

## **5. Conformació Activa HIP.**

### **5.1. Introducció.**

Una reestructuració del software a nivell del centre canvia els programes de modelització. El canvi de programes obliga a canviar el camp de forces i en conseqüència els BRs passen a estar descrits mitjançant un nou conjunt de paràmetres i equacions.

Indicar que en cadascuna de les tres conformacions actives el camp de forces utilitzat en l'anàlisi conformacional és diferent: a) en l'anàlisi conformacional sistemàtica en forma d'arbre es va fer servir el camp de forces MM2, b) en l'anàlisi conformacional aleatori implementat en SYBYL, el *TriposFF*, i c) en l'anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular controlada per un sistema de fusió simulada, el CVFF. Actualment només es pot treballar amb *Amber89* o *MMFF94*.

En principi, el valor de la energia per cada molècula o confórmer no té perquè ser igual en cada camp de forces. Però la diferència d'energia entre molècules o confòrmers hauria de ser igual independentment del camp de forces. No obstant, en l'estudi dels anàlegs BRs androstànics es van observar diferències en l'energia dels confòrmers degudes al ús de camps de forces diferents. Per tant, és d'esperar que en l'estudi dels BRs passi quelcom similar. Això suposa un greu inconvenient ja que l'energia s'ha utilitzat com a criteri en la selecció de la conformació activa MVP.

Es obligant, doncs, fer una revisió de selecció de la conformació activa MVP d'acord amb la "nova" energia dels confòrmers. No es tracta de repetir tot el procés de definir els graus de llibertat i realitzar els models amb els mapes de GRID flexibles, ni de realitzar un nou anàlisi conformacional. L'energia com a criteri, només s'utilitza en l'última etapa del procés de selecció (*iteració 4/Etapa 4*). Per tant, només es fa una revisió d'aquesta etapa. A més a més, s'intentarà solucionar el cas de la cadena lateral tipus *epi*, la qual presenta un grau d'intersecció del mapa de GRID amb la brassinolida inferior a l'esperat, malgrat tenir el diol de cadena amb configuració 22R,23R.

En la *iteració 4/Etapa 4*, només queda per definir l'extrem final de la cadena lateral. Per tant, a priori, sembla molt estrany que aquesta conformació activa sigui molt diferent de la conformació MVP. Per aquest motiu se la considera inicialment com una "*hipotètica nova*" conformació. D'aquí les sigles HIP.

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

El punt de partida són els resultats de la tercera iteració de la conformació activa MVP (*Figura 105*). A continuació es descriu els resultats obtinguts en la revisió fent servir els camps de forces *Amber89* i *MMFF94* per avaluar l'energia:

- *bl*: tenia un grup de tres confòrmers (20, 21 i 22), que es diferenciaven en la posició 3D de l'isopropil terminal ( $T_5$ ) i es triava el confórmer de mínima energia. Amb els nous camps de forces aquest és el confórmer 22, el qual resulta ser el de mínima energia absoluta.  $T_5$  que abans tenia un valor de  $180^\circ$  ara el té de  $300^\circ$ .

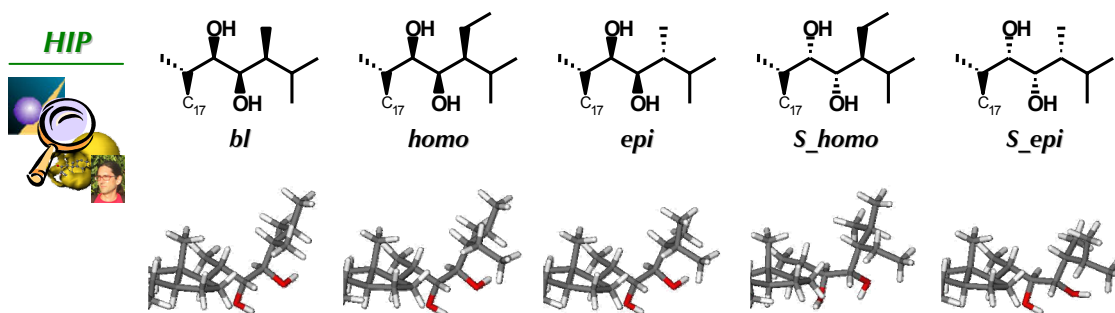
- *homo*: es tenien 9 confòrmers distribuïts en tres grups de tres confòrmers (37–39, 40–42 i 43–45). Cada grup es diferencia en la posició 3D de l'isopropil terminal ( $T_5$ ). La fixació d'aquesta torsió es basava en l'aproximació a l'anàleg actiu prenent com a referència la cadena lateral tipus *bl*. En aquest cas, la major similitud estructural es dona quan  $T_5$  és  $300^\circ$ . Els tres confòrmers restants (actualment 43, 44 i 45) es diferencien en la posició 3D de l'etil en C24 ( $T_6$ ), la qual es fixa triant el confòrmer de mínima energia. En aquest cas, la conformació activa correspon al confòrmer 45. No és el de mínima energia absoluta, però la diferència respecte d'aquest és molt petita (0,18 kcal/mol amb el camp de forces *Amber89* i 0,05 kcal/mol amb *MMFF94*).
- *epi*: es tenien 9 confòrmers distribuïts en quatre grups de dos o tres confòrmers (15–17, 18–19, 20–21 i 22–23). Cada grup es diferenciava en la posició 3D de l'extrem final de la cadena lateral ( $T_4$ ). Aquesta cadena lateral tipus era la més complexa.

En la conformació activa *MVP*, la selecció es basava en l'aproximació a l'anàleg actiu prenent com a referència la cadena lateral tipus *bl*. Aquest criteri presentava el problema que l'extrem final no quedava perfectament superposat, ja que si coincidía l'isopropil terminal, no coincidía el metil en C24, i viceversa. Al final es va triar una opció de compromís, en la qual  $T_3$  adoptava un valor de  $87^\circ$  mentre que per la resta de *22R,23R*-BRs (cadena tipus *bl* i *homo*) aquest estava al voltant dels  $55^\circ$ . Aquesta és la causa per la qual el grau d'intersecció dels mapes de GRID amb la brassinolida de la cadena tipus *epi* és tan sols del 44% quan per als *22R,23R*-BRs està al voltant del 80–85%.

Donades les dificultats per aplicar l'aproximació a l'anàleg actiu, s'utilitza exclusivament el criteri energia. Per tant, es tria el confòrmer 17, el qual resulta ser el de mínima energia absoluta. S'observa amb grata sorpresa, que la tria d'aquest confòrmer no suposa una greu distorsió geomètrica ja que respecte la brassinolida, l'isopropil terminal i el metil en C24 intercanvien les posicions.

- *S\_homo*: Es tenien 8 confòrmers distribuïts en tres grups de dos o tres confòrmers (52–54, 55–57 i 58–59). Cada grup es diferenciava en la posició 3D de l'isopropil terminal ( $T_5$ ). La selecció de la conformació activa es basava en l'aproximació a l'anàleg actiu prenent com a referència la cadena lateral tipus *homo*. En aquest cas, la major similitud estructural es dona quan  $T_5$  i  $T_6$  són igual a  $300^\circ$  (confòrmer 59).
- *S\_epi*: la selecció de la conformació activa es basava en l'aproximació a l'anàleg actiu prenent com a referència la cadena lateral tipus *epi*. En aquest cas, la major similitud estructural es dona en el confòrmer 35.

Els resultats finals per cada cadena lateral tipus es mostren en la *Figura 112*.

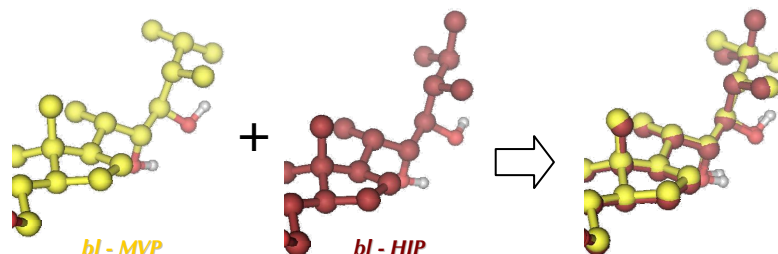


**Figura 112:** Conformació activa *HIP* de cadascuna de les cadenes laterals tipus

### 5.3. Discussió de resultats.

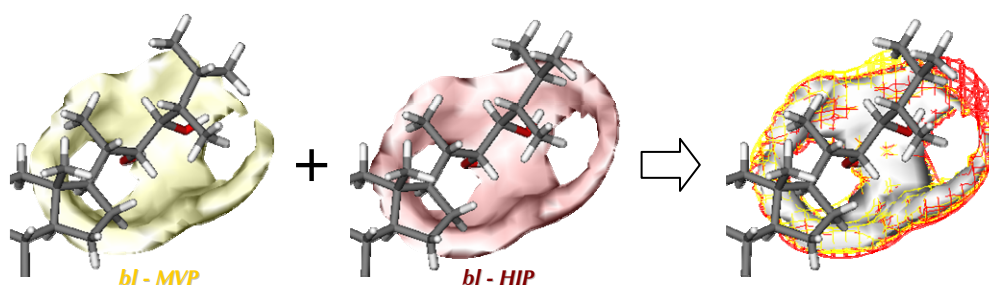
#### a) Cadena lateral tipus bl.

Les conformacions actives *MVP* i *HIP* de la *bl* només es diferencien en l'extrem final de la cadena lateral. Concretament en la posició de l'isopropil terminal (*Figura 113*).



**Figura 113:** Superposició de les conformacions actives *MVP* (en groc) i *HIP* (en granat) de la brassinolida.

En els mapes de GRID s'observen poques diferències (*Figura 114*). El de la conformació activa *MVP* descriu un "8" que està escapçat per la part superior, ja que un dels metils de l'isopropil terminal ocupa part de la zona d'interacció de l'hidroxil en C23. En canvi el de la conformació activa *HIP* descriu un "8" complet. El grau d'intersecció és del 81%.

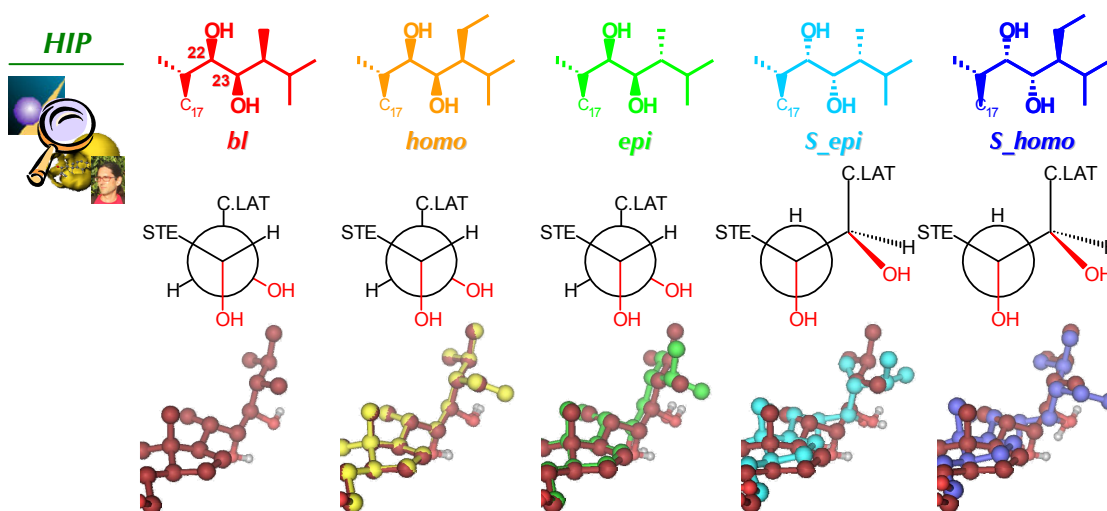


**Figura 114:** Superposició dels mapes de GRID de les conformacions actives *MVP* (en groc) i *HIP* (en granat), i intersecció dels camps (en blanc).

#### b) Resta de cadenes laterals tipus.

En la *Figura 115* 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 *HIP*. Les projeccions de Newman de l'enllaç C22–C23 són idèntiques per les conformacions actives *MVP* i *HIP*. Per tant, en la conformació *HIP* també és possible explicar la complementarietat geomètrica i la complementarietat electrostàtica dels 22S,23S-BRs amb el receptor, les quals són necessàries per al seu reconeixement molecular.

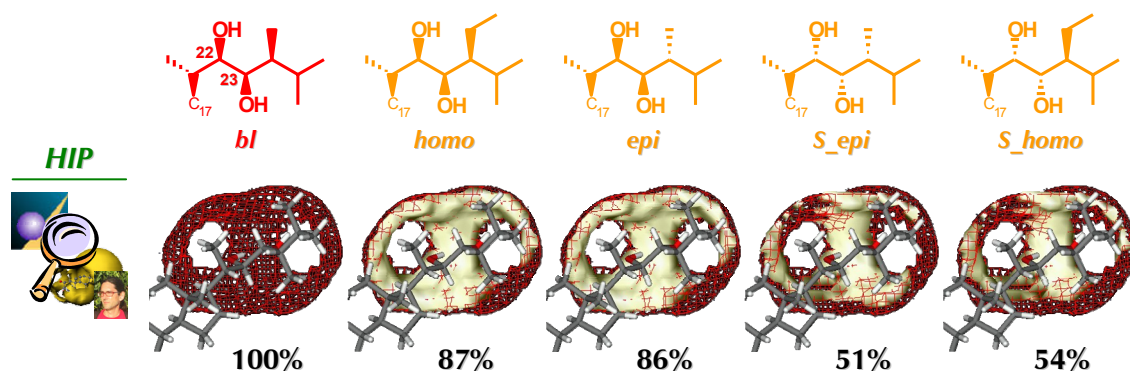
Destacar la cadena lateral tipus *epi*, en la qual i respecte a la cadena lateral tipus *bl*, s'han intercanviat les posicions del metil en C24 i l'isopropil terminal. Es a dir, on hi ha el metil C28 de la cadena tipus *bl* hi ha l'isopropil terminal de la cadena tipus *epi*, i viceversa.



**Figura 115:** Projectió de Newman de l'enllaç C22–C23 i superposició de les cadenes laterals amb la brassinolida, per la conformació activa *HIP*.

c) Intersecció de mapes de GRID.

Per completar la discussió dels resultats de la conformació activa *HIP*, es representa la intersecció dels mapes de GRID de les cadenes laterals amb la cadena tipus *bl* (Figura 116). A les cadenes dels 22*S*,23*S*-BRs es manté la millora tant a nivell qualitatiu com quantitatiu. Qualitativament, la coincidència es dona en tots dos hidroxils del diol. Quantitativament el grau d'intersecció està als voltants del 53%. Millora la cadena lateral tipus *epi* respecte la conformació activa *MVP*. El grau d'intersecció, abans del 44%, torna a estar d'acord amb els valors propis dels 22*R*,23*R*-BRs. La superposició, abans exclusiva de l'hidroxil en C22, torna a donar-se al llarg de tot el diol de la cadena lateral.



**Figura 116:** 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.

Recordar que per la conformació activa *SQR* (pàgines 33–35) es va suggerir que l'hidroxil en C23 tenia un paper més important en el desencadenament de l'activitat que no pas l'hidroxil en C22. D'acord amb la conformació activa *HIP*, aquesta afirmació no té fonament. Primer perquè tots dos hidroxils participen en la intersecció dels mapes de GRID i segon perquè qualitativament tampoc no hi ha una gradació entre l'activitat i les zones d'intersecció.

## **6. Conclusions.**

Es tenen quatre conformacions actives fruit de l'estudi continu de les cadenes laterals dels BRs. En ordre cronològic són *SQR*, *IZR*, *MVP* i *HIP*.

Les tres primeres (*SQR*, *IZR* i *MVP*) no són comparables entre si ja que presenten moltes diferències. La més rellevant és que la posició en l'espai de l'hidroxil en C23 és diferent per cadascuna d'elles. Com a conseqüència d'això, el 55% de la cadena lateral de la brassinolida ocupa posicions (volums) diferents en l'espai. Això pot originar problemes si s'utilitza la metodologia de l'aproximació a l'anàleg actiu (AAA) ja que l'estructura 3D del compost de referència canvia en cada cas. Per tant, l'estudi ha d'anar referit a una conformació activa i els resultats no tenen perquè ser iguals.

Les dos últimes conformacions actives (*MVP* i *HIP*) són molt similars entre si. La diferència entre les cadenes laterals de la brassinolida és tan sols del 9%. La diferència entre es cadenes laterals tipus *epi* és major (un 27%) i ve motivada per l'utilització de diferents criteris de selecció. En la conformació *MVP* es va donar preferència al criteri basat en l'aproximació a l'anàleg actiu, el qual comportava un conflicte geomètric i la necessitat d'adoptar una solució de compromís. En la conformació *HIP* es va donar preferència al criteri energètic, el resultat del qual no comporta una distorsió geomètrica respecte les altres cadenes.

Mentre que a les conformacions actives *SQR* i *IZR* no és possible justificar en termes de complementaritat, el reconeixement molecular dels 22S,23S-BRs per part del receptor, a les conformacions actives *MVP* i *HIP* sí és possible.

## PART II: Comparació de metodologies.

### 1. Introducció.

La metodologia per determinar la conformació activa dels BRs, ha constatat de dos etapes: 1) s'ha realitzat un anàlisi conformacional per explorar l'espai conformacional de cadascuna de les cinc cadenes laterals tipus, i 2) s'ha realitzat un procés de selecció per triar un únic conformer, fent servir diversos criteris de selecció.

Tres de les quatre conformacions actives (*SQR*, *IZR* i *MVP*) es diferencien tant en l'anàlisi conformacional com en el criteri de selecció de la conformació activa. La quarta (*HIP*) és una revisió de la tercera (*MVP*) motivada per un canvi de programari.

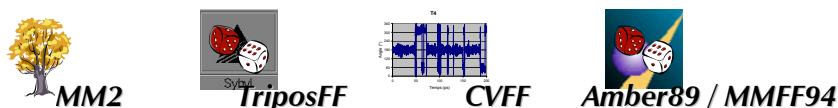
Es necessari fer una comparació de cadascuna de les etapes: l'anàlisi conformacional i el criteri de selecció de la conformació activa.

### 2. Comparació dels anàlisis conformacionals.

Destacar que per les tres primeres conformacions actives (*SQR*, *IZR* i *MVP*) s'han realitzat tres anàlisis conformacionals diferents. En cadascun es va utilitzar un camp de forces diferent. En la quarta (*HIP*) no es va realitzar cap anàlisi conformacional, sinó que es va fer una revisió de l'energia dels conformers fent servir dos camps de forces diferents (*Amber89* i *MMFF94*). Per tenir un punt de referència, s'ha realitzat un anàlisi conformacional aleatori implementat en *MOE* per cadascun d'ells.

Per tant, els diferents anàlisis conformacionals a comparar són (*Figura 117*):

- Anàlisi conformacional sistemàtic en forma d'arbre realitzat amb el camp de forces *MM2*. Dels resultats en depèn la conformació activa *SQR*.
- Anàlisi conformacional aleatori implementat en *SYBYL* realitzat amb el camp de forces *TriposFF*. Dels resultats en depèn la conformació activa *IZR*.
- Anàlisi conformacional mitjançant dinàmica molecular controlada per un sistema de fusió simulada realitzat amb el camp de forces *CVFF*. Dels resultats en depèn la conformació activa *MVP*.
- Anàlisi conformacional aleatori implementat en *MOE* en el qual s'assajaran dos camps de forces: *Amber89* i *MMFF94*. Els resultats es vinculen amb la conformació activa *HIP*.



**Figura 117:** Logotip dels 4 anàlisis conformacionals. Aquest conté informació tant de la metodologia com del camp de forces utilitzat.

## 2.1. Anàlisi conformacional en forma d'arbre.

El nombre de confòrmers obtinguts per cada cadena lateral tipus són 52 per la cadena tipus *bl*, 83 per la *homo*, 66 per la *epi*, 112 per la *S\_homo* i 55 per la *S\_epi*.

Quan els confòrmers s'endrecen segons els valors dels angles de torsió, s'observa que hi ha confòrmers repetits i quan s'aplica un tall d'energia de 5 kcal/mol el nombre de confòrmers encara queda més reduït. Per determinar els confòrmers repetits, es procedeix fent servir el mateix criteri que en l'anàlisi conformacional per dinàmica molecular: Es realitza una comparació dels 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  $T_1$ ,  $T_2$  i  $T_3$ ,  $\pm 30^\circ$  per  $T_4$ , i  $\pm 45^\circ$  per  $T_5$  i  $T_6$ ). Si dos confòrmers tenen tots els angles de torsió similars, dins dels marges establerts, es consideren confòrmers equivalents.

A mode d'exemple es mostren els resultats per la brassinolida. A la *Figura 118* es mostren les tres taules que s'obtenen en el procés d'endrecar, suprimir els confòrmers repetits i els d'elevada energia. S'observa com dels 52 confòrmers inicials, 36 són únics i 16 estan repetits. Quan s'aplica el tall d'energia només queden 23 confòrmers, un 43% dels inicials.

En revisar la resta de cadenes laterals tipus i aplicar el tall d'energia, s'obté una reducció en el nombre de confòrmers similar (*Figura 119*). El cas més espectacular és el de cadena tipus *S\_homo* on es passa de 112 a 19 confòrmers.

Es defineix com "eficàcia", la capacitat que té un anàlisi conformacional per trobar les 4 conformacions actives de cadascuna de les 5 cadena lateral tipus dels BRs.

A la *Figura 120* es mostra l'eficàcia de l'anàlisi conformacional sistemàtic en forma d'arbre amb el camp de forces MM2. Aquest només ha trobat 9 dels 20 confòrmers actius, el que representa una eficàcia del 45%.

Que faltin confòrmers actius *IZR* no és sorprenent ja que el diol de les cadenes dels *22R,23R-BRs* presenta una conformació eclipsada amb els hidroxils solapats i es creu que aquesta conformació és o bé a un punt d'encavalcament, o bé a un mínim local que es dona en condicions molt concretes. En canvi, és sorprenent que faltin confòrmers actius *MVP* i *HIP* ja que la majoria dels *22R,23R-BRs* es troben en la conformació de mínima energia absoluta o en un mínim molt proper.

Destacar l'elevada energia de la conformació activa *SQR* de la *bl*, per sobre de 5 kcal/mol.

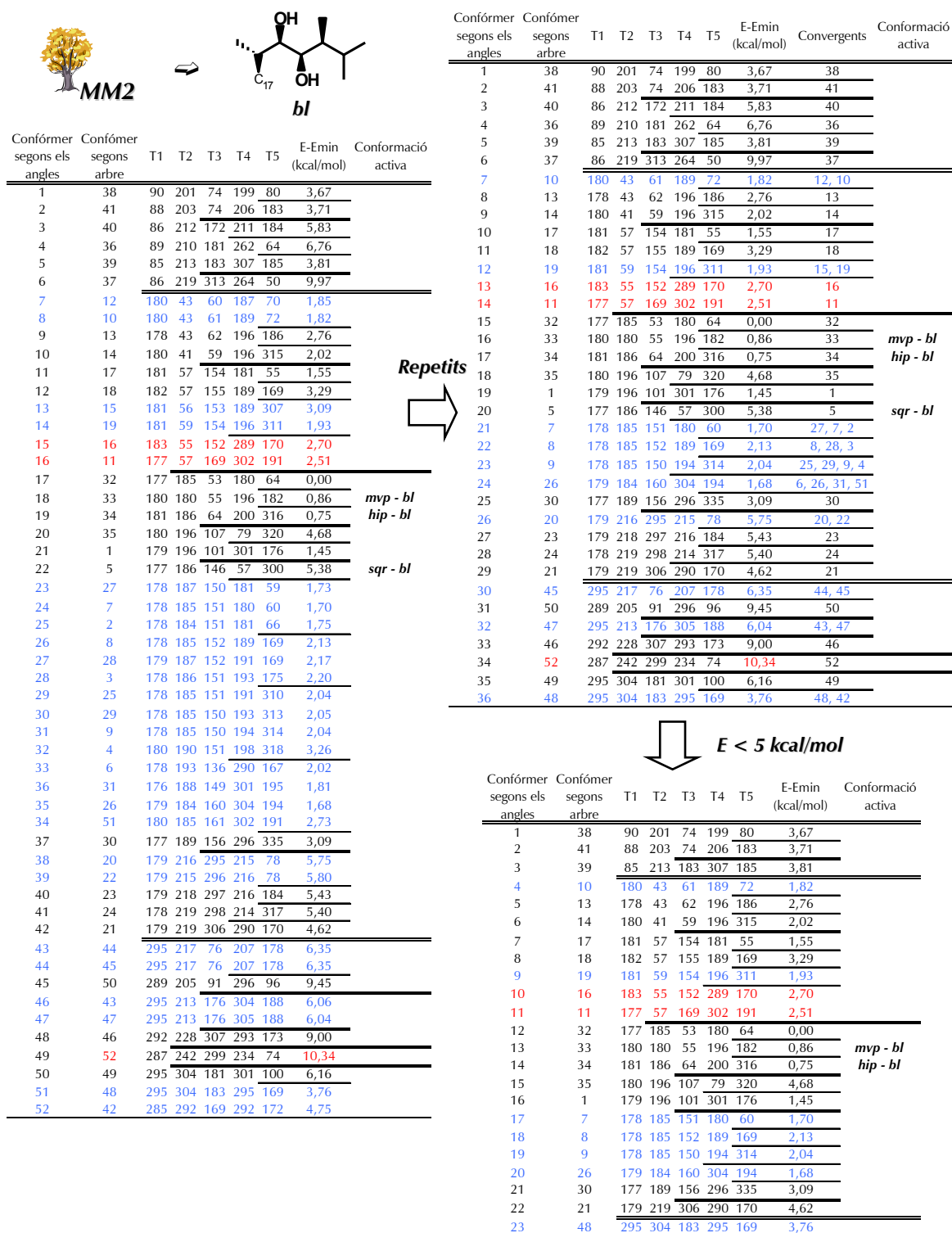


Figura 118: Resultats de l'anàlisi conformacional en forma d'arbre per la brassinolida, un cop ordenats, i aplicat el tall d'energia. En blau es marquen els confòrmers repetits, i en vermell aquells que a priori haurien d'haver convergit però que no ho han fet ja que no compleixen algun dels criteris d'equivalència.



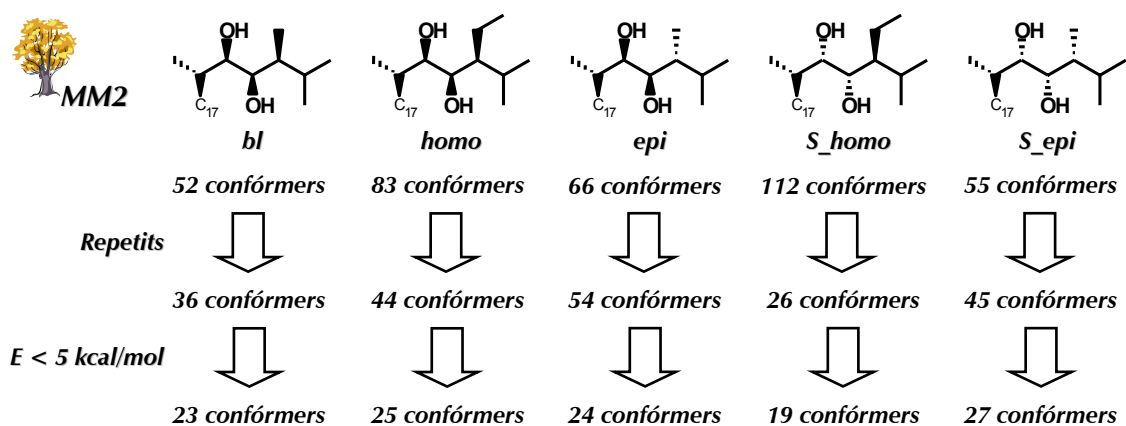


Figura 119: Reducció del nombre de confòrmers en revisar els resultats de l'anàlisi conformacional en forma d'arbre i aplicar el tall d'energia.

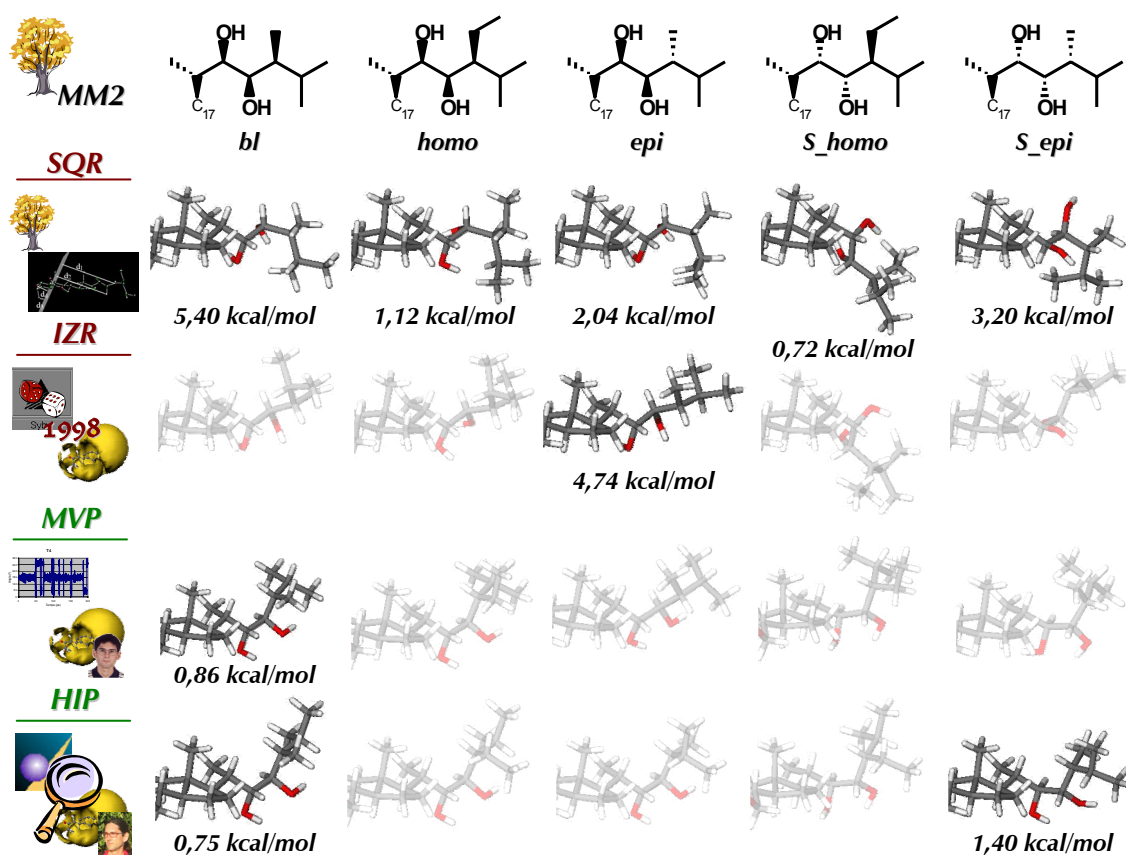


Figura 120: Eficàcia de l'anàlisi conformacional en forma d'arbre. Es ressalten els confòrmers actius trobats en l'anàlisi. També es mostra la diferència d'energia respecte del confòrmer de mínima energia absolut calculada amb el camp de forces MM2.

## 2.2. Anàlisi conformacional aleatori amb SYBYL.

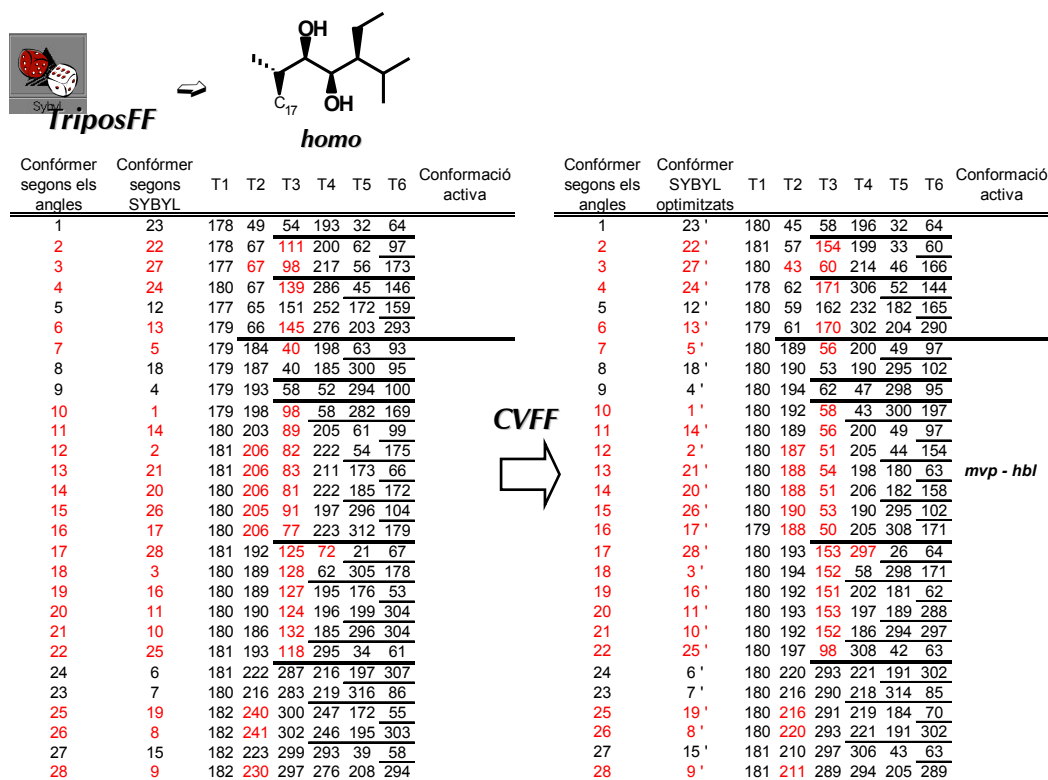
El nombre de confòrmers obtinguts per cada cadena lateral tipus van ser 28 per les cadenes tipus *bl*, *homo*, *S\_homo* i *S\_epi* i 24 per la cadena tipus *epi*.

Igual que en l'anàlisi anterior, els confòrmers s'endrecen segons els valors d'angle i es suprimeixen els repetits. A més a més, com hi ha valors d'angle propers a posicions

eclipsades, s'optimitza la geometria dels confòrmers fent servir el camp de forces CVFF. Els confòrmers es reordenen i es suprimeixen els repetits.

A mode d'exemple es mostren els resultats per la *homobrassinolida* (hbl) ja que la seva discussió és la més interessant. A la *Figura 121* es mostren les taules amb els confòrmers inicials i un cop optimitzada la seva geometria. En vermell es marquen els confòrmers i les torsions que són diferents abans i després de l'optimització. A la *Figura 122* es mostren les taules dels confòrmers un cop reordenats i eliminats els repetits.

Inicialment no hi ha confòrmers repetits. Dels 28 confòrmers, 21 canvien considerablement la seva geometria després d'optimitzar-la, i només 7 romanen igual. Inicialment no s'obté cap de les conformacions actives, però després de l'optimització apareix la conformació activa MVP. Dels confòrmers optimitzats tres estan duplicats. Així doncs, només el 25% dels confòrmers de la *homobrassinolida* obtinguts en l'anàlisi conformacional aleatori amb SYBYL i el camp de forces *TriposFF* es troben en un mínim d'energia. Per la resta de cadenes laterals tipus aquest percentatge augmenta fins arribar al 52% – 64%.



**Figura 121:** Resultats de l'anàlisi conformacional aleatori implementat en SYBYL per la homobrassinolida, abans i després de l'optimització de la geometria amb el camp de forces CVFF.

Confórmer segons els angles	Confórmer SYBYL optimitzats	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Conformació activa	Confórmer segons els angles	Confórmer SYBYL optimitzats	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Convergens	Conformació activa
1	23'	180	45	58	196	32	64		1	23'	180	45	58	196	32	64	23'	
2	27'	180	43	60	214	46	166		2	27'	180	43	60	214	46	166	27'	
3	22'	181	57	154	199	33	60		3	22'	181	57	154	199	33	60	22'	
4	12'	180	59	162	232	182	165		4	12'	180	59	162	232	182	165	12'	
5	24'	178	62	171	306	52	144		5	24'	178	62	171	306	52	144	24'	
6	13'	179	61	170	302	204	290		6	13'	179	61	170	302	204	290	13'	
7	4'	180	194	62	47	298	95		7	4'	180	194	62	47	298	95	4'	
8	1'	180	192	58	43	300	197		8	1'	180	192	58	43	300	197	1'	
9	5'	180	189	56	200	49	97		9	14'	180	189	56	200	49	97	5', 14'	
10	14'	180	189	56	200	49	97		10	2'	180	187	51	205	44	154	2'	
11	2'	180	187	51	205	44	154		11	21'	180	188	54	198	180	63	21'	<i>mvp - hbl</i>
12	21'	180	188	54	198	180	63		12	20'	180	188	51	206	182	158	20'	
13	20'	180	188	51	206	182	158		13	18'	180	190	53	190	295	102	18', 26'	
14	18'	180	190	53	190	295	102		14	17'	179	188	50	205	308	171	17'	
15	26'	180	190	53	190	295	102		15	25'	180	197	98	308	42	63	25'	
16	17'	179	188	50	205	308	171		16	3'	180	194	152	58	298	171	3'	
17	25'	180	197	98	308	42	63		17	16'	180	192	151	202	181	62	16'	
18	3'	180	194	152	58	298	171		18	11'	180	193	153	197	189	288	11'	
19	16'	180	192	151	202	181	62		19	10'	180	192	152	186	294	297	10'	
20	11'	180	193	153	197	189	288		20	28'	180	193	153	297	26	64	28'	
21	10'	180	192	152	186	294	297		21	19'	180	216	291	219	184	70	19'	
22	28'	180	193	153	297	26	64		22	6'	180	220	293	221	191	302	6', 8'	
23	19'	180	216	291	219	184	70		23	7'	180	216	290	218	314	85	7'	
24	6'	180	220	293	221	191	302		24	15'	181	210	297	306	43	63	15'	
25	8'	180	220	293	221	191	302		25	9'	181	211	289	294	205	289	9'	
26	7'	180	216	290	218	314	85											
27	15'	181	210	297	306	43	63											
28	9'	181	211	289	294	205	289											

Figura 122: Confòrmers de la homobrassinolida després de l'optimització de la geometria, reordenats i eliminat els repetits.

A la Figura 123 es mostra l'eficàcia de l'anàlisi aleatori amb SYBYL i el camp de forces TriposFF. Com era d'esperar la eficàcia torna a ser baixa. 11 dels 20 confòrmers, tot just un 55%.

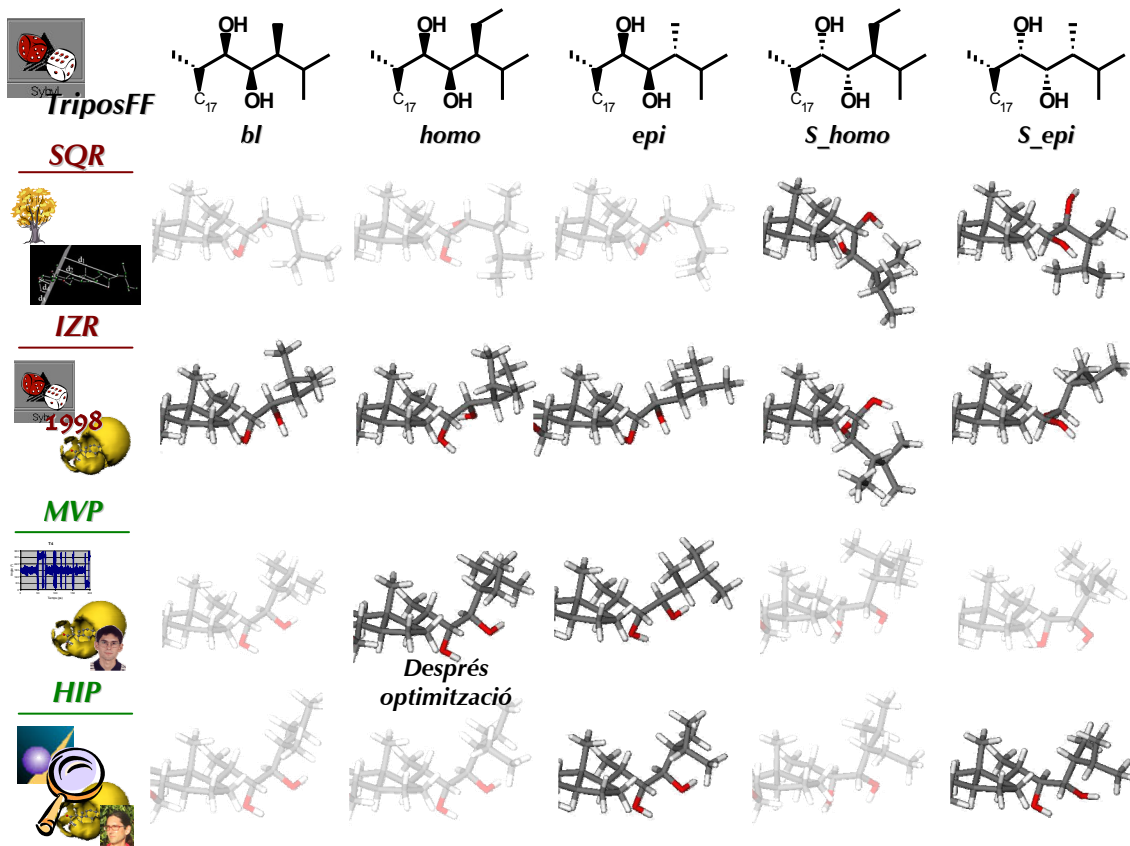
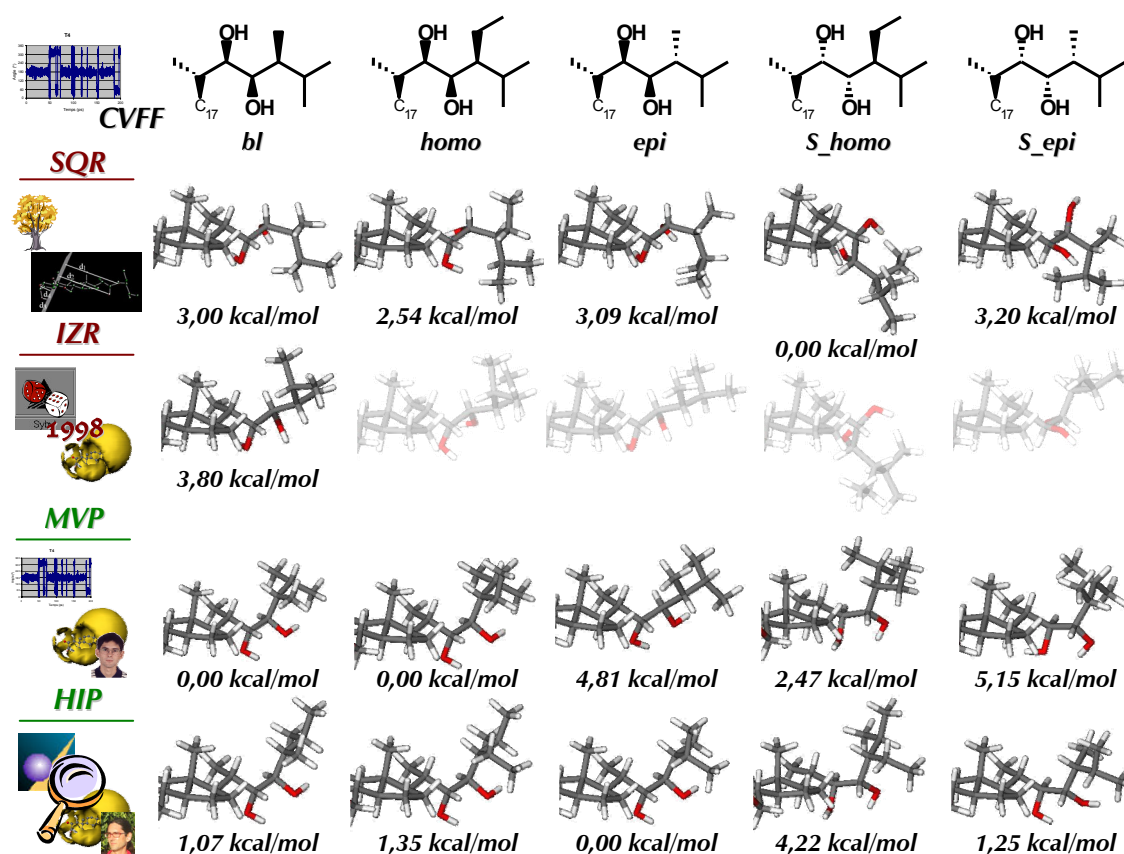


Figura 123: Eficàcia de l'anàlisi conformacional aleatori amb SYBYL i el camp de forces TriposFF. Es ressalten els confòrmers actius trobats en l'anàlisi.

### 2.3. Anàlisi conformational per dinàmica molecular i fusió simulada.

El nombre de confòrmers obtinguts per cada cadena lateral tipus han estat 44 per la cadena tipus *bl*, 69 per la *homo*, 38 per la *epi*, 80 per la *S\_homo* i 54 per la *S\_epi*. Hi ha motius per suposar que s'ha explorat tot l'espai conformational (pàgines 109–113).

A la *Figura 124* es mostra la eficàcia d'aquest anàlisi conformational. S'han trobat 16 dels 20 confòrmers actius, el que representa una eficàcia del 80%. Tots els confòrmers actius *SQR*, *MVP* i *HIP* són presents, i com era d'esperar falten la majoria dels *IZR* on només la cadena lateral tipus *bl* hi és present.

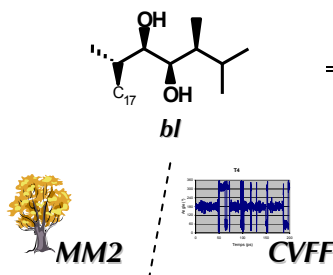


**Figura 124:** Eficàcia de l'anàlisi conformational per dinàmica molecular i fusió simulada. Es ressalten els confòrmers actius trobats en l'anàlisi. També es mostra la diferència d'energia respecte del confòrmer de mínima energia absolut calculat amb el camp de forces CVFF.

A mode d'exemple, a la *Taula 6* es mostra la comparació dels resultats dels anàlisi conformationals en forma d'arbre i per dinàmica molecular controlada mitjançant fusió simulada per la brassinolida. En la taula es presenta: a) la numeració segons els valors dels angles de torsió, b) el valor dels angles de torsió, c) la diferència d'energia respecte el confòrmer de mínima energia per cadascun dels camps de forces, d) els confòrmers de cadascun dels anàlisi, i e) si es correspon amb alguna de les quatre conformacions actives. S'obtenen 51 confòrmers dels quals 16 són comuns a tots dos anàlisi, 7 són exclusius de l'anàlisi d'arbre i 28 de l'anàlisi per dinàmica molecular. Per tant, ambdós anàlisi només coincideixen en un 31%. Destacar que l'energia dels confòrmers ( $E-E_{\min}$ ) és diferent per cada camp de forces.

Per a la resta de cadenes laterals tipus el percentatge de coincidència tampoc és gaire prometedor: un 7% de la cadena tipus *homo*, un 52% de la *epi*, un 11% de la *S\_homo* i un 16% de la *S\_epi*. Aquests baixos percentatges es deuen principalment al baix nombre de confòrmers amb  $T_1=180^\circ$  obtinguts en l'anàlisi d'arbre. Per exemple, en la cadena tipus *homo* en l'anàlisi d'arbre només s'obtenen 11 confòrmers amb  $T_1=180^\circ$ , mentre que en la dinàmica molecular se n'obtenen 64.

Tot plegat fa pensar que l'anàlisi conformacional sistemàtic en forma d'arbre no ha estat capaç d'explorar tot l'espai conformacional de les cadenes laterals dels BRs.



Confòrmer segons els angles	T1	T2	T3	T4	T5	E-Emin / MM2 (kcal/mol)	E-Emin / CVFF (kcal/mol)	Confòrmer segons arbre	Confòrmer segons dinàmica	Conformació activa
1	87	201	67	204	48	3,67	3,90	38	1	
2	87	201	67	203	184	3,71	3,40	41	2	
3	86	206	156	201	46		4,32		3	
4	86	206	157	201	182		3,99		4	
5	85	212	174	307	54		3,85		5	
6	85	213	183	307	185	3,81		39		
7	179	45	58	197	45	1,82	2,51	10	6	
8	180	44	58	196	182	2,76	1,80	13	7	
9	180	45	59	189	295	2,02	2,97	14	8	
10	181	57	153	63	32		3,01		9	
11	181	57	148	60	169		3,66		10	
12	181	58	157	56	298		2,92		11	
13	181	58	156	201	46	1,55	1,75		12	
14	181	58	156	200	182	3,29	1,41	18	13	
15	181	57	152	189	294	1,93	2,89	19	14	
16	179	61	169	307	56		1,74		15	
17	179	62	171	305	199	2,70	3,36	11	16	
18	183	55	152	289	170	2,51		16		
19	178	184	60	59	33		3,57		17	
20	179	185	59	56	171		4,00		18	
21	180	191	58	44	299		2,89		19	
22	180	188	53	196	45	0,00	0,50	32	20	
23	180	188	54	194	181	0,86	0,00	33	21	<i>mvp-bl</i>
24	180	189	52	186	294	0,75	1,07	34	22	<i>hip-bl</i>
25	180	193	60	266	44		4,28		23	
26	180	196	107	79	320	4,68		35		
27	180	197	94	304	50		3,80		24	<i>izr-bl</i>
28	179	196	101	301	176	1,45		1		
29	180	192	150	63	34		2,82		25	
30	180	192	146	59	170		3,43		26	
31	180	193	152	55	299		3,00		27	<i>sqr-bl</i>
32	180	192	152	200	46	1,70	1,81	7	28	
33	180	192	152	199	182	2,13	1,52	8	29	
34	180	192	150	189	294	2,04	2,83	9	30	
35	181	196	164	307	57		2,30		31	
36	180	193	153	274	182	1,68	4,63	26	32	
37	181	198	166	306	199		3,74		33	
38	177	189	156	296	335	3,09		30		
39	180	219	293	217	185		4,87		34	
40	181	211	296	304	52		3,92		35	
41	179	219	306	290	170	4,62		21		
42	296	206	59	195	45		4,47		36	
43	296	206	59	194	181		3,95		37	
44	296	206	55	184	294		4,87		38	
45	296	211	158	201	46		4,74		39	
46	296	211	158	200	182		4,46		40	
47	297	216	173	309	55		4,49		41	
48	300	305	166	206	47		4,61		42	
49	299	304	167	202	182		3,95		43	
50	294	305	185	304	48		3,38		44	
51	295	304	183	295	169	3,76		48		

**Taula 6:** Comparació dels resultats dels anàlisi conformacionals en forma d'arbre (tercera taula de la Figura 118) i l'anàlisi per dinàmica molecular (Taula 5) per la brassinolida.

#### 2.4. Anàlisi conformacional aleatori amb MOE.

El nombre de confòrmers obtinguts per cada cadena lateral tipus, amb cadascun dels camps de forces es mostren en la Figura 125. S'observa com el nombre de confòrmers que s'obté amb el camp de forces Amber89 és molt superior al que s'obté amb el MMFF94.

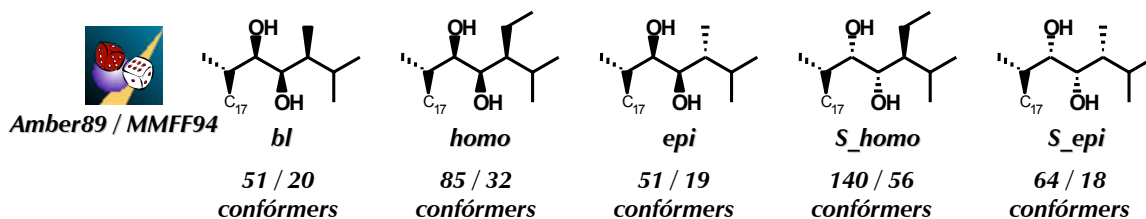
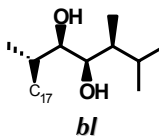



Figura 125: Resultats de l'anàlisi conformacional aleatori amb MOE fent servir els camps de forces Amber89 i MMFF94.

A mode d'exemple es mostra la comparació dels resultats de l'anàlisi per la brassinolida, fent servir els dos camps de forces (Taula 7). Igual que abans, en la taula es presenta: a) la numeració segons els valors dels angles de torsió, b) el valor dels angles de torsió, c) la diferència d'energia respecte el conformer de mínima energia per cadascun dels camps de forces, d) els confòrmers de cadascun dels anàlisi, i e) si es correspon amb alguna de les quatre conformacions actives.



*bl*



Conformer segons els angles	T1	T2	T3	T4	T5	E-Emin / Amber89 (kcal/mol)	E-Emin / MMFF94 (kcal/mol)	Conformer segons Amber89	Conformer segons MMFF94	Conformació activa
1	91	201	71	206	57	4,29		1		
2	91	200	71	203	190	4,10		2		
3	114	184	51	182	297	4,25		3		
4	90	208	159	56	299	4,77		4		
5	88	213	172	215	56	4,36		5		
6	88	213	169	210	189	4,25		6		
7	92	203	152	180	292	4,43		7		
8	87	215	184	308	59	3,18		8		
9	179	43	65	193	48	3,81	3,48	9	1	
10	179	43	65	191	181	3,44	2,90	10	2	
11	180	44	64	183	297	3,16	2,56	11	3	
12	180	59	156	59	27	3,24		12		
13	181	57	146	60	166	4,78		13		
14	180	59	154	55	301	2,58		14		
15	180	58	153	191	36	2,18	3,94	15	4	
16	180	59	155	198	185	2,03	3,59	16	5	
17	180	58	151	180	292	2,11	3,54	17	6	
18	178	62	165	216	315	3,47		18		
19	177	65	174	308	63	1,60	2,68	19	7	
20	178	61	166	258	175	3,83		20		
21	177	67	176	299	203	3,77		21		
22	177	64	169	301	344	4,42		22		
23	176	178	68	56	29	4,94	4,49	23	8	
24	178	185	63	43	301	2,55	2,33	24	9	
25	178	183	49	187	36	0,54	1,05	25	10	
26	178	183	49	189	181	0,35	0,59	26	11	<i>mvp - bl</i>
27	178	183	56	182	294	0,00	0,00	27	12	<i>hip - bl</i>
28	179	193	58	261	40	2,61	4,08	28	13	
29	178	193	106	298	49	3,27	3,41	29	14	<i>izr - bl</i>
30	178	188	152	60	28	3,03	4,32	30	15	
31	178	188	142	60	168	4,16		31		
32	178	188	148	54	302	2,30	3,84	32	16	<i>sqr - bl</i>
33	180	214	180	81	330	4,71		33		
34	178	187	149	190	36	1,84	3,30	34	17	
35	180	213	177	221	58	2,82		35		
36	178	187	149	193	181	1,73	2,99	36	18	
37	178	187	147	181	293	1,59	2,76	37	19	
38	180	212	173	213	315	3,22		38		
39	178	187	152	282	39	2,26		39		
40	180	215	183	308	61	1,26	2,44	40	20	
41	178	188	153	265	174	3,58		41		
42	180	216	185	299	201	3,25		42		
43	179	188	152	262	299	3,91		43		
44	180	215	177	300	341	4,31		44		
45	180	217	290	217	57	4,94		45		
46	180	219	291	214	190	4,98		46		
47	180	220	302	291	48	4,53		47		
48	184	269	187	308	59	3,43		48		
49	194	306	189	308	59	4,39		49		
50	301	223	182	309	61	4,76		50		
51	291	305	192	306	51	3,59		51		

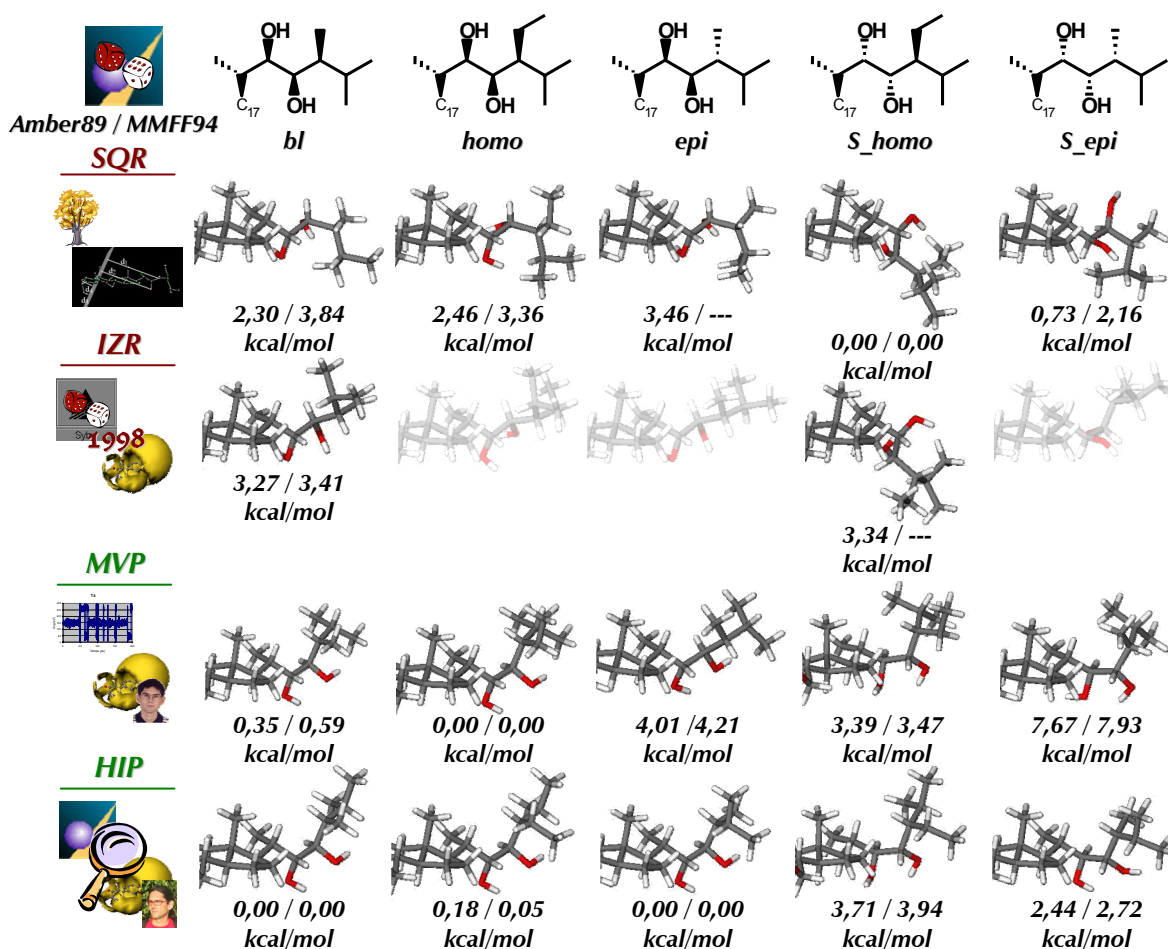
Taula 7: Comparació dels resultats dels anàlisi conformacionals aleatoris amb MOE fent servir els camps de forces Amber89 i MMFF94, per la brassinolida.

S'obtenen 51 confòrmers, dels quals els 20 del camp de forces MMFF94 són comuns en tots dos anàlisi i 31 són exclusius del camp de forces Amber89. S'observa, també, que en el

camp de forces *Amber89* hi ha molts confòrmers duplicats (en vermell) ja que no compleixen algun dels criteris d'equivalència. Per evitar confòrmers duplicats, es decideix treballar exclusivament amb el camp de forces *MMFF94*.

Destacar un cop més que la energia dels confòrmers ( $E-E_{\min}$ ) depèn del camp de forces. No obstant, els dos camps de forces coincideixen en el confòrmer de mínima energia absolut.

A la *Figura 126* es mostra la eficàcia de l'anàlisi aleatori amb MOE per cadascun dels camps de forces, *Amber89* i *MMFF94*. Tots dos són molt eficaços. Amb el camp de forces *Amber89* s'han trobat 17 dels 20 confòrmers actius, el que representa una eficàcia del 85%, mentre que el camp de forces *MMFF94* s'han trobat 15 dels 20 confòrmers actius, el que representa una eficàcia del 75%. Un cop més, els confòrmers *IZR* són els que falten.



**Figura 126:** Eficàcia de l'anàlisi conformacional aleatori amb MOE fent servir els camps de forces *Amber89* i *MMFF94*. Es ressalten els confòrmers actius trobats en l'anàlisi i es mostra la diferència d'energia respecte del confòrmer de mínima energia absolut per cada camp de forces.

Quan es comparen els resultats dels anàlisis conformacionals per dinàmica molecular (DM-SA) i de l'aleatori amb el camp de forces *MMFF94*, el grau de coincidència oscil·la entre el 35% i el 58%, segons la cadena lateral tipus. Normalment, tots els confòrmers de l'anàlisi aleatori estan presents en l'anàlisi per dinàmica molecular. Així doncs, tot i que l'anàlisi aleatori amb MOE i el camp de forces *MMFF94* no és el millor dels anàlisis, és suficientment bo com per ser eficaç. En altres paraules, tot i que no és capaç d'explorar tot l'espai conformacional, si és capaç d'explorar l'espai més significatiu.

## 2.5. Energia dels confórmers segons el camp de forces.

Com s'ha vist, l'energia dels confórmers ( $E-E_{\min}$ ) depèn del camp de forces amb el que ha estat avaluada. No obstant, hi ha alguns punts que cal ressaltar.

Segons la conformació activa *HIP*, la conformació activa dels 22R,23R-BRs és la conformació de mínima energia absoluta, o una conformació molt propera. Per contra la conformació activa dels 22S,23S-BRs es troba en un mínim local d'elevada energia (superior a 2,5 kcal/mol). Els 22R,23R-BRs són més actius que els corresponents 22S,23S-BRs. Un motiu de pes és que el confórmer que s'uneix amb el receptor ho fa a través de la conformació més estable, la de mínima energia. Per contra, en els 22S,23S-BRs la cadena lateral ha de realitzar un canvi conformacional, superior a 2,5 kcal/mol, per poder unir-se amb el receptor. Per aquest motiu els 22R,23R-BRs són més eficients que no pas els 22S,23S-BRs, i en conseqüència més actius. Cal ressaltar que els BRs naturals són 22R,23R-BRs, mentre que tots els 22S,23S-BRs són de síntesi.

## 3. Comparació dels mètodes de selecció de la conformació activa.

S'han fet servir dos mètodes per seleccionar la conformació activa. El primer es basava en la comparació d'índex de similitud basant-se en l'aproximació a l'anàleg actiu, i donava lloc a la conformació activa *SQR*. El segon es basava en la predictibilitat dels models fets amb camps de GRID flexibles, i donava lloc a les conformacions actives *IZR* i *MVP*.

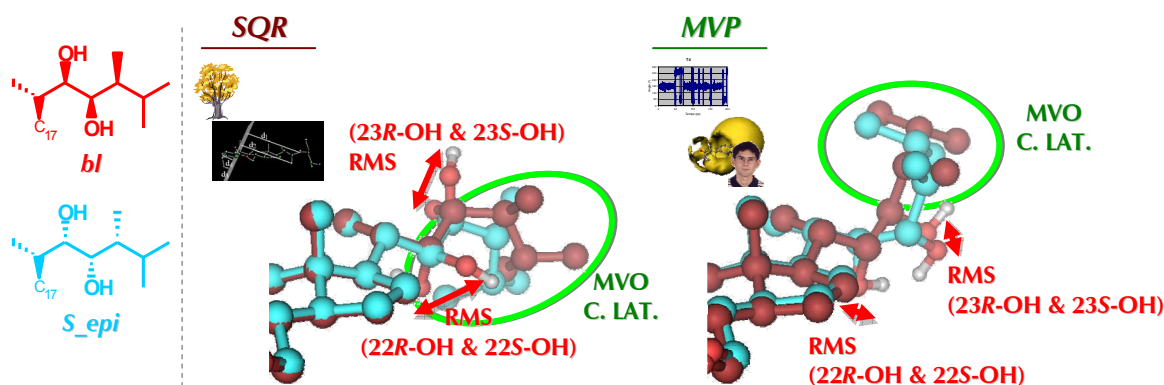
Per aplicar correctament aquestes dos metodologies és necessari que el conjunt de confórmers, del qual se'n triarà només un, sigui representatiu de tot l'espai conformacional. Per això cal que l'anàlisi conformacional hagi estat exhaustiu. Com això no ha estat així, els dos mètodes no es poden comparar des d'un punt de vista pràctic o d'eficàcia. No obstant, es fa una aproximació del que podria haver estat.

### 3.1. Metodologia basada en la comparació d'índex de similitud (*SQR*, *RMS* i *MVO*).

Els confórmers de l'anàlisi conformacional en forma d'arbre són el punt de partida d'aquesta metodologia. Aquest anàlisi, però, no ha estat exhaustiu. En aquest conjunt de confórmers falten la gran majoria dels confórmers que posteriorment es seleccionaran amb la metodologia dels models amb GRID flexible (confórmers actius *MVP*). Per tant, no és possible saber si la comparació dels índex de similitud hauria preferit els confórmers *MVP* abans que els *SQR*.

És coherent pensar que d'aplicar la comparació dels índex de similitud sobre els confórmers de la dinàmica molecular, s'haurien seleccionat els confórmers de la conformació activa *MVP*. A mode d'exemple es comparen els índex de similitud *RMS* (distància entre àtoms equivalents) i *MVO* (volum de superposició molecular) per les cadenes laterals tipus *bl* i *S<sub>epi</sub>* en les conformacions actives *SQR* i *MVP* (Figura 127). S'observa com les cadenes laterals tipus *bl* i *S<sub>epi</sub>* són molt més similars entre si en la conformació activa *MVP* que en la conformació activa *SQR*. La distància entre grups funcionals equivalents (*RMS*) és menor i el volum de superposició molecular (*MVO*) és major. Com que el procés de selecció és basa en la major similitud estructural, és evident s'haurien preferit els confórmers actius *MVP* abans que els *SQR*.





**Figura 127:** Comparació dels índex de similitud RMS (en vermell) i MVO (en verd) per les cadenes laterals tipus *bl* (en granat) i *S\_epi* (en cian) en les conformacions actives SQR i MVP.

És probable que, igual que amb la metodologia dels models amb GRID flexible, haguessin hagut dificultats per acabar de definir l'extrem final de la cadena lateral. En selecció de la posició de l'isopropil terminal, es creu que cap dels criteris hauria estat suficientment selectiu i seria necessari recorre a un altre criteri, com per exemple l'energia.

### 3.2. Metodologia basada en models de GRID flexible.

En l'anàlisi conformacional aleatori amb SYBYL, una bona part dels confòrmers no es troben en un mínim d'energia i falten la gran majoria de confòrmers actius, tant SQR com MVP i HIP. Com l'anàlisi conformacional dels BRs ha estat deficient, la metodologia basada en els models de GRID flexible ha estat incapaç de seleccionar una conformació activa coherent.

L'anàlisi conformacional per dinàmica molecular ha estat exhaustiu, contemplant tots els confòrmers actius SQR, MVP i HIP. És llavors, quan la metodologia ha pogut demostrar el seu potencial i les seves limitacions per tal de seleccionar la conformació activa més adient.

## 4. Conclusions

Per comparar les metodologies utilitzades en la selecció de la conformació activa dels BRs, es necessari separar les dos etapes del procés entre si.

Pel que respecta als anàlisis conformacionals sobre les cadenes laterals tipus dels BRs es conclou que:

- L'anàlisi conformacional sistemàtic en forma d'arbre no ha estat exhaustiu.
- L'anàlisi conformacional aleatori amb SYBYL tampoc ha estat exhaustiu i ha rendit una elevada quantitat de confòrmers que no estan en un mínim d'energia.
- L'anàlisi conformacional per dinàmica molecular gestionada per un procés de fusió simulada ha estat l'únic capaç d'explorar tot l'espai conformacional.
- L'anàlisi conformacional aleatori amb MOE i el camp de forces MMFF94 no és capaç d'explorar tot l'espai conformacional, però és prou eficaç com per explorar l'espai més significatiu.

Pel que respecta als dos mètodes de selecció de la conformació activa no es poden extreure conclusions ja que no són comparables entre si. Això és deu a que els conjunts de confòrmers de partida dels processos de selecció no són comuns. No obstant, És coherent pensar que d'aplicar la comparació dels índex de similitud sobre els confòrmers de la

dinàmica molecular, s'haurien seleccionat els confòrmers de la conformació activa *MVP* o *HIP* enlloc dels de la *SQR*.

D'acord amb la conformació activa *HIP*, els *22R,23R*-BRs s'uneixen amb el receptor a través de la conformació més estable, mentre que els *22S,23S*-BRs ho fan a través d'una conformació d'elevada energia. Per això els *22R,23R*-BRs són més eficients i en conseqüència més actius que els *22S,23S*-BRs.