



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Importancia biológica de las proteínas intrínsecamente
desestructuradas (IDPs)**

**Importancia biológica das proteínas intrínsecamente
desestructuradas (IDPs)**

**Biological importance of intrinsically destructured proteins
(IDPs)**

Marta Barturen Gómez

Curso: 2019 - 2020. Convocatoria: Xuño

Directora: María Ángeles Freire Picos



M^a ANGELES FREIRE PICOS, PROFESORA TITULAR DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA EN LA UNIVERSIDADE DA CORUÑA

INFORMA

QUE EL PRESENTE TRABAJO FIN DE GRADO PRESENTADO POR LA ALUMNA MARTA BARTUREN GÓMEZ Y TITULADO:

“Importancia biolóxica das proteínas intrinsecamente desestructuradas (IDPs)”

“Importancia biológica de las proteínas intrinsecamente desestructuradas (IDPs)”

“Biological importance of intrinsically destructured protein (IDPs)”

Ha sido realizado bajo mi dirección y autorizo su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que conste firmo la presente en A Coruña a 17 de Junio de 2020

M^a Angeles Freire Picos

FREIRE PICOS
MARIA
ANGELES -
32760558W

Firmado digitalmente por FREIRE
PICOS MARIA ANGELES -
32760558W
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES,
serialNumber=IDCES-32760558W,
givenName=MARIA ANGELES,
sn=FREIRE PICOS, cn=FREIRE PICOS
MARIA ANGELES - 32760558W
Fecha: 2020.06.17 11:17:54 +02'0

Índice.

Abreviaturas

Resumen/Summary

Palabras clave/ Keywords

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	1
3. Metodología.....	1
4. Resultados.....	2-15
4.1. Técnicas para el estudio de las IDPs.....	2-4
4.2. Características estructurales.....	4-6
4.3. Regiones relacionadas con la función.....	6-7
4.4. Tipos de IDPs.....	7
4.5. Estabilidad.....	7
4.6. Hipótesis de plegamiento.....	7-8
4.7. Funciones de las IDPs.....	8-13
4.7.1. Modificaciones postraduccionales.....	9-10
4.7.2. Interacción con ácidos nucleicos.....	10-11
4.7.3. Interacciones proteína-proteína.....	11-12
4.7.4. Regulación alostérica.....	12-13
4.8. Ejemplo de IDP: la proteína p53.....	13-14
4.9. Las IDPs en el desarrollo de nuevos medicamentos y evolución.....	14
4.10. Situación actual.....	15
5. Conclusiones/Conclusions.....	15-16
6. Bibliografía.....	16-24

Abreviaturas

CBP: Proteína de unión a CREB

TAD: Dominio de transactivación

CTD: Dominio carboxilo-terminal

D_{máx} : Distancia máxima dentro de una molécula

DBD: Dominio de unión a DNA

FRET: Transferencia de energía de resonancia de Förster

IDP: Proteína Intrínsecamente Desestructurada

IDR: Región Intrínsecamente Desestructurada

k_{off}: tasa de disociación

k_{on}: tasa de asociación

MD: Dinámica Molecular

MLOs: Orgánulos sin membrana

MoRF: Elementos de reconocimiento molecular

NLS: Dominio de señalización nuclear

NMR: Resonancia magnética nuclear

PP_{II}: Hélice de poliprolina II

PRD: Dominio rico en prolina

PRE: Incremento de relajación paramagnética

PTMs: Modificaciones postraduccionales

RDC: Acoplamiento dipolar residual

R_h: Radio hidrodinámico

SAXS: Dispersión de rayos X de pequeño ángulo

SLiM: Motivos lineales cortos

TAD: Dominio de transactivación

TET: Dominio de tetramerización

Resumen

Las IDPs son proteínas sin estructura estable que cumplen una gran variedad de funciones, muchas de ellas, imprescindibles para la célula. Debido a sus características estructurales, requieren de técnicas diferentes de las clásicas para su estudio y pueden interactuar de forma específica con numerosas proteínas, DNA y RNA. Su interacción específica con los diferentes ligandos es de baja afinidad, y por tanto, fácilmente reversible, de forma que son proteínas con gran relevancia en señalización y regulación. También son importantes desde el punto de vista evolutivo y en el desarrollo de medicamentos. En algunos casos, cambian su estado de plegamiento al interactuar a través de ciertas regiones, aumentando así el número de conformaciones en que se encuentran. A esto hay que sumarle las diferentes modificaciones postraduccionales que pueden sufrir, dando lugar a múltiples estructuras para una misma proteína y a diferentes funciones.

Summary

IDPs are proteins without stable structure, which perform multiple functions, many of them, essential for the cell. Due to their structural properties, they require structural techniques different from those used in classical structure determination. They can interact specifically with many different proteins DNA and RNA. Their specific interaction with different is with low affinity, therefore, easy to reverse, giving them relevant roles in signaling and regulation. They are also important from an evolutive perspective and in drug development. Some IDPs change their folding state upon interaction through some regions, increasing the number of conformations. In addition, they may suffer different types of postranslational modifications that lead to multiple structures for a unique protein and, therefore, different functions.

Palabras clave: Proteínas Intrínsecamente Desestructuradas, IDPs, estructura de proteínas, interacciones con ligandos, p53.

Keywords: Intrinsically Disordered Proteins, IDPs, protein structure, ligand interactions, p53.

1. Introducción

Hasta hace relativamente poco tiempo, se creía que las proteínas tenían siempre una estructura tridimensional definida y que esta estructura era la que determinaba su función. El descubrimiento de las proteínas intrínsecamente desestructuradas (IDPs) supuso un cambio en la forma de entender el funcionamiento de las proteínas (Uversky, 2011).

En diversos trabajos (Jirgensons, 1966); (Kriwacki, et al, 1996); (Romero, et al, 1998), se han ido encontrando datos sobre estas proteínas, sin embargo, no se planteó la idea de que una proteína sin estructura fija pudiera ser funcional hasta unos años atrás. Con las IDPs se demostró que esto no siempre es así. En la última década, ha ido aumentando la información sobre este tipo de proteínas, gracias al desarrollo de nuevas técnicas, ya que algunas de las más usadas en biología estructural clásica, como la cristalografía de rayos x, no son útiles con las proteínas que no tienen una estructura fija (Oroguchi, et al, 2011).

Las IDPs se caracterizan por no tener una estructura tridimensional estable bajo condiciones fisiológicas, pudiendo cambiar su estructura bajo condiciones concretas (Schlessinger, et al, 2007), y por tener un gran número de conformaciones posibles (Dosztányi, et al, 2010). También hay proteínas que no carecen por completo de estructura tridimensional, sino que tienen regiones intrínsecamente desestructuradas (IDRs). Con frecuencia, estas regiones se encuentran en los extremos de las proteínas y pueden tener una longitud muy variable. También pueden encontrarse en dominios internos, pero en estos casos, suelen ser regiones de menor tamaño y pueden aparecer también separando dominios (Oldfield, et al, 2019).

Aparecen con bastante frecuencia tanto en eucariotas como en procariotas y también en virus. En el caso de los eucariotas, las proteínas o regiones de proteínas sin estructura terciaria son especialmente abundantes. Además, tanto en eucariotas como en virus suelen encontrarse IDPs de mayor tamaño, en comparación con otros organismos. Se cree que esto puede deberse a que estos organismos tienen procesos de señalización y regulación de una mayor complejidad. También se ha observado que las IDPs se encuentran con mayor frecuencia en ciertas estructuras celulares, como pueden ser el nucleosoma o los ribosomas (Peng, et al, 2015). Dentro de las arqueas se ha encontrado una mayor proporción de IDPs en las que crecen en medios extremos y en las simbióticas, por lo que se cree que utilizan estas proteínas como una forma de adaptación (Xue, et al, 2010).

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es efectuar una revisión bibliográfica sobre diferentes aspectos de las proteínas intrínsecamente desestructuradas y su importancia biológica.

3. Metodología

La información que se recoge en este trabajo fue obtenida a partir de fuentes bibliográficas obtenidas de PubMed Central®, (NCBI) y de Google Scholar. Las imágenes de las figuras se rediseñaron con Paint 3D, RasMol (<http://www.openrasmol.org/>) y BioRender (<https://biorender.com/>).

4. Resultados

4.1. Técnicas para el estudio de las IDPs.

El estudio de las características estructurales de las IDPs no puede hacerse mediante las técnicas clásicas, sino que es necesario recurrir a otras técnicas o a la combinación de varias. Esto se debe en gran medida a que no pueden cristalizarse (Receveur-Bréchet & Durand, 2012), por tanto, la cristalografía de rayos X no es útil debido a que las regiones sin estructura no se pueden ver en los mapas de densidad electrónica. Solo puede emplearse, en algunos casos para conocer regiones que interaccionan, al cristalizar la proteína globular a la que se unen (Cordeiro, et al, 2017).

Respecto a la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) y la criomicroscopía electrónica sí son útiles para conocer posibles conformaciones y el grado de flexibilidad de algunas proteínas, pero no permiten resolver estructuras, solo conformaciones (Powers, et al, 2019).

-La criomicroscopía electrónica se basa en la obtención de imágenes en dos dimensiones, con un microscopio electrónico, de una molécula (proteína, RNA o DNA), de forma que si se conoce la orientación de las moléculas correspondientes a cada imagen, se puede obtener una imagen tridimensional (Nogales & Scheres, 2015). Además, la muestra se mantiene a bajas temperaturas con hielo vítreo (Bai, et al, 2015). El problema con las IDPs es que la flexibilidad de la estructura disminuye bastante la resolución (Nwanochie & Uversky, 2019), que a la vez, está limitada por la cantidad de electrones empleada porque estos causan daños en la muestra. Los daños se minimizan con la baja temperatura, pero no se pueden eliminar completamente (Henderson, 2015).

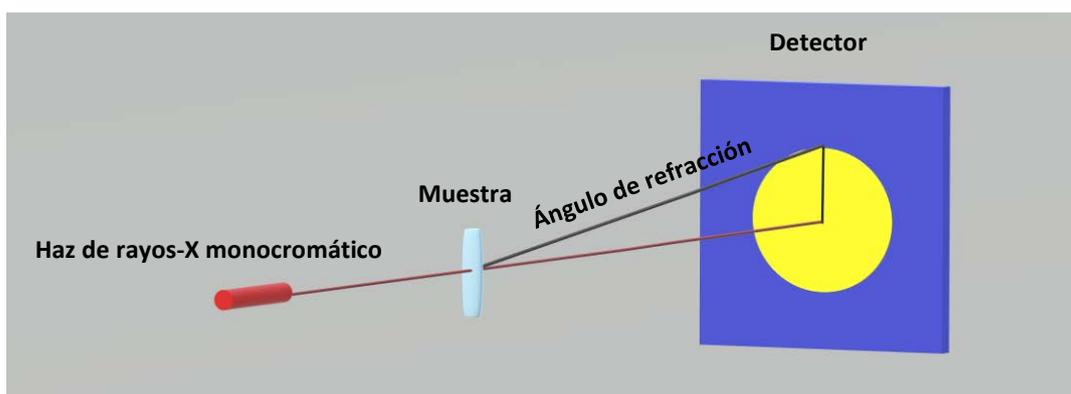


Figura 1. Esquema de un SAXS. En la imagen se puede observar un haz de rayos-X monocromático que atraviesa la muestra, generando un ángulo de refracción que queda registrado en el detector.

-La dispersión de rayos X de pequeño ángulo (SAXS, del inglés *small angle, X-ray scattering*) es una técnica que permite estudiar, entre otros, proteínas y nanocompuestos, tanto con estructura como sin ella. Es una técnica muy versátil y efectiva sobre diferentes tipos de muestras, independientemente de que formen cristales o no. Permite conocer el peso molecular; la distancia máxima dentro de una molécula ($D_{\text{máx}}$) o el radio de giro (Kikhney & Svergun,

2015), un parámetro que mide la distancia media de los átomos al centro de una molécula, permitiendo estudiar los cambios de tamaño a lo largo del tiempo (Tanner, 2016). La técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X monocromático sobre un capilar o cubeta con una disolución para conocer el ángulo de dispersión observado sobre un detector (figura 1). El ángulo varía con el número de moléculas en la disolución y con la diferencia entre la densidad de electrones del soluto y de la molécula, esto último se conoce como contraste y suele ser bajo debido a que no suele haber átomos pesados en las proteínas (Bernardó & Svergun, 2012). Además, se asume que las moléculas de la disolución son isotrópicas, puesto a que pueden estar en todas las orientaciones. La disolución puede ser monodispersa, si todas las moléculas son iguales, o polidispersa, si son diferentes. En el caso de las IDPs, las disoluciones se consideran polidispersas. Esto implica que para resolver la estructura, hay que utilizar medias y no datos simples, por lo que el proceso se complica (Kachala, et al, 2015).

-La espectroscopía de NMR es una de las técnicas más útiles para obtener datos estructurales de alta resolución de las IDPs (Eliezer, 2009). Esto se debe a que, a pesar de no tener estructura fija, si se le puede asignar un desplazamiento químico a cada átomo (Salmon, et al, 2010). Los desplazamientos químicos son medidas del entorno magnético del núcleo de cada átomo. Dan información sobre diferentes características, como pueden ser estructuras secundarias, la presencia de puentes de hidrógeno o los ángulos de torsión de las cadenas laterales (Nerli, et al, 2018). Dependen de los ángulos de torsión φ (el ángulo entre un carbono α y un nitrógeno) y ψ (el ángulo entre un carbono y un carbono α), por lo que cambian con la estructura secundaria, de forma que al calcular los valores para cada átomo y compararlos con los obtenidos experimentalmente, se puede conocer la estructura secundaria más probable. Existen diferentes bases de datos para hacer esto último, pero los datos varían en función de las condiciones experimentales (Kjaergaard, et al, 2011).

-Otra medida que se usa con frecuencia, en el caso de las IDPs, es el acoplamiento dipolar residual (RDC, *Residual Dipolar Coupling*). Se basa en el efecto que se da entre núcleos próximos, debido a que se comportan como dipolos, al hacer un alineamiento parcial en un medio anisotrópico. (Kosol, et al, 2013). Un medio anisotrópico se caracteriza por tener diferentes propiedades en función de la dirección en que se midan. Un ejemplo de medio anisotrópico podría ser la sustancia blanca del tejido nervioso, en relación a la dirección de difusión del agua (Beaullieu, 2002) o un gel de poliacrilamida. El alineamiento que se consigue al emplear un medio de estas características, junto a una campo magnético, permite medir la dirección de los enlaces en relación a la orientación de la proteína (Bax & Tjandra, 1997) (Mohana-Borges, et al, 2004). También aporta datos sobre la estructura secundaria y la posición relativa de elementos con cierta distancia dentro de la molécula (Esteban-Martín, et al, 2010). Sin embargo, al depender tanto de estructuras cercanas como de estructuras más alejadas espacialmente, puede dar lugar a errores (Jensen, et al, 2013).

-El método más común para estudiar interacciones entre residuos más alejados y la formación de estructuras terciarias es medir el incremento de relajación paramagnética (PRE, del inglés, *Paramagnetic Relaxation Enhancement*). Esto se hace al unir un marcador a un aminoácido, generalmente

mediante el uso de enlaces tiol. En el caso de haber interacciones entre residuos, la distancia entre los nucleos y el marcador se hace más pequeña (Konrat, 2014). Esta medida puede afectar a la estabilidad de la estructura y a otros parámetros, como pueden ser los desplazamientos químicos, por la introducción del marcador. Debido a ello, es común utilizarla de forma complementaria al estudio de la secuencia aminoacídica y a otras técnicas, como el SAXS (Sibille & Bernardó, 2012).

-Otras técnica que pueden ser útiles son el FRET (Ferreon, et al, 2010), espectrometría de masas (Beveridge, et al, 2013) o el dicroísmo circular (Chemes, et al, 2012).

Tabla 1. Comparativa de la utilidad de las técnicas clásicas y recientes comentadas en el estudio de las IDPs.

Técnica	Utilidad	Inconvenientes
Cristalografía de rayos X	En casos limitados, depende de las interacciones con proteínas globulares	No suele ser útil
NMR	Aporta datos de alta resolución, tanto de estructuras cercanas como de residuos alejados dentro de la proteína	Puede desviarse de la estructura real, especialmente entre átomos alejados
Criomicroscopía electrónica	Permite conocer conformaciones	Baja resolución, puede obviar conformaciones menos frecuentes
SAXS	Aporta datos de la estructura tridimensional	No aporta datos de gran resolución, está más orientado a conocer la geometría de la proteína

4.2. Características estructurales.

La estructura de las IDPs está definida en gran medida por la secuencia de aminoácidos, que definen la flexibilidad de la proteína y su capacidad de plegarse. Suelen estar formadas por una mayor proporción de aminoácidos hidrofílicos, mientras que es poco frecuente que tengan residuos aromáticos o aminoácidos hidrofóbicos (Dyson, 2016). Estas características son importantes para mantenerse sin estructura dentro de la célula. La carga neta que pueden tener estas proteínas, junto a la baja hidrofobicidad, hacen que haya cierto grado de repulsión y un menor número de interacciones hidrofóbicas en comparación con las que hay en otras proteínas, de forma que las IDPs podrían mantenerse sin estructura terciaria (Uversky, et al, 2000).

La secuencia aminoacídica de las IDPs suele ser diferente a la de proteínas globulares, especialmente en las proteínas que no se pliegan nunca (Vymětal, et al, 2019). Hay aminoácidos que aumentan el nivel de desorden. Son aminoácidos polares que aparecen con mayor frecuencia en proteínas sin estructura (Ala, Arg, Ser). Además, las IDPs también tienen con mayor frecuencia Gly y Pro, que hacen menos estables las estructuras terciarias, mientras que los aminoácidos aromáticos son menos frecuentes (Campen, et al, 2008). Si bien la estructura de las IDPs depende de los aminoácidos que las

forman, no dependen tanto como se creía de la secuencia, sino de las propiedades físicas (Hansen, et al, 2006).

Al no tener una conformación fija, las características estructurales y de interacción dependen en gran medida de la carga y de la distribución de los aminoácidos dentro de la proteína (Forman-Kay & Mittag, 2013). Un aumento de la carga neta, producida por una mayor proporción de aminoácidos con carga, y que genera un aumento de la carga neta por residuo; puede hacer que las proteínas pasen de una estructura globular a una fase con diferentes grados de desestructuración, en el caso de que las proteínas sean polianfolitos (Mao, et al, 2010), es decir, polímeros formados por monómeros con cargas positivas y por monómeros con cargas negativas (Johner & Joanny, 2018). Esto se da porque las proteínas, cuando están en un solvente, presentan tanto interacciones intracatenarias como interacciones individuales de cada residuo con el solvente. La estructura globular es la más favorable solo si la suma de todas las interacciones intracatenarias son mayores que las individuales de cada residuo con el solvente (Raos & Allegra, 1996).

Las IDPs sufren modificaciones postraduccionales con bastante frecuencia, y entre ellas una de las más comunes son la fosforilaciones; y si éstas se dan en suficientes residuos, la proteína puede pasar de ser un polianfolito, que suele ser lo más común en IDPs, a un polielectrolito (Lei, et al, 2018). Las secuencias con estas características suelen ser menos propensas a tener estructuras globulares, esto es debido a que hay pocas interacciones intracatenarias. También se pueden dar casos intermedios, en los que se forman estructuras globulares locales dentro de la proteína (Das, et al, 2015).

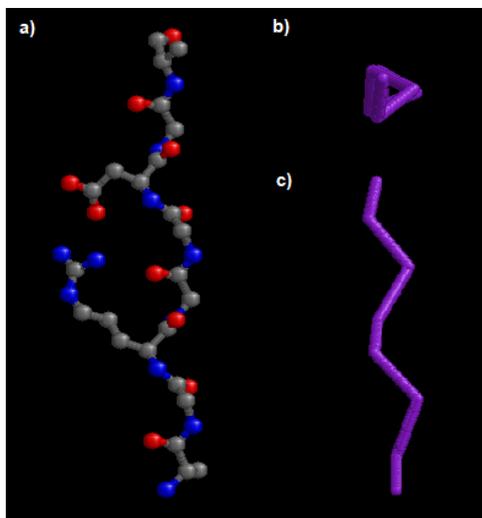


Figura 2. Hélice de poliprolina II obtenida a partir de la estructura de la GTPasa de *Thermus thermophilus* (TT1381) (Kukimoto-Niino, et al, 2004) y aislada con RasMol. En las imágenes a) y b) se puede ver la estructura secundaria de la hélice de poliprolina II con diferentes representaciones. En la imagen c) pueden verse los ángulos diédricos del enlace peptídico característicos de esta estructura.

Otro factor que condiciona la estructura de las IDPs, podría ser la preferencia que pueden tener estas proteínas por adoptar la conformación hélice de poliprolina II (PP_{II}) (figura 2.), que depende de la composición aminoacídica. Las PP_{II} son estructuras secundarias con forma de hélice levógira y sin puentes de hidrógeno. Esto último, permite que tengan un mayor grado de interacciones con

solventes y, por lo tanto, contribuirían a que las proteínas estén en conformaciones desplegadas (Narwani, et al, 2017). El R_h es el radio que tendría una esfera con un grado de difusión igual al de la proteína, o cualquier otra molécula, que se quiera estudiar. En las proteínas globulares, no es una medida exacta; pero en el caso de las IDPs se puede utilizar para conocer el grado de compactación de la estructura (Marsh & Forman-Kay, 2010).

Otro aspecto importante a la hora de estudiar la estructura de cualquier proteína, es el comportamiento del agua circundante. Una forma de conocer esto es haciendo simulaciones de dinámica molecular (MD), que permiten estudiar diferentes parámetros de forma más sencilla que mediante técnicas experimentales (Karplus & McCammon, 2002). A través de estas simulaciones, se ha observado que el agua se acumula alrededor de las IDPs (o IDRs) en mayor medida que en las proteínas globulares (Salvi, et al, 2019), probablemente por la mayor carga neta que tienen estas proteínas (Aggarwal & Biswas, 2018). Además, tienen un mayor número de interacciones mediante puentes de hidrógeno y una mayor movilidad de las moléculas de agua (Rani & Biswas, 2015). Esto es especialmente relevante, debido a la posibilidad de que pueda estar implicado con los cambios conformacionales. También se ha observado que algunas IDPs pueden estar relacionadas con la respuesta a la desecación, como las proteínas LEA en el caso de las plantas (Zamora-Briseño, et al, 2018) o las TDPs en el caso de los tardígrados (Boothby, et al, 2017).

4.3. Regiones relacionadas con la función.

Las IDPs contienen, con cierta frecuencia, regiones cortas responsables en gran medida de su función. Algunos de los elementos que aparecen con más frecuencia en estas regiones son los llamados motivos lineales cortos (SLiMs), los elementos de reconocimiento molecular (MoRFs) (Sharma, et al, 2018) y también las secuencias de baja complejidad (Calabretta & Richard, 2015). Las proteínas, o regiones de proteínas, pueden contener varios de estos motivos a la vez. Además, están reguladas por *splicing* alternativo (Babu, et al, 2012), que puede dar lugar a IDPs con dominios funcionales de este tipo específicos de tejido (Buljan, et al, 2012).

-Los SLiMs son secuencias cortas conservadas muy abundantes en IDPs. Son de pequeño tamaño, no suelen tener más de 10 aminoácidos y tienen diferentes funciones, como puede ser mediar interacciones en los procesos de señalización (Strome, et al, 2018). Con frecuencia, estas frecuencias solo son funcionales cuando se encuentran en IDPs o en IDRs (Gouw, et al, 2017). Su pequeño tamaño hace que al interactuar con ligandos, la afinidad sea más baja, de forma que la interacción pueda ser puntual. Además, en estas secuencias solo un par de aminoácidos suelen tener relevancia en cuanto a mantener la función (Neduva & Russell, 2005).

-Los MoRFs tienen estructuras muy variables, que les permiten interactuar con múltiples ligandos. Esto, sumado a que puede haber varios dentro de la misma proteína, permite que una única IDP intervenga en diferentes rutas de señalización, actuando como nexo de unión entre ellas (Wright & Dyson, 2015). Tienen una mayor proporción de residuos hidrofóbicos en comparación con la estructura completa de las IDPs y una mayor cantidad de aminoácidos aromáticos (Yan, et al, 2016). A pesar de ello, su composición aminoacídica es más parecida a la de las IDPs que a la de las proteínas globulares. Al igual que

los SLiMs, los MoRFs se asocian al splicing alternativo y se cree que se regulan por fosforilación (Mohan, et al, 2006). Se han encontrado tres tipos de MoRFs. Los α -MoRFs forman hélices α cuando interaccionan, los β -MoRFs forman láminas β y los γ -MoRFs, que no forman estructuras estables (Radivojac, et al, 2007).

-Las secuencias de baja complejidad consisten en repeticiones de un mismo aminoácido o en secuencias formadas por pocos aminoácidos diferentes (Haerty & Golding, 2010). Se ha observado que las repeticiones en tándem de aminoácidos aumentan el grado de desorden de las proteínas, sin que necesariamente tenga que haber secuencias exactas, por lo que los aminoácidos de las IDPs pueden, también, tener una mayor variabilidad (Jorda, et al, 2010).

4.4. Tipos de IDPs.

Dentro de las proteínas intrínsecamente desestructuradas se han encontrado tres tipos, también descritos como *flavors*, en base a la composición aminoacídica, la función y la posición de las secuencias: son los *flavors* C, S y V. Estos nombres vienen del método utilizado para predecir el nivel de desorden en cada tipo de IDP. (Buljan, et al, 2014) (Ando, et al, 2013). Además, los diferentes tipos se han podido relacionar con diferentes funciones. El *flavor* C se ha asociado a proteínas con cargas más neutras que funcionan como dominios de unión a azúcares. Las proteínas del tipo S tienen cargas negativas y suelen tener función de unión a otras proteínas, mientras que las proteínas con *flavor* V suelen tener cargas positivas y formar parte de los ribosomas (Vucetic, et al, 2003).

4.5. Estabilidad.

Una de las dudas que existen actualmente sobre las IDPs es como pueden mantenerse en la célula sin tener estructura terciaria, ya que normalmente las proteínas se degradan al perder su estructura. Se ha estudiado la sensibilidad de las IDPs a algunas de las proteasas más comunes y se ha observado que pueden ser degradadas al igual que las proteínas globulares. Esto podría indicar que tienen algún tipo de mecanismo de protección frente a las proteasas (Suskiewicz, et al, 2011). También se ha comprobado el efecto de las variaciones ambientales. Con el aumento de la temperatura, las IDPs sufren cambios estructurales, pudiendo llegar a plegarse. Pero estos cambios, a diferencia de los que suelen darse en las proteínas con estructura terciaria, son reversibles. Otros factores, como pueden ser el pH o la presencia de iones parece que producen el mismo efecto (Uversky, 2009). También se ha observado (*in vitro*), que no pierden su actividad al ser sometidas a bajas temperaturas. Se cree que esto se debe a la falta de estructura fija, e indirectamente, a las características mencionadas antes: baja hidrofobicidad y carga neta (Tantos, et al, 2009).

4.6. Hipótesis de plegamiento.

No está claro por qué las proteínas intrínsecamente desordenadas son tan comunes. Hay diferentes hipótesis. Una de las más aceptadas se basa en la capacidad de las IDPs de adoptar diferentes conformaciones, permitiendo así la

interacción con un mayor número de ligandos. Otras hipótesis se basan en que los monómeros con superficies de interacción grandes, en el caso de las proteínas con estructura, necesitan un mayor tamaño para ser estables (Gunasekaran, et al, 2003). Las IDPs permitirían una mayor superficie de interacción en proteínas de menor tamaño.

La falta de estructura terciaria puede suponer una ventaja. Gracias a la flexibilidad que aporta esta característica, pueden cambiar su forma dependiendo del medio y de las interacciones que se den. En otros casos, como por ejemplo en señalización, no es necesario que haya cambios en la estructura. Es suficiente con la secuencia lineal de los aminoácidos, o con estructuras secundarias de carácter local, para llevar a cabo una función; de forma que algunas IDPs no se pliegan, independientemente de si están interaccionando con ligandos o no (Wright & Dyson, 1999).

Hay bastantes teorías sobre cómo se pliegan las IDPs tras unirse a sus ligandos. Las hipótesis con mayor aceptación son la de selección conformacional y la hipótesis de plegamiento y unión acoplados.

-La hipótesis de selección conformacional sugiere que las IDPs pueden adquirir una conformación tridimensional como consecuencia de la unión con los ligandos (Ganguly, et al, 2012). Según esta teoría, las IDPs tienen ciertas estructuras secundarias aisladas que pueden facilitar la interacción con ligandos al requerir menos energía para la interacción. Cuando estas zonas interaccionan con los ligandos, el resto de regiones de la proteína, más flexibles y con menor preferencia por una conformación u otra, serían inducidas a adoptar una disposición en concreto (Fuxreiter, et al, 2004).

-En la hipótesis plegamiento y unión acoplados, el plegamiento ocurre sin que sea necesaria la unión a ligandos. Se ha comprobado que en algunos casos las IDPs se pliegan sin ligandos, simplemente utilizando un medio con un solvente que permita estabilizar la proteína (Kiefhaber, et al, 2012).

-En paralelo, ha surgido la idea de que las dos teorías no son excluyentes, dando lugar a una nueva hipótesis, el modelo sinérgico. Según este modelo, las dos hipótesis anteriores participarían en el plegamiento de las IDPs, dependiendo de diferentes variables como pueden ser la concentración de IDPs, el nivel de plasticidad de la proteína o la tasa de plegamiento requerida en un momento dado (Espinoza-Fonseca, 2009).

4.7. Funciones de las IDPs.

Las IDPs juegan un papel importante en funciones como la regulación de la transcripción y de la traducción con mayor frecuencia que otras proteínas con un grado de desorden menor, como puede ser el caso de la mayoría de enzimas (Tompa, 2012). Aunque pueden interaccionar con un gran número de ligandos, incluso con algunos con estructuras totalmente diferentes, pueden “seleccionar” con qué moléculas interactuar. Para ello, pueden ocultar los residuos que interaccionan con mayor facilidad. Un ejemplo de esto es la proteína p27, que tiene algunas regiones con estructura secundaria mientras no está unida a complejos ciclina (Uversky, 2011), (Abbastabar, et al, 2018). Además, suelen estar implicadas en la regulación del ciclo celular. Los ligandos con los que interactúan las IDPs suelen ser ácidos nucleicos o proteínas de membrana (Fink, 2005). Es poco frecuente que aparezcan como proteínas de membrana, debido

a su composición aminoacídica. Sin embargo, participan en algunos procesos que si pueden afectar a la membrana. Un ejemplo de esto son proteínas que intervienen en el tráfico vesicular, como pueden ser la α -sinucleína o la complexina, y que pueden interactuar con la membrana y modificar su topografía (Snead & Eliezer, 2019).

4.7.1. Modificaciones postraduccionales.

Las IDPs tienen un número de modificaciones postraduccionales (PTMs) excepcionalmente alto (Xie, et al, 2007). Las modificaciones postraduccionales pueden ser enzimáticas o no. En el caso de las enzimáticas las más comunes son fosforilaciones, acetilaciones y metilaciones, que suelen aparecer en dominios con cierta especificidad con uniones débiles a las enzimas. En el caso de las PTMs no enzimáticas, suelen tener bastante relevancia las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Estas modificaciones suelen afectar a la estructura, e implícitamente a la función, especialmente si modifican la carga (Theillet, et al, 2014). Los cambios en la función están determinados por modificaciones en las propiedades de la secuencia primaria (por la modificación de aminoácidos), cambios en la estabilidad de la estructura, introducción de estructuras secundarias o por la alteración de las interacciones entre zonas alejadas de la proteína (Bah & Forman-Kay, 2016). Los cambios estructurales pueden producir un cambio en la fase de la proteína, ocasionando cambios en el estado de desorden (figura 3) o generando estados de separación de fases (figura 4) (Darling & Uversky, 2018).

En el caso de la separación de fases, las IDPs pueden participar en la organización espacial de ciertas funciones al formar orgánulos sin membrana (MLOs, del inglés *membrane-less organelles*), relacionados con proteínas desestructuradas con motivos repetitivos que generan numerosas interacciones de baja afinidad (Owen & Shewmaker, 2019).

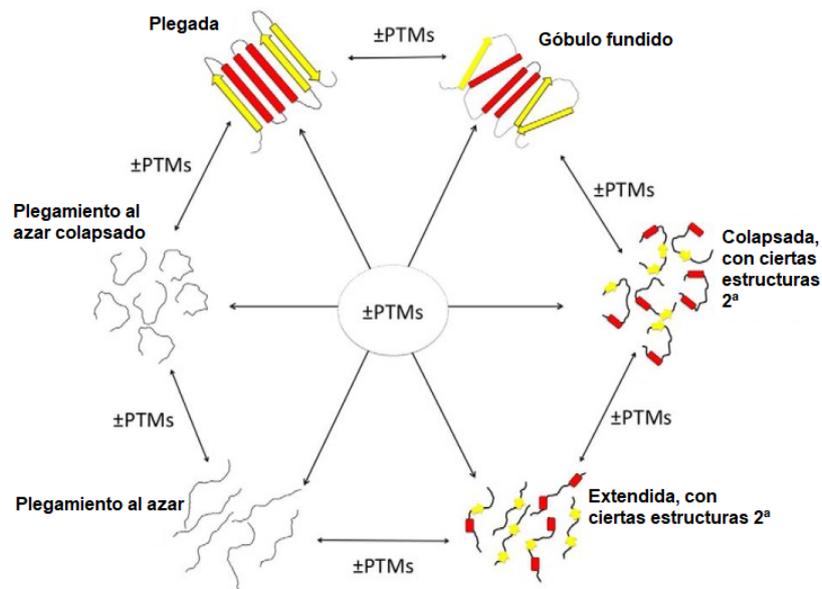


Figura 3. Cambios en el grado de desorden ocasionados por modificaciones postraduccionales. Estos cambios son producidos por los cambios en las propiedades termodinámicas de la proteína. Modificado de (Bah & Forman-Kay, 2016).

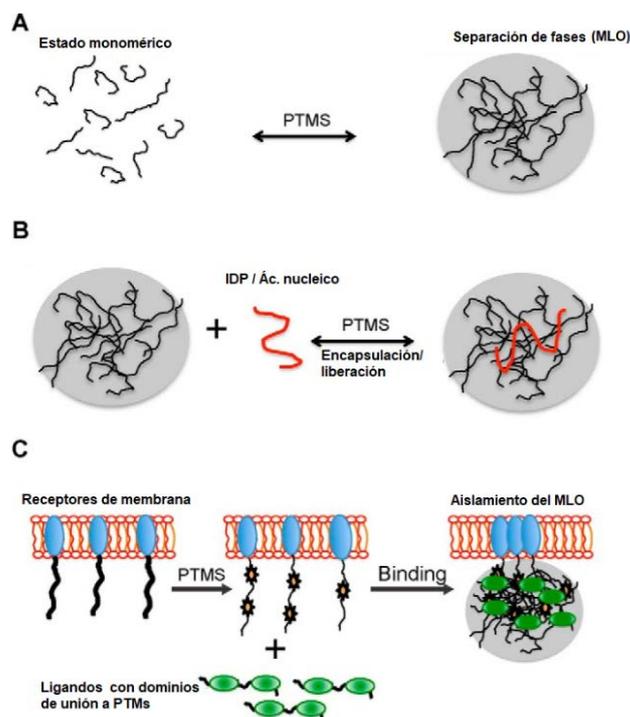


Figura 4. Las IDPs pueden formar orgánulos sin membrana (A, B) que gracias a las modificaciones postraduccionales pueden separar espacialmente algunas funciones celulares mediante interacciones a través de las modificaciones (C). Modificado de (Bah & Forman-Kay, 2016).

4.7.2. Interacción con ácidos nucleicos.

Una de las funciones más frecuentes de las IDPs es la interacción con ácidos nucleicos. Pueden tener funciones muy diversas que abarcan desde la remodelación de la cromatina, como ocurre con las colas de las histonas gracias a la fosforilación de serinas (Turner, et al, 2018); hasta el reconocimiento de sitios de unión específicos de los factores de transcripción o la interacción de factores de transcripción, como puede ser la dimerización de RXR (receptor x retinoide) (Zhao, et al, 2000).

Con frecuencia, los factores de transcripción contienen IDRs (Watson & Stott, 2019). Muchas IDRs actúan como subdominios de proteínas que regulan la afinidad de por el DNA al aumentar el número de interacciones inespecíficas, facilitando también el movimiento de las proteínas a lo largo del DNA, gracias a un mecanismo conocido como transferencia entre segmentos, mediante colas o proteínas *linker* desordenadas (Vuzman & Levy, 2012). Según este modelo, los factores de transcripción se desplazan a través del DNA y pueden moverse entre diferentes moléculas (figura 5) (Rudolph, et al, 2018), en función de la distancia entre las moléculas y de la longitud de la cola N-terminal, que determina la afinidad de la proteína por el DNA o por el *linker* (Vuzman, et al, 2010).

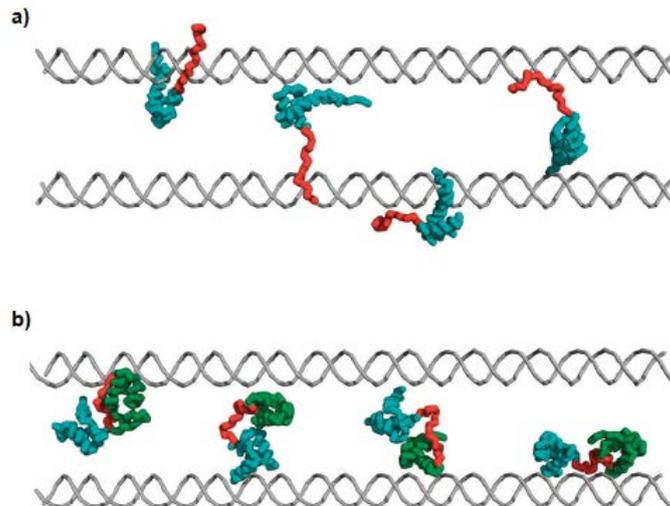
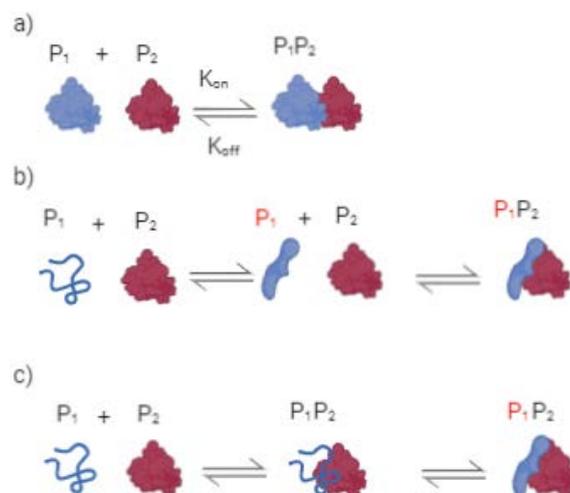


Figura 5. Modelos de desplazamiento de proteínas en el DNA. En la imagen a), se puede ver un factor de transcripción desplazándose mediante el mecanismo de transferencia entre segmentos, a través de una cola N-terminal desordenada. De esta forma, la proteína puede desplazarse entre las diferentes moléculas de DNA. En el caso de la imagen b), el mecanismo funciona a través de una proteína con un *linker* (en rojo), también sin estructura, que une dos regiones del factor de transcripción. Imagen modificada de (Vuzman & Levy, 2012).

El RNA también interacciona con cierta frecuencia con proteínas desestructuradas, incluyendo al RNA ribosómico, aunque en menor proporción. Los lugares en los que se dan estas interacciones son especialmente ricos en aminoácidos con carga (Srivastava, et al, 2018). Estas interacciones están relacionadas con la formación de ultraestructuras (MLOs), como pueden ser gránulos que se forman al acumularse mRNA (Calabretta & Richard, 2015), por ejemplo, los P-bodies (Standart & Weil, 2018).

4.7.3. Interacciones proteína-proteína.

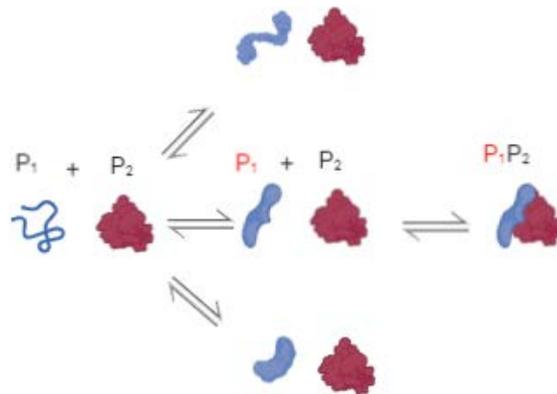


Created in BioRender.com bio

Figura 6. En la imagen a) se ve la interacción entre dos proteínas globulares, que sigue una cinética exponencial simple. En las imágenes b) y c) se ve la interacción de una

IDP, simplificada, que puede tener varios estados intermedios. En el caso b), la proteína desestructurada se pliega y posteriormente se une al ligando, en el caso c) la unión se da antes del cambio conformacional. También podría ocurrir que el proceso ocurra sin cambios conformacionales.

Las interacciones proteína-proteína de las IDPs es algo diferente a las que ocurren con proteínas globulares. Esto se debe a que al interactuar, la IDP sufre un cambio conformacional, independientemente de que sea antes o después (figura 6) (Dogan, et al, 2014). De esta forma, se pasa de una reacción con un paso en el que se unen las dos proteínas a una reacción con más pasos intermedios y más estados, en los que la IDP puede estar unida o no y tener una conformación u otra (figura 7) (Gianni, et al, 2016).



Created in BioRender.com

Figura 7. Las interacciones pueden darse con la IDP en diferentes conformaciones, que pueden cambiar al unirse o no. Esto implica que además puede haber un número de estados variable al estudiar la interacción y que la cinética puede ser de diferentes tipos en las diferentes fases, de forma que los valores k varíen de forma diferente al cambiar la concentración de las proteínas según la conformación en que se encuentre la IDP.

Además, al aumentar la concentración de la IDP libre en la misma conformación que cuando se une, la afinidad por el ligando aumenta, aunque no está claro si esto se debe a un aumento de k_{on} (tasa de asociación) o por una disminución de k_{off} (la tasa de disociación) (Shammas, et al, 2016). También se ha observado, que cuando se forman complejos ternarios, esto es, cuando el ligando se une simultáneamente a otra proteína, la constante de disociación cambia (Toto, et al, 2014). El cambio se debe a que tanto k_{on} como k_{off} se hacen más pequeñas, sin embargo la disminución de k_{off} es mayor. Esto implica que las interacciones proteína-proteína de las IDPs tienen regulación alostérica (Shammas, et al, 2014).

4.7.4. Regulación alostérica.

La regulación alostérica es algo bastante común en IDPs, especialmente en las que participan en vías de señalización. El modo de interacción puede ser positivo o negativo, es decir, la unión de otras proteínas puede facilitar o hacer más difícil la interacción que da lugar a un complejo ternario (Ferreon, et al, 2013). La regulación alostérica puede ocurrir dentro de una única región, como resultado

de una modificación post-traducciona l o del plegamiento al interactuar con una proteína; o en la IDP completa (Berlow, et al, 2018). Los cambios limitados a una región no son determinantes para la afinidad por el ligando, ya que pueden compensarse con cambios en otras regiones. Esto implica que el grado de afinidad por el ligando se debe en mayor medida a cambios en las regiones y no a cambios estructurales de la proteína completa (Hilser & Thompson, 2007). Es interesante también, introducir el concepto de alosterismo dinámico. El alosterismo dinámico consiste en la regulación alostérica originada por cambios en los niveles de entropía, y no únicamente por cambios en la estructura. La diferencia en la entropía puede deberse a variaciones en el grado de flexibilidad de la proteína (Popovych, et al, 2006).

4.8. Ejemplo de IDP: la proteína p53.

Si bien a lo largo de esta memoria se han ido comentando la importancia de las IDPs y de los dominios IDRs en las interacciones de proteínas con otras proteínas, ácidos nucleicos y en general diferentes ligandos esenciales para regular funciones como la transducción de señales o la regulación de la transcripción, en este apartado pasamos a ver el ejemplo de la proteína p53.

Se trata de un factor transcripcional que regula múltiples procesos como pueden ser el ciclo celular, la reparación del DNA, senescencia, apoptosis ,etc. (Xue, et al, 2013). Como se muestra en la figura 8, está formada por un dominio de transactivación N-terminal (TAD), un dominio rico en prolina (PRD), un dominio de señalización nuclear (NLS), un dominio C-terminal regulador (CTD) desestructurados y por un dominio de unión a DNA (DBD) y otro de tetramerización (TET) plegados (Krois, et al, 2018). P53 sufre una serie de fosforilaciones y se une al factor CBP mediante el dominio TAD para iniciar la transcripción cuando hay daño en el DNA o algún problema en el ciclo celular, mientras que de forma habitual se une a MDM2, para ser ubiquitinizada y degradada en el proteosoma (figura 9). En ambos casos, la unión ocurre a través de un cambio conformacional en el dominio TAD (Ithuralde & Turjanski, 2016), que consiste en la formación de una hélice α . Además, p53 se hace más flexible cuando está en forma de tetrámero y sin unirse al DNA (Wells, et al, 2008).



Figura 8. Dominios de p53. El NTAD, PRD, NLS y CTD (en naranja) son IDRs mientras que los dominios en blanco son regiones con estructura (Krois, et al, 2018).

Esta proteína es un caso particularmente relevante porque, además de ser una proteína muy estudiada, refleja bastante bien varios aspectos de interés a cerca de las IDPs. P53 tiene un gran número de isoformas. Estas isoformas, además, están sometidas a PTMs, mutaciones, splicing, etc. (Uversky, 2016) Cada una de estas isoformas puede tener funciones diferentes (Olivares-Illana & Fâhraeus, 2010), o como puede ser el caso de algunas mutaciones, pueden conllevar una pérdida de la función (Ghosh, et al, 2017). En muchos casos, las IDPs están relacionadas con la aparición de enfermedades debido a la pérdida de la función, ocasionada por un plegamiento erróneo o por PTMs, o a algún cambio en su regulación. Algunos ejemplos de esto pueden ser la relación de

p53 con el desarrollo de varios tipos de cáncer, o la relación de otras IDPs con enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares o con la diabetes (Uversky, et al, 2008).

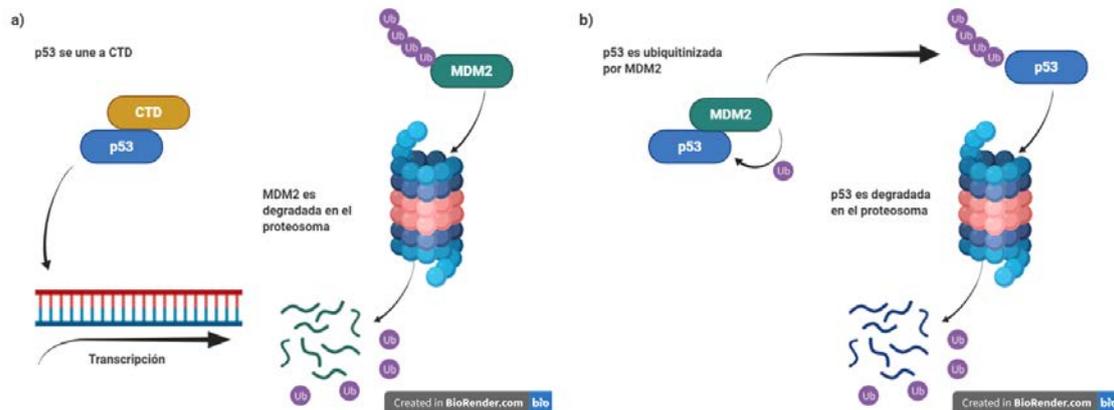


Figura 9. En la imagen a) se puede ver como p53 se une a CTD (el dominio C-terminal de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II) y se produce la transcripción. Esto ocurre cuando hay algún problema con el ciclo celular o cuando hay daño en el DNA, de forma que se activan genes de reparación del DNA o se induce la apoptosis. En la imagen b) se puede ver lo que ocurre en condiciones normales. MDM2 ubiquitina a p53, que es degradada en el proteosoma.

4.9. Las IDPs en el desarrollo de nuevos medicamentos y evolución.

Debido a estas características, y especialmente a los numerosos ligandos y a las funciones de señalización y regulación que pueden tener, las IDP son buenas dianas para el desarrollo de medicamentos (Wang, et al, 2011). Para ello, pueden utilizarse moléculas que se unan a la IDP y que la inhiban o que impidan su plegamiento o a un ligando, de forma que no pueda unirse o impidiendo la unión. Alternativamente, también pueden utilizarse como diana proteínas que modifican a la IDP o que están relacionadas con una ruta de señalización en la que participe (Ambadipudi & Zweckstetter, 2016). A pesar de ello, también tienen ciertos inconvenientes. El mayor problema radica en la baja afinidad de unión de las IDP, que se traduce en una baja afinidad por el medicamento (Metallo, 2010).

Otro punto interesante es que, generalmente, las IDPs tienen tasas de evolución mayores que las proteínas globulares. También hay ciertas excepciones, como puede ser el caso de IDPs con funciones de unión a RNA o que actúan como chaperonas, en las que si hay regiones relativamente conservadas (Vacic & lakoucheva, 2012). Las inserciones y deleciones son más frecuentes en el DNA que codifica IDPs. Esto, además del cambio estructural que conlleva, puede implicar que los lugares en que ocurren las PTMs cambien, dando lugar a funciones diferentes (Brown, et al, 2011). Otra característica del DNA que codifica este tipo de proteínas es que tiene mayores contenidos G-C y una mayor cantidad de islas CpG, más susceptibles de sufrir transiciones C-T (Forcelloni & Glansanti, 2020). En el caso de los eucariotas, se cree que las IDPs pueden contribuir a el desarrollo de proteínas con nuevas funciones sin que eso conlleve un incremento del tamaño del genoma (Niklas, et al, 2018).

4.10. Situación actual.

Como se puede comprobar en las diferentes bases de datos, el conocimiento sobre las IDPs, a pesar de haber aumentado exponencialmente en la última década, es muy bajo en relación al que se tiene sobre proteínas globulares. Actualmente, la mayoría de artículos sobre IDPs se centran en diferentes funciones, o en el uso de técnicas o nuevos algoritmos para predecir la estructura; también en el desarrollo de medicamentos, aunque esto último esté menos estudiado y suele centrarse en el uso de otros medicamentos que ya se usaban previamente. También cabe la posibilidad de utilizar este tipo de proteínas en biotecnología, en base a las características biofísicas, aunque actualmente esto está muy poco desarrollado. En general, quedan bastantes datos sin conocer sobre las IDPs, como pueden ser el mecanismo de plegamiento y de interacción o el mecanismo de regulación, particularmente interesante en el desarrollo de medicamentos.

5. Conclusiones

Tras la revisión bibliográfica sobre las IDPs podemos concluir:

- 1- Las IDPs cambiaron la forma de entender la relación función-estructura y su estudio implicó el desarrollo de nuevas técnicas de resolución de estructuras, que en algunos aplicables a otras proteínas.
- 2- Pese a ser ignoradas durante bastante tiempo, se comprobó que no son una excepción, sino que son relativamente abundantes en muchos organismos, especialmente en eucariotas y que desempeñan funciones imprescindibles para el funcionamiento de la célula.
- 3- Las características estructurales proporcionan a las IDPs una gran capacidad para interactuar con otras proteínas y para tener un papel importante dentro de muchas rutas de señalización y de regulación. Están sometidas a modificaciones que las convierten en proteínas muy versátiles. En muchos casos un cambio que altere la función de estas proteínas puede asociarse con el desarrollo de enfermedades.
- 4- Las IDPs tienen bastante potencial para su estudio como dianas de medicamentos.
- 5- Las mutaciones de las IDPs pueden tener relevancia a la hora de desarrollar nuevas funciones, desde el punto de vista evolutivo.

Conclusions

After the bibliographic review about IDPs, we can conclude:

- 1- IDPs changed the way we understand the function-structure correlation and their study entailed the development of new techniques to solve protein structures, in some cases applicable to other proteins.
- 2- Despite being ignored for some time, studies showed that IDPs aren't an exception, they are relatively abundant in some organisms like eukaryotes and they play important roles to the correct function of the cell.
- 3- Structural features give IDPs a great ability to interact with other proteins and an important role in signaling and regulation pathways. They are subject to many

modifications that gives them a great versatility. In many cases, changes that alter the function of those proteins can be associated with the development of diseases.

4- IDPs are potential targets in drug discovery.

5- From an evolutive perspective, IDPs' mutations can be relevant to develop new functions.

6. Bibliografía

- Abbastabar, M., Kheyrollah, M., Azizian, K., Bagherlou, N., Tehrani, S., Maniati, M., & Karimian, A. (2018). Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modifications and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair*, 69, 63-72.
- Aggarwarl, L., & Biswas, P. (2018). Hydration Water Distribution Around Intrinsically Disordered Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(15), 4206-4218.
- Ambadipudi, S., & Zweckstetter, M. (2016). Targeting intrinsically disordered proteins in rational drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 11(1), 65-77.
- Ando, D., Colvin, M., Rexach, M., & Gopinathan, A. (2013). Physical Motif Clustering within Intrinsically Disordered Nucleoporin Sequences Reveals Universal Functional Features. *PloS one*, 8(9), 1-11.
- Babu, M., Kriwacki, R., & Pappu, R. (2012). Versality from Protein Disorder. *Science*, 337(6101), 1460-1461.
- Bah, A., & Forman-Kay, J. (2016). Modulation of Intrinsically Disordered Protein Function by Post-translational Modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 6696-6705.
- Bah, A., & Forman-Kay, J. (2016). Modulation of Intrinsically Disordered Protein Function by Post-Translational Modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 6696-6705.
- Bai, X., McMullan, G., & Scheres, S. (2015). How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends in biochemical sciences*, 40(1), 49-57.
- Bax, A., & Tjandra, N. (1997). Direct Measurement of Distances and Angles in Biomolecules by NMR in a Dilute Liquid Crystalline Medium. *Science*, 278(5340), 1111-1114.
- Beaullieu, C. (2002). The basis of anisotropic water diffusion on the nervous system-a technical review. *NMR in Biomedicine: An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In Vivo*, 15(7-8), 435-455.
- Berlow, R., Dyson, H., & Wright, P. (2018). Expanding the Paradigm: Intrinsically Disordered Proteins and Allosteric Regulation. *Journal of Molecular Biology*, 430(16), 2309-2320.

- Bernardó, P., & Svergun, D. (2012). Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. *Molecular Biosystems*, *8*(1), 151-167.
- Beveridge, R., Chappuis, Q., Macphee, C., & Barran, P. (2013). Mass spectrometry methods for intrinsically disordered proteins. *Analyst*, *198*(1), 32-42.
- Boothby, T., Tapia, H., Brozena, A., Pieszkiewicz, S., Smith, A., Giovannini, I., . . . Goldstein, B. (2017). Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. *Molecular cell*, *65*(6), 975-984.
- Brown, C., Johnson, A., Dunker, A., & Daughdrill, G. (2011). Evolution and disorder. *Current opinion in structural biology*, *21*(3), 441-446.
- Buljan, M., Chalancon, G., Eustermann, S., Wagner, G., Fuxreiter, M., Bateman, A., & Babu, M. (2012). Tissue-Specific Splicing of Disordered Segments that Embed Binding Motifs Rewires Protein Interaction Networks. *Molecular cell*, *46*(6), 871-883.
- Buljan, M., Van Der Lee, R., Lang, B., Weatheritt, R., Daughdrill, G., Dunker, A., . . . Madan Babu, M. (2014). Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chemical reviews*, *114*(13), 6589-6631.
- Calabretta, S., & Richard, S. (2015). Emerging Roles of Disordered Sequences in RNA-Binding Proteins. *Trends in biochemical sciences*, *40*(11), 662-672.
- Campen, A., Williams, R., Brown, C., Meng, J., Uversky, V., & Dunker, A. (2008). TOP-IDP-Scale: A New Amino Acid Scale Measuring Propensity for Intrinsic Disorder. *Protein and peptide letters*, *15*(9), 956-963.
- Chemes, L., Alonso, L., Noval, M., & Prat-Gay, G. (2012). *Circular dichroism techniques for the analysis of intrinsically disordered proteins and domains*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Cordeiro, T., Herranz-Trillo, F., Urbanek, A., Estaña, A., Cortés, J., Sibille, N., & Bernadó, P. (2017). Small-angle scattering studies of intrinsically disordered. *Current opinion in structural biology*, *42*, 15-23.
- Darling, A., & Uversky, V. (2018). Intrinsic Disorder and Posttranslational Modifications: The Darker Side of the Biological Dark Matter. *Frontiers in genetics*, *9*, 158.
- Das, R., Ruff, K., & Pappu, R. (2015). Relating sequence encoded information to form and function of intrinsically disordered proteins. *Current opinion in structural biology*, *32*, 102-112.
- Dogan, J., Gianni, S., & Jemth, P. (2014). The binding mechanisms of intrinsically disordered proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *16*(14), 6323-6331.
- Dosztányi, Z., Mészáros, B., & Simon, I. (2010). Bioinformatical approaches to characterize intrinsically disordered/unstructured proteins. *Briefings in bioinformatics*, *11*(2), 225-243.
- Dyson, H. (2016). Making Sense of Intrinsically Disordered Proteins. *Biophysical journal*, *110*(5), 1013-1016.
- Eliezer, D. (2009). Biophysical characterization of intrinsically disordered proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *19*(1), 23-30.

- Espinoza-Fonseca, L. (2009). Reconciling binding mechanisms of intrinsically disordered proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(3), 479-482.
- Esteban-Martín, S., Fenwick, R., & Salvatella, X. (2010). Refinement of Ensembles Describing Unstructured Proteins Using NMR Residual Dipolar Couplings. *Journal of the American Chemical Society*, 132(13), 4626-4632.
- Ferreon, A., Ferreon, J., Wright, P., & Deniz, A. (2013). Modulation of allostery by protein intrinsic disorder. *Nature*, 498(7454), 390-394.
- Ferreon, A., Moran, C., Gambin, Y., & Deniz, A. (2010). Single-molecule fluorescence studies of intrinsically disordered proteins. *Methods in Enzymology*, 472, 179-204.
- Fink, A. (2005). Natively unfolded proteins. *Current opinion in structural biology*, 15(1), 35-41.
- Forcelloni, S., & Glansanti, A. (2020). Evolutionary Forces and Codon Bias in Different Flavors of Intrinsic Disorder in the Human Proteome. *Journal of Molecular Evolution*, 88(2), 164-478.
- Forman-Kay, J., & Mittag, T. (2013). From Sequence and Forces to Structure, Function, an Evolution of Intrinsically Disordered Proteins. *Structure*, 21(9), 1492-1499.
- Fuxreiter, M., Simon, I., Friedrich, P., & Tompa, P. (2004). Preformed Structural Elements Feature in Partner Recognition by Intrinsically Unstructured Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 338(5), 1015-1026.
- Ganguly, D., Zhang, W., & Chen, J. (2012). Synergistic folding of two intrinsically disordered proteins: searching for conformational selection. *Molecular BioSystems*, 8(1), 198-209.
- Ghosh, S., Salot, S., Sengupta, S., Navalkar, A., Ghosh, D., Jacob, R., . . . Maji, S. (2017). p53 amyloid formation leading to its loss of function: implications in cancer pathogenesis. *Cell Death & Differentiation*, 24(10), 1784-1798.
- Gianni, S., Dogan, J., & Jemth, P. (2016). Coupled binding and folding of intrinsically disordered proteins: what can we learn from kinetics? *Current Opinion in Structural Biology*, 36, 12-24.
- Gouw, M., Sálamo-Sánchez, H., Van Roey, K., Diella, F., Gibson, T., & Dinkel, H. (2017). Exploring Short Linear Motifs Using the ELM Database and Tools. *Current Protocols in Bioinformatics*, 58(1), 8-22.
- Gunasekaran, K., Tsai, C., Kumar, S., Zanuy, D., & Nussinov, R. (2003). Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(2), 81-85.
- Haerty, W., & Golding, B. (2010). Low-complexity sequences and single amino acid repeats: not just "junk" peptide sequences. *Genome*, 53(10), 753-762.
- Hansen, J., Lu, X., Ross, E., & Woody, R. (2006). Intrinsic Protein Disorder, Amino Acid Composition, and Histone Terminal Domains. *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 1853-1856.

- Henderson, R. (2015). Overview and future of single particle electron cryomicroscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 581, 19-24.
- Hilser, V., & Thompson, E. (2007). Intrinsic disorder as a mechanism to optimize allosteric coupling in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), 8311-8315.
- Ithuralde, R., & Turjanski, A. (2016). Phosphorylation Regulates the Bound Structure of an Intrinsically Disordered Protein: The p53-TAZ2 Case. *PLoS one*, 11(1), 1-17.
- Jensen, M., Ruigrok, R., & Blackledge, M. (2013). Describing intrinsically disordered proteins at atomic resolution by NMR. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(3), 426-435.
- Jirgensons, B. (1966). Classification of proteins according to conformation. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 91(1), 74-86.
- Johner, A., & Joanny, J. (2018). Translocation of polyampholytes and intrinsically disordered proteins. *The European Physical Journal*, 41(6), 78-87.
- Jorda, J., Xue, B., Uversky, V., & Kajava, A. (2010). Protein tandem repeats - the more perfect, the less structured. *The FEBS Journal*, 277(12), 2673-2682.
- Kachala, M., Valentini, E., & Svergun, D. (2015). Application of SAXS for the Structural Characterization of IDPs. En I. Felli, & R. Pierattelli, *Intrinsically Disordered Proteins Studied by NMR Spectroscopy* (1 ed., págs. 261-289). Springer International Publishing.
- Karplus, M., & McCammon, J. (2002). Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nature Structural Biology*, 9(9), 646-652.
- Kiefhaber, T., Bachmann, A., & Jensen, K. (2012). Dynamics and mechanisms of coupled protein folding and binding reactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(1), 21-29.
- Kikhney, A., & Svergun, D. (2015). A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Letters*, 589(19), 2570-2577.
- Kjaergaard, M., Brander, S., & Poulsen, F. (2011). Random coil chemical shift for intrinsically disordered proteins: effects of temperature and pH. *Journal of Biomolecular NMR*, 49(2), 139-149.
- Konrat, R. (2014). NMR contributions to structural dynamics studies of intrinsically disordered proteins. *Journal of Magnetic Resonance*, 241, 74-85.
- Kosol, S., Contreras-Martos, S., Cedeño, C., & Tompa, P. (2013). Structural Characterization of Intrinsically Disordered Proteins by NMR Spectroscopy. *Molecules*, 18(9), 10802-10828.
- Kriwacki, R., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S., & Wright, P. (1996). Structural studies of p21^{Waf1/Cip1}/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11504-11509.

- Krois, A., Dyson, H., & Wright, P. (2018). Long-range regulation of p53 DNA binding by its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(48), 11302-11310.
- Kukimoto-Niino, M., Shirouzu, M., Murayama, K., Inoue, M., Kuramitsu, S., & Yokoyama, S. (2004). Crystal structure of the GTP-binding protein Obg from *Thermus thermophilus* HB8. *Journal of Molecular Biology*, *337*(3), 761-770.
- Lei, R., Lee, J., Francis, M., & Kumar, S. (2018). Structural Regulation of a Neurofilament-inspired Intrinsically Disordered Protein Brush by Multisite Phosphorylation. *Biochemistry*, *57*(27), 4019-4028.
- Lin, Y., & Chan, H. (2017). Phase Separation and Single-Chain Compactness of Charged Disordered Proteins Are Strongly Correlated. *Biophysical Journal*, *112*(10), 2043-2046.
- Mao, A., Crick, S., Vitalis, A., Chicoine, C., & Pappu, R. (2010). Net charge per residue modulates conformational ensembles of intrinsically disordered proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(18), 8183-8188.
- Marsh, J., & Forman-Kay, J. (2010). Sequence Determinants of Compaction in Intrinsically Disordered Proteins. *Biophysical Journal*, *98*(10), 2383-2390.
- Metallo, S. (2010). Intrinsic disordered proteins are potential drug targets. *Current Opinion in Chemical Biology*, *14*(4), 481-488.
- Mohan, A., Oldfield, C., Radivojac, P., Vacic, V., Cortese, M., Dunker, A., & Uversky, V. (2006). Analysis of Molecular Recognition Features (MoRFs). *Journal of Molecular Biology*, *362*(5), 1043-1059.
- Mohana-Borges, R., Goto, N., Kroon, G., Dyson, H., & Wright, P. (2004). Structural Characterization of Unfolded States of Apomyoglobin using Residual Dipolar Couplings. *Journal of Molecular Biology*, *340*(5), 1131-1142.
- Müller-Späth, S., Soranno, A., Hirschfeld, V., Hofmann, H., Rügger, S., Reymond, L., . . . Schuler, B. (2011). Charge interactions can dominate the dimensions of intrinsically disordered proteins. *Biophysical Journal*, *100*(3), 12a-13a.
- Narwani, T., Santuz, H., Shinada, N., Vattekatte, A., Ghouzam, Y., Srinivasan, N., . . . de Brevern, A. (2017). Recent advances on polyproline II. *Amino acids*, *49*(4), 705-713.
- Neduva, V., & Russell, R. (2005). Linear motifs: Evolutionary interaction switches. *FEBS Letters*, *579*(15), 3342-3345.
- Nerli, S., McShan, A., Sgourakis, N., Neuhaus, D., & Gadian, D. (2018). Chemical shift-based methods in NMR structure determination. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, *106*, 1-25.
- Niklas, K., Dunker, A., & Yruela, I. (2018). The evolutionary origins of cell type diversification and the role of intrinsically disordered proteins. *Journal of Experimental Botany*, *69*(7), 1437-1446.
- Nogales, E., & Scheres, S. (2015). Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity. *Molecular cell*, *58*(4), 677-689.

- Nwanochie, E., & Uversky, V. (2019). Structure Determination by Single-Particle Cryo-Electron Microscopy: Only the Sky (and Intrinsic Disorder) is the Limit. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(17), 4186-4206.
- Oldfield, C., Uversky, V., Dunker, A., & Kurgan, L. (2019). Introduction to intrinsically disordered proteins and regions. En N. Salvi, *Intrinsically Disordered Proteins Dynamics, Binding and Function* (págs. 1-34). USA: Academic Press.
- Olivares-Illana, V., & Fâhraeus, R. (2010). p53 isoforms gain functions. *Oncogene*, 29(37), 5113-5119.
- Oroguchi, T., Ikeguchi, M., & Sato, M. (2011). Towards the Structural Characterization of Intrinsically Disordered Proteins by SAXS and MD Simulation. *Journal of Physics: Conference Series*, 272(1)012005.
- Owen, I., & Shewmaker, F. (2019). The Role of Post-Translational Modifications in the Phase Transitions of Intrinsically Disordered Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5501-5514.
- Peng, Z., Yan, J., Fan, X., Mizianty, M., Xue, B., Wang, K., . . . Kurgan, L. (2015). Exceptionally abundant exceptions: comprehensive characterization of intrinsic disorder in all domains of life. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(1), 137-151.
- Popovych, N., Sun, S., Ebright, R., & Kalodimos, C. (2006). Dynamically driven protein allostery. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(9), 831-838.
- Powers, K., Gildenberg, M., & Washington, M. (2019). Modeling Conformationally Flexible Proteins With X-ray Scattering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 570-578.
- Radivojac, P., Iakoucheva, L., Oldfield, C., Obradovic, Z., Uversky, V., & Dunker, A. (2007). Intrinsic Disorder and Functional Proteomics. *Biophysical Journal*, 92(5), 1439-1456.
- Rani, P., & Biswas, P. (2015). Diffusion of Hydration Water around Intrinsically Disordered Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(42), 13262-13270.
- Raos, G., & Allegra, G. (1996). Chain collapse and phase separation in poor-solvent polymer solutions: A unified molecular description. *The Journal of Chemical Physics*, 104(4), 1626-1645.
- Receveur-Bréchet, V., & Durand, D. (2012). How Random are Intrinsically Disordered Proteins? A Small Angle Scattering Perspective. *Current Protein and Peptide Science*, 13(1), 55-75.
- Romero, P., Obradovic, Z., Kissinger, C., Villafranca, J., Garner, E., Guillot, S., & Dunker, A. (1998). Thousands of proteins likely to have long disordered regions. *Pac Symp Biocomput*, 3, 437-448.
- Rudolph, J., Mahadevan, J., Dyer, P., & Luger, K. (2018). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 searches DNA via a 'monkey bar' mechanism. *Elife*, 7, 1-23.
- Salmon, L., Nodet, G., Ozenne, V., Yin, G., Jensen, M., Zweckstetter, M., & Blackledge, M. (2010). NMR Characterization of Long-Range Order In Intrinsically Disordered Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 132(24), 8407-8418.

- Salvi, N., Abyzov, A., & Blackledge, M. (2019). Solvent-dependent segmental dynamics in intrinsically disordered proteins. *Science advances*, 5(6).
- Schlessinger, A., Punta, M., & Rost, B. (2007). Natively unstructured regions in proteins identified from contact predictions. *Bioinformatics*, 23(18), 2376-2384.
- Shammas, S., Crabtree, M., Dahal, L., Wicky, B., & Clarke, J. (2016). Insights into Coupled Folding and Binding Mechanisms from Kinetic Studies. *Journal of Biological Chemistry*, 291(13), 6689-6695.
- Shammas, S., Travis, A., & Clarke, J. (2014). Allostery within a transcription coactivator is predominantly mediated through dissociation rate constants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12055-12060.
- Sharma, R., Raicar, G., Tsunoda, T., Patil, A., & Sharma, A. (2018). OPAL: prediction of MoRF regions in intrinsically disordered protein sequences. *Bioinformatics*, 34(11), 1850-1858.
- Sibille, N., & Bernardó, P. (2012). Structural characterization of intrinsically disordered proteins by the combined use of NMR and SAXS. *Biochemical Society Transactions*, 40(5), 955-962.
- Snead, D., & Eliezer, D. (2019). Intrinsically disordered proteins in synaptic vesicle trafficking and release. *Journal of Biological Chemistry*, 294(10), 3325-3342.
- Srivastava, A., Ahmad, S., & Gromiha, M. (2018). Deciphering RNA-Recognition Patterns of Intrinsically Disordered Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1595-1610.
- Standart, N., & Weil, D. (2018). P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage. *Trends in Genetics*, 34(8), 612-626.
- Strome, B., Hsu, S., Man, M., Zarin, T., Ba, A., & Moses, A. (2018). Short linear motifs in intrinsically disordered regions modulate HOG signaling capacity. *BMC systems biology*, 12(1), 75-88.
- Suskiewicz, M., Sussman, J., Silman, I., & Shaul, Y. (2011). Context-dependent resistance to proteolysis of intrinsically disordered proteins. *Protein Science*, 20(8), 1285-1297.
- Tanner, J. (2016). Empirical power laws for the radii of gyration of protein oligomers. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 72(10), 1119-1129.
- Tantos, A., Friedrich, P., & Tompa, P. (2009). Cold stability of intrinsically disordered proteins. *FEBS Letters*, 583(2), 465-469.
- Theillet, F., Binolfi, A., Frembgen-Kesner, T., Hingorani, K., Sarkar, M., Kyne, C., . . . Selenko, P. (2014). Physicochemical Properties of Cells and their Effects on Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). *Chemical Reviews*, 114(13), 6661-6714.
- Tompa, P. (2012). Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trend in Biochemical Sciences*, 37(12), 509-516.
- Toto, A., Giri, R., Brunori, M., & Gianni, S. (2014). The mechanism of binding of the KIX domain to the mixed lineage leukemia protein and its allosteric role in the recognition of c-Myb. *Protein Science*, 23(7), 962-969.

- Turner, A., Watson, M., Wilkins, O., Cato, L., Travers, A., Thomas, J., & Stott, K. (2018). Highly disordered histone H1-DNA model complexes and their condensates. *National Academy of Sciences*, *115*(47), 11964-11969.
- Uversky, V. (2009). Intrinsically Disordered Proteins and Their Environment: Effects of Strong Denaturants, Temperature, pH, Counter Ions, Membranes, Binding Partners, Osmolytes and Macromolecular Crowding. *The Protein Journal*, *28*(7-8), 305-325.
- Uversky, V. (2011). Intrinsically disordered proteins from A to Z. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *43*(8), 1090-1103.
- Uversky, V. (2011). Intrinsically disordered proteins may escape unwanted interaction via functional misfolding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1814*(5), 693-712.
- Uversky, V. (2016). p53 Proteoforms and Intrinsic Disorder: An Illustration of the Protein Structure-Function Continuum Concept. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(11), 1874-1910.
- Uversky, V., Gillespie, J., & Fink, A. (2000). Why Are "Natively Unfolded" Proteins Unstructured Under Physiologic Conditions? *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *41*(3), 415-427.
- Uversky, V., Oldfield, C., & Dunker, A. (2008). Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annual Review of Biophysics*, *37*, 215-246.
- Vacic, V., & Iakoucheva, L. (2012). Disease mutations in disordered regions—exception to the rule? *Molecular BioSystems*, *8*(1), 27-32.
- Vucetic, S., Brown, C., Dunker, A., & Obradovic, Z. (2003). Flavors of Protein Disorder. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *52*(4), 573-584.
- Vuzman, D., & Levy, Y. (2012). Intrinsically disordered regions as affinity tuner in protein-DNA interactions. *Molecular BioSystems*, *8*(1), 47-57.
- Vuzman, D., Azia, A., & Levy, Y. (2010). Searching DNA via a "Monkey Bar" Mechanism: The Significance of Disordered Tails. *Journal of Molecular Biology*, *396*(3), 674-684.
- Vymětal, J., Vondrášek, J., & Hlouchová, K. (2019). Sequence Versus Composition: What Prescribes IDP Biophysical Properties? *Entropy*, *21*(7), 654-662.
- Wang, J., Cao, Z., & Li, S. (2011). Novel Strategies for Drug Discovery Based on Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). *International Journal of Molecular Sciences*, *12*(5), 3205-3219.
- Watson, M., & Stott, K. (2019). Disordered domains in chromatin-binding proteins. *Essays in Biochemistry*, *63*(1), 147-156.
- Wells, M., Tidow, H., Rutherford, T., Markwick, P., Jensen, M., Mylonas, E., . . . Fersht, A. (2008). Structure of tumor suppressor p53 and its intrinsically disordered N-terminal transactivation domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(15), 5762-5767.
- Wright, P., & Dyson, H. (1999). Intrinsically Unstructured Proteins: Re-assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *Journal of Molecular Biology*, *293*(2), 321-331.

- Wright, P., & Dyson, H. (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 16(1), 18-29.
- Xie, H., Vucetic, S., Iakoucheva, L., Oldfield, C., Dunker, A., Obradovic, Z., & Uversky, V. (2007). Functional Anthology of Intrinsic Disorder. 3. Ligands, Post-Translational Modifications, and Diseases Associated with Intrinsically Disordered Proteins. *Journal of Proteome Research*, 6(5), 1917-1932.
- Xue, B., Brown, C., Dunker, A., & Uversky, V. (2013). Intrinsically disordered regions of p53 family are highly diversified in evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Proteins and Proteomics*, 1834(4), 725-738.
- Xue, B., Williams, R., Oldfield, C., Dunker, A., & Uversky, V. (2010). Achaic chaos: intrinsically disordered proteins in Archaea. *BMC Systems Biology*, 4(1), 1-21.
- Yan, J., Dunker, A., Uversky, V., & Kurgan, L. (2016). Molecular recognition features (MoRFs) in three domains of life. *Molecular BioSystems*, 12(3), 697-710.
- Zamora-Briseño, J., Reyes-Hernández, S., & Rodríguez-Zapata, L. (2018). Does water stress promote the proteome-wide adjustment of intrinsically disordered proteins in plants? *Cell Stress and Chaperones*, 23(5), 807-812.
- Zhao, Q., Chasse, S., Devarakonda, S., Sierk, M., Ahvazi, B., & Rastinejad, F. (2000). Structural basis of RXR-DNA interactions. *Journal of Molecular Biology*, 296(2), 509-520.