



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Desorden estructural en G0S2 y PLIN1, proteínas
involucradas en el metabolismo de lípidos**

Tesis que presenta

Edgar Daniel Páez Pérez

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Samuel Lara González

San Luis Potosí, S.L.P., enero 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Desorden estructural en G0S2 y PLIN1, proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos**” presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Edgar Daniel Páez Pérez** y aprobada el **4 de enero de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Samuel Lara González
Director de la tesis

Dra. Fabiola Jaimes Miranda
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Mónica R. Calera Medina
Miembro del Comité Tutorial

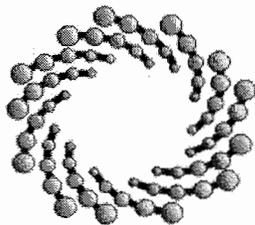
Dr. Gerardo R. Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Estructural de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Samuel Lara González.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 331851) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. Este trabajo fue financiado a través del proyecto de Ciencia Básica SEP-CONACYT CB-2011-01 No 168710 y por el proyecto CONACYT INFR-2013-01 No 204373.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 117 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 21 días del mes de enero del año 2021, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Fabiola Jaimes Miranda	Presidenta	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Secretario	IPICYT
Dra. Mónica Raquel Calera Medina	Sinodal externo	UASLP
Dr. Samuel Lara González	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Edgar Daniel Páez Pérez

sobre la Tesis intitulada:

Desorden estructural en G0S2 y PLIN1, proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Samuel Lara González

El Jurado, después de deliberar, determinó

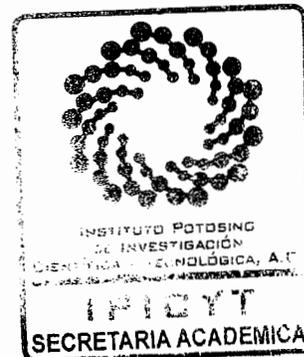
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 12:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 21 días del mes de enero de 2021.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Dedicatorias

A mi familia y amigos

Agradecimientos

Al Dr. Samuel Lara González por la dirección y apoyo en este trabajo.

A la Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza, por el apoyo académico y experimental brindado.

Al Dr. Marcelo E. Guerin y su grupo de trabajo por el apoyo académico y experimental brindado para la segunda parte de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Fabiola Jaimes Miranda, Dra. Mónica R. Calera Medina y Dr. Gerardo R. Argüello Astorga, por las aportaciones en la tesis.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, en especial a Miriam Livier y Fitzya Bocanegra por su apoyo.

Al maestro Aarón Avalos por su amistad y apoyo tanto académico como personal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Índice General

Introducción	1
<i>Metabolismo de lípidos</i>	1
Gotas de lípidos	1
Perilipinas	2
Lipólisis	5
ATGL	8
CGI-58	9
G0S2	11
<i>Justificación</i>	13
<i>Objetivos</i>	13
Capítulo 1	14
<i>Análisis bioinformático y caracterización biofísica revelan desorden estructural en la proteína G0S2</i>	14
<i>Materiales y métodos</i>	16
Análisis in silico	16
Clonación de G0S2	16
Expresión y purificación de G0S2	17
Cromatografía de exclusión por tamaño analítico (SEC analítico)	18
Dispersión dinámica de luz	19
Espectroscopía de dicroísmo circular (CD)	20
<i>Resultados y discusión</i>	20
Análisis <i>in silico</i> sugiere el carácter desordenado del extremo carboxilo terminal de G0S2	20
Análisis hidrodinámicos de G0S2 de humano y ratón	22
El análisis del contenido de la estructura secundaria por CD de UV lejano revela que G0S2 está en gran parte desestructurada	26
Capítulo 2	36
<i>Desorden estructural en el dominio C- terminal de PLIN1</i>	36
<i>Materiales y métodos</i>	38
Análisis in silico	38
Expresión y purificación del dominio C-terminal de mPLIN1C	39
Cromatografía de exclusión por tamaño analítico (SEC analítico)	40
Dispersión dinámica de luz	40
Espectroscopía de dicroísmo circular (CD)	41
<i>Resultados y discusión</i>	42
Análisis <i>in silico</i> sugiere el carácter desordenado del extremo carboxilo terminal de PLIN1	42
Expresión y purificación de mPLIN1C	43

Análisis hidrodinámicos confirman el carácter desordenado del extremo carboxilo terminal de PLIN1	44
El análisis del contenido de la estructura secundaria indica que mPLIN1C se comporta como una proteína intrínsecamente desordenada	46
Elementos de reconocimiento molecular (MoRFs) en mPLIN1C	49
Conclusiones y aportaciones del trabajo	62
Referencias:	64
Anexos	80
<i>Artículos publicados</i>	80

Índice de tablas

Capítulo 1

Tabla 1. Caracterización de G0S2 de humano y ratón por SEC.	31
---	-----------

Capítulo 2

Tabla 1. Caracterización de mPLIN1C por SEC.	55
--	-----------

Tabla 2. Caracterización de mPLIN1C por DLS.	55
--	-----------

Tabla 3. Resumen del contenido de estructura secundaria del dominio C-terminal de Perilipin de ratón en ausencia y presencia de SDS	55
---	-----------

Índice de figuras

Introducción

Fig 1. Estructuras de las proteínas perilipinas.	3
Fig 2. Regulación de la lipólisis en adipocitos.	6
Fig 3. Estructura de la proteína ATGL.	9
Fig 4. Estructura de la proteína CGI-58.	10

Capítulo 1

Fig 1. Análisis <i>in silico</i> y purificación de G0S2 de humano y ratón.	32
Fig 2. Determinación de radios de Stokes para G0S2 de humano y ratón por filtración en gel.	33
Fig 3. Radios hidrodinámicos de G0S2 de humano y ratón en estado nativo y desplegado.	34
Fig 4. Espectro de CD en el UV lejano de G0S2 de humano y ratón.	35

Capítulo 2

Fig 1. Análisis <i>in silico</i> de mPLIN1C.	56
Fig 2. mPLIN1C recombinante tiene propiedades hidrodinámicas típicas de las proteínas intrínsecamente desordenadas.	57
Fig 3. Radio hidrodinámico de mPLIN1C en estado nativo y desplegado.	58
Fig 4. Determinación de la concentración micelar crítica por DLS.	59
Fig 5. Análisis de mPLIN1C por dicroísmo circular.	60
Fig 6. Características de reconocimiento molecular predichas en mPLIN1C.	61

Abreviaturas (por sus siglas en inglés)

G0S2	G0/G1 switch gene 2
ATGL	Adipose triglyceride lipase
PLIN1	Perilipin 1
PMG	Pre-molten globule
MG	Molten globule
IDR	Intrinsic disorder region
IDP	Intrinsic disorder protein
SEC	Size-exclusion chromatography
DLS	Dynamic light scattering
CD	Circular dichroism
SDS	Sodium dodecyl sulfate

Resumen

Desorden estructural en G0S2 y PLIN1, proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos

La lipólisis es un proceso muy importante en el metabolismo celular, en su regulación participan distintas proteínas, una de ellas es Perilipin 1; esta proteína es la encargada de estabilizar la gota de lípidos donde se almacenan los triglicéridos y de esta manera protegerlos de la acción de las lipasas. Esta proteína tiene un dominio C-terminal único, con el cual secuestra y estabiliza a la proteína CGI-58 para que no interaccione y active a la lipasa ATGL e inicie la lipólisis. Por otra parte, cuando ya se está llevando a cabo un proceso de lipólisis y ésta necesita ser inactivada, entra en juego la proteína G0S2, esta proteína aparte de interaccionar e inhibir a ATGL, también está involucrada en otros procesos como la apoptosis, proliferación celular y la fosforilación oxidativa. Se carecen de estudios estructurales de ambas proteínas por lo que en este trabajo, nos dimos a la tarea de realizar una caracterización biofísica tanto del dominio C-terminal de Perilipin 1 de ratón (mPLIN1C), como de G0S2 humano (hG0S2) y ratón (mG0S2). Por análisis bioinformático se predice que tanto mPLIN1C como hG0S2 y mG0S2 tienden al desorden. La caracterización experimental por cromatografía de exclusión molecular y dispersión dinámica de luz, mostraron que el mPLIN1C y hG0S2 tiene una conformación elongada mientras que mG0S2 tiene propiedades similares a las de una proteína globular. La caracterización estructural por dicroísmo circular en condiciones nativas mostró que estas proteínas se encuentran principalmente desestructuradas, mostrando la presencia de estructuras de tipo hebra beta. Sugerimos que el desorden intrínseco observado en la proteína G0S2 puede facilitar su interacción con múltiples proteínas en la regulación del metabolismo celular, mientras que para mPLIN1C, el desorden intrínseco le permite estar potencialmente disponible para interaccionar y estabilizar a CGI-58 y estar expuesto a modificaciones adicionales.

PALABRAS CLAVE: G0S2, PLIN1, desorden intrínseco, pre-glóbulo fundido

Abstract

Structural disorder in G0S2 and PLIN1, proteins involved in lipid metabolism

Lipolysis is an important process in cell metabolism and is regulated by several proteins, one of them is Perilipin 1, this protein is responsible for the stabilization of lipid droplets, where triglycerides are stored and thus protecting them from the action of lipases. Perilipin 1 has a unique C-terminal domain, this domain sequesters and stabilizes CGI-58, so preventing the interaction with ATGL and the activation of lipolysis. On the other hand, when lipolysis is taking place and requires an inactivation process, G0S2 protein comes into play, this protein interacts and inactivates ATGL, and is also involved in other processes such as apoptosis, cell proliferation and oxidative phosphorylation. Structural characterization of these proteins is limited. In this work, we perform a biophysical characterization of the C-terminal domain of mouse Perilipin 1 (mPLIN1C), as well as human (hG0S2) and mouse G0S2 (mG0S2). Bioinformatic suggests that mPLIN1C and G0S2 proteins tend toward disorder. Experimental characterization by size-exclusion chromatography and dynamic light scattering showed that mPLIN1C and human G0S2 have an elongated conformation while mG0S2 has similar properties of a globular protein. Structural analysis by circular dichroism revealed that in native conditions, these proteins are mainly unstructured, showing the presence of beta sheet structures. We suggest that the intrinsic disorder observed in the G0S2 protein may facilitate its interaction with multiple proteins in the regulation of cellular metabolism, while for mPLIN1C, the intrinsic disorder allows it to be potentially available to interact and stabilize CGI-58 and to be accessible to additional modifications.

KEY WORDS: G0S2, PLIN1, intrinsic disorder, pre-molten globule

Introducción

Metabolismo de lípidos

Gotas de lípidos

El tejido adiposo asegura un vasto depósito de energía. Los nutrientes que proporcionan un exceso de calorías se convierten en triglicéridos para su almacenamiento en las gotas de lípidos de los adipocitos. Durante el ayuno y el ejercicio prolongado, estos triglicéridos se hidrolizan en el proceso de lipólisis para liberar ácidos grasos en la circulación. Los ácidos grasos son absorbidos por el músculo esquelético y otros tejidos para impulsar la producción de energía. El almacenamiento de triglicéridos y la lipólisis están controlados por un complejo elenco de caracteres que se mantienen en un delicado equilibrio [1]. Estas gotas de lípidos se encuentran en el citoplasma de casi todos los tipos de células en los tejidos de los mamíferos, así como en las células de otros cordados y muchos organismos inferiores. En los mamíferos, las gotas de lípidos desempeñan un papel importante en la homeostasis de los lípidos celulares, almacenando principalmente ésteres de colesterol que se utilizarán para la síntesis de hormonas esteroideas y de membrana, triglicéridos que sirven como fuente de sustratos energéticos o precursores para la señalización de lípidos o síntesis de fosfolípidos de membrana. El núcleo de lípidos neutros de las gotas de lípidos está cubierto por una monocapa de fosfolípidos y colesterol en la que se incrustan las proteínas. Los estudios de proteómica han revelado más de 200 componentes proteicos de las gotas de lípidos, algunos de los cuales se localizan únicamente en éstas, mientras que otros también se encuentran en otros compartimentos subcelulares.

Algunas de las proteínas de gotas de lípidos más abundantes incluyen las perilipinas (PLINS); hasta la fecha, no se han identificado gotas de lípidos citosólicos que carezcan de PLINs en células de mamíferos. Por tanto, donde quiera que se almacenen lípidos neutros, se expresan dos o más miembros de la familia de proteínas PLINs y se unen a gotas de lípidos.

Perilipinas

Cinco genes de PLIN codifican cinco proteínas principales de esta familia (PLIN 1-5) [2]. PLIN1 se expresa predominantemente en adipocitos, PLIN2 se expresa de forma ubicua. Debido a que PLIN1 y PLIN2 se encuentran en la superficie de las gotas de lípidos, se consideran proteínas marcadoras de éstas. Estudios recientes sobre otras proteínas PLIN sugieren funciones en la formación de gotas de lípidos, y se han demostrado tanto la diversidad como la redundancia entre ellas [3]. Estructuralmente todas las PLINs contienen un dominio conservado llamado PAT, un motivo repetido 11-mer y una estructura llamada (4-helix bundle) que parece estar presente en la parte C-terminal de estas proteínas, con la excepción de PLIN4 que solo contiene un motivo de repetición largo 11-mer como se observa en la Fig. 1.

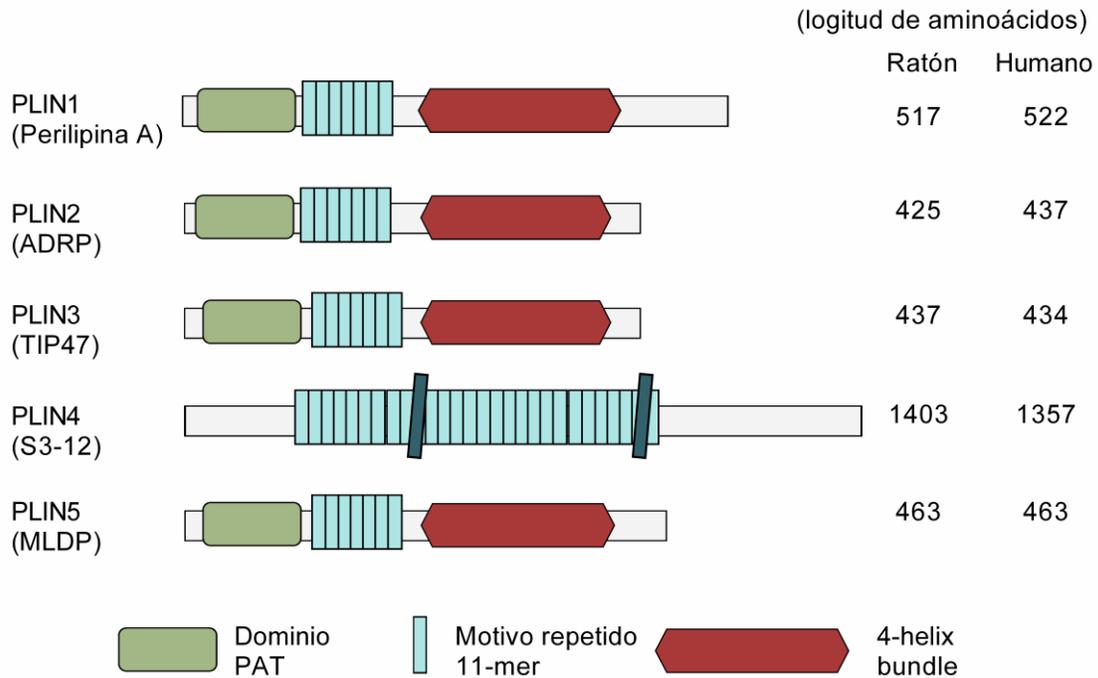


Fig 1. Estructuras de las proteínas perilipinas. La familia de la perilipinas incluye 5 miembros (PLIN1 a PLIN5) con un motivo de repetición de 11-mer, un dominio PAT y una estructura 4-helix bundle presente en la parte C-terminal de todas las PLIN, excepto PLIN4 que únicamente tiene un dominio largo de motivos repetidos 11-mer, las barras azul oscuro se utilizan para indicar que esta proteína tiene un peso molecular de casi tres veces las otras PLINs. Se indican los números de aminoácidos en PLIN humanos y murinos. (Tomado y modificado de [3])

PLIN1 o Perilipin A se descubrió originalmente como la proteína más fosforilada en tejido adiposo blanco [4]. PLIN1 es expresada abundantemente en adipocitos maduros, y además es fosforilada por la proteína quinasa A (PKA) de una manera dependiente de cAMP y localizada en la superficie de las gotas de lípidos. También PLIN1 se expresa en baja concentración en tejido adiposo café y

músculo cardíaco [3]. Por otra parte, PLIN2 es bien conocida como la principal proteína en las gotas de lípidos en hígado [5]. PLIN2 se denominó originalmente proteína relacionada con la diferenciación adiposa (ADRP), lo que refleja su inducción durante la diferenciación temprana de los adipocitos [6]. Sin embargo, aunque PLIN2 está presente en los adipocitos prematuros, se reemplaza por PLIN1 durante la diferenciación en adipocitos maduros [7]. Aunque PLIN3 y PLIN2 tienen secuencias de aminoácidos similares y ambos están distribuidos ubicuamente entre los tejidos, es PLIN3 la que se localiza tanto en citosol como en gotas de lípidos [8]. Esta proteína se denominó inicialmente “tail-interacting protein of 47 kDa” (TIP47) y estaba implicada en tráfico intracelular de enzimas lisosomales [9]. PLIN4 (S3–12) es única entre las cinco proteínas de la familia PLIN, con un peso molecular casi tres veces mayor que el de otras PLIN y carece de un dominio PAT. PLIN4 tiene múltiples similitudes de secuencia con PLIN1, se expresa selectivamente en adipocitos y está presente en gotas de lípidos y en el citosol [10]. Aunque se sabe poco sobre las funciones biológicas de PLIN4, su presencia en adipocitos humanos se demostró tras la diferenciación de las células madre mesenquimales humanas (hMSC), donde PLIN4 se indujo junto con PLIN1 durante etapas tardías de la diferenciación de adipocitos [11]. Poco después que las tres proteínas asociadas a LD que contienen el dominio PAT fueran reconocidos como pertenecientes a esta familia, otra proteína de dominio PAT con patrón de distribución de tejido único, inicialmente llamado proteína miocárdica de gotas de lípidos (MLDP), se descubrió en búsquedas BLAST [12]. Esta proteína se identificó al mismo tiempo como una proteína de gotas de lípidos en los tejidos

musculares y se le dio otros nombres (OXPAT, LSDP5), pero finalmente se llamó PLIN5 [13].

Ya que hemos enfatizado la importancia de las perilipinas en la formación y metabolismo de las gotas de lípidos, pasaremos a hablar de como los lípidos neutros presentes en el núcleo de las gotas de lípidos son hidrolizados por lipasas intracelulares en un proceso llamado lipólisis.

Lipólisis

Los tejidos almacenan triglicéridos en gotas de lípidos cuando los ácidos grasos endógenos son abundantes y están disponibles para su importación y esterificación. En un estado de alimentación, aumenta la disponibilidad de ácidos grasos para la entrega a los adipocitos, mientras que la insulina promueve la absorción de glucosa para apoyar la síntesis de triglicéridos. Por el contrario, el almacenamiento de triglicéridos en otros tejidos, incluidos el hígado, el páncreas y el músculo esquelético y cardíaco, aumenta durante el ayuno, cuando los ácidos grasos se exportan del tejido adiposo para su transporte a estos otros tejidos. Cuando los suministros de ácidos grasos extracelulares disminuyen o se requiere energía para apoyar el ejercicio, las hormonas inician cascadas de señalización que aumentan la actividad de quinasas para activar las vías lipolíticas en los adipocitos. La posterior fosforilación de PLINs, lipasas y cofactores de las lipasas inicia la translocación de las lipasas del citoplasma a las gotas de lípidos y permite que las interacciones proteína-proteína ensamblen el complejo lipolítico en el andamio de PLINs que rodea las gotas de lípidos. Por tanto, las lipasas acceden a los sustratos lipídicos y se produce la lipólisis de los triglicéridos almacenados [2].

Las lipasas adiposas incluyen la lipasa de triglicéridos del tejido adiposo (ATGL), lipasa sensible a hormonas (HSL) y la lipasa de monoglicéridos (MGL). ATGL escinde los triglicéridos, pero no los diglicéridos ni los monoglicéridos, por lo que se cree que inicia la hidrólisis de lípidos almacenados [14,15]. Por tanto, los diglicéridos liberados durante la etapa inicial de la lipólisis son escindidos por HSL. MGL cataliza el paso final de la lipólisis y los ácidos grasos y el glicerol se eliminan del adipocito.

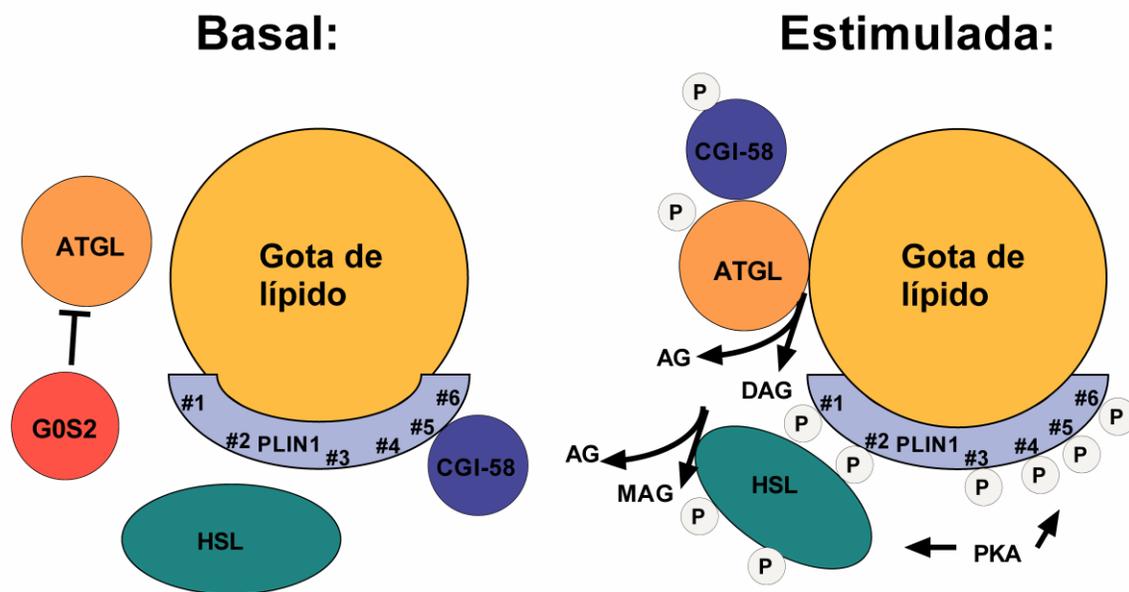


Fig 2. Regulación de la lipólisis en adipocitos. En condiciones basales, PLIN1 y HSL están desfosforiladas, y HSL se encuentra en el citoplasma. CGI-58 se encuentra estabilizada y secuestrada por medio del dominio C-terminal de PLIN1. Mientras de ATGL está siendo inactivada por G0S2. La estimulación de la lipólisis involucra la activación de PKA, que fosforila a PLIN1 y HSL, se libera CGI-58 de PLIN1, y ésta se une a ATGL, mientras que HSL se transloca a PLIN1 y comienza la hidrólisis de los triglicéridos. (Tomado y modificado de [16])

Las lipasas, sin embargo, son solo una parte de la historia. La investigación realizada en la última década ha revelado que la proteína de gotas de lípidos estructurales, la PLIN1, desempeña un papel fundamental en el control del acceso de las lipasas a los triglicéridos almacenados [17]. Además, estudios posteriores han identificado proteínas reguladoras que interactúan con ATGL para activar o inhibir su actividad enzimática. CGI-58 (*comparative gene identification-58*) sirve como coactivador de ATGL, aumentando la hidrólisis de triglicéridos hasta 20 veces *in vitro* [18] y G0S2 (*G0/G1 Switch 2*) como su inhibidor [19]. Se sabe que las señales β -adrenérgicas regulan positivamente la acción enzimática de ATGL en los adipocitos. Se ha sugerido que los mecanismos de activación de ATGL implican la disociación de CGI-58 de PLIN1 fosforilada [20,21], así como la fosforilación directa de ATGL por PKA [22]. Interesantemente, se observó que G0S2 se transloca a las gotas de lípidos junto a ATGL en respuestas a agonistas β -adrenérgicos, y esta translocación se anuló cuando se suprimió la expresión de ATGL. Por lo tanto, parece existir una relación interdependiente entre G0S2 y ATGL en su localización en gotas de lípidos, aunque la relevancia funcional de este reclutamiento mutuo sigue sin estar claro.

Los estudios funcionales de G0S2 y ATGL han revelado la importancia del mecanismo lipolítico y su regulación. En la evolución eucariota, la síntesis y el catabolismo de triglicéridos surgieron como una de las vías preferidas para mitigar las fluctuaciones en la demanda y disponibilidad de energía. A través del refinamiento genético y las presiones ambientales, ATGL se convirtió en la hidrolasa de triglicéridos intracelular predominante en organismos superiores y

más complejos. Para contrarrestar el papel de ATGL y establecer un mecanismo regulador de la lipólisis intracelular, G0S2 apareció en la evolución posterior ya que solo se encuentra en vertebrados [23]. Estudios recientes han reforzado el papel de G0S2 como el llamado regulador maestro de la lipólisis basal y estimulada [24].

ATGL

ATGL también conocida como “patatin-like phospholipase domain-containing protein 2” (PNPLA2). Se demostró que cataliza el primer paso de la lipólisis intracelular, donde el triglicérido se hidroliza a diacilglicerol y ácidos grasos libres. La lipólisis de triglicéridos es un mecanismo evolutivo bien establecido, que se conserva funcionalmente desde mamíferos hasta levaduras.

Los ortólogos existentes son muy divergentes en longitud y estructura primaria, pero comparten una característica estructural común denominado dominio "patatin", que recibe su nombre de una proteína lipídica de actividad acil-hidrolasa que se encuentra en los tubérculos de patata maduros [25]. Estructuralmente el dominio patatin muestra un plegamiento tipo $\alpha\beta\alpha$, en el cual se tiene una estructura central de una lámina de 6 hebras beta rodeada de hélices alfas. En contraste con el papel catalítico del dominio patatin del ATGL, el papel funcional de los dominios C-terminales del ATGL humano se ha revelado sólo parcialmente [26]. El papel central de ATGL en el catabolismo de triglicéridos se hizo evidente a partir del análisis de ratones deficientes en esta enzima y de pacientes humanos con mutaciones en el gen (PNPLA2). Ratones deficientes en ATGL muestran una lipólisis reducida y un incremento en la acumulación de grasa en prácticamente

todos sus tejidos corporales [27]. Los pacientes con mutaciones en el gen PNPLA2 desarrollan la enfermedad de almacenamiento de lípidos neutros con miopatía (NLSDM; del inglés: Neutral Lipid Storage Disease) que se caracteriza por la acumulación de triglicéridos sistémica en múltiples tejidos y cardiomiopatía [28].

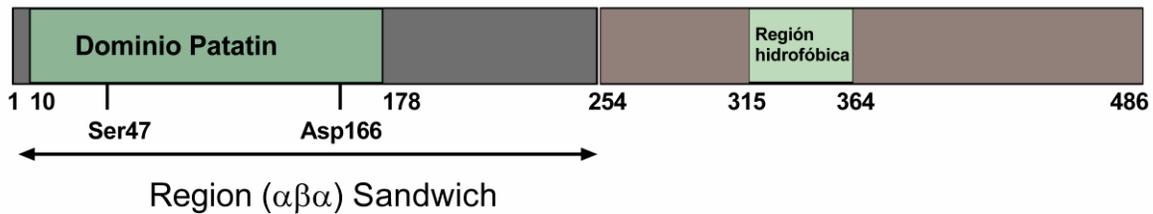


Fig 3. Estructura de la proteína ATGL. Representación gráfica de la organización de los dominios de ATGL. En amarillo el dominio patatin, incluido los residuos que forman la diada catalítica (S47 y D166). En gris la región que comprende el plegamiento ($\alpha\beta\alpha$) que comprende los residuos 10 al 254. Y en café la región hidrofóbica putativa. (Tomado y modificado de [29])

CGI-58

CGI-58 también conocida como ABHD5 ya que pertenece a la familia de enzimas que contienen el dominio alfa-beta hidrolasa, de las cuales se conoce que algunas de éstas contienen una triada catalítica de lipasa. Sin embargo, CGI-58 no posee en su sitio activo el residuo de serina involucrado en la actividad de lipasa [30].

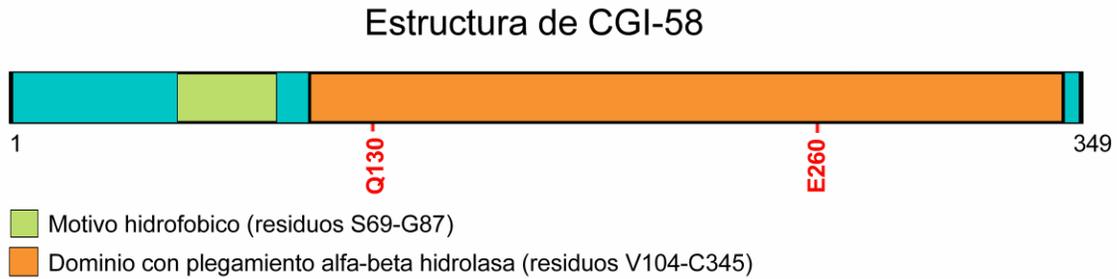


Fig 4. Estructura de la proteína CGI-58. La proteína se caracteriza por dos dominios funcionales: un sitio de unión a gotas de lípidos (dominio hidrofóbico) y un dominio α/β hidrolasa que incluye dos residuos involucrados en la interacción de ATGL y PLIN1 (Q130 y E260). (Tomado y modificado de [31])

En reportes previos se ha mostrado que CGI-58 puede estimular la actividad de ATGL hasta 20 veces en ratones, también en humano se describe este fenómeno pero en menor grado (aproximadamente 5 veces) [32]. Interesantemente, pacientes con mutaciones en el gen que codifica para esta proteína, presentan una rara enfermedad autosómica denominada “síndrome de Chanarin-Dorfman (CDS)”, también conocida como “enfermedad de almacenamiento de lípidos neutros con ictiosis (NLSDI)”. Los individuos con esta enfermedad presentan piel escamosa y la acumulación intracelular de gotas de triglicéridos, lo que indica una actividad adicional de CGI-58 a la de activación de ATGL. Además, se informó que CGI-58 se unía a cinco de nueve miembros de la familia de proteínas de unión a ácidos grasos (FABP). En presencia de A-FABP, CGI-58 es aún más potente para activar ATGL [33]. Las FABP se unen a los ácidos grasos de cadena larga con alta afinidad y son importantes para la captación y transporte de éstos. La interacción

con CGI-58 puede facilitar la adsorción de los ácidos grasos generados y por lo tanto removerlos de ATGL resultando en un aumento la hidrólisis de triglicéridos [33–35].

G0S2

G0S2 se encontró originalmente que se expresaba durante el reingreso de las células mononucleares de la fase G0 a G1 del ciclo celular [36]. Además, G0S2 no comparte similitudes de secuencia con alguna estructura 3D de proteínas conocidas [37]. Por otra parte, se ha observado que la delección de los residuos 27-41, que corresponden a la región hidrofóbica, interrumpe la interacción de G0S2 con ATGL [19]. Se ha descrito la expresión de G0S2 en diversos tejidos humanos y murinos, encontrándose mayores niveles en tejidos adiposos e hígado, seguido por el músculo, ovario y riñón [19,38]. En adipocitos, su expresión es inducida por insulina e inhibida por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o isoproterenol, ambos factores que estimulan la lipólisis [19]. La capacidad inhibitoria de G0S2 sobre ATGL fue originalmente caracterizada por Yang y colaboradores [19], quienes expresaron G0S2 en células HeLa y determinaron su localización subcelular por inmunofluorescencia, después de tratar con ácido oleico para promover la formación de gotas de lípidos. Se observó que las gotas de lípidos en las células que expresaban G0S2 fueron significativamente más grandes y numerosas en comparación con las células no transfectadas. Además, G0S2 se localizó en la superficie de las gotas de lípidos. Debido a que ATGL juega un papel

clave en la degradación de gotas de lípidos en células HeLa, se concluyó que G0S2 previene la degradación de las gotas de lípidos mediada por ATGL. El hecho de que la expresión de G0S2, un inhibidor lipolítico, puede alterarse, de acuerdo con las condiciones de consumo y demanda de energía, implica un mecanismo potencial para cambiar el equilibrio entre la movilización y almacenaje de triglicéridos [19]. En los casos de exceso calórico, por ejemplo, un aumento en la relación entre los niveles de G0S2 y ATGL inducido por insulina, puede conducir a una menor capacidad lipolítica y por lo tanto servir para facilitar el flujo de ácidos grasos a triglicéridos en el tejido adiposo blanco. Durante una exposición a hambruna, las catecolaminas pueden apagar la expresión de G0S2 como una manera de sostener la lipólisis en los adipocitos [19].

Justificación

G0S2 y PLIN1 han demostrado ser interesantes e importantes reguladores del metabolismo de lípidos y homeostasis de la energía. La dilucidación de sus funciones en el metabolismo celular se ha logrado gracias al esfuerzo de distintos grupos de investigación; sin embargo, se carece de estudios biofísicos y estructurales de estas proteínas que nos permitan describir el espectro completo de sus funciones en diferentes entornos celulares. Por lo que en el presente trabajo nos dimos a la tarea de realizar su caracterización biofísica en el cual encontramos una característica peculiar, el desorden estructural. En el siguiente par de capítulos hablaremos del trabajo realizado tanto para G0S2 como para PLIN1, respectivamente.

Objetivos

General: La caracterización biofísica de la proteína G0S2 y del dominio C-terminal de PLIN1.

Específicos:

1. Análisis bioinformáticos de las proteínas que nos permitan tener una percepción de su posible conformación estructural.
2. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.
3. Análisis hidrodinámicos que nos permitan dilucidar las dimensiones y conformaciones de las proteínas.
4. Análisis espectrofotométricos que nos permitan estimar la estructura secundaria de las proteínas.

Capítulo 1

Análisis bioinformático y caracterización biofísica revelan desorden estructural en la proteína G0S2

El gen *G0/G1 switch 2* (*G0S2*) se identificó originalmente en linfocitos después de inducir la progresión del ciclo celular mediante fármacos [36]. *G0S2* de humano y ratón codifica para una proteína básica pequeña de 103 aminoácidos e inicialmente se propuso que *G0S2* mediaba el reingreso de las células de la fase G0 a G1 del ciclo celular, pero estudios recientes han empezado a revelar aspectos funcionales de *G0S2* en diversos entornos celulares. Se ha descrito la expresión de *G0S2* en diversos tejidos humanos y murinos, encontrándose mayores niveles en tejido adiposo, una expresión moderada en hígado y baja expresión en músculo esquelético y corazón [19]. *G0S2* solo se ha identificado en vertebrados, ortólogos en otros organismos incluyendo levadura o moscas no han sido reportados [19,39]. La proteína *G0S2* está altamente conservada entre especies, compartiendo un 77.7% de identidad entre la proteína de humano y ratón. La región más conservada a lo largo de todas las especies se encuentra en la región N-terminal, mientras que el C-terminal muestra diferencias mayores [40]. El mayor avance en entender la función de *G0S2* fue el descubrimiento de su capacidad de interactuar directamente con el dominio tipo patatin de ATGL y de inhibir selectivamente su actividad de hidrolasa de una manera no competitiva, incluso en la presencia del activador CGI-58[19]. Estudios recientes muestran sorprendentemente que *G0S2* tiene actividad enzimática denominada actividad de

aciltransferasa de ácido lisofosfatídico y desempeña un papel crítico en promover la acumulación de triglicéridos en el hígado, ya que su gen codificador es diana directa de un importante factor de transcripción lipogénico, el receptor x hepático alfa (LXR) α [41]. Por lo cual G0S2 es capaz de promover directamente la síntesis de TG al actuar como una enzima sintetizadora de lípidos [41]. G0S2 también está involucrado en otras funciones celulares importantes, incluida la apoptosis, la fosforilación oxidativa y proliferación celular [38,42,43]. En mitocondria, G0S2 cumple la función de promover la apoptosis, ya que interactúa específicamente con Bcl-2 para evitar su interacción con Bax, inhibiendo la formación del complejo heterodimérico anti-apoptótico Bcl-2/Bax [38]. También se ha reportado que G0S2 regula positivamente la producción de ATP mitocondrial al interactuar con la F₀F₁-ATP sintasa. La sobreexpresión de G0S2 mitiga la disminución de ATP en los cardiomiocitos y aumenta fuertemente su tolerancia hipóxica durante la isquemia [43]. Por otro lado, se descubrió que G0S2 promueve la inhibición de la proliferación celular de las células hematopoyéticas troncales, ya que ésta interactúa directamente con nucleolina y la retiene en el citosol evitando que lleve a cabo su función [42,44]. Por otro lado, el gen *G0S2* se ha reportado hipermetilado en ciertos tipos de cáncer, lo que indica un posible papel en el desarrollo del mismo [38,45]. Sin embargo, la función de G0S2 en cáncer aún se desconoce.

Hasta la fecha, no hay estructura tridimensional experimental de G0S2 que haya sido publicada y las predicciones de su estructura por modelado de homología fallan al carecer de homólogos estructurales adecuados. Por otra parte, los avances que se han hecho para dilucidar su estructura-función se han centrado en

identificar los dominios mínimos de interacción de G0S2 con otras proteínas, el cual se ha propuesto que involucra el dominio hidrofóbico, y actualmente no hay reportes de estudios estructurales más a fondo. En este trabajo, describimos los resultados de un análisis bioinformático y de la caracterización bioquímica y biofísica de las proteínas G0S2 de humano y ratón. Nuestros resultados muestran que ambas proteínas se comportan como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) del tipo pre-glóbulo fundido (PMG-like). A diferencia de G0S2 de ratón, la proteína de humano presenta una conformación más extendida debido a que su extremo carboxilo terminal (residuos 68-103) se encuentra completamente desplegado en las condiciones experimentales evaluadas.

Materiales y métodos

Análisis in silico

Las predicciones de regiones desordenadas se realizaron utilizando el servidor GeneSilico MetaDisorder [46] disponible en <http://genesilico.pl/metadisorder/>. Los análisis de composición de aminoácidos se realizaron con Composition Profiler [47] disponible en <http://www.cprofiler.org>. Los cálculos del gráfico de Uversky [48] se realizaron utilizando PONDR en <http://www.pondr.com>. Todos los análisis se realizaron utilizando la configuración predeterminada de los servidores.

Clonación de G0S2

En breve, las secuencias de DNA que codifican para G0S2 de humano y ratón (NP_056529.1 y NP_032085.1) optimizadas para su expresión en *Escherichia coli*

y la secuencia para la proteína SUMO (residuos 1-97) de *Saccharomyces cerevisiae*, con una etiqueta 6xHis en su amino terminal y un sitio de escisión para la proteasa 3C de rinovirus humano (HRV 3C) en su carboxilo terminal, fueron adquiridos de Integrative DNA Technologies (IDT DNA) en forma de gblock. El fragmento de DNA de SUMO fue clonado entre los sitios NcoI y NdeI del vector pET28 para obtener la construcción pET28SUMO-HRV3C posteriormente fueron clonados los fragmentos de G0S2 entre los sitios NdeI y HindIII para obtener las construcciones pET28SUMO-HRV3C/hG0S2 y pET28SUMO-HRV3C/mG0S2

Expresión y purificación de G0S2

Células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) y BL21 (DE3) pLysS fueron transformadas con las construcciones de humano y ratón respectivamente. Las células se cultivaron a 37 °C y cuando la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) alcanzó 0.5-0.8, se agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM, y las células se cultivaron a 28 °C durante 16 horas adicionales. Las células fueron cosechadas y resuspendidas en amortiguador de lisis [50 mM Tris (pH 8.0), 300 mM NaCl y 10 mM imidazol] y sonicadas en hielo, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C por 15 minutos. El sobrenadante de células lisadas se cargó en una columna con resina Ni-NTA (Qiagen) equilibrada con amortiguador de lisis. La columna se lavó con amortiguador de lisis (10 CV). Las proteínas de fusión se eluyeron en un solo paso con amortiguador de elución [50 mM Tris (pH 8.0), 300 mM NaCl y 500 mM imidazol]. A continuación, la proteína SUMO se separó mediante la adición de 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 2 mM de ditioneitol (DTT) y 0.1 mg de

proteasa HRV 3C por 10 mg de proteína purificada. La escisión se realizó durante 16 horas (toda la noche) a 4 °C. Posteriormente las proteínas G0S2 escindidas fueron desaladas de la siguiente manera: la proteína de humano en el amortiguador A [50 mM Tris (pH 8.0), 0.5 mM EDTA y 1mM DTT] y la proteína de ratón en el amortiguador B [50 mM HEPES (pH 8.2), 0.5 mM EDTA y 1 mM DTT] para después ser inyectadas a las columnas Hitrap Q HP y Hitrap S HP (GE Healthcare) equilibradas con el mismo amortiguador respectivamente. Las proteínas fueron eluidas mediante un gradiente lineal de 0 a 500 mM de NaCl en el amortiguador en el que fueron preparadas (20 CV). Las proteínas eluidas fueron concentradas por ultrafiltración en una unidad Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) con un límite de peso molecular nominal (NMWL) de 3 kDa, para posteriormente llevar a cabo una cromatografía por exclusión por tamaño (SEC) en una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) con el amortiguador [20 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA y 1.0 mM DTT]. La concentración de las proteínas se midió a 205 nm (A_{205}), como se describe por Scopes [49]. El coeficiente de extinción de G0S2 de humano y ratón a una longitud de onda de 205 nm ($E_{205}^{0.1\%}$) se determinó directamente utilizando el método descrito por Anthis y Clore [50]. $E_{205}^{0.1\%} = 29.70$ y 30.23 para G0S2 de humano y ratón, respectivamente.

Cromatografía de exclusión por tamaño analítico (SEC analítico)

Los experimentos SEC se realizaron con una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) en un sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare), a un flujo de 0.5 ml/min a temperatura ambiente. Se inyectó independientemente 0.1 ml de G0S2

de humano y de ratón previamente purificadas (1mg/mL). La detección se realizó monitoreando la absorbancia a 280 nm. La columna se equilibró con el amortiguador [20 mM Tris-HCl pH 8.0 y 150 mM NaCl] y se calibró utilizando las siguientes proteínas estándar: ovoalbúmina (44 kDa, 28.42 Å), mioglobina (17 kDa, 20.24 Å), insulina (5.8 kDa, 13.78 Å) y vitamina B12 (1.35 kDa, 8.19 Å). Los radios de Stokes (R_s) de las proteínas estándar se calcularon de acuerdo con la Ec 1 [51].

$$\log (R_s) = -(0.204 \pm 0.023) + (0.357 \pm 0.005)\log (MW) \quad (1)$$

El volumen total de la columna (V_T) fue de 24 ml, y el volumen vacío de la columna (V_0) de 8.2 ml se determinó usando tiroglobulina. El volumen de elución (V_E) de cada proteína estándar se utilizó para calcular los coeficientes de distribución de la fase de gel (factores K_{AV}) de acuerdo con la Ec 2 [52]. Los valores de K_{AV} se representaron en función de R_s calculada y se ajustaron a la curva estándar. Finalmente, los R_s de GOS2 de humano y de ratón fueron calculados.

$$K_{AV} = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0} \quad (2)$$

Dispersión dinámica de luz

Los experimentos de dispersión dinámica de luz se llevaron a cabo en un equipo Zetasizer APS2000 (Malvern Instruments) a 25 °C. Se estimó el radio de GOS2 de humano y ratón a una concentración de 1 mg/mL en el amortiguador [20 mM Tris (pH8.0) y 1 mM beta-mercaptoetanol (BME)]. La desnaturalización de ambas proteínas se hizo mediante la incubación de éstas con concentraciones crecientes

de urea [0 a 8 M] durante toda la noche a temperatura ambiente. Para cada concentración de urea se realizó la medición del radio hidrodinámico, hasta el completo desplegamiento de las proteínas. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Espectroscopía de dicroísmo circular (CD)

Las mediciones de CD se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con un soporte de celda tipo Peltier PFD-425S para control de temperatura. Los espectros de CD se registraron de 194 a 250 nm utilizando celdas de paso de luz de 0.1 cm. Todas las muestras se prepararon a una concentración de proteína de 0.25 mg/mL (22 μ M) en un amortiguador [20 mM fosfato de potasio (pH 8.0) y 20 mM NaCl]. La elipticidad se reporta como elipticidad media por residuo [θ].

Resultados y discusión

Análisis *in silico* sugiere el carácter desordenado del extremo carboxilo terminal de G0S2

El análisis *in silico* de las secuencias de G0S2 de humano y ratón incluyó la predicción de regiones desordenadas utilizando el servidor GeneSilico MetaDisorder [46]. El análisis de las secuencias indica tendencias de desorden que son similares, pero no idénticas. Ambas proteínas comparten el mismo dominio hidrofóbico el cual se predice que es la parte más estructurada de la

proteína (residuos 27–42, Fig. 1A), pero es notable que los extremos a partir de esta región tienden inmediatamente hacia el desorden, siendo el dominio carboxilo de G0S2 de humano el que se predice está totalmente desordenado, en comparación con el de la proteína de ratón que también muestra flexibilidad (Fig. 1B). Se ha observado previamente que en eucariontes el 36% del proteoma corresponde a proteínas que contienen >20% de desorden y que estos segmentos corresponden a regiones de al menos 30 residuos [53]. Basándonos en estos datos decidimos realizar análisis adicionales *in silico* con las secuencias C-terminal de ambas proteínas, que corresponden a los últimos 35 residuos (del 68 al 103) y que fueron denominados G0S2C (Fig. 1A). El software Composition Profiler [47] se utilizó para evaluar la abundancia o escasez de los contenidos de aminoácidos de G0S2C en relación con la base de datos SwissProt 51, la cual contiene las distribuciones de aminoácidos en las proteínas encontradas en la naturaleza [54]. Los resultados para G0S2C de ambas proteínas, se analizaron junto con las distribuciones de aminoácidos en proteínas determinadas experimentalmente como proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs por sus siglas en inglés) y depositadas en la base de datos DisProt 3.4 [55]. En comparación con la base de datos SwissProt 51, la secuencia de G0S2C de humano y ratón son pobres en residuos no polares promotores de orden (W, F, Y, I y N) y enriquecidas en el aminoácido promotor de desorden (Q) [56], con la diferencia que el dominio de ratón también se encuentra enriquecido con los aminoácidos (C) y (A), ambos residuos son conocidos por ser formadores de alfas hélices siendo el residuo de cisteína el mayor promotor de orden en comparación con la alanina [57] (Fig. 1C), también se encontró que el carboxilo de ratón tiene

una cantidad atípica de histidinas en comparación con los IDPs, sin embargo este aminoácido está clasificado como neutral en términos de desorden [56] . Este análisis muestra que, la composición de aminoácidos de G0S2 de humano es más similar a las de las proteínas depositadas en la base de datos DisProt 3.4, lo que sugiere que puede mostrar propiedades de IDPs. En tanto para G0S2C de ratón, el análisis muestra una composición más equilibrada de aminoácidos promotores y no promotores de orden (Fig. 1C). Para probar esta hipótesis, se generó un diagrama de Uversky [48]. Este diagrama representa la carga neta media frente a la hidrofobicidad media y distingue a los IDPs de las proteínas ordenadas. G0S2C de humano ocupa una posición bien definida en la cual se localizan las proteínas desordenadas. Para G0S2C de ratón, ésta ocupa una posición cercana en la zona ocupada tanto para proteínas ordenadas como desordenadas (Fig. 1D). Los resultados de nuestros análisis *in silico* son consistentes y sugieren el carácter desordenado del carboxilo terminal de G0S2 de humano, pero no nos permiten definir las características estructurales de G0S2 de ratón. Por lo tanto, decidimos realizar un análisis *in vitro* para obtener información sobre la estructura de ambas proteínas y corroborar nuestras predicciones.

Análisis hidrodinámicos de G0S2 de humano y ratón

Para obtener información de los parámetros hidrodinámicos relacionados con la forma de ambas proteínas se realizaron experimentos de SEC y DLS [58,59]. G0S2 de humano y G0S2 de ratón fueron clonadas y purificadas como se describe en la sección de *Métodos*. En la Figura 1E, se muestra el perfil electroforético de

ambas proteínas después del último paso de purificación (exclusión molecular) a 5 y 2 μg , humano y ratón, respectivamente.

En los experimentos de SEC, G0S2 de humano eluyó como un pico único (Fig. 2A) con un volumen de elución correspondiente a un R_s de 18.8 Å y fue aproximadamente 1.1 veces mayor que el valor teórico de 17.5 Å calculado suponiendo que G0S2 tiene una estructura globular y un peso molecular de 11.3 kDa (Fig. 2B). Esta diferencia resultó significativa, calculada mediante una prueba t de una muestra ($P = 0.0003$). Por otra parte, G0S2 de ratón eluyó de igual forma en un solo pico único (Fig. 2A) con un volumen de elución correspondiente a un R_s de 17.5 Å para el cual no hubo una diferencia significativa ($P = 0.0625$) al valor teórico de 17.4 Å calculado con un peso molecular de 11.1 kDa (Fig. 2B). El volumen determinado experimentalmente para G0S2 de humano fue de 28 Å³ el cual fue mayor que el volumen teórico de 22.4 Å³, mientras que la densidad experimental de 0.40 kDa/Å³ fue menor que la densidad teórica de 0.50 kDa/Å³ (Tabla 1). Por otra parte, los valores experimentales de volumen (22.5 Å³) y densidad (0.5 kDa/Å³) de G0S2 de ratón fueron muy similares a los teóricos que fueron de 22 Å³ y 0.5 kDa/Å³, respectivamente (Tabla 1). Los perfiles de elución de las proteínas G0S2 de humano y ratón nos indican diferencias en forma y tamaño de éstas, a pesar de que ambas proteínas son de 103 aminoácidos. Esta diferencia puede deberse a las características estructurales de las regiones carboxilo terminal de cada proteína, ya que se predice que el de humano se encuentra más desordenado que el de ratón (Fig. 1B). Estos datos nos permiten concluir que G0S2 de humano tiene una estructura extendida en comparación con G0S2 de ratón, la cual tiene una conformación más compacta y globular.

Tras observar la diferencia de forma (tamaño) entre G0S2 de humano y ratón, se llevaron a cabo mediciones de DLS para calcular los radios hidrodinámicos (R_h) de cada proteína y compararlos con los datos obtenidos de SEC. La distribución de tamaño de las muestras de proteína mostró la presencia de una sola especie con un R_h aparente de 1.4 ± 0.03 nm y 1.7 ± 0.02 nm para G0S2 de humano y ratón, respectivamente (Fig. 3A). Para la proteína de ratón, el diámetro calculado por DLS nos confirma que se encuentra en una conformación compacta y globular, ya que su R_h concuerda bien con el R_s que también es de 1.7 nm (17.4 Å, Table 1). Por otro lado, el R_h obtenido de la proteína humana nos indica que la proteína difunde como una proteína más pequeña con un tamaño aproximado de 8 kDa, nosotros sugerimos que este comportamiento en el experimento de DLS se debe a que la proteína de humano presenta una región globular que comprende los residuos 1-68 (7.48 kDa) que corresponde con el valor observado por DLS, mientras que su extremo C-terminal (residuos 69-103, 3.85 kDa) se encuentra desplegado. Al observar estas diferencias de R_h en los estados nativos de ambas proteínas, decidimos explorar el comportamiento en condiciones desnaturizantes ya que ambas proteínas tienen el mismo número de aminoácidos y comparten una identidad global del 77.7%, por lo que es de esperar que ambas proteínas muestren el mismo R_h en condiciones desnaturizantes.

Se realizaron curvas de desnaturización de G0S2 de humano y de ratón, en presencia de concentraciones crecientes de urea y se estimó el R_h por DLS para cada concentración de caotrópico utilizada (Fig. 3B). Los datos exhiben un comportamiento sigmoidal para la proteína de humano y un aumento en el radio hidrodinámico aparente experimental. Se observa una sola transición en el rango

de 2 a 6 M de urea, con una transición de punto medio C_M , de 4.4 M, la proteína pierde su estructura a 6 M de urea y se despliega totalmente alcanzando un R_h de 3.5 ± 0.06 nm que concuerda bien con el R_h esperado para el estado desplegado de una proteína de 103 residuos que es de 2.96 nm [60]. El proceso de desnaturalización de la proteína de ratón inicia con un R_h de 1.7 ± 0.02 nm, y se observa que de 0 a 2 M de urea, la proteína tiene un proceso de “swelling” en el cual las cadenas laterales de los aminoácidos dejan de interactuar entre sí y empiezan a interactuar con la urea [61]. Cuando la proteína se encuentra en una concentración de 3 M de urea su R_h colapsa hasta un valor de 1.4 ± 0.01 nm, que corresponde al mismo valor que presenta la proteína de humano en su estado nativo (1.4 ± 0.03 nm), mientras que, a concentraciones superiores de urea, G0S2 de ratón sigue el mismo patrón observado para G0S2 de humano hasta alcanzar un R_h de 3.4 ± 0.01 nm a 6 M de urea. Estos resultados sugieren que la proteína de ratón contiene un elemento estructural lábil en la región C-terminal, el cual se desestabiliza y despliega a concentraciones bajas de urea (3 M).

Estudios previos han mostrado que las IDPs pueden presentar regiones con propensión a estructurarse que muestran transiciones desorden-orden, cuya función es dirigir la interacción de la IDP con su proteína asociada [62,63].

Con el objetivo de identificar un posible elemento estructural en el carboxilo terminal de G0S2, analizamos las secuencias de humano y ratón con el servidor MoRFpred [64] para identificar regiones de reconocimiento molecular (MoRFs) con propensión a presentar transiciones desorden-orden. La predicción identifica a los residuos 95-102 (**ALSLRQHA**) de la proteína de ratón, como una posible región MoRF. Adicionalmente, el servidor Jpred4 [65] predice una estructura de tipo

hélice alfa para los residuos 95-101. En el caso de la proteína de humano, la región 95-102 (**ALSNRQHA**) también se predice como MoRF, pero con menor probabilidad (6 de 8 residuos) y se predice una hélice alfa más corta (3 residuos), por lo que, de formarse una hélice alfa, ésta podría ser poco estable en solución. Estos datos sugieren que los residuos 95-102 forman parte del elemento estructural que se despliega a bajas concentraciones de urea (3 M) en la proteína de ratón y que se observan desplegados en condiciones nativas en la proteína de humano.

El análisis del contenido de la estructura secundaria por CD de UV lejano revela que G0S2 está en gran parte desestructurada

La espectroscopia de CD es una herramienta ampliamente utilizada para evaluar el contenido de la estructura secundaria y las propiedades de plegamiento de las proteínas [66]. Para investigar la estructura secundaria de G0S2, se registraron espectros de CD de UV lejano. Los espectros de CD de G0S2 de humano y ratón exhiben propiedades típicas de IDPs. Éstos muestran un mínimo cercano a 200 nm ($-11.67 \times 10^{-3} \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) y ($-12.05 \times 10^{-3} \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) y un pequeño pico negativo cercano a 222 nm ($-2.55 \times 10^{-3} \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$) y ($1.48 \times 10^{-3} \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$), G0S2 humano y ratón, respectivamente, lo que sugiere la presencia de estructuras secundarias residuales, las cuales podrían estar relacionadas con el dominio hidrofóbico (residuos 27–42) que en el análisis bioinformático se predice estructurado y que ha sido identificado como parte del dominio mínimo de interacción con ATGL (residuos 20-52) [29] (Fig. 4 A), así como también el elemento estructural en la región C-terminal en el caso de la

proteína de ratón. De hecho, de acuerdo con Uversky, los IDPs pueden asignarse a dos grupos estructuralmente diferentes: coil-like (tipo coil) y PMG-like (tipo pre-glóbulo fundido), dependiendo de la relación de los valores de elipticidad a 200 y 222 nm, y cada grupo se caracteriza por valores específicos [67]. En referencia a los datos obtenidos del espectro de CD, tanto G0S2 de humano como de ratón se encuentran más cercanos al área ocupada por IDPs similares a PMG-like (Fig. 4B). Estos resultados son interesantes puesto que los análisis *in silico* solo fueron capaces de predecir el carácter desordenado del extremo C-terminal de G0S2 de humano, mientras que la caracterización experimental demuestra que ambas proteínas se comportan como IDPs en las condiciones experimentales exploradas.

Hemos observado que G0S2 de humano y ratón tienen compacidad, esto puede deberse a las interacciones de su dominio hidrofóbico que unen y compactan la cadena de polipéptidos, sin embargo, nuestro análisis muestra que los extremos de este dominio tienden al desorden. Es sabido que, en algunos casos se pueden formar estados de glóbulos fundidos compactos pero desordenados, o que las regiones locales de la secuencia pueden tener una propensión a adoptar elementos aislados y fluctuantes de estructura secundaria, lo que es equivalente al pre-glóbulo fundido propuesto por Uversky [67]. Es poco probable, que las proteínas se comporten como verdaderos coil-like, especialmente en medios no desnaturizantes, ya que incluso en sus estados más altamente desplegados, las proteínas muestran una propensión a formar elementos locales de estructura secundaria o grupos hidrofóbicos [68,69] En particular, las diferencias estructurales que observamos en el extremo carboxilo de ambas proteínas,

pueden sugerir que G0S2 de ratón tiene una función más acotada que la proteína de humano. Para explorar esta posibilidad, analizamos *in silico* la presencia sitios de modificación postraduccional (PTM) en G0S2C de humano y ratón. Encontramos que G0S2C de ratón presenta un posible sitio de fosforilación (Ser 97), mientras que G0S2C de humano presenta dos posibles sitios de fosforilación (Ser 97 y Thr 89). La fosforilación de regiones desordenadas ha sido descrita en algunas proteínas por ejemplo, se ha demostrado que la fosforilación de las regiones desordenadas tanto del N- como del C- terminal regulan la actividad de Ets1 [70], un factor de transcripción que regula varias vías que desempeñan papeles clave en enfermedades, incluido el cáncer y la autoinmunidad [71,72]. En el caso de p53, la fosforilación y acetilación tienen un profundo efecto en las preferencias conformacionales de su dominio regulador negativo (NRD) intrínsecamente desordenado, regulando así la actividad de esta proteína [73]. Por lo tanto, futuros estudios permitirán discernir si el carácter desordenado del dominio C-terminal de G0S2 de humano tiene o no una relevancia en su función como proteína diana.

Pies de figura

Fig 1. Análisis *in silico* y purificación de G0S2 de humano y ratón. (A) Esquema que representa la estructura de G0S2. En naranja se indica el dominio hidrofóbico. (B) Predicción de regiones no ordenadas basadas en la secuencia de aminoácidos de la proteína G0S2 de humano y ratón. Los cálculos se realizaron utilizando el software MetaDisorder. Una puntuación de más de 0.5 indica una alta probabilidad de desorden. (C) Composición de aminoácidos. Composition Profiler fue utilizado

para analizar la composición de aminoácidos. Los resultados obtenidos para G0S2C de humano (barras rojas) y ratón (barras azules) se combinaron con las distribuciones de aminoácidos en proteínas identificadas experimentalmente como IDPs (barras grises). Todos los resultados se refieren a la base de datos SwissProt 51 y las distribuciones de aminoácidos en las proteínas encontradas en la naturaleza. Los aminoácidos se organizan en orden creciente de capacidad de promover el desorden. Los valores por encima de cero indican abundancia, y los valores por debajo de cero indican un déficit de un residuo dado. (D) Gráfico de carga-hidropatía. El gráfico de Uversky compara la carga neta media absoluta y la hidropatía media de las proteínas desordenadas (círculos blancos) y ordenadas (círculos grises). Se muestra el límite entre proteínas ordenadas y desordenadas. Los círculos rojo y azul corresponden a G0S2C de humano y ratón, respectivamente. (E) SDS-PAGE de G0S2 de humano y ratón después de la purificación. Se cargó una alícuota de la proteína después de la purificación (250 y 100 μ g, respectivamente). La pureza de la proteína, calculada con el software ImageJ, fue $\geq 95\%$.

Fig 2. Determinación de radios de Stokes para G0S2 de humano y ratón por filtración en gel. (A) SEC analítica. Los experimentos se realizaron en una columna Superdex75 10/300 GL. La curva roja y azul representan el volumen de elución de G0S2 de humano y ratón, respectivamente. (B) Curva de calibración preparada trazando el valor de K_{AV} de proteínas estándar (puntos negros) versus su correspondiente valor de R_s . El círculo rojo y azul corresponden a G0S2 de

humano y ratón, respectivamente. Los parámetros teóricos y experimentales obtenidos fueron el radio de Stokes, volumen y densidad de cada proteína.

Fig 3. Radios hidrodinámicos de G0S2 de humano y ratón en estado nativo y desplegado. (A) Distribuciones de tamaño de muestras de G0S2 de humano (rojo) y ratón (azul) obtenidas con DLS bajo condiciones nativas. (B) Radios hidrodinámicos de G0S2 de humano (rojo) y ratón (azul) tras la desnaturalización con urea monitoreada por DLS. La línea continua es el mejor ajuste usando un modelo de despliegue de equilibrio de múltiples estados.

Fig 4. Espectro de CD en el UV lejano de G0S2 de humano y ratón. (A) Se registro el espectro de CD de G0S2 de humano (rojo) y ratón (azul) en amortiguador [20 mM fosfato de potasio (pH 8.0) y 20 mM NaCl] a una concentración de proteína de 22 μ M. (B) Una gráfica de doble longitud de onda que muestra $[\theta]_{222}$ versus $[\theta]_{200}$ para tipo coil (círculos blancos) y PMG-like (círculos grises). La posición de G0S2 de humano y ratón se indica con un círculo rojo y azul, respectivamente.

Figuras y Tablas

Tabla 1. Caracterización de G0S2 de humano y ratón por SEC.

MM [kDa]	R_s [Å]		$V_s \cdot 10^3$ [Å ³]		$\rho \cdot 10^3$ [kDa/Å ³]	
	Teórico	Experimental	Teórico ^a	Expe ^b	Teórico ^a	Expe ^b
11.3 ^h	17.5	18.8 ± 0.03	22.4	28.0	0.5	0.4
11.1 ^m	17.4	17.5 ± 0.05	22.0	22.5	0.5	0.5

^aCalculado usando el R_s teórico. ^h Humano

^bCalculado usando el R_s experimental. ^m Ratón

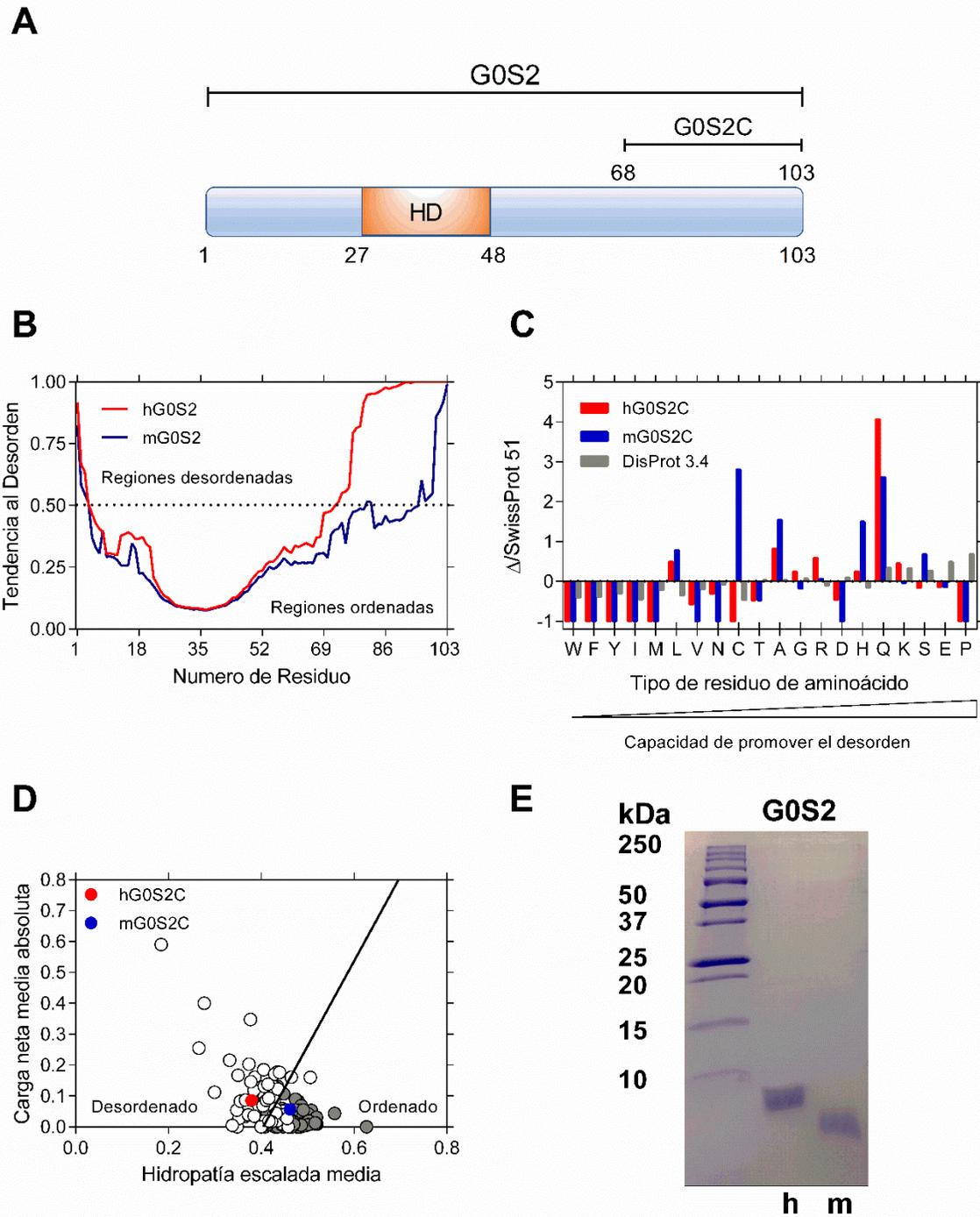


Fig 1. Análisis in silico y purificación de G0S2 de humano y ratón.

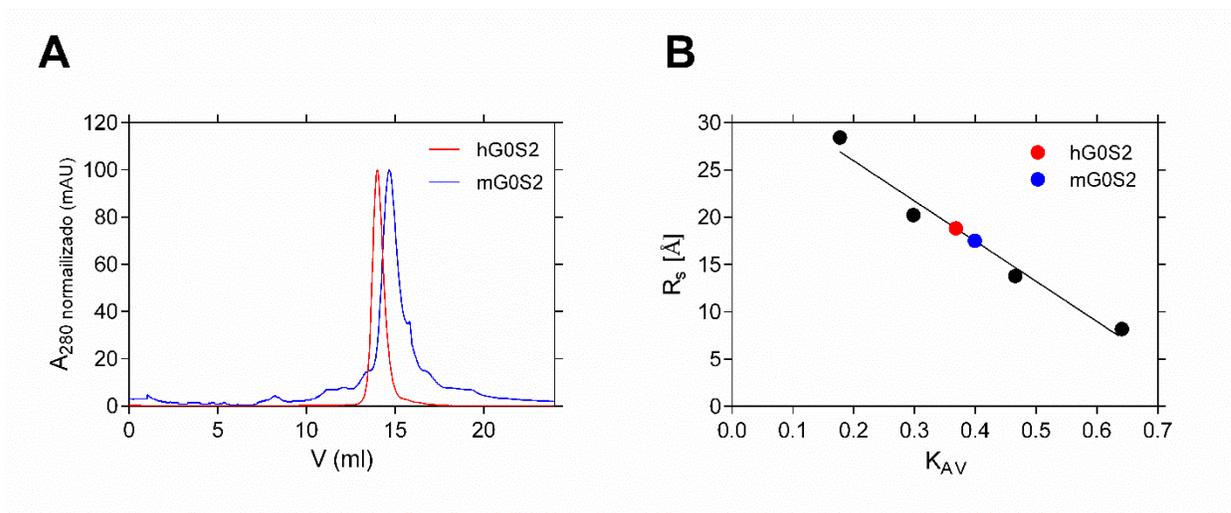


Fig 2. Determinación de radios de Stokes para G0S2 de humano y ratón por filtración en gel.

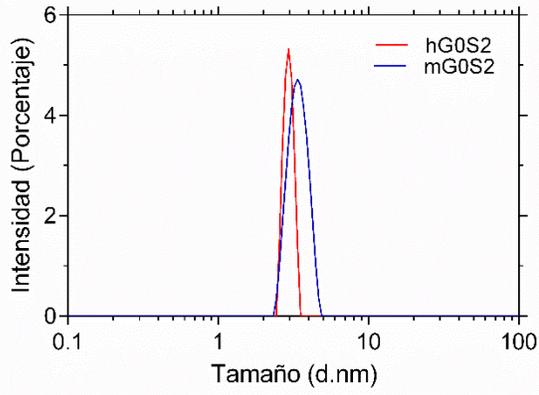
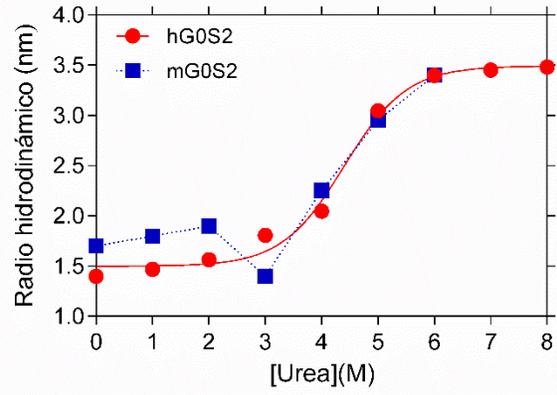
A**B**

Fig 3. Radios hidrodinámicos de G0S2 de humano y ratón en estado nativo y desplegado.

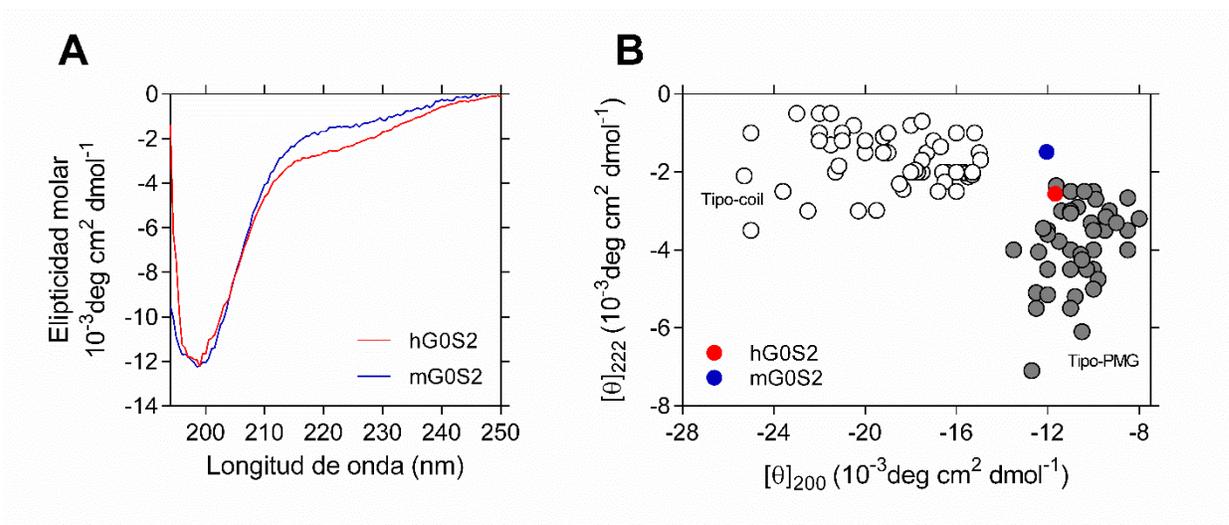


Fig 4. Espectro de CD en el UV lejano de G0S2 de humano y ratón.

Capítulo 2

Desorden estructural en el dominio C- terminal de PLIN1

El adipocito es un tipo de célula muy peculiar en distintos aspectos, ya que almacena el exceso de energía en forma de lípidos neutros y, por lo tanto, puede cambiar drásticamente su tamaño de acuerdo con las necesidades metabólicas que se presenten [74]. Estos lípidos neutros pueden ser liberados como ácidos grasos libres para su uso por otros tejidos durante ayuno o ejercicio [75]. El triacilglicerol (TG) y el éster de colesterol son los principales lípidos neutros en el cuerpo humano. Debido a su naturaleza hidrofóbica, estos lípidos son insolubles en agua y forman espontáneamente agregados para minimizar las interfases lípido-agua. En consecuencia, la estructura de una gota de lípido comprende un núcleo de lípidos rodeado por una monocapa de fosfolípidos y proteínas de superficie especializadas [3]. Algunas de estas proteínas que recubren las gotas de lípidos coordinan la absorción y liberación de ácidos grasos, [76]. En adipocitos humanos, la proteína más abundante y fosforilada asociada a gotas de lípidos es la Perilipina 1 (PLIN1) [77]. En mamíferos, PLIN1 junto con otras 4 proteínas forman la familia de proteínas Perilipinas (PLIN1-5), las PLIN2 y 3 se expresan de forma ubicua, mientras que las PLIN1,4 y 5 tienen una expresión tisular más limitada. En gotas de lípidos se encuentran exclusivamente asociadas las PLIN1 y 2 [2]. Se encontró que esta proteínas poseían un dominio conservado llamada dominio PAT [78], Además del dominio PAT, estas proteínas tienen un dominio de repetición 11-mer en común. Aunque el dominio PAT está involucrado en la

asociación de estas proteínas con las gotas de lípidos, también se han sugerido otros segmentos que intervienen en su interacción, como lo son las regiones N- y C- terminales, así como también regiones centrales de las proteínas PLIN1 y PLIN2 [79,80]. Es importante destacar que la subestructura helicoidal 11-mer se encuentra presente en varias proteínas asociadas a la membrana, como la sinucleínas y apolipoproteínas, y puede mediar la interacción con los fosfolípidos [81]. Entre los miembros de la familia PLIN, PLIN1 tiene una característica estructural única, esta proteína posee un extremo C-terminal distinto al de otras PLINs, que le permite regular la lipólisis. En el estado basal o de alimentación, el extremo C-terminal de la PLIN1 secuestra a CGI-58, un coactivador esencial de ATGL, evitando que active a la lipasa. Después de la fosforilación mediada por la proteína quinasa A (PKA) del extremo C-terminal de PLIN1, se libera CGI-58, lo que le permite unirse y activar ATGL, que cataliza la hidrólisis del TG [82]. Se ha propuesto una región de interacción con CGI-58 que comprende los residuos 361 al 419, esta región proviene de un segmento del exón C-terminal específico de PLIN1. Por tanto, es muy diferente de las secuencias corriente abajo de esa región en otras PLINs [82]. Esta región comienza en la posición del aminoácido 404 en la secuencia humana y exactamente en la posición homóloga en los ortólogos de vertebrados [82].

La lipólisis es un proceso altamente regulado, en el cual PLIN1 tiene un importante papel que desempeñar, ya que se ha visto que pacientes con mutaciones con pérdida de función de esta proteína, tienen una lipólisis elevada cuyas consecuencias metabólicas incluyen lipodistrofia parcial, severa resistencia a la insulina, diabetes, dislipidemia y enfermedad del hígado graso no alcohólico [83].

Estudios recientes han puesto de manifiesto que el extremo C-terminal de PLIN1 está adaptado de forma única para secuestrar a CGI58 y así inhibir la lipólisis basal [82]. Hasta la fecha no ha resuelto la estructura tridimensional de esta proteína, al igual que se carece de estudios biofísicos que nos permitan conocer más a fondo la regulación de la lipólisis mediada por esta proteína. Por lo que en este trabajo describimos el resultado de un análisis bioinformático y la caracterización bioquímica y biofísica del dominio C-terminal de PLIN1 de ratón. Nuestros resultados muestran que este dominio se comporta como una región intrínsecamente desordenada (IDR) del tipo coil (coil-like) en solución y del tipo pre-globulo fundido (PMG-like) en un modelo de interacción con lípidos.

Materiales y métodos

Análisis in silico

El perfil de desorden intrínseco se generó utilizando el algoritmo VSL2 de PONDR [84], así como también los análisis de carga-hidropatía, ambos disponibles en (<http://www.pondr.com/>). La composición de aminoácidos se realizó con Composition Profiler [47] disponible en (<http://www.cprofiler.org>). Los análisis de HCA [85] (hydrophobic cluster analysis) se llevaron a cabo en (<https://mobylye.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::HCA>).

La predicción de estructura secundaria se generó con FIELDS [86] (<http://old.protein.bio.unipd.it/fells/>). Mientras que la búsqueda de MoRFs se realizó con las plataformas MoRFPred [64] (<http://biomine.cs.vcu.edu/servers/MoRFPred/>) y ANCHOR (<https://iupred2a.elte.hu/>) [87].

Expresión y purificación del dominio C-terminal de mPLIN1C

El cDNA que codifica para el dominio C-terminal de PLIN1 de ratón (mPLIN1C), que consta de los residuos 406-517, se encuentra clonado entre los sitios de restricción NdeI y Sall del vector de expresión pET28, a esta construcción se le denominó pET28mPLIN1C. Células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) fueron transformadas con esta construcción. Las células se cultivaron a 37 °C hasta que alcanzaron una densidad óptica OD₆₀₀ de 0.6, posteriormente se agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM, y las células se cultivaron a la misma temperatura por 4 horas más. Las células fueron cosechadas y resuspendidas en amortiguador de lisis [50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 2mM Beta-mercaptoetanol y 10 mM Imidazol] y sonicadas en hielo, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C por 15 minutos. El sobrenadante de células lisadas se cargó en una columna con resina Ni-NTA (Qiagen) equilibrada con amortiguador de lisis. La columna se lavó con amortiguador de lisis (3 CV). Se aplicó una elución creciente escalonada con imidazol (50, 250 y 500 mM) preparado en el amortiguador de lisis, para liberar la proteína unida. Las fracciones que contienen a la proteína recombinante se recolectaron y se realizó un intercambio al siguiente amortiguador A [50 mM HEPES pH 7.0, 300 mM NaCl, 2mM Beta-mercaptoetanol y 0.5 mM EDTA], para después ser inyectada a la columna Hitrap S HP (GE Healthcare) equilibrada con el mismo amortiguador. La proteína fue eluída mediante un gradiente lineal de 0.3 a 1 M de NaCl en el amortiguador que fueron preparada (15 CV). La concentración de proteína se

midió a 205 nm (A_{205}) [49] utilizando el coeficiente de extinción molar $E_{205}^{0.1\%} = 30.79$ calculado [50].

Cromatografía de exclusión por tamaño analítico (SEC analítico)

Se inyectó una muestra de 100 μ L de mPLIN1C purificada a una concentración de 1 mg/mL en una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada en el amortiguador SEC [20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl y 1 mM Beta-mercaptoetanol] a un flujo de 0.5 mL/min a temperatura ambiente. La columna se calibró utilizando las siguientes proteínas estándar: ovoalbúmina (44 kDa), mioglobina (17 kDa), insulina (5.8 kDa) y vitamina B12 (1.35 kDa). Los radios de Stokes (R_s) de las proteínas estándar se calcularon de acuerdo con la Ec 1 [51].

$$\log (R_s) = -(0.204 \pm 0.023) + (0.357 \pm 0.005)\log (MW)$$

(1)

El volumen total de la columna (V_T) fue de 24 mL, y el volumen vacío de la columna (V_0) de 8.2 mL se determinó usando tiroglobulina. El volumen de elución (V_E) de cada proteína estándar se utilizó para calcular los coeficientes de distribución de la fase de gel (factores K_{AV}) de acuerdo con la Ec 2 [52].

$$K_{AV} = \frac{V_E - V_0}{V_T - V_0}$$

(2)

Dispersión dinámica de luz

Los experimentos de dispersión dinámica de luz se llevaron a cabo en un equipo Zetasizer APS2000 (Malvern Instruments) a 25 °C. Se estimó el radio de mPLIN1C a una concentración de 1 mg/mL en el amortiguador CD [20 mM fosfato de sodio

(pH 7.4) y 20 ml NaCl]. La desnaturalización de la proteína se hizo mediante la incubación de ésta con concentraciones crecientes de urea durante toda la noche a temperatura ambiente. Para cada concentración de urea se realizó la medición del radio hidrodinámico, hasta el completo desplegamiento de la proteína. Para determinar la concentración micelar crítica (CMC) del detergente dodecilsulfato sódico (SDS) en el amortiguador CD, se midió la intensidad de la luz dispersada en kcps (in kilo counts per second) en función de concentraciones crecientes de SDS (0-5 mM). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Espectroscopía de dicroísmo circular (CD)

Las mediciones de CD se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-815 (Jasco Inc., Easton, MD) equipado con un sistema de termorregulación Peltier. Los espectros de CD se registraron de 200 a 250 nm utilizando celdas de paso de luz de 0.1 cm. Todas las muestras se prepararon a una concentración de proteína de 6 μ M en el amortiguador CD. Los espectros de CD también se registraron en presencia de concentraciones crecientes de SDS (1 a 20 mM). La elipticidad se reporta como elipticidad media por residuo $[\theta]$. También se realizó una curva de desnaturalización (20 a 90 °C) monitoreada por la elipticidad a 222 nm. Para estudiar el desplegamiento de la proteína, se realizaron mediciones a una longitud de onda fija de 222 nm en el rango de temperatura de 20 a 90 °C.

Resultados y discusión

Análisis *in silico* sugiere el carácter desordenado del extremo carboxilo terminal de PLIN1

Hasta la fecha hay poca información estructural de la familia de proteínas PLIN, en el contexto de desorden estructural, se tiene reportado la predicción de desorden intrínseco en PLIN2 (Adipophilin) y PLIN3 (TIP47), que pudiera explicar su multifuncionalidad [88]. Nosotros realizamos la predicción de desorden estructural de proteína completa PLIN1 de ratón (mPLIN1), utilizando el algoritmo VSL2 de PONDR, en el cual se muestran tres regiones a lo largo de la secuencia con alta probabilidad de estar desestructuradas (Fig. 1B), estas regiones comprenden los residuos (185-229), (272-330) y (410-517). Esta última región corresponde al dominio C-terminal ausente en los otros miembros de la familia PLIN (Fig. 1A). Como lo muestra el perfil de desorden, el dominio C-terminal de PLIN1 de ratón (mPLIN1C) se predice altamente desestructurado (Fig. 1B). Esta región comprende 107 residuos, y se sabe que sufre modificaciones postraduccionales como la fosforilación de las serinas (S497 y S522), estas fosforilaciones están relacionadas a un mecanismo de liberación de CGI-58 en respuesta a estímulos lipolíticos [21]. Nos dimos a la tarea de analizar la distribución de aminoácidos de esa región de PLIN1, este análisis se realizó con Composition Profiler. La distribución de aminoácidos se combinó y se graficó junto con la distribución de aminoácidos de las proteínas encontradas en la naturaleza así como también de las proteínas clasificadas como IDPs (Fig. 1C), depositadas en SwissProt 51 y DisProt 3.4, respectivamente [54] [55]. Los resultados indican que mPLIN1C

carece de aminoácidos no polares promotores de orden (W, F, Y, I and N) en comparación con la base de datos SwissProt. En contraste, este dominio se encuentra enriquecido en los residuos promotores de desorden (R,S y P) [56]. Por lo tanto, la composición de aminoácidos de mPLIN1C es muy similar a la de las proteínas depositadas en la base de datos DisProt, lo cual sugiere que mPLIN1C tiene propiedades de IDR. Para entender la posible conformación de este dominio, se realizó un análisis de las propiedades de la carga neta media y la hidrofobicidad media, ya que estas propiedades se han utilizado para distinguir IDPs de las proteínas ordenadas [48]. La figura 1D muestra que mPLIN1C se localiza en una posición bien definida que corresponde a los IDPs. Estos resultados sugieren el carácter desordenado del dominio C terminal de Perilipin 1.

Expresión y purificación de mPLIN1C

Para evaluar experimentalmente la naturaleza desordenada predicha de mPLIN1C, expresamos la proteína en la cepa *Escherichia coli* BL21 (DE3) por los buenos rendimientos que se obtienen. El primer paso de purificación consistió en una cromatografía de afinidad a níquel debido a que este dominio tiene en su extremo N-terminal una etiqueta de histidinas. La elución de la proteína se realizó con un gradiente escalonado de imidazol [10-500 mM], en el cual se observa que la proteína eluye a partir de una concentración de imidazol de 250 mM. Este dominio tiene un punto isoeléctrico de 10.2, que nos indica que es una proteína básica. Por tanto, para remover las proteínas contaminantes, se llevó a cabo un proceso adicional de purificación que consistió en una cromatografía de intercambio catiónico. Los primeros intentos de desalar la proteína resultaron en

su agregación, por lo que la unión de la proteína a la columna se realizó a una concentración de 300 mM de NaCl. La concentración de sal con la que comienza su elución fue a partir de 350 mM. No fue necesario otro paso de purificación ya que la muestra de proteína obtenida hasta al momento mostraba la pureza necesaria para los experimentos posteriores. Un primer indicio de la posible naturaleza desordenada de la proteína es la movilidad anómala que se observa en su perfil electroforético (Fig. 2C). Esta proteína con su etiqueta 6XHis tiene un peso teórico de 15.6 kDa y tiene una migración anormal cercana a los 20 kDa. Una característica de las IDPs es que tienen una unión menos eficiente de SDS en comparación con proteínas regulares de pesos moleculares similares, esto se debe a su inusual composición de aminoácidos.

Análisis hidrodinámicos confirman el carácter desordenado del extremo carboxilo terminal de PLIN1

Se realizaron experimentos de SEC y DLS para estudiar las propiedades hidrodinámicas de mPLIN1C, ya que estos son parámetros útiles para estimar el tamaño y forma de las proteínas [58,59]. En el ensayo de SEC analítico, la proteína eluye como un solo pico (Fig. 2A) con un volumen de elución correspondiente a un R_s de 28.3 Å. Si nosotros calculamos el R_s teórico para este dominio, asumiendo el peso molecular de 15.6 kDa y una conformación globular, obtenemos un valor de 19.6 Å (Fig. 2B). El cociente de los radios resulta en una diferencia de 1.4 veces más grande del valor experimental con respecto al teórico. Por lo tanto, los valores de volumen (95 \AA^3) y densidad (0.16 kDa/\AA^3) experimentales difieren en gran medida con los teóricos calculados de 31.5 \AA^3 y

0.50 kDa/Å³, respectivamente (Tabla 1). El valor del R_s experimental se comparó con los valores R_s esperados en función del peso molecular para los siguientes estados de plegamiento de proteínas que incluyen el nativo, glóbulo fundido, pre-glóbulo fundido, nativo desplegado (coil-like) además del desplegado por cloruro de guanidinio (GdnHCl unfolded) [67,89]. El R_s experimental se ubica en una posición entre las proteínas del tipo pre-glóbulo fundido y coil (Fig. 2C). Estos parámetros hidrodinámicos calculados nos muestran que mPLIN1C tiene mayores dimensiones en comparación que si este fuera un dominio globular. Estos datos sugieren que la proteína tiene una estructura extendida o que también se pudiera encontrar en una conformación oligomérica. Para obtener más información sobre la forma molecular de este dominio, se llevaron a cabo mediciones de DLS para calcular el R_h de este dominio. Los resultados sugieren que el dominio parece asumir una estructura monomérica del tipo coil [90] (coil-like) con un R_h de 3.25 ± 1.15 nm (Fig. 3A), con lo cual se estima un peso molecular de 53.1 ± 10.4 kDa (Tabla 2). Posteriormente se realizó una curva de desnaturalización por urea para corroborar que la amplia distribución de tamaño no esté reflejando oligomerización del dominio (Fig. 3B), ya que el peso molecular teórico de la proteína es de 15.6 kDa. Por lo tanto, si el dominio se encuentra formando oligómeros, conforme se aumenta la concentración de urea deberíamos ver la disminución de tamaño que nos indique la disociación de los monómeros que deberían tener un R_h estimado de 1.9 nm, hasta una completa desnaturalización de las proteínas y alcanzar un R_h aproximado de 3.1 nm suponiendo para ambos radios una proteína de 112 residuos [60]. Procesos de disociación oligomérica monitoreada por DLS ya se han realizado, por ejemplo, con la proteína HbGp, la cual nos muestra que

cambios de pH a valores más alcalinos promueven su disociación [91]. La curva de desnaturalización nos muestra que conforme aumentamos la concentración de urea, el R_h no se modifica lo cual nos sugiere que no se está llevando a cabo algún proceso de desplegamiento, y tampoco de disociación oligomérica. Por lo cual se sugiere que el dominio mPLIN1C se encuentra altamente desordenado en solución, ya que tiene una conformación extendida y no tiene propensión a oligomerización.

El análisis del contenido de la estructura secundaria indica que mPLIN1C se comporta como una proteína intrínsecamente desordenada

Para obtener más información sobre el contenido estructural de mPLIN1C, utilizamos espectroscopia de dicroísmo circular en la región ultravioleta lejana [66]. mPLIN1C exhibe un espectro (Fig. 5A) característico de un péptido desordenado, con una elipticidad negativa cerca de los 200 nm ($-15167.38 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) y poca elipticidad a 222 nm ($-1325.619 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$). Estas características se han asociado con la presencia de estructuras residuales del orden del 10-20% [92]. El análisis de los datos de CD utilizando el algoritmo BestSel [93], indica que el mPLIN1C se encuentra principalmente desestructurado, mostrando un contenido de ~54% de coil, ~26.3% de hebras β , ~19.7% de giros β y ninguna contribución de hélices α (Tabla 3). El alto contenido de coils confirma las predicciones de desorden obtenidas por el análisis bioinformático, además también concuerda con que el dominio tiene un alto porcentaje (~42%) de regiones con baja complejidad en su secuencia [94]. Reportes previos predicen que este dominio no forma ninguna estructura secundaria, lo que sugiere que se

encuentra potencialmente disponible para interacciones y expuesto a modificaciones adicionales [82]. Un análisis más detallado utilizando FELLs (fast estimator of latent local structure) [86] muestra que las hebras β deberían de comprender los residuos 408 al 414, 452 al 460 y 478 al 482. Además, hay otros tres segmentos con el potencial de generar una conformación de hebra β , los cuales comprenden los residuos 415 al 422, 467 al 476 y el 488 al 497. Los datos de contenido de estructura secundaria obtenidos por CD corresponden al tipo de conformación que este dominio pudiera tener en solución, por lo que nos dimos a la tarea de investigar qué tipo de conformación pudiera adquirir este dominio en condiciones más cercanas a las nativas. Con ese fin, utilizamos micelas de SDS como modelo de membrana, ya que se considera un buen sustituto para imitar las interacciones que ocurren entre proteínas y lípidos [95]. Para conocer que concentración de SDS se debe usar para obtener micelas en el amortiguador CD, se realizó un experimento de DLS con el cual se calculó la concentración micelar crítica (cmc) (Fig. 4). DLS es adecuado para el estudio de fenómenos de micelización, ya que por debajo de la cmc la intensidad de la luz dispersa detectada de cada concentración es similar a la obtenida del agua, que en nuestro caso es el amortiguado CD. Sin embargo, cuando se alcanza la cmc, la intensidad de la luz dispersa aumenta debido a la presencia de micelas. La intensidad comienza a mostrar un aumento lineal a partir de este punto, ya que el número de micelas aumenta en la solución [96]. La intersección de las líneas con el mejor ajuste a través de los puntos de datos corresponde a un valor de cmc de 1.2 mM (Fig. 4). Posteriormente, adquirimos el espectro de CD en presencia de micelas de SDS para ver los cambios estructurales que pudiera provocar esta unión.

Podemos observar que con una concentración de 1 mM hasta una de 20 mM de SDS (Fig. 5A), la proteína conserva el mismo cambio en su espectro de CD. Con un mínimo cambio de la señal de la elipticidad negativa de 200 a 202 nm, y se observó una ganancia significativa en la señal de CD a 222 nm (Fig. 5C). Esto muestra que en presencia de micelas de SDS, mPLIN1C pierde parte de su conformación β y gana α -helicidad, pero interesantemente hay un ligero aumento en su estructura coil (Tabla 3), lo que sugiere que sigue teniendo una conformación extendida. Reportes previos muestran que una región que comprende los residuos 93 al 192 de PLIN1, el cual incluye la región predicha de 11 mer, muestra que se encuentra desestructurado en solución, pero en la presencia de micelas de detergente se pliega en α -hélices [97]. Un análisis más profundo hecho por FIELDS con respecto a la posible posición de estas α -hélices formadas, nos indica 2 regiones que comprenden los residuos 423 al 432 y 507 al 514.

El contenido de estructuras secundarias se ha utilizado para clasificar los IDPs, en glóbulo fundido (MG), pre-glóbulo fundido (PMG) y random coil (RC). Las proteínas MG tienen conformaciones colapsadas con un contenido significativo de estructuras secundarias; las proteínas PMG muestran regiones hidrofóbicas parcialmente colapsadas con estructuras secundarias residuales, mientras que las proteínas RC tienen grandes dimensiones hidrodinámicas que carecen de estructura secundarias [98]. Para conocer qué tipo de conformación teníamos en ausencia y presencia de micelas, nosotros analizamos los datos de CD utilizando un gráfico de doble longitud de onda de los valores de elipticidad a 200 y 222 nm (Fig. 5B), ya que este enfoque se ha utilizado para diferenciar IDPs en PMG y en

RC [67]. Los datos muestran que mPLIN1C tiene una conformación tipo coil en solución, mientras que en presencia de micelas este dominio se comporta como un MG.

Por otra parte, quisimos comparar cuanta elipticidad a 222 nm se podía ganar mediante plegamiento inducido por calor, ya que esta es una característica típica de los IDPs, ya que es probable que este efecto peculiar se deba al aumento de la fuerza de las interacciones hidrofóbicas que se producen a alta temperatura y que actúan como fuerza impulsora de plegamiento hidrofóbico [48,99]. En el caso de mPLIN1C, aumentar la temperatura globalmente resulta en un aumento de la elipticidad a 222nm (Fig. 5D), cuyo valor alcanzado fue de $(-4390 \text{ deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1})$ a una temperatura de 90°C, este valor es muy similar a los obtenidos con micelas, lo que sugiere que la formación de nueva estructura secundaria es comparable para ambos tipos de plegamiento inducido.

Elementos de reconocimiento molecular (MoRFs) en mPLIN1C

Es bien sabido que la cadena principal de los IDPs no es rígida. En cambio, es altamente dinámica y flexible y generalmente contiene elementos estructurales residuales requeridos para un funcionamiento adecuado [98]. En muchos casos, esta flexibilidad permite a los IDPs interactuar con múltiples partners mediante interacción molecular directa. Cuando los IDP se unen a una proteína, ADN o ARN diana e inhiben o activan las funciones de la diana, se denomina efector [98]. Estudios previos han demostrado que estas regiones muestran transiciones de desorden-orden que facilitan la interacción con múltiples proteínas [62]. Además, la exposición y flexibilidad de los residuos en los IDPs es un factor clave que

facilita las modificaciones postraduccionales (PTM) como la fosforilación. En este contexto, se ha demostrado que en condiciones basales CGI-58 es la proteína con la cual interactúa PLIN1, por medio de su dominio C-terminal; por otro lado, con la estimulación de la lipólisis, este dominio sufre fosforilación para la completa liberación de CGI-58. En este sentido nos dimos a la tarea de buscar MoRFs que puedan indicarnos el posible sitio de interacción con CGI-58. En reportes previos han sugerido que la región involucrada en la interacción de PLIN1 y CGI58 ,abarca los residuos 382-429 del extremo C-terminal de PLIN1 de ratón [100]. Otros intentos de refinar la región mínima para estabilizar a CGI-58 sugieren que la región entre los residuos 361 y 419 es suficiente para este efecto [82]. Sin embargo, el análisis de la homología entre los segmentos relevantes de las PLIN1-3 sugiere fuertemente que los aminoácidos 185-404 están suficientemente bien conservados para sugerir una estructura muy similar en todas las perilipinas, además deleciones del extremo C-terminal de PLIN1, al residuo 404 o 413 interrumpen la interacción. Por lo que se sugiere que el extremo C-terminal de PLIN1 está adaptado de forma única para secuestrar a CGI-58, ya que cuando se fusiona este dominio a las PLIN2 y 3, éstas pueden estabilizar a CGI-58 y suprimir la lipólisis [82].

Nosotros analizamos la secuencia de mPLIN1C con los servidores MoRFpred y ANCHOR, para identificar MoRFs con propensión a presentar transiciones desorden-orden [64,87]. Ambos servidores identifican a los residuos 413-417 (EPESE) como una región MoRF (Fig. 6A). Adicionalmente el servidor FIELDS predice que ese segmento tiene potencial de formar una α -hélice. Anchor también

fue capaz de identificar 3 regiones más con potencial de tener eventos de unión, cabe mencionar que MoRFpred también identificó tres regiones similares, pero con menor probabilidad (Fig. 6A). Además, se realizó un análisis HCA (hydrophobic cluster analysis). HCA proporciona una representación helicoidal bidimensional de secuencias de proteínas en las que se grafican grupos hidrofóbicos a lo largo de la secuencia. Este enfoque ha demostrado ser útil para identificar regiones coiled coil, regiones con composición sesgada y regiones con potencial de plegamiento inducido por transiciones de desorden-orden [85,98]. El análisis de HCA de mPLIN1C distingue tres segmentos con grupos hidrofóbicos, el segmento tres tiene la mayor cantidad de grupos de dos o tres residuos, el segmento 2 únicamente tiene un par de grupos de uno y tres residuos, mientras que el segmento 1, en donde se sugiere que contiene la región de interacción con CGI-58 tiene grupos de uno a tres residuos de longitud. Esto está de acuerdo con el hecho de que las regiones largas desprovistas de grupos hidrofóbicos corresponden a regiones desordenadas y los grupos pequeños dentro de regiones desordenadas corresponden a MoRF putativos [101]. Estos datos sugieren que probablemente la región que comprende el MoRF (EPESE) sea la encargada de la estabilización de CGI-58 ya que esta cae en la zona delimitada por los residuos 361-419 y es exclusiva de la región C-terminal ausente en las otras PLINs. Esto promueve la necesidad de más trabajo para aclarar la posible función de los supuestos MoRF, ya que éstos nos permiten identificar eventos de unión con distintos partners, ya que probablemente CGI-58 no sea la única proteína diana en el metabolismo celular.

Pies de figura

Fig 1. Análisis *in silico* de mPLIN1C. (A) Esquema que representa la estructura de PLIN1; donde se muestran los dominios estructurales pertenecientes a la familia de PLINs (PAT, 11 mer y 4-helix bundle) y su dominio C-terminal único (PLIN1C). (B) Predicción de desorden de PLIN1 de ratón generado por el algoritmo VSL2 de PONDR; valores por encima de 0.5 indica una alta probabilidad de desorden. (C) Distribución de aminoácidos de mPLIN1C (rojo) en relación con la base de datos SWISS-PROT; los datos se muestran combinados con la distribución de aminoácidos encontrados en los IDPs (negro); enriquecimiento (>0) o disminución (<0) en su composición se generó con Composition Profiler. (D) Gráfico de carga-hidropatía. Los valores de carga neta media absoluta versus hidropatía media para un conjunto de proteínas desordenadas (círculos abiertos) y ordenadas (círculos grises) se representaron junto con mPLIN1C.

Fig 2. mPLIN1C recombinante tiene propiedades hidrodinámicas típicas de las proteínas intrínsecamente desordenadas. (A) Cromatograma de SEC analítica; la curva roja representa el perfil de elución de mPLIN1C. (B) Curva de calibración preparada trazando el valor de K_{AV} de proteínas estándar (puntos negros) versus su correspondiente valor de R_s . El círculo rojo corresponde a mPLIN1C. (C) Gráficos logarítmicos de peso molecular (MW) versus R_s para las conformaciones de proteínas indicadas, con el valor de mPLIN1C mostrado (estrella negra); los datos de las proteínas estándar, utilizados para trazar las dependencias R_s (MW) fueron extraídos de [67,89]. (D) Perfil electroforético de mPLIN1C recombinante finalmente purificada.

Fig 3. Radio hidrodinámico de mPLIN1C en estado nativo y desplegado. (A) Distribución de tamaño de muestra de mPLIN1C obtenido con DLS bajo condiciones nativas en solución. (B) Radios hidrodinámicos de mPLIN1C tras la desnaturalización con urea monitoreada por DLS.

Fig 4. Determinación de la concentración micelar crítica por DLS. Intensidad dispersa (kcps) en función de la concentración de SDS (mM). La intersección de las dos líneas en 1.2 mM en los datos de intensidad corresponde a la concentración micelar crítica.

Fig 5. Análisis de mPLIN1C por dicroísmo circular. (A) Se registro el espectro de CD de mPLIN1C en amortiguador [20 mM fosfato de sodio (pH 7.4) y 20 mL NaCl] a una concentración de proteína de 6 μ M en ausencia y presencia de SDS. (B) Una gráfica de doble longitud de onda que muestra $[\theta]_{222}$ versus $[\theta]_{200}$ para tipo coil (círculos grises) y PMG-like (círculos negros); la posición de mPLIN1C se indica con un círculo rojo en ausencia de SDS y en círculos azul, verde, amarillo y morado en presencia creciente de SDS, respectivamente. (C) Ganancia de estructura secundaria en presencia de SDS. La cantidad relativa de α -helicidad se determinó midiendo la elipticidad molar a 222 nm, y la concentración de SDS se varió entre 1 y 20 mM. (D) Elipticidad molar a 222 nm de mPLIN1C como función de la temperatura. El rango de temperatura utilizado fue de 20-90 °C.

Fig 6. Características de reconocimiento molecular predichas en mPLIN1C. (A) Los resultados de MoRFpred y ANCHOR se muestran en rojo y azul, respectivamente; el valor de umbral corresponde a 0.5. El MoRF putativo con mayor probabilidad corresponde a los residuos 413-417 (EPESE). (B) Grafico HCA de mPLIN1C. La forma de los clusters está asociada principalmente a cada tipo de estructura secundaria. Por lo tanto, los grupos horizontales y verticales a menudo corresponden a hélices α y hebras β , respectivamente. Los aminoácidos hidrófobos se muestran en verde. Los residuos básicos y ácidos se muestran en azul y rojo, respectivamente. Los símbolos se utilizan para designar aminoácidos específicos: estrella para prolina, diamante para glicina, cuadrado para treonina y cuadrado punteado para serina.

Figuras y Tablas

Tabla 1. Caracterización de mPLIN1C por SEC.

MM [kDa]	R_s [Å]		$V_s \cdot 10^3$ [Å ³]		$\rho \cdot 10^3$ [kDa/Å ³]	
	Teórico	Experimental	Teórico ^a	Expe ^b	Teórico ^a	Expe ^b
15.55	19.6	28.31	31.54	95.04	0.5	0.16

^aCalculado usando el R_s teórico.

^bCalculado usando el R_s experimental.

Tabla 2. Caracterización de mPLIN1C por DLS.

R_h		$R_h + 8$ M Urea		Peso molecular (kDa)	
[nm]	[Å]	[nm]	[Å]	Teórico ^a	Experimental ^b
3.25	32.5	3.464	34.64	15.5	53.1 ± 10.4

^aCalculado basado en su composición de aminoácidos ^bCalculado por DLS

Tabla 3. Resumen del contenido de estructura secundaria del dominio C-terminal de Perilipin de ratón en ausencia y presencia de SDS

Type of structure	0	1	5	10	20
Helice	0	6.2	5.9	3.1	1.6
Antiparalela	26.3	16.8	17.8	14.7	18.4
Paralela	0	0	0	0	0
Giro	19.7	20.2	17.9	19.3	18.1
Otros (coil)	54	56.8	58.5	63	61.9
Total	100	100	100	100	100

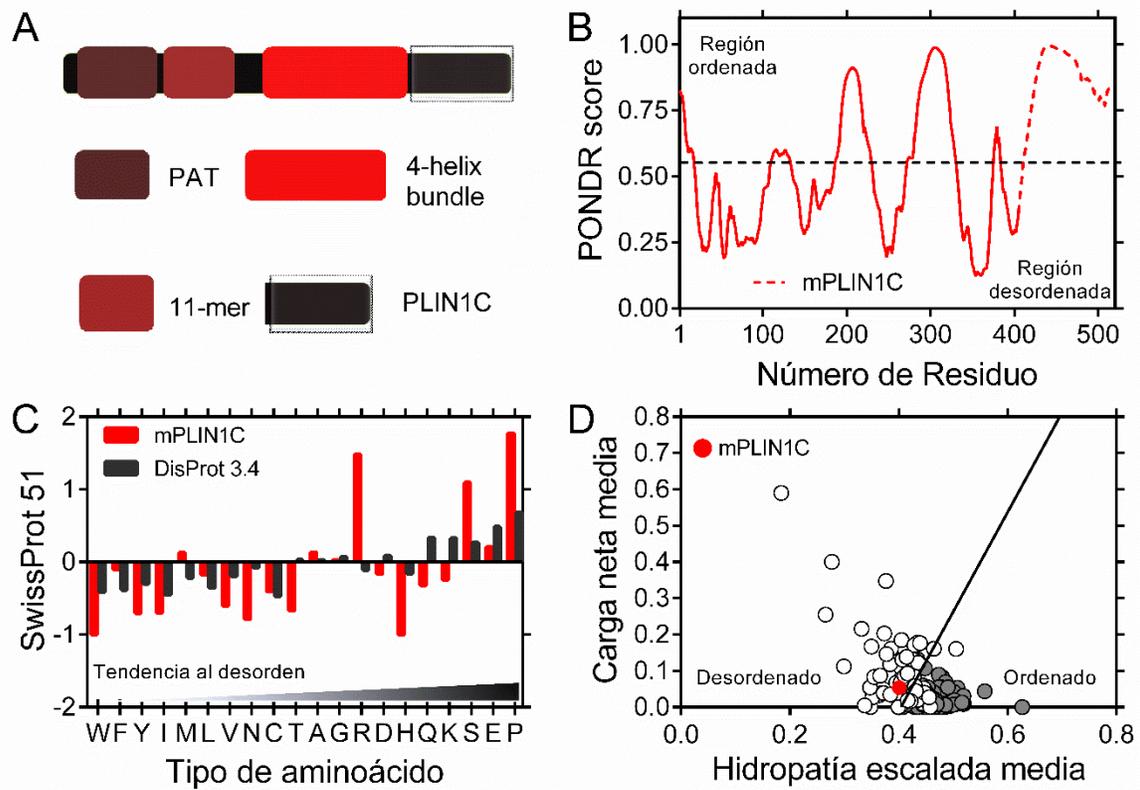


Fig 1. Análisis *in silico* de mPLIN1C.

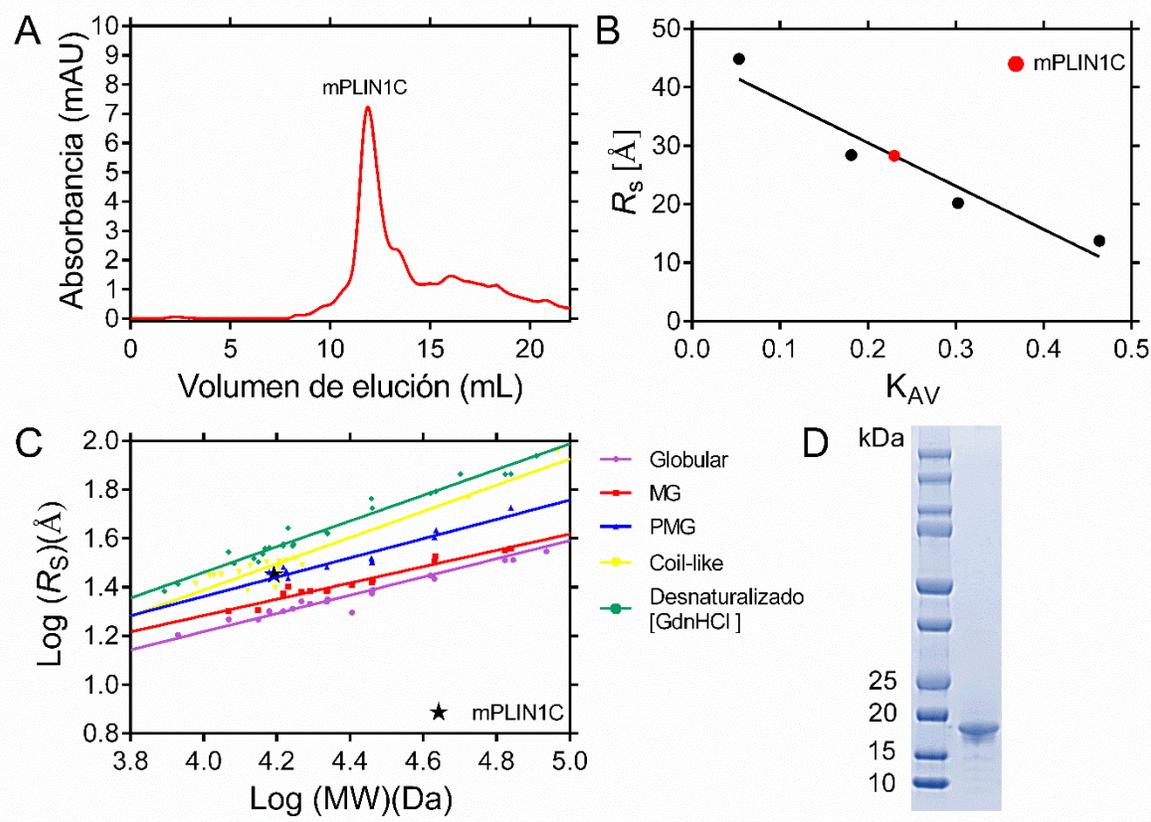


Fig 2. mPLIN1C recombinante tiene propiedades hidrodinámicas típicas de las proteínas intrínsecamente desordenadas.

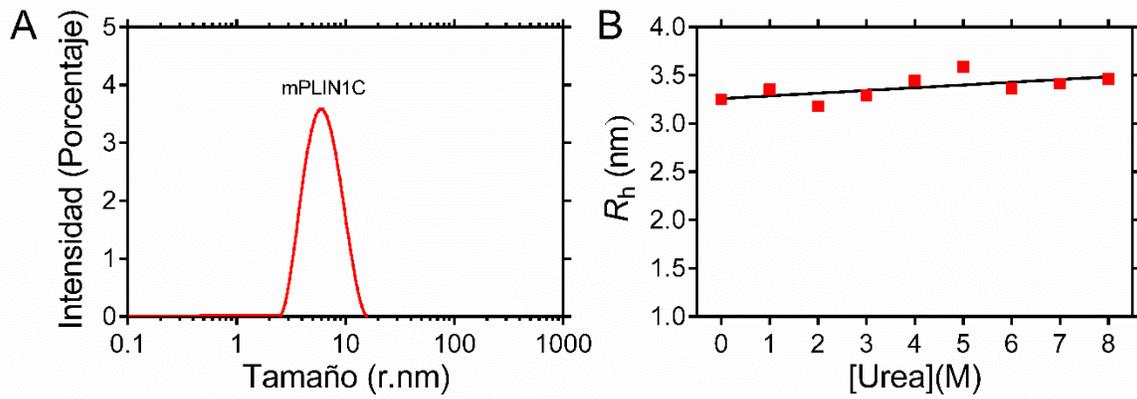


Fig 3. Radio hidrodinámico de mPLIN1C en estado nativo y desplegado.

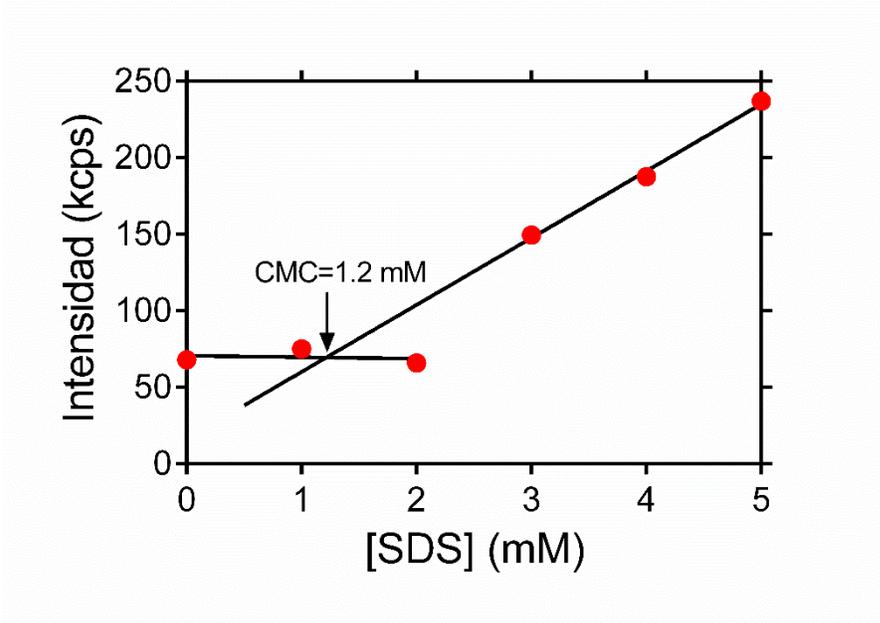


Fig 4. Determinación de la concentración micelar crítica por DLS.

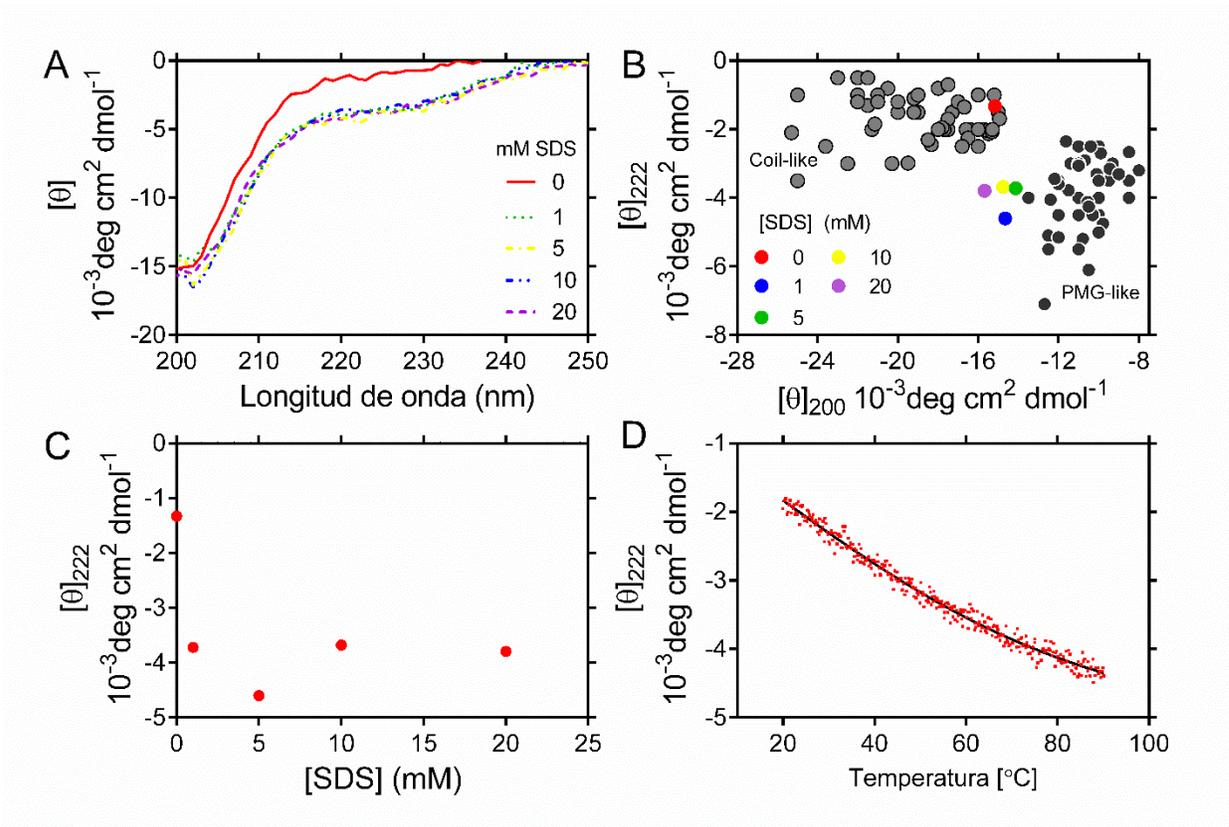


Fig 5. Análisis de mPLIN1C por dicroísmo circular.

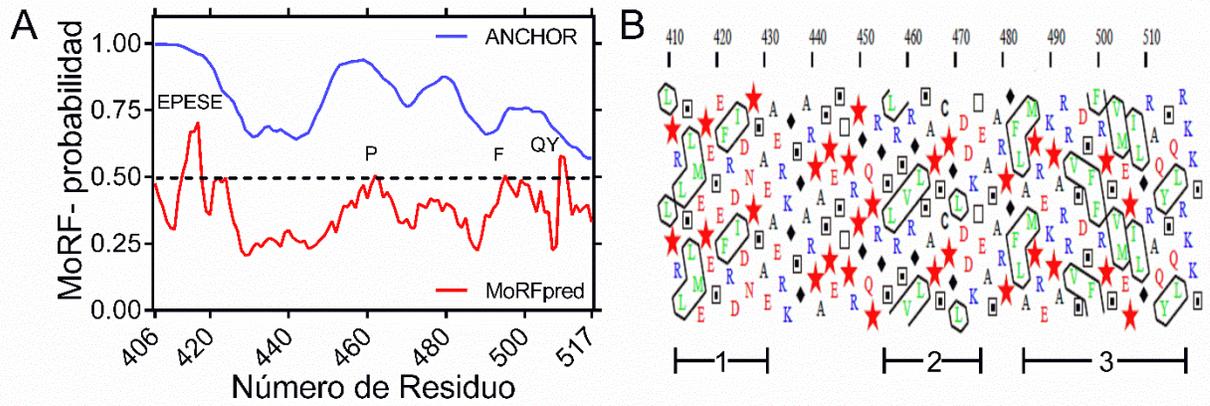


Fig 6. Características de reconocimiento molecular predichas en mPLIN1C.

Conclusiones y aportaciones del trabajo

Nuestros resultados muestran que hemos encontrado desorden estructural en dos miembros de la familia de proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos. Una es Perilipin 1, la cual es la encargada de la formación de las gotas de lípidos en el adipocito, en comparación con otras perilipinas, ésta tiene un exclusivo dominio C-terminal que regula la lipólisis, ya que es mediante este dominio que secuestra y estabiliza a CGI-58, y como consecuencia esta proteína no activa a ATGL. Nuestros resultados sugieren que este dominio se encuentra altamente desestructurado, con una conformación extendida y con estructura secundaria residual en solución, pero que en presencia de micelas tiene ganancia de estructura secundaria en forma de α -hélices. Este fue un resultado interesante ya que se sabe que una característica peculiar de las IDPs es que éstas se estructuran en presencia de micelas de detergentes, y su ganancia de estructura suele ser significativa, ya que el análisis de sus espectros de dicroísmo circular indica que estructuran en gran medida hasta tener conformaciones similares a las de las proteínas estructuradas. En nuestro caso no fue así, mPLIN1C mantuvo su conformación extendida, lo que sugiere que esta debe ser su conformación ideal para que CGI-58 pueda interactuar fácilmente con ella, y que los sitios de fosforilación también estén fácilmente accesibles cuando se lleve a cabo la señalización de la lipólisis. Por lo tanto, estaríamos observando un ejemplo en el cual el desorden estructural está más enfocado en el reconocimiento y fácil acceso a una proteína y no tanto en la multifuncionalidad de ésta mediante la interacción

con distintos partners. Sabemos que las regiones desestructuradas están involucradas en muchos eventos de unión con distintas proteínas, hasta el momento se conoce que CGI-58 es la única proteína que interacciona con el dominio C-terminal de Perilipin 1, es en este sentido que hace falta más trabajo que nos indique que otras proteínas pudiera estar regulando Perilipin 1 si ese fuese el caso. Por otro lado, encontramos que G0S2 también es de naturaleza desordenada, nosotros sugerimos que este desorden se encuentra también en su dominio C-terminal, aunque cabe destacar que entre los dominios de humano y ratón, es este último el que sugerimos que tiene un elemento estructural que le pudiera conferir distintas propiedades. El desorden estructural muy probablemente le dé la facilidad de interactuar y regular la actividad de distintas proteínas involucradas en el metabolismo celular, siendo ATGL la que G0S2 inactiva para suprimir la lipólisis, interacciona con Bcl-2 y promueve la apoptosis, secuestra a Nucleolina en el citosol de las células hematopoyéticas troncales promoviendo su quiescencia, y se une a la ATP sintasa en cardiomiocitos para hacer más eficiente la fosforilación oxidativa en condiciones de hipoxia. Se ha sugerido que G0S2 tiene un rol en la supresión de tumores [102], reportes recientes involucran a G0S2 en la enfermedad miastenia gravis [103] e interesantemente se ha descrito una conexión entre la metilación de *G0S2* y el desorden de estrés postraumático [104], por lo tanto sugerimos que la participación de G0S2 en estos procesos es mediante la interacción con otras proteínas funcionando como un efector, lo cual ampliaría en gran medida la cantidad de partners con los cuales tiene asociación, lo cual hace necesario más caracterización estructural que nos permita asignar funciones.

Referencias:

- [1] D.L. Brasaemle, Lipolysis Control: The Plot Thickens, *Cell Metab.* (2010). doi:10.1016/j.cmet.2010.02.008.
- [2] C. Sztalryd, D.L. Brasaemle, The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* (2017). doi:10.1016/j.bbalip.2017.07.009.
- [3] H. Itabe, T. Yamaguchi, S. Nimura, N. Sasabe, Perilipins: a diversity of intracellular lipid droplet proteins, *Lipids Health Dis.* (2017). doi:10.1186/s12944-017-0473-y.
- [4] E.J. Blanchette-Mackie, N.K. Dwyer, T. Barber, R.A. Coxey, T. Takeda, C.M. Rondinone, J.L. Theodorakis, A.S. Greenberg, C. Londos, Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes, *J. Lipid Res.* (1995).
- [5] W. Motomura, M. Inoue, T. Ohtake, N. Takahashi, M. Nagamine, S. Tanno, Y. Kohgo, T. Okumura, Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006). doi:10.1016/j.bbrc.2005.12.121.
- [6] H.P. Jiang, G. Serrero, Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1992). doi:10.1073/pnas.89.17.7856.
- [7] D.L. Brasaemle, T. Barber, N.E. Wolins, G. Serrero, E.J. Blanchette-Mackie, C. Londos, Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein, *J. Lipid Res.* (1997).
- [8] X. Lu, J. Gruia-Gray, N.G. Copeland, D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, C. Londos,

- A.R. Kimmel, The murine perilipin gene: The lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin, *Mamm. Genome*. (2001). doi:10.1007/s00335-01-2055-5.
- [9] E. Díaz, S.R. Pfeffer, Tip47: A cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking, *Cell*. (1998). doi:10.1016/S0092-8674(00)81171-X.
- [10] N.E. Wolins, J.R. Skinner, M.J. Schoenfish, A. Tzekov, K.G. Bensch, P.E. Bickel, Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets, *J. Biol. Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.M304025200.
- [11] S. Nimura, T. Yamaguchi, K. Ueda, K. Kadokura, T. Aiuchi, R. Kato, T. Obama, H. Itabe, Olanzapine promotes the accumulation of lipid droplets and the expression of multiple perilipins in human adipocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015). doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.045.
- [12] T. Yamaguchi, S. Matsushita, K. Motojima, F. Hirose, T. Osumi, MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α , *J. Biol. Chem.* (2006). doi:10.1074/jbc.M601682200.
- [13] A.R. Kimmel, D.L. Brasaemle, M. McAndrews-Hill, C. Sztalryd, C. Londos, Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins, *J. Lipid Res.* (2010). doi:10.1194/jlr.R000034.
- [14] V. Bezaire, A. Mairal, C. Ribet, C. Lefort, A. Grousse, J. Jocken, J. Laurencikienė, R. Anesia, A.M. Rodriguez, M. Ryden, B.M. Stenson, C. Dani,

- G. Ailhaud, P. Arner, D. Langin, Contribution of adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase to lipolysis in hMADS adipocytes, *J. Biol. Chem.* (2009). doi:10.1074/jbc.M109.008631.
- [15] M. Schweiger, R. Schreiber, G. Haemmerle, A. Lass, C. Fledelius, P. Jacobsen, H. Tornqvist, R. Zechner, R. Zimmermann, Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 40236–40241. doi:10.1074/jbc.M608048200.
- [16] P.M. McDonough, D. Maciejewski-Lenoir, S.M. Hartig, R.A. Hanna, R. Whittaker, A. Heisel, J.B. Nicoll, B.M. Buehrer, K. Christensen, M.G. Mancini, M.A. Mancini, D.P. Edwards, J.H. Price, Differential Phosphorylation of Perilipin 1A at the Initiation of Lipolysis Revealed by Novel Monoclonal Antibodies and High Content Analysis, *PLoS One.* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0055511.
- [17] D.L. Brasaemle, Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis, *J. Lipid Res.* (2007).
- [18] A. Lass, R. Zimmermann, G. Haemmerle, M. Riederer, G. Schoiswohl, M. Schweiger, P. Kienesberger, J.G. Strauss, G. Gorkiewicz, R. Zechner, Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome, *Cell Metab.* (2006). doi:10.1016/j.cmet.2006.03.005.
- [19] X. Yang, X. Lu, M. Lombès, G.B. Rha, Y.I. Chi, T.M. Guerin, E.J. Smart, J. Liu, The G0/G1 Switch Gene 2 Regulates Adipose Lipolysis through

- Association with Adipose Triglyceride Lipase, *Cell Metab.* 11 (2010) 194–205. doi:10.1016/j.cmet.2010.02.003.
- [20] J.G. Granneman, H.P.H. Moore, R.L. Granneman, A.S. Greenberg, M.S. Obin, Z. Zhu, Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes, *J. Biol. Chem.* (2007). doi:10.1074/jbc.M610580200.
- [21] J.G. Granneman, H.P.H. Moore, R. Krishnamoorthy, M. Rathod, Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl), *J. Biol. Chem.* (2009). doi:10.1074/jbc.M109.068478.
- [22] J. Pagnon, M. Matzaris, R. Stark, R.C.R. Meex, S.L. Macaulay, W. Brown, P.E. O'Brien, T. Tiganis, M.J. Watt, Identification and functional characterization of protein kinase A phosphorylation sites in the major lipolytic protein, adipose triglyceride lipase, *Endocrinology*. (2012). doi:10.1210/en.2012-1127.
- [23] X. Zhang, B.L. Heckmann, L.E. Campbell, J. Liu, G0S2: A small giant controller of lipolysis and adipose-liver fatty acid flux, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* (2017). doi:10.1016/j.bbalip.2017.06.007.
- [24] T.S. Nielsen, N. Møller, Adipose triglyceride lipase and G0/G1 Switch gene 2: Approaching proof of concept, *Diabetes*. (2014). doi:10.2337/db13-1838.
- [25] D.L. Andrews, B. Beames, M.D. Summers, W.D. Park, Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector., *Biochem. J.* (1988). doi:10.1042/bj2520199.
- [26] N. Kulminskaya, M. Oberer, Protein-protein interactions regulate the activity

- of Adipose Triglyceride Lipase in intracellular lipolysis, *Biochimie*. (2020).
doi:10.1016/j.biochi.2019.08.004.
- [27] G. Haemmerle, A. Lass, R. Zimmermann, G. Gorkiewicz, C. Meyer, J. Rozman, G. Heldmaier, R. Maier, C. Theussl, S. Eder, D. Kratky, E.F. Wagner, M. Klingenspor, G. Hoefler, R. Zechner, Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase, *Science* (80-.). (2006). doi:10.1126/science.1123965.
- [28] J. Fischer, C. Lefèvre, E. Morava, J.M. Mussini, P. Lafoît, A. Negre-Salvayre, M. Lathrop, R. Salvayre, The gene encoding adipose triglyceride lipase (PNPLA2) is mutated in neutral lipid storage disease with myopathy, *Nat. Genet.* (2007). doi:10.1038/ng1951.
- [29] I. Cornaciu, A. Boeszoermyeni, H. Lindermuth, H.M. Nagy, I.K. Cerk, C. Ebner, B. Salzburger, A. Gruber, M. Schweiger, R. Zechner, A. Lass, R. Zimmermann, M. Oberer, The minimal domain of adipose triglyceride lipase (ATGL) ranges until leucine 254 and can be activated and inhibited by CGI-58 and G0S2, respectively, *PLoS One*. 6 (2011).
doi:10.1371/journal.pone.0026349.
- [30] C.C. Lord, G. Thomas, J.M. Brown, Mammalian alpha beta hydrolase domain (ABHD) proteins: Lipid metabolizing enzymes at the interface of cell signaling and energy metabolism, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*. (2013). doi:10.1016/j.bbalip.2013.01.002.
- [31] A.H. Eskiocak, S. Missaglia, L. Moro, M. Durdu, D. Tavian, A novel mutation of ABHD5 gene in a Chanarin Dorfman patient with unusual dermatological findings, *Lipids Health Dis.* (2019). doi:10.1186/s12944-019-1181-6.

- [32] R. Zechner, P.C. Kienesberger, G. Haemmerle, R. Zimmermann, A. Lass, Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores, *J. Lipid Res.* (2009). doi:10.1194/jlr.R800031-JLR200.
- [33] P. Hofer, A. Boeszoermenyi, D. Jaeger, U. Feiler, H. Arthanari, N. Mayer, F. Zehender, G. Rechberger, M. Oberer, R. Zimmermann, A. Lass, G. Haemmerle, R. Breinbauer, R. Zechner, K. Preiss-Landl, Fatty acid-binding proteins interact with comparative gene identification-58 linking lipolysis with lipid ligand shuttling, *J. Biol. Chem.* (2015). doi:10.1074/jbc.M114.628958.
- [34] N.H. Haunerland, F. Spener, Fatty acid-binding proteins - Insights from genetic manipulations, *Prog. Lipid Res.* (2004). doi:10.1016/j.plipres.2004.05.001.
- [35] J. Storch, B. Corsico, The emerging functions and mechanisms of mammalian fatty acid-binding proteins, *Annu. Rev. Nutr.* (2008). doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093710.
- [36] L. Russell, D.R. Forsdyke, A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene containing a CpG-rich island encodes a small basic protein with the potential to be phosphorylated., *DNA Cell Biol.* 10 (1991) 581–591. doi:10.1089/dna.1991.10.581.
- [37] A. Lass, R. Zimmermann, M. Oberer, R. Zechner, Lipolysis - A highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores, *Prog. Lipid Res.* 50 (2011) 14–27. doi:10.1016/j.plipres.2010.10.004.
- [38] C. Welch, M.K. Santra, W. El-Assaad, X. Zhu, W.E. Huber, R.A. Keys, J.G. Teodoro, M.R. Green, Identification of a protein, G0S2, that lacks Bcl-2 homology domains and interacts with and antagonizes Bcl-2, *Cancer Res.* 69

- (2009) 6782–6789. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0128.
- [39] B.L. Heckmann, X. Zhang, X. Xie, J. Liu, The G0/G1 switch gene 2 (G0S2): Regulating metabolism and beyond, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1831 (2013) 276–281. doi:10.1016/j.bbaliip.2012.09.016.
- [40] I.K. Cerk, L. Wechselberger, M. Oberer, Adipose Triglyceride Lipase Regulation: An Overview, *Curr. Protein Pept. Sci.* 19 (2017). doi:10.2174/1389203718666170918160110.
- [41] X. Zhang, X. Xie, B.L. Heckmann, A.M. Saarinen, H. Gu, R. Zechner, J. Liu, Identification of an intrinsic lysophosphatidic acid acyltransferase activity in the lipolytic inhibitor G0/G1 switch gene 2 (G0S2), *FASEB J.* 33 (2019) 6655–6666. doi:10.1096/fj.201802502R.
- [42] T. Yamada, C.S. Park, A. Burns, D. Nakada, H.D. Lacorazza, The cytosolic protein G0S2 maintains quiescence in hematopoietic stem cells, *PLoS One.* 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0038280.
- [43] H. Kioka, H. Kato, M. Fujikawa, O. Tsukamoto, T. Suzuki, H. Imamura, A. Nakano, S. Higo, S. Yamazaki, T. Matsuzaki, K. Takafuji, H. Asanuma, M. Asakura, T. Minamino, Y. Shintani, M. Yoshida, H. Noji, M. Kitakaze, I. Komuro, Y. Asano, S. Takashima, Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 273–278. doi:10.1073/pnas.1318547111.
- [44] T. Yamada, C.S. Park, Y. Shen, K.R. Rabin, H.D. Lacorazza, G0S2 inhibits the proliferation of K562 cells by interacting with nucleolin in the cytosol, *Leuk. Res.* 38 (2014) 210–217. doi:10.1016/j.leukres.2013.10.006.

- [45] M. Kusakabe, K. Watanabe, N. Emoto, N. Aki, H. Kage, T. Nagase, J. Nakajima, Y. Yatomi, N. Ohishi, D. Takai, Impact of DNA demethylation of the G0S2 gene on the transcription of G0S2 in squamous lung cancer cell lines with or without nuclear receptor agonists, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (2009) 1283–1287. doi:10.1016/j.bbrc.2009.10.137.
- [46] L.P. Kozlowski, J.M. Bujnicki, MetaDisorder: a meta-server for the prediction of intrinsic disorder in proteins, *BMC Bioinformatics.* 13 (2012) 111. doi:10.1186/1471-2105-13-111.
- [47] V. Vacic, V.N. Uversky, A.K. Dunker, S. Lonardi, Composition Profiler: A tool for discovery and visualization of amino acid composition differences, *BMC Bioinformatics.* 8 (2007) 211. doi:10.1186/1471-2105-8-211.
- [48] V.N. Uversky, What does it mean to be natively unfolded?, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 2–12. doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02649.x.
- [49] R.K. Scopes, Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm, *Anal. Biochem.* 59 (1974) 277–282. doi:10.1016/0003-2697(74)90034-7.
- [50] N.J. Anthis, G.M. Clore, Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm, *Protein Sci.* 22 (2013) 851–858. doi:10.1002/pro.2253.
- [51] S.E. Permyakov, I.S. Millett, S. Doniach, E.A. Permyakov, V.N. Uversky, Natively Unfolded C-Terminal Domain of Caldesmon Remains Substantially Unstructured after the Effective Binding to Calmodulin, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 53 (2003) 855-n/a. doi:10.1002/prot.10481.
- [52] P. Andrews, Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration., *Methods Biochem. Anal.* 18 (1970) 1–53.

doi:10.1002/9780470110362.ch1.

- [53] Z. Peng, J. Yan, X. Fan, M.J. Mizianty, B. Xue, K. Wang, G. Hu, V.N. Uversky, L. Kurgan, Exceptionally abundant exceptions: Comprehensive characterization of intrinsic disorder in all domains of life, *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (2014) 137–151. doi:10.1007/s00018-014-1661-9.
- [54] A. Bairoch, R. Apweiler, C.H. Wu, W.C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M.J. Martin, D.A. Natale, C. O'Donovan, N. Redaschi, L.S.L. Yeh, The Universal Protein Resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) D154–D159. doi:10.1093/nar/gki070.
- [55] M. Sickmeier, J.A. Hamilton, T. LeGall, V. Vacic, M.S. Cortese, A. Tantos, B. Szabo, P. Tompa, J. Chen, V.N. Uversky, Z. Obradovic, A.K. Dunker, DisProt: The database of disordered proteins, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) D786–D793. doi:10.1093/nar/gkl893.
- [56] A.K. Dunker, J.D. Lawson, C.J. Brown, R.M. Williams, P. Romero, J.S. Oh, C.J. Oldfield, A.M. Campen, C.M. Ratliff, K.W. Hipps, J. Ausio, M.S. Nissen, R. Reeves, C.H. Kang, C.R. Kissinger, R.W. Bailey, M.D. Griswold, W. Chiu, E.C. Garner, Z. Obradovic, Intrinsically disordered protein, *J. Mol. Graph. Model.* (2001). doi:10.1016/S1093-3263(00)00138-8.
- [57] V.N. Uversky, The alphabet of intrinsic disorder, *Intrinsically Disord. Proteins.* 1 (2013) e24684. doi:10.4161/idp.24684.
- [58] V.N. Uversky, Size-exclusion chromatography in structural analysis of intrinsically disordered proteins, *Methods Mol. Biol.* 896 (2012) 179–194. doi:10.1007/978-1-4614-3704-8_11.
- [59] K. Gast, C. Fiedler, Dynamic and static light scattering of intrinsically

disordered proteins, *Methods Mol. Biol.* 896 (2012) 137–161.

doi:10.1007/978-1-4614-3704-8_9.

- [60] S. Kuravi, T.H. Lan, A. Barik, N.A. Lambert, Third-Party bioluminescence resonance energy transfer indicates constitutive association of membrane proteins: Application to class A G-protein-coupled receptors and G-proteins, *Biophys. J.* 98 (2010) 2383–2390. doi:10.1016/j.bpj.2010.02.006.
- [61] W. Zheng, A. Borgia, K. Buholzer, A. Grishaev, B. Schuler, R.B. Best, Probing the Action of Chemical Denaturant on an Intrinsically Disordered Protein by Simulation and Experiment, *J. Am. Chem. Soc.* 138 (2016) 11702–11713. doi:10.1021/jacs.6b05443.
- [62] P. Radivojac, L.M. Iakoucheva, C.J. Oldfield, Z. Obradovic, V.N. Uversky, A.K. Dunker, Intrinsic disorder and functional proteomics, *Biophys. J.* 92 (2007) 1439–1456. doi:10.1529/biophysj.106.094045.
- [63] Á. Canales, M. Rösinger, J. Sastre, I.C. Felli, J. Jiménez-Barbero, G. Giménez-Gallego, C. Fernández-Tornero, Hidden α -helical propensity segments within disordered regions of the transcriptional activator CHOP, *PLoS One.* 12 (2017) e0189171. doi:10.1371/journal.pone.0189171.
- [64] F.M. Disfani, W.L. Hsu, M.J. Mizianty, C.J. Oldfield, B. Xue, A. Keith Dunker, V.N. Uversky, L. Kurgan, MoRFPred, a computational tool for sequence-based prediction and characterization of short disorder-to-order transitioning binding regions in proteins, *Bioinformatics.* 28 (2012) i75–i83. doi:10.1093/bioinformatics/bts209.
- [65] A. Drozdetskiy, C. Cole, J. Procter, G.J. Barton, JPred4: A protein secondary structure prediction server, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) W389–W394.

doi:10.1093/nar/gkv332.

- [66] N.J. Greenfield, Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nat. Protoc.* 1 (2007) 2876–2890.
doi:10.1038/nprot.2006.202.
- [67] V.N. Uversky, Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics, *Protein Sci.* 11 (2002) 739–756. doi:10.1110/ps.4210102.
- [68] G.D. Rose, *Unfolded proteins*, Academic Press, 2002.
- [69] H. Jane Dyson, P. Ewright, Insights into the structure and dynamics of unfolded proteins from nuclear magnetic resonance, *Adv. Protein Chem.* 62 (2002) 311–340. doi:10.1016/S0065-3233(02)62012-1.
- [70] K. Kasahara, M. Shiina, J. Higo, K. Ogata, H. Nakamura, Phosphorylation of an intrinsically disordered region of Ets1 shifts a multi-modal interaction ensemble to an auto-inhibitory state, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 2243–2251. doi:10.1093/nar/gkx1297.
- [71] J. Dittmer, The biology of the Ets1 proto-oncogene, *Mol. Cancer.* 2 (2003) 1–21. doi:10.1186/1476-4598-2-29.
- [72] L.A. Garrett-Sinha, Review of Ets1 structure, function, and roles in immunity, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 3375–3390. doi:10.1007/s00018-012-1243-7.
- [73] J. Chen, C. McDowell, J. Chen, Potential conformational heterogeneity of p53 bound to S100B($\beta\beta$), *J. Mol. Biol.* 425 (2013) 999–1010.
doi:10.1016/j.jmb.2013.01.001.
- [74] M.W. Rajala, P.E. Scherer, Minireview: The adipocyte - At the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis, *Endocrinology.* (2003). doi:10.1210/en.2003-0580.

- [75] K. Frayn, Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux, *Diabetologia*. (2002). doi:10.1007/s00125-002-0873-y.
- [76] Y. Guo, T.C. Walther, M. Rao, N. Stuurman, G. Goshima, K. Terayama, J.S. Wong, R.D. Vale, P. Walter, R. V. Farese, Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization, *Nature*. (2008). doi:10.1038/nature06928.
- [77] D.L. Brasaemle, V. Subramanian, A. Garcia, A. Marcinkiewicz, A. Rothenberg, Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism, in: *Mol. Cell. Biochem.*, 2009. doi:10.1007/s11010-008-9998-8.
- [78] S. Miura, J.W. Gan, J. Brzostowski, M.J. Parisi, C.J. Schultz, C. Londos, B. Oliver, A.R. Kimmel, Functional conservation for lipid storage droplet association among perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*, *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M204410200.
- [79] A. Garcia, A. Sekowski, V. Subramanian, D.L. Brasaemle, The central domain is required to target and anchor perilipin A to lipid droplets, *J. Biol. Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.M206602200.
- [80] P. Targett-Adams, D. Chambers, S. Gledhill, R.G. Hope, J.F. Coy, A. Girod, J. McLauchlan, Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein, *J. Biol. Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.M211289200.
- [81] R. Bussell, D. Eliezer, A structural and functional role for 11-mer repeats in α -synuclein and other exchangeable lipid binding proteins, *J. Mol. Biol.* (2003). doi:10.1016/S0022-2836(03)00520-5.

- [82] S. Patel, W. Yang, K. Kozusko, V. Saudek, D.B. Savage, Perilipins 2 and 3 lack a carboxy-terminal domain present in perilipin 1 involved in sequestering ABHD5 and suppressing basal lipolysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2014). doi:10.1073/pnas.13187911111.
- [83] S. Gandotra, C. Le Dour, W. Bottomley, P. Cervera, P. Giral, Y. Reznik, G. Charpentier, M. Auclair, M. Delépine, I. Barroso, R.K. Semple, M. Lathrop, O. Lascols, J. Capeau, S. O’Rahilly, J. Magré, D.B. Savage, C. Vigouroux, Perilipin Deficiency and Autosomal Dominant Partial Lipodystrophy, *N. Engl. J. Med.* (2011). doi:10.1056/nejmoa1007487.
- [84] K. Peng, S. Vucetic, P. Radivojac, C.J. Brown, A.K. Dunker, Z. Obradovic, Optimizing long intrinsic disorder predictors with protein evolutionary information, *J. Bioinform. Comput. Biol.* (2005). doi:10.1142/S0219720005000886.
- [85] I. Callebaut, G. Labesse, P. Durand, A. Poupon, L. Canard, J. Chomilier, B. Henrissat, J.P. Mornon, Deciphering protein sequence information through hydrophobic cluster analysis (HCA): Current status and perspectives, *Cell. Mol. Life Sci.* (1997). doi:10.1007/s000180050082.
- [86] D. Piovesan, I. Walsh, G. Minervini, S.C.E. Tosatto, FIELDS: Fast estimator of latent local structure, *Bioinformatics.* (2017). doi:10.1093/bioinformatics/btx085.
- [87] B. Mészáros, G. Erdős, Z. Dosztányi, IUPred2A: Context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding, *Nucleic Acids Res.* (2018). doi:10.1093/nar/gky384.
- [88] E.M. Redwan, S.A. Alkarim, A.A. El-Hanafy, Y.M. Saad, H.A. Almehdar, V.N.

- Uversky, Disorder in milk proteins: adipophilin and TIP47, important constituents of the milk fat globule membrane, *J. Biomol. Struct. Dyn.* (2020). doi:10.1080/07391102.2019.1592027.
- [89] O. Tcherkasskaya, V.N. Uversky, Denatured collapsed states in protein folding: Example of apomyoglobin, *Proteins Struct. Funct. Genet.* (2001). doi:10.1002/prot.1089.
- [90] S.B. Mizel, A.H. Graff, N. Sriranganathan, S. Ervin, C.J. Lees, M.O. Lively, R.R. Hantgan, M.J. Thomas, J. Wood, B. Bell, Flagellin-F1-V fusion protein is an effective plague vaccine in mice and two species of nonhuman primates, *Clin. Vaccine Immunol.* (2009). doi:10.1128/CVI.00333-08.
- [91] P.S. Santiago, F. Moura, L.M. Moreira, M.M. Domingues, N.C. Santos, M. Tabak, Dynamic light scattering and optical absorption spectroscopy study of pH and temperature stabilities of the extracellular hemoglobin of *glossoscolex paulistus*, *Biophys. J.* (2008). doi:10.1529/biophysj.107.116780.
- [92] P. Tompa, Intrinsically unstructured proteins, *Trends Biochem. Sci.* (2002). doi:10.1016/S0968-0004(02)02169-2.
- [93] A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki, J. Kun, É. Moussong, Y.H. Lee, Y. Goto, M. Réfrégiers, J. Kardos, BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra, *Nucleic Acids Res.* (2018). doi:10.1093/nar/gky497.
- [94] P. Mier, L. Paladin, S. Tamana, S. Petrosian, B. Hajdu-Soltész, A. Urbanek, A. Gruca, D. Plewczynski, M. Grynberg, P. Bernadó, Z. Gáspári, C.A. Ouzounis, V.J. Promponas, A. V. Kajava, J.M. Hancock, S.C.E. Tosatto, Z. Dosztanyi, M.A. Andrade-Navarro, Disentangling the complexity of low

- complexity proteins, *Brief. Bioinform.* (2020). doi:10.1093/bib/bbz007.
- [95] D. V. Tulumello, C.M. Deber, SDS micelles as a membrane-mimetic environment for transmembrane segments, *Biochemistry.* (2009). doi:10.1021/bi9013819.
- [96] Ö. Topel, B.A. Çakir, L. Budama, N. Hoda, Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block- poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering, *J. Mol. Liq.* (2013). doi:10.1016/j.molliq.2012.10.013.
- [97] E.R. Rowe, M.L. Mimmack, A.D. Barbosa, A. Haider, I. Isaac, M.M. Ouberai, A.R. Thiam, S. Patel, V. Saudek, S. Siniosoglou, D.B. Savage, Conserved amphipathic helices mediate lipid droplet targeting of perilipins 1-3, *J. Biol. Chem.* (2016). doi:10.1074/jbc.M115.691048.
- [98] J. Habchi, P. Tompa, S. Longhi, V.N. Uversky, Introducing protein intrinsic disorder, *Chem. Rev.* 114 (2014) 6561–6588. doi:10.1021/cr400514h.
- [99] X. Sun, W.T. Jones, D. Harvey, P.J.B. Edwards, S.M. Pascal, C. Kirk, T. Considine, D.J. Sheerin, J. Rakonjac, C.J. Oldfield, B. Xue, A.K. Dunker, V.N. Uversky, N-terminal domains of DELLA proteins are intrinsically unstructured in the absence of interaction with GID1/gibberellic acid receptors, *J. Biol. Chem.* (2010). doi:10.1074/jbc.M109.027011.
- [100] V. Subramanian, A. Rotlienber, C. Gomez, A.W. Cohen, A. Garcia, S. Bhattacharyya, L. Shapiro, G. Dolios, R. Wang, M.P. Lisanti, D.L. Brasaemle, Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.* (2004). doi:10.1074/jbc.M407462200.
- [101] P. Lieutaud, F. Ferron, A. V. Uversky, L. Kurgan, V.N. Uversky, S. Longhi,

How disordered is my protein and what is its disorder for? A guide through the “dark side” of the protein universe, *Intrinsically Disord. Proteins*. (2016). doi:10.1080/21690707.2016.1259708.

- [102] C.Y. Yim, D.J. Sekula, M.P. Hever-Jardine, X. Liu, J.M. Warzecha, J. Tam, S.J. Freemantle, E. Dmitrovsky, M.J. Spinella, GOS2 suppresses oncogenic transformation by repressing a MYC-regulated transcriptional program, *Cancer Res*. (2016). doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2265.
- [103] L. Xu, Z. Li, Y. Li, Z. Luo, Y. Luo, B. Xiao, H. Yang, The Expression Pattern and Regulatory Mechanism of the G0/G1 Switch Gene 2 (G0S2) in the Pathogenesis and Treatment of AChR Myasthenia Gravis (MG), *Mediators Inflamm*. (2020). doi:10.1155/2020/4286047.
- [104] M.W. Logue, M.W. Miller, E.J. Wolf, B.R. Huber, F.G. Morrison, Z. Zhou, Y. Zheng, A.K. Smith, N.P. Daskalakis, A. Ratanatharathorn, M. Uddin, C.M. Nievergelt, A.E. Ashley-Koch, D.G. Baker, J.C. Beckham, M.E. Garrett, M.P. Boks, E. Geuze, G.A. Grant, M.A. Hauser, R.C. Kessler, N.A. Kimbrel, A.X. Maihofer, C.E. Marx, X.J. Qin, V.B. Risbrough, B.P.F. Rutten, M.B. Stein, R.J. Ursano, E. Vermetten, C.H. Vinkers, E.B. Ware, A. Stone, S.A. Schichman, R.E. McGlinchey, W.P. Milberg, J.P. Hayes, M. Verfaellie, M.J. Friedman, V.E. Alvarez, D. Benedek, C. Brady, D. Cruz, D.A. Davis, R.S. Duman, M.J. Girgenti, M. Hardegree, P.E. Holtzheimer, T.M. Keane, N. Kowell, J.H. Krystal, A. McKee, B. Marx, D. Mash, W.K. Scott, T. Stein, D.E. Williamson, K.A. Young, An epigenome-wide association study of posttraumatic stress disorder in US veterans implicates several new DNA methylation loci, *Clin. Epigenetics*. (2020). doi:10.1186/s13148-020-0820-0.

Artículos publicados

Edgar D. Páez-Pérez, Miriam Livier Llamas-García, Claudia G. Benítez-Cardoza, Gabriela M. Montero-Morán, and Samuel Lara-González. 2020. “**Bioinformatic Analysis and Biophysical Characterization Reveal Structural Disorder in G0S2 Protein.**” ACS Omega. Vol. 5: 25841-25847 DOI: 10.1021/acsomega.0c03171.

Doi: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.0c03171>