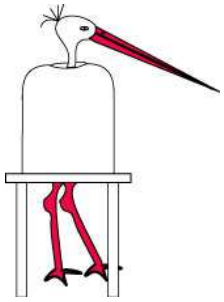
- Bruno Kieffer
  - Etudes de Chimie-Biochimie-biophysique à Strasbourg
  - Thèse avec JF Lefèvre 1992: étude de la dynamique des protéines par RMN
  - Stage Post-doctoral chez ID Campbell (Oxford)
  - Maître de conférence à l'Ecole de Biotechnologie de Strasbourg
  - Professeur de biophysique à l'ESBS



Etat des lieux et développements en RMN



Bruno Kieffer (kieffer@igbmc.fr)
Groupe de RMN biologique
ESBS-IGBMC
Illkirch

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

igbmc
institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire

esbs
école supérieure de biotechnologie
STRASBOURG

La RMN en biologie: 30 ans d'évolutions méthodologiques

K Wüthrich
Protein. Solution Str.

^{15}N-^{13}C labelling
Methods (Ad Bax)
3D triple reso. Spec.

TROSY
(A. Pervushin)

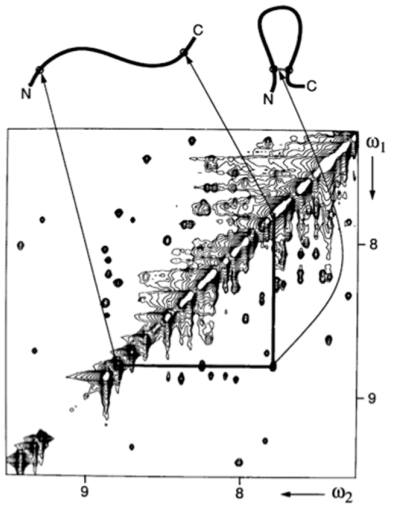
Relaxation
Dispersion (A. Palmer)

Longitudinal Relax.
Optimized spectr.
SOFAST (P. Schanda)

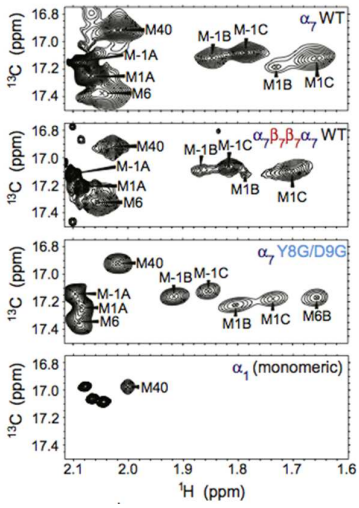
1980	1990	2000	2010
500 MHz	800 MHz	900 MHz	1 GHz

Methyl labelling
(L. Kay)

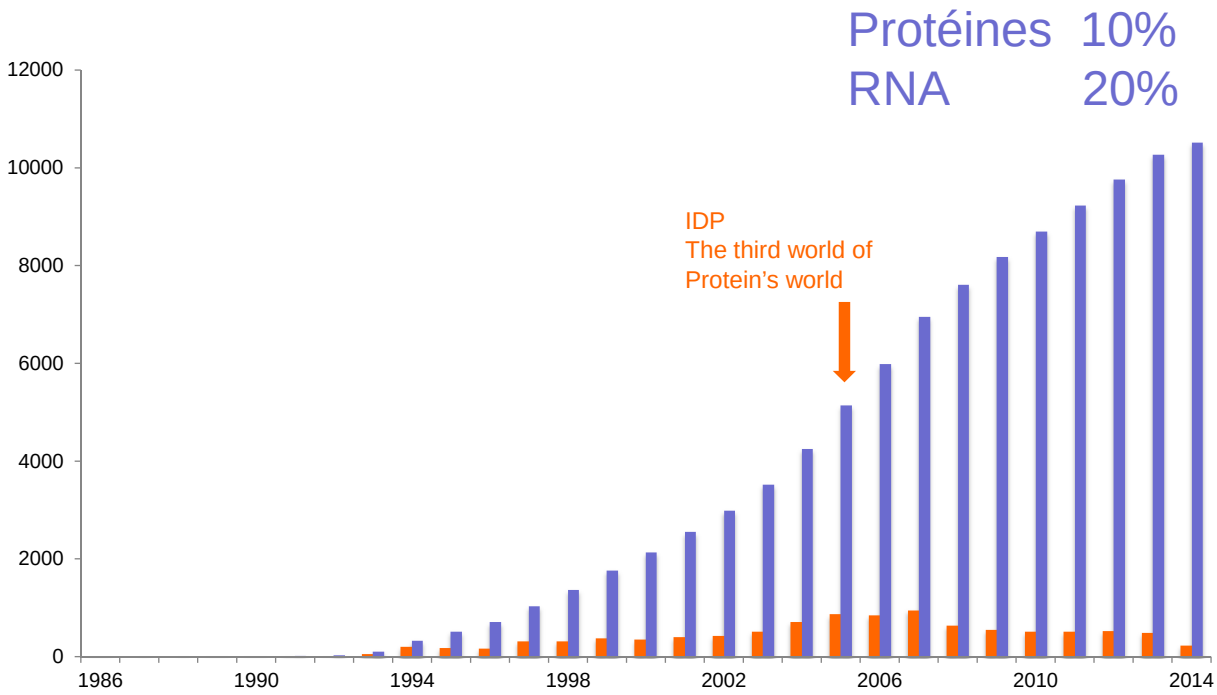
RDC
(J Prestegard,
N. Tjandra)



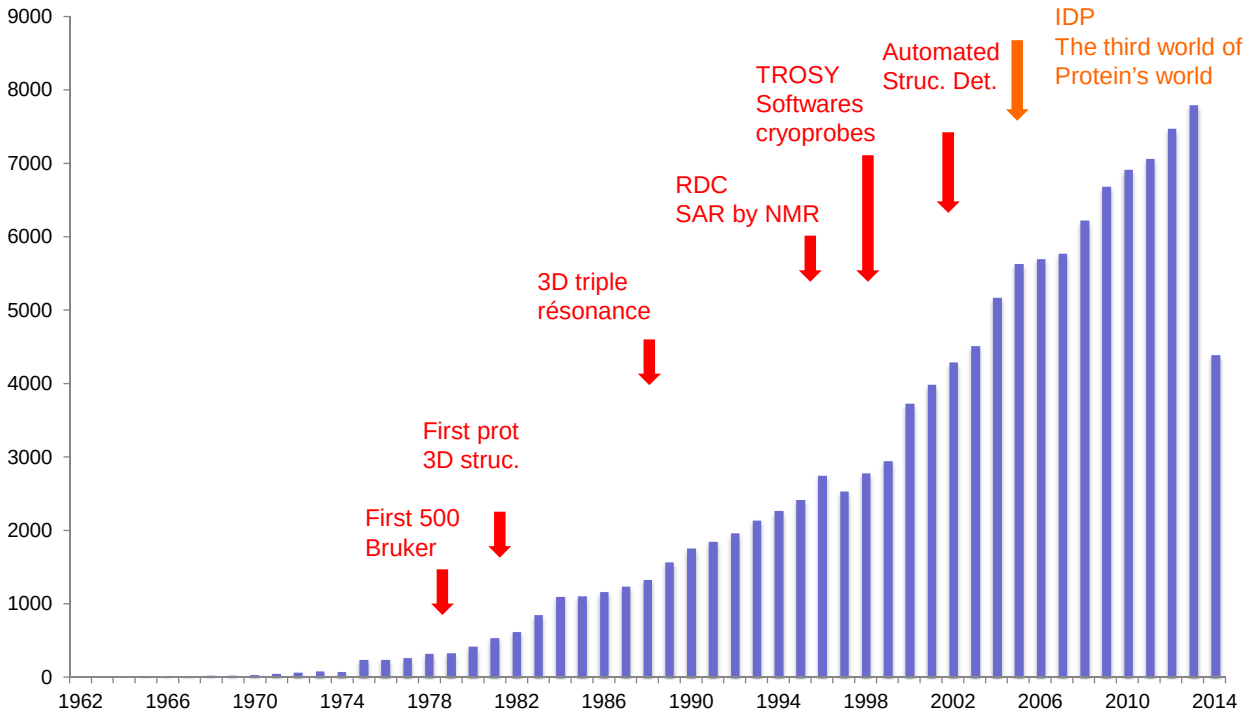




Structures déterminées par RMN dans la PDB



Evolution du nombre d'articles comportant le mot NMR dans le titre/résumé des articles répertoriés dans PUBMED



ReNaFobis 2014

BIOCHEMISTRY
including biophysical chemistry & molecular biology

Current Topic

pubs.acs.org/biochemistry

Jan 2013

The Quiet Renaissance of Protein Nuclear Magnetic Resonance

Paul J. Barrett,[†] Jiang Chen,[†] Min-Kyu Cho,[†] Ji-Hun Kim,[†] Zhenwei Lu,[†] Sijo Mathew,[†] Dungeng Peng,[†] Yuanli Song,[†] Wade D. Van Horn,[†,§] Tiandi Zhuang,[‡] Frank D. Sönnichsen,[∥] and Charles R. Sanders*[,†]

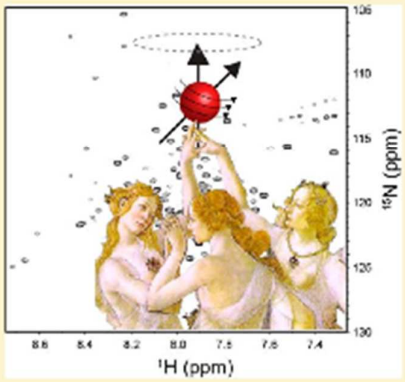
[†]Department of Biochemistry and Center for Structural Biology, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee 37232-8725, United States

[‡]Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia, Charlottesville, Virginia 22908, United States

[§]Department of Chemistry and Biochemistry, Arizona State University, Tempe, Arizona 85287-1604, United States

[∥]Institute for Organic Chemistry, Christian-Albrechts University of Kiel, D-24118 Kiel, Germany

ABSTRACT: From roughly 1985 through the start of the new millennium, the cutting edge of solution protein nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was to a significant extent driven by the aspiration to determine structures. Here we survey recent advances in protein NMR that herald a renaissance in which a number of its most important applications reflect the broad problem-solving capability displayed by this method during its classical era during the 1970s and early 1980s.



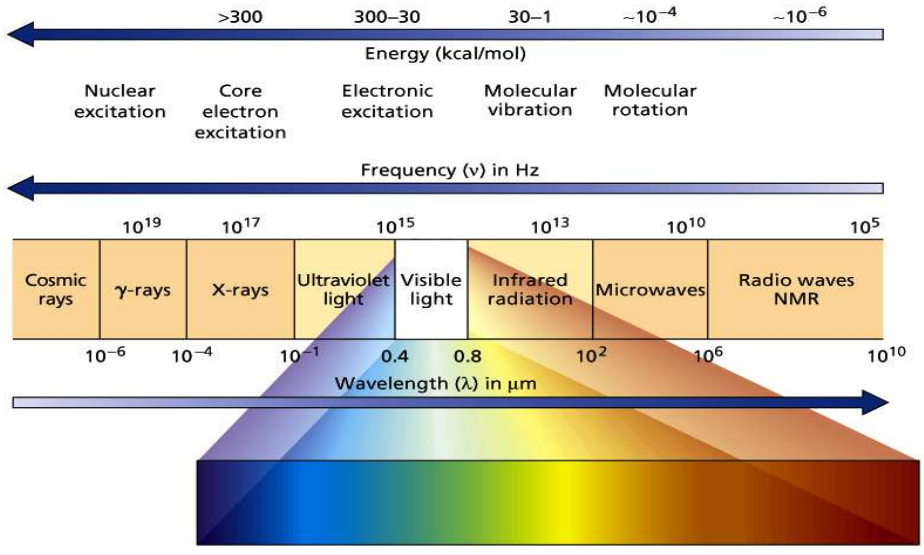
2005-2014
RMN: un outil au service de la biologie structurale intégrative

- Etude des protéines intrinsèquement désordonnées
- Etude des mécanismes de reconnaissance moléculaires
- Etude des états excités des protéines et acides nucléiques
- Etude de la dynamique de très grands complexes
- Contexte cellulaire

Quelques concepts de base pour comprendre les évolutions technologiques

- La RMN est une spectroscopie de très (vraiment trés) faible énergie

Energie thermique
0,5 kcal/mol



$$E = \hbar \gamma B_0$$

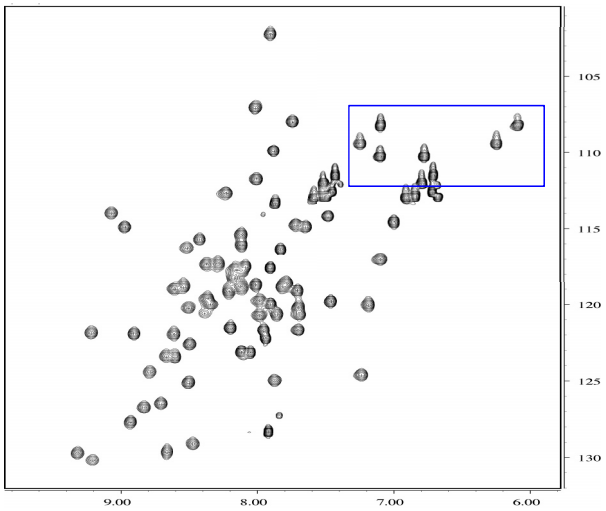
$$\nu = 2\pi^{-1}\gamma B_0$$

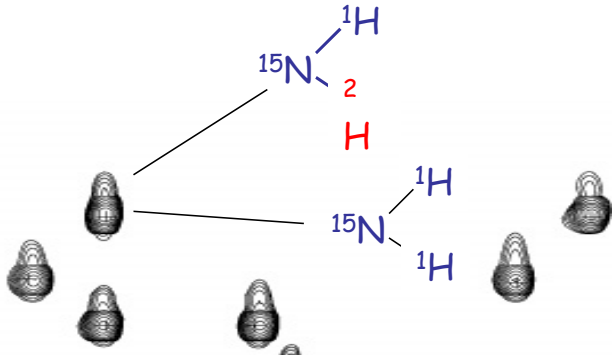
$$\lambda = \frac{2\pi c}{\gamma B_0}$$

Faible énergie: un avantage…

- Une extrème sensibilité de la fréquence de résonnance à l'environnement

Le spectre HSQC ^{1}H-^{15}N





Effet isotopique du deutérium

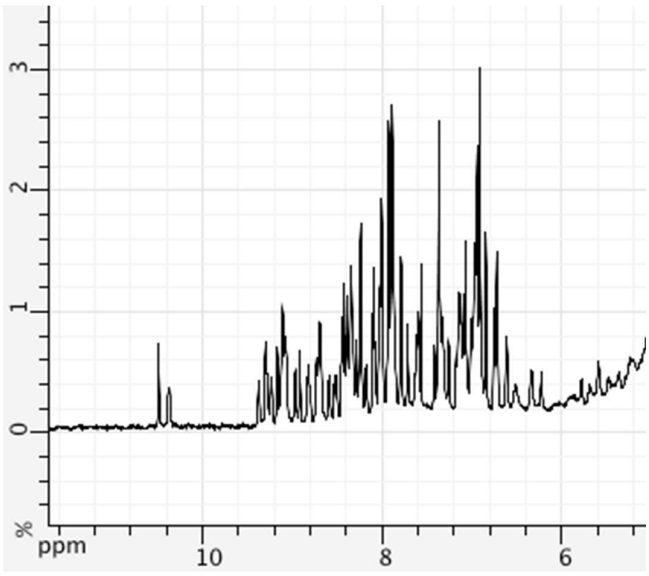
Faible énergie: un inconvénient…

- Une faible sensibilité de détection du signal:

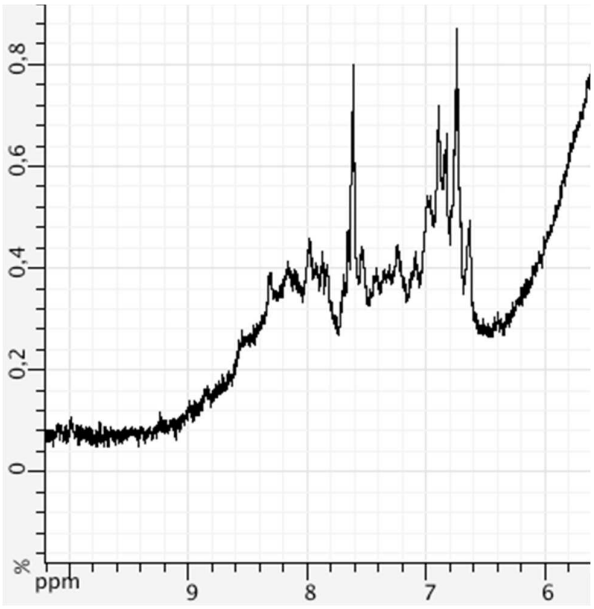
- La statistique de Boltzman permet de calculer la valeur de l'aimantation à l'équilibre :

$$\frac{P_\beta}{P_\alpha} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} = e^{\frac{-\gamma\hbar B_0}{kT}} \approx 1 - \underbrace{\frac{\gamma\hbar B_0}{kT}}_{10^{-4}}$$

Résolution et encombrement spectral



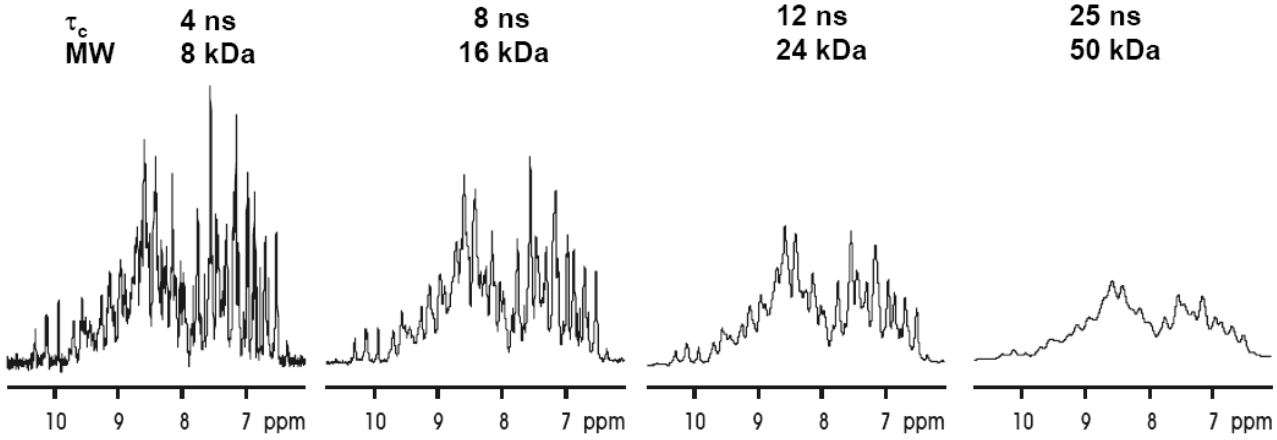
GB1 (~6 kDa)



Dimère LBD RXR
(~50 kDa)

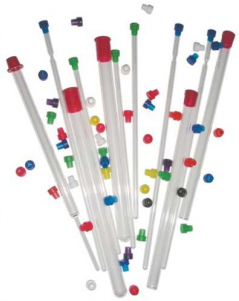
Temps de vie du signal (vitesse de relaxation transverse)

linewidth $\Delta\nu_{1/2} = 1/\pi T_2$



Les points d'innovations technologiques





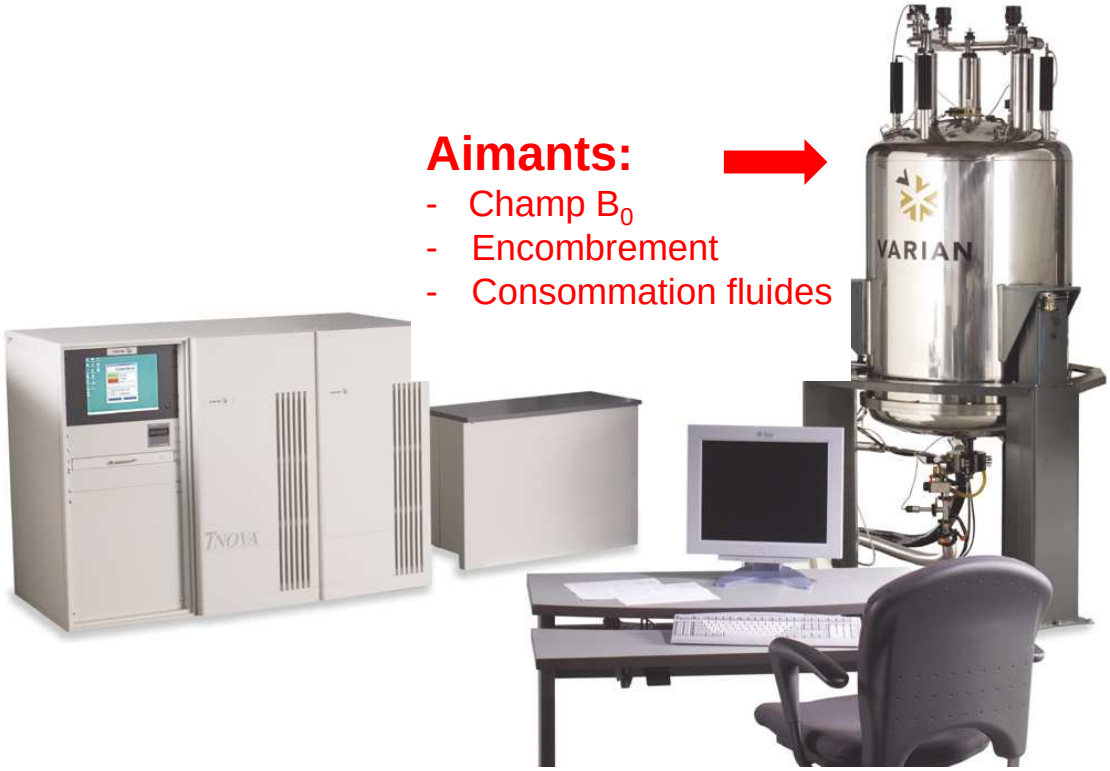
Echantillon :

- Petits volumes
- Marquages isotopiques

Les points d'innovations technologiques

Aimants:

- Champ B_0
- Encombrement
- Consommation fluides



Les points d'innovations technologiques

Sondes :

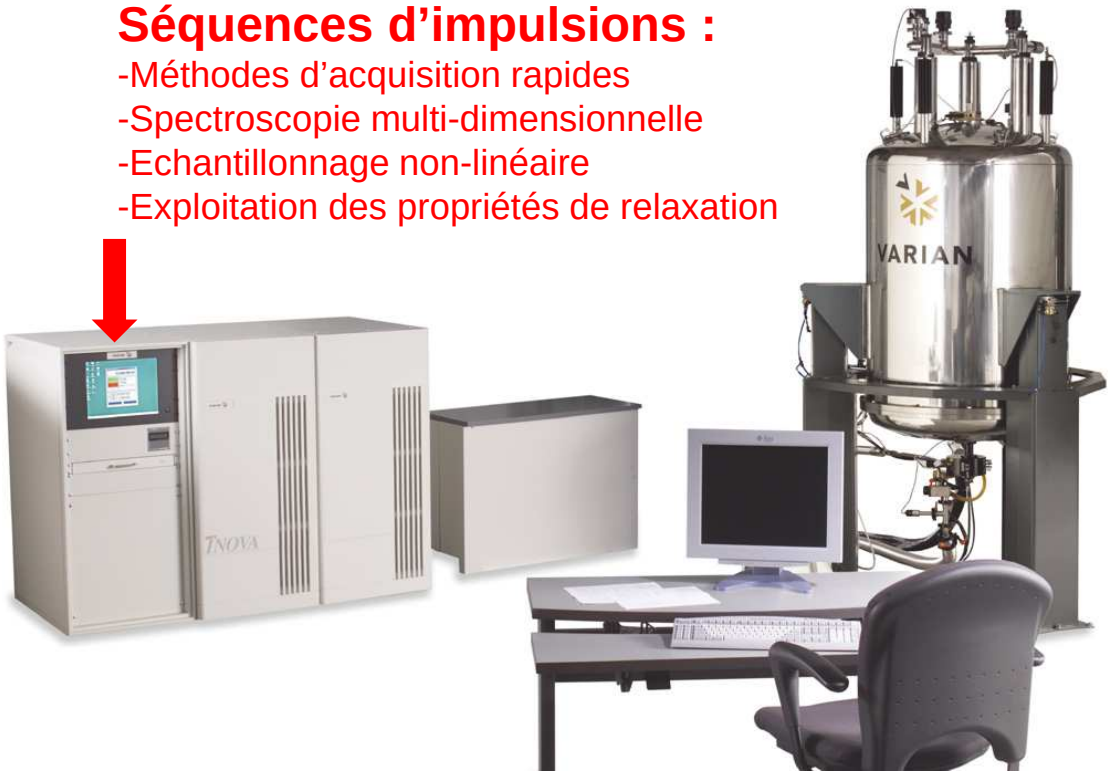
- Cryosondes
- Sondes petits volumes
- Sondes multi-noyaux



Les points d'innovations technologiques

Séquences d'impulsions :

-Méthodes d'acquisition rapides
-Spectroscopie multi-dimensionnelle
-Echantillonnage non-linéaire
-Exploitation des propriétés de relaxation



Les points d'innovations technologiques

Traitement numérique :

-Filtrage

-Gestion et intégration des données

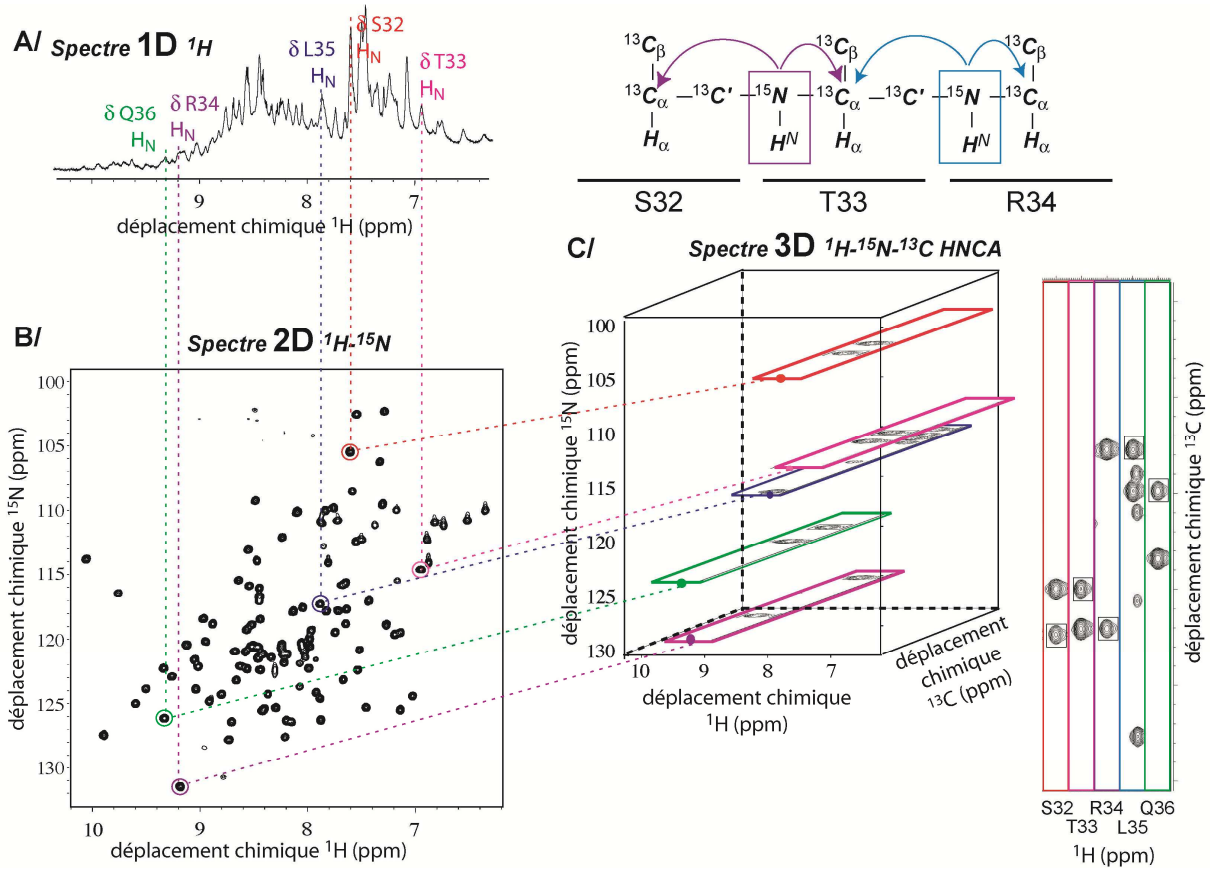
-Logiciels de calcul de structure



Préparation de l'échantillon

- Deux objectifs:
  - Simplification des spectres (réduction du nombre de fréquences dans le spectre)
  - Réduire les sources de relaxation (Deutération partielle)
- Elargir le nombre d'observables

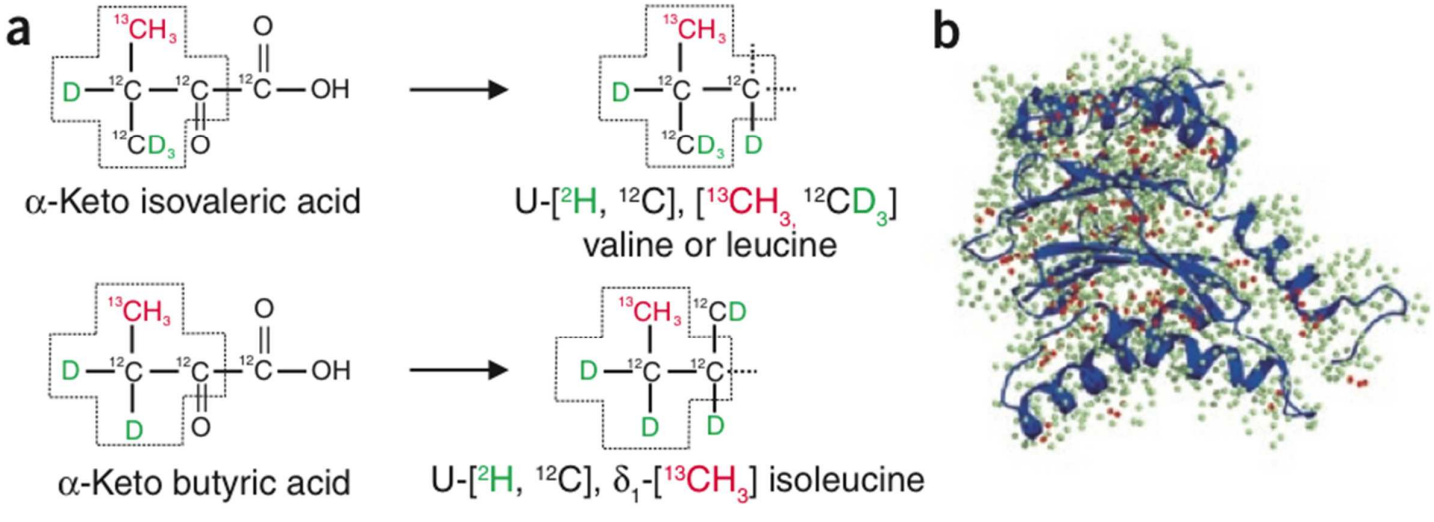
Méthode standard: marquage ^{15}N-^{13}C associé à la spectroscopie 3D triple résonance



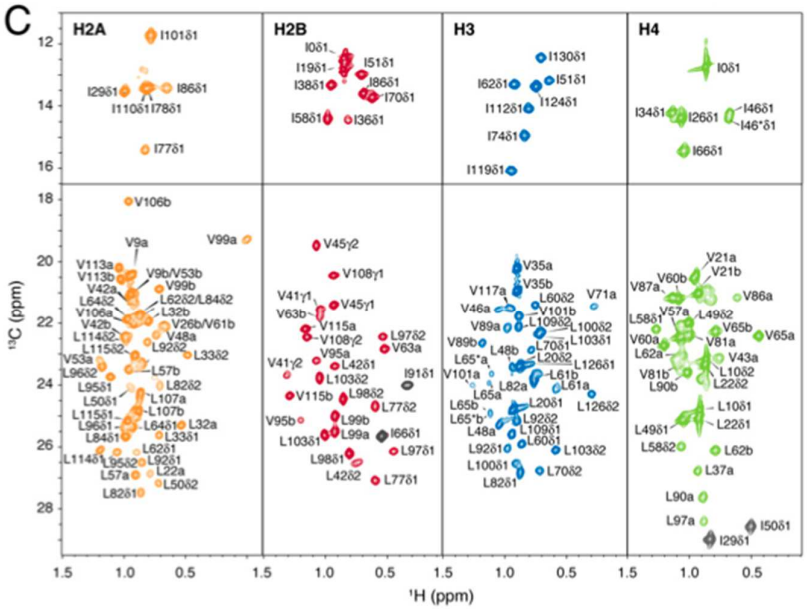
Solution NMR of supramolecular complexes: providing new insights into function

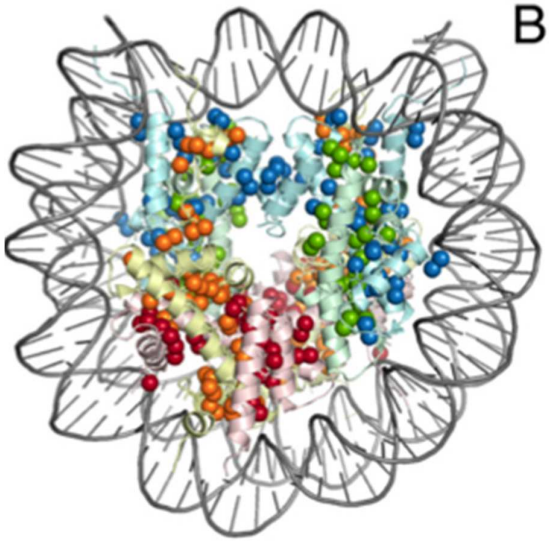
Remco Sprangers, Algirdas Velyvis & Lewis E Kay

Nature Methods 2007



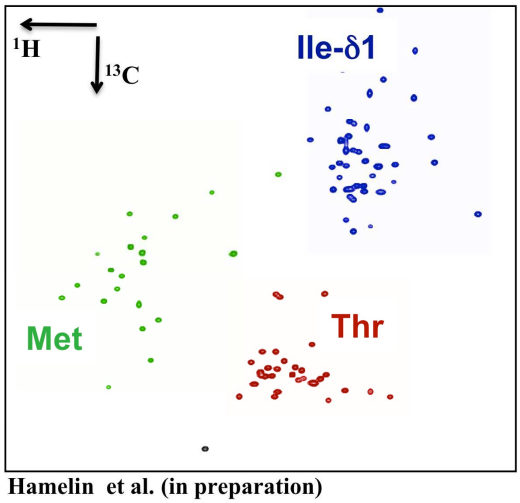
Exploring molecular mechanisms within the chromatin using NMR



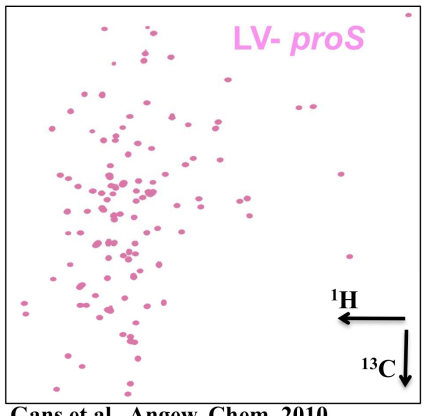


From Kato et al PNAS 2011

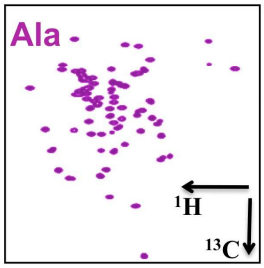
Methodologies developed at Grenoble (J Boisbouvier)



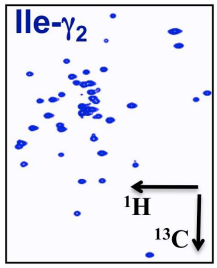
Hamelin et al. (in preparation)



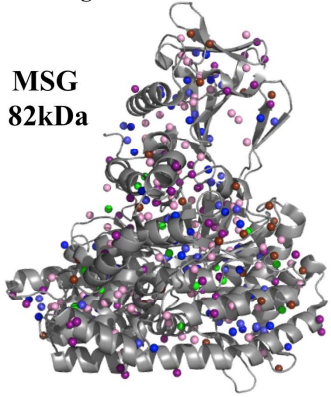
Gans et al. Angew. Chem. 2010



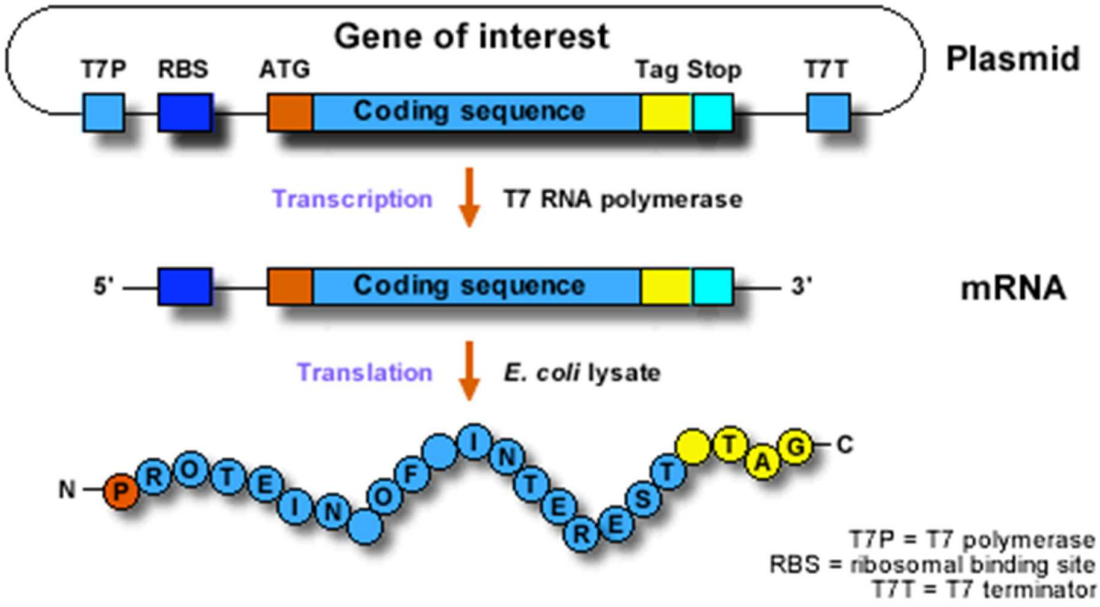
Ayala, J. Bio. NMR 2009



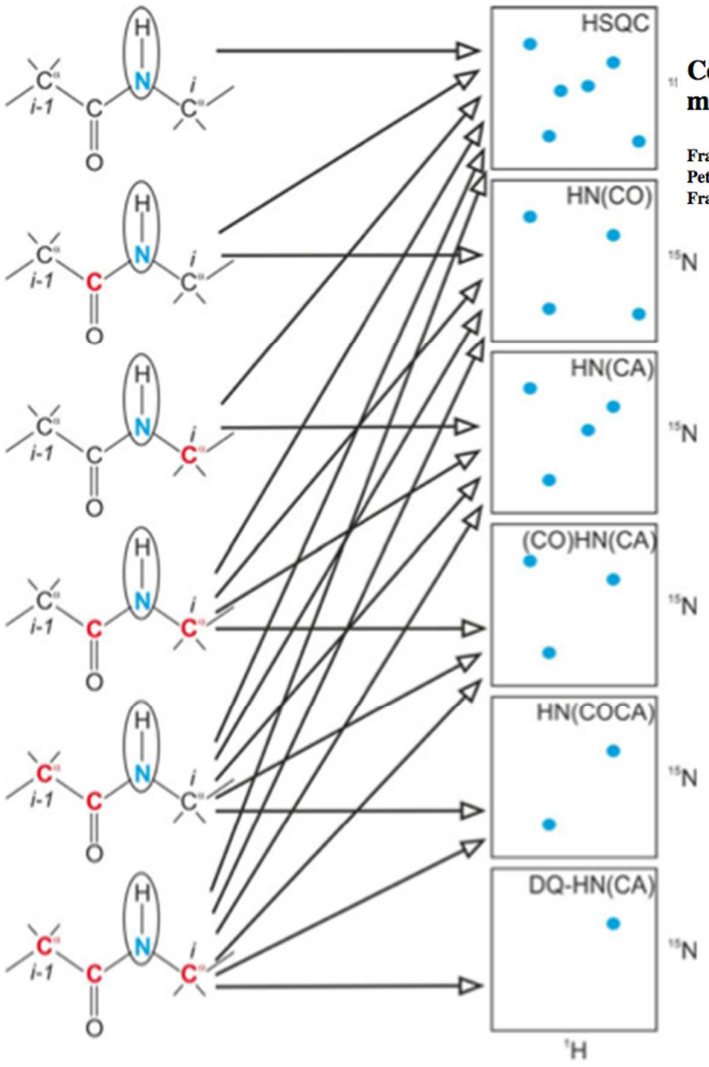
Ayala, Chem Comm 2012.



Cell free expression
et marquage isotopique combinatoire



ReNaFobis 2014



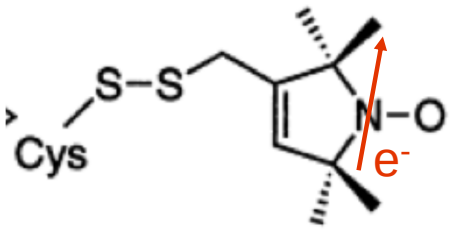
Combinatorial triple-selective labeling as a tool to assist membrane protein backbone resonance assignment

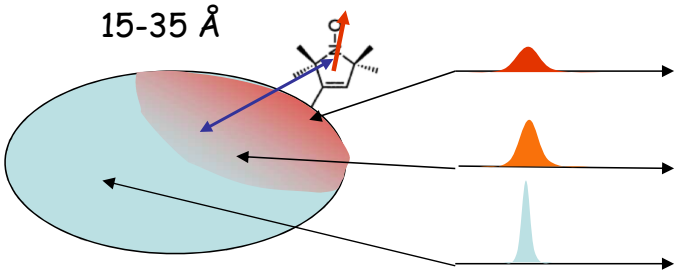
Frank Löhr · Sina Reckel · Mikhail Karbyshev · Peter J. Connolly · Norzehan Abdul-Manan · Frank Bernhard · Jonathan M. Moore · Volker Dötsch

J Biomol NMR (2012)

Amino acid type	Samples		
	1	2	3
Leucine	^{13}C/^{15}N	1-^{13}C	1-^{13}C
Valine	1-^{13}C	^{13}C/^{15}N	
Isoleucine			^{13}C/^{15}N
Methionine	^{15}N		
Lysine		^{15}N	
Phenylalanine			^{15}N
Arginine	^{15}N	^{15}N	
Tyrosine	^{15}N	1-^{13}C	^{15}N
Alanine		^{15}N	^{15}N
Threonine	^{15}N	^{15}N	^{15}N
Glycine	1-^{13}C		
Aspartate			1-^{13}C

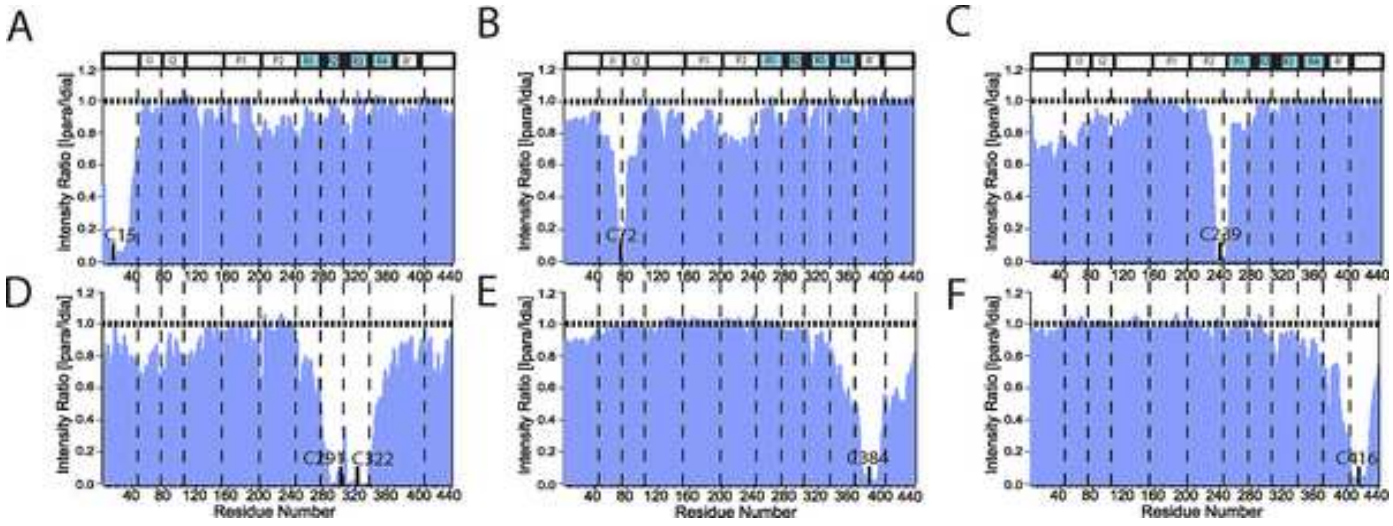
Autres sondes: spin label





- Le spin électronique produit une relaxation efficace des spins nucléaires situés à proximité
- Permet d'accéder à des données de structurales
- Permet d'obtenir des informations sur la dynamique

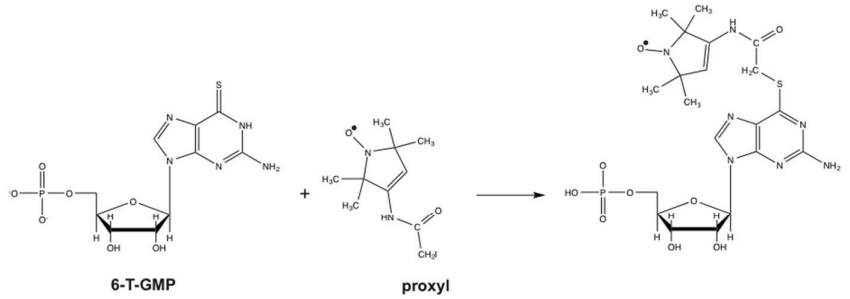
Application à l'étude de protéines désordonnées (Tau)



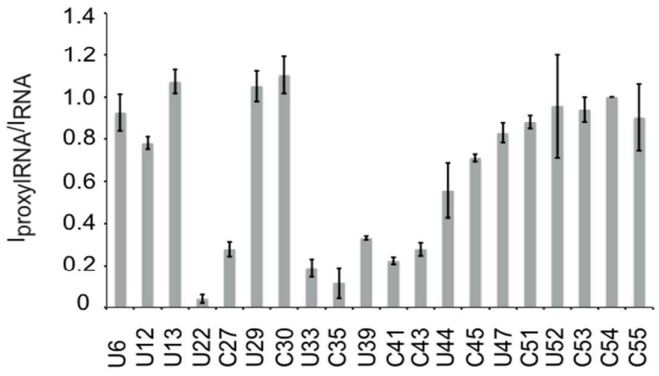
Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, et al. (2009) Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution. PLoS Biol 7(2): e1000034. doi:10.1371/journal.pbio.1000034
http://www.plosbiology.org/article/info:doi/10.1371/journal.pbio.1000034

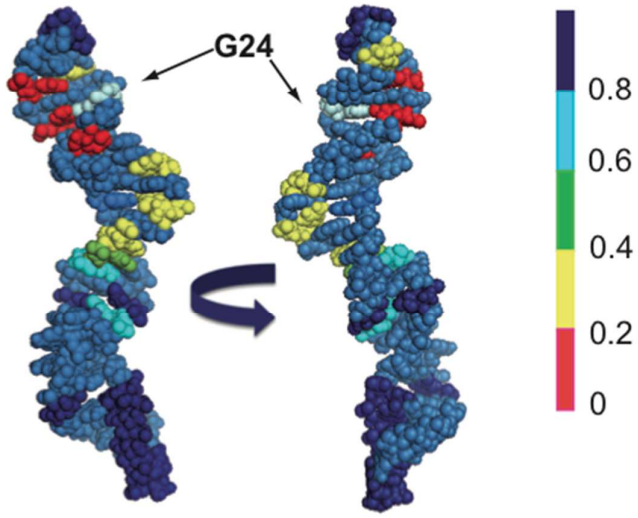
PLOS | BIOLOGY

Marquage de spin sur l'ARN



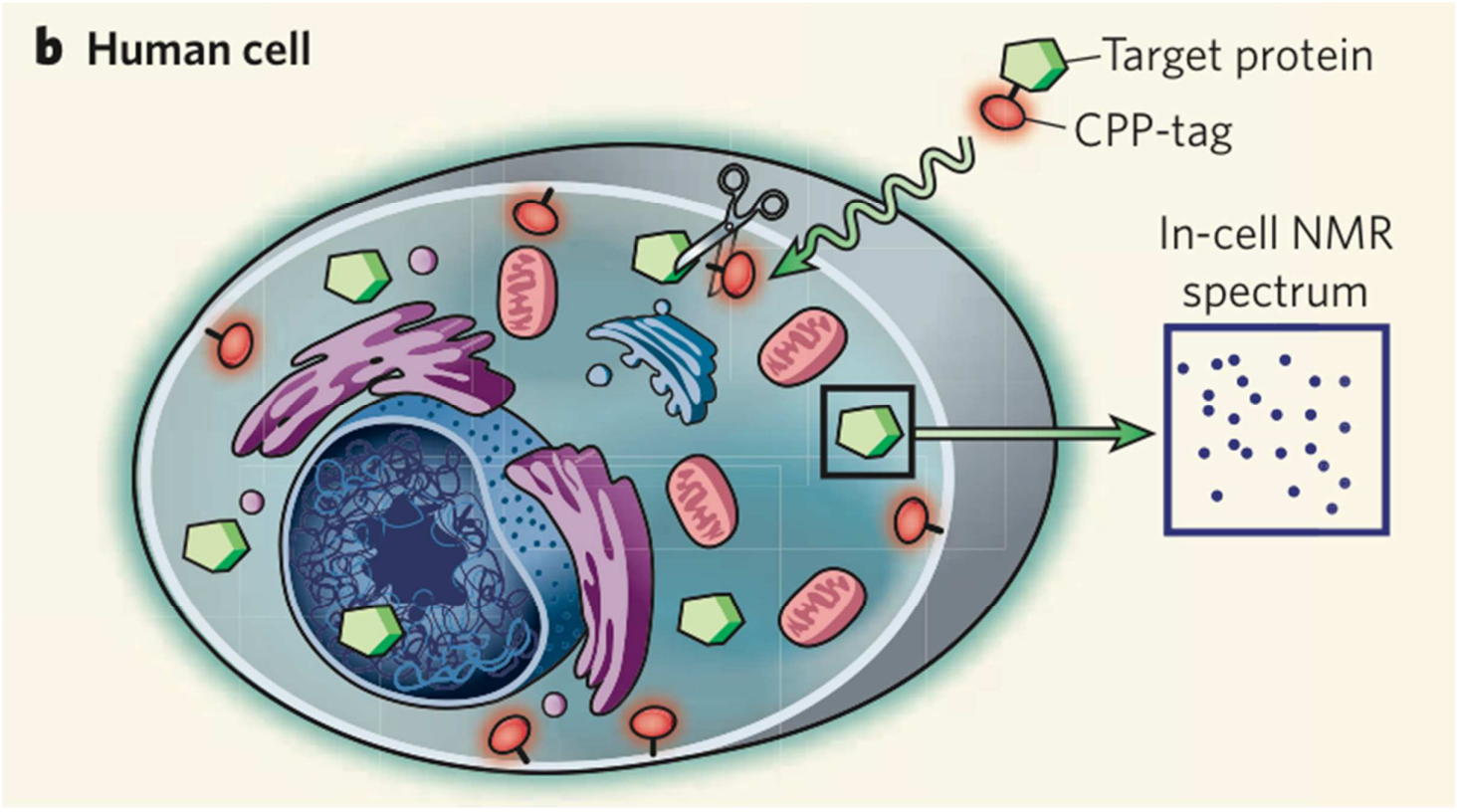
I. Lebars et al submitted





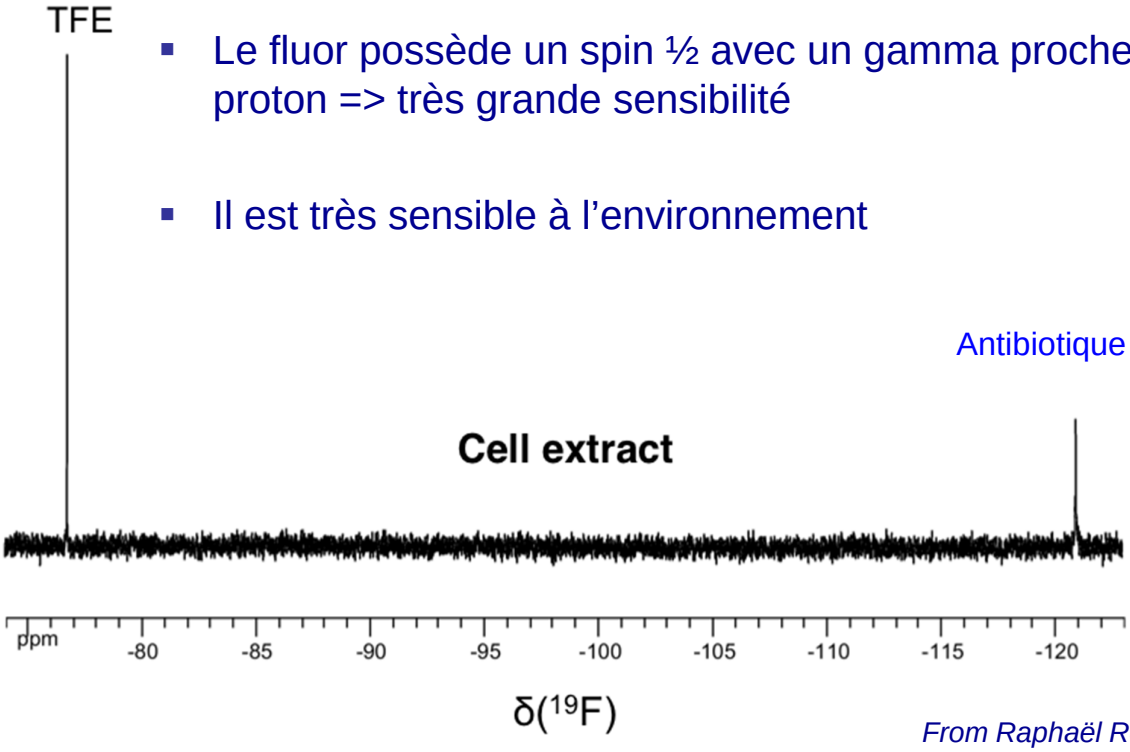
ReNaFobis 2014

In-cell NMR



Utilisation du noyau Fluor

- Le fluor possède un spin ½ avec un gamma proche de celui du proton => très grande sensibilité
- Il est très sensible à l'environnement



Antibiotique fluoré

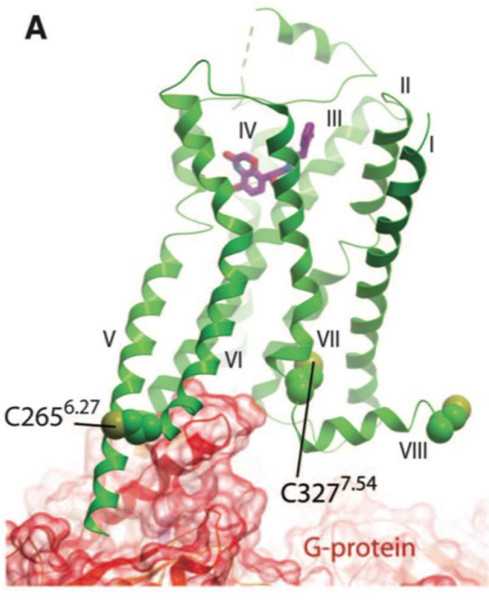
From Raphaël Recht

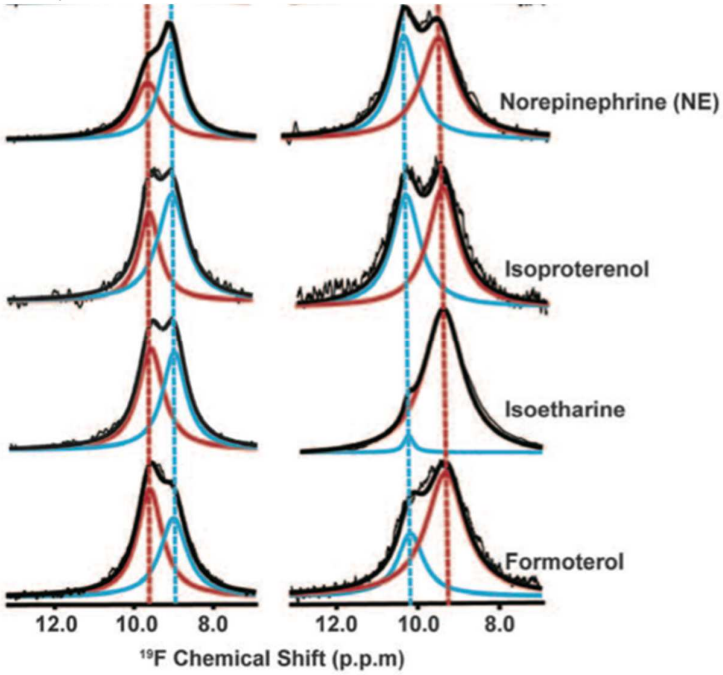
Utilisation du noyau Fluor

Biased Signaling Pathways in β_2-Adrenergic Receptor Characterized by ^{19}F-NMR

Science 2012

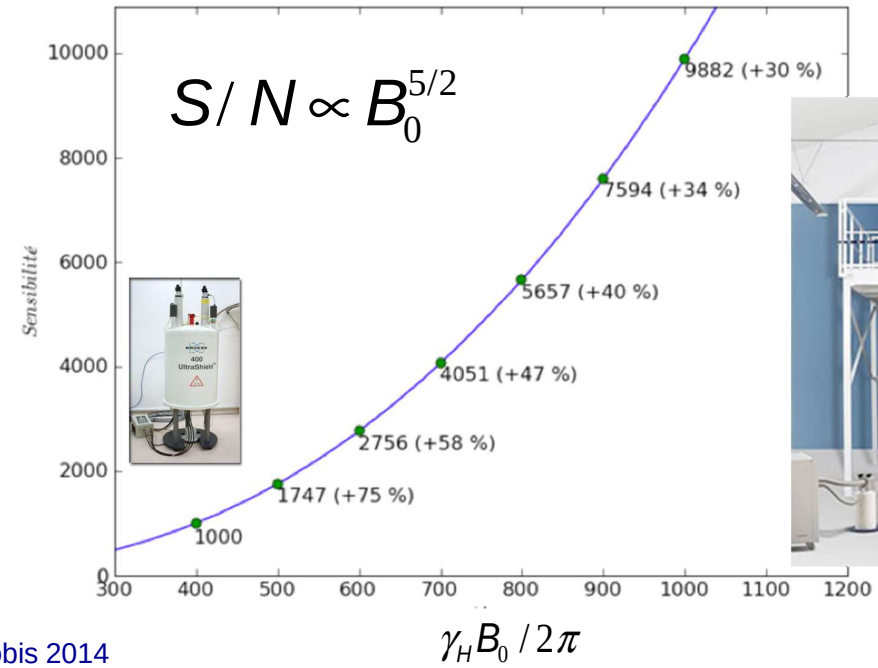
Jeffrey J. Liu,[1*] Reto Horst,[1*] Vsevolod Katritch,[1] Raymond C. Stevens,[1†] Kurt Wüthrich[1,2†]





1. Progrès liés à l'instrumentation

- Le rapport Signal/Bruit dépend du champ magnétique appliqué



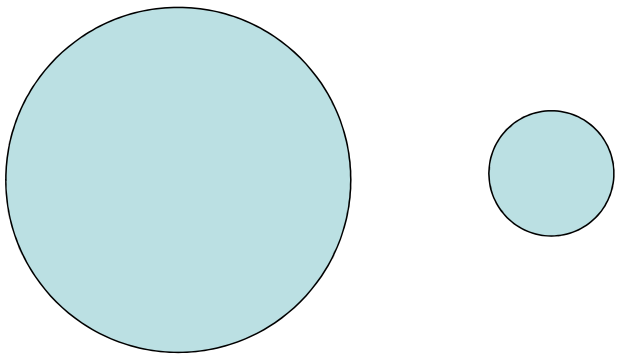


1. Progrès liés à l'instrumentation

- Accessoirement: les aimants deviennent plus compacts



Comparaison de la surface d'un aimant de 800 MHz blindé (à droite) et non-blindé



Apport des cryosondes





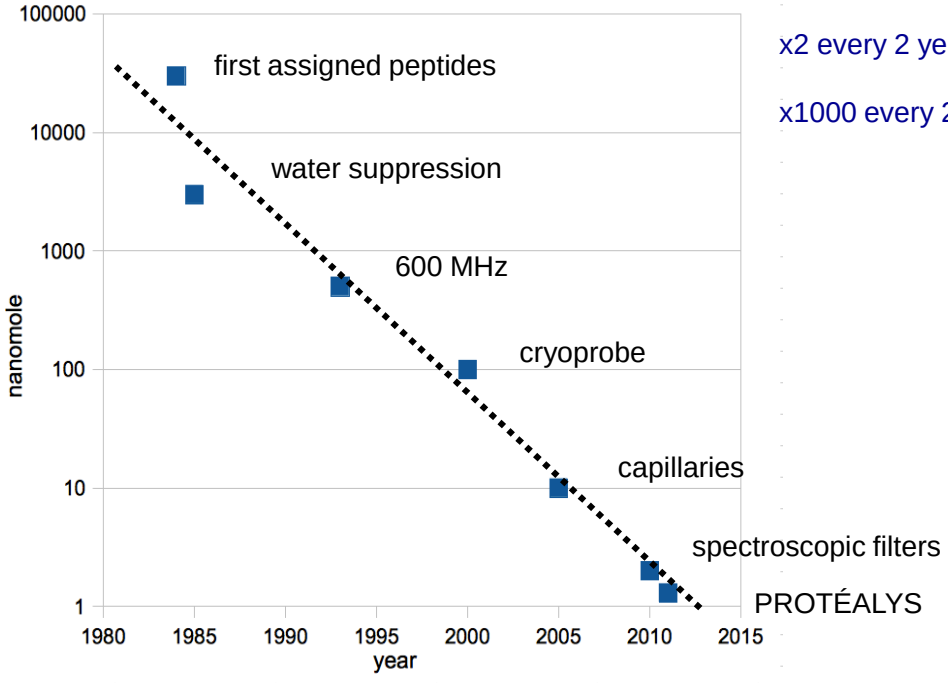
- Si on adapte le conditionnement (tubes) on optimise la sensibilité (ramenée à la quantité de matière requise par expérience)
- Loi de Hoult: $S/N \propto Q\eta M_o$

Q : facteur de qualité

η : facteur de remplissage

Evolution de la sensibilité de détection

Quantité de protéine détéctée

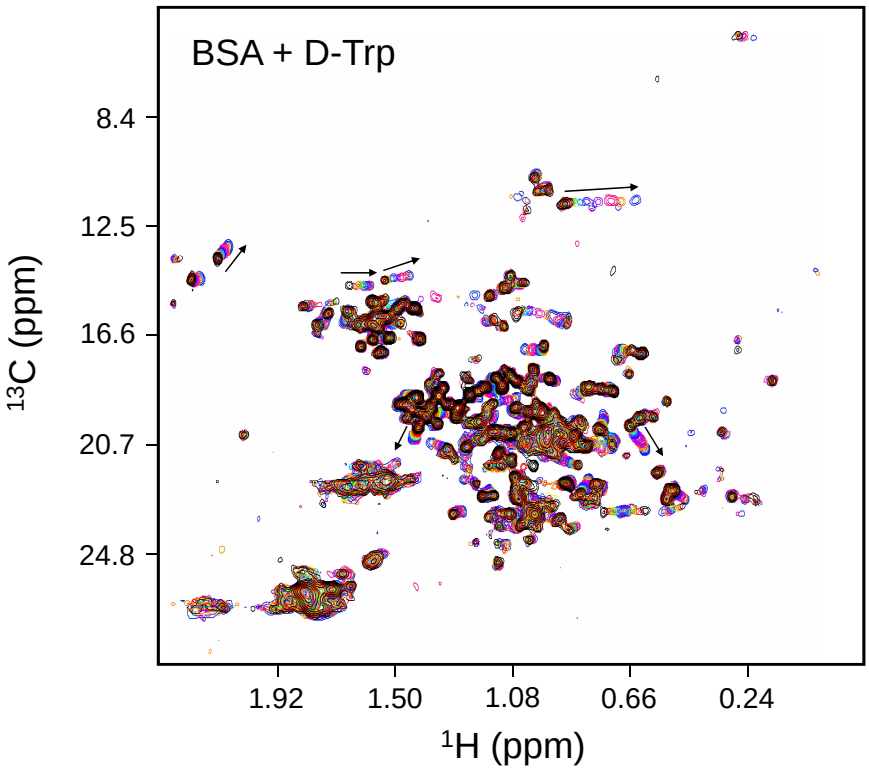


x2 every 2 years

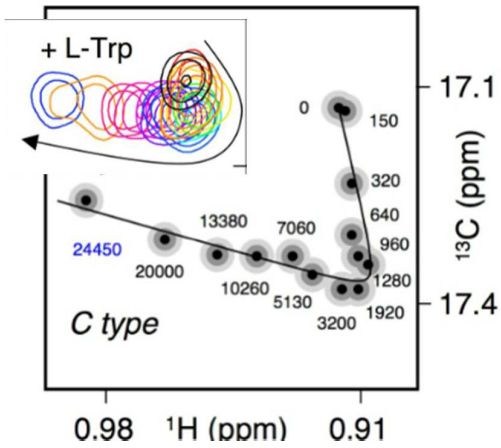
x1000 every 20 years

From MA Delsuc

Interaction between a small ligand and a protein « by simple NMR »



Experimental conditions
- Unlabelled BSA 900 uM
- 3 mm tube (< 1 nmol prot)
- 700 MHz cryo TCI
- 2 hours acquisition
- SOFAST METHYL-TROSY



ReNaFobis 2014

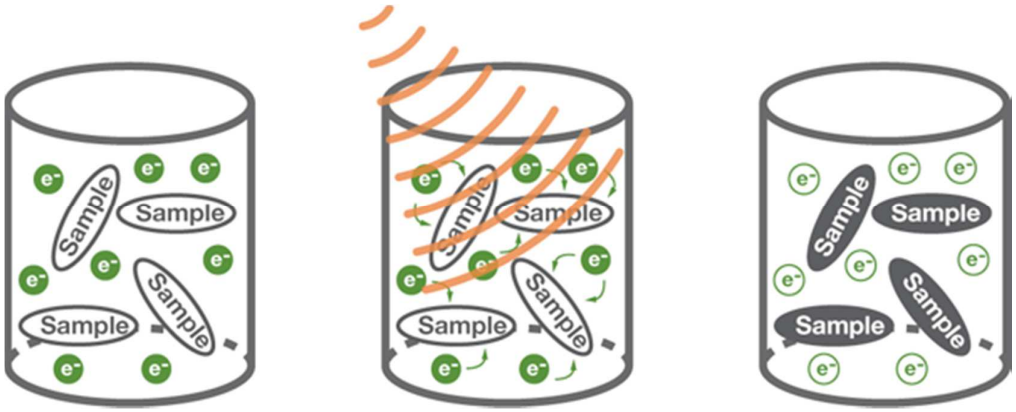
Quinternet...Kieffer, Chem. Eur. J. 2012, 18, 3969 – 3974

Polarisation Dynamique Nucléaire (DNP)

-> Principe: transférer la polarisation du spin de l'électron sur celui du noyau

Gain théorique: $\frac{\gamma_{e^-}}{\gamma_H} = 660$

Irradiation micro-ondes (460 GHz/700 MHz)

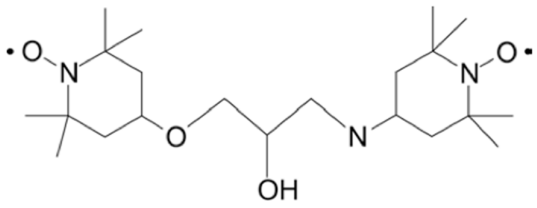


ReNaFobis 2014

Polarisation Dynamique Nucléaire (DNP)

❖ *Contraintes techniques*

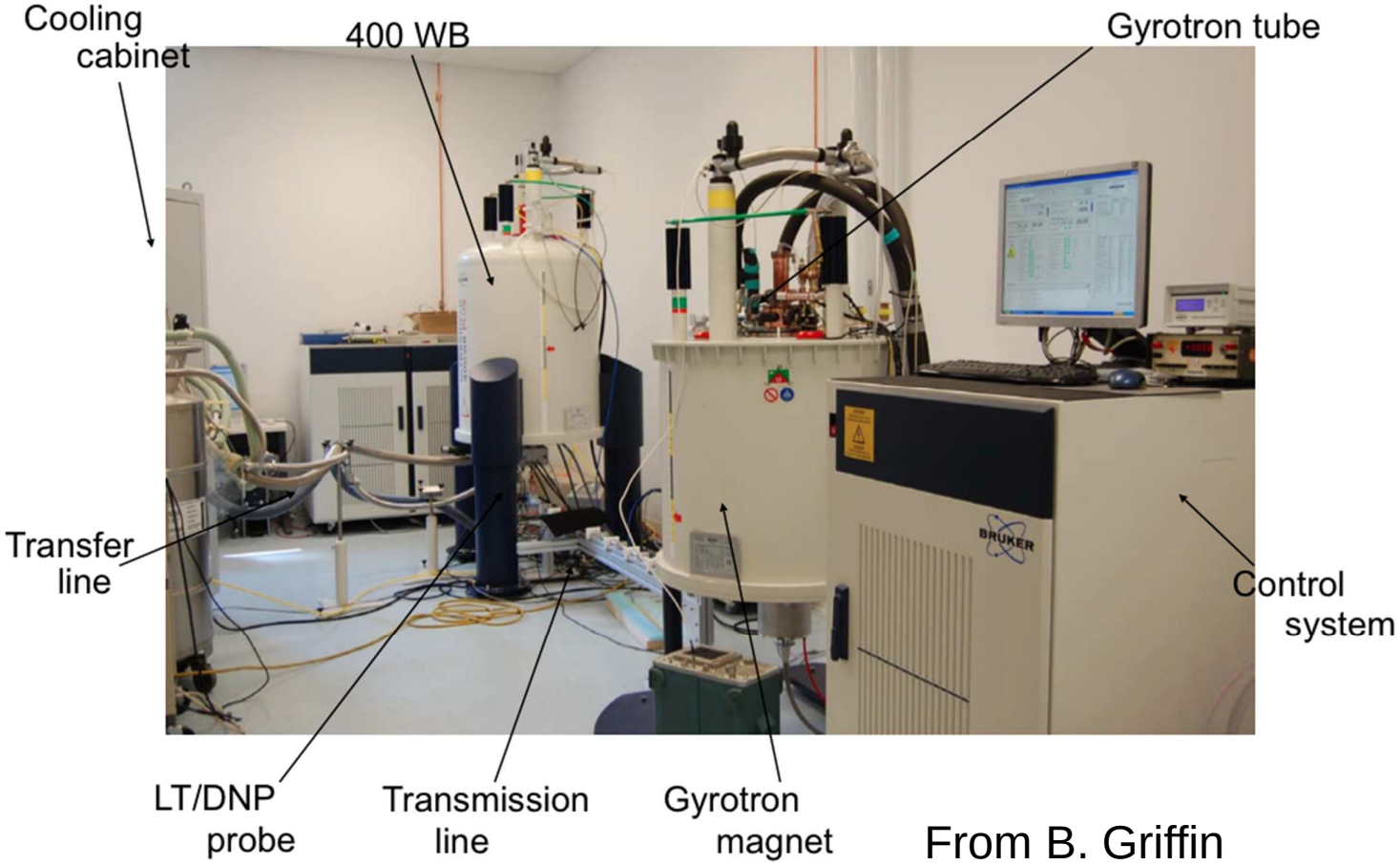
- *Générateur micro-ondes (gyrotron = 2^{em} aimant)*
- *Molécules possèdant un spin électronique stable (nitroxide) exp: TOTAPOL, AMUPOL*



TOTAPOL

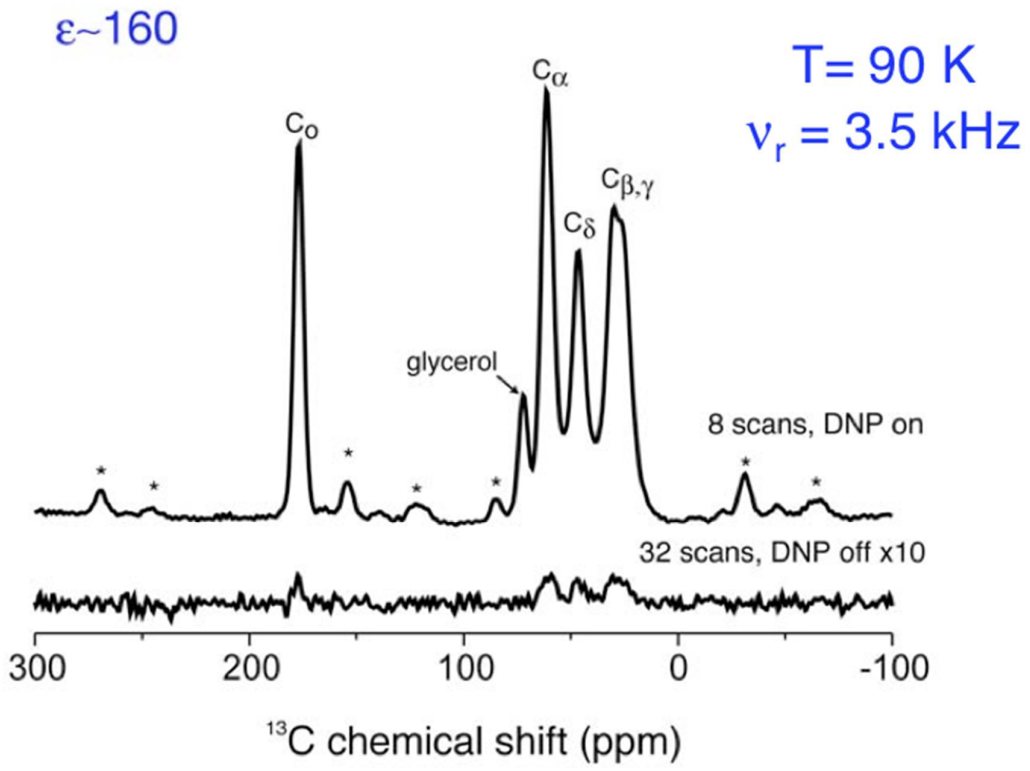
- *Temps de vie de l'état excité (T1) long => expériences à basse température (100 K) et à l'état solide*

263 GHz Gyrotron in Bruker-Billerica DNP Lab



From B. Griffin

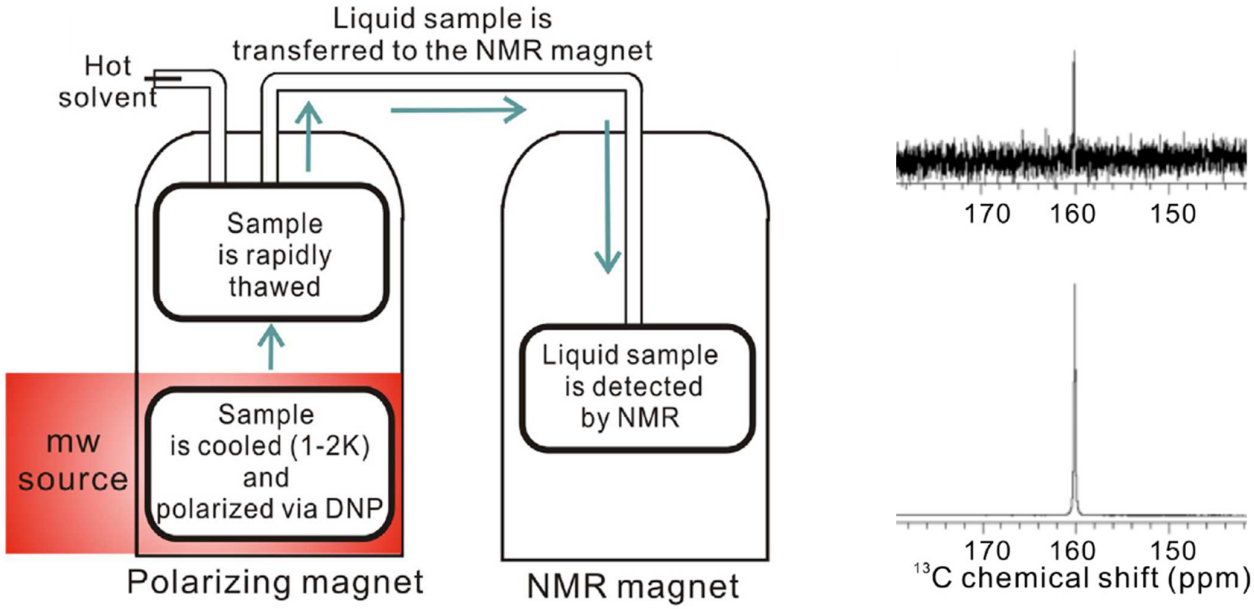
Spectre DNP MAS ^{13}C, ^{15}N proline



ReNaFobis 2014

C. Song, T. Swager et. al., JACS (2006)

DNP en liquide à T° ambiante ?



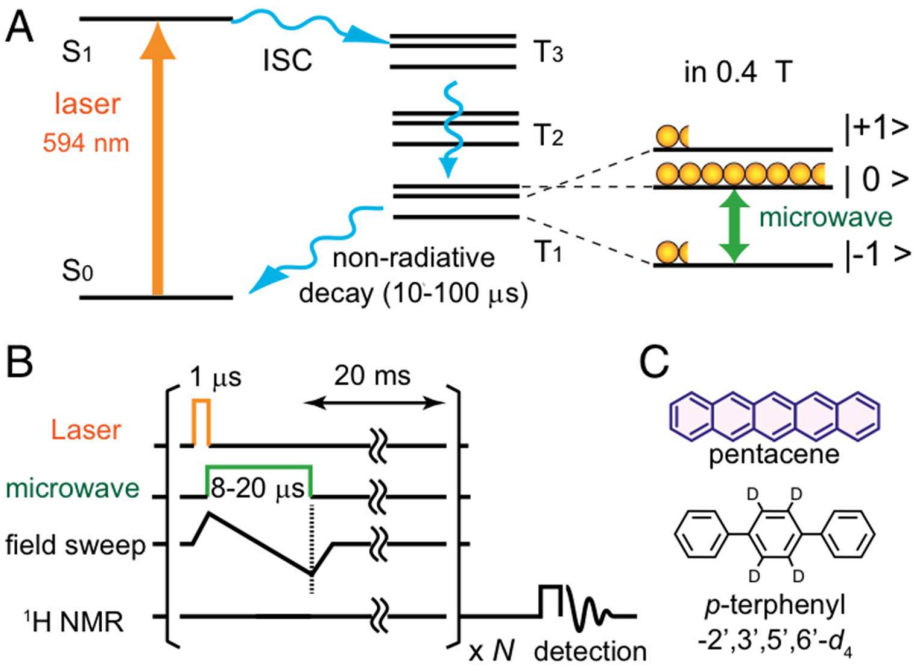
ReNaFobis 2014

From H. Ardenkjær-Larsen et al. Increase in signal-to-noise ratio of >10,000 times in liquid-state NMR, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100 (2003) 10158–10163.

Photo chemically Induced DNP (*photo-CIDNP*)

- *Principe: excitation de l'état-triplet de certains chromophores (exp: FMN) par un flash laser.*
  - *Dans ce cas, la polarisation peut théoriquement atteindre 100% !*
- *Transfert de l'électron polarisé sur une molécule acceptrice (généralement des aromatiques) lors du procesus de désexcitation.*

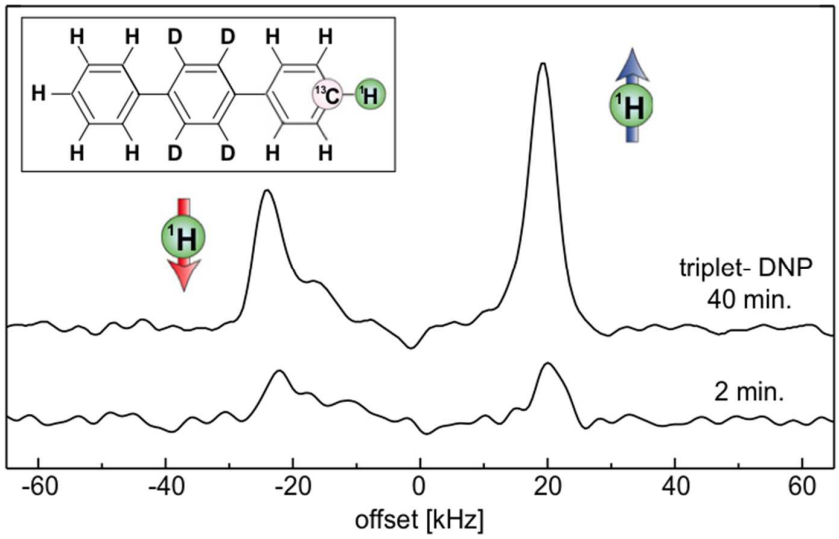
Photo chemically Induced DNP (*photo-CIDNP*)



Kenichiro Tateishi et al, Room temperature hyperpolarization of nuclear spins in bulk, PNAS Mai 2014

Photo chemically Induced DNP (photo-CIDNP)

- *La polarisation du proton conduit à des raies de couplage asymétrique! La polarisation est ici de 30 % à température ambiante. (250 000 x)*



Kenichiro Tateishi et al, Room temperature hyperpolarization of nuclear spins in bulk, PNAS Mai 2014

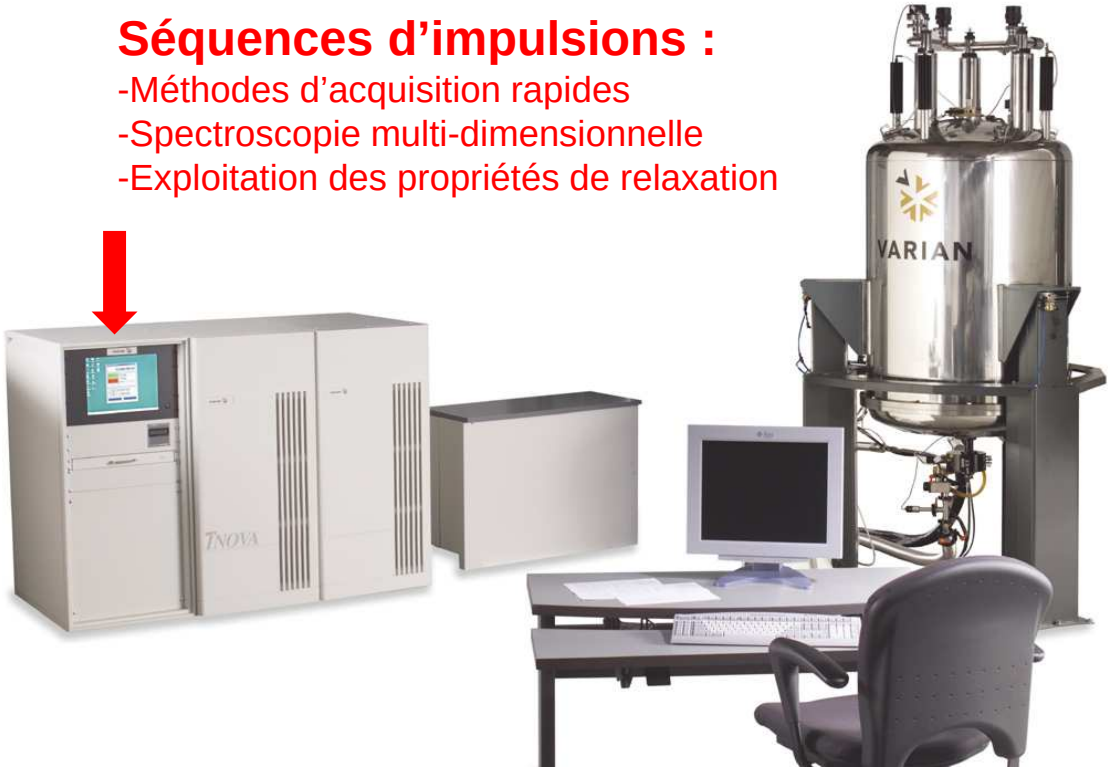
Les points d'innovations technologiques

Séquences d'impulsions :

-Méthodes d'acquisition rapides

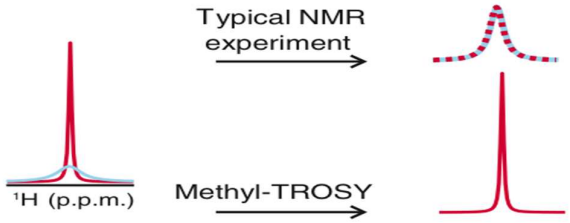
-Spectroscopie multi-dimensionnelle

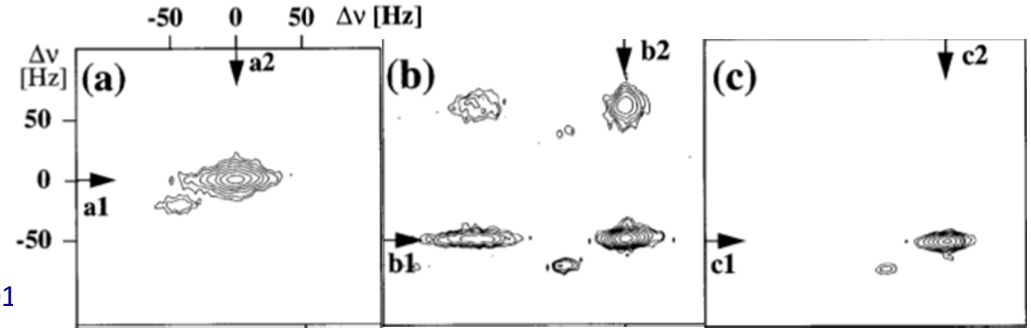
-Exploitation des propriétés de relaxation



Exploitation des propriétés de relaxation

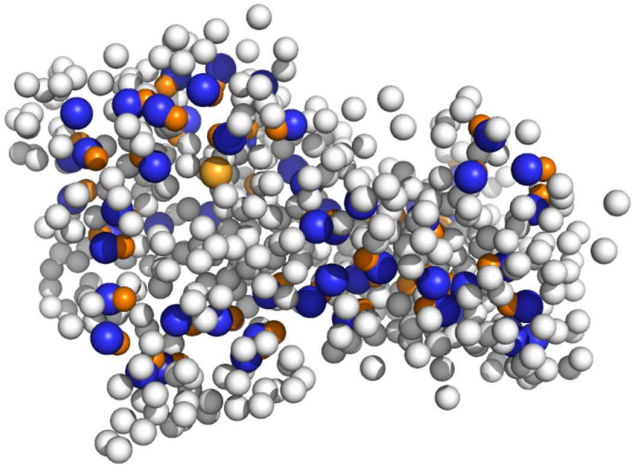
- 1. la relaxation transverse:
  - Exploitation de la corrélation entre plusieurs mécanismes de relaxation (CSA-DD) => TROSY





Exploitation des propriétés de relaxation

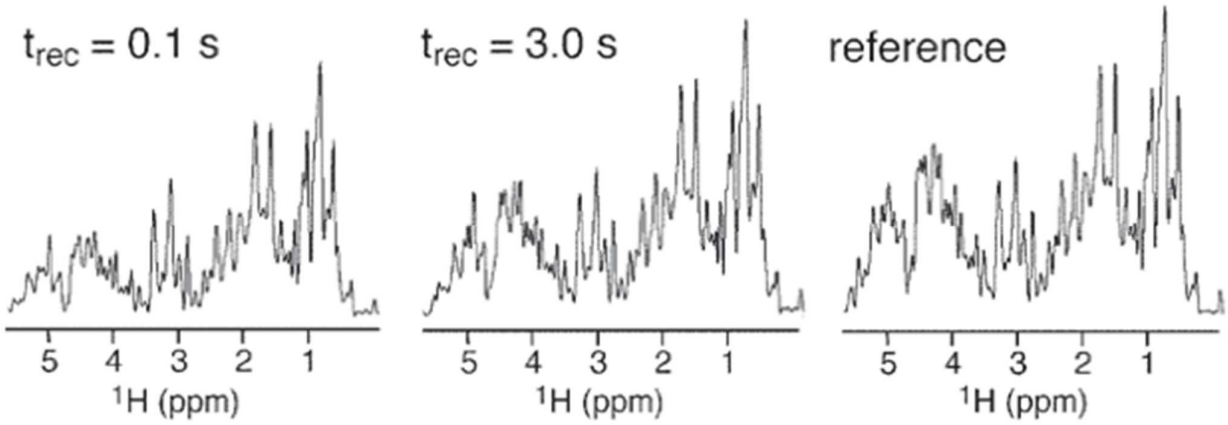
- 2. la relaxation longitudinale:
  - Accélerer le retour à l'équilibre thermodynamique pour augmenter la vitesse d'acquisition => SOFAST



P Schanda et al. 2005

Exploitation des propriétés de relaxation

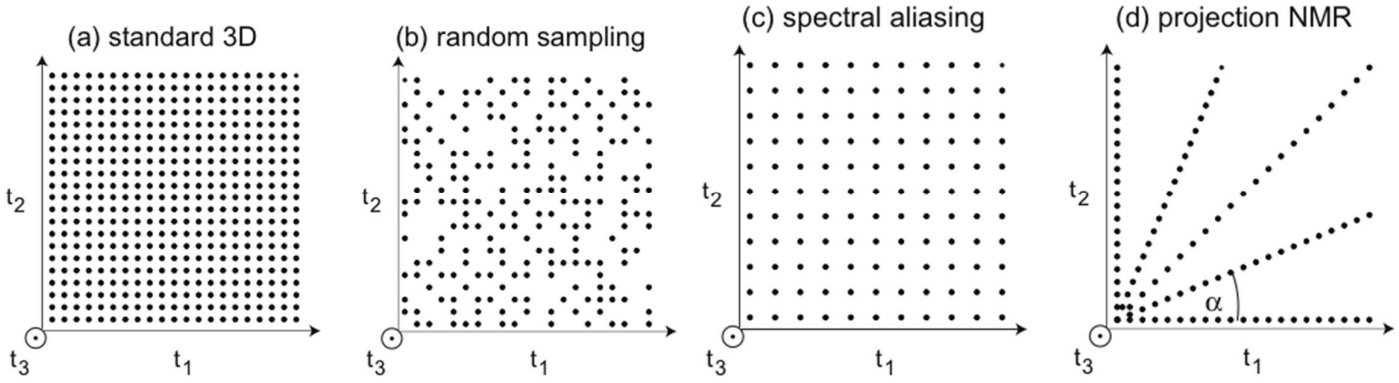
- 2. la relaxation longitudinale:
  - Accélerer le retour à l'équilibre thermodynamique pour augmenter la vitesse d'acquisition => SOFAST



P Schanda et al. 2005

Echantillonnage du signal

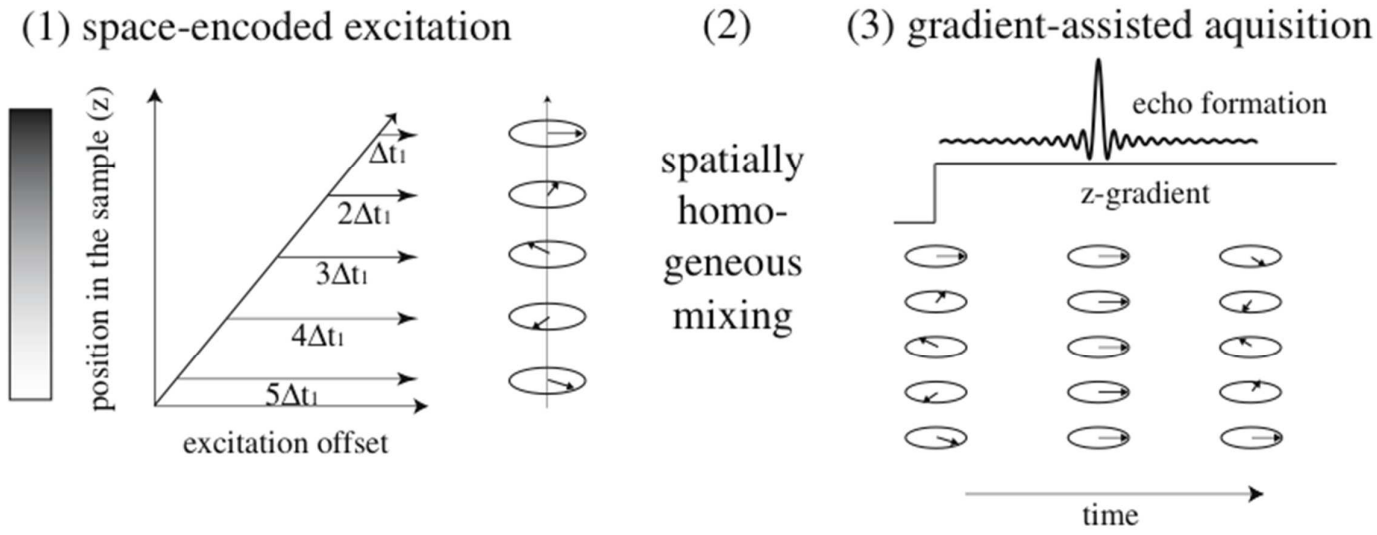
- L'utilisation de la FFT impose un échantillonnage linéaire
- Des méthodes alternatives (NUS) sont actuellement proposées



P Schanda Progress NMR Spect. 2009

RMN ultra-rapide

- Principe: on utilise les gradients de champ pour « coder » une évolution temporelle dans une dimension spatiale du tube RMN.
  => Une 2D peut être enregistrée en qq secondes (L. Friedman et al. PNAS 2002)



ReNaFobis 2014

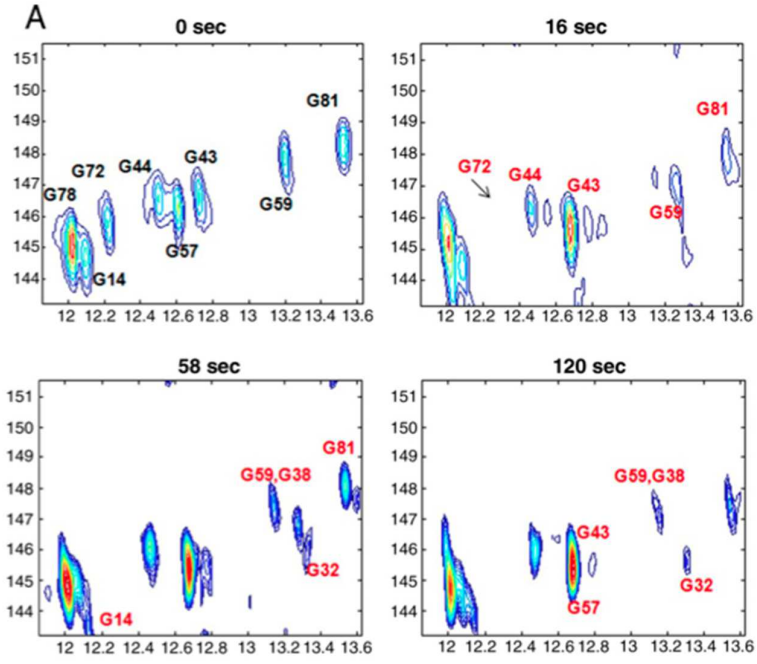
P Schanda Progress NMR Spect. 2009

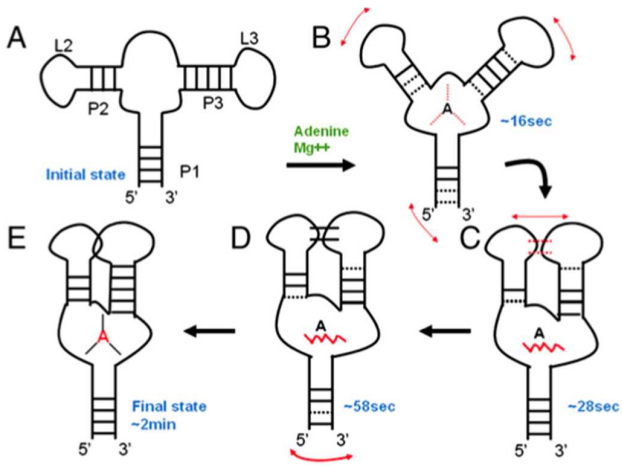
Application: suivi en temps réel du repliement d'un aptamère ARN

Real-time multidimensional NMR follows RNA folding with second resolution

Mi-Kyung Lee[a,1], Maayan Gal[b,1], Lucio Frydman[b,2], and Gabriele Varani[a,c,2]

PNAS 2010





Les points d'innovations technologiques

Traitement des données:

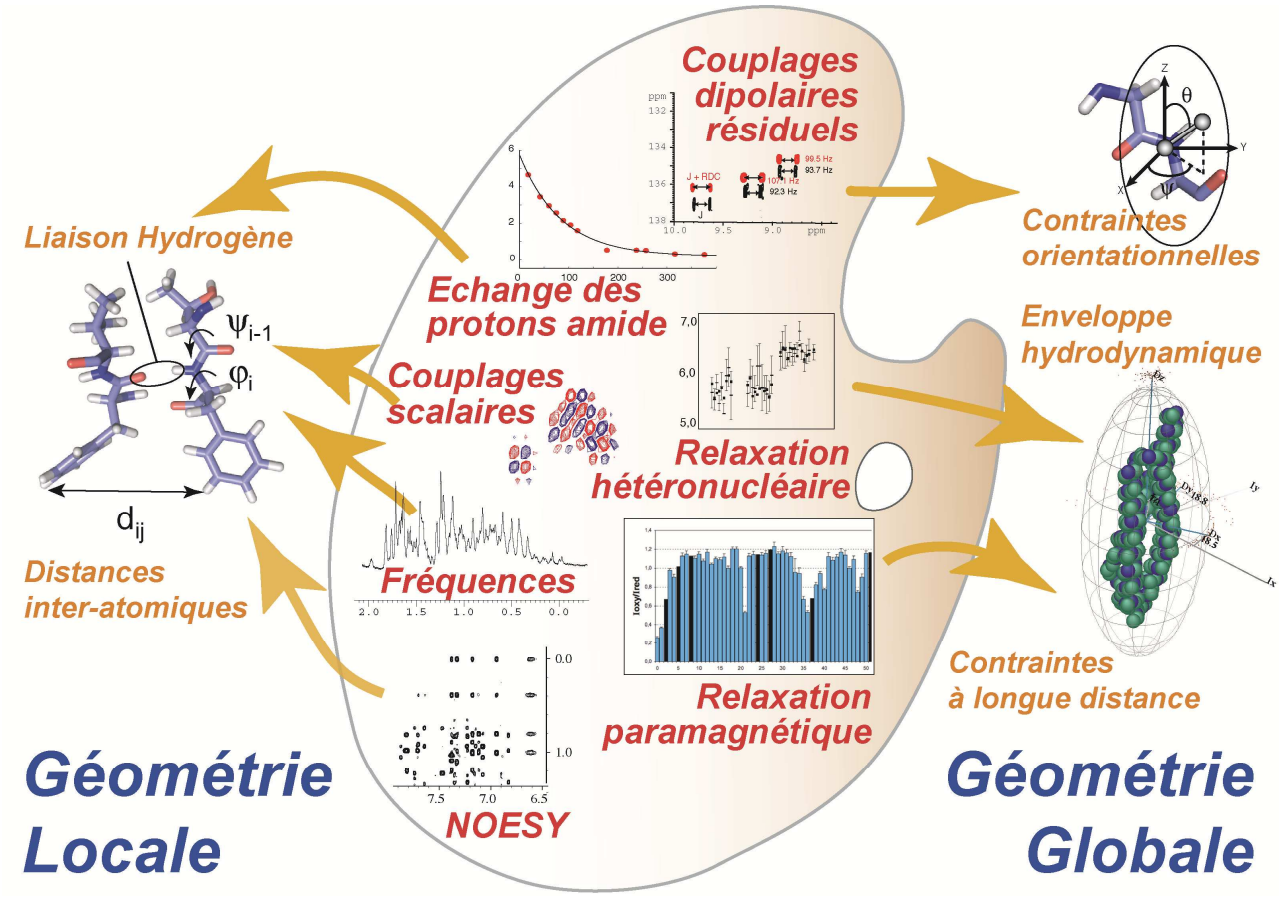
-Gestion et intégration des données

-Logiciels de calcul de structure

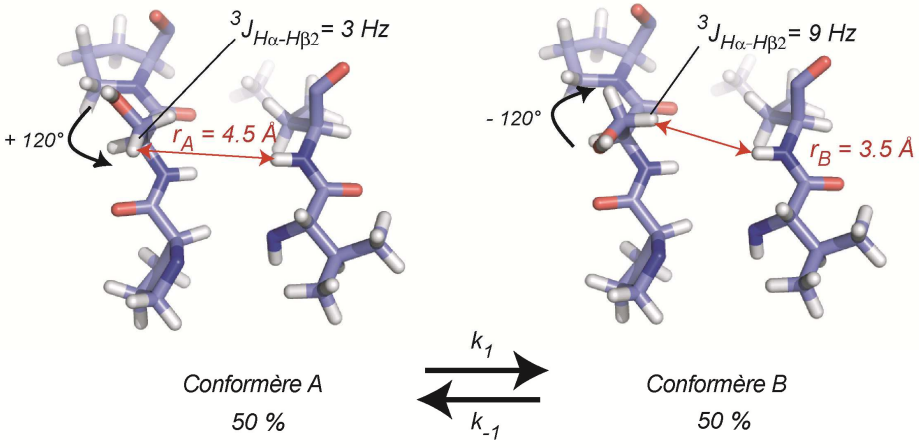


Quelques points sur la modélisation:

1. La palette du spectroscopiste RMN



2. Les moyennes entre observables ne sont pas nécessairement cohérentes

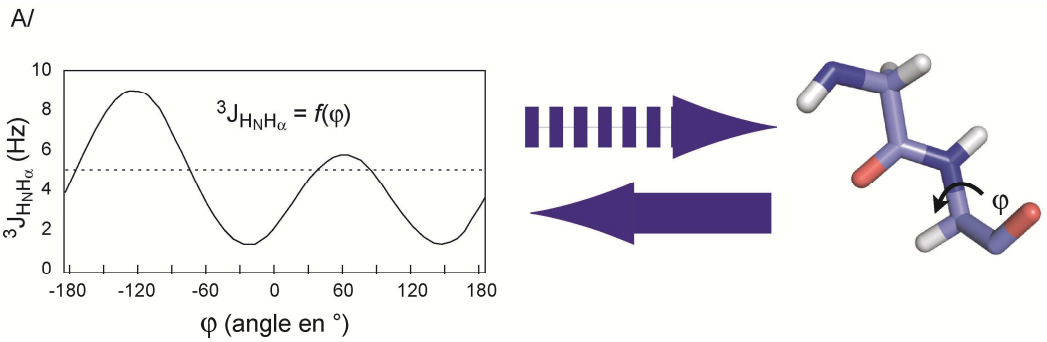


$$< r > = \frac{1}{\sqrt[6]{\frac{1}{2}\left(\frac{1}{r_A^6} + \frac{1}{r_B^6}\right)}} = 3.8 \text{ Å}$$

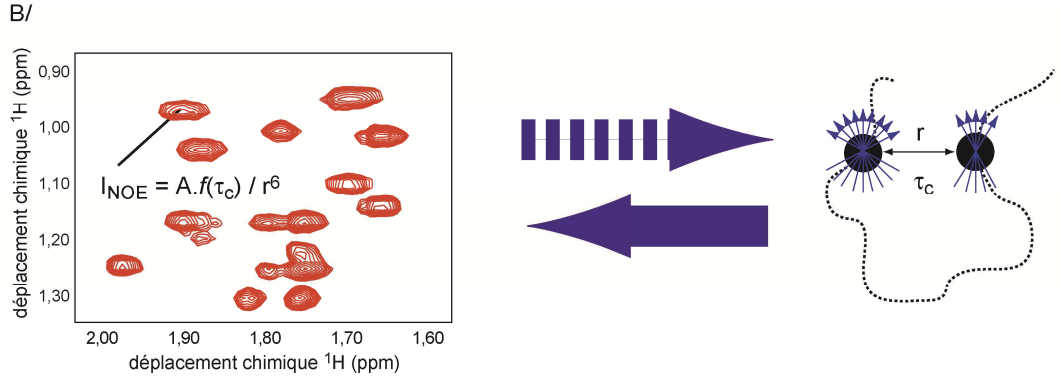
$$< {}^3J_{H_\alpha - H_{\beta 2}} > = 6 \text{ Hz}$$

3. Le calcul d'un modèle de structure: un problème inverse mal conditionné

Dihedral angles

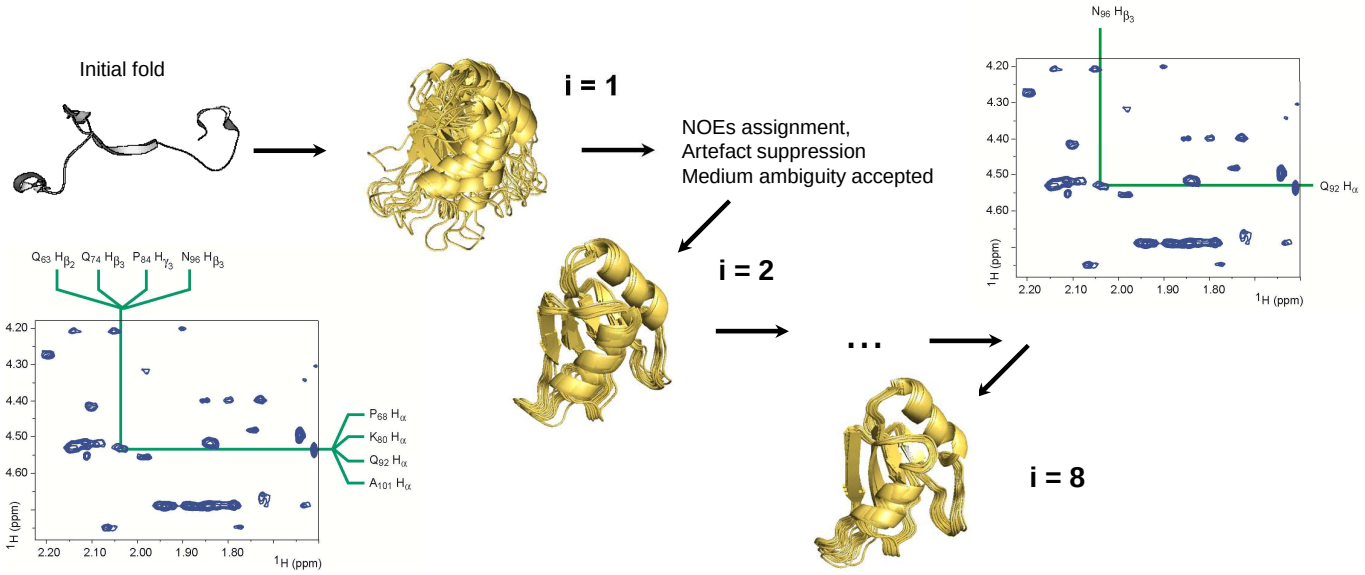


NOEs



Développement des programmes de calcul de structures RMN

Incorporation des données ambiguës de distances au cours d'un processus itératif => M. Nilges

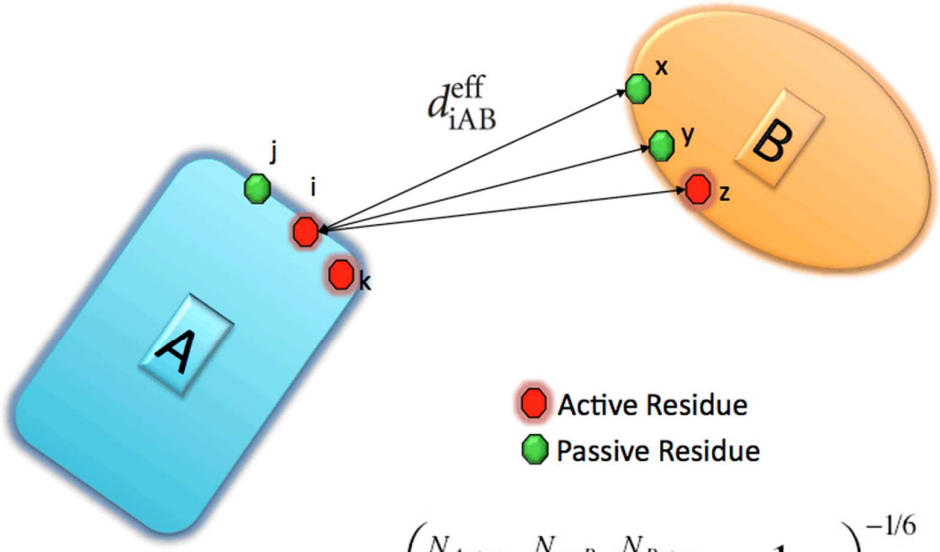


Logiciels ARIA, UNIO

Rieping W., Habeck M., Bardiaux B., Bernard A., Malliavin T.E., Nilges M. (2007) ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. Bioinformatics 23:381-382.

Volk, J.; Herrmann, T.; Wüthrich, K. J. Biomol.NMR. 2008, 41, 127-138..

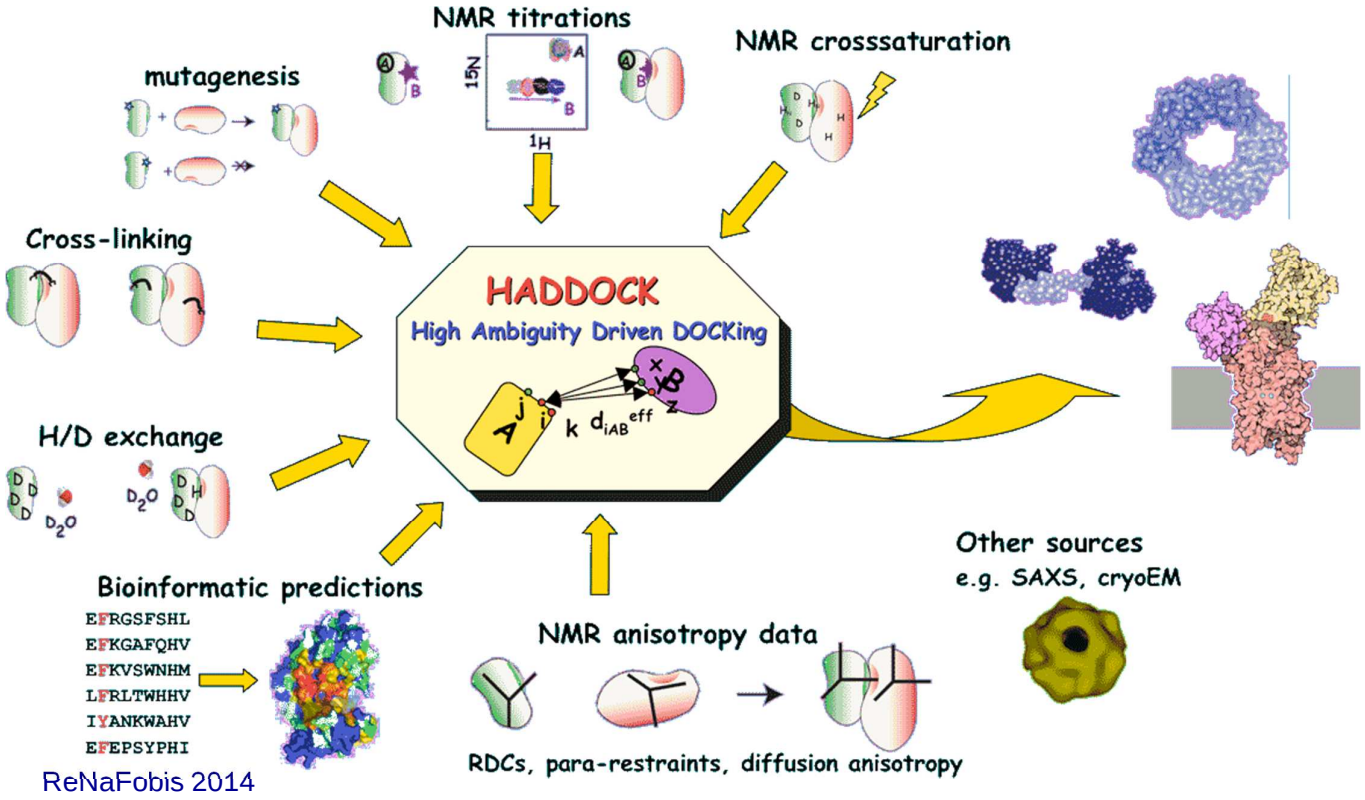
HADDOCK

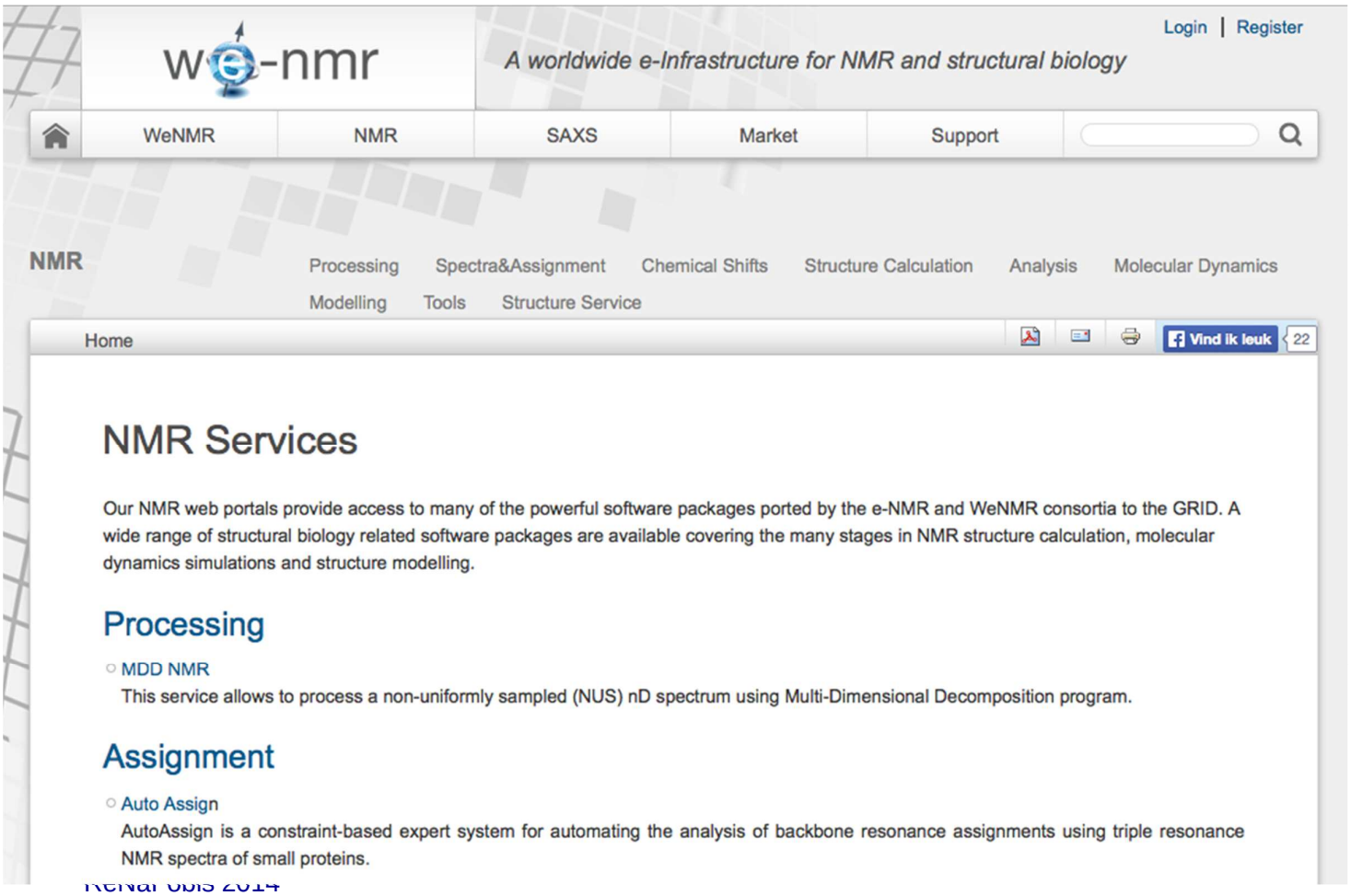


$$d_{iAB}^{eff} = \left(\sum_{m_{iA}=1}^{N_{Aatom}} \sum_{k=1}^{N_{resB}} \sum_{n_{kB}=1}^{N_{Batom}} \frac{1}{d_{m_{iA}n_{kB}}^{6}} \right)^{-1/6}$$

Domingez C, Boelens R, Bonvin A, J. Am. Chem. Soc. 125, 1731-1737 (2003).

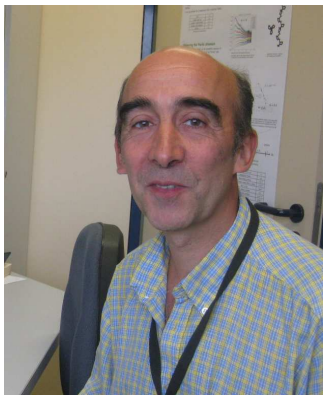
Use of Ambiguous Interaction Restraints for soft docking





Remerciements

Methods



Marc-André

Staff



Claude

RNA/DNA NMR



Isabelle

ReNaFobis 2014

