



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
*Memorie e Rendiconti di Chimica, Fisica,
Matematica e Scienze Naturali*
139° (2021), Vol. II, fasc. 1, pp. 53-59
ISSN 0392-4130 • ISBN 978-88-98075-44-7

Verso una comprensione del ruolo del disordine nelle proteine

STEFANO GIANNI*

* Dipartimento di Scienze Biochimiche “A. Rossi Fanelli,” Sapienza Università di Roma, 00185 Rome, Italy. E.mail: stefano.gianni@uniroma1.it

Abstract – Intrinsically disordered proteins are an abundant class of polymers formed by Proteins or protein segments that are capable to accumulate well-defined structures in their free states under native-like conditions. Such proteins are extremely abundant in protein–protein interaction modules, where their disorder apparently gives several advantages extending their binding properties and repertoires. To fully understand how protein disorder contributes to protein–protein interactions it is critical to describe in detail the mechanism(s) of interactions. However, elucidating mechanisms in protein–protein interactions is usually very challenging. In this paper, I discuss how kinetics in combination with protein engineering and structural information can be used to unveil the details of reaction mechanisms involving intrinsically disordered proteins.

Keywords: testo

Uno dei concetti più intuitivi, universalmente associato a qualsiasi strumento pratico, è che la forma determina la funzione. Di conseguenza, i fondamenti della nostra comprensione del meccanismo mediante il quale le macromolecole esercitano i loro ruoli si basano sul dogma struttura-funzione. Date queste premesse, non sorprende che la scoperta che una grande frazione del proteoma sia essenzialmente disordinata abbia rivoluzionato la nostra visione della scienza delle proteine [1-6]. Infatti, mentre queste proteine mancano di uno stato ordinato in condizioni fisiologiche, sono tuttavia pienamente funzionali e spesso critiche per la vita cellulare.

Quando si confrontano proteine ordinate e disordinate, un problema di interesse sta nel capire se l'eterogeneità conformazionale di queste ultime conferisce loro un valore potenziale. Infatti, sebbene sia chiaro che un sistema disordinato è intrinsecamente più malleabile e, quindi, più incline ad adattarsi alle mutevoli condizioni di vita [7-9], la nostra conoscenza delle proteine intrinsecamente disordinate (IDP) non consente ancora di comprenderne a pieno le eventuali potenzialità. In questo contesto, gli studi meccanicistici sono di particolare importanza [10-21]. Infatti, studiando i meccanismi con cui le protei-

ne disordinate riconoscono i loro partner, potrebbe essere possibile evidenziare il ruolo specifico nella loro funzione.

Le proteine intrinsecamente disordinate (IDP) sono una classe di proteine che esercitano la loro funzione nonostante la mancanza di una struttura tridimensionale ben definita, che a volte si ottiene solo legandosi ai loro ligandi naturali. Questa caratteristica implica che il ripiegamento sia generalmente associato a un evento di legame, una problematica che rappresenta una sfida interessante per gli studi cinetici. In questa breve rassegna, ricapitoliamo alcuni dei più importanti risultati dei meccanismi di ripiegamento indotti dal legame delle IDP ottenuti analizzando la loro cinetica di legame. Inoltre, concentrandoci sull'interazione tra la proteina NTAIL del virus del morbillo, un IDP prototipo, e il suo partner fisiologico, il dominio X, ricapitolerò i principali approcci teorici e sperimentali utilizzati per descrivere il ripiegamento indotto dal legame.

In questa rassegna, descriveremo alcuni dei principali risultati di cinetica di riconoscimento mediata dagli IDP. In particolare, ricapitoleremo dapprima alcune delle più importanti osservazioni che sono state osservate su diversi sistemi proteici. Quindi, ci concentreremo sull'interazione tra le proteine virali NTAIL e XD da Morbillo, che hanno rappresentato l'oggetto del lavoro diretto del mio laboratorio di ricerca, nel tentativo di individuare le caratteristiche peculiari di questa specifica interazione e la sua importanza.

La cooperatività nel riconoscimento proteina-proteina mediata da IDP

La comprensione del meccanismo di una data reazione richiede la dissezione di ogni singola fase e la sua successiva caratterizzazione. Di conseguenza, il modo classico per comprendere la cinetica di una reazione chimica è: primo, proporre lo schema cinetico più semplice che descriva l'evoluzione temporale osservata di una data reazione; secondo, perturbare le condizioni sperimentali e / o la composizione chimica dei reagenti monitorando gli effetti della perturbazione su ogni singolo evento misurabile [22]. Un importante prerequisito per questo approccio risiede nella disponibilità di un metodo ottico efficiente per monitorare la reazione di interesse.

Il meccanismo di riconoscimento delle IDP generalmente coinvolge almeno una fase di interazione ed una fase di ripiegamento [10, 23]. Tuttavia, questi passaggi possono portare a un complesso strutturalmente eterogeneo, che esplora diverse conformazioni alternative ed

è quindi indicato con il termine inglese “fuzzy” o morbido [7-9]. A causa di questa complessità, ne consegue che lo schema cinetico minimo per comprendere il ripiegamento indotto dal legame di un IDP coinvolge almeno un passaggio bimolecolare (legame) e monomolecolare (piegatura). L'ordine temporale in base al quale questi due passaggi possono verificarsi, però, può teoricamente cambiare, in modo che il legame possa verificarsi prima (adattamento indotto) o dopo (selezione conformazionale) il ripiegamento dell'IDP [15, 24].

La prima caratterizzazione cinetica del ripiegamento indotto dal legame di un IDP è stata fornita da Hagen e collaboratori [25], che hanno studiato l'interazione tra il piccolo peptide IA3 e la proteina YPrA utilizzando la tecnica sperimentale del salto di temperatura. Un'osservazione sorprendente, derivante da questo elegante lavoro, è che nonostante la complessità intrinseca del piegamento indotto dal legame, l'apparente reazione avviene con una chiara semplicità, in modo tale che la cinetica osservata è semplice come un singolo esponenziale. Questo risultato, che rappresenterà un tema ricorrente nei successivi studi cinetici sugli IDP [10-21], suggerisce che il ripiegamento indotto dal legame avvenga in modo cooperativo in modo tale che solo gli stati completamente disordinato-non legato e completamente ordinato-legato possono essere osservati.

Entità delle costanti di velocità osservate nella cinetica IDP

Sin dalla scoperta delle IDP, sono stati proposti numerosi modelli per spiegare il potenziale valore del disordine di una proteina. In particolar modo, è stato suggerito che disordine possa aumentare il loro raggio di cattura di un polimero e quindi accelerare la cinetica di legame [26]. Questo scenario, tipicamente denominato “meccanismo fly-casting”, implicherebbe i) che le costanti di velocità di legame nelle interazioni IDP sono maggiori di quelle osservate nelle proteine strutturate; ii) dovrebbe esserci una correlazione tra la (in)stabilità della proteina e le costanti della velocità di legame. Entrambe le ipotesi sono state testate in lavori diversi [13,27-29] e, ad oggi, non è stata fornita alcuna prova sperimentale convincente e inequivocabile per il meccanismo fly-casting.

È stato dimostrato che le costanti della velocità di associazione degli IDP possono variare da 10^5 a 10^9 $M^{-1} s^{-1}$, mentre le costanti della velocità di dissociazione sono comprese tra circa 0.1 e $1000 s^{-1}$. Si è quindi concluso che l'ampiezza delle costanti di velocità osser-

vate era dello stesso ordine di quelle misurate per le proteine ripiegate [10]. Tuttavia, un'analisi più attenta dei dati cinetici ha suggerito che il legame si è svolto a forze ioniche elevate, riportando la cosiddetta 'costante di velocità basale' (cioè la costante di velocità di associazione misurabile dove il contributo della carica netta delle molecole è schermato), restituisce valori più elevati per IDP rispetto a quelli ottenuti da proteine ripiegate [23, 30]. Pertanto, mentre questo risultato potrebbe indicare che il disordine proteico accelera effettivamente il riconoscimento tra i partner interagenti, poiché l'ampiezza delle costanti di velocità osservate misurate in condizioni fisiologiche non differisce in modo significativo nei sistemi ordinati e disordinati, è improbabile che questo e tutto svolga un ruolo significativo in vivo.

La nucleazione eterogenea e il ripiegamento delle IDP

Data la sua importanza vitale, la comprensione del meccanismo di ripiegamento delle proteine ha rappresentato un ruolo centrale nella scienza da decenni [31]. Pertanto, molti sforzi sperimentali sono stati dedicati alla descrizione del ripiegamento delle proteine globulari e sono stati proposti diversi modelli per catturare i dettagli di questa complessa reazione.

Un'osservazione ricorrente negli studi sul ripiegamento delle proteine globulari risiede nella robustezza inaspettata della reazione [31-33]. Infatti, mentre il ripiegamento implica la formazione e la rottura di centinaia di deboli interazioni non covalenti, diversi studi sperimentali e computazionali hanno evidenziato che il ripiegamento è generalmente iniziato dalla formazione di un piccolo nucleo con collasso simultaneo dell'intero dominio [34]. Sebbene tale nucleo sia debole e relativamente esteso all'interno della proteina globulare, è piuttosto robusto e resistente ai cambiamenti nelle condizioni sperimentali, nella composizione della sequenza e / o nella connettività della sequenza [35].

Considerando queste premesse, non è difficile capire come una delle scoperte più sorprendenti nella cinetica delle IDP fosse rappresentata dall'osservazione di una notevole duttilità del loro meccanismo di ripiegamento. Infatti, studiando il ripiegamento di una stessa IDP contro diversi partner con leggere differenze strutturali nella sua tasca di legame, si è scoperto che il fenomeno di ripiegamento è macroscopicamente perturbato [19]. Una spiegazione plausibile di questo fenomeno è che, poiché il nucleo di ripiegamento è diviso tra l'IDP e il suo partner, il ripiegamento può avvenire solo tramite nucleazione eterogenea e, pertanto, si osservano percorsi alter-

nativi con condizioni mutevoli e / o composizione della sequenza. Questo risultato, che è stato originariamente osservato per il ripiegamento dei domini di transattivazione di MLL e c-Myb a KIX [19, 20], è stato confermato anche per l'interazione tra NCBD e ACTR [36] e per quella tra NTAIL e XD [37]. Queste ultime proteine rappresentano un esempio paradigmatico di ripiegamento indotto dal legame. Pertanto, nella seconda parte di questa rassegna, ricapiteremo i principali risultati che abbiamo ottenuto dalla loro cinetica di legame.

L'interazione tra NTAIL e XD. Ruolo fisiologico e caratteristiche strutturali

Il dominio C-terminale della nucleoproteina del virus del morbillo (NTAIL) è un esempio paradigmatico di un dominio intrinsecamente disordinato. Il virus del morbillo (MeV) è un membro della famiglia Paramyxoviridae e un grave patogeno umano. Il genoma di MeV è costituito da un RNA a filamento singolo non segmentato di polarità negativa che è avvolto da una matrice regolare di monomeri della nucleoproteina (N) all'interno di un nucleocapside elicoidale. Quest'ultimo è il substrato utilizzato dalla RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) per la trascrizione dei geni virali e la replicazione del genoma. Il RdRp è composto dalla proteina grande (L) e dalla fosfoproteina (P), con la P necessaria per il recupero della proteina L sul modello del nucleocapside.

La proteina N è costituita da un dominio N-terminale strutturato (NCORE, amminoacidi 1-400) che è responsabile del legame all'RNA e dell'autoassemblaggio di N [38-40], e da un dominio C-terminale intrinsecamente disordinato (NTAIL, amminoacidi 451-525) [41]. La proteina P possiede un dominio N-terminale lungo, intrinsecamente disordinato (PNT) [38] e una regione C-terminale (PCT) organizzata in moduli strutturati e disordinati alternati [42]. PCT comprende due regioni strutturate: il dominio di multimerizzazione P (PMD) che adotta una struttura a spirale [43, 44] e il dominio X C-terminale (XD) che è responsabile del legame di P a [45]. XD consiste in un fascio di tre α -eliche antiparallele [46, 47]. Sebbene MeV XD sia piegato, gli studi di spettrometria di massa a ionizzazione spray di elettroni hanno rivelato che è strutturalmente eterogeneo, popolando almeno due conformazioni alternative in condizioni native [48]. Questa conclusione è supportata anche da un recente studio cinetico che ha identificato la presenza, in condizioni native, di un intermedio pieghevole di XD che rappresenta fino al 30% della popolazione proteica [49].

L'interazione NTAIL-XD gioca quindi un ruolo criti-

co nel mantenere la polimerasi ancorata al nucleocapside durante la sua scansione. Oltre a questa funzione nell'ancoraggio e nel governo delle dinamiche di sintesi dell'RNA, questa interazione è stata proposta anche regolare l'effetto inibitorio esercitato dalle appendici disordinate che ricoprono il nucleocapside sull'accesso della polimerasi al modello nucleocapsidico [54]. A causa di questi molteplici ruoli critici, l'interazione NTAIL-XD deve essere strettamente controllata. In linea con questo requisito, studi mutazionali hanno dimostrato che le sostituzioni casuali introdotte all'interno di Box2 portano a una riduzione della forza di legame [55]. Questo risultato implica che la sequenza Box2 è scarsamente evolutiva, perché è stata scelta naturalmente per legare XD in modo ottimale. A sostegno di questa osservazione, la sequenza amminoacidica di Box2 è piuttosto ben conservata nei ceppi MeV presenti in natura [55].

Distinzione tra adattamento indotto e selezione conformazionale

Una delle scoperte più interessanti nell'interazione tra NTAIL e XD risiede nell'analisi dell'ordine degli eventi che si verificano durante il ripiegamento indotto dal legame. Infatti, studi spettroscopici hanno mostrato che l' α -MoRE di NTAIL è in parte pre-strutturato come α -elica in assenza di XD [46,56,57] con questa proprietà conservata in vari paramixovirus [58]. La preconfigurazione parziale dei MoRE facilita il processo di ripiegamento indotto da legame: la struttura residua trattiene lo spazio conformazionale campionato dall'IDP, riducendo così il numero di conformeri in soluzione e rendendo la transizione strutturale alla conformazione (parzialmente) piegata energeticamente meno impegnativo [51]. Questi risultati supporterebbero un meccanismo che coinvolge, almeno in parte, la selezione conformazionale, in cui la struttura elicoidale preformata è stabilizzata selettivamente legandosi a NTAIL. D'altra parte, il comportamento di risonanza di NTAIL negli esperimenti di titolazione NMR con XD ha evidenziato la formazione di un intermedio di legame [46]. Questa evidenza sperimentale è stata presto considerata indicativa di un meccanismo di piegatura dopo legame, scenario che è stato successivamente supportato da simulazioni di dinamica molecolare [59].

Nel tentativo di risolvere questa apparente ambiguità, sono stati eseguiti esperimenti di cinetica rapida [24]. In particolare, è stato utilizzato un test cinetico, discusso in precedenza [60, 61], che permette di discriminare l'adattamento indotto dalla selezione conforma-

zionale. In breve, si può dimostrare che l'esecuzione di esperimenti di pseudo-primo ordine rispetto ai due ligandi può distinguere tra i due modelli: solo l'adattamento indotto restituisce costanti di velocità identiche quando si confrontano le due condizioni del primo ordine [62]. I dati sperimentali ottenuti hanno rivelato la presenza di cinetiche complesse, che hanno consentito la descrizione di almeno due fasi cinetiche [24]. Inoltre, un confronto tra esperimenti condotti variando la concentrazione di NTAIL o XD rispettivamente ha permesso di dimostrare in modo inequivocabile che la reazione si verificava attraverso uno scenario di ripiegamento dopo il legame. In questo caso, il percorso di reazione dominante avviene attraverso l'accumulo di un intermedio parzialmente ripiegato seguito da un successivo evento di ripiegamento monomolecolare. Questi risultati hanno rappresentato il primo studio cinetico in cui è stato chiarito l'ordine degli eventi che si verificano nel ripiegamento indotto dal legame di un IDP. Questo comportamento è stato successivamente osservato in altre proteine [63], suggerendo che il ripiegamento dopo il legame rappresenta un meccanismo generale di riconoscimento negli IDP. Sottolineiamo, tuttavia, che sono necessari ulteriori studi per rafforzare ulteriormente questo modello.

Analisi dettagliata delle fasi di legame e ripiegamento di IDP

La migliore strategia per comprendere un meccanismo di reazione consiste nell'applicare le regole di base della chimica: i) identificare gli intermedi di reazione e gli stato di transizione tra di essi e ii) caratterizzare la loro struttura [22]. Come brevemente ricordato sopra, la fortuita complessità della cinetica di legame tra NTAIL e XD ci ha permesso di dimostrare il meccanismo di adattamento indotto e, quindi, di essere in grado di studiare individualmente i passaggi di legame e ripiegamento [24]. Di conseguenza, il passo successivo nell'analisi della reazione è stato affrontarla da una prospettiva strutturale.

Mutando sistematicamente le catene laterali in NTAIL mentre si monitora l'effetto della perturbazione sulle fasi di legame e di ripiegamento, è teoricamente possibile offrire una rappresentazione dell'intera reazione a una risoluzione quasi atomica [64]. Questo metodo, classicamente indicato come analisi del valore Φ , è stato precedentemente applicato a diversi sistemi di IDP [12,14,17,19,20,36,65–67]. C'è un particolare interesse tuttavia nell'interazione tra NTAIL e XD in quanto è

stato possibile per la prima volta studiare individualmente le fasi di legame e di ripiegamento [68].

Mappando l'effetto delle perturbazioni strutturali sulla struttura di NTAIL, è interessante notare come la formazione del complesso di incontro iniziale sia essenzialmente mediata da residui situati nella parte centrale dell'elica [68]. In effetti, si è riscontrato che l'interazione è stabilizzata prevalentemente dai residui idrofobici A494, L495 e L498, che sembrano ancorare NTAIL a XD nella sua conformazione non strutturata. Dopo il legame, la reazione di ripiegamento avviene in NTAIL, bloccando il complesso nella sua configurazione finale. Sorprendentemente, NTAIL si ripiega tramite uno stato di transizione che assomiglia a una versione distorta dello stato nativo (cioè allo stato legato), con un grado molto elevato di struttura simile a quella nativa. Mentre le caratteristiche generali di questa reazione richiamano ciò che si osserva tipicamente nelle proteine globulari [31,32,34,69], vale la pena notare che lo stato di transizione mostra un grado più elevato di struttura nativa.

CONCLUSIONI

Data la possibilità di analizzare individualmente le fasi di legame e di ripiegamento, la cinetica dell'interazione tra MeV NTAIL e XD è particolarmente informativa. Infatti, integrando un approccio cinetico con esperimenti di ingegneria proteica, è possibile ricapitolare alcune delle principali scoperte che sono state osservate fino ad oggi sui meccanismi di riconoscimento nei sistemi IDP. Saranno comunque necessari sforzi continui su altri sistemi proteici per colmare gli attuali divari di conoscenza tra il ripiegamento delle proteine globulari e di quelle disordinate e consentire di disegnare un modello generale che descriva il ripiegamento indotto dal legame, nonché chiarire in dettaglio il ruolo del disordine nella funzione fisiologica di questi sistemi strutturalmente eterogenei.

REFERENZE

- [1] A.K. Dunker, I. Silman, V.N. Uversky, J.L. Sussman, Function and structure of inherently disordered proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008) 756-764.
- [2] H.J. Dyson, P.E. Wright, Coupling of folding and binding-ordered proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002). 54-60.
- [3] P. Tompa, The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 579 (2005) 3346-3354.
- [4] P. Tompa, Unstructural biology coming of age, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21 (2011) 419-425.
- [5] V.N. Uversky, A.K. Dunker, Understanding protein non-folding, *Biochim. Biophys. Acta* 1804 (2010) 1231-1264.
- [6] P.E. Wright, H.J. Dyson, Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm, *J. Mol. Biol.* (1999) 293.
- [7] P. Tompa, M. Fuxreiter, Fuzzy complexes: polymorphismand structural disorderin protein-protein interactions, *Trends Biochem. Sci.* 33 (2008) 2-8.
- [8] M. Fuxreiter, Fuzzinessin protein interactions-Ahistorical perspective, *J. Mol. Biol.* 430 (2018) 2278-2287.
- [9] M. Fuxreiter, Fold or not to fold upon binding - does it really matter? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 54 (2018) 19-25.
- [10] J. Dogan, S. Gianni, P. Jemth, The binding mechanisms of intrinsically disordered proteins, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 6323-6331.
- [11] J. Dogan, P. Jemth, Only kinetics can prove conformational selection, *Biophys. J.* 107 (2014) 1997-1998.
- [12] J. Dogan, T. Schmidt, X. Mu, Å. Engström, P. Jemth, Fast association and slow transitions in the interaction between two intrinsically disordered protein domains, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 34316-34324.
- [13] S. Gianni, A. Morrone, R. Giri, M. Brunori, A folding-after-binding mechanism describes the recognition between the transactivation domain of c-Myb and the KIX domain of the CREB-binding protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428 (2012) 205-209.
- [14] R. Giri, A. Morrone, A. Toto, M. Brunori, S. Gianni, Structure of the transition state for the binding of c-Myb and KIX highlights an unexpected order for a disordered system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013) 14942-14947.
- [15] T. Kiefhaber, A. Bachmann, K.S. Jensen, Dynamics and mechanisms of coupled protein folding and binding reactions, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22 (2012) 21-29.
- [16] J.M. Rogers, V. Oleinikovas, S.L. Shammass, C.T. Wong, D. De Sancho, C.M. Baker, J. Clarke, Interplay between partner and ligand facilitates the folding and binding of an intrinsically disordered protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 1520-1525.
- [17] J.M. Rogers, C.T. Wong, J. Clarke, Coupled folding and binding of the disordered protein PUMA does not require particular residual structure, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2013) 5197-5200.
- [18] S.L. Shammass, T. A.J., J. Clarke, Allosterity within a transcription coactivator is predominantly mediated through dissociation rate constants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (2014) 12055-12060.
- [19] A. Toto, C. Camilloni, R. Giri, M. Brunori, M. Vendruscolo, S. Gianni, Molecular recognition by templated folding of an intrinsically disordered protein, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21994-22000.
- [20] A. Toto, S. Gianni, Mutational analysis of the binding-induced folding reaction of the mixed-lineage leukemia protein to the KIX domain, *Biochemistry* 55 (2016) 3957-3962.
- [21] P. Jemth, E. Karlsson, B. Vögeli, B. Guzovsky, E. Andersson, G. Hultqvist, J. Dogan, P. Güntert, R. Riek, C.N. Chi, Structure and dynamics conspire in the evolution of a nity between intrinsically disordered proteins, *Sci. Adv.* 4 (2018) 4130.

- [22] A.R. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman, New York, 1999.
- [23] S. Gianni, J. Dogan, P. Jemth, Coupled binding and folding of intrinsically disordered proteins: what can we learn from kinetics? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 36 (2016) 18-24.
- [24] M. Dosnon, D. Bonetti, A. Morrone, J. Erales, E. di Silvio, S. Longhi, S. Gianni, Demonstration of a folding after binding mechanism in the recognition between the measles virus NTAIL and X domains, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 795-802.
- [25] R. Narayanan, O.K. Ganesh, A.S. Edison, S.J. Hagen, Kinetics of folding and binding of an intrinsically disordered protein: the inhibitor of yeast aspartic proteinase YPrA, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 11477-11485.
- [26] B.A. Shoemaker, J.J. Portman, P.G. Wolynes, Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the y-casting mechanism, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97 (2000) 8868-8873.
- [27] K. Umezawa, J. Ohnuki, J. Higo, M. Takano, Intrinsic disorder accelerates dissociation rather than association, *Proteins* 84 (2016) 1124-1133.
- [28] D. De Sancho, R.B. Best, Modulation of an IDP binding mechanism and rates by helix propensity and non-native interactions: association of HIF1 with CBP, *Mol. Biosyst.* 8 (2012) 256-267.
- [29] Y. Huang, Z. Liu, Kinetic advantage of intrinsically disordered proteins in coupled folding-binding process: a critical assessment of the "y-casting" mechanism, *J. Mol. Biol.* 393 (2009) 1143-1159.
- [30] S.L. Shammass, M.D. Crabtree, L. Dahal, B.I. Wicky, J. Clarke, Insights into coupled folding and binding mechanisms from kinetic studies, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 6689-6695.
- [31] A.R. Fersht, From the first protein structures to our current knowledge of protein folding: delights and scepticisms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 650-654.
- [32] V. Daggett, A.R. Fersht, Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 18-25.
- [33] S. Gianni, P. Jemth, Protein folding: vexing debates on a fundamental problem, *Biophys. Chem.* 212 (2016) 17-21.
- [34] L.S. Itzhaki, D.E. Otzen, A.R. Fersht, The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding, *J. Mol. Biol.* 254 (1995) 260-288.
- [35] S. Gianni, P. Jemth, Conserved nucleation sites reinforce the significance of Phi value analysis in protein-folding studies, *IUBMB Life* 66 (2014) 449-452.
- [36] E. Karlsson, E. Andersson, J. Dogan, S. Gianni, P. Jemth, C. Camilloni, A structurally heterogeneous transition state underlies coupled binding and folding of disordered proteins, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 1230-1239.
- [37] D. Bonetti, F. Troilo, M. Brunori, S. Longhi, S. Gianni, How robust is the mechanism of folding-upon-binding for an intrinsically disordered protein? *Biophys. J.* 114 (2018) 1889-1894.
- [38] D. Karlin, S. Longhi, B. Canard, Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association, *Virology* 302 (2002) 420-432.
- [39] I. Gutsche, A. Desfosses, G. E. Antin, W.L. Ling, M. Haupt, R.W. Ruigrok, C. Sachse, G. Schoehn, Structural virology. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid, *Science* 348 (2015) 704-707.
- [40] A. Desfosses, S. Milles, M.R. Jensen, S. Guseva, J.P. Colletier, D. Maurin, G. Schoehn, I. Gutsche, R.W.H. Ruigrok, M. Blackledge, Assembly and cryo-EM structures of RNA-specific measles virus nucleocapsids provide mechanistic insight into paramyxoviral replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2019) Feb 20. pii: 201816417.
- [41] S. Longhi, V. Receveur-Bréchet, D. Karlin, K. Johansson, H. Darbon, D. Bhella, R. Yeo, S. Finet, B. Canard, The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 18638-18648.
- [42] D. Karlin, F. Ferron, B. Canard, S. Longhi, Structural disorder and modular organization in Paramyxovirinae N and P, *J. Gen. Virol.* 84 (2003) 3239-3252.
- [43] D. Blocquel, J. Habchi, E. Durand, M. Sevajol, F. Ferron, J. Erales, N. Papageorgiou, S. Longhi, Coiled-coil deformations in crystal structures: the measles virus phosphoprotein multimerization domain as an illustrative example, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70 (2014) 1589-1603.
- [44] G. Communie, T. Crépin, D. Maurin, M.R. Jensen, M. Blackledge, R.W. Ruigrok, Structure of the tetramerization domain of measles virus phosphoprotein, *J. Virol.* 87 (2013) 7166-7169.
- [45] J. Bourhis, K. Johansson, V. Receveur-Bréchet, C.J. Oldfield, A.K. Dunker, B. Canard, S. Longhi, The C-terminal domain of measles virus nucleoprotein belongs to the class of intrinsically disordered proteins that fold upon binding to their physiological partner, *Virus Res.* 99 (2004) 157-167.
- [46] S. Gely, D.F. Lowry, C. Bernard, M.R. Jensen, M. Blackledge, S. Costanzo, J.M. Bourhis, H. Darbon, G. Daughdrill, S. Longhi, Solution structure of the C-terminal X domain of the measles virus phosphoprotein and interaction with the intrinsically disordered C-terminal domain of the nucleoprotein, *J. Mol. Recognit.* 23 (2010) 435-447.
- [47] K. Johansson, J.-M. Bourhis, V. Campanacci, C. Cambillau, B. Canard, S. Longhi, Crystal structure of the measles virus phosphoprotein domain responsible for the induced folding of the C-terminal domain of the nucleoprotein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 44567-44572.
- [48] A. D'Urzo, A. Konijnenberg, G. Rossetti, J. Habchi, J. Li, P. Carloni, F. Sobott, S. Longhi, R. Grandori, Molecular basis for structural heterogeneity of an intrinsically disordered protein bound to a partner by combined ESI-IM-MS and modeling, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (2015) 472-481.
- [49] D. Bonetti, C. Camilloni, L. Visconti, S. Longhi, M. Brunori, M. Vendruscolo, S. Gianni, Identification and structural characterization of an intermediate in the folding of the measles virus X domain, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 10886-10892.
- [50] R.L. Kingston, D.J. Hamel, L.S. Gay, F.W. Dahlquist, B.W. Matthews, Structural basis for the attachment of a paramyxoviral polymerase to its template, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 8301-8306.
- [51] M. Fuxreiter, I. Simon, P. Friedrich, P. Tompa, Prefolded structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins, *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 1015-1028.

- [52] L.M. Bloyet, J. Brunel, M. Dosnon, V. Hamon, J. Eroles, A. Gruet, C. Lazert, C. Bignon, P. Roche, S. Longhi, D. Gerlier, Modulation of Re-initiation of measles virus transcription at intergenic regions by PXD to NTAIL binding strength, *PLoS Pathog.* 12 (2016) e1006058.
- [53] A. Gruet, M. Dosnon, D. Blocquel, J. Brunel, D. Gerlier, R.K. Das, D. Bonetti, S. Gianni, M. Fuxreiter, S. Longhi, C. Bignon, Fuzzy regions in an intrinsically disordered protein impair protein-protein interactions, *FEBS J.* 283 (2016) 576-594.
- [54] S.A. Krumm, M. Takeda, R.K. Plemper, The measles virus nucleocapsid protein tail domain is dispensable for viral polymerase recruitment and activity, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 29943-29953.
- [55] A. Gruet, M. Dosnon, A. Vassena, V. Lombard, D. Gerlier, C. Bignon, S. Longhi, Dissecting partner recognition by an intrinsically disordered protein using descriptive random mutagenesis, *J. Mol. Biol.* 425 (2013) 3495-34509.
- [56] V. Belle, S. Rouger, S. Costanzo, E. Liquière, J. Strancar, B. Guigliarelli, A. Fournel, S. Longhi, Mapping alpha-helical induced folding within the intrinsically disordered C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein by site-directed spin-labeling EPR spectroscopy, *Proteins* 73 (2008) 973-988.
- [57] M.R. Jensen, G. Communie, E.A.J. Ribeiro, N. Martinez, A. Desfosses, L. Salmon, L. Mollica, F. Gabel, M. Jamin, S. Longhi, R.W. Ruigrok, M. Blackledge, Intrinsic disorder in measles virus nucleocapsids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2011) 9839-9844.
- [58] L. Baronti, J. Eroles, J. Habchi, I.C. Felli, R. Pierattelli, S. Longhi, Dynamics of the intrinsically disordered C-terminal domain of the nipah virus nucleoprotein and interaction with the x domain of the phosphoprotein as unveiled by NMR spectroscopy, *Chembiochem* 16 (2015) 268-276.
- [59] Y. Wang, X. Chu, S. Longhi, P. Roche, W. Han, E. Wang, J. Wang, Multiscaled exploration of coupled folding and binding of an intrinsically disordered molecular recognition element in measles virus nucleoprotein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013) e3743-e3752.
- [60] S. Gianni, J. Dogan, P. Jemth, Distinguishing induced t from conformational selection, *Biophys. Chem.* 189 (2014) 33-39.
- [61] S. Gianni, T. Walma, A. Arcovito, N. Calosci, A. Bellelli, A. Engstrom, C. Travaglini-Allocatelli, M. Brunori, P. Jemth, G.W. Vuister, Demonstration of long-range interactions in a PDZ domain by NMR, kinetics, and protein engineering, *Structure* 14 (2006) 1801-1809.
- [62] S.T. Olson, K.R. Srinivasan, I. Bjork, J.D. Shore, Binding of high affinity heparin to antithrombin III. Stopped flow kinetic studies of the binding interaction, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 11073-11079.
- [63] A. Toto, D. Bonetti, A. De Simone, S. Gianni, Understanding the mechanism of binding between Gab2 and the C terminal SH3 domain from Grb2, *Oncotarget* 8 (2017) 82344-82351.
- [64] A.R. Fersht, A. Matouschek, L. Serrano, The folding of an enzyme. I. Theory of protein engineering analysis of stability and pathway of protein folding, *J. Mol. Biol.* 224 (1992) 771-782.
- [65] P. Jemth, X. Mu, Å. Engström, J. Dogan, A frustrated binding interface for intrinsically disordered proteins, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 5528-5533.
- [66] A. Toto, R. Giri, M. Brunori, S. Gianni, 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 Sci.* 23 (2014) 962-969.
- [67] J. Dogan, A. Toto, E. Andersson, S. Gianni, P. Jemth, Activation barrier-limited folding and conformational sampling of a dynamic protein domain, *Biochemistry* 55 (2016) 5289-5295.
- [68] D. Bonetti, F. Troilo, A. Toto, M. Brunori, S. Longhi, S. Gianni, Analyzing the folding and binding steps of an intrinsically disordered protein by protein engineering,
- [69] A.R. Fersht, Relationship of Le_{er} (Bronsted) alpha values and protein folding Phi values to position of transition-state structures on reaction coordinates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 14338-14342.

