

USE OF CALIX[4]ARENES TO  
RECOVER THE SELF-ASSEMBLY  
ABILITY OF MUTATED p53  
TETRAMERIZATION DOMAINS

Susana Gordo Villoslada

2008



Memòria presentada per

Susana Gordo Villoslada

per optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona

Revisada per:

Prof. Ernest Giralt i Lledó

Universitat de Barcelona

Director

Programa de Química Orgànica

Bienni 2003-2005

Barcelona, abril de 2008



Als que m'estimo.

Pleasure in the job puts perfection in the work

*Aristotle (384BC – 322BC)*



## LA OTRA MEMORIA DE LA TESIS

Ésta tesis es algo más que 300-y-pico páginas. Es algo más que un puñado de experimentos, la mayoría de los cuales nunca verán la luz. Ésta tesis ha sido mi vida durante estos últimos años y aunque no se ven, guarda muchos sacrificios y demasiados esfuerzos. Para haber significado tanto, la verdad es que si empiezo a contar, me salen más disgustos que alegrías. Disgustos que te curten, que te hacen madurar en lo profesional y en lo personal, y que te abren los ojos y te enseñan que el mundo es injusto y trabajo no es siempre proporcional a recompensa. Pero durante estos años, durante todos esos disgustos, he tenido la suerte de encontrar a mi lado a personas maravillosas, personas que me han ayudado, me han enseñado, me han apoyado, me han divertido, me han emocionado, me han hecho sentir querida y ser **feliz**, y a las que ni con 300 ni 3000 páginas podría decir todo lo que siento y lo mucho que agradezco haberles conocidos. Vosotr@s, mi tesoro, también sois parte de ésta tesis.

Ya va camino de 5 años que aquella pueblerina Susanita –pura química orgánica de formación y a mucha honra– aterrizó en el *super-fashion* Parc Científic de Barcelona, en un grupo en el que todavía se respiraba aquel buen rollo del llamado *grup 10 del departament*. Después de los *never-ending cursos de doctorat*, y de perder los dos primeros años de experimental con cosas que no salían y aprendiendo técnicas que luego no volvería a utilizar (qué vergüenza de DEA...) llegaron, como caídos del cielo (del cielo entre Madrid y Tarragona, claro!), unos calixarenos que salvaron mi tesis (y mi moral!). Tras la breve e intensa conquista de las Américas, llegó el fatídico último año. Nada salía, los equipos se estropeaban, los resultados no se entendían... pero que se podía esperar de un año que empezó “de culo” –lo siento, no queda muy educado, pero literalmente es así como empezó. Entonces llegaron los forzados meses de clausura, leyendo y analizando, analizando y leyendo, esperando una “idea feliz”. Y después de tanto tiempo, llegó el momento de escribir. El parto fue agonizante, sin epidural, y la criaturita, pobrecilla, nació muy prematura con lo que le toco pasar un buen tiempo de incubadora a base de cuidados intensivos. Y aquí está! Sí, lo sé, me ha salido un poco peculiar (como su madre!) y sé que tiene un poco de sobrepeso, *però jo me l'estimo igual!*

Y después de esta historia, ya es hora empezar a homenajear a los compañeros de viaje.

Començaré, *como no*, pel “jefe”. **Ernest**, gràcies per donar-me un lloc al teu laboratori, per deixar-me fer i desfer amb tanta –pot ser massa– llibertat, per no queixar-te per les factures que devien arribar al meu nom, i per fer-me de “mecenes” i donar-me la oportunitat de conèixer món.

Es obligado seguir por el salvador de mi naufragio, el capitán **de Mendoza**. Javier, nada de lo que hay aquí habría sido posible sin tus calixarenos. No te puedes imaginar lo que sentí cuando obtuve mi primer resultado positivo después de años de penuria. *I'm indebted to you*. Espero haber correspondido como tocaba en ésta colaboración. Lástima del tema publicaciones...

Y, claro está, el capitán dio las órdenes pero el trabajo fue de su grumete. **Vera**, gracias. Sé que las síntesis no fueron fáciles y cada miligramo de producto lo trataba como si fuera oro. Lamento no haberte tenido más al día de los resultados (soy un desastre...).

No me quiero ir del barco sin agradecer (y pedir disculpas) a mi pobre **Julián**, que hizo un trabajo genial diseñando y sintetizando un montón de *guanis* con las que no he podido jugar más y que se han quedado fuera de esta tesis. Deseo que el “nuevo tema” del DNA te dé buenos resultados (y si estás de bajón, pues nada coliflor, a recordar viejos tiempos de mails kilométricos!).

También quiero dar las gracias a la tercera parte del proyecto, **Eva y Carles**, a quien Javier lío con esto de los calix's y la p53 para hacer dinámicas moleculares.

Y ahora dirección a Madrid, donde se encuentra mi queridísima **Marga**. Sin interés alguno más que el de ser una buena persona, me abriste las puertas de tu laboratorio, me escuchaste, me enseñaste y me asesoraste. No tengo palabras para expresar cuanto agradezco todo lo que has hecho por mí, ni lo mucho que te admiro. No sé como podré devolvértelo. Siempre te lo digo, y es verdad, eres un sol! (tú y tus “nenas”).

Seguint amb el fil de col·laboradors, no em puc oblidar de la **Marta Vilaseca**. Mentre jo escrivia, ella es va dedicar a fer els experiments de masses que són la *guinda del pastel*. I tot i que ara ja m'hi he posat jo a fer cosetes, no sé que faria sense els teus coneixements. Gràcies Marta. (I també gràcies a la Núria.)

Al meu benvolgut **Ignasi Fita** també vull agrair-li per acollir-me al seu laboratori en les meves primeres passes cap a la cristal·lografia i donar-me l'oportunitat de conèixer a la seva gent. Vull fer especial homenatge a la **Rosa**, qui va estar al meu costat des del primer moment, ensenyant-me com era això tan *freaky* de penjar gotes i pescar cristalls. Em sap molt greu haver deixat "aparcada" la cristal·lografia per posar-me a escriure, però ara que sembla que això ja està *over*, tinc moltes ganes de tornar-hi i sí, penso cristal·litzar el complex!

També vull fer menció dels que van estar abans implicats amb això de la p53. Al **Marc** (Martinell), tot i que em va deixar soleta des de bon començament, vull agrair-li que m'ho deixes tot tan ben posadet amb la seva tesi; em sembla que cap altra persona la deu haver mirat tant com jo! I després tenim al **Xavi** (Salvatella). Tot i que generacionalment no vam coincidir al lab, vaig tenir la sort de conèixer-te (com a amic); qui t'ho havia de dir que acabaries com a suplent del meu tribunal!

I ara sí. **Sílvia**, no sé per on començar. LA meva amiga. Tu has estat al meu costat des del primer dia; encara recordo aquell moment, aquella nena llargaruda amb ulleres i bata de qui, *pa' variar*, l'Ernest no recordava el nom. Vaig tenir la sort de fer una mini-col·laboració amb tu i les teves cèl·lules; només espero poder-te agrair aquell temps que m'hi vas dedicar amb alguna publicació... (algún día llegarán!). Amb tu he après a ser bona persona (sí, encara que la gent no s'ho cregui!) i hem compartit moments molt feliços. Sempre t'has preocupat per mi i has estat el meu suport del dia a dia. Les penes... buah, millor no recordem les nostres frustracions per veure com d'injust pot ser el món; sabem que hi ha llocs on podem ser feliços i sentir-nos estimades. I tot i que acabarem separades per la distància, hem vist que això no és prou per trencar aquesta amistat. Sílvيا, de debò, res no hauria estat el mateix sense tu.  
*Arigato Shirubia-san.*

Desde México llegaron otros dos regalos a mi vida. La primera fue mi **Martina**, con quien compartí tantísimos buenos momentos (*in & out*) y tantísimos pasteles. Te me fuiste a la otra parte del mundo con tu **Marquitus**, pero un continente de por medio no ha sido suficiente para que me olvide de vosotros y perdamos el contacto. Cuento los días para que nos volvamos a ver. Después, desde el DF, llegó mi güerito, mi **Nessim**. Aih Kichikito... me alegro tanto de haberte conocido, te agradezco tanto haberme hecho reír, haberme acompañado en tantos ratos y tantos lugares y, por supuesto, haberme ayudado tanto! Espero que tomes buena nota de mis consejos (sabe más el diablo por viejo que por diablo) y, no querría perderte nunca.

I arribem a la meua **Teresita**. La mama-POP. La meva *bio-mentor*. Sense cap interès, sempre has tingut un moment per ajudar-me amb això del món bio. Has estat el meu model, una companya de lab "estupendíssima" i competent de mena, i una persona excel·lent. Formes part d'aquest grup de persones amb les que sempre tindrè un deute pendent, i no hi ha prou bombons ni galetetes per demostrar-ho. Encara que no apareguis en els formalisme d'aquesta tesi, a la teva manera també m'has dirigit i corregit. Només puc desitjar-te el millor del món.

Continuando con la saga POP, es turno de mi rubia preferida, la uuuuuju-Fraud **Birgit**. Esta alemana-poco-alemana que nunca dejaba de sorprendernos y que irradiaba felicidad. Gracias a ti tengo esos resultados de STD tan fantásticos, y lo más importante, tengo un montón de buenos y felices recuerdos. El lab sin ti no es lo mismo. A ver cuando vamos a hacer un picnic a los Alpes!

Pels temps que fa que ens coneixem, **Albert**, ara et toca a tu. Nou anys ja! Ho hem passat TOT junts i m'has ajudat tant... I què t'he de dir? Doncs només se m'acut allò de que, des de l'altre Cambridge, et trobaré a faltar! Ets un tio genial, un p...-crack, i facis el que facis, segur que triomfaràs.

Al **Fernando** i a la **Míriam** també els hi vull dedicar unes paraules. Vosaltres heu estat al meu costat durant aquests anys, fent-me de "papa" i de "germana gran". Us aprecio molt i sou un model a seguir. Gràcies pels consells, per la vostra proximitat i per fer menys solitaris els caps de setmana al Parc.

Otros nombres míticos que ya tardaba en mencionar son los de **Jesús** y **Jimena**. Recuerdo con muchísima nostalgia vuestro "reinado". Aquellos sí que fueron buenos tiempos! Jimena, fuiste un precedente que lamentablemente no tuvo continuación. Jesús, contigo además compartí muchos ratos, muchas charlas, muchas fiestas y muchas risas y todavía te echo de menos. Gracias a los dos por aquellos buenos tiempos.



Seguint amb els fonaments del lab, és torn de l'**Eva**. Ja sé que és la teva feina, però gràcies per fer-la tan bé i ser tan eficient! El laboratori no seria RES sense tu! I per si no fos prou, a sobre ets una maquíssima persona.

Sense la **Dolors**, la **Giovana** i la senyu-**Pili** res d'això tampoc hauria estat el mateix. Més enllà de companyes de laboratori, han estat amigues. Tot i que ara ja no formen part del meu dia a dia, els geladets de Sants i les "sessions-teràpia" continuen. Lolita, vull veure aquesta tesi acabada d'una vegada i no hi ha excuses perfeccionistes que valguin! Giovanita, qué bueno verte de nuevo. I Piluca, ets una artista, no una científica, i sempre em treus un somriure amb la teva forma de veure les coses.

Tot i que va ser breu, la meva petita **Gemma** també va deixar la seva marca. Et trobo molt a faltar, però m'alegro que finalment marxessis a un lloc on ets feliç. Gràcies per ser com ets! I espero haver-te ajudat durant aquells mesos de missèria... Tinc moltes ganes de tornar-te a veure.

Te n'adones que portes molt temps a un lloc quan mires al teu voltant i veus que ja queden pocs d'aquells que hi havia quan vas entrar. Bona part d'ells ja han sortit, però tampoc vull oblidar-me del **Jose Pastor** (mi profe de OBLs!), del **Ricard** (l'lastima que mai ens vam avenir gaire... però creu-me que t'admirava moltíssim, i agraija que hi hagués algú altre corrent pel lab els caps de semana o a hores intempestives, encara que no ens diguessim ni una paraula), del **Kalamar** (gracias por ser tan *kalamar* y haberme ayudado sin conocerme), de **Piere** (que después de un año, aprendió a hablar español espontáneamente!), de la **Montse-Montse**, de la **Nuria Bayó** (amb aquell bon rotllo que espero que no s'hagi glaçat amb el fred de Montreal) i tot i que no corria pel lab, el *newyorker* del **Miquel** també va formar part del grup.

Otros fueron más fugaces, pero también dejaron huella. Y aquí están mis portuguesas favoritas, **Eliana** y (mama) **Luisa**, junto a las que pasé momentos divertidísimos que, después de tanto tiempo, recordarlos todavía me provoca una sonrisa. *Moito obrigada*. Tampoco me olvido de **Cecilia**, **Mariela** (la bolisha), **Frank**, **Ele** (y sus modelitos), **Ivone**, **Ayman**, **Anna Picó**, **Ionara**, de los muchos "passa" que han pasado los veranos por el Parc ... y otros tantos que se me deben quedar en el tintero.

De vuelta a Can Giralt, queda gente a la que debo mencionar y agradecer por el día a día. Per aquell viatge inoblidable a Montpellier en un R5, i per haver començat junts en això, l'**Edu** es mereix ser el primer de la llista. Perquè llegirà tres dies abans que jo i perquè també em compartit molts moments *out-lab*, la **WonderStephanie**, aquesta catalana amb accent francès, vindrà la segona. Pel que et toca aguantar, Sant **Roger**, *here you are*. **Miguel**, no te he podido disfrutar mucho, pero por ser un vecino tan majete, por darme cháchara y porqué se te están encogiendo los telómeros, ahora es tu turno. I seguim amb DJ-papa-**Sergio**, amb la **Rosa** (la bona minyona), amb la **Muriel** (la AFM-minyona), amb la **Natalia** (que em va corretgir tants abstracts i tantes cartes), a la **Laura** (una periquita con rizos de anuncio), la **Irene** (mi link con mis "ya-no-tan-madrileños" Ali, Richar y Tahl), l'**Anna** i, tot i que per culpa dels seu pèptids vaig passar dos anys penosos, al **Natxo** i a la seva paella a les 5 de la matinada també els he de mencionar.

Mis vecinos de Can Fernando y Pharmamar, con su alegría y su compañerismo (y pese a estar ensardinados!), han ayudado a que todo sea más llevadero. Sois muchos y de verdad que no me quiero dejar a ninguno. Permitidme empezar por mi **Faynilla** (con quien pasé tantos buenos ratos y seguro que me va a dejar a Japón patas-arriba!) y el **Tommaso** (aunque eres un desastre y lo sabes, me has hecho mucha compañía). A **Carles**, **Eli**, **Jan** (Juanito), mama-**Judit**, **Gerardo**, **Leti** (ánimos, y tómate un respiro!), **Lorena**, **Marta** (Paradís), **Marta** (la Pelay!), **Miriam**, **Ramón**, la **Yesi**... a todos tendría algo que decirlos y mucho que agradecerlos. No cambiéis!

Del clan Fama-UQC *et al.*, sigo con mi amigo **Unai** (fuente inagotable de marujeos), el **Farrera**, el **Pauete**, la **Delia**, el **Dani**, la **Angela**,... sois tantos!

És moment de baixar a Can Pons, però aquest cop no farem servir ni la campana ni els incubadors. A Jaca i Tarragona, els meus *ponsitos* en van donar *grandes momentos para el recuerdo* (sí, sí, inclòs aquell dia empaquetant bosses-sense-bossa per 700 persones). **Arola**, **Jascha**, **Tiago**, **Carles**, **Pau**, **Giovanni**, *you're the best!*

I no em puc deixar de fer una visita als amics de Can Macías –la **Bego**, la **Lídia**, el **Roman** i la mítica **Ximena**– amb qui, tot i els rafi-rafes pel temps de RMN, sempre hi ha hagut molt bon rotllo.

Y seguimos para bingo! Ara toca recordar a la gent dels Serveis. Allà, a les catacumbes de RMN on tantes hores vaig passar, trobem a la meva amiga **Marga**, qui em va ensenyar això de fer *matching*, *tunning* i *shimming*, i amb qui vaig gaudir de les *tapichuelas* i del *tomate-con-tomate* de Jaca. En confocal, mimando a las celullillas, tenemos a **Nieves**. A citometria, hi ha el Jaume i al Ricard, que em van fer companyia en els meus dies de Biacore. A química fina, els Rafels, i a l'AFM, el carismàtic Isma.

Subimos al departamento, donde se encuentran **Ernesto Nicolás**, **María** y mis "niños" de prácticas, que ayudaron a hacer menos agónicas aquellas tres (injustas!) semanas de EQO.

Y ya que estoy por la facultad, no puedo olvidarme de mis olvidados royalitos! El Dr. **Franó**, la **Gema**, el **Cal-los**, la **Anna**, la Dra. **Isabel**, la **Ari**, el **Santi**... con quien pase toda la carrera y un viaje memorable a Egipto, y a los que sólo puedo pedir perdón por haber dejado de lado por culpa del trabajo...

**Eugenio**, a ti también te quiero dar las gracias. Sin saberlo, sin conocerme, tú cambiaste mi vida.

No words can describe my short visit to the Imperiali Lab at the MIT. **Barbara**, I'm very gratefull for your kindness and hospitality. **Anne**, **Angelyn**, **Beth**, **Brenda**, **Dora**, **Elvedyn**, **Langdon**, **Matthieu**, **Meredith** and **Wendy**, you were the reason of my happiness. I found a place where I fit and I am looking forward to coming back.

Finalmente, gracias a mis **padres** y a mi **hermano**. Óscar, el Dr. pajarero, gracias por acogerme en mis visitas a los Madriles, por cuidarme, y por esas charlas laaargas que no han podido ser tan frecuentes como me habría gustado. Paquita y Pablo, gracias por vuestros esfuerzos y vuestros sacrificios, y por darme lo que vosotros nunca tuvisteis. A vuestra manera también os ha tocado sufrir esta tesis.

May, 2008

susana.



## TABLE OF CONTENTS

## Abbreviations and annexes

## INTRODUCTION

1. In the network .....	3
1.1. Protein networks .....	5
1.2. Protein-protein interactions .....	6
1.3. Holes & knots. When something goes wrong .....	8
1.4. Untying knots and knitting tears: strategies to control the protein network .....	10
1.5. The example: protein p53 .....	13
1.6. Multivalency .....	17
1.7. Calixarenes .....	20
Bibliography .....	22
2. Biophysical methods .....	29
2.1. Nuclear magnetic resonance .....	31
2.2. X-ray crystallography .....	37
2.3. Circular dichroism .....	39
2.4. Differential scanning calorimetry .....	41
2.5. Isothermal titration calorimetry .....	43
2.6. Mass spectroscopy by electrospray ionization .....	45
Bibliography .....	47
Objectives .....	49

## RESULTS

1. The p53 tetramerization domain and its mutants .....	53
1.1. The tetramerization domain of p53 and its mutants: who they are .....	55
1.1.1. Mutant R337H .....	57
1.1.2. Mutant G334V .....	59
1.1.3. Mutant L344P .....	60
1.2. Obtaining the proteins .....	62
1.2.1. Recombinant p53wt tetramerization domain .....	62
1.2.2. Mutant G334V and R337H .....	63
1.2.3. Mutant L344P .....	65
1.2.4. Cutting the tails: synthetic p53 tetramerization domain .....	69
1.3. Biophysical characterization of the proteins .....	70
1.3.1. Circular dichroism .....	70

1.3.2. Differential scanning calorimetry .....	77
1.3.3. Nuclear magnetic resonance .....	81
1.3.4. Chemical cross-linking .....	86
1.3.5. Mass spectrometry by electrospray ionization .....	87
1.3.6. Crystallography .....	89
1.4. In summary .....	91
Bibliography .....	93
2. Calix4brige: a designed ligand for p53 tetramerization domain .....	97
2.1. Calix4bridge: the design .....	99
2.2. Thermal effects of calix4bridge on protein stability .....	102
2.2.1. Differential Scanning Calorimetry .....	102
2.2.2. Circular Dichroism .....	108
2.3. Structural characterization of the complex by NMR. Understanding the binding event .	113
2.3.1. NMR on the protein .....	113
2.3.1.1. $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -HSQC chemical shift perturbation by calix4bridge .....	113
2.3.1.2. $\text{NH}_2$ -calix4bridge by $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -HSQC perturbation .....	129
2.3.1.3. Up-field $^1\text{H}$ perturbation .....	135
2.3.2. NMR on the ligand .....	137
2.3.2.1. $^1\text{H}$ spectrum of calix4bridge .....	137
2.3.2.2. $^1\text{H}$ chemical shift perturbation and line broadening .....	137
2.3.2.3. $^1\text{H}$ Saturation transfer difference .....	143
2.3.2.4. Transferred nOe .....	148
2.4. Isothermal Titration Calorimetry .....	152
2.5. Towards the detection of the tetrameric complex .....	155
2.5.1. Protein chemical cross-linking .....	155
2.5.2. Mass spectrometry .....	157
2.5.3. Crystallography. First trials .....	160
2.6. Calix4bridge summarized .....	163
Bibliography .....	165
3. Calix4prop: an unexpected ligand for p53 tetramerization domain .....	167
3.1. Calix4prop: the origins .....	169
3.2. Differential Scanning Calorimetry .....	170
3.3. Circular Dichroism .....	173
3.4. NMR structural characterization .....	178
3.4.1. NMR on the protein .....	178
3.4.1.1. Chemical shift perturbation by $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -HSQC .....	178
3.4.1.2. The role of the upper rim .....	189
3.4.1.3. $^1\text{H}$ Up-field perturbation .....	192
3.4.2. NMR on the ligand .....	195
3.4.2.1. $^1\text{H}$ spectra .....	195
3.4.2.2. Transferred nOe .....	196
3.5. Isothermal titration calorimetry .....	199
3.6. Towards the detection of the tetrameric complex .....	201

3.6.1. Protein cross-linking .....	201
3.6.2. Mass spectrometry by electrospray ionization .....	204
3.3.3. Crystallography. First trials .....	206
3.7. Calix4prop overviewed .....	208
Bibliography .....	211
4. Other molecular recognition properties of the calixarenes compounds ..	213
4.1. Calixarenes and DNA molecular recognition .....	215
4.2. Calixarenes as transfectans for DNA delivery .....	218
4.3. Discussion .....	222
Bibliography .....	224
Future directions .....	225
CONCLUSIONS .....	229
EXPERIMENTAL SECTION	
1. Molecular biology for protein expression and purification .....	237
1.1. Site-directed mutagenesis .....	239
1.2. Cloning L344P into vector pETM11 .....	240
1.3. Protein expression .....	241
1.4. Protein purification .....	244
1.5. General protocols for molecular biology .....	245
Materials and reagents .....	249
2. Protein Chemical Synthesis .....	251
2.1. Solid phase peptide synthesis .....	253
2.2. Peptide cleavage and side-chain deprotection .....	254
2.3. Peptide purification .....	255
Materials and reagents .....	256
3. Biophysics .....	259
3.1. Nuclear magnetic resonance .....	261
3.2. Differential scanning calorimetry .....	265
3.3. Isothermal titration calorimetry .....	266
3.4. Circular Dichroism .....	267
3.5. Chemical cross-linking .....	268
3.6. EMSA .....	268
3.7. Electrospray ionization - Mass spectrometry .....	269

---

3.8. X-ray crystallography .....	270
Materials, reagents and biophysical instrumentation .....	271
4. Cell cultures and transient transfection .....	273
4.1. HeLa cellular cultures .....	275
4.2. MTT viability assay .....	275
4.3. HeLa transient transfection assays .....	276
4.4. Flow cytometry .....	276
4.5. Confocal laser scanning microscopy .....	276
4.6. Media and stocks .....	277
Materials and reagents .....	278
<b>Bibliography .....</b>	<b>279</b>
RESUMEN .....	281
Appendixes	
I. Calix[4]arenes synthesis and structural assessment .....	305
II. Supplementary material contents .....	311



# ABBREVIATIONS & ANNEXES





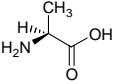
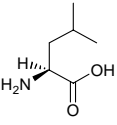
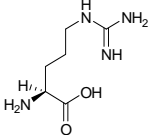
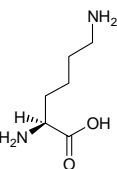
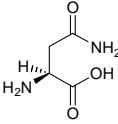
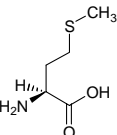
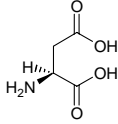
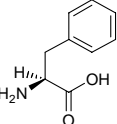
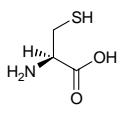
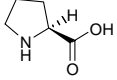
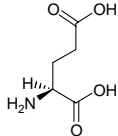
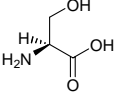
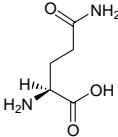
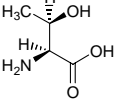
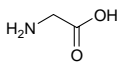
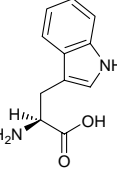
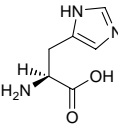
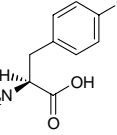
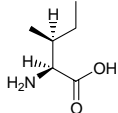
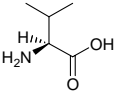
## ABBREVIATIONS

<b>AA</b>	amino acid
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	acetic anhydride
<b>ACC</b>	adrenocortical carcinoma
<b>ACH</b>	$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid
<b>ACN</b>	acetonitrile
<b>AcOH</b>	acetic acid
<b>ADME</b>	absorption, distribution, metabolism and excretion
<b>APS</b>	ammonium persulfate
<b>A.U.</b>	absorbance units
<b>CD</b>	circular dichroism
<b>Cl-HOBt</b>	6-chloro-1-hydroxy-1H-benzotriazole
<b>CLSM</b>	confocal laser scanning microscopy
<b>C<sub>p</sub></b>	heat capacity
<b>&lt;C<sub>p</sub>&gt;</b>	excess heat capacity (C <sub>p</sub> normalized to concentration)
<b>&lt;C<sub>p</sub><sup>tr</sup>&gt;</b>	unfolding transition excess heat capacity
<b>CSP</b>	chemical shift perturbation
<b>cv</b>	column volume
<b>DBD</b>	DNA binding domain (p53)
<b>DBU</b>	1,4-diazabicyclo[2.2.2]undecane
<b>DCM</b>	dichloromethane
<b>DIEA</b>	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
<b>D-MEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>DMF</b>	dimethylformamide
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid
<b>DSC</b>	differential scanning calorimetry
<b>EDC</b>	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide
<b>EDT</b>	1,2-ethanedithiol
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid
<b>EGFP</b>	enhanced green fluorescence protein
<b>eq</b>	equivalent
<b>ESI-MS</b>	electrospray ionization - mass spectrometry
<b>EtOH</b>	ethanol
<b><i>f</i><sub>B</sub></b>	bound fraction
<b><i>f</i><sub>F</sub></b>	free fraction
<b>Fmoc</b>	9-fluorenylmethoxycarbonyl
<b>FPLC</b>	fast protein liquid chromatography
<b><i>f</i><sub>u</sub></b>	unfolded fraction
<b>HCTU</b>	2-(6-chloro-1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylammonium hexafluorophosphate
<b>HeLa</b>	cell line derived from cervical cancer (taken from Henrietta Lacks, 1951)
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>His-tag</b>	(His) <sub>6</sub>
<b>HOBt</b>	<i>N</i> -hydroxybenzotriazole
<b>HPLC</b>	high pressure liquid chromatography

<b>HPLC-MS</b>	high pressure liquid chromatography – mass spectrometry detection
<b>HSQC</b>	heteronuclear single quantum coherence
<b>IPTG</b>	isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
<b>ITC</b>	isothermic titration calorimetry
<b>J</b>	coupling constant
<b>K<sub>A</sub></b>	association thermodynamic constant
<b>K<sub>B</sub></b>	binding thermodynamic constant (= K <sub>A</sub> )
<b>K<sub>D</sub></b>	dissociation thermodynamic constant
<b>k<sub>off</sub></b>	off-rate, dissociation kinetic constant
<b>k<sub>on</sub></b>	on-rate, association kinetic constant
<b>k<sub>sat</sub></b>	saturation kinetic constant
<b>L</b>	ligand
<b>LB</b>	Luria-Bertani medium
<b>LD<sub>50</sub></b>	lethal dose 50 (concentration for 50% mortality)
<b>m/z</b>	mass/charge
<b>MALDI-TOF MS</b>	matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flying mass spectrometry
<b>MDM2</b>	murine double minute protein
<b>MES</b>	2-( <i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
<b>MeOH</b>	methanol
<b>MS</b>	mass spectrometry
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
<b>MW</b>	molecular weight
<b>na</b>	not available
<b>NHS</b>	<i>N</i> -hydroxysulfosuccinimide
<b>NMP</b>	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidinone
<b>NMR</b>	nuclear magnetic resonance
<b>nOe</b>	nuclear Overhauser effect
<b>NOESY</b>	nuclear Overhauser effect spectroscopy
<b>O/N</b>	over night
<b>OPTI-MEM</b>	reduced serum modified Eagle's medium
<b>P</b>	protein
<b>p53</b>	gene codifying protein p53
<b>p53</b>	protein p53
<b>p53<sub>tetS</sub></b>	p53 (311-367)
<b>p53TD</b>	protein p53 tetramerization domain
<b>PAL</b>	5-[3,5-dimethoxy-4-(aminomethyl)phenoxy]pentanoic acid
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction
<b>PDB</b>	protein databank
<b>PEG</b>	poly(ethylene glycol)
<b>pEGFP</b>	enhanced green fluorescence protein plasmid
<b>pI</b>	isoelectric point
<b>Pi</b>	phosphate buffer
<b>pK<sub>a</sub></b>	–logarithm of the acid dissociation constant
<b>PO<sub>4</sub></b>	phosphate (buffer)
<b>PyBOP</b>	benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate
<b>R1</b>	longitudinal relaxation rate

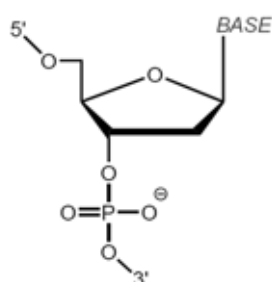
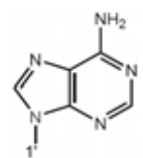
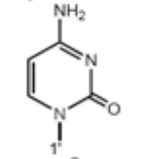
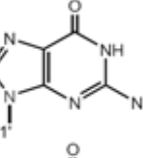
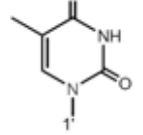
<b>R2</b>	transversal relaxation rate
<b>reagent K</b>	TFA:H <sub>2</sub> O: thioanisole:ethanedithiol:phenol, 85:5:5:2.5:2.5
<b>Rink</b>	dimethoxyphenyl[aminomethyl]phenoxyacetic acid
<b>ROESY</b>	rotational nuclear Overhauser effect spectroscopy
<b>HPLC-RP</b>	reverse phase high pressure liquid chromatography
<b>SDS</b>	sodium dodecyl sulfate
<b>SDS-PAGE</b>	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>STD</b>	saturation transfer difference
<b>STD<sub>ampl</sub></b>	STD amplification factor
<b>SPPS</b>	solid phase peptide synthesis
<b>T<sup>0</sup></b>	reference temperature ( $\Delta G^0=0$ )
<b>T<sub>05</sub></b>	half unfolding transition temperature
<b>T1</b>	longitudinal relaxation time
<b>T2</b>	transversal relaxation time
<b><sup>t</sup>Bu</b>	<i>tert</i> -butyl
<b>TD</b>	tetramerization domain
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
<b>TEV</b>	tobacco etch virus
<b>TFA</b>	trifluoroacetic acid
<b>TIS</b>	triisopropylsilane
<b>T<sub>m</sub></b>	melting temperature
<b>TOCSY</b>	total correlation spectroscopy
<b>t<sub>r</sub></b>	retention time
<b>Tris</b>	tris(hydroxymethyl)aminomethane
<b>tr-nOe</b>	transferred nuclear Overhauser effect
<b>t<sub>sat</sub></b>	saturation time
<b>UV</b>	ultraviolet
<b>v/v</b>	volume/volume
<b>wt</b>	wild-type
<b>δ</b>	chemical shift
<b>ΔG<sub>B</sub></b>	binding free energy change
<b>ΔG<sub>m</sub></b>	unfolding (or melting) free energy change
<b>ΔH<sub>B</sub></b>	binding enthalpy
<b>ΔH<sub>m</sub></b>	unfolding (or melting) enthalpy
<b>ΔS<sub>B</sub></b>	binding entropy
<b>ΔS<sub>m</sub></b>	unfolding (or melting) entropy
<b>Δδ</b>	chemical shift perturbation
<b>ε</b>	molar extinction coefficient
<b>θ</b>	molar ellipticity
<b>θ<sub>MR</sub></b>	mean residue ellipticity
<b>λ<sub>em</sub></b>	emission wavelength
<b>λ<sub>ex</sub></b>	excitation wavelength
<b>η</b>	nOe
<b>τ<sub>c</sub></b>	correlation time
<b>ω</b>	frequency (off-set)

## ANNEX I AMINO ACIDS\*

alanine	Ala	A		leucine	Leu	L	
arginine	Arg	R		lysine	Lys	K	
asparagine	Asn	N		methionine	Met	M	
aspartic acid	Asp	D		phenylalanine	Phe	F	
cysteine	Cys	C		proline	Pro	P	
glutamic acid	Glu	E		serine	Ser	S	
glutamine	Gln	Q		threonine	Thr	T	
glycine	Gly	G		tryptophan	Trp	W	
histidine	His	H		tyrosine	Tyr	Y	
isoleucine	Ile	I		valine	Val	V	

\* Amino acids abbreviations follow the rules of the Commission on Biochemical Nomenclature of the IUPAC-IUB; as specified in *Eur. J. Biochem.* (1984) **138**: 9-37 and *Eur. J. Biochem.* (1993) **213**:2.

ANNEX II DNA<sup>§</sup> AND GENETIC CODE

	DNA base	abbreviation	formula
	adenine	A	
	cytosine	C	
	guanine	G	
	thymine	T	

		2nd base							
		T		C		A		G	
1st base	T	TTT	Phe	TCT	Ser	TAT	Tyr	TGT	Cys
		TTC	Phe	TCC	Ser	TAC	Tyr	TGC	Cys
		TTA	Leu	TCA	Ser	TAA	STOP	TGA	STOP
		TTG	Leu	TCG	Ser	TAG	STOP	TGG	Trp
	C	CTT	Leu	CCT	Pro	CAT	His	CGT	Arg
		CTC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
		CTA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
		CTG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
	A	ATT	Ile	ACT	Thr	AAT	Asn	AGT	Ser
		ATC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
		ATA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
		ATG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
	G	GTT	Val	GCT	Ala	GAT	Asp	GGT	Gly
		GTC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
		GTA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
		GTG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

<sup>§</sup> Nucleic acids abbreviations follow the rules of the Commission on Biochemical Nomenclature of the IUPAC-IUB., as specified in *J. Biol. Chem.* (1962) **237**: 1381-1387.

## ANNEX III p53 TETRAMERIZATION DOMAINS

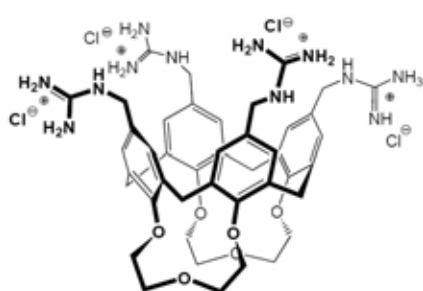
protein	sequence
p53wt	(M)NTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPPGGSRAHSS
G334V	(M)NTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRVRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPPGGSRAHSS
R337H	(M)NTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGREHFEMFRELNEALELKDAQAGKEPPGGSRAHSS
L344P	GAMANTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFREPNEALELKDAQAGKEPPGGSRAHSS
His-tagged L344P	MKHHHHHPMSDYDIPTTENLYFGAMANTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFREPNEALELKDAQAGKEPPGGSRAHSS
p53TD synthetic	KKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAG

protein	source	AA*	Mw (Da)	pI	basic AA	acid AA	formula	$\epsilon_{280\text{nm}}$
p53wt	pET23b(+)	58	6552.3	8.1	10	9	$C_{282}H_{451}N_{85}O_{91}S_2$	1280
		57	6421.1	8.3	10	9	$C_{277}H_{442}N_{84}O_{90}S_1$	
G334V	pET23b(+)	58	6594.4	8.1	10	9	$C_{285}H_{457}N_{85}O_{91}S_2$	1280
		57	6463.2	8.3	10	9	$C_{280}H_{448}N_{84}O_{90}S_1$	
R337H	pET23b(+)	58	6533.2	6.7	9	9	$C_{282}H_{446}N_{84}O_{91}S_2$	1280
		57	6402.0	6.9	9	9	$C_{277}H_{437}N_{83}O_{90}S_1$	
His-tag L344P	pETM-11	85	9733.7	6.6	11	12	$C_{423}H_{645}N_{127}O_{131}S_4$	4470
L344P	pETM-11 TEV- digestion	61	6735.4	8.3	10	9	$C_{289}H_{460}N_{88}O_{94}S_2$	1280
p53TD	synthetic	37	4439.3	5.0	7	8	$C_{197}H_{313}N_{56}O_{59}S_1$	1280

\* as a monomer

 $\epsilon_{280\text{nm}}$  ( $M^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) in 25mM phosphate buffer pH 7

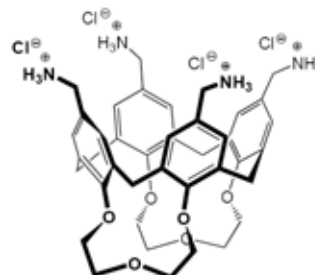
## ANNEX IV CALIX[4]ARENES LIGANDS



calix4bridge

5,11,17,23-tetraguanidinomethyl-25,26-27,28-biscrown-3- calix[4]arene tetrahydrochloride

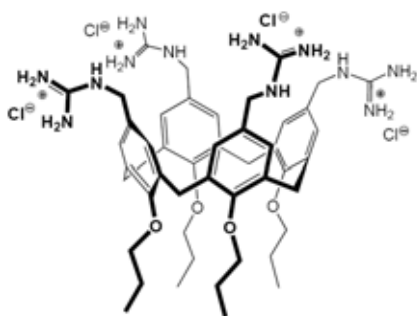
$C_{44}H_{60}Cl_4N_{12}O_6$  (MW: 994.84Da)



NH2-calix4bridge

5,11,17,23-tetraaminomethyl-25,26-27,28-biscrown-3- calix[4]arene tetrahydrochloride

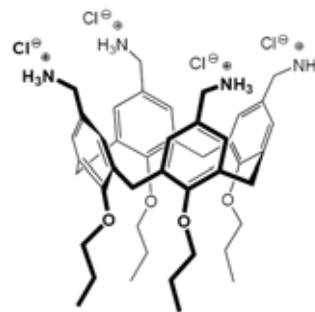
$C_{40}H_{52}Cl_4N_4O_6$  (MW: 826.68Da)



calix4prop

5,11,17,23-tetraguanidinomethyl-25,26-27,28-propoxycalix[4]arene tetrahydrochloride

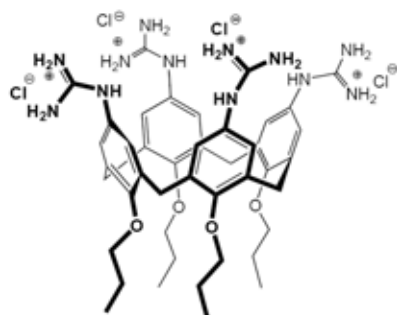
$C_{48}H_{72}Cl_4N_{12}O_4$  (MW: 1022.98Da)



NH2-calix4prop

5,11,17,23-tetraaminomethyl-25,26-27,28-propoxycalix[4]arene tetrahydrochloride

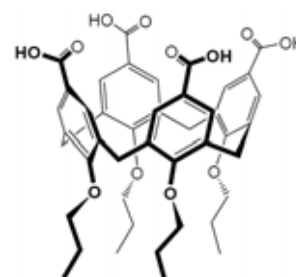
$C_{44}H_{64}Cl_4N_4O_4$  (MW: 854.82Da)



4G4Pr-cone

5,11,17,23-tetraguanidinium-25,26-27,28-propoxycalix[4]arene tetrahydrochloride

$C_{44}H_{64}Cl_4N_{12}O_4$  (MW: 966.87Da)



COOH-calix4prop

5,11,17,23-tetracarboxylic-25,26-27,28-propoxycalix[4]arene acid

$C_{44}H_{48}O_{12}$  (MW: 768.84Da)

## ANNEX V PROTEIN – LIGAND MASS TABLES

## Tetrameric protein + calix4bridge

protein	Met		protein tetramer			+ 1 calix4bridge			+ 2 calix4bridge		
	-	+	10H <sup>+</sup>	11H <sup>+</sup>	12H <sup>+</sup>	10H <sup>+</sup>	11H <sup>+</sup>	12H <sup>+</sup>	10H <sup>+</sup>	11H <sup>+</sup>	12H <sup>+</sup>
p53wt	4	0	2569.4	2335.9	2141.3	2654.3	2413.1	2212.1	2739.2	2490.3	2282.9
	3	1	2582.5	2347.8	2152.3	2667.5	2425.1	2223.1	2752.4	2502.2	2293.8
	2	2	2595.6	2359.8	2163.2	2680.6	2437.0	2234.0	2765.5	2514.2	2304.7
	1	3	2608.8	2371.7	2174.1	2693.7	2448.9	2244.9	2778.6	2526.1	2315.7
	0	4	2621.9	2383.6	2185.1	2706.8	2460.8	2255.9	2791.7	2538.0	2326.6
G334V	4	0	2586.3	2351.3	2155.4	2671.2	2428.4	2226.2	2756.1	2505.6	2296.9
	3	1	2599.4	2363.2	2166.3	2684.3	2440.4	2237.1	2769.2	2517.5	2307.8
	2	2	2612.5	2375.1	2177.3	2697.4	2452.3	2248.0	2782.3	2529.5	2318.8
	1	3	2625.6	2387.0	2188.2	2710.5	2464.2	2259.0	2795.4	2541.4	2329.7
	0	4	2638.8	2399.0	2199.1	2723.7	2476.1	2269.9	2808.6	2553.3	2340.6
R337H	4	0	2561.8	2329.0	2135.0	2646.7	2406.2	2205.8	2731.6	2483.4	2276.5
	3	1	2574.9	2340.9	2145.9	2659.8	2418.1	2216.7	2744.7	2495.3	2287.4
	2	2	2588.0	2352.9	2156.9	2672.9	2430.0	2227.6	2757.8	2507.2	2298.4
	1	3	2601.2	2364.8	2167.8	2686.1	2442.0	2238.6	2771.0	2519.1	2309.3
	0	4	2614.3	2376.7	2178.7	2699.2	2453.9	2249.5	2784.1	2531.1	2320.2

## Tetrameric protein + calix4prop

protein	Met		protein tetramer			+ 1 calix4prop			+ 2 calix4prop		
	-	+	10H <sup>+</sup>	11H <sup>+</sup>	12H <sup>+</sup>	10H <sup>+</sup>	11H <sup>+</sup>	12H <sup>+</sup>	10H <sup>+</sup>	11H <sup>+</sup>	12H <sup>+</sup>
p53wt	4	0	2569.4	2335.9	2141.3	2657.2	2415.7	2214.5	2744.9	2495.4	2287.6
	3	1	2582.5	2347.8	2152.3	2670.3	2427.6	2225.4	2758.0	2507.3	2298.5
	2	2	2595.6	2359.8	2163.2	2683.4	2439.5	2236.3	2771.1	2519.3	2309.4
	1	3	2608.8	2371.7	2174.1	2696.5	2451.5	2247.3	2784.2	2531.2	2320.4
	0	4	2621.9	2383.6	2185.1	2709.6	2463.4	2258.2	2797.3	2543.1	2331.3
G334V	4	0	2586.3	2351.3	2155.4	2674.0	2431.0	2228.5	2761.7	2510.7	2301.6
	3	1	2599.4	2363.2	2166.3	2687.1	2442.9	2239.4	2774.8	2522.7	2312.5
	2	2	2612.5	2375.1	2177.3	2700.2	2454.8	2250.4	2787.9	2534.6	2323.5
	1	3	2625.6	2387.0	2188.2	2713.4	2466.8	2261.3	2801.1	2546.5	2334.4
	0	4	2638.8	2399.0	2199.1	2726.5	2478.7	2272.2	2814.2	2558.4	2345.3
R337H	4	0	2561.8	2329.0	2135.0	2649.5	2408.7	2208.1	2737.2	2488.5	2281.2
	3	1	2574.9	2340.9	2145.9	2662.6	2420.7	2219.0	2750.3	2500.4	2292.1
	2	2	2588.0	2352.9	2156.9	2675.8	2432.6	2230.0	2763.5	2512.3	2303.1
	1	3	2601.2	2364.8	2167.8	2688.9	2444.5	2240.9	2776.6	2524.3	2314.0
	0	4	2614.3	2376.7	2178.7	2702.0	2456.4	2251.8	2789.7	2536.2	2324.9