

Les observables en RMN Une source d'informations structurales et dynamiques pour les biomacromolécules

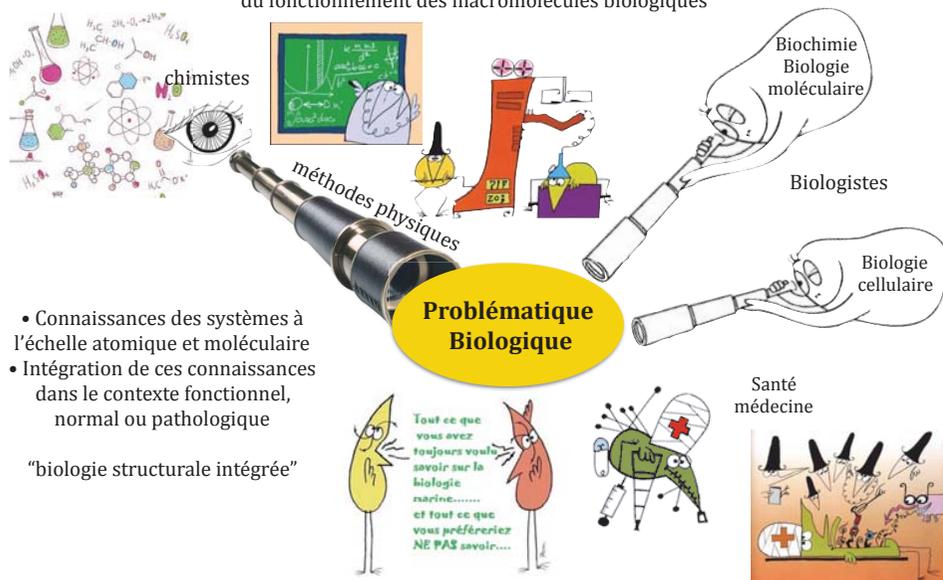


Carine van Heijenoort, ICSN-CNRS, Laboratoire de Chimie et Biologie Structurales
1 avenue de la terrasse, 91190, Gif-sur-Yvette
carine.van-heijenoort@cnrs.fr

- ☞ Analyse chimique
 - ☞ Chimie organique
 - ☞ Chimie industrielle (agroalimentaire, polymères, cosmétiques, ...)
 - ☞ Chimie/physique des matériaux
- ☞ Imagerie (IRM)
 - ☞ Imagerie médicale
 - ☞ Matériaux (industrie pétrolière, bétons)
 - ☞ Analyse d'oeuvres d'art
- ☞ Biologie structurale
 - ☞ Structures 3D de macromolécules biologiques (liquide & solide)
 - ☞ Dynamique internes de macromolécules biologiques
 - ☞ Etude fonctionnelles (enzymatiques, interactions)
 - ☞ Génomique structurale (protéomique, interactome ...)

Biologie Structurale

Discipline cherchant à décortiquer, expliquer et prédire les mécanismes à la base du fonctionnement des macromolécules biologiques



- Connaissances des systèmes à l'échelle atomique et moléculaire
- Intégration de ces connaissances dans le contexte fonctionnel, normal ou pathologique

"biologie structurale intégrée"

La RMN : une science récente

1936 : Rabi découvre le spin nucléaire

Prix Nobel de physique (1944)

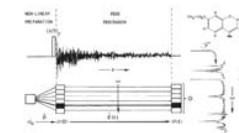


1945 : Obtention des premiers signaux RMN par Bloch et Purcell

Prix Nobel de physique (1952)

1949 : Notion de déplacement chimique

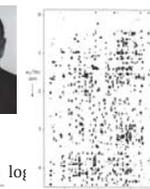
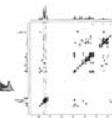
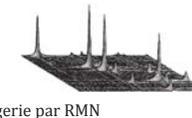
1970 : Apparition des appareils à transformée de Fourier.



1972 : Bobines supraconductrices. Champs élevés, découverte de la RMN 2D (Jeener)

1975 : Applications de la RMN 2D par Ernst

Prix Nobel de Chimie (1991)



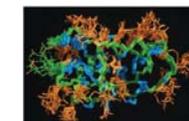
1990 : RMN haute résolution, développement de la RMN structurale appliquées aux macromolécules

Kurt Wüthrich prix Nobel de chimie (2002)

2000 : Introduction de cryo-sondes à 500 et 600 MHz

2003 : Paul C. Mauterbur et Sir Peter Mansfield

prix Nobel de médecine pour leurs travaux sur l'IRM



Bibliographie

Livres sur les bases théoriques de la RMN :

- A. Carrington et A. Mc Lachlan** Introduction to Magnetic Resonance with applications to chemistry and chemical physics, Harper International , 1967
- C. Slichter** Principle of Magnetic Resonance , 3 ème ed, 1990, Springer Verlag
- A. Abragam** Principles of Magnetic Resonance, Oxford University Press, 1961
- Ernst, Bodanhausen, Wokaun** Principle of Nuclear Magnetic Resonance in one and two dimensions, Oxford Science 1987
- M. Goldman** Quantum description of high resolution NMR in liquids. Oxford 1990.
- D. Canet*** La RMN : concepts, méthodes et applications (2^{ème} ed.), UniverSciences, Dunod 2002
- M. H. Levitt**** Spin dynamics. Basic of Nuclear Magnetic Resonance J.Wiley 2001, 2008
- J Keeler**** Understanding NMR spectroscopy, J.Wiley 2005,2006,2007

Livres où l'aspect expérimental et les applications sont plus développés

- J. K. M. Sanders, B. K. Hunter*** Modern NMR Spectroscopy: A Guide for Chemists 2nd Edition, Oxford 2003
- D. Shaw** Fourier transform NMR spectroscopy Elsevier 1984
- K. Wüthrich*** NMR of proteins and nucleic acids. Wiley interscience 1986
- John Cavanagh, Wayne J. Fairbrother, Arthur G., III Palmer**** Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice. Academic Press (2nd ed.), 2006

Biologie Structurale et RMN

Qu'est ce que la RMN des protéines apporte aujourd'hui ?
- Les questions spécifiques pour lesquelles la RMN n'est pas la meilleure solution

- ▶ **Structure**
 - "Grosses" protéines / assemblages bien structurés
 - Complexes macromoléculaires
- ▶ **Dynamique**
 - cinétiques pouvant être suivies par d'autres techniques
 - suivi de réactions "rapides" hors équilibre (<s)
 - "faibles" quantités (<10µM)
- ▶ **Interactions**
 - Paramètres cinétiques et thermodynamiques globaux pour les interactions "fortes"
 - Changement "globaux" de structures
 - "In cell"

Diffraction des RX
Microscopie Electronique
Spectrométrie de masse

Fluorescence, DSC, ...
Stopped-flow

ITC, SPR, ...
DC
DLS, SEC-MALS
SAXS
Fluorescence

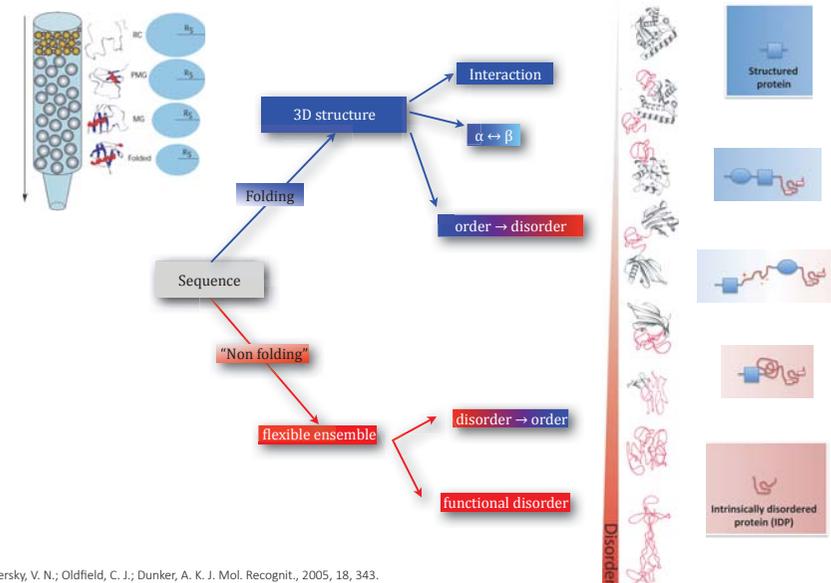
Biologie Structurale et RMN

Qu'est ce que la RMN des protéines apporte aujourd'hui ?

- Les questions spécifiques auxquelles la RMN peut apporter des réponses spécifiques

- ▶ **Structures**
 - substances naturelles, petites molécules libres ou liées
 - protéines de taille 'raisonnable'
 - protéines difficilement cristallisables, membranaires
 - partenaire au sein de complexes supramoléculaires
 - états multiples en échange
 - états peu peuplés
- ▶ **Dynamique**
 - flexibilité interne sur une large échelle de temps
 - boucles
 - fragments flexibles ("Intrinsèquement Désordonnés")
 - allostérie
 - mouvements de domaines
 - cinétique
 - repliement, interaction
- ▶ **Interactions**
 - Changements de conformations/flexibilité au cours de l'interaction
 - Interactions transitoires
 - Cinétique et thermodynamique des interactions
 - Interfaces
- ▶ **Variation des conditions expérimentales (T, P, concentration en sel, solvant, etc.)**
- ▶ **In cell analysis**

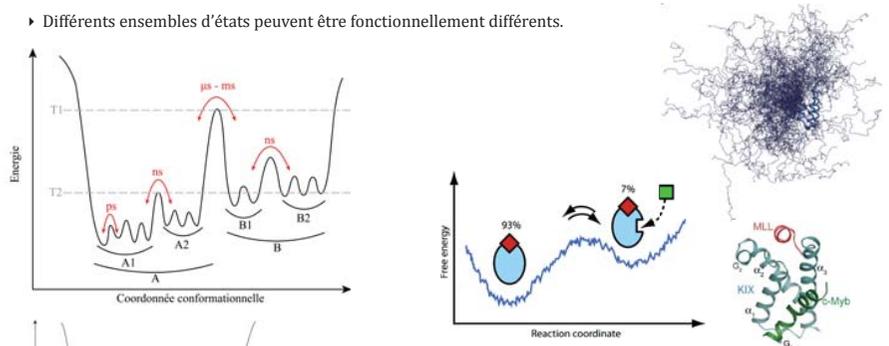
Une question cruciale :
explorer les états multiples des protéines et leur plasticité
un continuum ordre <-> désordre



Uversky, V. N.; Oldfield, C. J.; Dunker, A. K. J. Mol. Recognit., 2005, 18, 343.
Habchi, Tompa, Longhi & Uversky, Chemical reviews 2014, introducing protein intrinsic disorder
van der Lee et al., Chemical reviews 2014, classification of IDRs and IDPs

Les protéines : des objets dynamiques

- ▶ Les protéines sont des ensembles thermodynamiques : ensemble d'états conformationnels en échange
- ▶ Différents ensembles d'états peuvent être fonctionnellement différents.



Brüschweiler et al, J. Am. Chem. Soc. (2009) 131, 3063-3068

L'ensemble le plus peuplé n'est pas forcément l'état de plus basse énergie interne (état A) ni celui de plus grande entropie (état B) mais celui de plus basse enthalpie libre (G=H-TS).

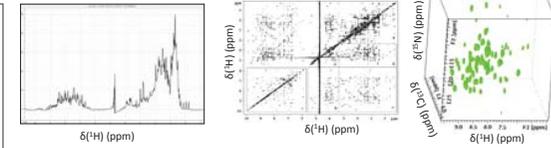
La valeur moyenne d'une propriété n'est pas forcément représentative d'une conformation.

- ↖ Importance fondamentale de caractériser la dynamique et les états multiples des protéines
- ↖ Importance fondamentale de caractériser la cinétique de l'échange entre les ensembles d'états conformationnels

Biologie Structurale et RMN

MOTS CLES

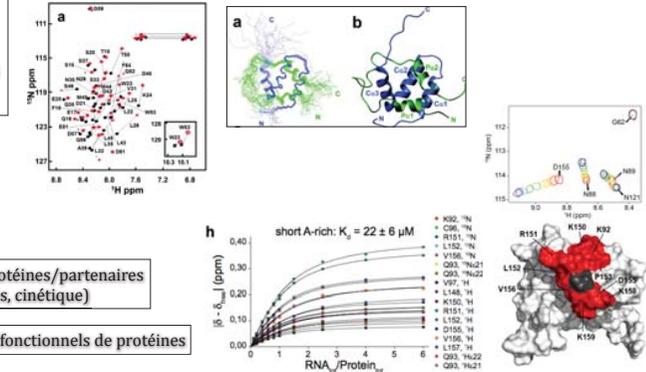
- Spins, Champs magnétiques
- Fréquence de résonance
- Spectre
 - Déplacement chimique
 - Largeur de raie
- Environnement électronique
- Communication entre spins
 - Proximité le long des liaisons
 - Proximité dans l'espace



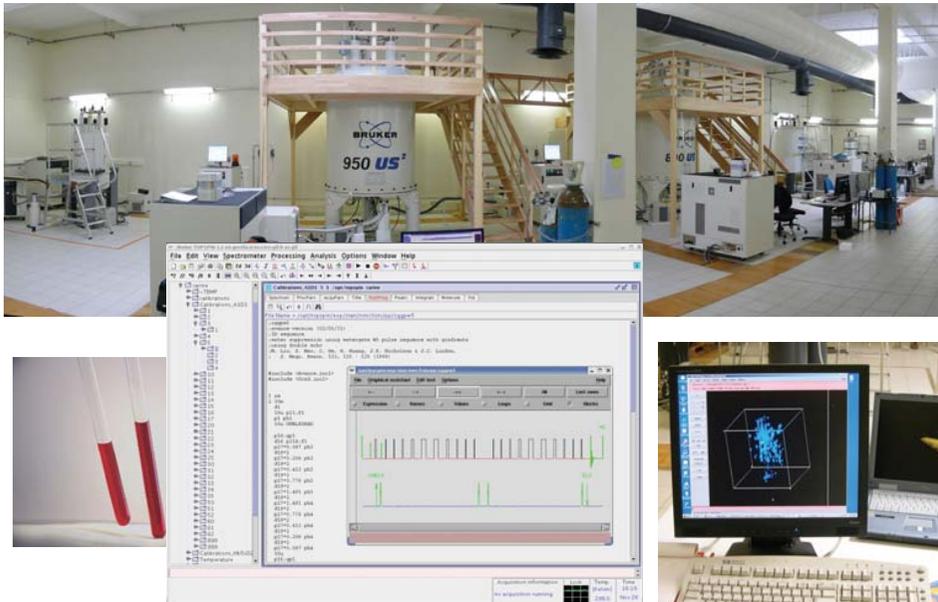
- Interactions
- Mouvements, flexibilité
- Structure

- Caractériser des interactions protéines/partenaires (sites d'interaction, affinités, cinétique)

- Caractériser des états multiples fonctionnels de protéines



La RMN des protéines : avec quel matériel ?



Etude d'une protéine par RMN Les pré-requis

... vont beaucoup dépendre de la question posée ...



- ▶ L'échantillon
 - quantité?
 - type de production?
 - type de marquage isotopique?
 - Stabilité?
 - Conditions expérimentales?
- ▶ Les spectromètres
 - Quel champ magnétique?
 - Quel type de sonde ?



Etude d'une protéine par RMN Les pré-requis

Protéine marquée (mg)

- ↪ 100µM-1mM dans 300µl
- ↪ Protéines exprimées dans E-Coli / in vitro
- ↪ Expression en milieu minimum ¹⁵N, ¹³C, (²H)
- ↪ Expression en cellules d'insectes (protéines eucaryotes)



Echantillon stable

- ↪ Conditions idéales : pas trop de sel, pH bas, protéine stable pendant plusieurs semaines
- ↪ **On peut toujours travailler même si les conditions ne sont pas "idéales" !!!**

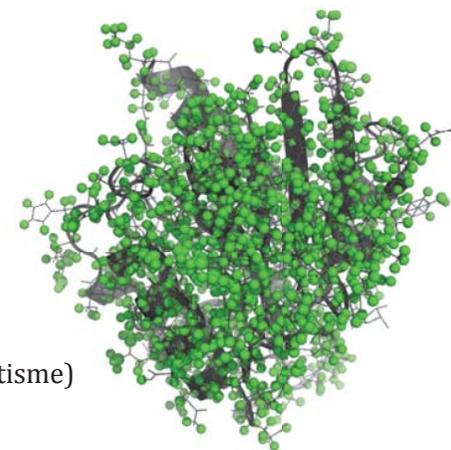


Champ magnétique élevé (sensibilité, résolution)

- ↪ 11.75-23.5T (500-1000MHz)
- ↪ cryosondes

Résonance Magnétique Nucléaire

Nucléaire



Objet d'étude :
Le spin des noyaux des atomes
Propriété intrinsèque
(comme la masse, la charge, le magnétisme)
↪ RMN : spins non nuls 1/2
¹H (²H), ¹⁵N (¹⁴N), ¹³C, ³¹P, ...

Résonance Magnétique Nucléaire



Nucléaire

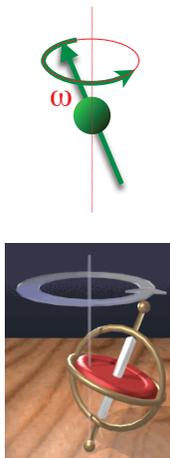
- ↪ Spins des noyaux des atomes
- ↪ ¹H (²H), ¹⁵N (¹⁴N), ¹³C, ³¹P, ...

Interaction spin / champ magnétique

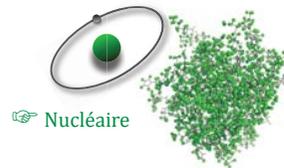
- ↪ Précession autour du champ magnétique
- ↪ fréquence de précession

Fréquence de Larmor

$$\vec{\omega}_0 = -\gamma \vec{B}_0$$



Résonance Magnétique Nucléaire



Nucléaire

- ↪ Spins des noyaux des atomes
- ↪ ¹H (²H), ¹⁵N (¹⁴N), ¹³C, ³¹P, ...

Interaction spin / champ magnétique

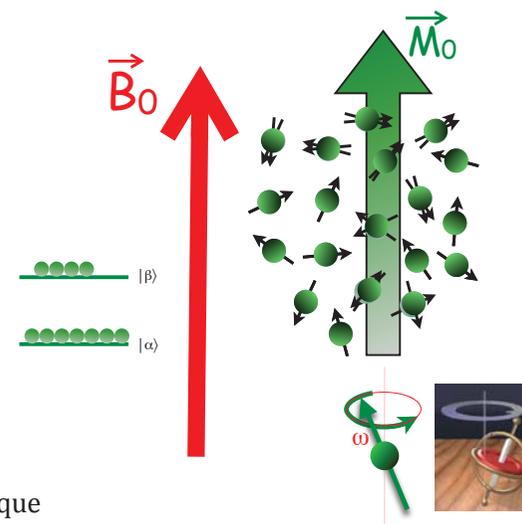
- ↪ Précession autour du champ magnétique
- ↪ fréquence de précession

Fréquence de Larmor

$$\vec{\omega}_0 = -\gamma \vec{B}_0$$

- ↪ Levée de dégénérescence

↪ Aimantation macroscopique



Résonance Magnétique Nucléaire

Nucléaire

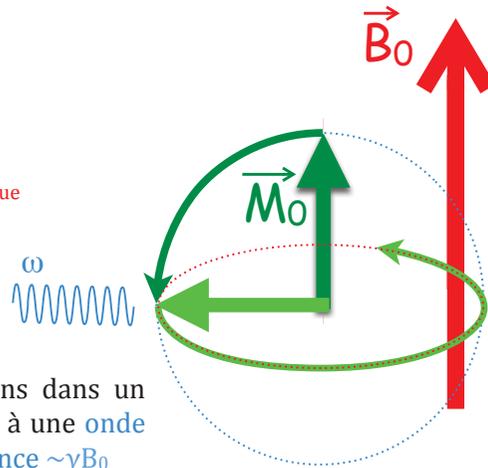
- Spins des noyaux des atomes
- ^1H (^2H), ^{15}N (^{14}N), ^{13}C , ^{31}P , ...

Interaction spin / champ magnétique

- Précession autour du champ magnétique
 - fréquence de précession (γB_0)
- Levée de dégénérescence
- Aimantation macroscopique

Résonance

Mise en résonance des spins dans un champ magnétique grâce à une onde radiofréquence de fréquence $\sim \gamma B_0$



Résonance Magnétique Nucléaire

Nucléaire

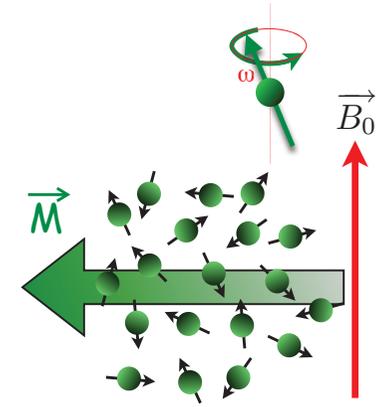
- Spins des noyaux des atomes
- ^1H (^2H), ^{15}N (^{14}N), ^{13}C , ^{31}P , ...

Interaction spin / champ magnétique

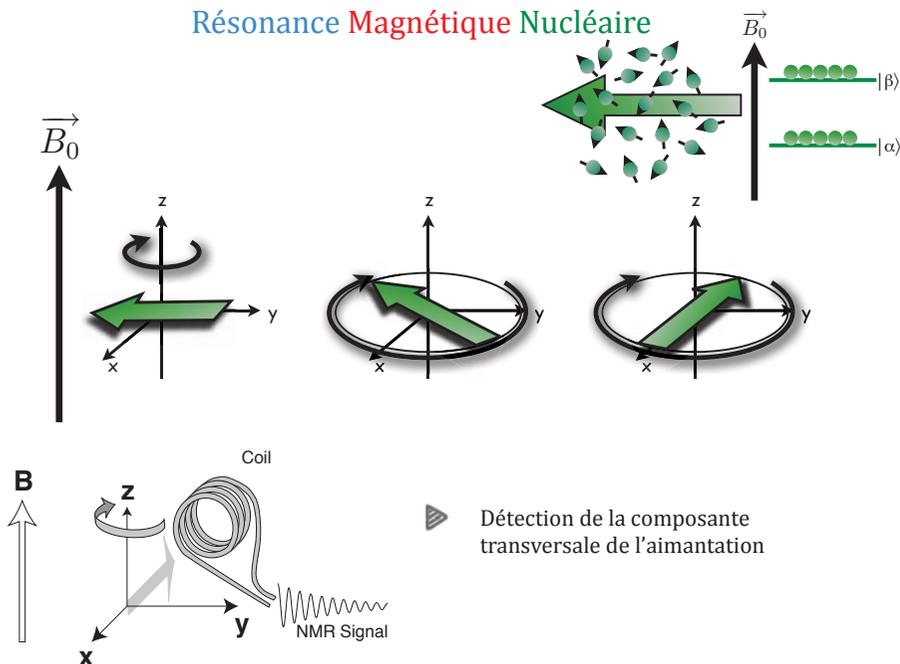
- Précession autour du champ magnétique
 - fréquence de précession
- Levée de dégénérescence
- Aimantation macroscopique

Résonance

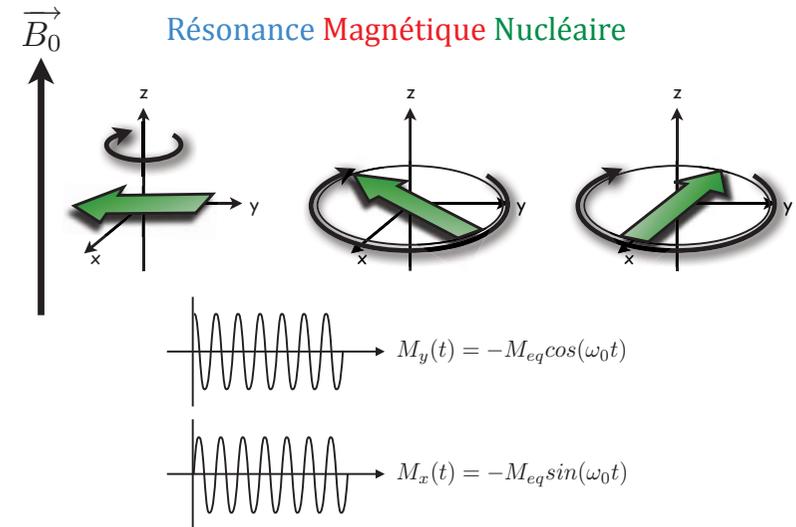
- Mise en résonance des spins dans un champ magnétique grâce à une onde radiofréquence
- L'aimantation transversale précesse (tourne) autour du champ magnétique à la fréquence de Larmor



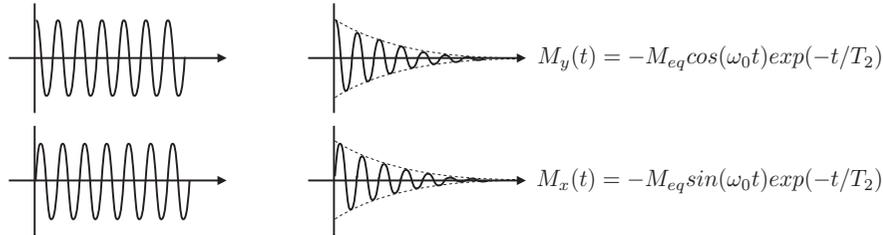
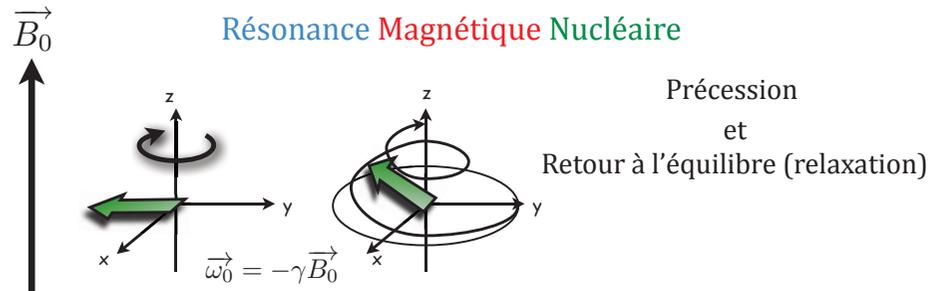
Résonance Magnétique Nucléaire



Résonance Magnétique Nucléaire



Mesure de la fréquence de résonance des spins



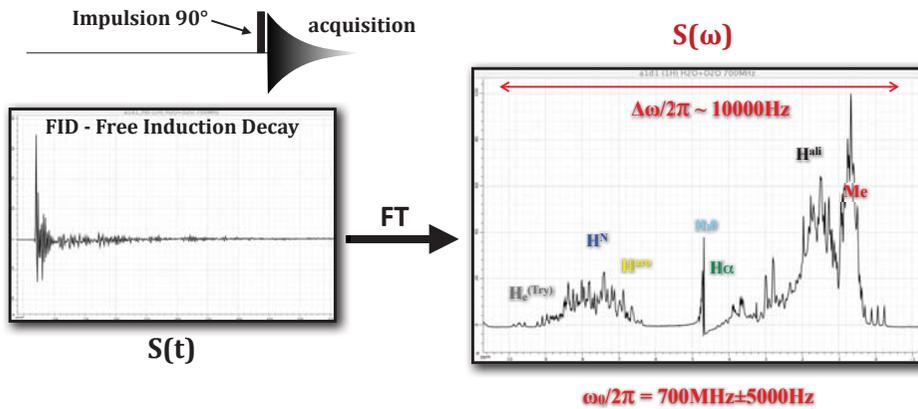
- ↳ Mesure de la fréquence de résonance des spins
- ↳ Mesure du temps de vie du signal

Résonance Magnétique Nucléaire



- ↳ Nucléaire
 - ↳ Spins des noyaux des atomes
 - ↳ ^1H (^2H), ^{15}N (^{14}N), ^{13}C , ^{31}P , ...
- ↳ Interaction spin / champ magnétique
 - ↳ Précession autour du champ magnétique
 - ↳ fréquence de précession
 - ↳ Levée de dégénérescence
 - ↳ Aimantation macroscopique
- ↳ Résonance
 - ↳ Mise en résonance des spins dans un champ magnétique grâce à une onde radiofréquence à la fréquence de précession des spins
- ↳ Observation des spins non nuls
 - ↳ Excitation et observation d'un type de noyau
 - ↳ Observation simultanée
- ↳ Faible sensibilité
 - ↳ Champs magnétiques élevés
 - ↳ cryosondes
 - ↳ Concentrations "élevées"
- ↳ Fréquence de précession : $\omega = \gamma B_0(1 - \sigma)$
 - ↳ σ dépend de l'environnement électronique local autour du noyau

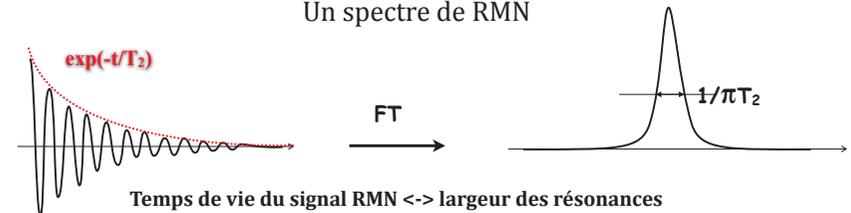
Un spectre de RMN



Plusieurs fréquences de résonances

- ↳ Nature chimique des spins
- ↳ Environnement électronique des spins
- ↳ Déplacement chimique (ppm)

Un spectre de RMN

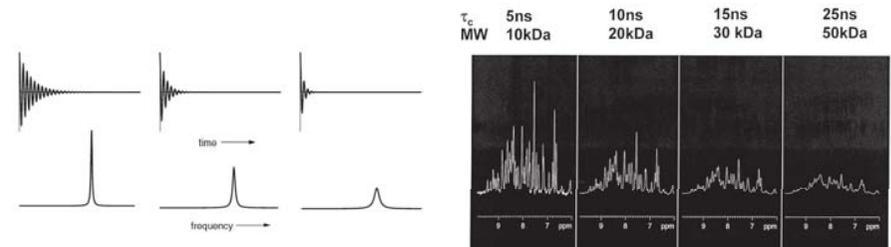


T_2 dépend du champ magnétique B_0 , de la nature des spins, de la taille des molécules, de la dynamique du système, de la température, etc.

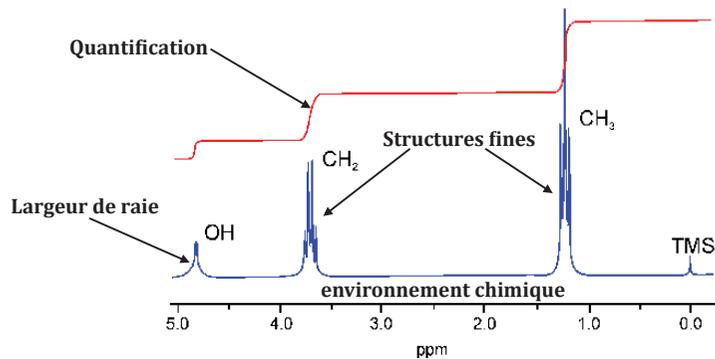
$T_2 \searrow$ (largeur de raie \nearrow) lorsque le temps de réorientation \nearrow
 $T_2 \nearrow$ (largeur de raie \searrow) si flexibilité \nearrow

Méthodes récentes (TROSY) permettent de s'affranchir de l'effet de la relaxation T_2

Nathalie

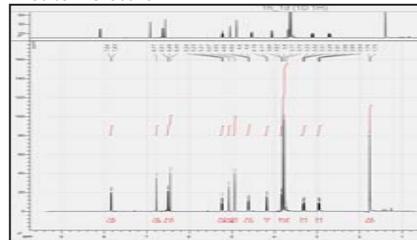


Un spectre de RMN

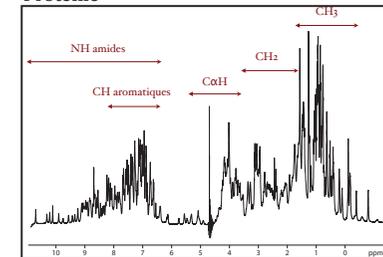


Un spectre de RMN

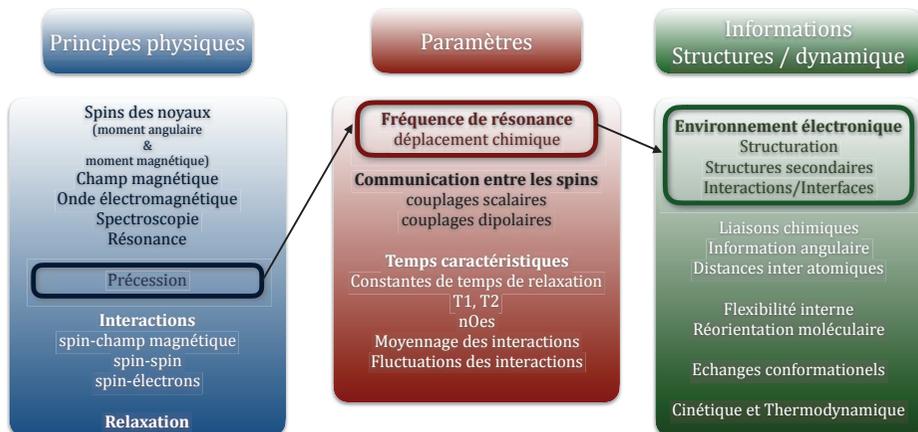
"Petite molécule"



Protéine



Résonance Magnétique Nucléaire

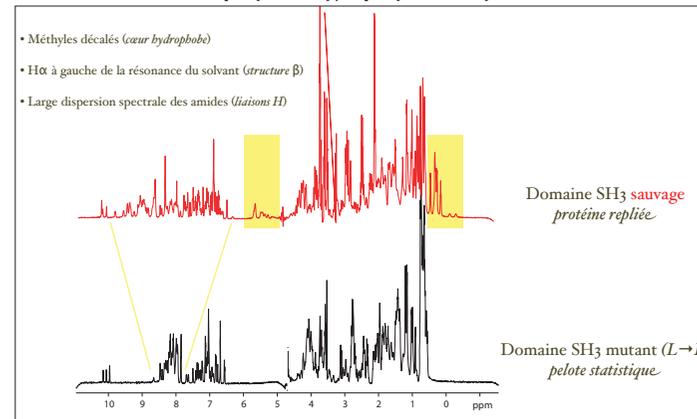


RMN : sonde à l'échelle atomique de l'environnement électronique des atomes

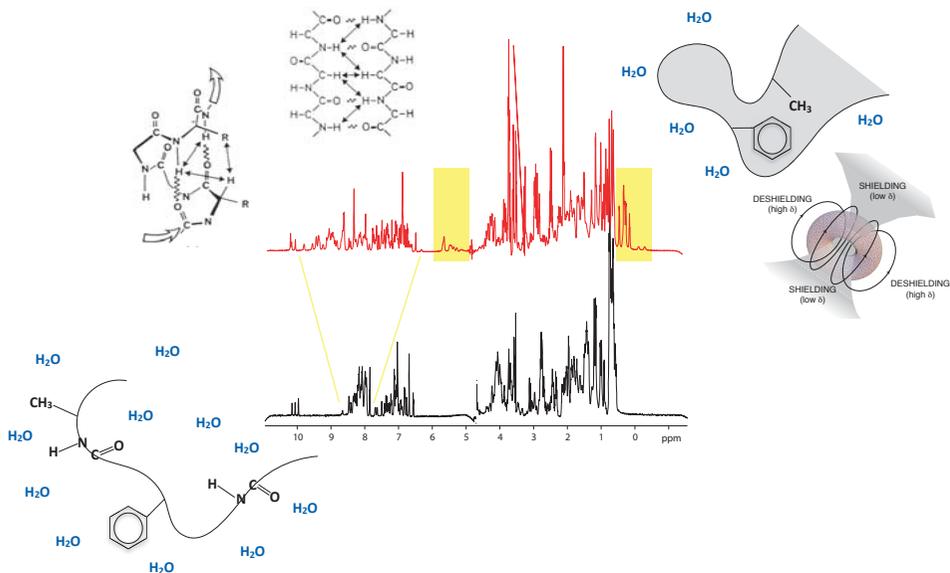
Les déplacements chimiques : une source d'information structurale

- Chaque atome de la molécule dont le spin n'est pas nul donne un signal caractéristique de son environnement électronique
- spectre en fréquence caractéristique d'une molécule dans un état/environnement particulier (pH, température, pression, solvant, sels, libre/lié, structuré/désordonné, ...)

Etat replié (structuré) / déplié (désordonné)



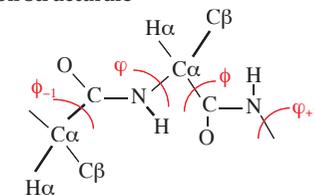
➔ Les déplacements chimiques : une source d'information structurale



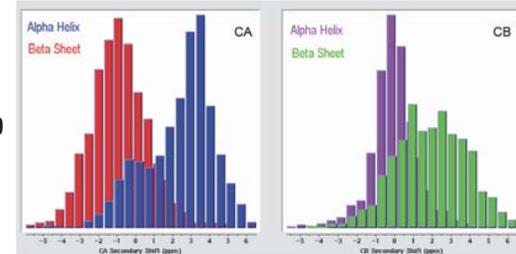
➔ Les déplacements chimiques : une source d'information structurale

$$\Delta\delta = \delta_{total} - \delta_{rc} = \delta_{\varphi\phi} + \delta_{\chi} + \delta_{hb} + \delta_{ring} + \delta_{elec} + \delta_{autres}$$

- δ_{total} : mesure du déplacement chimique
- δ_{rc} : déplacement chimique de non structuré
- $\delta_{\varphi\phi}$, δ_{χ} : contribution de la géométrie (squelette + chaîne la)
- δ_{hb} : contribution des liaisons hydrogènes
- δ_{ring} : effet de la susceptibilité magnétique
- δ_{elec} : polarisation des liaisons dues aux charges voisines
- δ_{autres} : autres



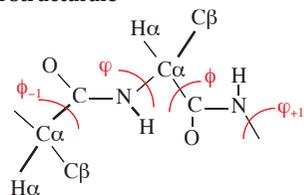
- Environnement chimique/électronique
- Etat replié (structuré) / déplié (désordonné)
- Liaisons hydrogènes
- Structures secondaires (CSI, TALOS, SSP)



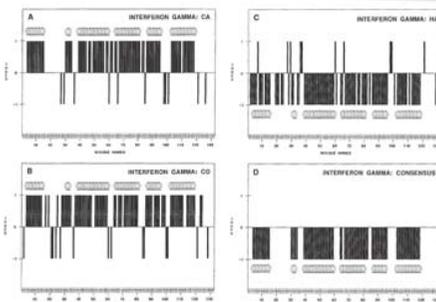
➔ Les déplacements chimiques : une source d'information structurale

$$\Delta\delta = \delta_{total} - \delta_{rc} = \delta_{\varphi\phi} + \delta_{\chi} + \delta_{hb} + \delta_{ring} + \delta_{elec} + \delta_{autres}$$

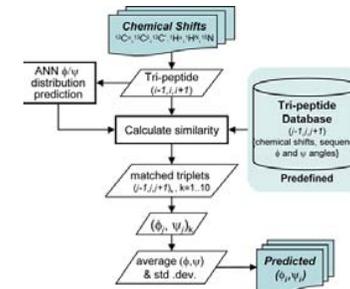
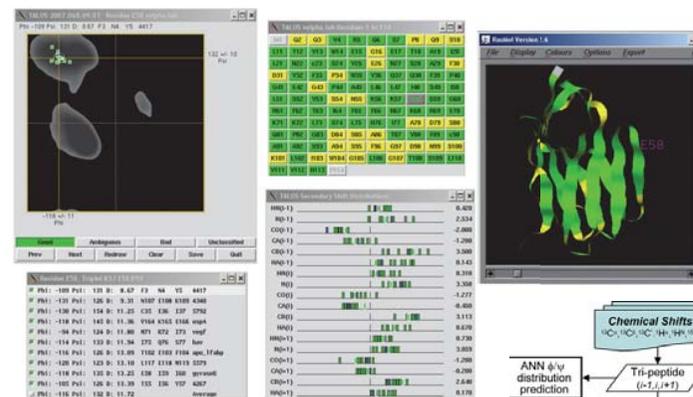
- δ_{total} : mesure du déplacement chimique
- δ_{rc} : déplacement chimique de non structuré
- $\delta_{\varphi\phi}$, δ_{χ} : contribution de la géométrie (squelette + chaîne la)
- δ_{hb} : contribution des liaisons hydrogènes
- δ_{ring} : effet de la susceptibilité magnétique
- δ_{elec} : polarisation des liaisons dues aux charges voisines
- δ_{autres} : autres



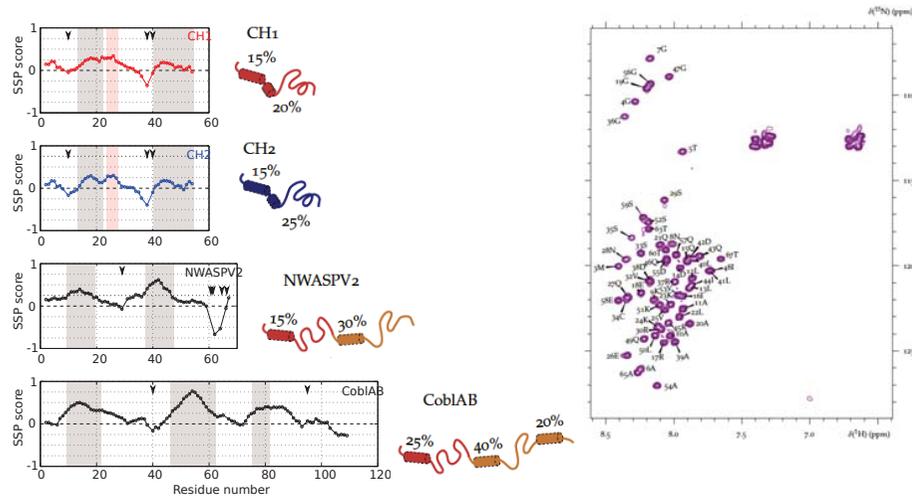
- Structures secondaires (CSI, TALOS, SSP)



► Structures secondaires (CSI, TALOS, SSP)



► Structures secondaires (CSI, TALOS, SSP)



► Les déplacements chimiques : une source d'information structurale

► Calculer une structure à partir des déplacements chimiques?

► CS-ROSETTA

Bruno

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0800256105

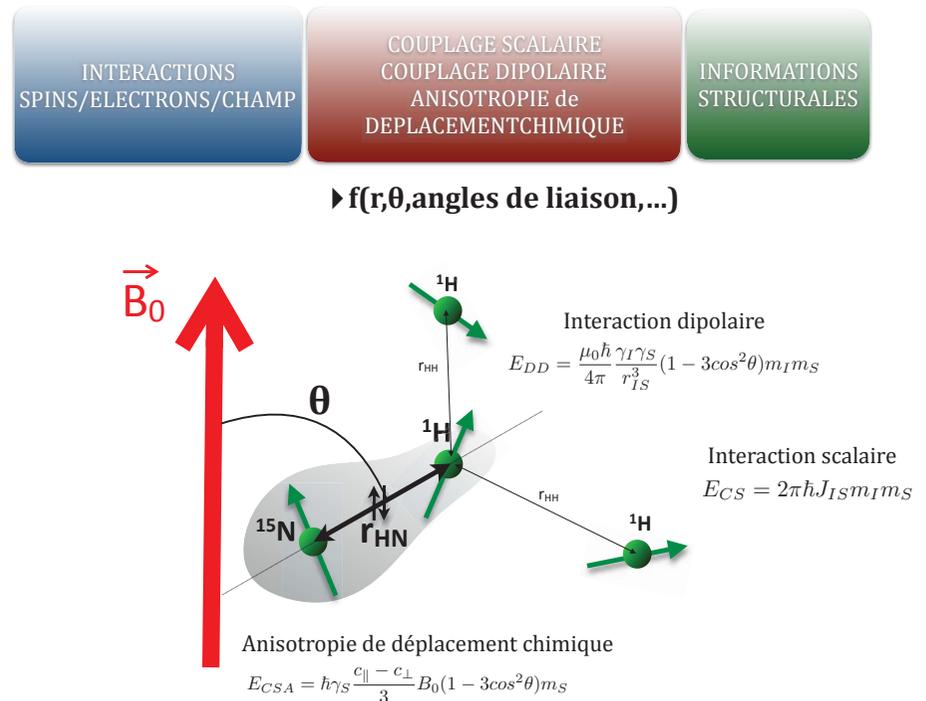
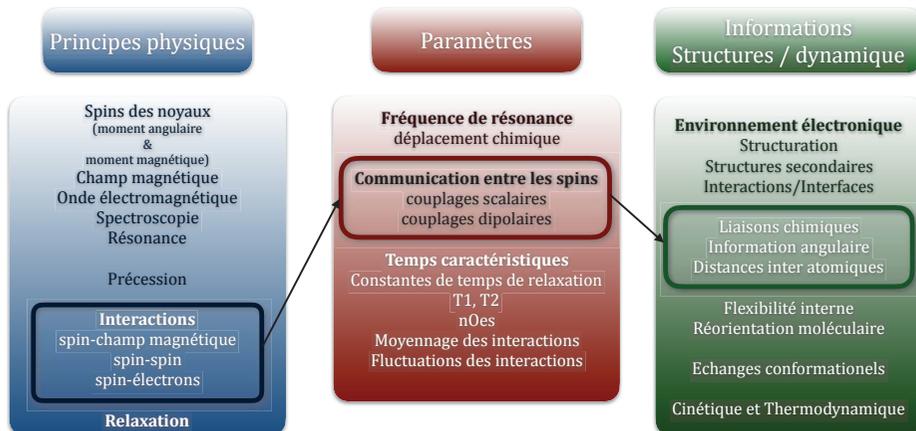
PNAS | March 25, 2008 | vol. 105 | no. 12 | 4685-4690

Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data

Yang Shen*, Oliver Lange[†], Frank Delaglio*, Paolo Rossi[‡], James M. Aramini[‡], Gaozhua Liu[‡], Alexander Eletsky[§], Yibing Wu[§], Kiran K. Singarapu[§], Alexander Lemak[§], Alexandr Ignatchenko[§], Cheryl H. Arrowsmith[¶], Thomas Szyperski[§], Gaetano T. Montelione[§], David Baker^{||}, and Ad Bax*^{||}

*Laboratory of Chemical Physics, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892; [†]Department of Biochemistry and Howard Hughes Medical Institute, University of Washington, Seattle, WA 98195; [‡]Center for Advanced Biotechnology and Medicine, Department of Molecular Biology and Biochemistry, and Northeast Structural Genomics Consortium, Rutgers, The State University of New Jersey, and Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ 08854; [§]Departments of Chemistry and Structural Biology and Northeast Structural Genomics Consortium, University at Buffalo, State University of New York, Buffalo, NY 14260; and [¶]Ontario Cancer Institute, Department of Medical Biophysics, and Northeast Structural Genomics Consortium, University of Toronto, Toronto, ON, Canada M5G 1L5

Résonance Magnétique Nucléaire

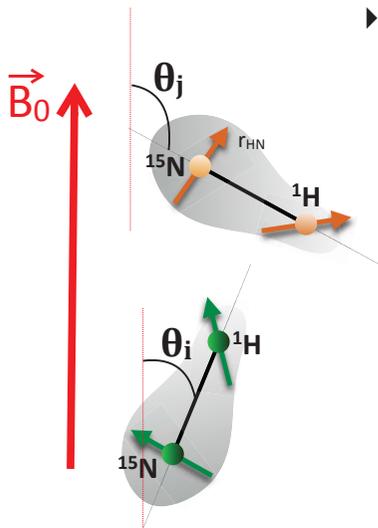


INTERACTIONS
SPINS/ELECTRONS/CHAMP

COUPLAGE SCALAIRE
COUPLAGE DIPOLAIRE
ANISOTROPIE de
DEPLACEMENT CHIMIQUE

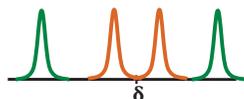
INFORMATIONS
STRUCTURALES

► $f(r, \theta, \text{angles de liaison}, \dots)$



Interaction dipolaire

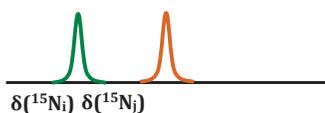
$$E_{DD} = \frac{\mu_0 \hbar \gamma_I \gamma_S}{4\pi r_{IS}^3} (1 - 3\cos^2\theta) m_I m_S$$



Marie

Anisotropie de déplacement chimique

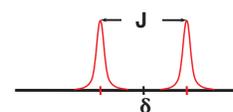
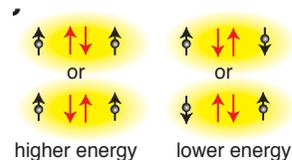
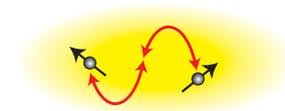
$$E_{CSA} = \hbar \gamma_S \frac{c_{\parallel} - c_{\perp}}{3} B_0 (1 - 3\cos^2\theta) m_S$$



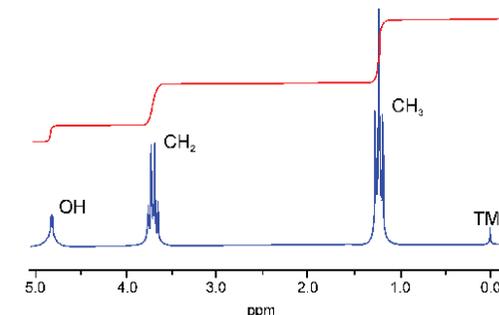
Faire communiquer les spins
à travers les électrons de liaison

COUPLAGE SCALAIRE

Liaisons chimiques
Nombre de voisins
Relier des fréquences les unes aux autres
Information angulaire



► Structures fines dépendent du nombre voisins



Faire communiquer les spins
à travers les électrons de liaison

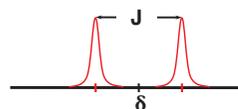
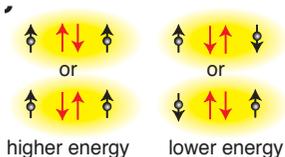
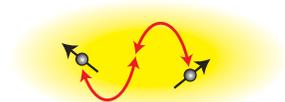
COUPLAGE SCALAIRE

Liaisons chimiques
Information angulaire
Nombre de voisins
Relier des fréquences les unes aux autres

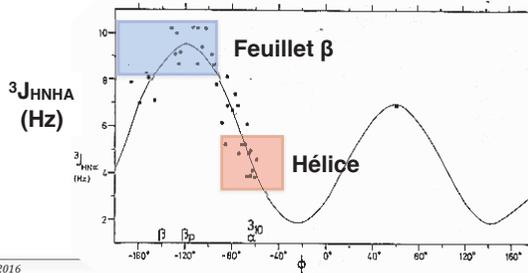
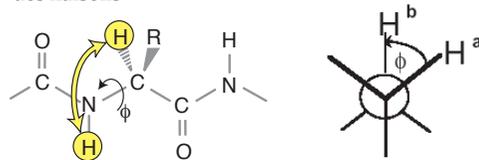
Faire communiquer les spins
à travers les électrons de liaison

COUPLAGE SCALAIRE

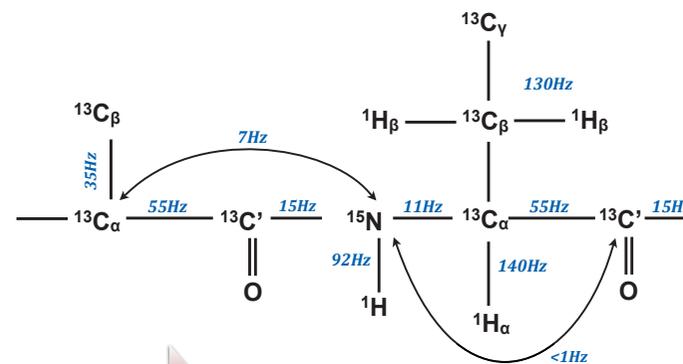
Liaisons chimiques
Relier des fréquences les unes aux autres
Nombre de voisins
Information angulaire



► La constante de couplage dépend de la géométrie des liaisons



► Transfert de polarisation entre deux spins



Délai pour transférer la polarisation d'un noyau à un autre ~1/2J

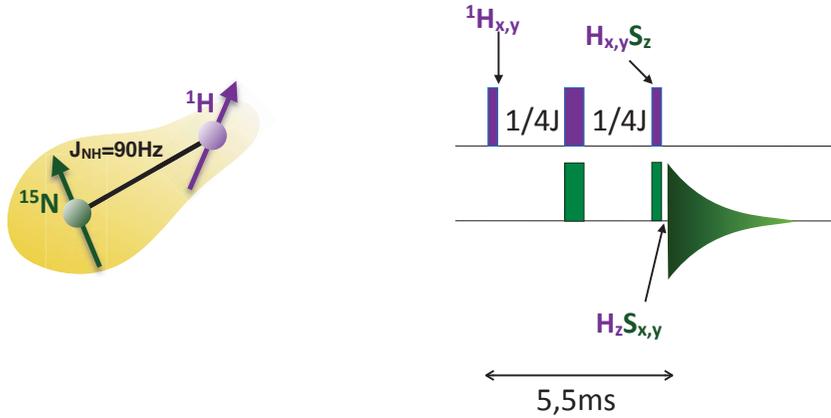
Faire communiquer les spins à travers les électrons de liaison

COUPLAGE SCALAIRE

Liaisons chimiques
Relier des fréquences les unes aux autres

Nombre de voisins
Information angulaire

► Tranfert de polarisation le long de la liaison



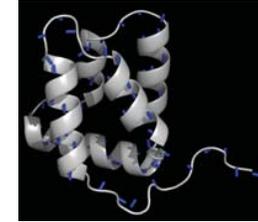
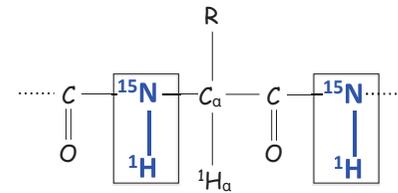
Faire communiquer les spins à travers les électrons de liaison

COUPLAGE SCALAIRE

Liaisons chimiques
Relier des fréquences les unes aux autres

Nombre de voisins
Information angulaire

► Tranfert de polarisation $^1\text{H}^N \rightarrow ^{15}\text{N}$ très efficace



“faire parler” entre eux des spins de nature différente à travers des liaisons chimiques

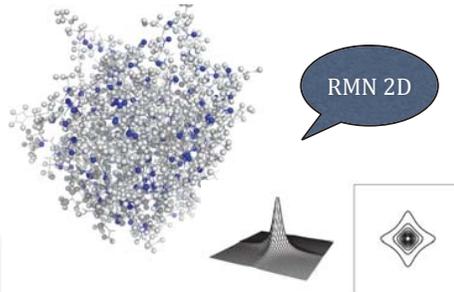
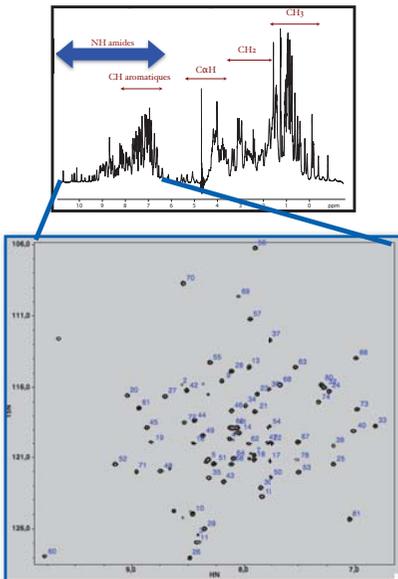
- Spectre à 2 dimensions : par exemple une dimension proton et une dimension azote 15.
- Eclater l'information sur une deuxième dimension

Faire communiquer les spins à travers les électrons de liaison

COUPLAGE SCALAIRE

Liaisons chimiques
Relier des fréquences les unes aux autres

Nombre de voisins
Information angulaire



≈ 1 pic par acide aminé

- Caractéristique d'une protéine dans un environnement donné
- Empreinte de l'état de la protéine

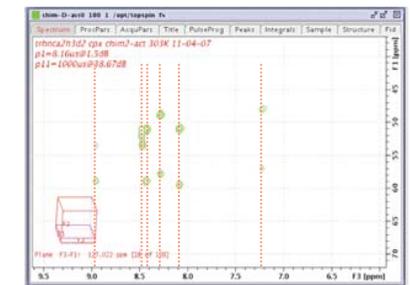
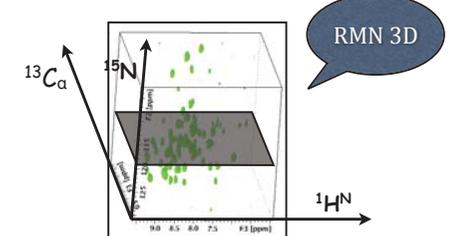
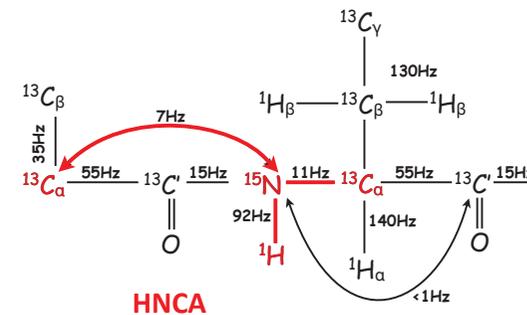
Faire communiquer les spins à travers les électrons de liaison

COUPLAGE SCALAIRE

Liaisons chimiques
Relier des fréquences les unes aux autres

Nombre de voisins
Information angulaire

► Séquences d'impulsions spécifiques :
relier les spins de manière sélective



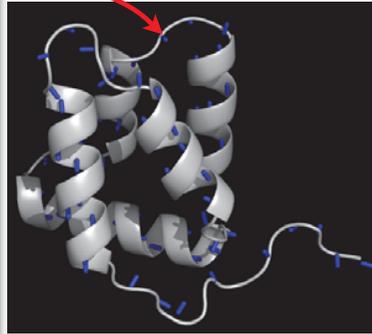
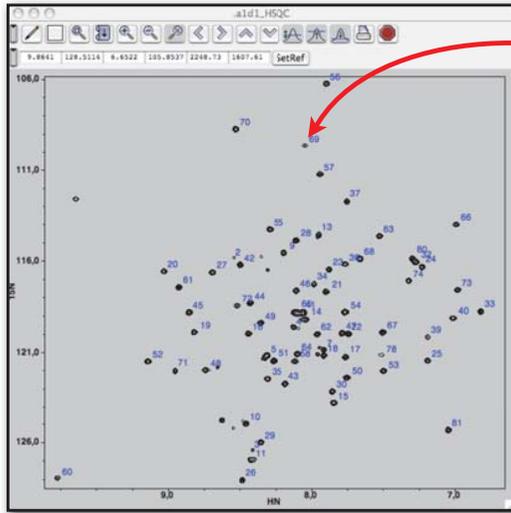
Faire communiquer les spins à travers les électrons de liaison

COUPLAGE SCALAIRE

Liaisons chimiques
Relier des fréquences les unes aux autres

Nombre de voisins
Information angulaire

► Séquences d'impulsions spécifiques : Attribution des résonances



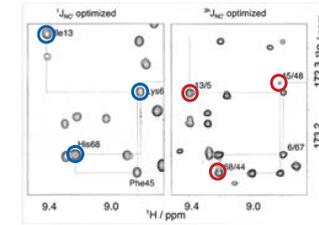
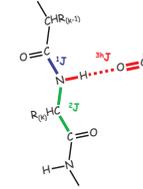
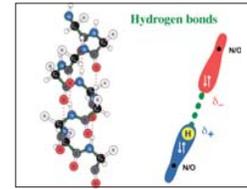
Faire communiquer les spins à travers les électrons de liaison

COUPLAGE SCALAIRE

Liaisons chimiques

Nombre de voisins
Relier des fréquences les unes aux autres
Information angulaire

► Mise en évidence de partage électronique le long d'une liaison hydrogène



Left : $^1\text{H(N)CO}$, T=16ms, $\Delta=0$ (64 scans)
Right : Long range H(N)CO , T=66ms, $\Delta=0$ (1024 scans)

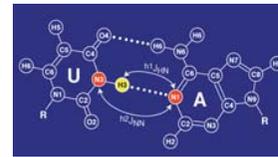
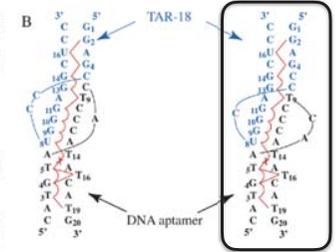
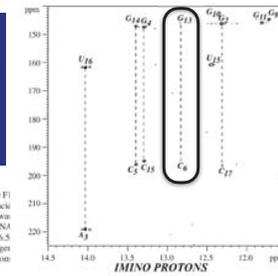


Figure 3. 2D ^1H - ^{15}N HMQC-COSY spectrum showing the correlation along the F1 dimension of two imino ^{15}N / ^{15}N across the hydrogen bond in nucleic acid base pairs, by internucleotide ^1H scalar coupling. The experiment was recorded on a 600 MHz spectrometer at 15°C on an ~ 1 mM TAR-18-DNA complex sample in 150 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5. The magnetization transfer time from the ^{15}N of one strand to the hydrogen bonded ^{15}N of the opposite strand was set to 40 ms. The five correlations showing the base pairing along the RNA stems are shown as dotted lines.



Colin et al., Nucleic Acid Research 2000, 28, 3386

Faire communiquer les spins à travers l'espace

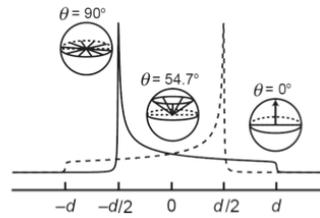
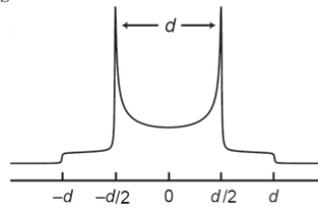
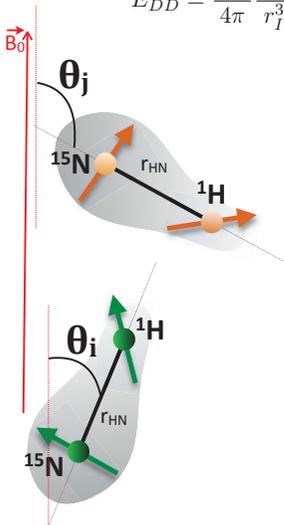
COUPLAGE DIPOLAIRE

Orientations relatives
Information angulaire

Distances en les spins

Interaction dipolaire

$$E_{DD} = \frac{\mu_0 \hbar \gamma_I \gamma_S}{4\pi r_{IS}^3} (1 - 3\cos^2\theta) m_I m_S$$



$D=f(\theta)$ (0-10⁵Hz)

► milieu orienté / solide

$D=0$

► milieu isotrope, réorientation rapide

Faire communiquer les spins à travers l'espace

COUPLAGE DIPOLAIRE

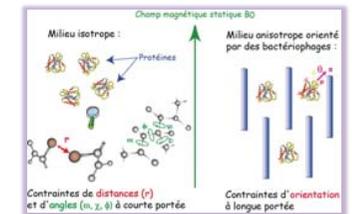
Orientations relatives
Information angulaire

Distances en les spins

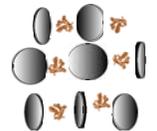
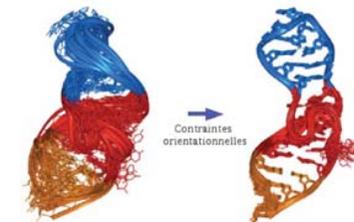
► Retrouver des informations angulaires en solution : Couplages Dipolaires Résiduels (Residual Dipolar Couplings RDCs)

- Milieux "orientants" de types cristal liquide
- Faible orientation des macromolécules, réorientation rapide

$$D_{\text{residual}}=f(\theta) \quad (10-30\text{Hz})$$



- Orientations relatives de domaines
- Affinement de structures
- Structures secondaires résiduelles



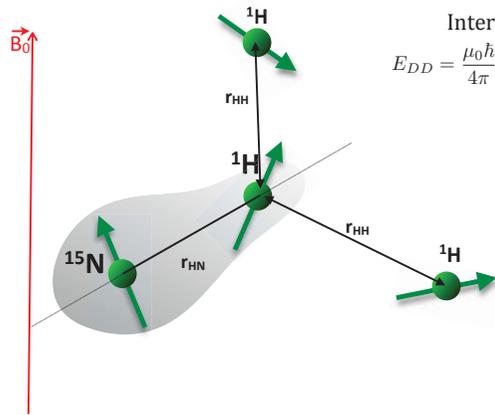
Faire communiquer les spins à travers l'espace

COUPLAGE DIPOLAIRE

Distances entre les spins

Orientations relatives
Information angulaire

► Mesurer des distances entre spins : l'effet nOe (nuclear Overhauser effect)



Interaction dipolaire

$$E_{DD} = \frac{\mu_0 \hbar \gamma_I \gamma_S}{4\pi r_{IS}^3} (1 - 3\cos^2\theta) m_I m_S$$

Relaxation croisée dipolaire

► Constante de vitesse de relaxation liée à l'interaction dipolaire

$$\sigma_{IS} \propto \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2}{r_{IS}^6} f(\tau_c)$$

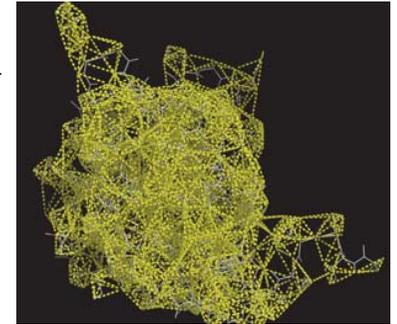
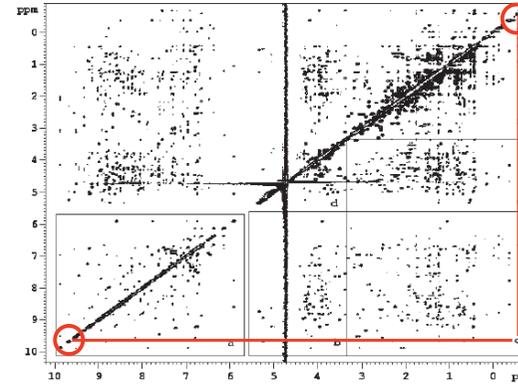
Faire communiquer les spins à travers l'espace

COUPLAGE DIPOLAIRE

Distances entre les spins

Orientations relatives
Information angulaire

NOESY



► Détermination de structures tridimensionnelles

Bruno

Fréquence de résonance
déplacement chimique

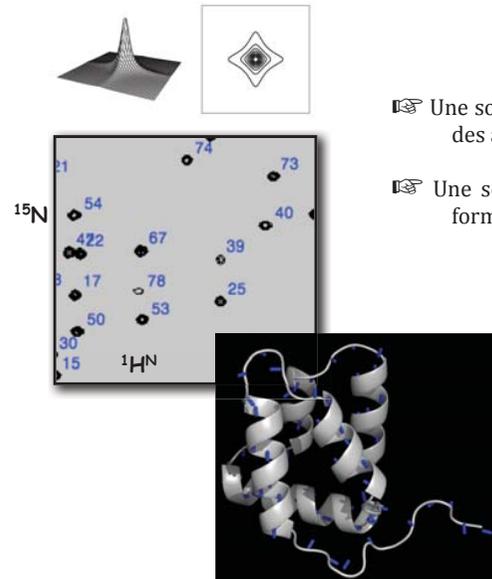
Environnement électronique

Structuration
Structures secondaires
Interactions/Interfaces

Fréquence de résonance
déplacement chimique

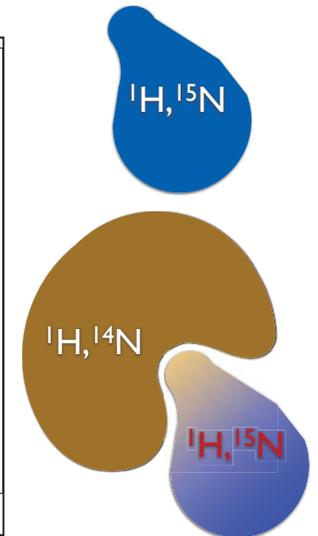
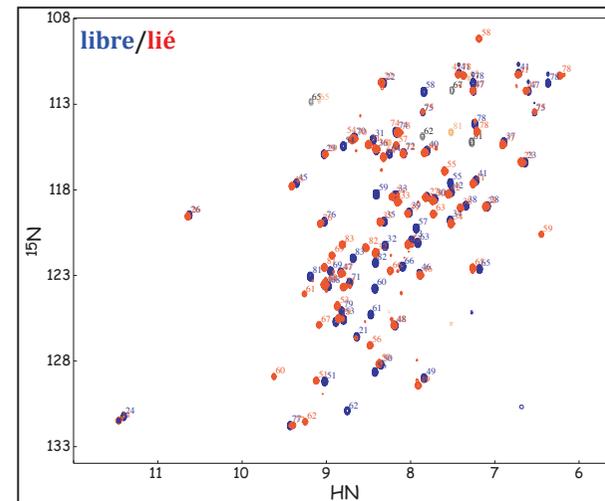
Environnement électronique

Structuration
Structures secondaires
Interactions/Interfaces



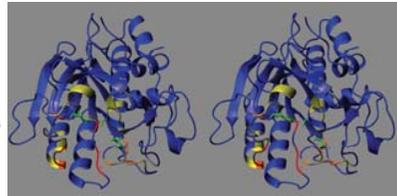
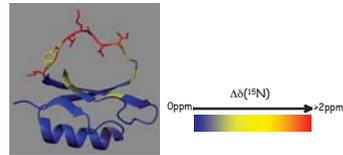
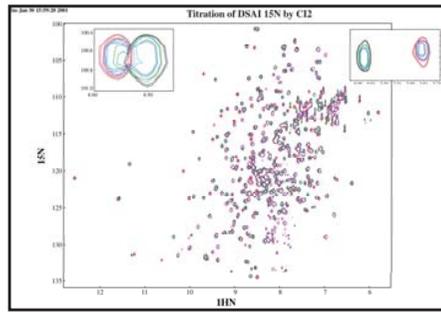
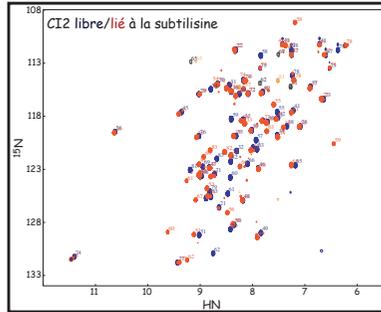
☞ Une sonde locale de l'environnement électronique des atomes : fréquences de résonances.

☞ Une sonde locale de la dynamique du système : forme/largeur des résonances



Fréquence de résonance
déplacement chimique

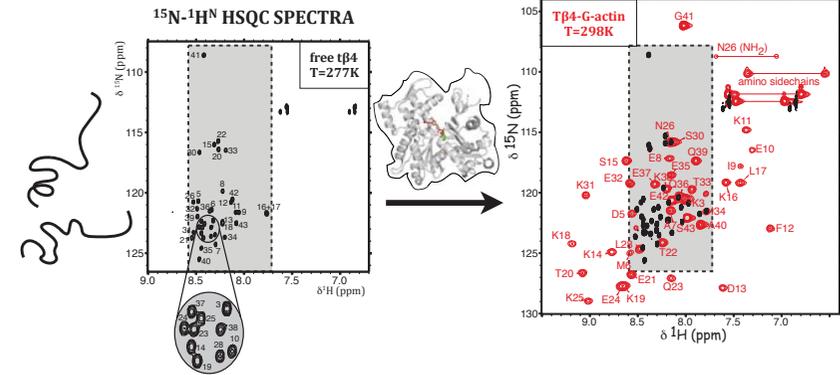
Environnement électronique
Structuration
Structures secondaires
Interactions/Interfaces



Fréquence de résonance
déplacement chimique

Environnement électronique
Structuration
Structures secondaires
Interactions/Interfaces

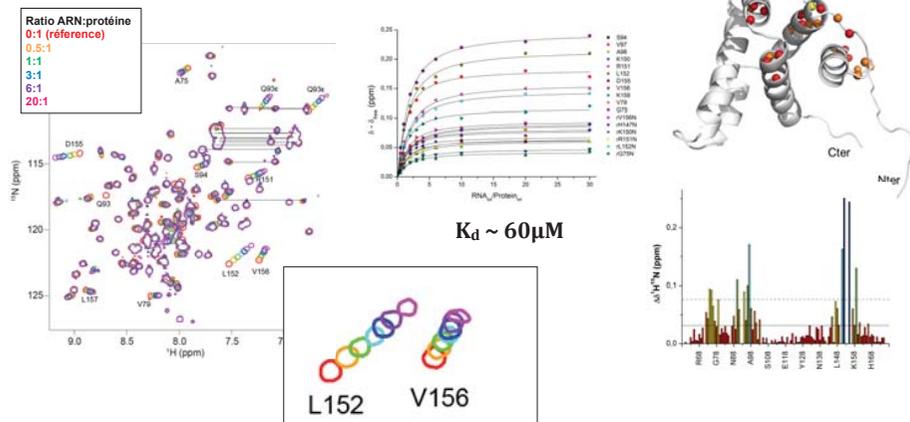
Changements conformationnels/repliement au cours d'une interaction



Fréquence de résonance
déplacement chimique

Environnement électronique
Structuration
Structures secondaires
Interactions/Interfaces

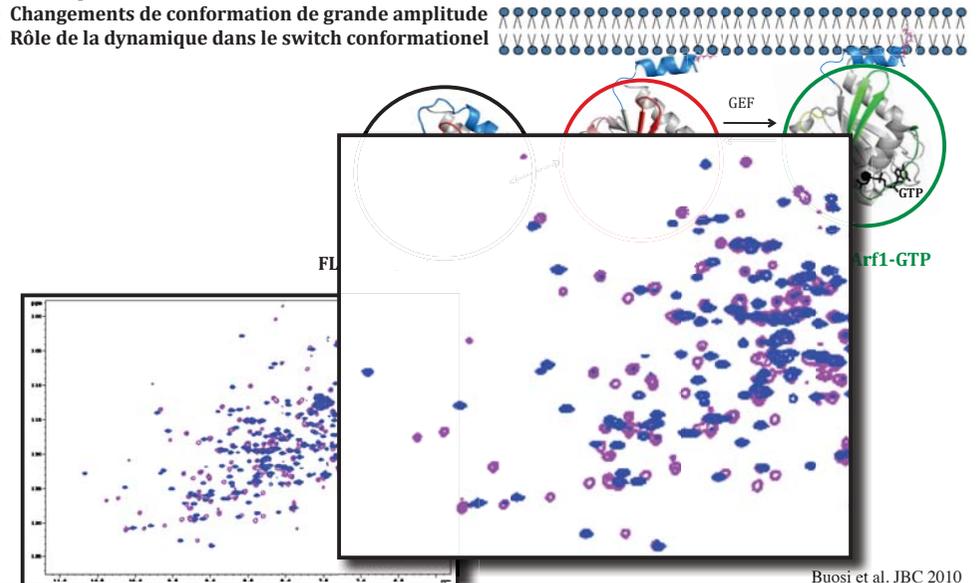
Titration, zone d'interaction et mesure de Kd



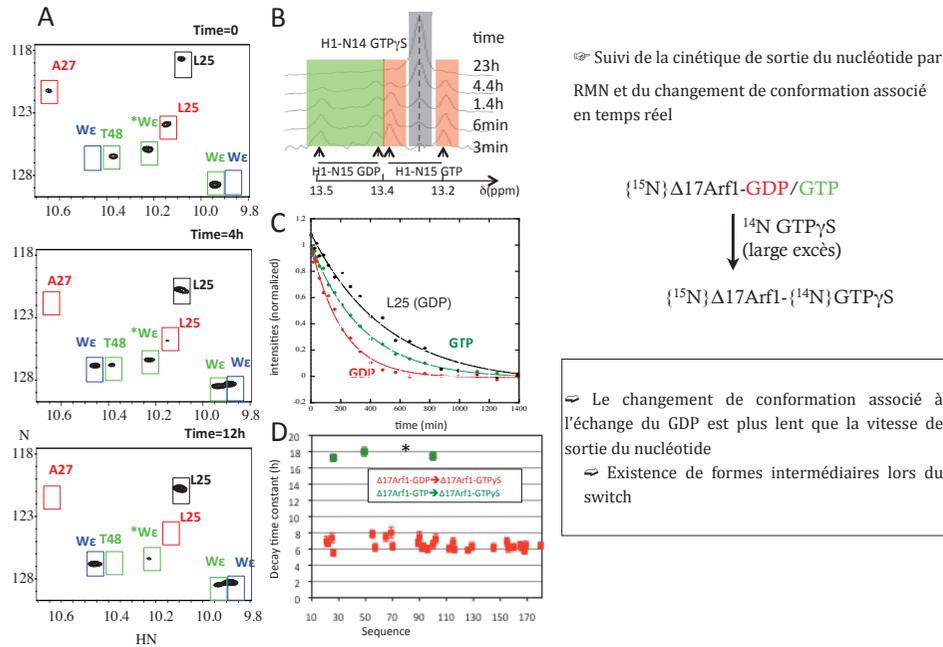
Fréquence de résonance
déplacement chimique

Environnement électronique
Structuration
Structures secondaires
Interactions/Interfaces

- Interrupteur moléculaire
- Changements de conformation de grande amplitude
- Rôle de la dynamique dans le switch conformationnel



► Suivi de cinétique de changement de conformation

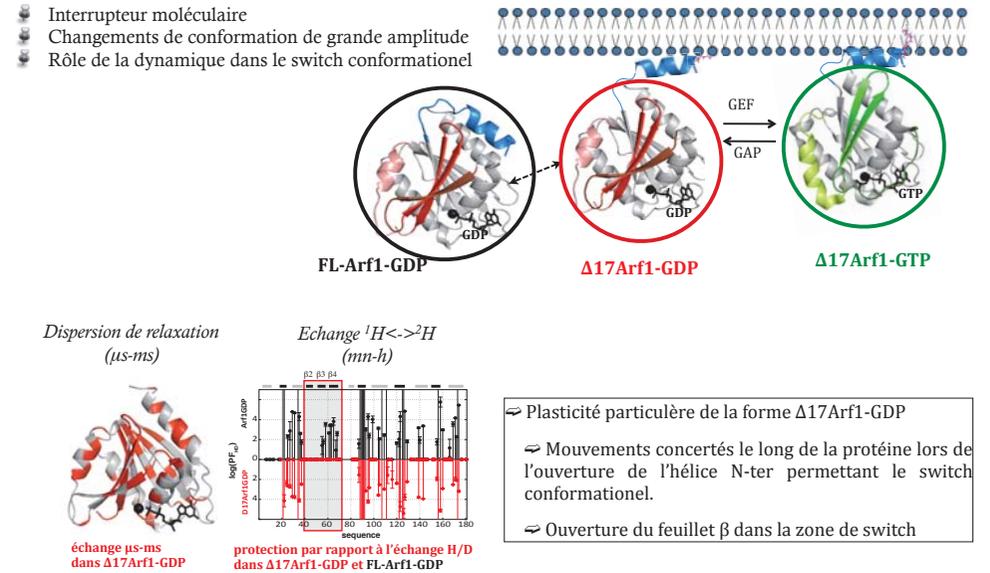


◀ Suivi de la cinétique de sortie du nucléotide par RMN et du changement de conformation associé en temps réel

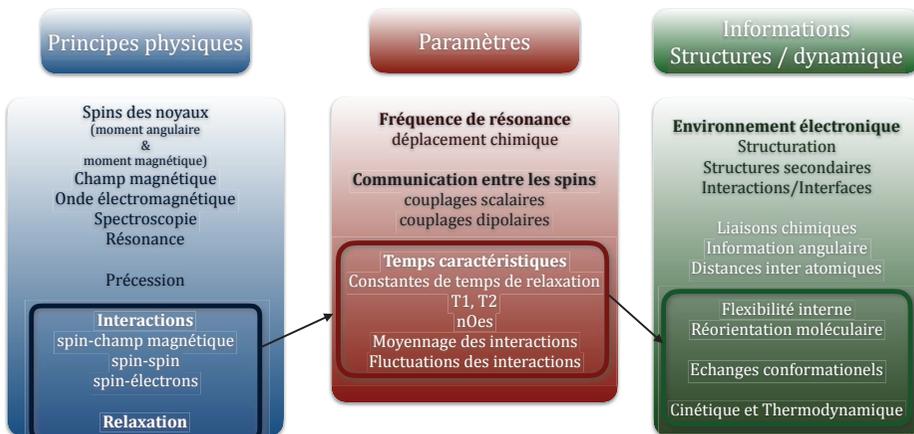


◀ Le changement de conformation associé à l'échange du GDP est plus lent que la vitesse de sortie du nucléotide
 ◀ Existence de formes intermédiaires lors du switch

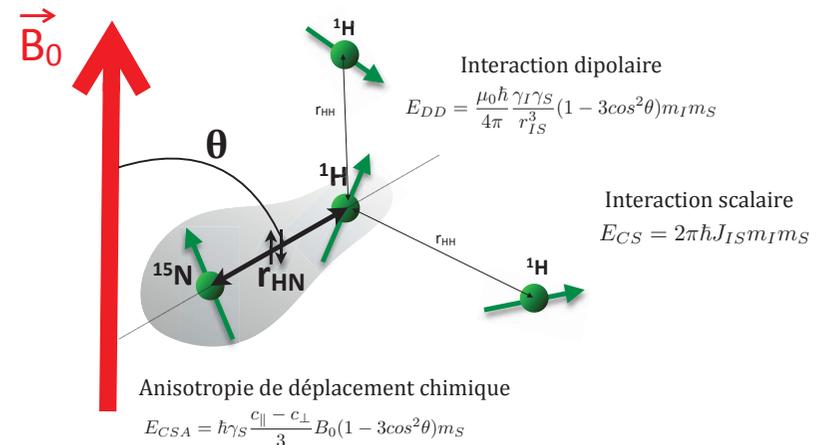
Un exemple de l'apport de la RMN dans la relation dynamique/fonction:
 Le rôle de la dynamique dans le switch conformationnel de petites protéines G



Résonance Magnétique Nucléaire



► f(environnement(t), r(t), θ (t))



Les gammes de temps en RMN

Information dynamique

Les gammes de temps accessibles sont liés au temps caractéristiques de la RMN

Trois grandes échelles de temps/fréquences caractéristiques en RMN

o Le temps de retour à l'équilibre T_1 et le temps de vie du signal T_2

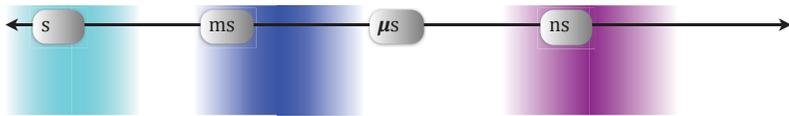
- Expérience de RMN \leftrightarrow perturbation du système de spins
- Ordre de grandeur du temps de retour à l'équilibre : Centaine de ms - s (T_1) / 10ms-s (T_2)
- Détermine la fréquence minimale des mouvements que l'on peut mettre en évidence au cours d'une expérience de RMN
- Détermine la largeur des résonances

o L'échelle de temps spectrale : $\tau=1/\Delta\nu$

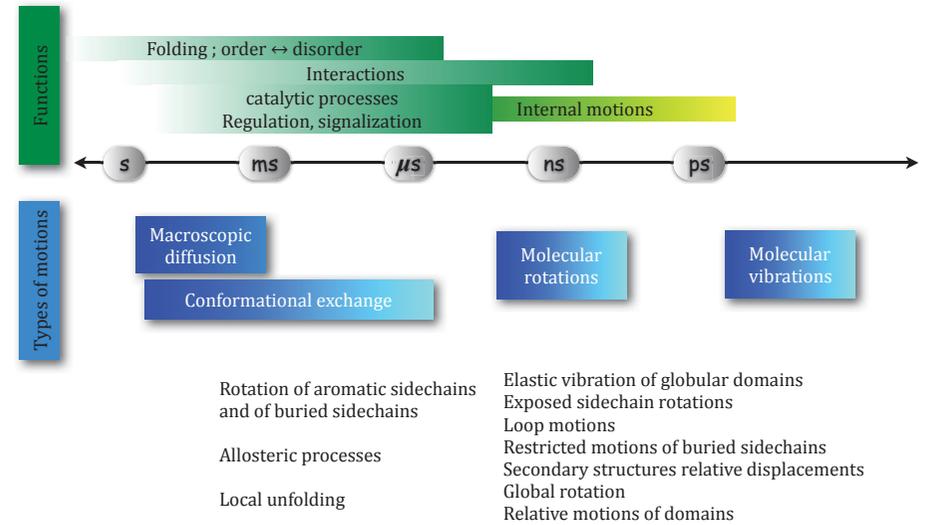
- Caractéristiques spectrales : gamme de déplacements chimiques, couplages, ...
- Moyennage des interactions par les mouvements de fréquence supérieure à cette échelle
- Perturbation de l'allure des spectres par les mouvements autour de cette échelle de temps

o L'échelle de temps « de Larmor » : ω_0

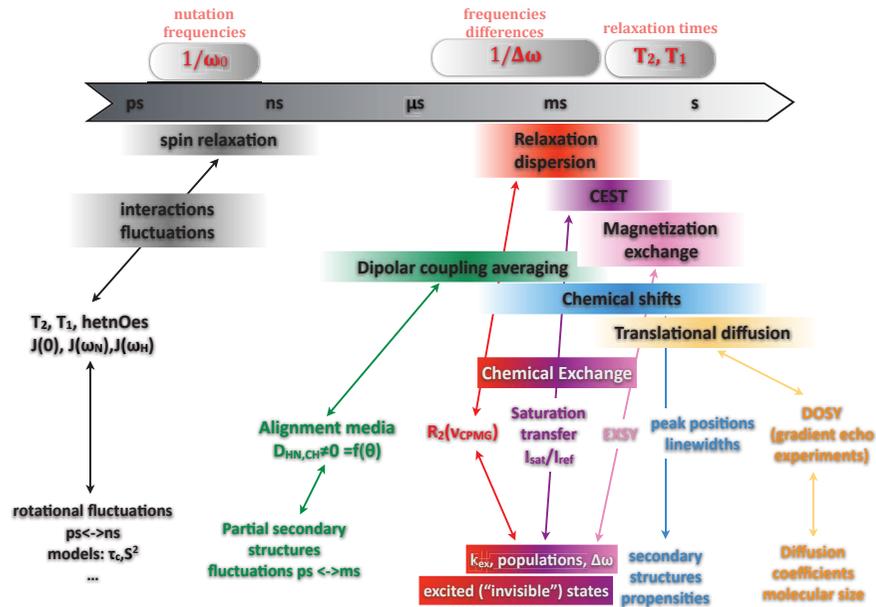
- Fréquence de précession des spins dans un champ magnétique $B_0 = \omega_0 / \gamma$
- Efficacité des transitions entre ces niveaux lors des processus de relaxation est déterminée par la « densité spectrale » des fluctuations moléculaires à ces fréquences.



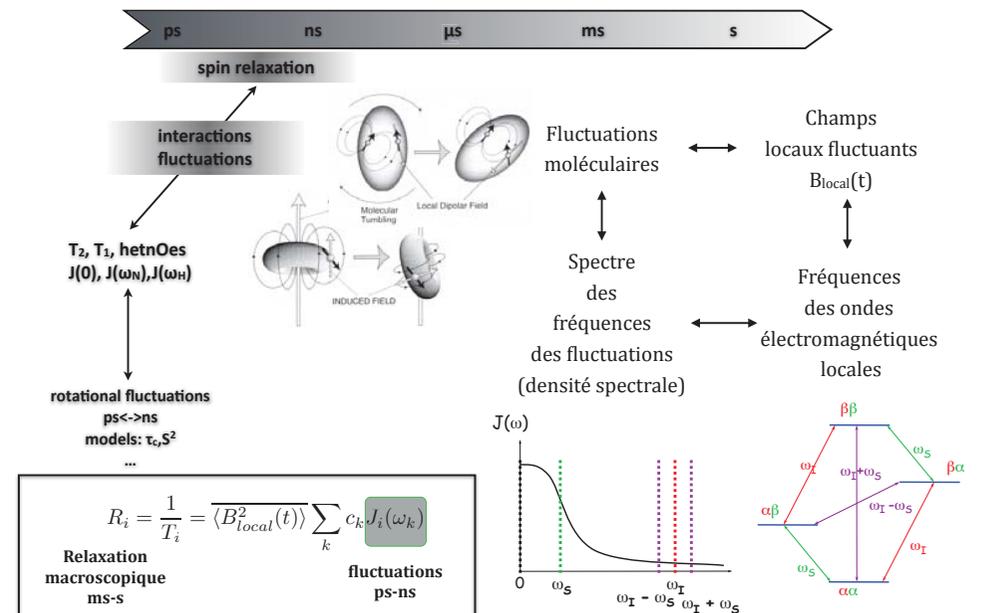
Les échelles de temps



Echelle de temps des mouvements et paramètres RMN

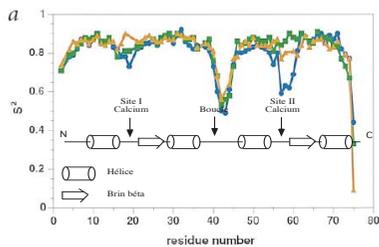


Echelle de temps des mouvements et paramètres RMN



Échelle de temps de Larmor relaxation des spins ⇔ flexibilité locale (ps-ns)

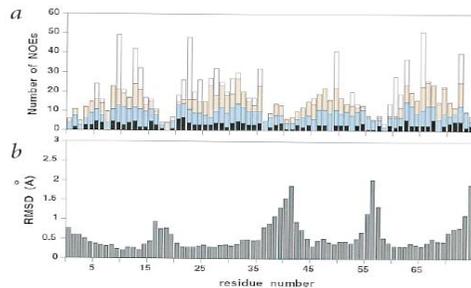
- Mesure de 3 paramètres de relaxation: R1, R2, et hetNOE qui donnent des informations sur la flexibilité locale des liaisons ¹H-¹⁵N dans une gamme 100ps-ns.
- Flexibilité locale au sein de protéines "structurées"



Calbindin D_{9k}
Apo
(Ca₂₊)₁-N56A
(Cd₂₊)₁¹¹

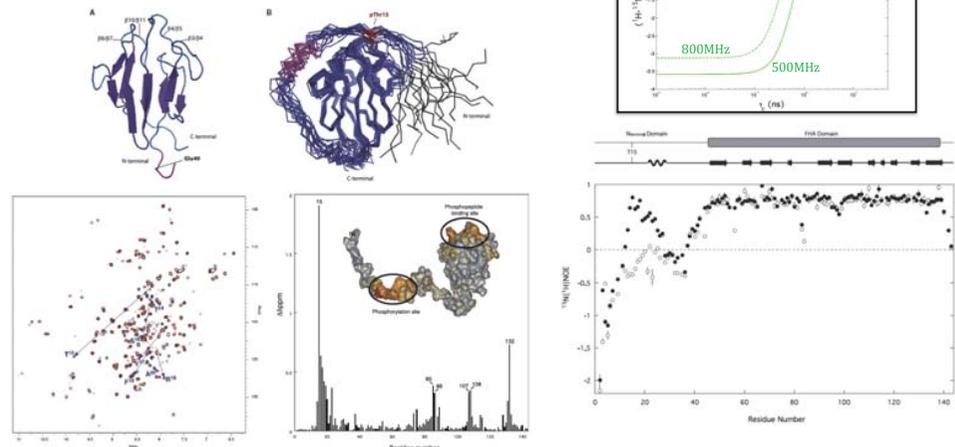


Mäler et al., Nat. Struct. Biol. 7, 245 (2000)



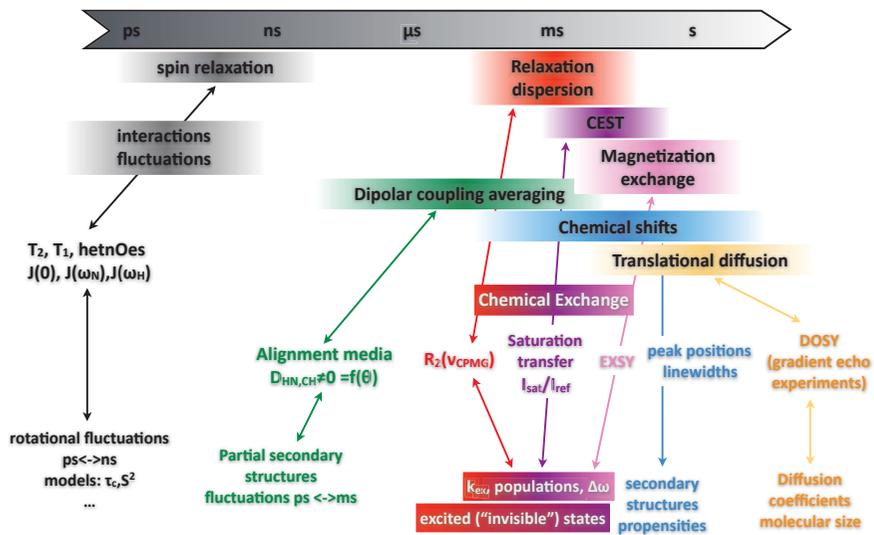
Échelle de temps de Larmor relaxation des spins ⇔ flexibilité locale (ps-ns)

En pratique: la mesure des nOEs hétéronucléaires (¹H->¹⁵N) est facile et donne une information qualitative sur la flexibilité locale dans la gamme des 100ps.



Barthe et al., "Dynamic and Structural Characterization of a Bacterial FHA Protein Reveals a New Autoinhibition Mechanism". Structure 17, 568-578 (2009).

Echelle de temps des mouvements et paramètres RMN



Echelle de temps des mouvements et paramètres RMN

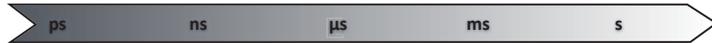
Chemical Exchange peak positions linewidths

thermodynamic parameters
 $K_{eq} = k_1/k_{-1} = p_B/p_A$
 $\Delta G = -RT \ln K$

kinetic parameters
 $k_{ex} = 1/\tau_{ex} = k_1 + k_{-1} = k_1/p_B = k_{-1}/p_A$
 $k_{ex}(T) = k_0 \exp(-E_a/RT)$

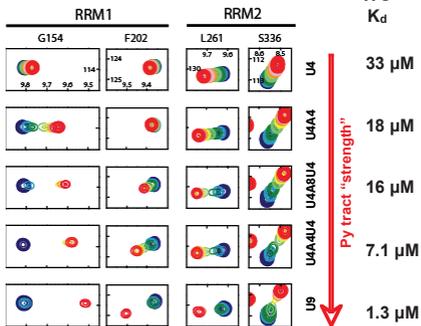
► Deux conformations : deux jeux de pics

Echelle de temps des mouvements et paramètres RMN



U2AF65 conformation depends on Py tract strength

Exchange regime & RNA binding affinity



Deux conformations: un ou deux jeux de pics

(Michael Sattler personal communication)
Carine van Heijenoort - La RMN, un outil pour la biologie - RéNaFoBis - Oléron - 2016

Chemical shifts
Chemical Exchange peak positions linewidths

Intermolecular processes

$$P + L \xrightleftharpoons[k_{off}]{k_{on}} PL$$

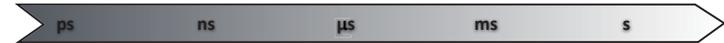
$$\delta_{P_f} \quad \delta_{L_f} \quad \delta_{P_b} \quad \delta_{L_b}$$

$$k_{ex} = k_{on}[P] + k_{off}$$

$$k_{ex} = k_{on}[L] + k_{off}$$

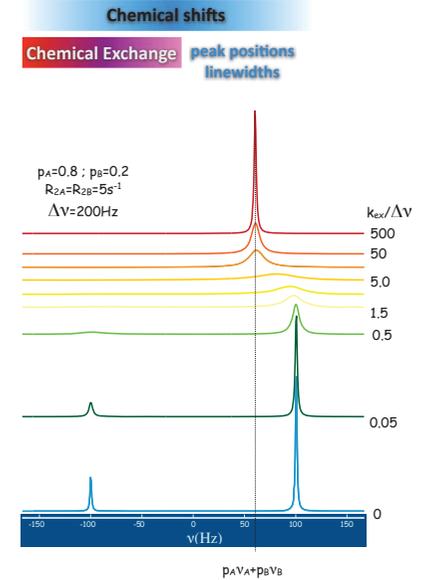
$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Echelle de temps des mouvements et paramètres RMN



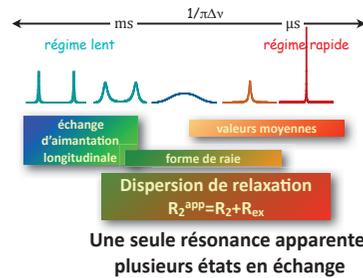
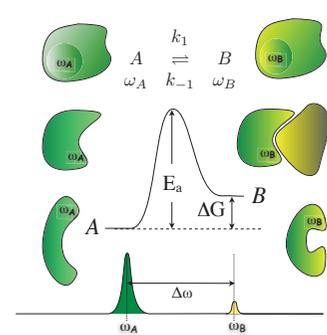
- Les mouvements dans la gamme de la μ s-ms provoquent une modification de l'allure des spectres.
- Ces mouvements correspondent en général à un échange conformationnel, ou échange chimique.
- L'effet sur les spectres dépend des valeurs relatives de k_{ex} (τ_{ex}) et de $\Delta\omega/2$ ($2/\Delta\omega$). On parle d'échange **lent** ou **rapide** à l'échelle des déplacements chimiques.

- Echange "rapide": $\Delta\omega \ll k_{ex}$
 - Un pic $\omega = p_A\omega_A + p_B\omega_B$
 - $R_{ex} \propto B_0^2$
- On ne connaît pas le nombre de sites en échange
- Echange "intermédiaire": $\Delta\omega \approx k_{ex}$
 - Un ou deux pics élargis
 - $R_{ex} \propto B_0$
- Echange "lent": $\Delta\omega \gg k_{ex}$
 - Deux pics
 - R_{ex} indépendant de B_0
 - $R_{ex}^{(B)} \rightarrow k_{BA} = p_A k_{ex}$; $R_{ex}^{(A)} \rightarrow k_{AB} = p_B k_{ex}$
 - $p_A \gg p_B \Rightarrow R_{ex}(B) \gg R_{ex}(A)$
- Le pic minoritaire peut devenir indétectable



Carine van Heijenoort - La RMN, un outil pour la biologie - RéNaFoBis - Oléron - 2016

Caractériser des échanges conformationnels entre états Cas d'un seul pic observé



Une seule résonance apparente, plusieurs états en échange

paramètres thermodynamiques

$$K_{eq} = k_1/k_{-1} = p_B/p_A$$

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq}$$

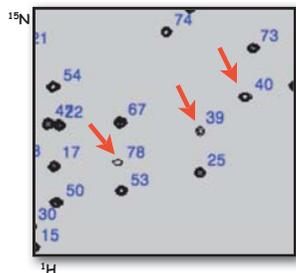
paramètres cinétiques

$$k_{ex} = 1/\tau_{ex} = k_1 + k_{-1} = k_1/p_B = k_{-1}/p_A$$

$$k_{ex}(T) = k_0 \exp(-E_a/kT)$$

paramètres structuraux

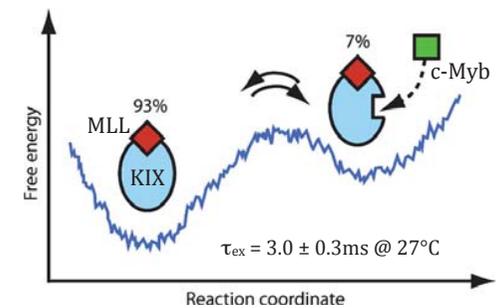
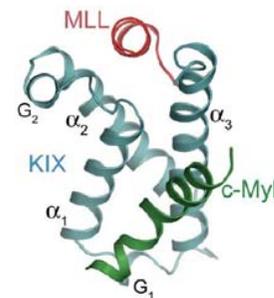
$$\Delta\omega ; \omega_A ; \omega_B$$



Carine van Heijenoort - La RMN, un outil pour la biologie - RéNaFoBis - Oléron - 2016

Caractériser des échanges conformationnels entre états Cas d'un seul pic observé

Direct Observation of the Dynamic Process Underlying Allosteric Signal Transmission



La liaison du domaine d'activation du facteur de transcription MLL à KIX induit une redistribution des populations relatives des conformères de KIX en faveur de l'état dans lequel le site de liaison de c-Myb (pKID) est préformé.

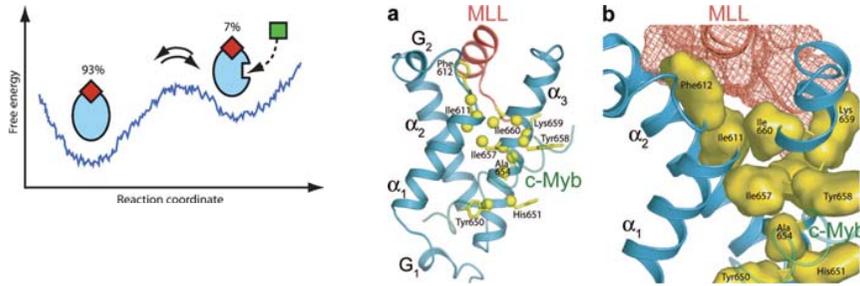
Cet état minoritaire n'est pas détectable dans la forme libre de KIX

Brüschweiler et al, J. Am. Chem. Soc. (2009) 131, 3063-3068

Carine van Heijenoort - La RMN, un outil pour la biologie - RéNaFoBis - Oléron - 2016

Sélection conformationnelle

Direct Observation of the Dynamic Process Underlying Allosteric Signal Transmission

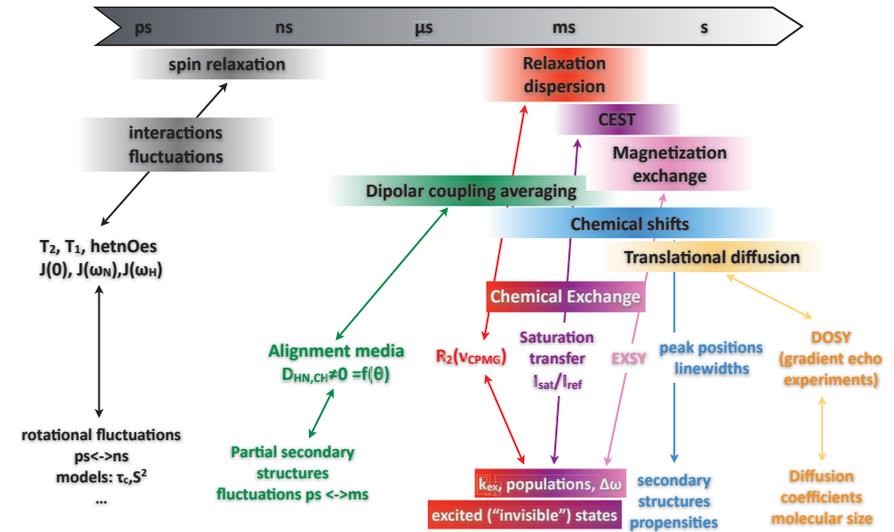


⇒ Les chaînes latérales des isoleucines participent à la formation d'un réseau d'interactions au travers duquel «l'information allostérique» est transmise.

⇒ L'analyse de la transition allostérique du domaine KIX de CBP fournit une description à l'échelle atomique du mécanisme de transmission coopérative d'information entre deux facteurs de transcription.

Brüschweiler et al, J. Am. Chem. Soc. (2009) 131, 3063-3068

Echelle de temps des mouvements et paramètres RMN



Biologie Structurale et RMN

MOTS CLES

- Spins, Champs magnétiques
- Fréquence de résonance
- Spectre
 - Déplacement chimique
 - Largeur de raie
- Environnement électronique
- Communication entre spins
 - Proximité le long des liaisons
 - Proximité dans l'espace

