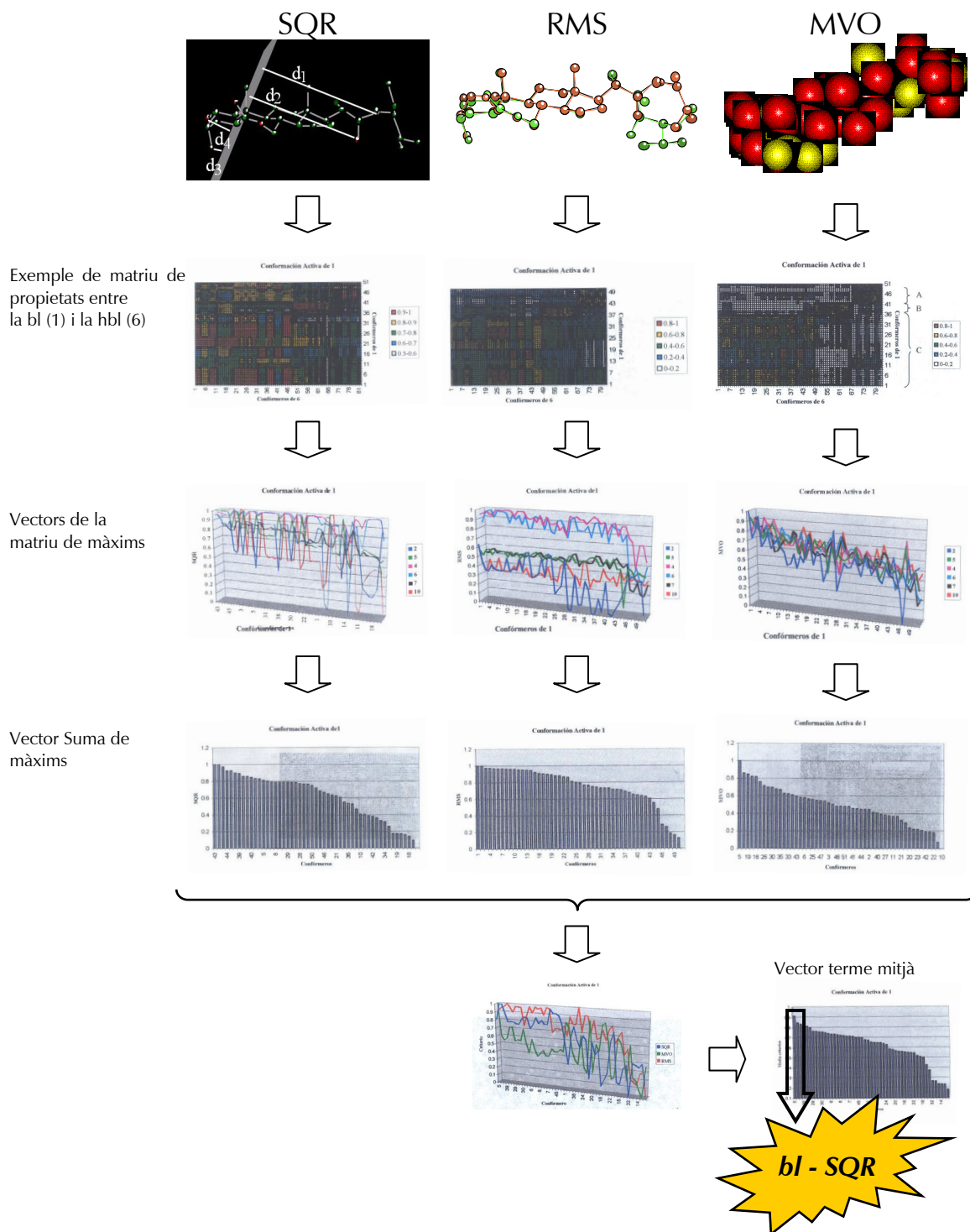


Figura 73: Resultats de la selecció de la conformació activa SQR de la brassinolida.

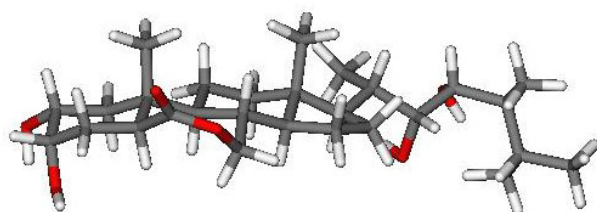


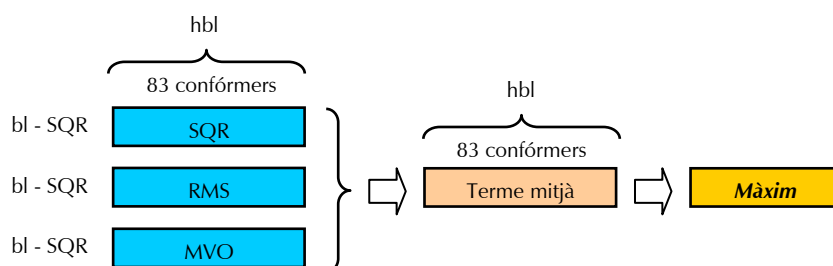
Figura 74: Conformació activa SQR de la brassinolida.

2) Conformació activa de la resta d'anàlegs.

Un cop es va tenir la conformació activa de la brassinolida, ja es disposava d'un punt de referència per poder comparar. Així doncs, per la resta d'anàlegs calia buscar la conformació que fóra més similar a aquesta referència.

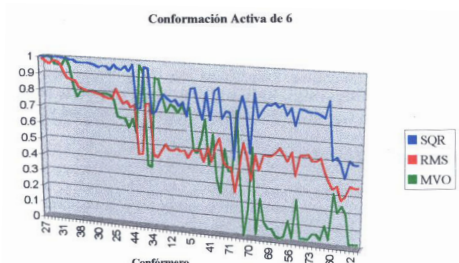
El protocol era una simplificació de l'anterior (Figura 75):

1. Per cada criteri de similitud, es van comparar, per exemple, els 83 confòrmers de la hbl amb la conformació activa SQR de la bl i es va calcular el vector (1x83) de similitud.
2. Per cada confòrmer de la hbl es va calcular la mitjana aritmètica dels tres criteris i es va seleccionar el confòrmer que presentava el valor màxim.



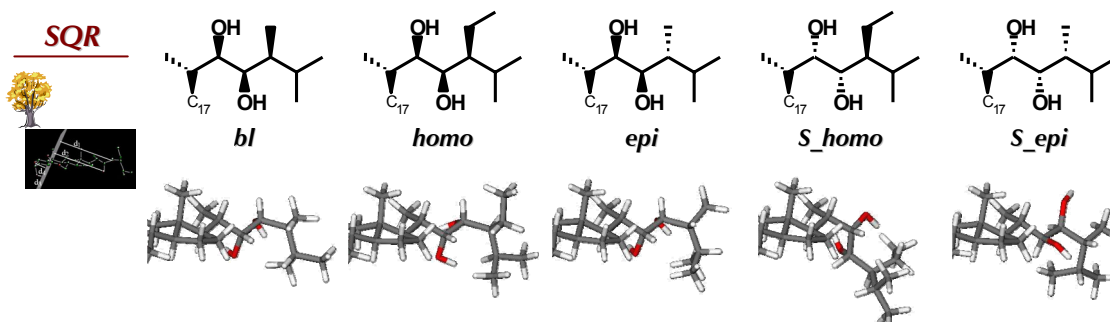
**Figura 75:** Esquema del procés de selecció de la conformació activa de la resta d'anàlegs BRs, prenent com a referència la bl.

A mode d'exemple, en la Figura 76 es mostren els resultats per la homobrassinolida (hbl). S'observa que hi ha moltes conformacions on els tres índex són molt similars i superiors a 0,95 la qual cosa dificulta la selecció ja que no hi ha cap confòrmer que destaquí clarament per sobre dels altres. Finalment, es va seleccionar el que presentava el valor màxim.



**Figura 76:** Resultats de la selecció de la conformació activa SQR de la hbl. Vectors suma de màxims.

Els resultats per cada cadena lateral tipus es mostren en la Figura 77.



**Figura 77:** Conformació activa SQR de cadascuna de les cadenes laterals tipus.

### **3. Conformació Activa IZR.**

#### **3.1. Introducció.**

Amb la conformació activa *SQR* es van realitzar tots els estudis de QSAR Clàssic, MEP–QSAR, CoMFA, SAR i QSAR presentats en la introducció (pàgines 29–35). Com els millors resultats s’havien obtingut mitjançant la metodologia GRID–GOLPE (CoMFA like), i aprofitant que era possible calcular els mapes de GRID considerant la cadena lateral flexible, es va plantejar la possibilitat de fer servir els models obtinguts amb mapes de GRID flexibles per seleccionar la conformació activa dels BRs (pàgina 35). Els avantatges d’aquesta proposta eren:

1. No es basava en l’aproximació a l’anàleg actiu. La conformació activa de les 5 cadenes laterals tipus es determinava simultàniament.
2. No depèn de criteris de similitud. Anteriorment s’havien triat dos criteris geomètrics (*SQR* i *RMS*) i un de volum (*MVO*). Però també podien haver-se agafat altres criteris de similitud que contemplessin factors electrostàtics i/o estèrics. En canvi, amb l’ús de models de GRID flexible no s’introduïa cap regla ni criteri, sinó que era l’activitat la que guiava el procés de selecció.

Aquesta metodologia va ser proposada per Ismael Zamora en la seva tesi. Per això, les seves inicials donen nom a la segona de les conformacions actives.

#### **3.2. Anàlisi conformacional.**

Es va realitzar un anàlisi conformacional aleatori mitjançant el mòdul “Random Search” implementat en SYBYL. Per cada cadena lateral tipus es van fixar  $T_1$  a  $180^\circ$  i es van analitzar  $T_2 - T_6$ , fent servir el camp de forces TriposFF.

#### **3.3. Selecció de la conformació activa.**

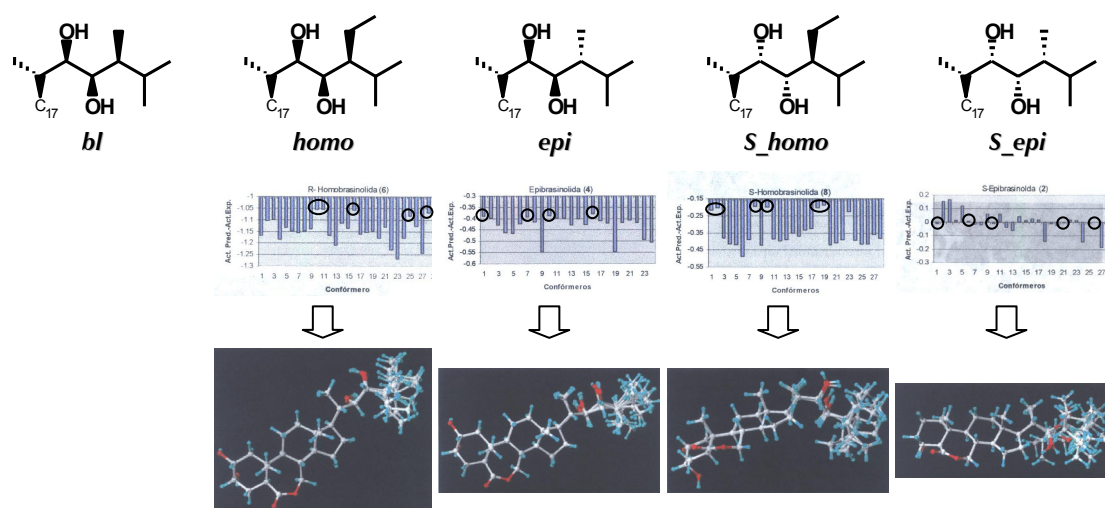
El primer pas és definir els graus de llibertat. Cal triar quins angles de torsions es consideraran rígids i el seu valor, i quins mòbils. Es calculen els mapes de GRID flexibles i es realitza el model amb aquests. Per a que la metodologia sigui aplicable, el model ha de mantenir els criteris de qualitat dels estudis QSAR. Es a dir, ha de ser capaç tant d’explicar com de predir les dades d’activitat en funció de l’estructura, ara flexible, dels BRs.

Paral·lelament, es fa l’anàlisi conformacional de cadascuna de les cadenes laterals tipus. La mobilitat de la cadena lateral queda reflectida en els confòrmers obtinguts. Aquests, s’interpolen en el model i s’obté l’activitat predita per cada confòrmer. Es seleccionen els que millor s’ajustin al valor d’activitat experimental i si presenten característiques estructurals comunes es poden fixar els graus de llibertat.

Aquest és un procés iteratiu que s’acaba quan s’han fixat tots els graus de llibertat. Es a dir, el valor de tots els angles de torsió.

- Iteració 1.

Degut a les experiències prèvies, es va fixar  $T_1$  a  $180^\circ$  i es van definir  $T_2 - T_6$  com a graus de llibertat. Les molècules es van alinear per els anells C i D.\* Com el model no era capaç d'explicar la bl, no es va tenir en compte en aquesta etapa. Es van interpolar els confòrmers, es va representar la diferència entre l'activitat experimental i la predita, i es van visualitzar els que tenien una diferència menor (*Figura 78*). La primera iteració va permetre fixar  $T_2$  i  $T_3$ . Això fixava la posició del diol en C22,C23 en l'espai. El cas de la  $S\_epibl$  era complex, ja que donava dos configuracions per al diol. De les dos es va seleccionar aquella que era més similar a la conformació  $SQR$ . Destacar que, a excepció de la  $S\_epibl$ , l'activitat predita sempre era inferior a l'experimental.

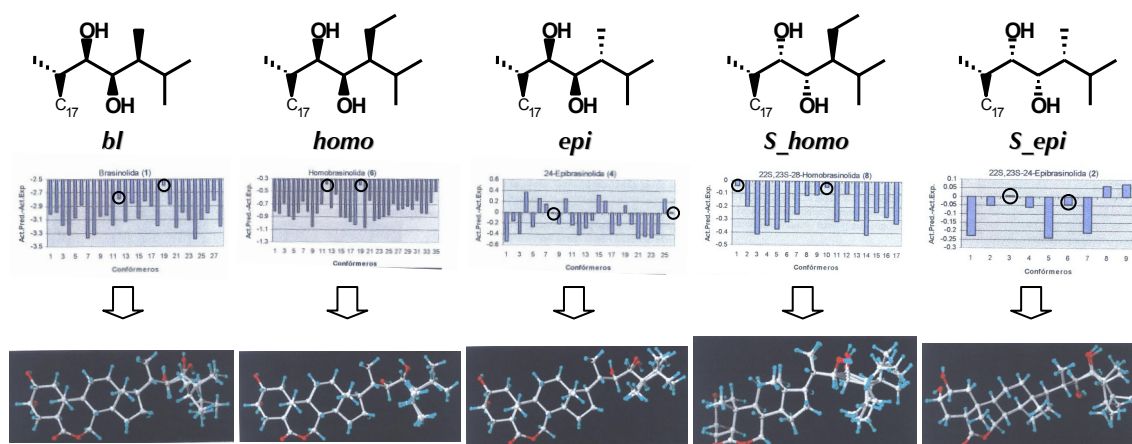


**Figura 78:** Resultats de la primera iteració per l'obtenció de la conformació activa IZR: Gràfics de la diferència entre l'activitat predita i l'activitat experimental en els quals es remarquen els confòrmers seleccionats i visualització d'aquests.

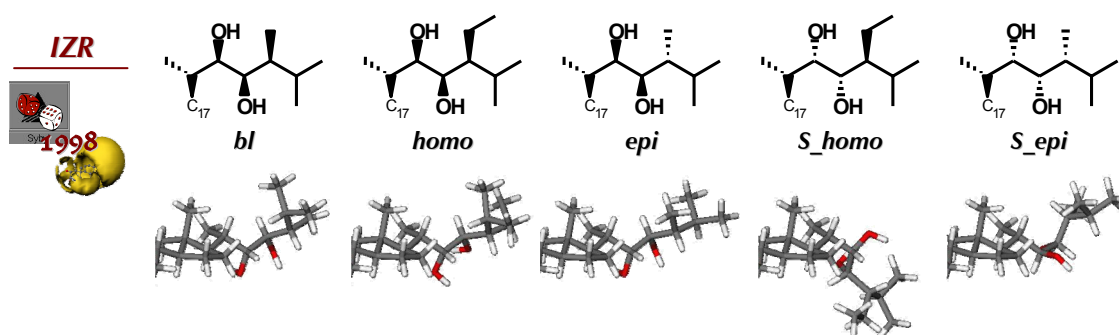
- Iteració 2.

Es van definir com a graus de llibertat  $T_4 - T_6$  i es va procedir de la mateixa manera. En aquesta segona etapa el model va ser capaç d'explicar la bl, i aquesta es va incorporar a l'estudi (*Figura 79*). La segona iteració va permetre fixar la majoria d'angles. Quan es van tenir més de dos confòrmers, es va estudiar la superposició amb la resta de cadenes i es va seleccionar el que presentava una major superposició. Els resultats per cada cadena lateral tipus es mostren en la *Figura 80*.

\* En teoria l'alineament hauria d'haver estat a través dels anells C i D. No obstant, a la pràctica, és un alineament on es té en compte tota la molècula.<sup>198</sup>



**Figura 79:** Resultats de la segona iteració per l'obtenció de la conformació activa IZR: Gràfics de la diferència entre l'activitat predita i l'activitat experimental en els quals es remarquen els confòrmers seleccionats i visualització d'aquests.



**Figura 80:** Conformació activa IZR de cadascuna de les cadenes laterals tipus.

## 4. Conformació Activa MVP.

### 4.1. Introducció.

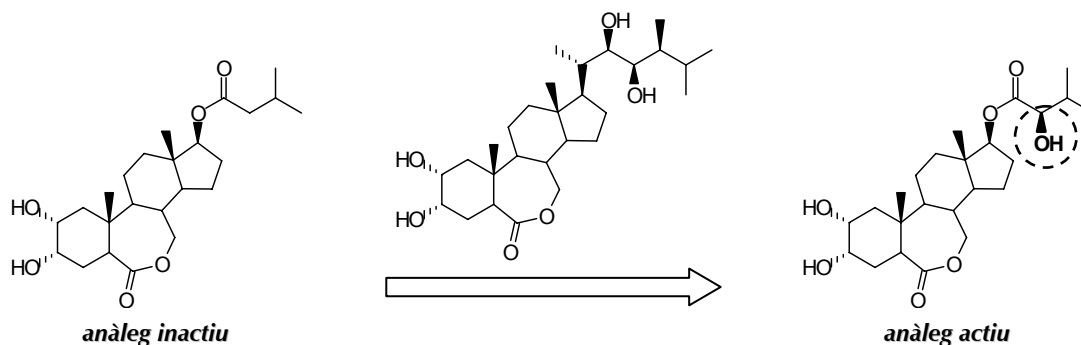
A l'inici de la tesi, es va decidir de treballar només amb la conformació activa IZR per diversos motius:

1. La seva obtenció no es basava en criteris de similitud (criteris objectius), sinó que eren les dades d'activitat les que havien guiat la selecció.
2. Els models QSAR semblaven lleugerament millors.
3. Es comentava que les diferències entre les conformacions SQR i IZR eren mínimes ("resultats convergents").

En el transcurs de la tesi es presenten un conjunt de contradiccions que fan replantejar la bondat d'ambdues conformacions actives. A continuació s'explicaran aquestes contradiccions en ordre cronològic.

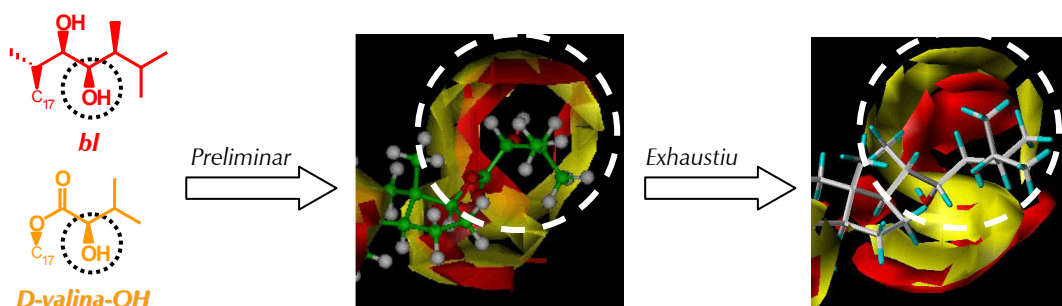
#### 1) Primera contradicció: Estudi dels anàlegs androestànics.

El primer indicatiu que les conformacions actives no són tan iguals com en un principi es suposava, es té en l'estudi dels anàlegs androestànics dels BRs. Recordar que es volia transformar un anàleg inactiu en un anàleg actiu afegint un hidroxil amb la configuració més adient en  $\alpha$  de carbonil (Figura 81).



**Figura 81:** Estratègia per transformar els anàlegs androstànic de inactius a actius.

Els estudis computacionals per avaluar la viabilitat d'aquesta transformació es basaven en l'aproximació a l'anàleg actiu (AAA). Quan més similar fóra l'anàleg androstànic a la brassinolida, més actiu se suposa que podria ser. En l'estudi preliminar, la superposició de mapes de GRID mostra una superposició excel·lent dels dos hidroxils.<sup>178</sup> No obstant, en l'estudi computacional exhaustiu, la superposició ja és més discutible, i en cap cas es qualificable com a excel·lent<sup>179,180</sup> (Figura 82). En un primer moment es va responsabilitzar d'aquesta diferència a l'alineament. En l'estudi preliminar es va fer servir un alineament a través del potencial electrostàtic molecular (Alineament MEP), i en l'exhaustiu a través dels anells C i D (Alineament CD). Amb aquesta conclusió es va continuar treballant i no va ser fins molt més tard que es va veure que la diferència es devia a la conformació activa de la brassinolida (bl). En l'estudi preliminar es va fer servir la conformació activa SQR, i en l'exhaustiu la IZR.



**Figura 82:** Superposició dels mapes de GRID de la bl (vermell) i l'anàleg androstànic (groc).

## 2) Segona contradicció: Interseccions de mapes de GRID.

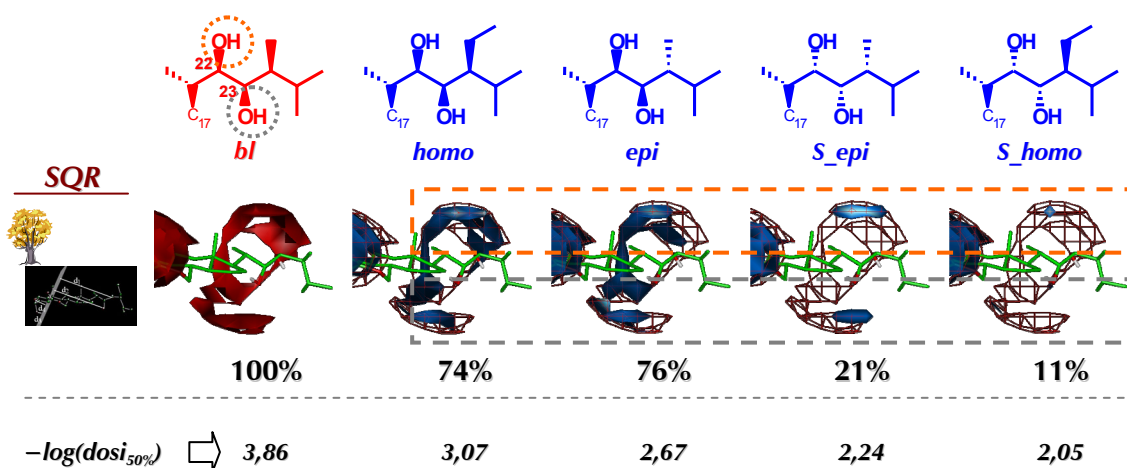
En els estudis de relació estructura-activitat qualitius (SAR) es van superposar els mapes de GRID dels BRs i la brassinolida. Basant-se en l'Aproximació a l'Anàleg Actiu (AAA), quan major sigui la superposició més similar hauria de ser l'activitat. Però segons l'AAA la zona que té més importància en la discussió és la intersecció i no pas la superposició. Aquesta no es pot avaluar ja que en les superposicions dels mapes de GRID només es veu la superfície de cadascun d'ells.

El càlcul de la intersecció de mapes de GRID no és trivial. Com els mapes de GRID es visualitzen a  $-3$  kcal/mol, l'equip va estimar-la a través de la suma dels dos camps i visualitzant el camp resultant a  $-6$  kcal/mol. Aquesta estimació es va fer per l'anell A i per l'anell B (pàgines 31 i 32). No obstant, en la cadena lateral es va ometre i es va representar la superposició (pàgina 33).

Recordar que en la cadena lateral es va observar que a mesura que la superposició en la part alta de l'hidroxil en C23 augmentava també augmentava l'activitat dels BRs. Això va donar lloc a la hipòtesi que l'hidroxil en C23 tenia un paper més important en el desencadenament de l'activitat que no pas l'hidroxil en C22.

En la tesi s'ha pogut calcular tan qualitativa com quantitativament, la intersecció real dels mapes de GRID amb el compost de referència (la brassinolida).\*

La Figura 83 mostra els resultats per a la conformació activa SQR: a) en vermell el contorn del mapa de GRID de la bl (mapa de referència), b) en blau la zona comuna entre els mapes de GRID, c) el grau d'intersecció i d) el valor d'activitat. Certament, observant la superposició corresponent a la part superior de l'hidroxil en C23 de la bl es pot concloure que a mesura que la intersecció disminueix, també disminueix l'activitat dels compostos. Altrament, la mateixa afirmació es pot fer observant la intersecció corresponent a la part inferior de l'hidroxil en C22: A mesura que la intersecció disminueix, també disminueix l'activitat dels compostos. Això deixa sense efecte la hipòtesi inicial que l'hidroxil en C23 té un paper més important en el desencadenament de l'activitat que no pas l'hidroxil en C22. Arribat a aquest punt, es pot caure en la temptació de replantejar la hipòtesi i assegurar que a mesura que la intersecció en els extrems del diol en C22,C23 disminueix, també disminueix l'activitat dels compostos. No obstant, les següents conformacions actives s'encarregaran de deixar sense efecte aquesta afirmació.

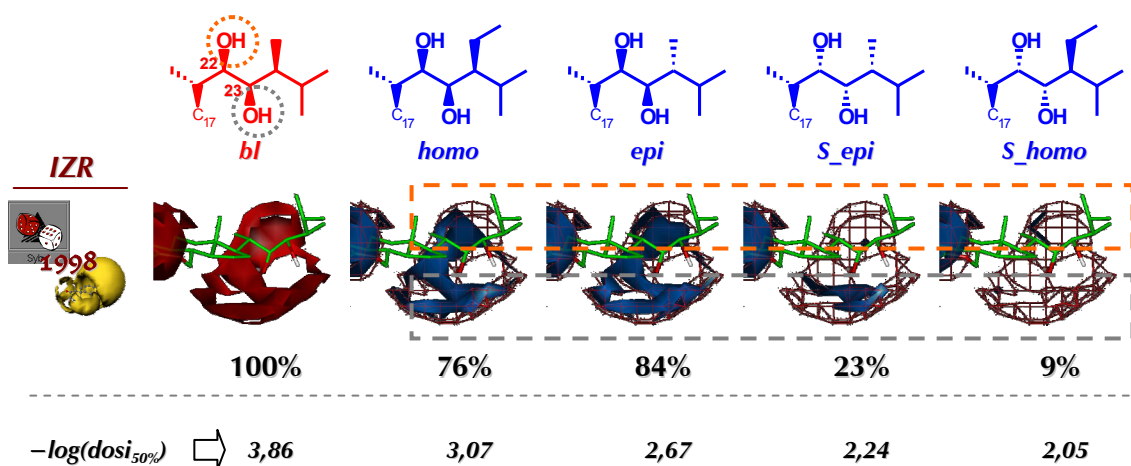


**Figura 83:** Intersecció de mapes de GRID entre les cadenes laterals tipus i la brassinolida en la conformació activa SQR. En taronja es remarca l'hidroxil en C23 i en gris l'hidroxil en C22.

Des del punt de vista quantitatiu tampoc s'observa relació entre l'activitat i el percentatge d'intersecció. Les principals divergències són: 1) la cadena tipus *epi* presenta un grau d'intersecció major que la *homo*, en canvi és menys activa, i 2) el grau d'intersecció de les cadenes tipus *S\_epi* i *S\_homo* cau dràsticament, però no passa el mateix amb l'activitat.

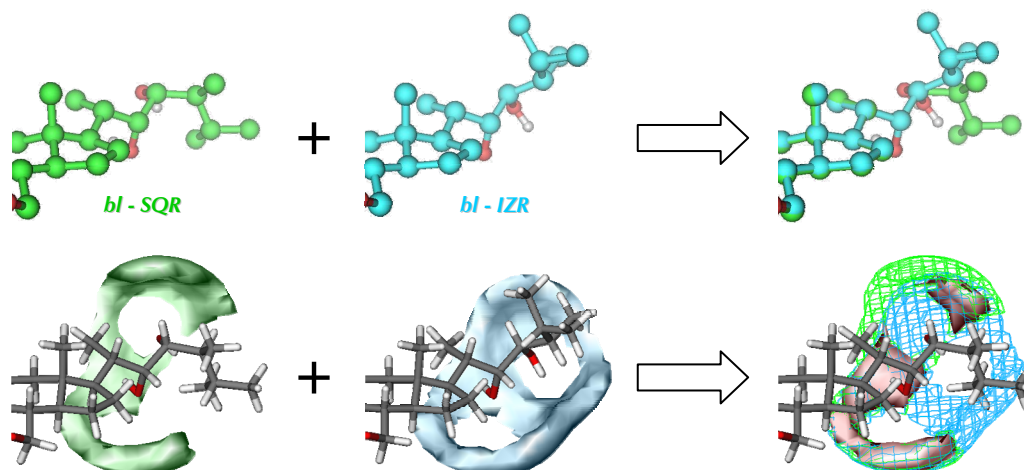
Amb la conformació activa IZR, s'arriben a les mateixes conclusions que amb la SQR (Figura 84).

\* El càlcul de la intersecció real s'explica en la part experimental (pàgina 236)



**Figura 84:** Intersecció de mapes de GRID entre les cadenes laterals tipus i la brassinolida en la conformació activa IZR. En taronja es remarca l'hidroxi en C23 i en gris l'hidroxi en C22.

Comparant les dos conformacions actives (SQR i IZR), cal destacar que tan el mapa de GRID de referència (mapa de la brassinolida, en vermell) com les interseccions de cada cadena lateral tipus (en blau) presenten lleugeres variacions (Figura 83 respecte Figura 84). En la Figura 85 es comparen les dos conformacions actives de la brassinolida. Es representa cada cadena lateral per separat i superposada, així com els seus el mapes de GRID\* per separat, superposats i amb la intersecció.



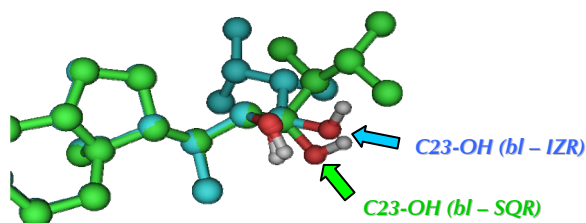
**Figura 85:** Superposició de les conformacions actives SQR (en verd) i IZR (en cian) de la brassinolida i intersecció dels camps de GRID (en vermell).

El mapa de GRID de la conformació SQR descriu com una “E”, mentre que el de la IZR descriu un “8”. La forma de “E” de la conformació SQR és, de fet, un “8” incomplet degut a que l'extrem final de la cadena lateral ocupa part de la zona d'interacció del diol. En canvi, aquest impediment no es dona en la conformació IZR i es descriu el “8” complet. Quan es superposen els dos mapes de GRID, el grau d'intersecció és només d'un 53%. El solapament es quasi complet en l'hidroxi de C22, on coincideixen en la totalitat de la part inferior de la “E” de la conformació SQR. En canvi en l'hidroxi de C23 la intersecció és incompleta ja que només coincideixen en la part intermèdia del diol, comuna amb C22, i en una petita regió en la part més allunyada al diol.

\* En una segona etapa es va augmentar la resolució dels mapes de GRID per avaluar millor els mapes de la intersecció.



La diferència en el mapa de GRID de l'hidroxil en C23 es deu a que els dos hidroxils estan separats entre si formant un angle de  $39^\circ$  (Figura 86). Aquesta diferència, que en un principi es va considerar escassa des del punt de vista estructural ("resultats convergents"), adquireix rellevància quan es calculen els mapes de GRID. Aquests descriuen els hidroxils a través de la seva interacció amb la sonda d'aigua (molècula d'aigua) la qual es dona a certa distància, i es ben conegut que per més petit que sigui l'angle, la longitud de l'arc és major a mesura que s'allunya del vèrtex.



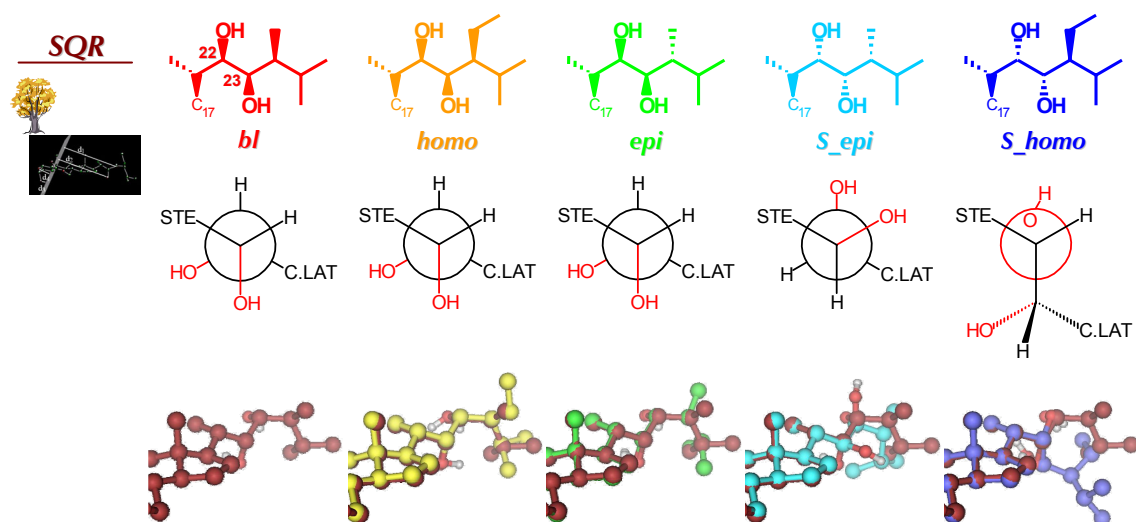
**Figura 86:** Detall dels hidroxils en C23 de les conformacions actives SQR (en verd) i IZR (en cian) de la brassinolida.

### 3) Tercera contradicció: Hidroxils dels 22R,23R-BRs.

A continuació es mostra per cada cadena lateral tipus, la projecció de Newman de l'enllaç C22–C23 i la superposició amb la cadena lateral de la brassinolida (Figura 87 per la conformació activa SQR, i Figura 88 per la IZR). La projecció de Newman és especialment important ja que aportarà molta informació 3D rellevant. Per interpretar-la cal tenir en compte que les molècules estan alineades per l'esquelet esteroide i que a excepció de la cadena *S\_homo*, totes les cadenes laterals tipus tenen el mateix valor de  $T_1$  i  $T_2$ . Com en la definició de  $T_2$  intervenen C22 i C23, aquests àtoms estan alineats en l'espai. Així doncs, les observacions de l'enllaç C22–C23 que es facin sobre l'espai 2D de les projeccions de Newman són traslladables directament a l'espai 3D. Pel que fa a la notació, l'esquelet esteroide més C20 i C21 es representa com STE i l'extrem final de la cadena lateral (a partir de C24) es representa com C.LAT. Per facilitar la interpretació, es representa C22 davant amb STE a dalt i a l'esquerra, C23 darrera amb la posició dels àtoms d'acord amb el valor de  $T_3$ .

Per la conformació activa SQR s'observa (Figura 87):

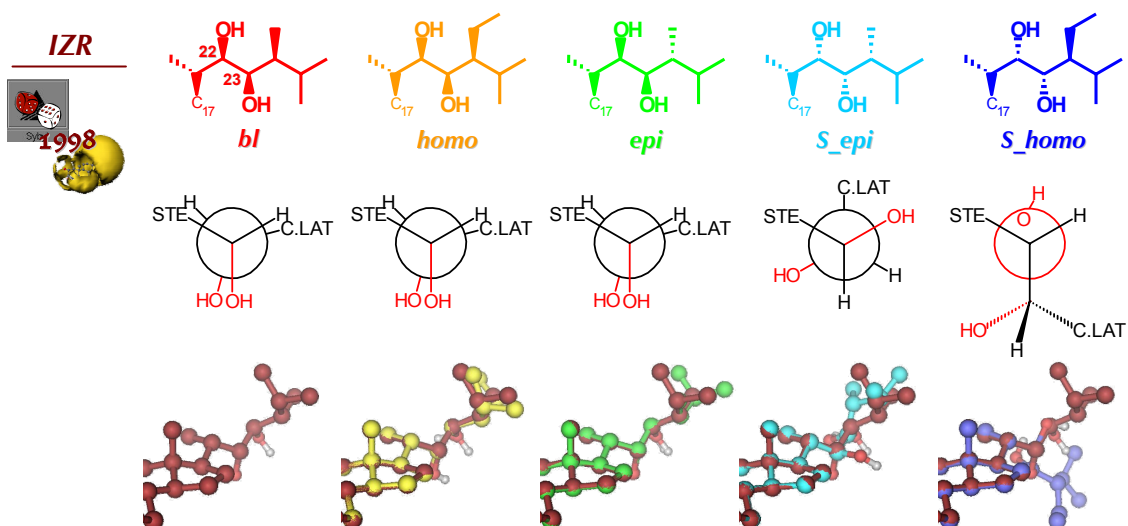
- Pel que fa als 22R,23R-BRs (cadenes tipus *bl*, *homo* i *epi*), els àtoms es troben en una posició alternada amb el diol en posició *cis*, i STE i C.LAT en posició *trans*.
- Per la cadena tipus *S\_epi*, els àtoms també es troben en una posició alternada amb el diol en posició *cis*, i STE i C.LAT en *trans*. No obstant, el diol 22S,23S està orientat cap a el pla oposat respecte al dels 22R,23R-BRs i no coincideixen.
- Per la cadena tipus *S\_homo*,  $T_2$  és diferent a la resta i això fa que l'hidroxil en C22 es situï sobre el carboni C23 de la *bl* i la cadena lateral es situï, ja a partir de C23, cap a la cara  $\alpha$ .



**Figura 87:** Projectió de Newman de l'enllaç C22–C23 i superposició de les cadenes laterals amb la brassinolida, per a les conformacions actives SQR.

Per la conformació activa IZR s'observa (Figura 88):

- Pel que fa als 22R,23R-BRs (cadenes tipus *bl*, *homo* i *epi*), els àtoms es troben en una posició quasi eclipsada, amb el diol solapat. Això es deu a que  $T_3$  adopta un valor al voltant dels  $110^\circ$ . L'extrem final de la cadena lateral es trasllada de la cara  $\alpha$  a la cara  $\beta$ .
- Per la cadena tipus *S\_epi*, els àtoms es troben en una posició alternada amb el diol en posició *trans*, i STE i C.LAT en posició *cis*. L'hidroxil en C22 no coincideix amb el de la *bl*. L'hidroxil en C23 tampoc coincideix, però s'aproxima més. El fet que no coincideixi es deu al fet que el diol de la *bl* es troba en una posició eclipsada.
- Per la cadena tipus *S\_homo*, no hi ha gaire diferència amb la conformació SQR. L'hidroxil en C22 es situa sobre el carboni C23 de la *bl* i la cadena lateral es situa, ja a partir de C23, cap a la cara  $\alpha$ .



**Figura 88:** Projectió de Newman de l'enllaç C22-C23 i superposició de les cadenes laterals amb la brassinolida, per a les conformació activa IZR.

Sobta que el diol de les cadenes dels 22R,23R-BRs presentin una conformació eclipsada amb els hidroxils solapats en la conformació IZR. El valor està al voltant de  $110^\circ$ , el qual, des d'un punt de vista teòric, no es troba precisament en un mínim d'energia. Aquest fet complica molt la construcció de nous anàlegs amb el diol 22R,23R. Quan inicialment s'assigna aquest valor d'angle a  $T_3$  i s'optimitza l'energia, s'observa que en alguns casos

concrets,  $T_3$  manté el valor al voltant de  $110^\circ$ , llavors l'hidroxil en C23 s'assembla al de la bl (compost de referència), però en la majoria de casos l'enllaç evoluciona cap a posicions alternades adquirint segons cada cas valors propers a  $60^\circ$  o a  $180^\circ$ , llavors l'hidroxil en C23 no es correspon exactament amb el de la bl (compost de referència). Tot plegat fa pensar que el valor de  $T_3$  al voltant de  $110^\circ$  correspon o bé a un punt d'encavalcament, o bé a un mínim local que es dona en condicions molt concretes.

El fet que  $T_3$  passi d'estar al voltant de  $60^\circ$  a la conformació activa SQR a estar al voltant de  $110^\circ$  a la conformació activa IZR, provoca que la cadena lateral passi d'estar de la cara  $\alpha$  en la conformació SQR a la cara  $\beta$  en la conformació IZR.

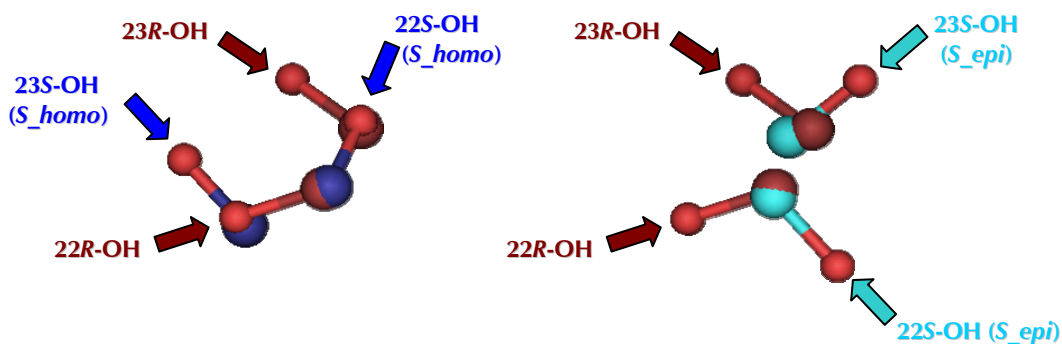
#### 4) Quarta contradicció: Cas dels 22S,23S-BRs.

L'ús de mètodes indirectes obliga a fer la suposició que el reconeixement molecular entre els BRs i el seu receptor, és específic. Per a que això sigui possible, ha d'haver complementarietat geomètrica i complementarietat electrostàtica entre els BRs i el seu receptor. A priori, ni l'una ni l'altre estan garantides per estereoisòmers.

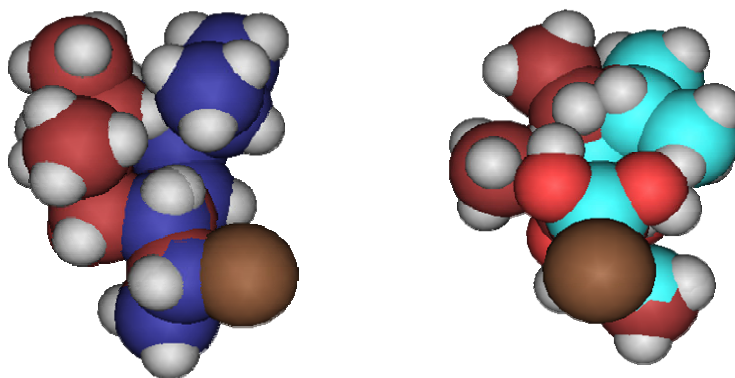
Els 22R,23R-BRs són naturals i es suposa que la complementarietat amb el receptor està garantida. Els 22S,23S-BRs no són naturals, però també són actius. Respecte els naturals són diastereoisòmers i en conseqüència el receptor no tindria perquè reconèixer-los com un substrat vàlid ja que la complementarietat no està, a priori, garantida. Però els reconeix ja que són actius. Per tant, cal veure si tridimensionalment hi ha quelcom que pugui explicar la complementarietat entre els 22S,23S-BRs i el receptor. Com s'estan utilitzant mètodes indirectes, es pren com a referència l'estructura dels 22R,23R-BRs.

A les projeccions de Newman de (Figura 87) s'observa com els hidroxils de cadena dels 22S,23S-BRs no coincideixen en l'espai amb els hidroxils de cadena dels 22R,23R-BRs. A la Figura 89 es mostra, exclusivament, la superposició dels hidroxils dels 22S,23S-BRs amb els de la brassinólida per a la conformació activa SQR. S'observa com la orientació 3D dels hidroxils dels 22S,23S-BRs (cadena tipus  $S_{homo}$  i  $S_{epi}$ ) no coincideix amb la dels hidroxils dels 22R,23R-BRs. Això concorda amb el fet que les interseccions dels mapes de GRID dels 22S,23S-BRs es donessin en baixa proporció i en zones molt puntuals (Figura 83). Aquesta manca de coincidència fa que no hi hagi una regió comuna a tots dos diastereoisòmers que explicaria la complementarietat electrostàtica. A més a més, la complementarietat geomètrica tampoc queda explicada ja que la coincidència en l'extrem final de les cadenes laterals dels diastereoisòmers també és baixa (Figura 90).

Segons aquests resultats el receptor no hauria de ser capaç de poder reconèixer les conformacions actives SQR dels 22S,23S-BRs com un substrat vàlid.

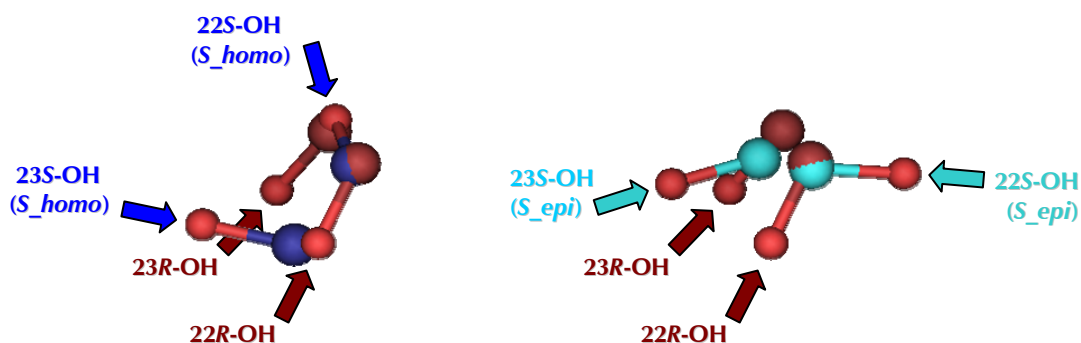


**Figura 89:** Superposició dels hidroxils C22 i C23 de la cadena tipus  $S_{homo}$  (en blau) i  $S_{epi}$  (en cian) respecte la bl (en granat) per a les conformacions actives SQR.

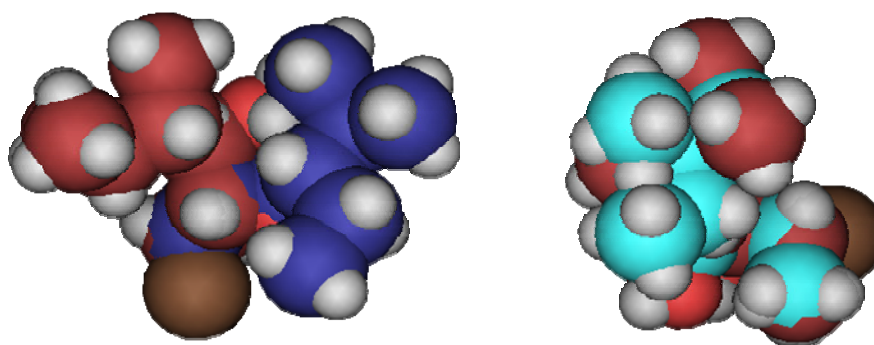


**Figura 90:** Superposició de les cadenes laterals tipus  $S_{\text{homo}}$  (en blau) i  $S_{\text{epi}}$  (en cian) amb la bl (en granat) per a les conformacions actives SQR. S'ha suprimit l'esquelet esteroide perquè interfereix en el camp de visió i el carboni C17 es marca en marró.

Per la conformació activa IZR passa quelcom similar. La orientació 3D dels hidroxils dels 22S,23S-BRs (cadenes tipus  $S_{\text{homo}}$  i  $S_{\text{epi}}$ ) tampoc coincideix amb la dels hidroxils dels 22R,23R-BRs (Figura 91), i tot i que la coincidència en l'extrem final de les cadenes laterals és acceptable per les cadenes laterals tipus  $S_{\text{epi}}$ , és nul·la per a les cadenes laterals tipus  $S_{\text{homo}}$  (Figura 92). Per tant, el receptor tampoc no hauria de ser capaç de poder reconèixer les conformacions actives IZR dels 22S,23S-BRs com un substrat vàlid.



**Figura 91:** Superposició dels hidroxils C22 i C23 de la cadena tipus  $S_{\text{homo}}$  (en blau) i  $S_{\text{epi}}$  (en cian) respecte la bl (en granat) per a les conformacions actives IZR.



**Figura 92:** Superposició de les cadenes laterals tipus  $S_{\text{homo}}$  (en blau) i  $S_{\text{epi}}$  (en cian) amb la bl (en granat) per a les conformacions actives IZR. S'ha suprimit l'esquelet esteroide perquè interfereix en el camp de visió i el carboni C17 es marca en marró.