

Resumint, es tenen dos conformacions actives (SQR i IZR) les quals no són tan similars com en un principi es suposava. Per als 22R,23R-BRs, l'hidroxil en T<sub>3</sub> varia uns 40° d'una conformació activa a l'altre el que provoca que els mapes de GRID de la brassinolida siguin bastant diferents i que l'extrem final de la cadena lateral estigui orientada o bé cap a la cara  $\alpha$ , o bé cap a la cara  $\beta$ . En els estudis on s'utilitza l'aproximació a l'anàleg actiu aquest fet és crític ja que l'estructura tridimensional de la brassinolida (compost de referència) és diferent segons s'utilitzi una conformació activa o l'altre, i per tant els resultats dels estudis no tenen perquè coincidir. A més a més, cap de les dos conformacions actives explica ni la complementarietat geomètrica ni la complementarietat electrostàtica dels 22S,23S-BRs amb el receptor, les quals són necessàries per al seu reconeixement molecular.

Per tot plegat, es planteja fer una revisió de la conformació activa. Per a l'anàlisi conformacional dels BRs es tria la dinàmica molecular gestionada a través d'un procés de fusió simulada (simulated annealing), la qual ha ja estat utilitzada pels anàlegs androstànics. La selecció de la conformació activa es realitza mitjançant els models obtinguts amb els mapes de GRID flexibles. Aquesta revisió dóna lloc a la tercera de les conformacions actives i porta per nom les meves inicials.

#### **4.2. Anàlisi conformacional.**

Es realitza un anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular gestionada a través d'un procés de fusió simulada (simulated annealing). Recordar que la molècula d'estudi es porta de temperatura ambient (298K) a elevada temperatura (900K), es deixa evolucionar durant un cert temps, es refreda lentament fins a temperatura ambient (298K) i finalment s'optimitza l'energia. En el cas dels BRs, aquest procés es repeteix 2.500 vegades per a les cadenes tipus *bl*, *epi* i *S\_epi* i 3.000 per a les *homo* i *S\_homo*.

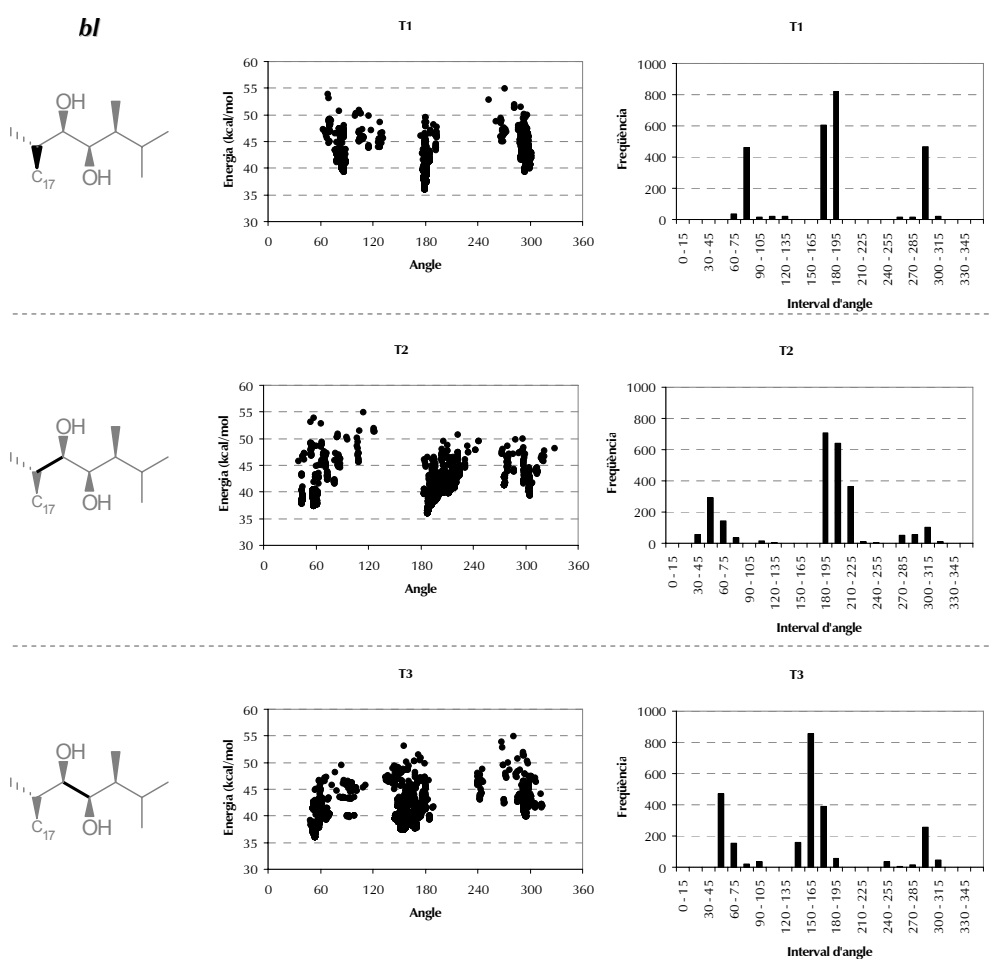
La selecció dels confòrmers d'interès es realitza de forma anàloga a la dels anàlegs androstànics. Es comparen els valors dels angles de torsió i es considera que dos valors són iguals si difereixen en més/menys un angle determinat ( $\pm 15^\circ$  per T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> i T<sub>3</sub>,  $\pm 30^\circ$  per T<sub>4</sub>, i  $\pm 45^\circ$  per T<sub>5</sub> i T<sub>6</sub>). Si dos confòrmers tenen tots els angles de torsió similars, dins dels marges establerts, es consideren confòrmers equivalents i es selecciona el de menor energia. Per tal de suprimir els confòrmers d'elevada energia s'aplica un tall d'energia de 5 kcal/mol.

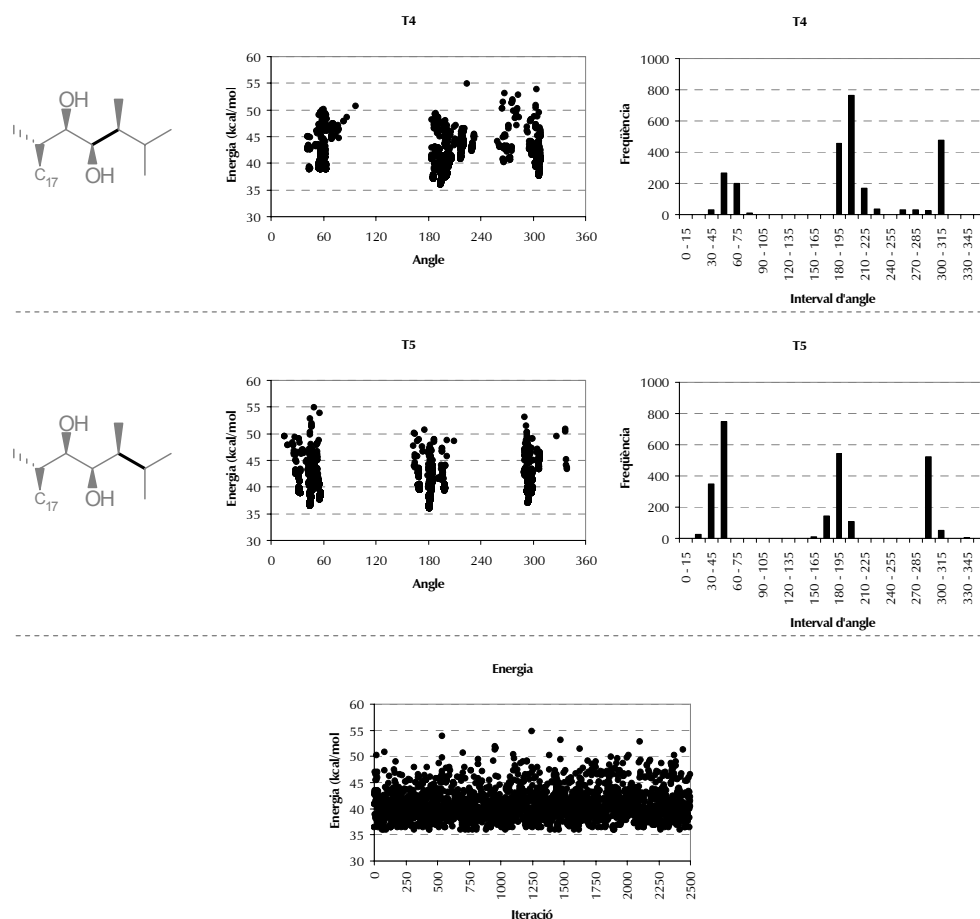
A mode d'exemple es mostren els resultats de la brassinolida. En la *Figura 93* es mostren els gràfics corresponents a la simulació. El gràfic de la distribució dels angles en funció de l'energia permet discutir: a) els valors que té cada angle de torsió, b) el seu valor promig, c) si el valor coincideix amb el teòric o està desplaçat, d) si el valor és únic o depèn dels valors de la resta d'angles de torsió, i e) si el valor correspon a una posició eclipsada, i avaluar la seva energia. El gràfic de freqüències complementa l'anterior indicant quins valors són més importants que altres. El gràfic d'energia és de control i permet veure si la simulació ha transcorregut correctament.

Totes les torsions presenten els valors característics de l'enllaç Csp<sup>3</sup>-Csp<sup>3</sup>. Les observacions més destacables per cada torsió són:

- T<sub>1</sub>: Els valors més freqüents es situen cap a 80°, 180° i 290°. Els valors a 80° i 290° presenten una elevada energia, propera al tall de 5 kcal/mol. El valor de 180° és l'energèticament més estable. Això indica que la cadena lateral té tendència a allunyar-se de l'esquelet esteroide. També s'observen uns conjunts de valors, cap a 60°, 100°, 120°, 130° i 260° que presenten una elevada energia i una baixa freqüència. Alguns suposen una posició quasi eclipsada de T<sub>1</sub>.

- $T_2$ : El valor més estable està al voltant de  $190^\circ$ . Aquest valor presenta una diversitat de considerable, ja que pot adquirir qualsevol valor entre  $190^\circ$  i  $225^\circ$  encara que a mesura que els valors s'allunyen de  $190^\circ$  l'energia augmenta. Cap a  $60^\circ$ ,  $T_2$  pot adoptar els valors de  $50^\circ$  o  $60^\circ$ , aquests presenten una energia moderada i una freqüència relativament baixa. Cap a  $300^\circ$ ,  $T_2$  pot adoptar els valors de  $275^\circ$  o  $300^\circ$ , els quals presenten una elevada energia, propera o superior al tall de 5 kcal/mol. En conseqüència la seva freqüència resulta força baixa.
- $T_3$ : El valor energèticament més estable es situa cap a  $50^\circ$ . No obstant, el valor més freqüent es situa entre  $150^\circ$  i  $180^\circ$  i presenta una energia moderada. Els valors situats cap a  $300^\circ$  presenten una elevada energia. S'observa un conjunt de valors cap a  $90^\circ$  que tenen una energia propera al tall de 5 kcal/mol. També s'observa una conformació eclipsada a  $240^\circ$ , però és d'elevada energia.
- $T_4$ : El valor energèticament més estable està al voltant dels  $190^\circ$ , encara també que pot adquirir valors propers (entre  $185^\circ$  i  $210^\circ$ ). Cap a  $60^\circ$  pot adquirir diversos valors propers entre si ( $45^\circ$ ,  $50^\circ$  i  $65^\circ$ ), en canvi cap a  $300^\circ$  només n'adquireix un ( $305^\circ$ ). S'observa un conjunt de valors cap a  $270^\circ$  que tenen una energia propera al tall de 5 kcal/mol.
- $T_5$ : En ser l'enllaç de l'extrem final de la cadena lateral, és el que es pot moure amb més llibertat. Presenta valors cap a  $50^\circ$ ,  $180^\circ$  i  $295^\circ$ , tots ells amb energies similars. Segons els valors de la resta d'angles de torsió,  $T_5$  pot prendre valors propers als anteriorment esmentats.





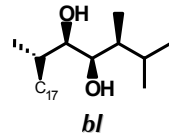
**Figura 93:** Resultats de l'anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular gestionada a través d'un procés de fusió simulada per la bl. Gràfics de distribució dels angles en funció de l'energia, freqüència dels angles, i energia al llarg de la simulació.

En la *Taula 5* es mostra la selecció dels confòrmers d'interès endreçats segons els valors dels angles de torsió. En la taula es presenta: a) la numeració segons els valors dels angles de torsió, b) la numeració segons energies creixents, c) el valor dels angles de torsió, d) la diferència d'energia respecte el confòrmer de mínima energia, e) el nombre de cops que ha aparegut en la simulació, f) el primer cop que apareix en la simulació, i g) si es correspon amb alguna de les quatre conformacions actives.

S'obtenen 44 confòrmers diferents. La freqüència acumulada d'aquests representa un 64% de la simulació (1.555 punts). El 36% restant correspon a confòrmers amb una energia superior a 5 kcal/mol respecte el confòrmer de mínima energia. El confòrmer que triga més a aparèixer ho fa cap al 24% de la simulació (punt 601). Per tant, en el primer quart de la simulació ja s'obtenen els resultats desitjats, mentre que en els altres tres quarts la simulació es repeteix. Es considera, doncs, que la simulació ha estat prou llarga com per explorar tot l'espai conformacional.

D'acord amb els valors que poden adoptar els angles de torsió s'observa:

- Com era d'esperar, la majoria de confòrmers presenten un valor de  $T_1$  al voltant de  $180^\circ$ .
- No hi ha cap confòrmer que, tenint  $T_1$  igual a  $180^\circ$ , presenti un valor de  $T_2$  al voltant de  $300^\circ$ . Aquesta combinació de valors provocaria que la cadena lateral es plegues sobre l'anell D. En funció del valor de  $T_3$  la interacció desfavorable amb l'anell D es donaria a través de la part alifàtica de la cadena lateral (*Figura 94a*), de l'hidroxil en C23, o de l'hidrogen en C23.



Confòrmer segons els angles	Confòrmer segons l'energia	T1	T2	T3	T4	T5	E-Emin (kcal/mol)	Freqüència	Primer punt en la simulació	Conformació activa
1	29	87	201	67	204	48	3,90	41	32	
2	22	87	201	67	203	184	3,40	34	62	
3	36	86	206	156	201	46	4,32	22	2	
4	33	86	206	157	201	182	3,99	51	23	
5	28	85	212	174	307	54	3,85	43	53	
6	11	179	45	58	197	45	2,51	24	279	
7	8	180	44	58	196	182	1,80	24	12	
8	17	180	45	59	189	295	2,97	23	118	
9	19	181	57	153	63	32	3,01	34	83	
10	25	181	57	148	60	169	3,66	22	601	
11	16	181	58	157	56	298	2,92	28	85	
12	7	181	58	156	201	46	1,75	51	81	
13	4	181	58	156	200	182	1,41	53	79	
14	14	181	57	152	189	294	2,89	43	170	
15	6	179	61	169	307	56	1,74	50	249	
16	20	179	62	171	305	199	3,36	18	479	
17	24	178	184	60	59	33	3,57	15	545	
18	34	179	185	59	56	171	4,00	28	93	
19	15	180	191	58	44	299	2,89	12	75	
20	2	180	188	53	196	45	0,50	91	1	
21	1	180	188	54	194	181	0,00	83	59	<i>mvp - bl</i>
22	3	180	189	52	186	294	1,07	61	29	<i>hip - bl</i>
23	35	180	193	60	266	44	4,28	7	128	
24	27	180	197	94	304	50	3,80	11	45	<i>izr - bl</i>
25	12	180	192	150	63	34	2,82	63	86	
26	23	180	192	146	59	170	3,43	45	92	
27	18	180	193	152	55	299	3,00	33	48	<i>sqr - bl</i>
28	9	180	192	152	200	46	1,81	75	7	
29	5	180	192	152	199	182	1,52	86	27	
30	13	180	192	150	189	294	2,83	54	109	
31	10	181	196	164	307	57	2,30	91	38	
32	41	180	193	153	274	182	4,63	7	123	
33	26	181	198	166	306	199	3,74	34	31	
34	44	180	219	293	217	185	4,87	7	73	
35	30	181	211	296	304	52	3,92	27	148	
36	38	296	206	59	195	45	4,47	38	457	
37	32	296	206	59	194	181	3,95	26	312	
38	43	296	206	55	184	294	4,87	10	139	
39	42	296	211	158	201	46	4,74	6	142	
40	37	296	211	158	200	182	4,46	12	595	
41	39	297	216	173	309	55	4,49	24	138	
42	40	300	305	166	206	47	4,61	11	305	
43	31	299	304	167	202	182	3,95	20	9	
44	21	294	305	185	304	48	3,38	17	303	

Taula 5: Resultats de l'anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular gestionada a través d'un procés de fusió simulada per la bl. Taula dels confòrmers d'interès.

- Només hi ha dos confòrmers que, tenint  $T_1$  igual a  $180^\circ$ , presenti un valor de  $T_3$  al voltant de  $300^\circ$ . Aquest valor fa augmentar  $T_2$  fins  $210^\circ$ - $220^\circ$  mentre que el valor habitual és de  $190^\circ$ . Aquesta combinació de valors provoca que l'extrem de la cadena lateral s'acosti al metil C21. En funció del valor de  $T_4$  la interacció desfavorable amb el metil C21 es donaria a través la resta metil en C28 (Figura 94b), de l'hidrogen en C24, o la resta isopropil de l'extrem de la cadena lateral.

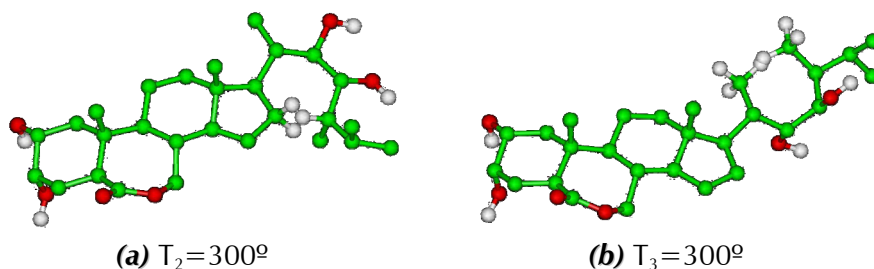


Figura 94: Representació de les conformacions inexistentes de la bl.

- El confórmer 24 forma per si sol un grup “anòmal”. Aquest té un valor de  $T_3$  igual a  $94^\circ$  mentre que el valor habitual és de  $50^\circ$ – $60^\circ$ . Curiosament aquest confórmer es correspon amb la conformació activa IZR.
- Hi ha dos confòrmers (32 i 33 indicats en vermell) que, a priori, haurien d’haver convergit en un de sol. No ho fan ja que no compleixen el criteri d’equivalència en  $T_4$  ( $\pm 30^\circ$ ). S’observa com el de major energia té una freqüència menor. Casos com aquest són difícils d’explicar. Es plantegen tres possibilitats: a) el confórmer de major energia correspon a un confórmer que no es troba en el mínim d’energia ja que l’optimització ha finalitzat abans de convergir, b) el mínim d’energia no és un mínim robust i petites variacions en els valors d’angle de la resta de torsions el modifica considerablement duplicant el confórmer en qüestió, o c) hi ha dos mínims d’energia molt propers. En els dos primers casos es podria pensar en suprimir el confórmer de major energia. No obstant, es decideix treballar amb tots els confòrmers.

En la resta de cadenes laterals tipus s’obtenen observacions similars. El nombre de confòrmers obtinguts per cadascuna d’elles es mostra en la *Figura 95*. Les diferències entre lactona i cetona són mínimes. La majoria es deu a la presència de confòrmers amb  $T_1$  diferent de  $180^\circ$ , confòrmers duplicats, o confòrmers que estan en la frontera del tall d’energia.

<i>bl</i>	<i>homo</i>	<i>epi</i>	<i>S_homo</i>	<i>S_epi</i>
<b>Lactona</b>				
<i>44 confòrmers</i>	<i>69 confòrmers</i>	<i>38 confòrmers</i>	<i>80 confòrmers</i>	<i>54 confòrmers</i>
<b>Cetona</b>				
<i>41 confòrmers</i>	<i>71 confòrmers</i>	<i>35 confòrmers</i>	<i>90 confòrmers</i>	<i>50 confòrmers</i>

**Figura 95:** Resultats de l’anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular gestionada a través d’un procés de fusió simulada per cada cadena lateral tipus.

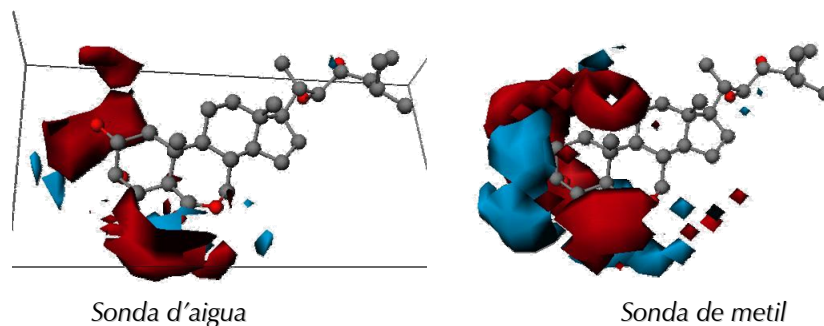
### 4.3. Selecció de la conformació activa.

Es fa servir el criteri de selecció basat en els models de GRID flexible. Recordar que es un procés iteratiu. En cada iteració es defineixen els graus de llibertat, es calculen els mapes de GRID flexibles i es realitza el model amb aquests. Paral·lelament, es fa l’anàlisi conformacional de cadascuna de les cadenes laterals tipus. Els confòrmers s’interpolen en el model i es seleccionen aquells on l’activitat predita s’ajusta millor amb l’activitat experimental. Si presenten trets estructurals comuns, es poden fixar reduint el nombre de graus de llibertat de la següent iteració.

- Iteració 0

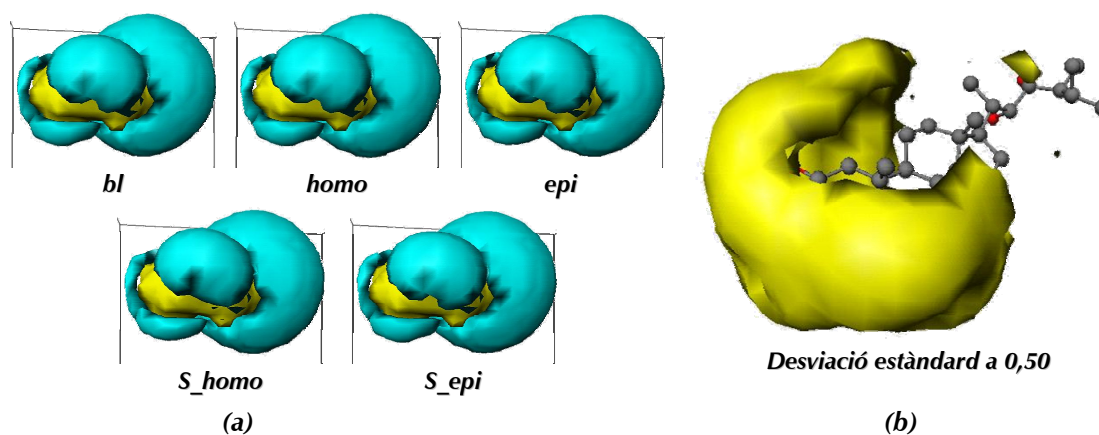
Com ja s’ha comentat, per a que la metodologia sigui aplicable, el model ha de mantenir els criteris de qualitat dels estudis QSAR. Es a dir, ha de ser capaç tant d’explicar com de predir les dades d’activitat en funció de l’estructura, ara flexible, dels BRs. En aquesta iteració 0 es veurà un exemple d’un model que no és útil.

Malgrat que tot apunta a que  $T_1$  es pot fixar a  $180^\circ$  es decideix, en un primer moment, permetre el seu gir. Així doncs, es defineixen com a graus de llibertat  $T_1 - T_6$ . Les molècules s'alineen pels anells C i D. El model presenta uns paràmetres estadístics acceptables ( $r^2_{(LV1)} = 44\%$  i  $q^2_{(LV1, LOO)} = 23\%$ ), però en els mapes de coeficients la contribució de la cadena lateral es nul·la (Figura 96). Com que el model és incapaç d'explicar no res que faci referència a la cadena lateral, és inútil aplicar-lo per establir diferències tant entre conformers com entre les diferents cadenes laterals tipus.



**Figura 96:** Mapes de coeficients a  $\pm 0,0010$ . En vermell es mostren les contribucions positives a l'activitat i en blau les negatives.

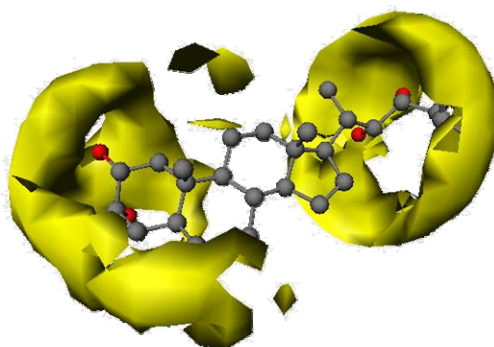
Seria interessant saber com i perquè s'ha arribat a aquest punt. Recordar que el model estadístic pretén explicar les dades d'activitat a través dels punts que presenten una màxima dispersió en els seus valors. Com es permet que la cadena lateral giri ja des de  $T_1$ , la seva mobilitat és total i els mapes de GRID flexible són idèntics independentment de la cadena lateral tipus (Figura 97a). Això fa que els punts que descriuen la cadena lateral tinguin molt poca dispersió (Figura 97b), per tant poca informació i en conseqüència no tinguin cap pes en el model (Figura 96, sonda d'aigua).



**Figura 97:** (a) Mapes de GRID flexibles per la sonda d'aigua considerant la mobilitat de  $T_1 - T_6$ , i (b) camp de desviació estàndard a 0,50 per la sonda d'aigua.

- Iteració 1

Es decideix fixar  $T_1$  a  $180^\circ$  i definir com a graus de llibertat  $T_2 - T_6$ . Es pren com a base l'alineament fet servir per Ismael Zamora en la seva tesi. Abans de realitzar el model es visualitza el camp de desviació estàndard per veure si la cadena lateral aporta informació al model o no (Figura 98). S'observa com la informació de la cadena lateral es concentra en un gran anell al voltant de l'enllaç C22-C23 que rodeja la cadena lateral quan aquesta s'estén el més allunyada possible de l'esquelet esteroide.

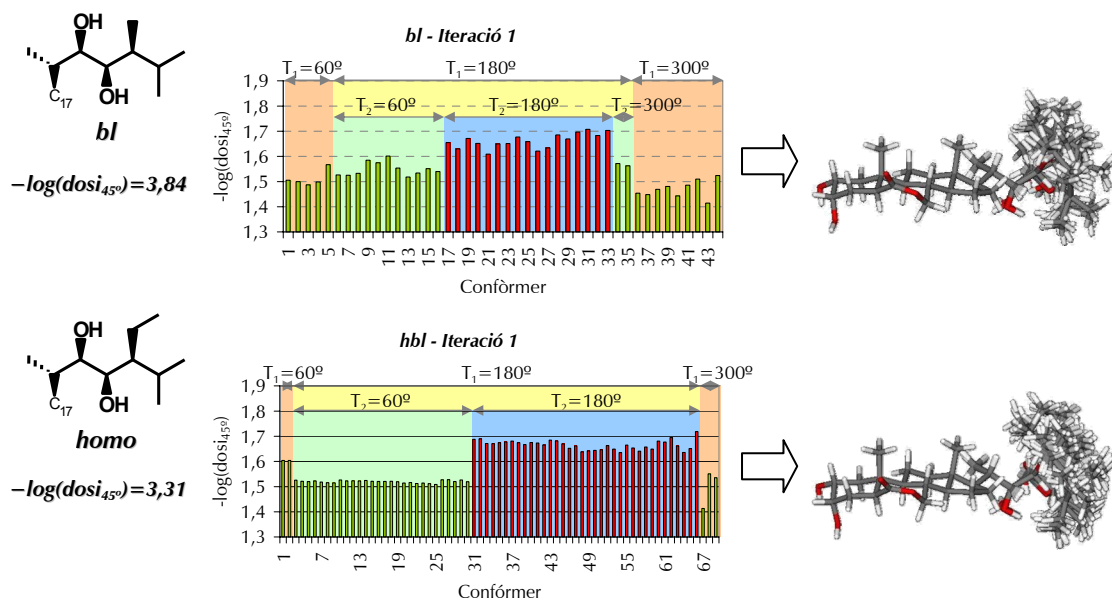


**Figura 98:** Camp de desviació estàndard a 1,00 per la sonda d'aigua.

El model presenta uns paràmetres estadístics acceptables ( $r^2_{(LV1)} = 68\%$  i  $q^2_{(LV1, LOO)} = 23\%$ ), amb una bona capacitat de predicció on la cadena lateral té influència. S'interpolen els confòrmers i es representa la seva activitat predita (Figura 99). Com aquests estan endreçats segons els angles de torsió la interpretació dels gràfics és directe. Els confòrmers que s'ajusten millor al valor d'activitat experimental es representen en vermell i es visualitzen.

S'observa que per als 22*R*,23*R*-BRs (cadena lateral tipus *bl*, *homo* i *epi*) els confòrmers que millor s'ajusten són els que tenen  $T_1$  i  $T_2$  igual a  $180^\circ$ .

En els 22*S*,23*S*-BRs (cadena lateral tipus *S\_homo* i *S\_epi*) no és tan fàcil relacionar l'activitat predita amb alguna característica estructural comuna. En general els millors valors s'obtenen amb  $T_2$  igual a  $60^\circ$  o igual a  $300^\circ$ . En el primer cas la cadena lateral se'n va cap a la cara  $\alpha$ , mentre que en el segon se'n va cap a la cara  $\beta$ . Amb anterioritat, de les dos opcions es va seleccionar aquella que era més similar a la conformació *SQR*. No obstant, actualment, no es vol donar res per suposat i en la següent iteració es faran dos models fixant en cadascun d'ells un dels dos valors possibles de  $T_2$  pels 22*S*,23*S*-BRs.



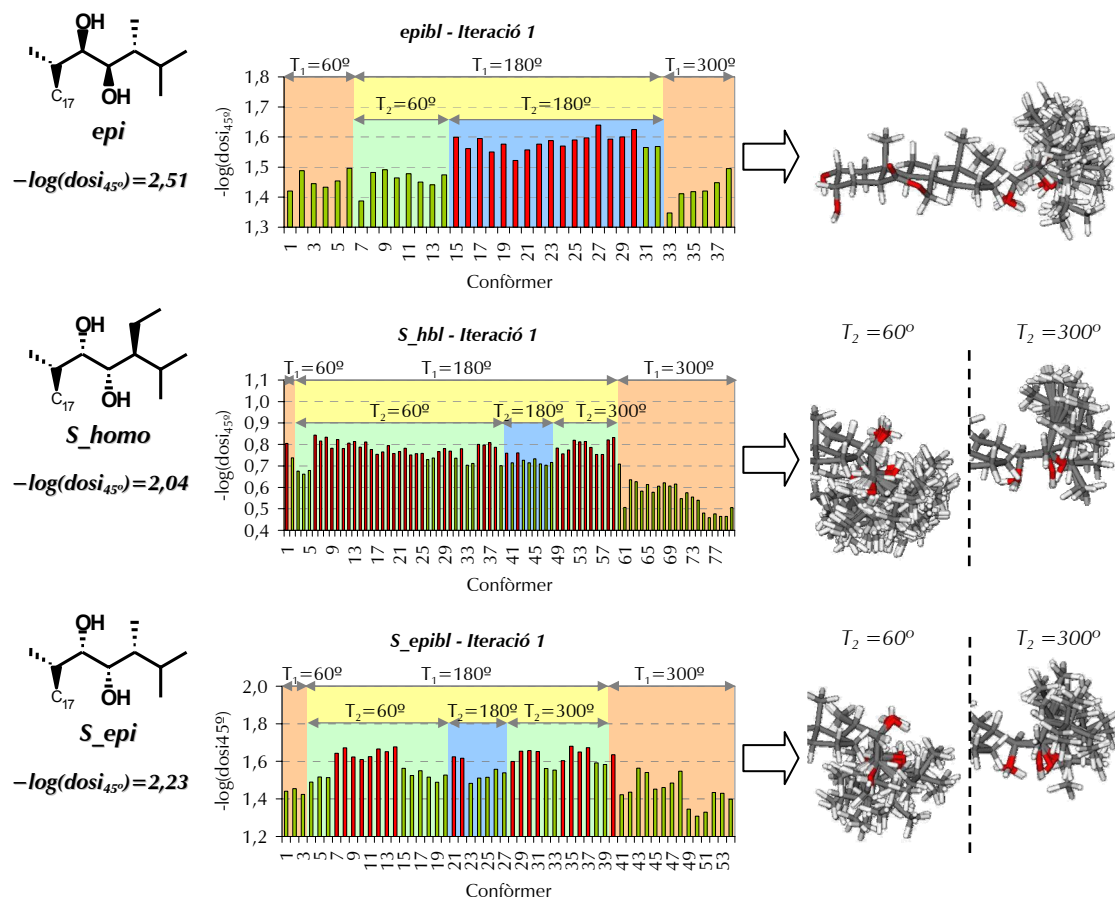
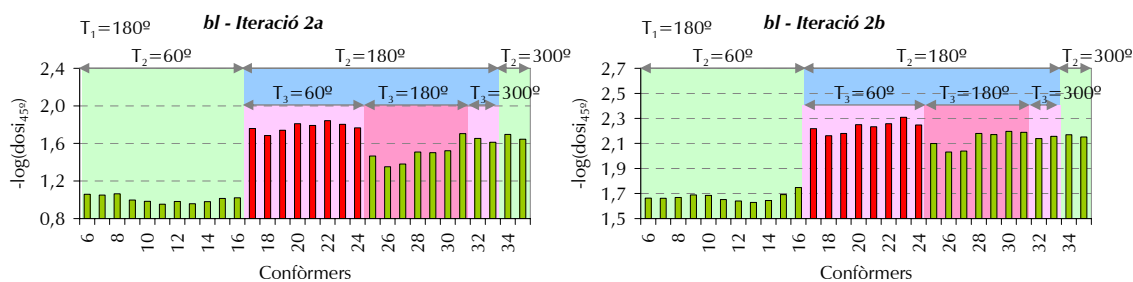


Figura 99: Resultats de la primera iteració per l'obtenció de la conformació activa MVP.

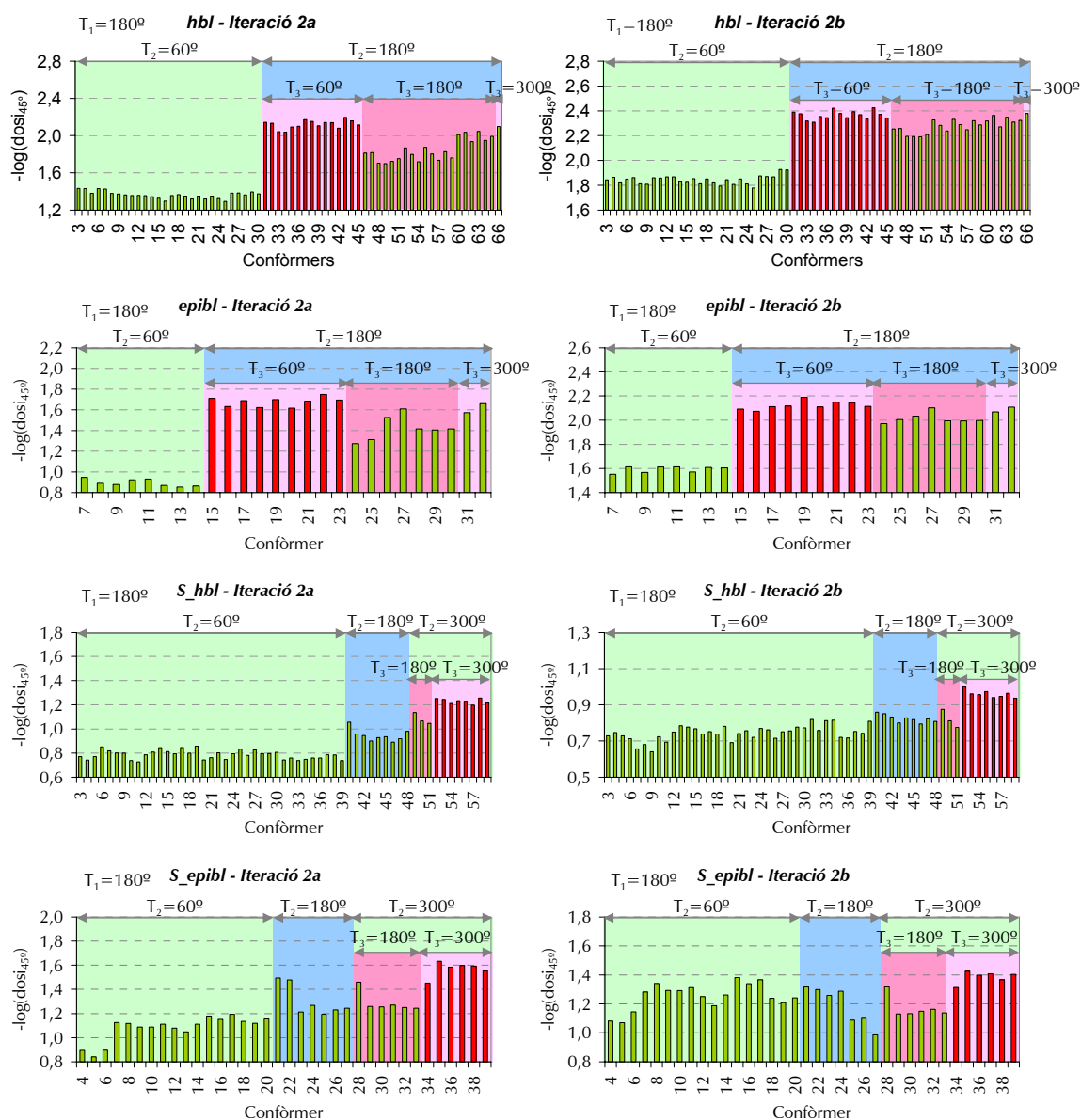
- Iteració 2

Es fan dos models. En tots dos,  $T_2$  dels 22R,23R-BRs es fixa a  $180^\circ$ . Per contra  $T_2$  dels 22S,23S-BRs varia segons el model. En el primer (*Iteració 2a*) es fixa a  $60^\circ$  i en el segon (*Iteració 2b*) a  $300^\circ$ . Es defineixen com a graus de llibertat  $T_3 - T_6$ , i es procedeix de la mateixa manera. Els gràfics d'activitat es mostren en la *Figura 100*. Els confòrmers que millor s'ajusten es representen en vermell i es visualitzen en la *Figura 101*.

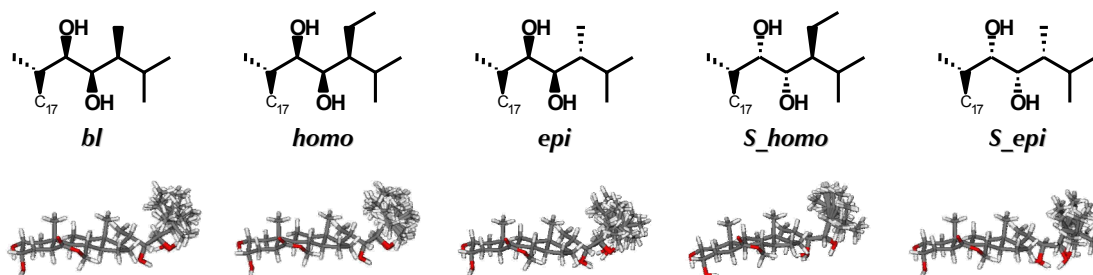
S'observa que per els 22R,23R-BRs (cadena lateral tipus *bl*, *homo* i *epi*) els confòrmers que millor s'ajusten són els que tenen  $T_3$  igual a  $60^\circ$ . En canvi, per els 22S,23S-BRs (cadena lateral tipus *S\_homo* i *S\_epibl*) els que millor s'ajusten tenen  $T_2$  i  $T_3$  igual a  $300^\circ$ . Cal destacar que el primer model (*Iteració 2a*) on es fixa  $T_2$  igual a  $60^\circ$  prediu que són millors els confòrmers que tenen  $T_2$  igual a  $300^\circ$ , que no pas els que li pertoquen.







**Figura 100:** Resultats de la segona iteració per l'obtenció de la conformació activa MVP. Gràfics de predicció de l'activitat.

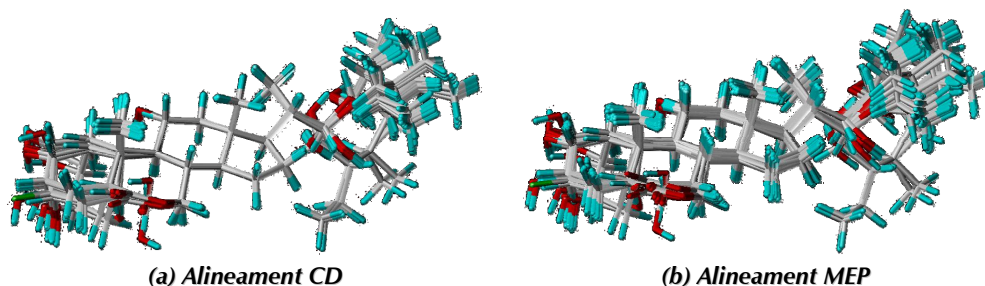


**Figura 101:** Resultats de la segona iteració per l'obtenció de la conformació activa MVP. Conformers que millor s'ajusten a l'activitat experimental.

- Iteració 3

Tradicionalment, en la secció s'han fet servir 2 alineaments: 1) l'alineament a través de la superposició dels anells C i D, i 2) l'alineament mitjançant la superposició del potencial molecular electrostàtic (MEP). La *Figura 102* mostra el resultat de cadascun dels alineaments, anomenats CD i MEP, sobre els BRs en la conformació activa SQR. Es considera que, de poder triar entre tots dos, l'alineament a través del potencial molecular electrostàtic és preferible. Les raons són:

- a) És un alineament global, es a dir, que té en compte tota la molècula. Per contra l'alineament CD és local. A la *Figura 102a* s'observa com els anells C i D semblen un de sol. Això fa que l'error d'alineament es concentri en l'anell A i en la cadena lateral, les quals són les zones a estudiar. En canvi com l'alineament MEP és global, l'error d'alineament es reparteix al llarg de tota la molècula.
- b) És més realista de cara a explicar la unió substrat/receptor. En l'aproximació de tots dos, les primeres interaccions (interaccions a llarga distància) són del tipus electrostàtic. Així doncs, la distribució de cargues tan del substrat com del receptor contribueixen a que el substrat adopti la conformació més apropiada per a que la unió sigui productiva.



**Figura 102:** Alineaments dels BRs fets servir en la secció.

Fins aquest moment, en tot aquest procés, l'únic alineament possible és a través de la superposició dels anells C i D ja que la cadena lateral és flexible. Però un cop fixat  $T_3$ , tots els grups funcionals polars estan perfectament situats en l'espai 3D, i es pot realitzar un alineament a través del potencial molecular electrostàtic (Alineament MEP). Com alternativa a l'alineament MEP es pot fer servir un alineament a través dels camps moleculars de GRID amb la sonda d'aigua (alineament H<sub>2</sub>O). En aquest es maximitza la superposició de les zones d'interacció per enllaç d'hidrogen.

Com que la part alifàtica de la cadena lateral encara és flexible, es pren per cada cadena lateral tipus el confórmer de mínima energia dins del subconjunt de confòrmers seleccionats en la segona iteració. Posteriorment, a cada compost s'assigna els valors d'acord amb la seva cadena lateral tipus i s'optimitza la geometria. Finalment, els compostos s'alineen prenent com a referència la brassinolida.\* Es defineixen com a graus de llibertat  $T_4 - T_6$ . Igual que en la segona iteració es fan dos models: en el primer (*Iteració 3-CD*) es fa servir l'alineament a través de la superposició dels anells C i D, i en el segon (*Iteració 3-H<sub>2</sub>O*) es fa servir l'alineament a través dels camps moleculars de GRID fent servir la sonda d'aigua.

Els gràfics d'activitat es mostren en la *Figura 103*. S'observa com la *iteració 3-CD* està al límit de la seva capacitat predictiva ja que no es capaç de discriminar entre confòrmers. En canvi, la *iteració 3-H<sub>2</sub>O* és més sensible ja que permet discriminar molt millor els

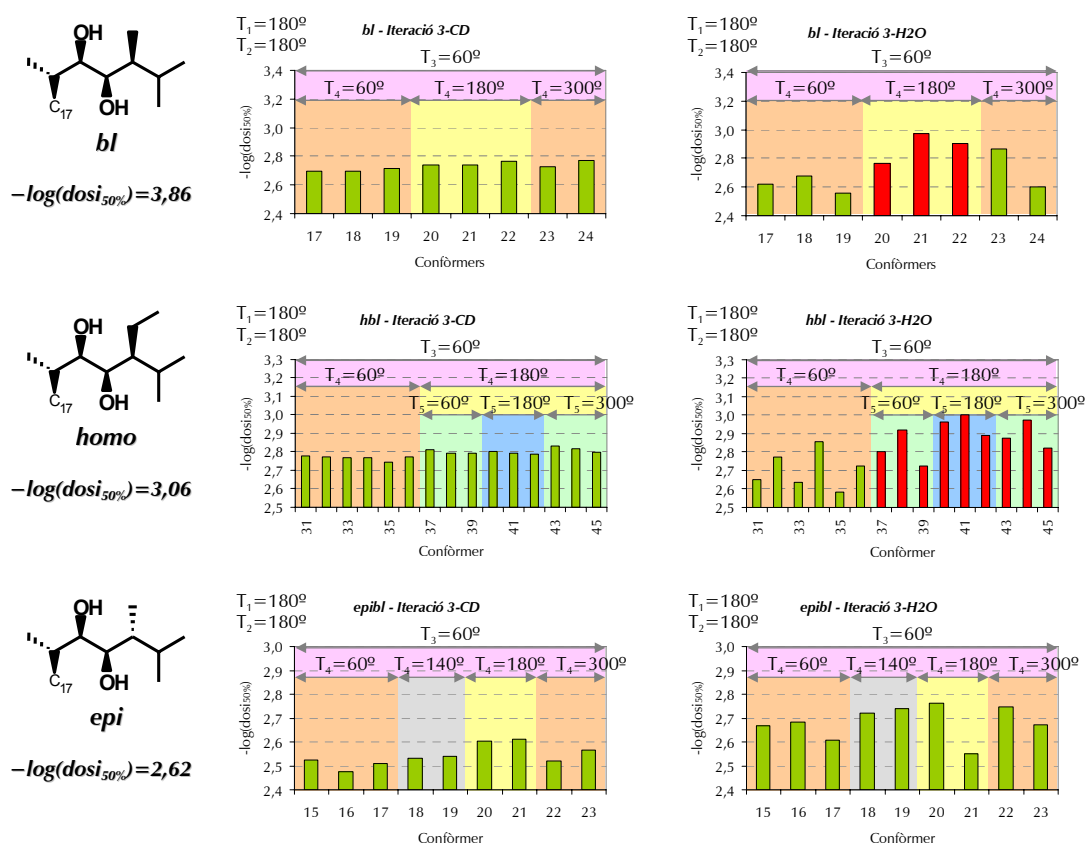
---

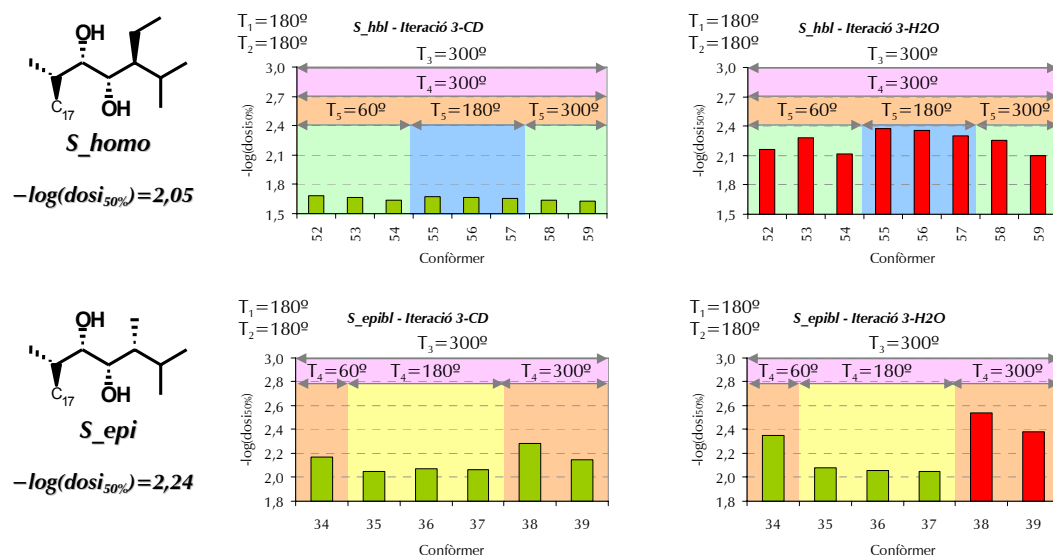
\* Al final de tot el procés, la conformació activa MVP de la brassinolida resultarà ser el confórmer de menor energia. Per tant, sense saber-ho, ja en aquests moments s'estan alineant els compostos amb el que serà la conformació activa de la brassinolida.

confòrmers d'acord amb el valor d'activitat predita. Per aquesta iteració, els confòrmers que millor s'ajusten es representen en vermell i es visualitzen en la *Figura 104*. Les observacions més destacades són:

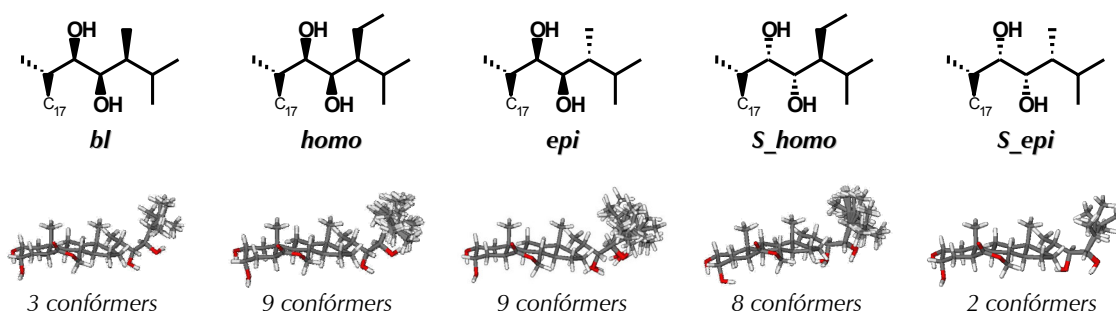
- *bl*: els confòrmers que millor s'ajusten són els que tenen  $T_4$  igual a  $180^\circ$ .
- *homo*: igual que la *bl*, els confòrmers que millor s'ajusten són els que tenen  $T_4$  igual a  $180^\circ$ .
- *epi*: és complicat seleccionar un valor de  $T_4$ . Primer perquè s'observa un valor d'angle en una posició quasi eclipsada ( $140^\circ$ ) degut a la interacció estèrica entre el metil C18 i l'extrem final de la cadena lateral. Segon perquè, si bé, fins ara els valors d'activitat predits sempre estaven per sota del real, ara els valors d'activitat predits oscil·len per sobre i per sota del valor real (2,62).
- *S\_homo*: l'anàlisi conformacional comporta que tots els confòrmers que tenen  $T_3$  igual a  $300^\circ$  tenen necessàriament  $T_4$  igual a  $300^\circ$ . Per tant no hi ha discussió sobre quin valor de  $T_4$  és millor.
- *S\_epi*: l'anàlisi conformacional no presenta tantes restriccions com en la cadena tipus *S\_homo* i s'observen els tres valors de  $T_4$ . Els confòrmers que millor s'ajusten són els que tenen  $T_4$  igual a  $300^\circ$ . Això reforça els resultats obtinguts per la cadena tipus *S\_homo*.

Aquests resultats permeten fixar  $T_4$  igual a  $180^\circ$  pels 22*R*,23*R*-BRs (amb l'excepció de la cadena lateral tipus *epi*) i a  $300^\circ$  pels 22*S*,23*S*-BRs.





**Figura 103:** Resultats de la tercera iteració per l'obtenció de la conformació activa MVP. Gràfics de predicció de l'activitat.



**Figura 104:** Resultats de la tercera iteració per l'obtenció de la conformació activa MVP. Confòrmers que millor s'ajusten a l'activitat experimental.

#### • Iteració / Etapa 4

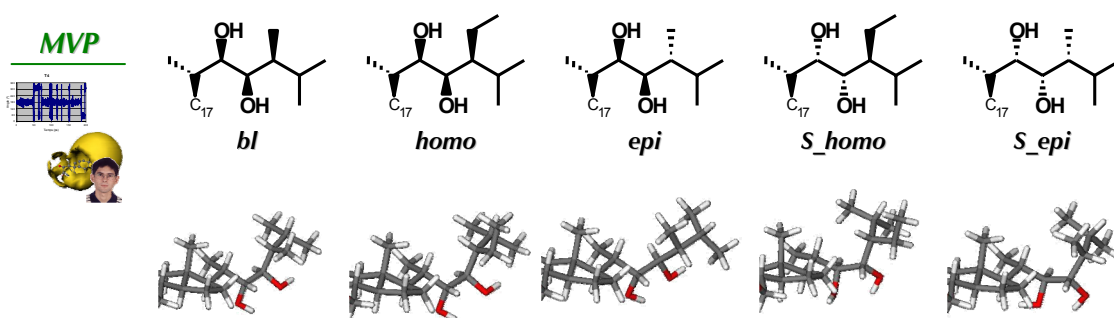
No es tracta d'una iteració en si. Es considera que l'activitat predita com a criteri de selecció ha arribat al límit de la seva capacitat i per tant cal utilitzar altres criteris. En els casos on sigui aplicable, es fa servir l'aproximació a l'anàleg actiu, i en els casos on aquest criteri no sigui aplicable s'utilitzarà l'energia.

A continuació es descriu els resultats obtinguts:

- *bl*: es té un grup de tres confòrmers (20, 21 i 22), que es diferencien en la posició 3D de l'isopropil terminal ( $T_5$ ). La brassinolida és el compost de referència quan s'utilitza l'aproximació a l'anàleg actiu i en conseqüència no té sentit aplicar aquest criteri. Per tant es tria el confòrmer de mínima energia (confòrmer 21). Aquest resulta ser el de mínima energia absoluta.
- *homo*: es tenen 9 confòrmers distribuïts en tres grups de tres confòrmers (37–39, 40–42 i 43–45). Cada grup es diferencia en la posició 3D de l'isopropil terminal ( $T_5$ ). La fixació d'aquesta torsió es basa en l'aproximació a l'anàleg actiu prenent com a referència la cadena lateral tipus *bl*. La major similitud estructural es dona quan  $T_5$  és  $180^\circ$ . Els tres confòrmers restants (40, 41 i 42) es diferencien en la posició 3D de l'etil en C24 ( $T_6$ ). Com la brassinolida no té aquesta torsió es tria el confòrmer de mínima energia (confòrmer 41). Igual que amb la *bl*, resulta ser el confòrmer de mínima energia absoluta.

- *epi*: es tenen 9 confòrmers distribuïts en quatre grups de dos o tres confòrmers (15–17, 18–19, 20–21 i 22–23). Cada grup es diferencia en la posició 3D de l'extrem final de la cadena lateral ( $T_4$ ). Aquesta cadena lateral tipus és la més complexa. Recordar que en la iteració anterior és l'única on no es pot fixar  $T_4$ . La selecció de la conformació activa es basa en l'aproximació a l'anàleg actiu prenent com a referència la cadena lateral tipus *bl*. La major similitud estructural es dona quan  $T_4$  i  $T_5$  són iguals a  $180^\circ$  (confòrmer 20).
- *S\_homo*: Es tenen 8 confòrmers distribuïts en tres grups de dos o tres confòrmers (52–54, 55–57 i 58–59). Cada grup es diferencia en la posició 3D de l'isopropil terminal ( $T_5$ ). La selecció de la conformació activa es basa en l'aproximació a l'anàleg actiu prenent com a referència la cadena lateral tipus *homo*. La major similitud estructural es dona quan  $T_5$  és igual a  $180^\circ$  i  $T_6$  a  $60^\circ$  (confòrmer 55).
- *S\_epi*: es tenen 2 confòrmers (38 i 39) que es diferencien en la posició 3D de l'isopropil terminal ( $T_5$ ). La selecció de la conformació activa es basa en l'aproximació a l'anàleg actiu prenent com a referència la cadena lateral tipus *epi*. La major similitud estructural es dona quan  $T_5$  és igual a  $180^\circ$ , però cap dels dos confòrmers presenta aquest valor. Es revisen els resultats de l'anàlisi conformacional augmentant el tall d'energia. A  $0,15$  kcal/mol del tall es troba el confòrmer en qüestió.

Els resultats finals per cada cadena lateral tipus es mostren en la *Figura 105*.



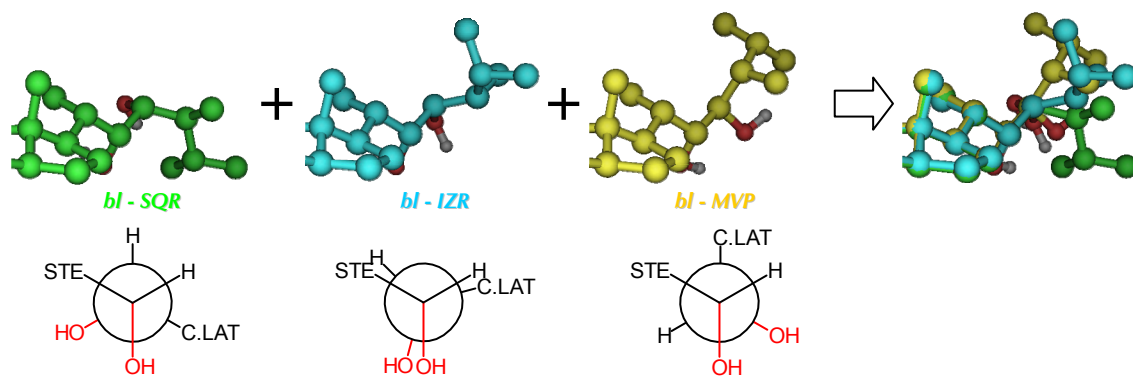
**Figura 105:** Conformació activa MVP de cadascuna de les cadenes laterals tipus

#### 4.4. Discussió dels resultats.

En les conformacions actives *SQR* i *IZR* es donaven un conjunt de contradiccions que van motivar la seva revisió. Cal veure si la conformació activa *MVP* és capaç d'explicar-les.

##### a) Hidroxils de la brassinolida.

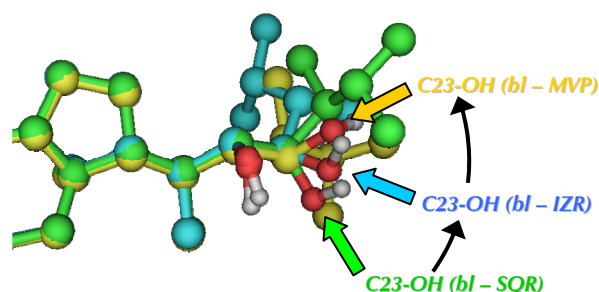
En la *Figura 106* es comparen les tres conformacions actives de la brassinolida. Es representa cada cadena lateral per separat i superposada, així com la projecció de Newman de l'enllaç C22–C23. En la conformació activa *MVP* els àtoms es troben en una posició alternada. Comparant les tres conformacions actives, s'observa que l'hidroxil en C22 coincideix en totes tres, però no així l'hidroxil en C23. Aquest ha patit una rotació i ha passat d'estar alternat orientat cap a l'esquerra (conformació *SQR*) a estar alternat orientat cap a la dreta (conformació *MVP*). La posició eclipsada que passa de l'un a l'altre és la conformació *IZR*.



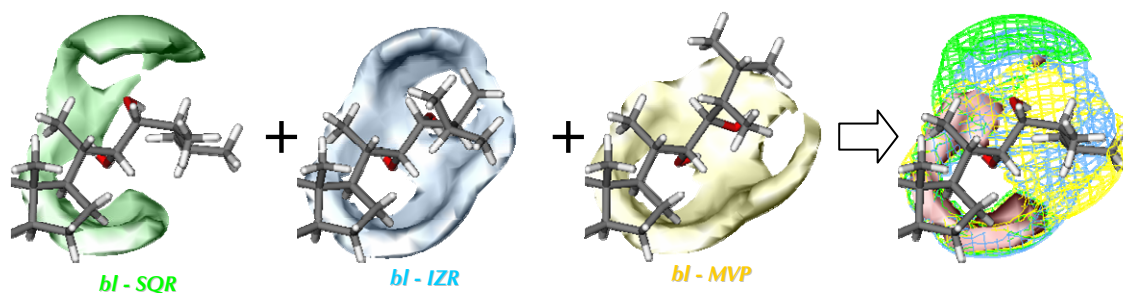
**Figura 106:** Superposició de les conformacions actives SQR (en verd), IZR (en cian) i MVP (en groc) de la brassinolida i projecció de Newman de l'enllaç C22–C23.

En la *Figura 107* es mostra el detall dels hidroxils en C23 de les tres conformacions. L'hidroxil en C23 adopta posicions diferents en cada conformació activa, diferenciant-se entre si mitjançant un angle. Recordar que els mapes de GRID descriuen la interacció de l'hidroxil a certa distància d'aquest. Per tant és d'esperar que els mapes de GRID de cada conformació activa siguin diferents en l'hidroxil en C23 (*Figura 108*). El mapa de GRID de la conformació activa MVP descriu un "8" que està escapçat per la part superior. Quan es superposen els tres mapes de GRID el grau d'intersecció és només d'un 40%. El solapament és quasi complet en l'hidroxil de C22, on coincideixen en la totalitat de la part inferior de la "E" descrita per la conformació SQR. En canvi, en l'hidroxil de C23 la intersecció és incompleta ja que només coincideixen en la part intermèdia del diol, comuna amb C22, i en una petita regió puntual en la part més allunyada al diol.

Tot plegat confirma que la conformació activa MVP de la brassinolida no és comparable a cap de les anteriors.



**Figura 107:** Detall dels hidroxils en C23 de les conformacions actives SQR (en verd), IZR (en cian) i MVP (en groc) de la brassinolida.



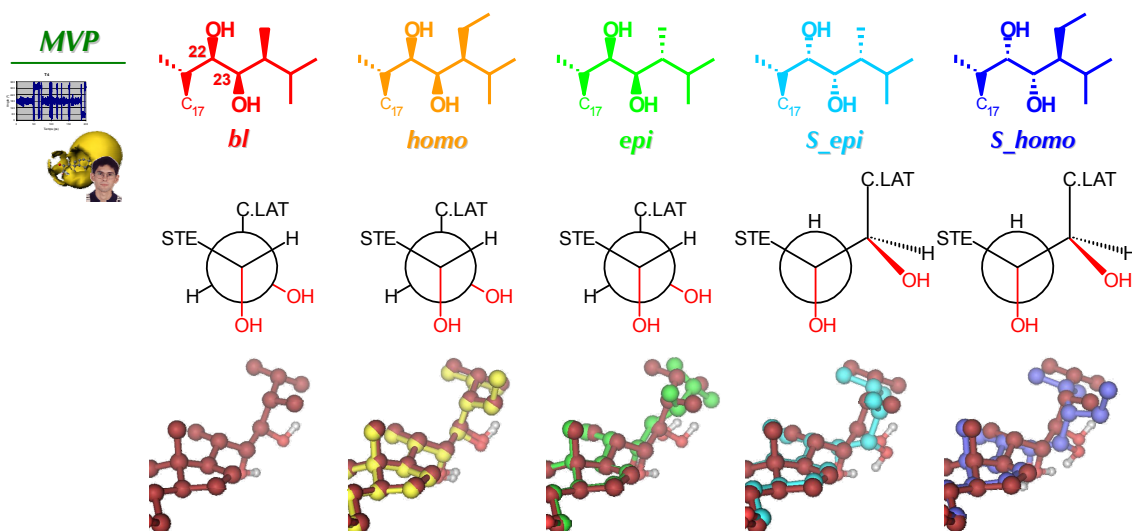
**Figura 108:** Superposició dels mapes de GRID de les conformacions actives SQR (en verd), IZR (en cian) i MVP (en groc), i intersecció dels camps (en vermell).

b) Cas dels 22S,23S-BRs.

Recordar que les conformacions actives *SQR* i *IZR* no explicaven ni la complementarietat geomètrica ni la complementarietat electrostàtica dels 22S,23S-BRs amb el receptor, les quals són necessàries per explicar reconeixement molecular dels BRs fent servir mètodes indirectes.

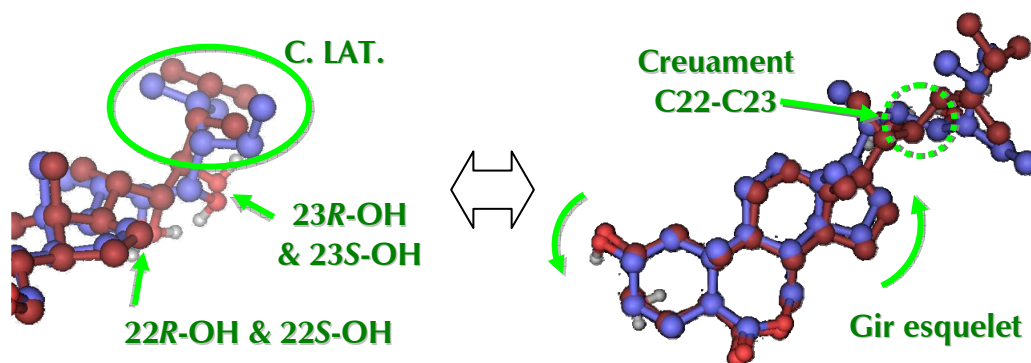
En la *Figura 109* es mostra la projecció de Newman de l'enllaç C22–C23 i la superposició amb la cadena lateral de la brassinolida per la conformació activa *MVP*. S'observa:

- Per els 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 també en *cis*. Podria pensar-se que entre l'esteroide i el final de la cadena lateral hi ha un elevat impediment estèric, però no és així. La conformació activa *MVP* de les cadenes tipus *bl* i *homo* és la de mínima energia. Només en algunes conformacions de la cadena lateral tipus *epi* s'observa una interacció estèrica.
- Per els 22S,23S-BRs (cadenes tipus *S\_homo* i *S\_epi*), C23 es situa sobre l'hidrogen de C22 de la *bl*. Malgrat que, a priori, sembla que no tenen res a veure amb els 22R,23R-BRs, les posicions relatives tant del diol com de STE i C.LAT tenen certa similitud espacial. En tots dos, els àtoms es troben en una posició alternada amb el diol en posició *cis*, i STE i C.LAT també en *cis*. A més a més, en tots dos, el diol es situa cap avall a la dreta, i STE i C.LAT es situa cap a dalt a l'esquerra.



**Figura 109:** Projecció de Newman de l'enllaç C22–C23 i superposició de les cadenes laterals amb la brassinolida, per la conformació activa *MVP*.

A mode d'exemple, en la *Figura 110* es mostra amb més detall la superposició de les cadenes laterals tipus *bl* i *S\_homo*. S'observa com els hidroxils 22R i 22S coincideixen en l'espai, els hidroxils 23R i 23S també, i l'extrem final de la cadena lateral també coincideix tant en la posició del grup isopropil com de C28. Això és possible ja que s'ha produït un petit gir en l'esquelet que dóna lloc a un creuament de la cadena lateral en l'enllaç C22–C23.

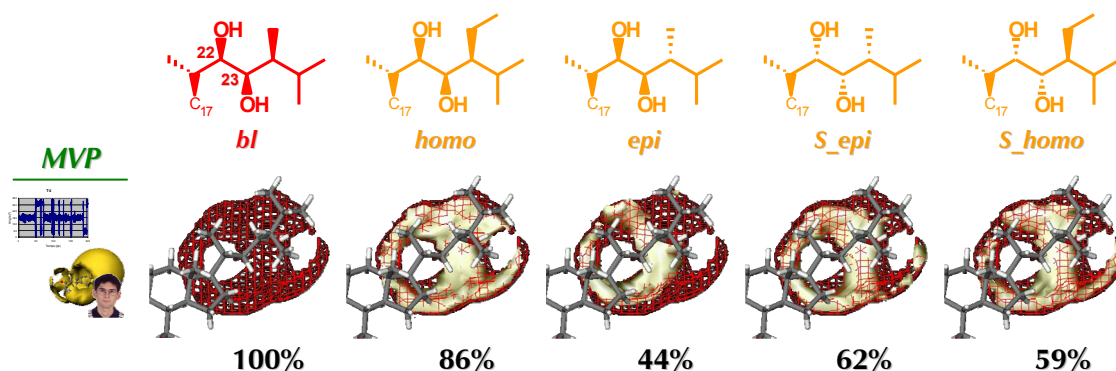


**Figura 110:** Superposició de cadenes laterals *bl* (en granat) i *S\_homo* (en blau). Detall de la cadena lateral i vista des de la cara  $\beta$  de tot l'esteroid.

Segons aquests resultats, el receptor és capaç de reconèixer les conformacions actives MVP dels 22S,23S-BRs com un substrat vàlid, ja que tan la complementarietat geomètrica com la complementarietat electrostàtica queden explicades tridimensionalment. Per tant, la conformació activa MVP soluciona el problema de les conformacions SQR i IZR.

c) Interseccions de mapes de GRID.

Per acabar de corroborar l'afirmació anterior es representa la intersecció dels mapes de GRID de les cadenes laterals amb la cadena tipus *bl* (Figura 111). Recordar que el grau de similitud dels 22R,23R-BRs estava entre el 74% i el 84% i coincidia en la majoria del diol de la *bl*. Per contra en els 22S,23S-BRs el grau de similitud queia fins al 9%–23% i la coincidència amb el diol de la *bl* era puntual (v. Figura 83 i Figura 84, pàgina 104). Per les cadenes dels 22S,23S-BRs s'observa una millora espectacular, tant a nivell qualitatiu com quantitatiu. Qualitativament, la coincidència es dona en tots dos hidroxils del diol. Quantitativament el grau d'intersecció augmenta fins arribar als voltants del 60%. Sorpren, però la cadena lateral tipus *epi*. En les conformacions SQR i IZR el grau d'intersecció està al voltant del 80% mentre que en la conformació MVP només és del 44%, inferior inclús que el dels 22S,23S-BRs.



**Figura 111:** Intersecció de mapes de GRID de les cadenes laterals tipus amb la brassinolida i grau d'intersecció. En vermell es mostra el mapa de la *bl* (mapa de referència) i en groc la zona comuna.