

Tesi Doctoral

**DISSENY, SÍNTESI I ESTUDI DE LLIGANDS PEPTÍDICS CAPAÇOS DE
RECONÈIXER LA SUPERFÍCIE DE LA P53**

Marc Martinell Pedemonte

Departament de Química Orgànica

Facultat de Química



UNIVERSITAT DE BARCELONA

U

B

Memòria presentada per:

Marc Martinell Pedemonte

Per optar al grau de Doctor en Ciències Químiques per la Universitat de Barcelona

Revisada per:

Dr. Ernest Giralt i Lledó

Programa de Doctorat: Química Orgànica

Bienni: 2000-2002

Barcelona, febrer del 2004

Finalment, després de més de quatre anys de laboratori i uns quants mesos de reclusió escrivint aquest munt de fulls, sembla que el "viatge" arriba a la fi. Un viatge que va començar en una reunió al despatx del Dr. Ernest Giralt on li vaig comentar que m'agradaria poder fer una tesi al seu grup. Gràcies Ernest per permetre'm participar en aquest projecte, gràcies per ensenyar-me aquest món de la recerca i gràcies pels teus ànims i empena, sobretot en els mals moments.

Però aquest viatge no l'he fet tot sol, sinó que he tingut la sort de poder-lo compartir amb MOLTA gent que ha anat passant pel laboratori durant tots aquests anys. M'agradaria començar per agrair-li al Dr. Fernando Albericio tots els seus "Martinell! Com va tot?", que han sigut un munt. Tampoc no vull oblidar-me de tots els altres "jefes" que han format part del grup durant aquest anys com el Dr. Ernesto Nicolás, al qual he atabalat força últimament..., el Dr. Paul Lloyd-Williams, el Dr. David Andreu, el Dr. Miquel Pons i la Dra. Mercedes Álvarez. I també tots els d'oligos, Dra. Anna Grandas, Dr. Enrique Pedroso i Dr. Jordi Robles.

Quan penso amb tota la gent que he compartit el dia a dia del laboratori, la veritat és que em perdo... Durant aquest temps hem estat molts els que hem anat arribant i marxant, alguns de pas per unes setmanes o pocs mesos i d'altres durant uns anys. Tinc ganes de poder agrair a tothom el temps compartit, però segur que se m'escapa algú, així que abans de tot, GRÀCIES A TOTS! En la part inicial del viatge, em vaig trobar un laboratori amb gent que ja ha anat marxant. Per exemple, la M.Luz, la Montse del Fresno, la Cris Chiva, l'Eva etc. o l'Alberto Adeva, tot i que encara ronda pel lab fent pèptids sense parar. O la Mele, que espero que en la seva nova vida com a profe trobi el que sempre ha estat buscant. I els "erremener@s" Mac, Òscar i Anna Codina. També la Lia, la millor mestra de síntesi que hi ha, o la Paula, la referent del Biacore. O la Laia i el Xavi que segur que estan disfrutant la vida a Cambridge. I el Pau, que segurament a hores d'ara deu estar esquiant a Grenoble. D'entre tots ells, he trobat especialment a faltar bons amics que han marxat cap a la "capital". Com la Lore, que sempre està a punt per escoltar i donar un cop de mà, o l'Àngel, que va marcar un estil... bé, excepte jugant a futbol... Cap a una de les capitals d'Europa, també hi ha marxat el Javi, probablement la persona amb el cor més gran que conec, sort que sembla que torna aviat! I tampoc no m'oblido d'altres "torpedillos" amb els que sempre es riu una estona com el Feman i la Marta o la Laura, l'Alberto, la Judit i la Mari Rosi. Però per torpedillo, el Kalamar! amb un humor tan negre com la tinta que corre per les seves venes... I la Montse-Montse, sense ella el café no és el matí. Tampoc m'oblido del Josep M^a i de la Marta Vilaseca, amb qui he compartit "patiments" amb el 514 i la Prodigiosina. Ni de la Laia, la presidenta vitalícia del PIMCO, què fariem sense la teva organització?!

Però la roda no para mai, i en el laboratori encara hi ha un munt de gent amb la qui he compartit de tot i que m'agradaria recordar... Com el Rubén "Buenafuente", t'he dit que vaig falsificar la firma? O el "capi" del dream team el Marcus Minus. També tota la resta dels "os mais procurados" com són l'Yras, el Farrera, la Mònica, la Sònia i l'Àngela, sense oblidar la Miriam! Però, si hi ha alguna cosa que sigui d'agradar del Parc, és l'estupenda terrasseta, i m'alegro d'haver-hi compartit tants dinars i discussions transcendentals amb la Natàlia, la Núria Bayó i l'Ariadna, o els dubtes existencials de la Carol, així com tots els moments amb la gent de lab de 100, Estela, Marta (quant tornarem a rebre mails "Made in Marfil"?), Abdú, Pablo, Núria Parera i Celia. D'entre la colla de gent amb la que vaig començar aquest viatge m'agradaria destacar els companys de congrés a Sorrento, Glòria, Jose P. (o Josep?) i Txell, no està mal el limoncello de Sant Agnielo, eh? I per companys de viatge, la Cris Ausin, el Ricard i el Miquel. Sort que el sargent Velasco va ser simpàtic... llàstima que a Las Vegas no tinguéssim tanta sort!! Parlant de viatges, si hi ha algú hospitalari, aquest és el Greg! Però pel laboratori encara hi queda molta altra gent amb qui he compartit aquests últims mesos al parc, com la Sílvia Frutos, sí... et deixo mirar el mail, o la Dolors, que sí que ve d'Arbeca! O la Tere, que ens ha fet descobrir la biologia, i la merengue Pili que de moment pot estar tranquil·la, però tot arribarà... i el Natxo, sempre amb una pregunta intel·ligent ben apunt. A l'altre punta del lab, també hi ha gent com el Jesús, un altre crack mediàtic del futbol, o la Martina, que aconseguirà que tots acabem menjant chile! Controlant-ho tot, la Jimena, tan seria que semblava al principi... I l'omnipresent Marcelo, que en sap de tot! Quina llàstima que marxi cap a Xile! Tampoc m'oblido de les "noves generacions" com la Sílvia, la Susana, l'Esther, l'Albert, la Fayna o l'Eduard, ni de tots els altres que ja fa més que corren pel lab com la Natàlia C., Jan, Javi, Tomasso, Giovanna, Luis-Javier, Jean-Claude, etc.

Però, aquest ha estat un llarg viatge, i és per això que també hi ha molta altra gent que no em vull deixar d'anomenar. Com els encara integrants de lab 1, Òscar P. i Mònica, o la Mireia, quin viatge deu estar preparant?... O tota la colla del laboratori de biomolècules, Jesús, Eric i David, el "golejador" del dream team. I també tots els oligos, com el Joan, aquest sí que fa gols!, o la Berta, quin serà el pròxim 3.000?, i el Dani, Sònia, Vicente, Núria E., etc.

Però una de les coses per les quals estic més agraït, és per l'oportunitat que he tingut de conèixer altres laboratoris. Al Dr. Mauricio G. Mateu, li dec quasi tot el que he après de biologia molecular i per això m'agradaria agrair-li la seva hospitalitat, així com la dels membres del laboratori del Dr. Esteban Domingo. A la Dra. Dolors Ludevid i a la resta del seu laboratori, els hi voldria agrair tota la seva ajuda en l'expressió de la p53. També m'agradaria agrair-li a la Dra. Margarita Menéndez tot el seu esforç, sort n'he tingut de la seva ajuda! I al Dr. Ricardo Pérez-Tomás i al seu grup de Bellvitge, sobretot la Tiz, per tots els bons moments que hem passat amb la història de la prodigiosa i el 514.

En aquest sentit m'agradaria agrair especialment al Dr. Jeffrey W. Kelly que em donés l'oportunitat de treballar uns mesos al seu laboratori de San Diego. Allí vaig tenir la sort de poder-hi conèixer gent com l'Amy, Kid, Luke, Evan, Gina, Songpon, Ted, Mary Beth, Sara, Nora, Steve, Yoshi, Mike, Doug etc. els quals em van acollir la mar de bé. I també el Roberto, el meu "roomy" a l'Avenida Navidad.

Per sort, però, durant tot aquest llarg viatge també hi ha hagut temps per altres coses, i és per això que no vull deixar d'agrair a tots els amics amb els qui comparteixo el temps lliure. Sense tots ells, seria molt més difícil tirar endavant, sobretot quan les coses no surten com t'esperes... Gràcies a tots els del "cau", Ferran, Clara, Roger, Oriol, Marc, etc. i tots els de la Uni, Ignasi, Natàlia, Cris W., Sílvia, Cris F, Rosa, etc. Sense oblidar tota la colla la de Sant Pol, gràcies per fer-me sentir com a casa! I també tota la colla de Sant Feliu amb els que hem compartit, sobertot, les nits d'aquests estius.

No seria just per part meua, acabar aquestes línies sense un agraïment especial per l'informàtic que em va salvar tota la informació del disc dur de l'atac d'un virus a falta d'una setmana per dipositar aquesta tesi... gràcies!

Uf, deu ni dó el munt de gent que he anomenat! Tot i que els deixi pel final però, sobretot vull agrair als meus pares i germans, així com la resta de la família el seu suport incondicional. Se que sovint sóc de poques paraules i no mostro gaire el que sento, però la veritat és que m'heu ajudat molt a tirar endavant i sense tots vosaltres avui no estaria assentat davant l'ordenador escrivint l'última pàgina de la tesi. Gràcies! Gràcies també a tota la família Haro Tobalina!

Per últim, m'agradaria dedicar aquestes línies a agrair a la Marissa que hagi estat en tot moment al meu costat. Gràcies Marissa pel teu consell, suport i ajuda, gràcies per aguantar totes les meves crisis (que han estat moltes aquests mesos!) i gràcies per fer que cada dia valgui més la pena.

ÍNDEX

ABREVIATURES I ANNEXOS	1
INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS	13
0.1 Interaccions proteïna-proteïna	16
0.2 Modulació de contactes proteïna-proteïna	22
0.2.1 Genètica química	23
0.2.2 “Phage display”	25
0.2.3 Anticossos monoclonals	26
0.2.4 Pèptids de la interfase	26
0.2.5 Lligands de disseny	31
0.2.5.1 Reconeixement de pèptids model	32
0.2.5.2 Reconeixement de superfícies proteiques	34
0.3 P53	36
0.3.1 Estructura i funció	36
0.3.2 Domini de tetramerització	39
0.4 Objectius	41
CAPÍTOL 1 P53_TETS	43
1.1 Obtenció del domini de tetramerització de la p53	45
1.1.1 Expressió	46
1.1.1.1 Expressió sense marca isotòpica	47
1.1.1.2 Expressió amb marca isotòpica	48
1.1.2 Purificació	48
1.1.2.1 Bescanvi iònic	49
1.1.2.2 Exclusió molecular	50
1.1.2.3 Dessalat	51
1.1.2.4 Emmagatzematge	52
1.1.3 Caracterització i quantificació	52
1.1.3.1 Rendiment	52
1.1.3.2 Puresa	53
1.1.3.3 Caracterització	53
1.1.4 Preparacions realitzades	56
1.2 Estabilitat	57
1.2.1 Control estabilitat química	57
1.2.2 Control estabilitat estructural	58

1.3	El motiu hidrofílic	59
CAPÍTOL 2	CAP DE SÈRIE	65
2.1	Estratègia	67
2.1.1	Introducció al modelat molecular	68
2.1.1.1	Minimització energètica	70
2.1.1.2	Dinàmica molecular	71
2.1.2	Introducció a la fluorescència	74
2.1.2.1	Fluorescència i proteïnes	75
2.1.2.2	Fluorescència i p53_tetS	77
2.2	Aproximació helicoidal	78
2.2.1	Disseny	79
2.2.1.1	Plantejament inicial	79
2.2.1.2	Optimització del disseny	80
2.2.1.3	Avaluació <i>in silico</i> ((MD-SA)	81
2.2.2	Síntesi	82
2.2.3	Avaluació preliminar	83
2.2.4	Conclusió	84
2.3	Aproximació lineal	84
2.3.1	Disseny	84
2.3.1.1	Plantejament inicial	85
2.3.1.2	Optimització del disseny	85
2.3.1.3	Avaluació <i>in silico</i> ((MD-SA)	86
2.3.2	Síntesi	87
2.3.3	Avaluació preliminar	88
2.3.4	Síntesis posteriors	90
CAPÍTOL 3	AVALUACIÓ	93
3.1	Ressonància magnètica nuclear	96
3.1.1	Experiments basats en els senyals de la proteïna	97
3.1.1.1	[1H-15N]-HSQC	98
3.1.1.2	Conclusió	105
3.1.2	Experiments basats en els senyals del lligand	106
3.1.2.1	Assignació del pèptid Candidat 4	107
3.1.2.2	“Saturation Transfer Difference” (STD)	108
3.1.2.3	“Transferred NOE” (trNOE)	109
3.1.2.4	Conclusió	110

3.2	Ressonància de plasmó superficial	111
3.2.1	Biacore	111
3.2.2	Condicions experimentals	115
3.2.3	Experiments realitzats	118
3.2.3.1	Xips tipus CM5	118
3.2.3.2	Xips C1	121
3.2.3.3	Xips HPA	126
3.2.4	Conclusió	129
3.3	Espectroscòpia de fluorescència	130
3.3.1	Avaluació en aigua a pH 7	131
3.3.2	Experiments de competició	134
3.3.3	Conclusió	136
3.4	Microcalorimetria	136
3.4.1	Fonament de la tècnica	137
3.4.2	Experiments realitzats	139
3.4.3	Conclusió	142
3.5	Discussió	143
CAPÍTOL 4	OPTIMITZACIÓ DEL LLIGAND	149
4.1	Preparació de la quimioteca	151
4.1.1	Disseny	152
4.1.1.1	Estratègia	152
4.1.1.2	Punts de diversitat	153
4.1.2	Síntesi	159
4.1.2.1	Generació 1	161
4.1.2.2	Generació 2	162
4.1.2.3	Generació 3	165
4.1.2.4	Generació 4	172
4.1.3	Purificació	174
4.1.3.1	Elecció de la columna	174
4.1.3.2	Purificació de la quimioteca	177
4.1.4	Quantificació	178
4.1.5	Conclusió	179
4.2	Avaluació de la quimioteca	181
4.2.1	Metodologia	181
4.2.2	Resultat	183
4.2.3	Discussió	185

CAPÍTOL 5	LÍNIES DE FUTUR	195
CONCLUSIONS		205
PART EXPERIMENTAL		211
0	Materials i mètodes	213
0.1	Principals dissolvents i reactius	213
0.2	Instrumentació general	215
0.3	Síntesi i purificació de pèptids	216
0.3.1	Estratègia Boc/Bzl	216
0.3.2	Estratègia Fmoc/ ^t Bu	218
0.3.3	Mètodes analítics	219
0.3.4	Purificació	220
1	Part experimental capítol 1	222
1.1	Expressió p53 _{tetS}	222
1.2	Purificació p53 _{tetS}	225
2	Part experimental capítol 2	228
2.1	Modelat molecular	228
2.2	Síntesi dels pèptids	228
2.2.1	Candidat 2	228
2.2.2	Candidat 4	229
2.3	Espectroscòpia de fluorescència	231
2.3.1	Consideracions generals	231
2.3.2	Candidat 2	231
2.3.3	Candidat 4	231
3	Part experimental capítol 3	233
3.1	Ressonància magnètica nuclear	233
3.1.1	Consideracions generals	233
3.1.2	[¹ H- ¹⁵ N]-HSQC	233
3.1.3	TOCSY i NOESY	234
3.2	Ressonància de plasmó superficial	234
3.2.1	Xips CM5	235
3.2.2	Xips C1	235
3.2.3	Xips HPA	236
3.3	Espectroscòpia de fluorescència	237
3.4	Microcalorimetria	238

4	Part experimental capítol 4	239
4.1	Síntesi de la quimioteca	239
4.1.1	Tronc comú	239
4.1.2	Generació 1	240
4.1.3	Generació 2	249
4.1.4	Generació 3	252
4.1.5	Generació 4	257
4.1.6	Escissió i desprotecció	258
4.2	Purificació de la quimioteca	258
4.3	Espectroscòpia de fluorescència	260
5	Part experimental capítol 5	261
	APÈNDIX	263

ABREVIATURES | ANNEXOS

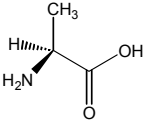
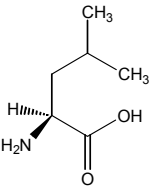
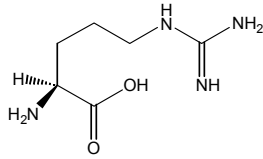
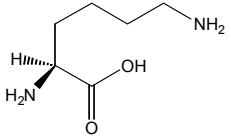
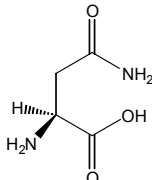
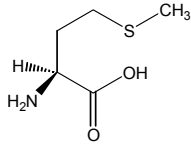
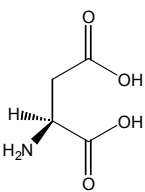
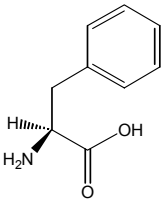
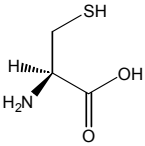
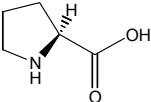
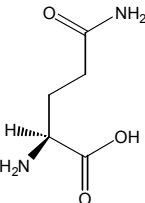
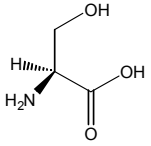
ABREVIATURES

aa	Aminoàcid
ACH	Àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic
ACN	Acetonitril
Ac₂O	Anhídrid acètic
AcOH	Àcid acètic
ADN	Àcid desoxirribonucleïc
APS	Persulfat amònic
Biotina-DSPE	<i>N</i> -(Biotinil)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal sòdica
Biotin-OSu	Biotinil- <i>N</i> -hidroxisucciniimidil éster
Da	Dalton
DBU	1,8-diazobiciclo[5.4.0]undec-7-è
DC	Dicroïsme circular
DCM	Diclorometà
Deg	Graus sexagesimlas
DHB	Àcid 2,5-dihidroxibenzoïc
DIEA	<i>N,N'</i> -etilidiisopropilamina
DIPCDI	<i>N,N'</i> -diisopropilcarbodiimida
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMPC	1,2-dimiristolil-sn-glicero-3-fosfocolina
DMSO	Dimetilsulfòxid
DTT	1,4-ditiotreitòl
EDC	<i>N</i> -etil- <i>N'</i> -(dimetilaminopropil)carbodiimida
EDT	Etanditiol
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
ELISA	Assaig immunoabsorbent d'enzim lligat
Eq	Equivalent
ETH	Etanolamina
Et₂O	Éter dietílic
EtOH	Etanol
f_{inicial}	Funcionalització inicial
FPLC	Cromatografia líquida de proteïnes ràpida
h	Hores
HATU	Hexafluorofosfat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -{(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5- <i>b</i>]piridin-1-il-metilen}- <i>N</i> -metilmetanamini
HBS	Tampó d'HEPES salí
HEPES	Àcid 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etansulfònic
HF	Fluorur d'hidrogen
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol

HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
HPLC-MS	Cromatografia líquida d'alta pressió acoblada a espectrometria de masses
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosid
ITC	Valoració calorimètrica isotèrmica
k_a	Constant d'associació
K_A	Constant d'afinitat (associació)
k_d	Constant de dissociació
K_D	Constant d'afinitat (dissociació)
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
LB	Luria-Bertani
λ	Longitud d'ona
MALDI-TOF	Espectrometria de masses amb ionització per desorció amb làser sobre una matriu i anàlisi per temps de vol
MES	Àcid 2-(<i>N</i> -morfolino)etansulfònic
MBS	<i>m</i> -maleimidobenzoil- <i>N</i> -hidroxisuccinimida
MeOH	Metanol
min	Minuts
MPLC	Cromatografia líquida de mitja pressió
TBME	<i>tert</i> -butilmetilèter
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
nm	Nanòmetre
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
NOE	Efecte nuclear overhauser
PBS	Tampó fosfat salí
PIPES	Sal sòdica de l'àcid 1,4-piperazinbis(etansulfònic)
PyAOP	Hexafluorofosfat de 7-azabenzotriazol-1-il- <i>N</i> -oxi-tris(pirrolidino)fosfoni
PyBOP	Hexafluorofosfat de benzotriazol-1-il-oxi-tris(pirrolidino)fosfoni
RMN	Ressonància magnètica nuclear
rpm	Revolucions per minut
RPS	Ressonància de plasmó superficial
RU	Unitats de ressonància
s	Segons
SA	Àcid sinapínic
SDS	Dodecilsulfat de sodi
SDS-PAGE	Dodecilsulfat de sodi – gel d'electroforesi de poliacrilamida
SPPS	Síntesi de pèptids en fase sòlida
STD	"Saturation Transfer Difference"
TBTU	Tetrafluoroborat de <i>N</i> -òxid de <i>N</i> -[(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]- <i>N</i> -metilmetanamini
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametilendiamina
TFA	Àcid trifluoroacètic
tr	Temps de retenció
Tris	tris-hidroximetilaminometà
trNOE	"Transferred NOE"
UV-Vis	Ultraviolat-visible
V	Volts

ANNEXOS

A.1 Aminoàcids naturals

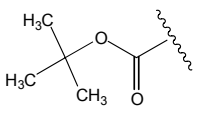
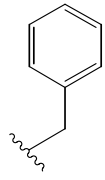
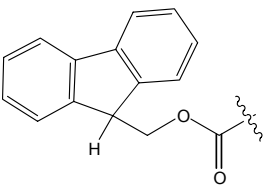
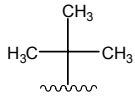
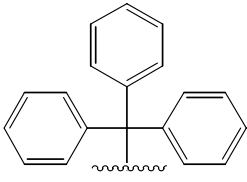
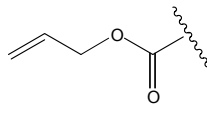
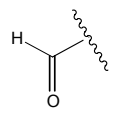
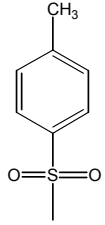
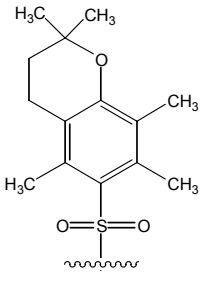
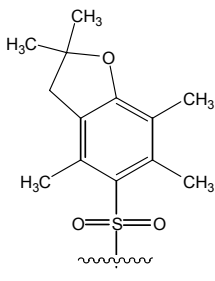
Aminoàcid	Estructura	Aminoàcid	Estructura
Alanina (Ala, A)		Leucina (Leu, L)	
Arginina (Arg, R)		Lisina (Lys, K)	
Asparagina (Asn, N)		Metionina (Met, M)	
Àc. aspàrtic (Asp, D)		Fenilalanina (Phe, F)	
Cisteïna (Cys, C)		Prolina (Pro, P)	
Glutamina (Gln, Q)		Serina (Ser, S)	

Aminoàcid	Estructura	Aminoàcid	Estructura
Àc. glutàmic (Glu, E)		Treonina (Thr, T)	
Glicina (Gly, G)		Triptòfan (Trp, W)	
Histidina (His, H)		Tirosina (Tyr, Y)	
Isoleucina (Ile, I)		Valina (Val, V)	

A.2 Resines

Resina	Estructura
p-MBHA 4-metilbenzidrilamina	
Rink amida MBHA 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-4-metilbenzidrilamina	

A.3 Grups protectors

Nom	Estructura	Nom	Estructura
Boc <i>t</i> -butoxicarbonil		Bzl benzil	
Fmoc fluorenilmetoxicarbonil		^tBu <i>t</i> -butil	
Trt tritol		Alloc al·liloxicarbonil	
For formil		Tos tosil	
Pmc 2,2,5,7,8- pentametilcroman-6- sulfonil		Pbf 2,2,4,6,7,- pentametildihidroxibenzofuran- 5-sulfonil	

A.4 Programes bàsics utilitzats en els càlculs de modelat molecular

En aquests exemples, no s'hi inclouen les ordres utilitzades per introduir restriccions en el càlcul.

Minimització energètica

```
#BIOSYM btcl 3
#
# Input File For Discover Generated By Insight 95.0
# Date:          Mon Dec 13 16:58:09 1999
# User Name:    marc
# Host Name:    susanita.qo.ub.es
# Host Type:    iris
#
# System Name:  CANDIDAT2_P53
#
#Stage Name: 1  begin
begin
#
#Stage Name: 2  nonbonds
forcefield nonbond \
  -separate_coulomb \
  vdw \
    summation_method = atom_based \
    cutoff = 12 spline_width = 1.0 buffer_width = 0.5 \
  coulomb \
    -distance_dependent_dielectric \
    dielectric_value = 1.0
#
#Stage Name: 3  forcefield
forcefield \
  select = "cvff_nocross_nomorse" \
  parameters \
  +bond_automatic \
  +angle_automatic \
  +torsion_automatic \
  +oop_automatic \
  +print_automatic \
  +bond_stop \
  +angle_stop \
  +torsion_stop \
  +oop_stop \
  -cross_stop
#
#Stage Name: 12 minimize
minimize \
  iteration_limit = 30000 movement_limit = 0.200 \
  cg \
    convergence = 0.1 method = polak \
    line_search_precision = 0.100 \
  final_convergence = 0.1
#
writeFile coordinate filename = .cor
```


Dinàmica molecular

```

#BIOSYM btcl 3
#
# Input File For Discover Generated By Insight 95.0
# Date: Mon Nov 22 11:12:57 1999
# User Name: marc
# Host Name: manolito.qo.ub.es
# Host Type: iris
#
# System Name: CAN4_P53 , estructures minimitzades dels candidats
# Dinamica dels candidats amb p53 (3 cicles de 50ps)

# Procediments especials:

proc cent {a b} {
  expr $a+$b
  global loop1
  readfile archive filename = CAN4_P53.arc frame = $loop1}
#
proc doscents {a b} {
# initialize dynamics
  expr $a+$b
dynamics \
  time = 100 timestep = 1.0 \
  initial temperature = 1 +boltzmann \
  ensemble = nvt temperature_control_method = velocity_scaling \
  integration_method = Velocity_verlet \
  temperature = 600 temperature_window = 10 \
  deviation = 5000 \
  execute frequency = 100 last_step = 100 \
  command = {print history} \
}
#
proc trescents {a b} {
# resume dynamics
  expr $a+$b
dynamics \
  time = 1000 timestep = 1.0 -boltzmann \
  ensemble = nvt temperature_control_method = velocity_scaling \
  integration_method = Velocity_verlet \
  temperature = 600 temperature_window = 10 \
  deviation = 5000 \
  execute frequency = 200 last_step = 1000 \
  command = {print history} \
}
#
proc tresbis {a b} {
  global loop1
  set loop1 [expr $loop1+$a+$b]
  writefile archive filename = CAN4_P53.arc frame = $loop1
}
#
proc quatrecent {a b} {
  global loop1
  set loop1 [expr $loop1+$a+$b]
  readfile archive filename = CAN4_P53.arc frame = $loop1
}
#
# minimize
  minimize \
  iteration_limit = 300000 movement_limit = 0.200 \
  sd \
  convergence = 10 line_search_precision = 0.100 \
  cg \
  convergence = 0.01 method = polak \
  line_search_precision = 0.100 \
  final_convergence = 0.01 \
  execute frequency = 100 \
  command = {print output \
  +potential_energy}
#
#Stage Name: 120 file control
  writefile archive filename = CAN4_P53 frame = $loop1
}
#
#Stage Name: 1 begin
  begin
#
#Stage Name: 2 nonbonds
  forcefield nonbond \

```

```

-separate_coulomb \
vdw \
  summation_method = atom_based \
  cutoff = 12 spline_width = 1.0 buffer_width = 0.5 \
coulomb \
  +distance_dependent_dielectric \
  dielectric_value = 4 \
  summation_method = atom_based \
  cutoff = 12 spline_width = 1.0 buffer_width = 0.5
#
#Stage Name: 3 forcefield
forcefield \
  select = "cvff_nocross_nomorse" \
  parameters \
  +bond_automatic \
  +angle_automatic \
  +torsion_automatic \
  +oop_automatic \
  +print_automatic \
  +bond_stop \
  +angle_stop \
  +torsion_stop \
  +oop_stop \
  -cross_stop
#
#Stage Name: 4 =
$loop1 = 0
while {$loop1 < 150} {
#
#Stage Name: 5 if
if {$loop1 > 0} { cent 2 2 }
doscents 2 2
trescents 1 0
tresbis 1 0
#
#Stage Name: 6 for
for {$loop2 = 1} {$loop2 < 50} {incr loop2} {trescents 1 0
tresbis 1 0}
#
#Stage Name: 7 =
$loop1 = $loop1-50
#
#Stage Name: 8 minimize
quatrecent 1 0
#
#Stage Name: 9 for
for {$loop2 = 1} {$loop2 < 50} {incr loop2} {quatrecent 1 0}
#
#
#Stage Name: 10 output
writeFile coordinate filename = .cor
#
#Stage Name: 11 end
}

```

A.5 Mètode bàsic de programació dels cicles d'anàlisi mitjançant Biacore

Exemple representatiu del mètode utilitzat per analitzar una mostra de p53_tetS 75nM en dues superfícies, una amb pèptid immobilitzat (fc2) i una de referència (fc1):

```

!-----
!CAN4, xip C1-1 fc2 (100 RU imob) i fc1 (blanc);
!-----

!*****
! LOOPS
!*****

DEFINE LOOP p53

    LPARAM %conc    %position
    TIMES 1

                75nM    r1a1

END

!*****
!  APROG
!*****

DEFINE APROG inyeccion
    PARAM %conc    %position
    FLOW 60 -f
    INJECT r2f6 60
    KEYWORD concentracion %conc
    KINJECT %position 120 360
    INJECT r2f5 60
    EXTRACLEAN
    WASH i
    WASH n
    INJECT r2f7 60

END

!#####
! EJECTABLE
!#####

MAIN

    RACK 1 THERMO_B
    RACK 2 THERMO_A

    FLOWCELL 2

        LOOP p53 ORDER
            APROG inyeccion %conc    %position
        ENDLOOP

        PRIME

    FLOWCELL 1

        LOOP p53 ORDER
            APROG inyeccion %conc    %position
        ENDLOOP

        PRIME

    APPEND continue

END

```

