

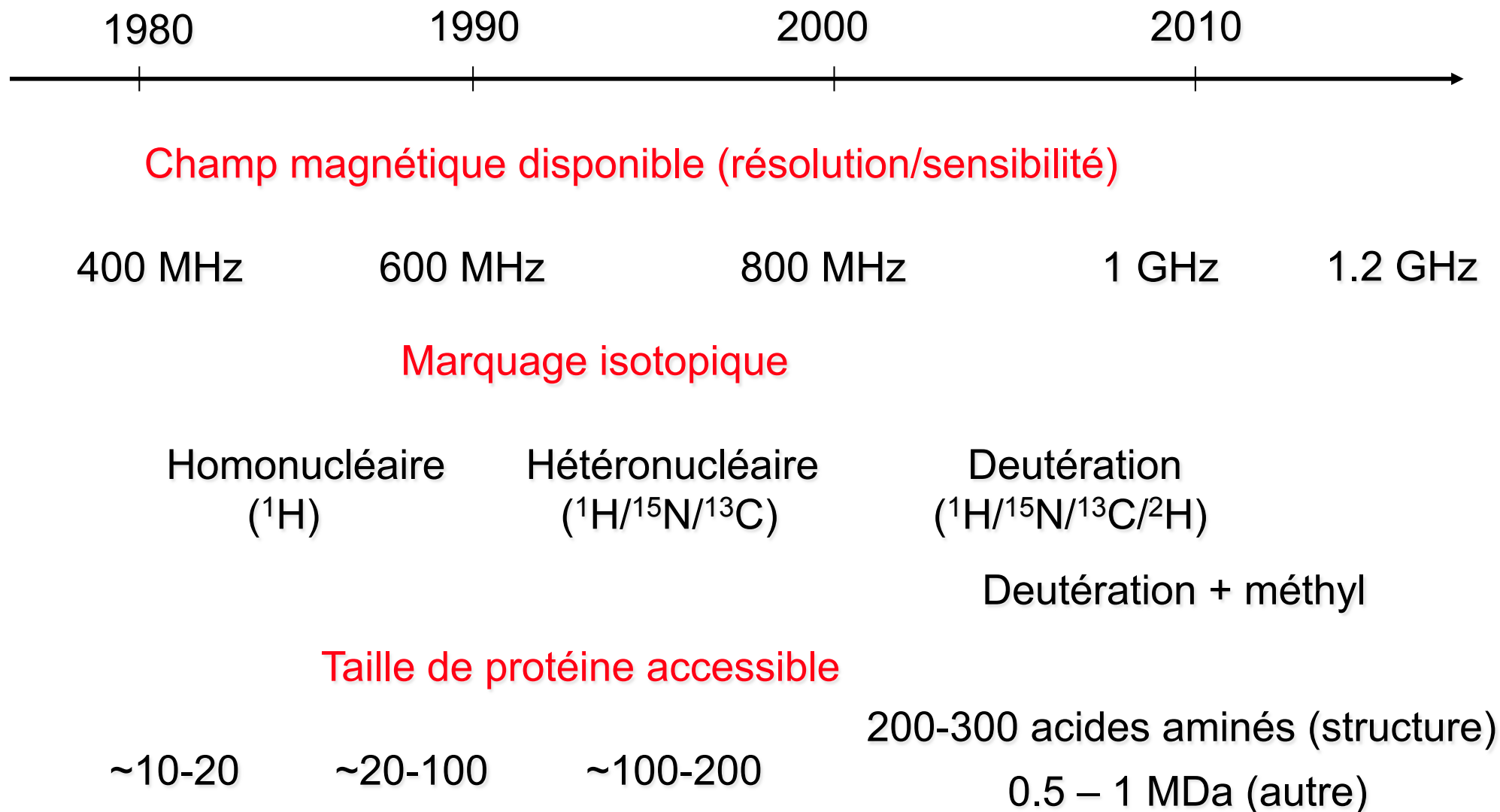
Contributions de la RMN à la biologie structurale : Approches multi-échelles spatiales et temporelles

Ewen Lescop, ICSN, Gif-sur-Yvette
Ecole d'Oléron Renafobis, 21 juin 2017

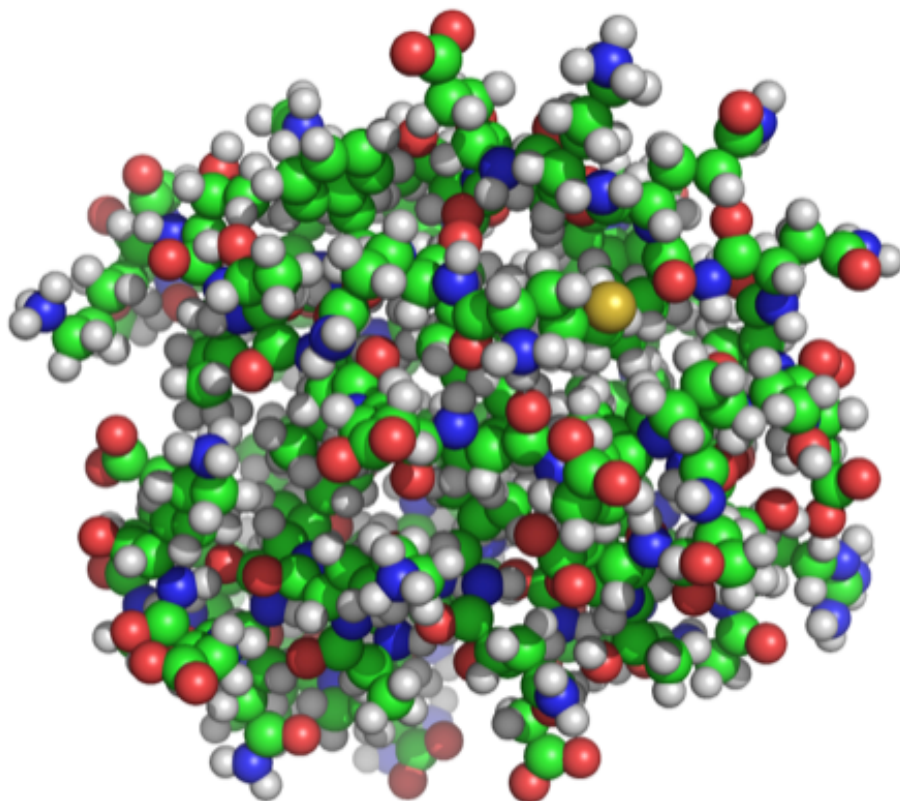
Plan

- ☞ **Considérations pratiques de RMN et protéines**
- ☞ Considérations générales sur l'importance des mouvements en biologie
- ☞ Temps et signaux RMN
- ☞ Méthodes RMN pour accéder aux différentes échelles de temps

Evolution de la RMN des protéines



Composition d'une protéine



Abondance naturelle

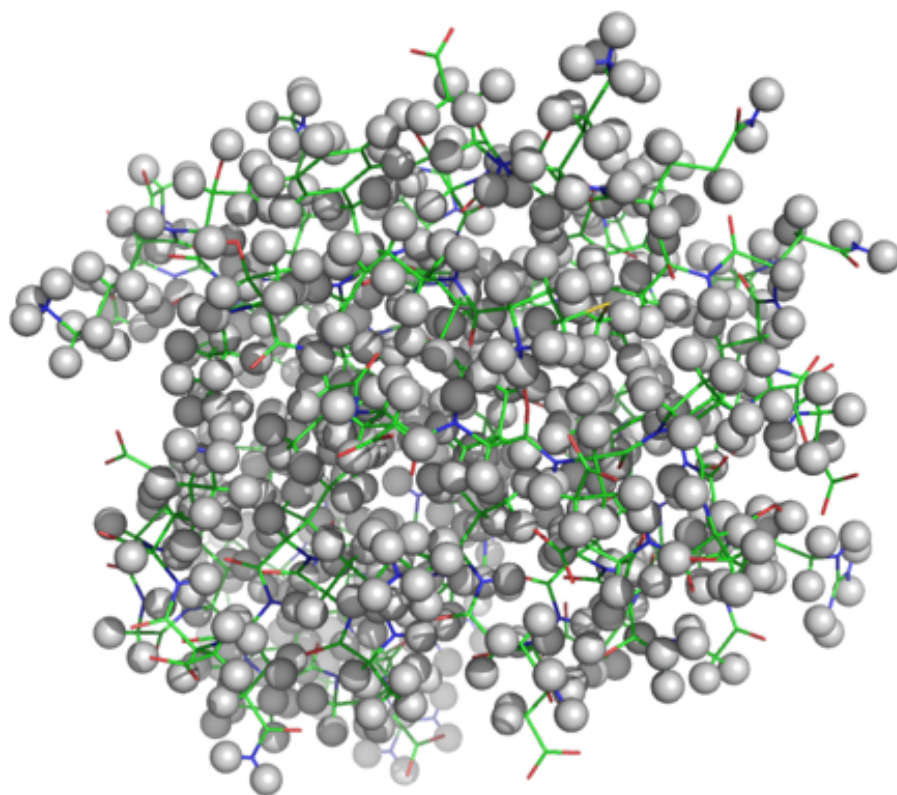
-  H (^1H $S=1/2$)
-  C (^{12}C $S=0$)
-  N (^{14}N $S=1$)
-  O (^{16}O $S=0$)
-  S (^{32}S $S=0$)

Un cadeau de la nature

Noyau	Abondance naturelle (%)	Rapport gyromagnétique ($10^7 \times \text{rad/Ts}$)	ν_0 à 11.7 T	Sensibilité relative
^1H	99.98	26.752	500.13	1
^{13}C ($S=1/2$)	1.11	6.728	125.76	1.6%
^{15}N ($S=1/2$)	0.36	-2.712	50.70	0.1%

Le noyau le plus abondant dans une protéine est aussi celui le plus sensible parmi les isotopes H,C,N!

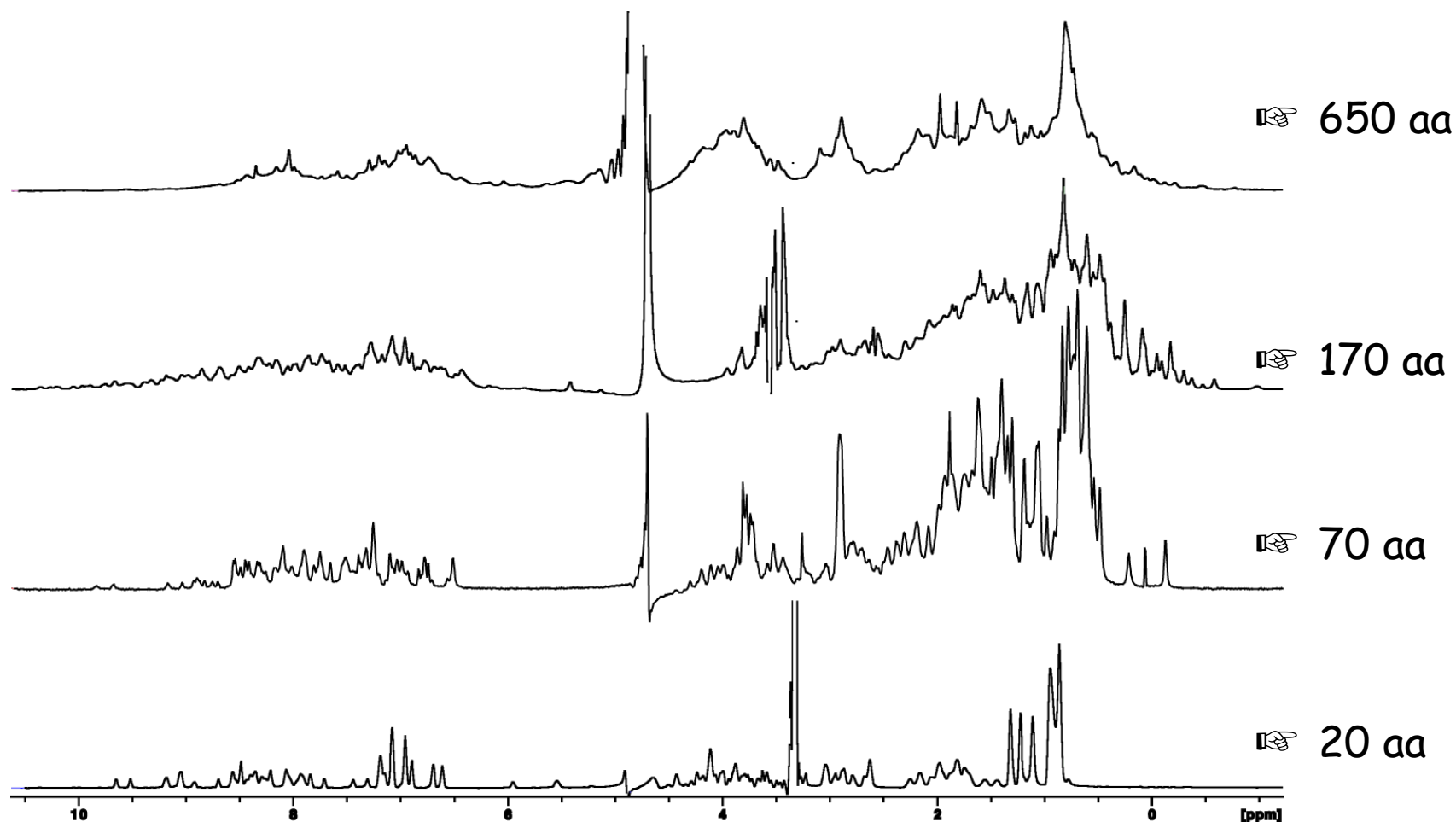
Noyaux visibles en RMN



Abondance naturelle

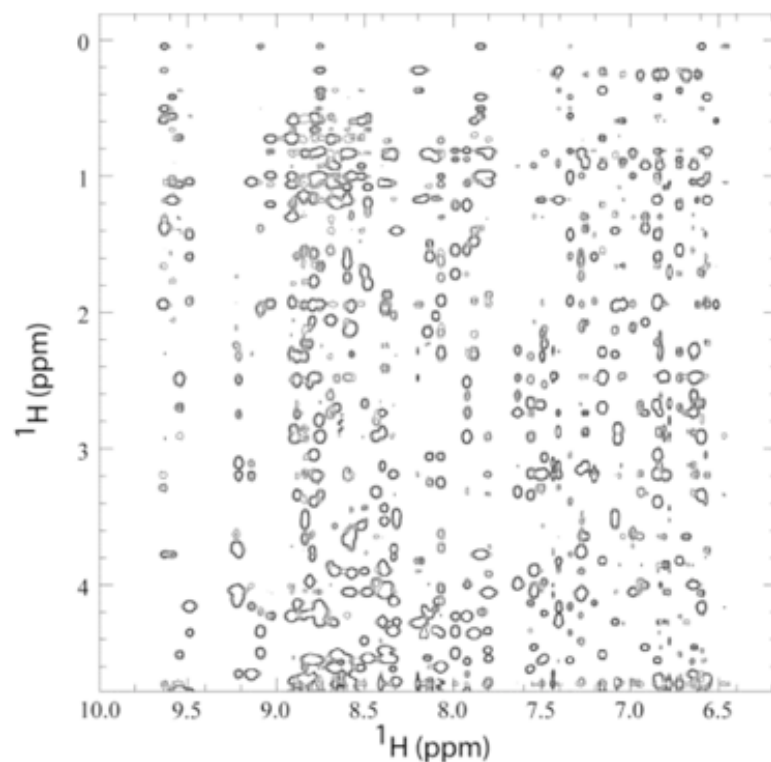


Limitation à ~100 acides aminés

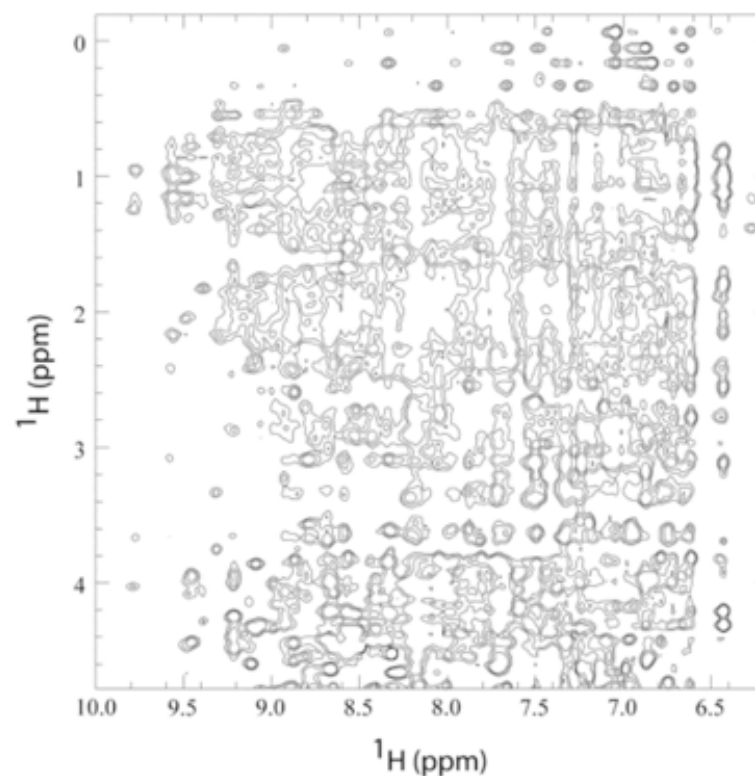


Au-delà de ~100 résidus, l'encombrement des spectres rend l'attribution quasiment impossible

La 2D ne suffit pas



8 kDa (Tendamistat)



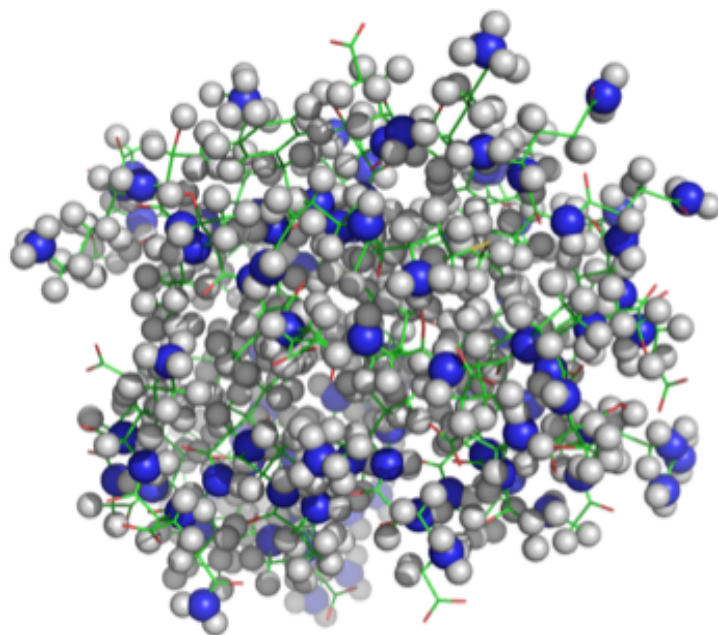
21 kDa (Cdc42)

☞ Les superpositions spectrales deviennent inextricables

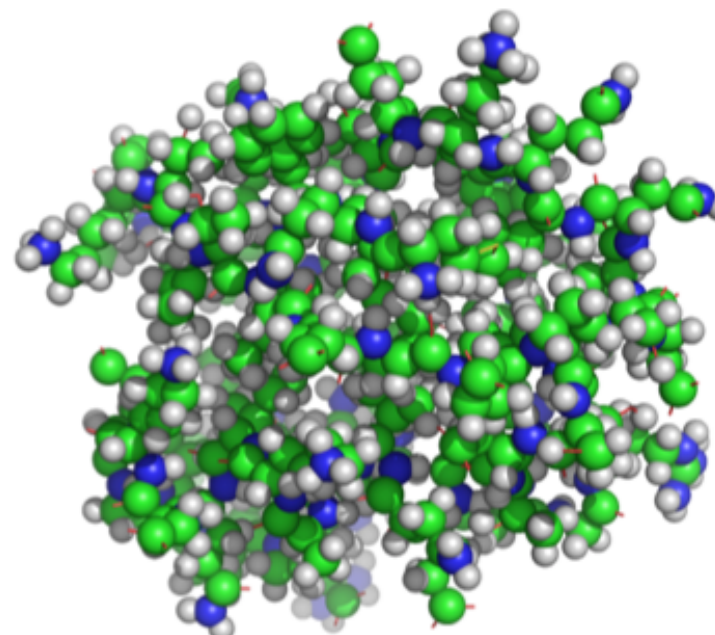
☞ Les risques de mauvaise attribution sont augmentés

Solution: injecter plus d'informations

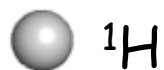
Enrichissement en isotopes ^{15}N et ^{13}C



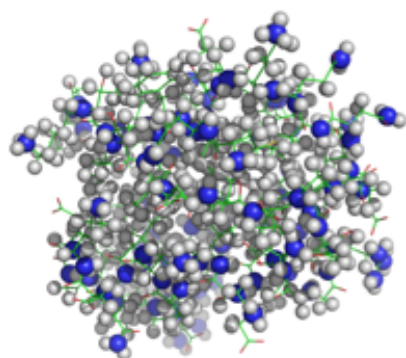
Marquage $^1\text{H}/^{15}\text{N}$



Marquage $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$

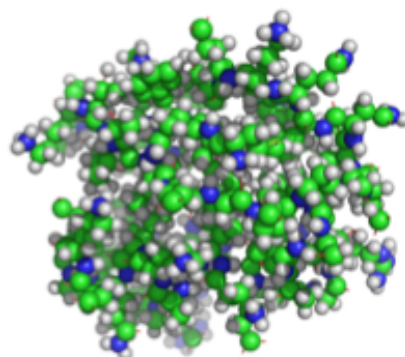


Marquage isotopique



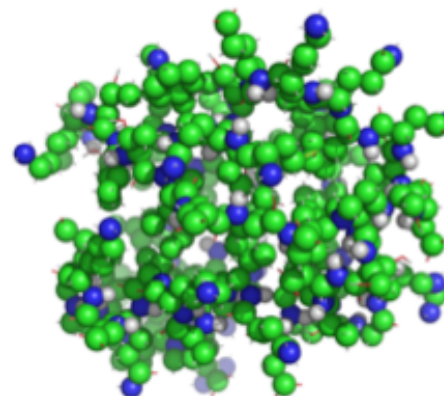
Marquage $^1\text{H}/^{15}\text{N}$

Source : $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$



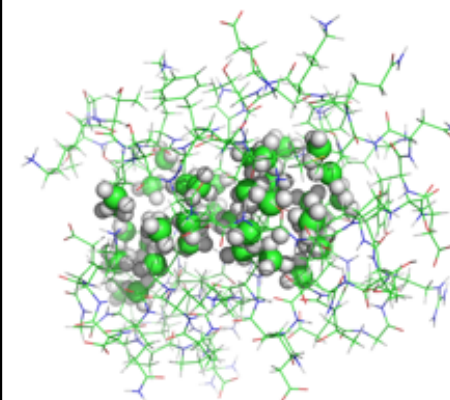
Marquage $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$

Source : $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$
et ^{13}C -glucose



Marquage $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$

Source : $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$,
 ^{13}C -glucose et D_2O



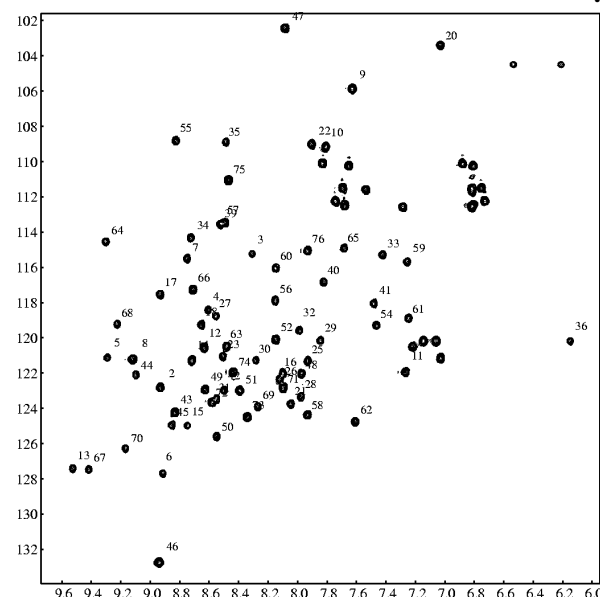
Marquage $^2\text{H} / ^{13}\text{CH}_3$

Source : D_2O et
précurseur d'acides
aminés

et autres: marquages spécifiques de certains acides aminés

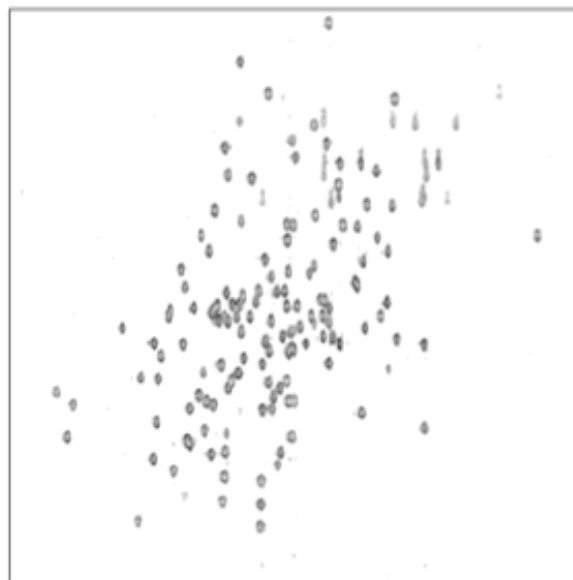
Taille de protéine

Marquage ^{15}N

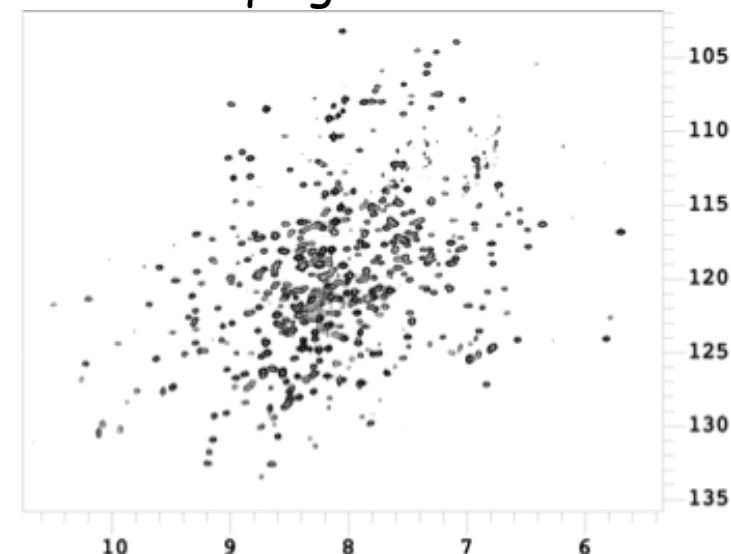


76 aa

Marquage $^{15}\text{N} / ^2\text{H}$



150 aa



600 aa

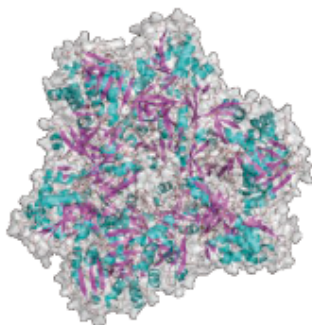
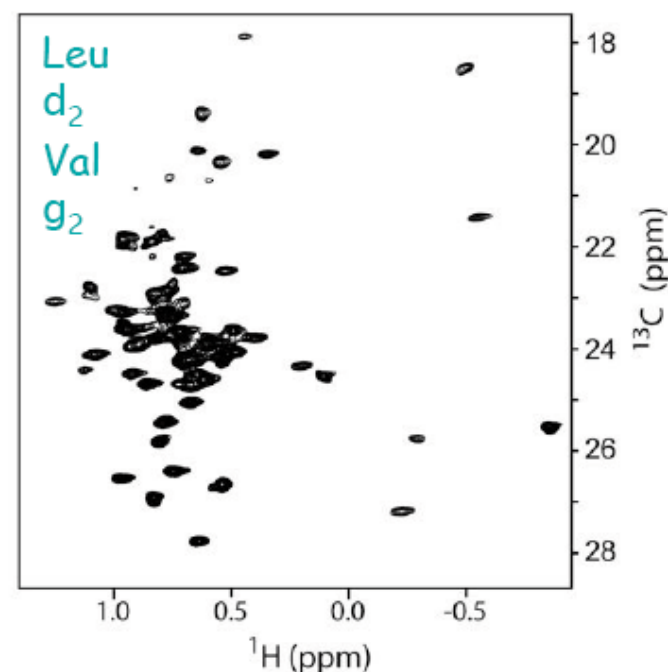
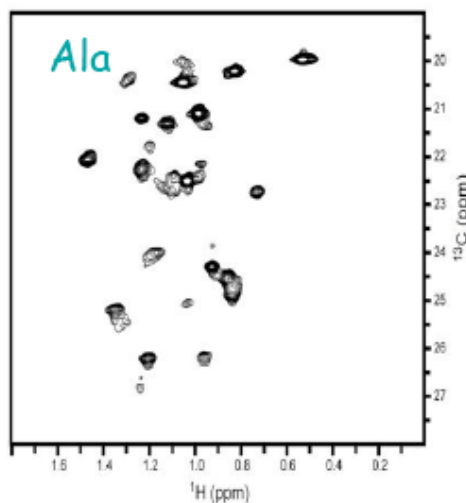
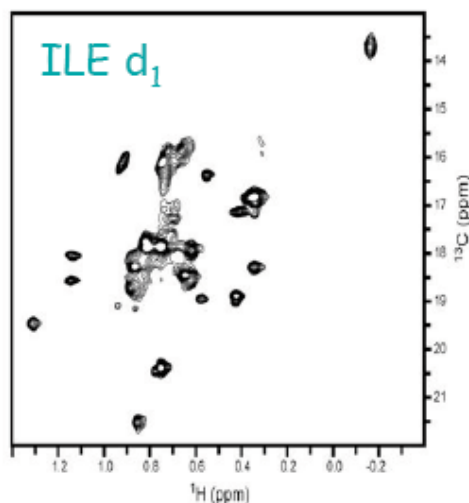
- ☞ Les spectres ^{15}N -HSQC restent (presque parfaitement) résolus même pour des protéines > 600 aa (acides aminés)

Très gros objets (0.5 MDa)

Marquage ^2H / $^{13}\text{CH}_3$

On enlève un maximum de protons pour les remplacer par des deutérons

On réintroduit des $^{13}\text{CH}_3$ sur les méthyls



TET2 468 kDa

T = 50 °C

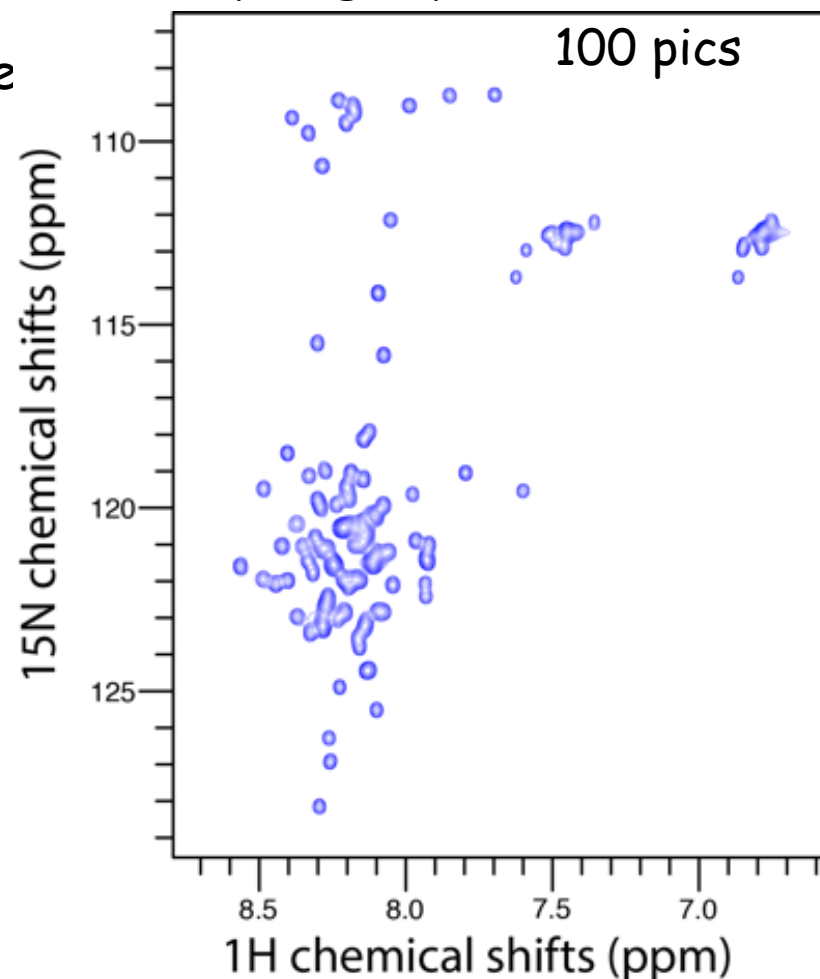
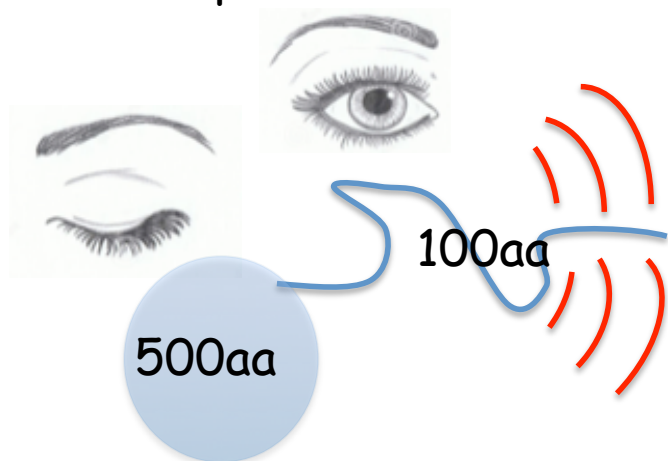
t_C = 240 ns

Yield ~ 20mg/L

Ne pas voir les signaux RMN: un avantage!

Les 500 pics $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ des acides aminés "rigides" sont trop larges pour être visibles

Seuls les pics des résidus flexibles sont visible

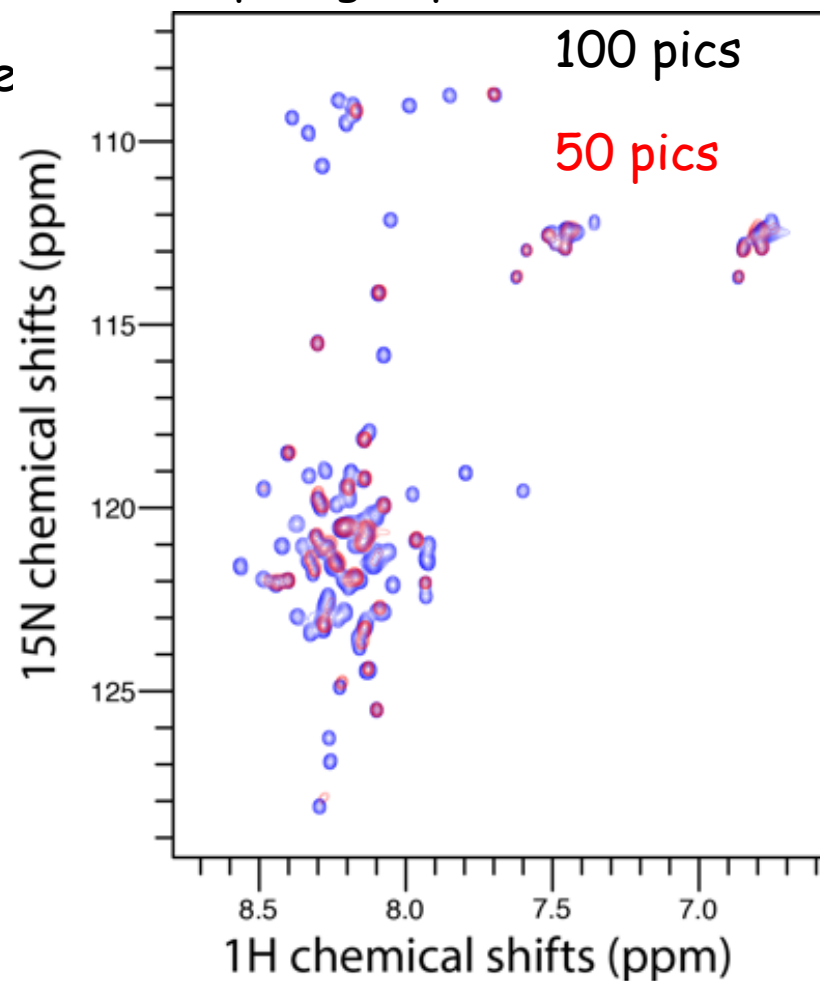
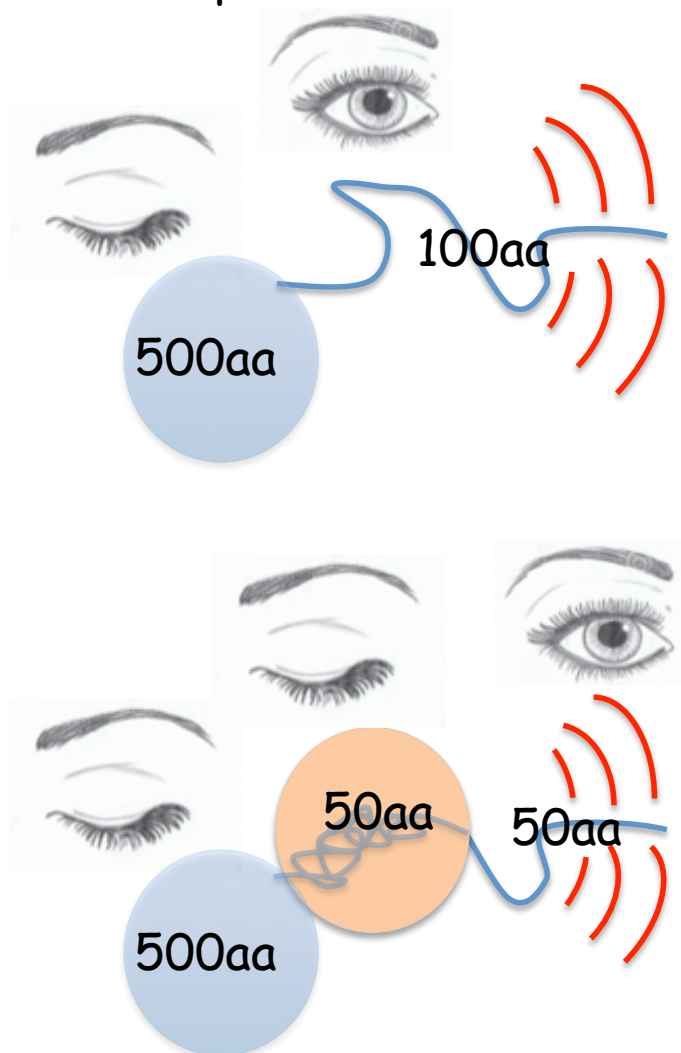


Les 100 pics $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ visibles se comportent comme une IDP: raies fines, intenses, au centre du spectre ^1H et facilement attribuables

Ne pas voir les signaux RMN: un avantage!

Les 500 pics $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ des acides aminés "rigides" sont trop larges pour être visibles

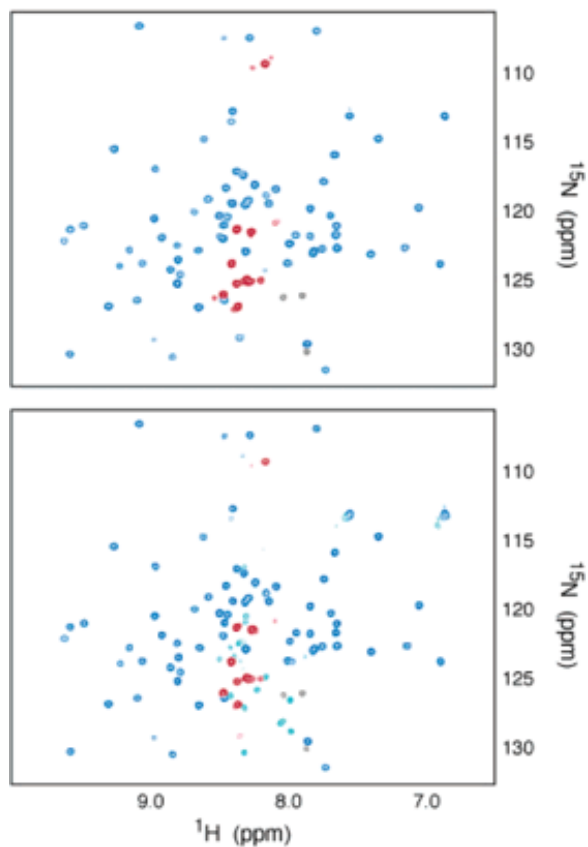
Seuls les pics des résidus flexibles sont visible



Footprinting sur des protéines intactes
Alternative à la protéolyse ménagée

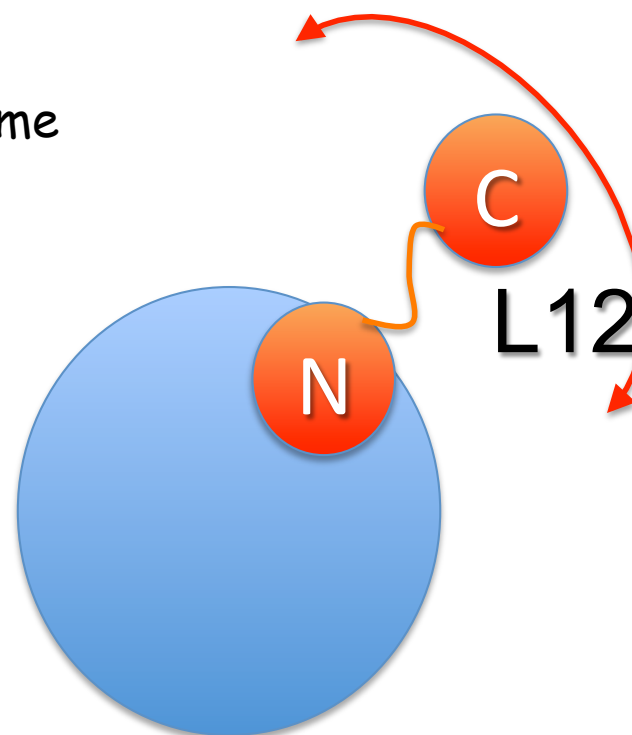
De la RMN sur le ribosome?

La RMN voit ce que la cristallo
ne voit pas, et vice-versa



Sous-unité 50S du ribosome
marquée ^{15}N

Ribosome 70S intact
marqué ^{15}N



Ne pas voir les signaux RMN: un avantage?

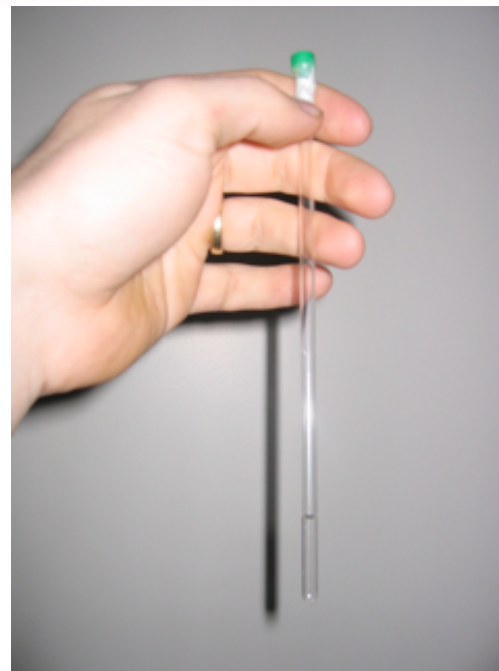
...mais voit très bien les éléments
vifs et mobiles

La RMN (du liquide) ne voit pas bien les
éléments peu vifs et peu mobiles....



Considérations expérimentales

- ☞ Protéine: de $\sim 1 \mu\text{M}$ à 5 mM
- ☞ Volume: 200 à $500 \mu\text{L}$
- ☞ Tampon: pas de restriction *a priori*
- ☞ Attention au pH si spectre ^{15}N (labilité de H_N accélérée)
- ☞ Attention à la concentration en sel (pas trop élevée mais alternatives)
- ☞ Un peu (5-10%) de D_2O pour la stabilité du spectromètre (*lock*)



Plan

- ☞ Considérations pratiques de RMN et protéines
- ☞ **Considérations générales sur l'importance des mouvements en biologie**
- ☞ Temps et signaux RMN
- ☞ Méthodes RMN pour accéder aux différentes échelles de temps

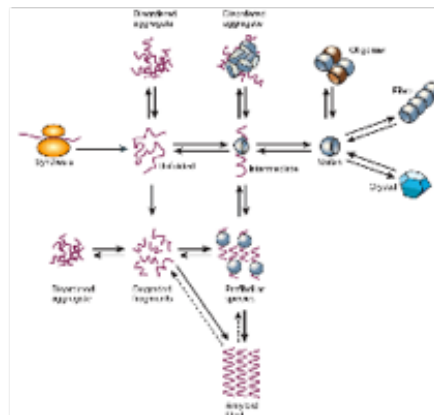
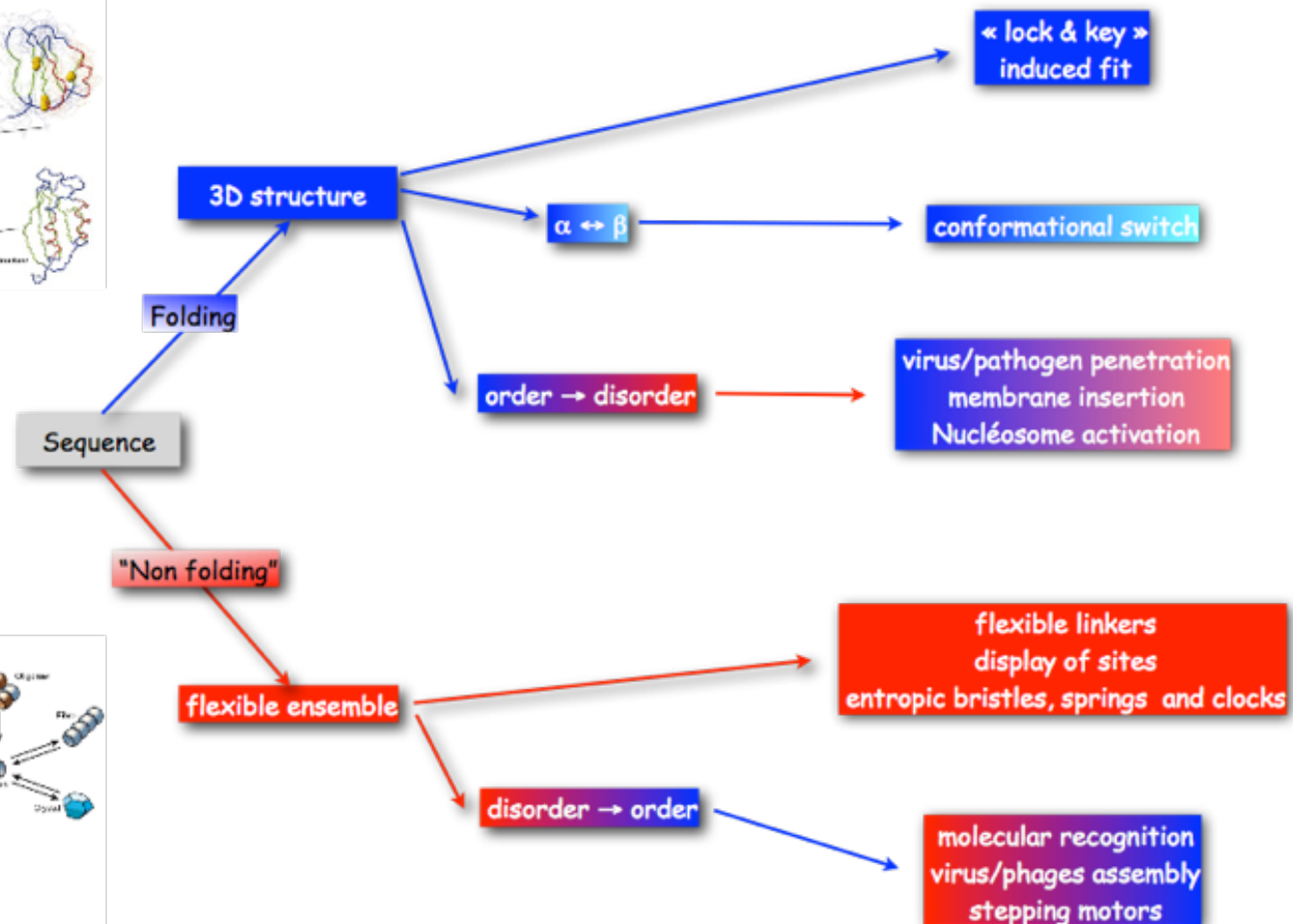
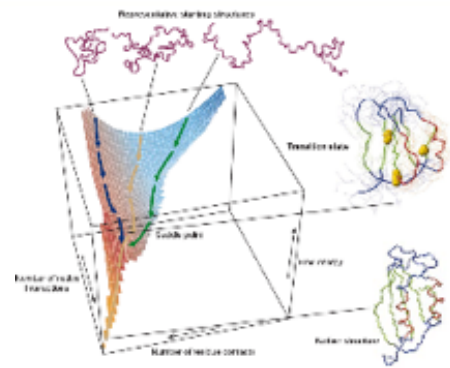
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide: μ s-ms

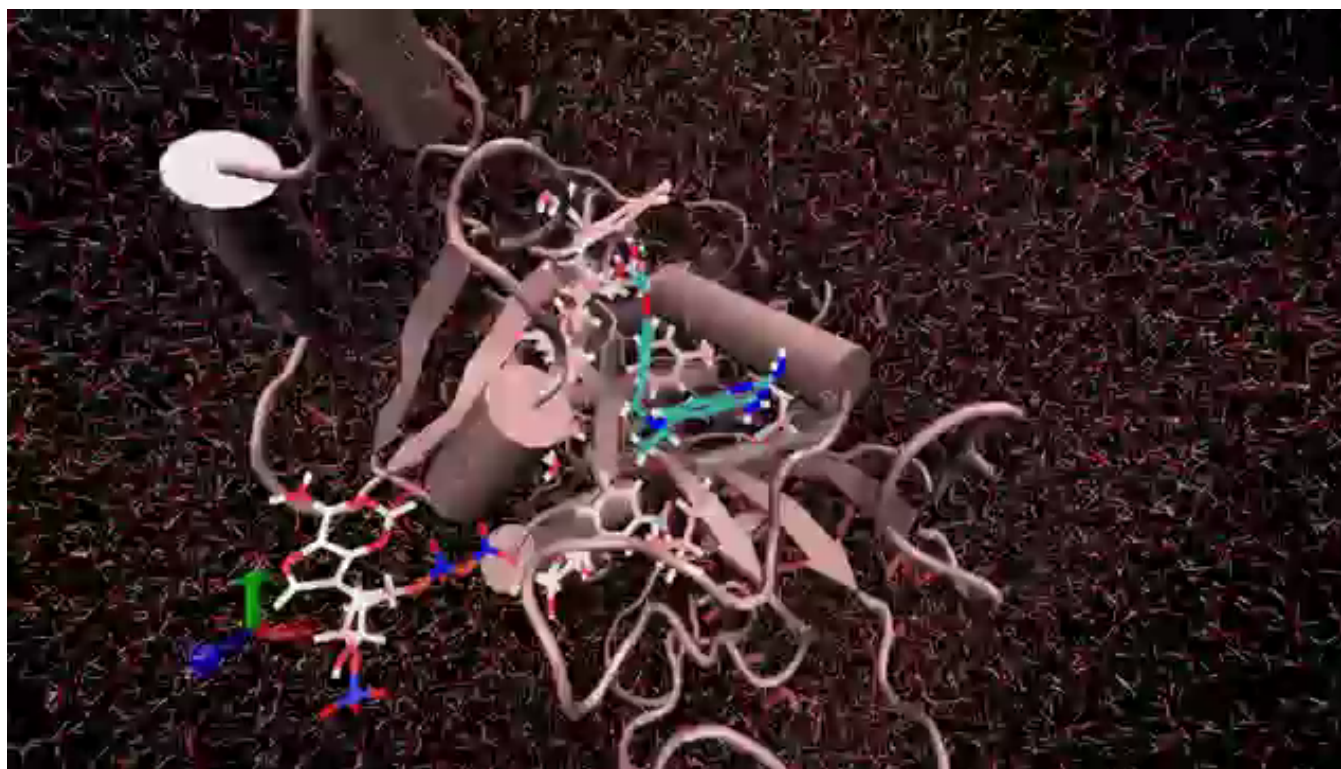
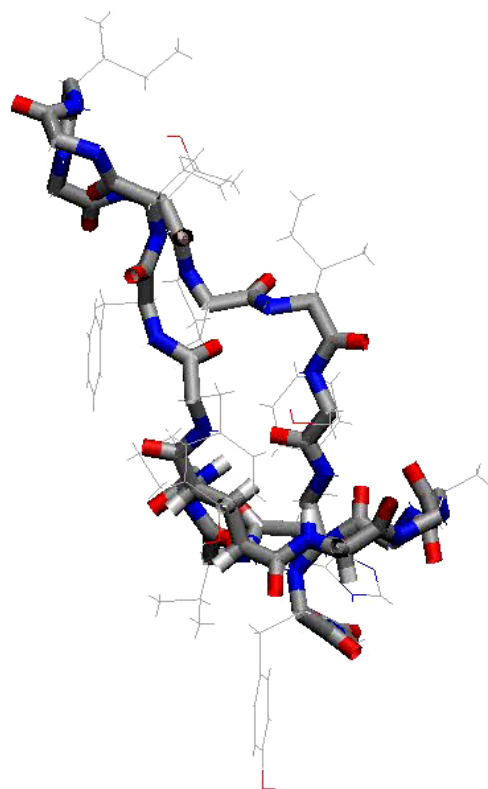
et finalement rapide: ps-ns

Les Protéines: des objets dynamiques



Les protéines sont des molécules dynamiques

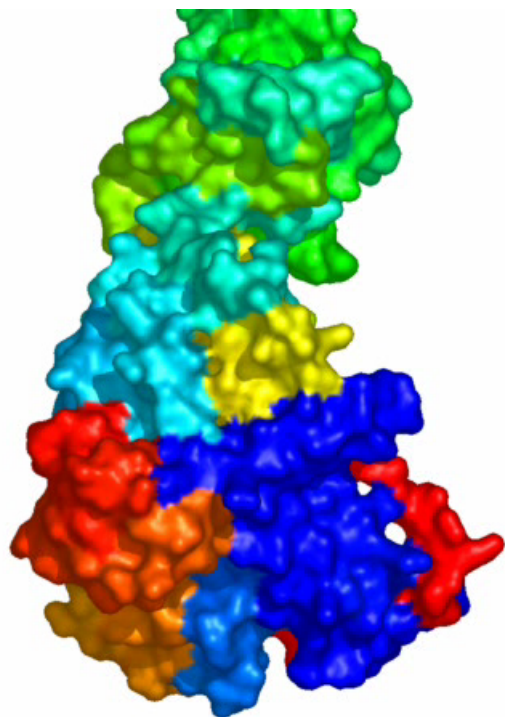
Mouvements dans la gamme picoseconde-nanoseconde



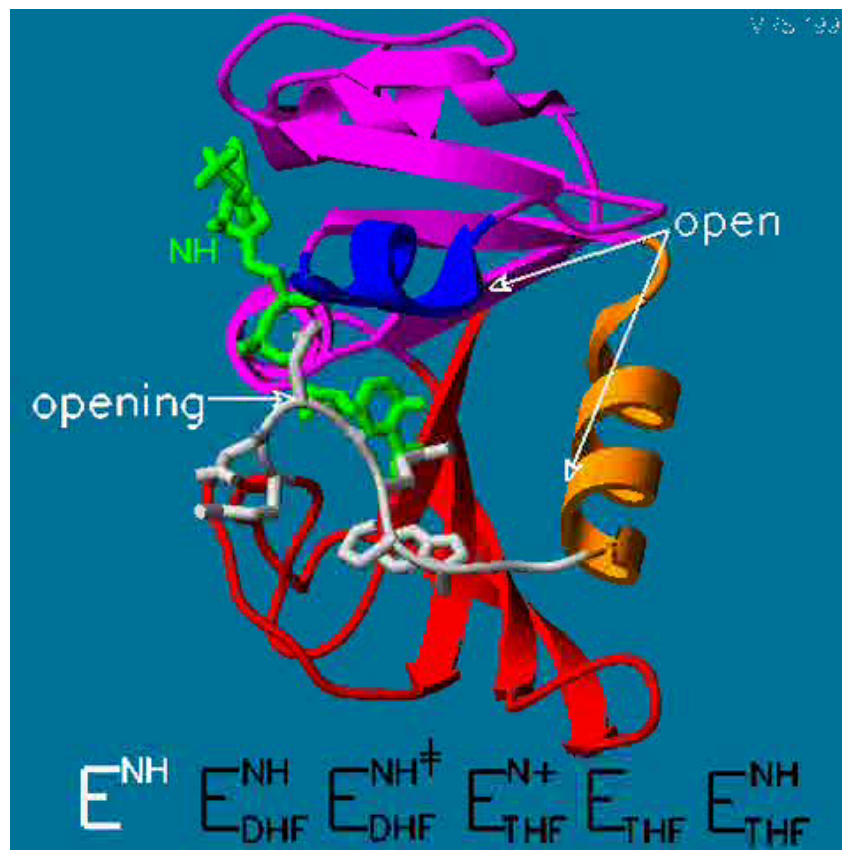
<https://www.youtube.com/watch?v=raQl0l69kvg>

Les protéines sont des molécules plastiques

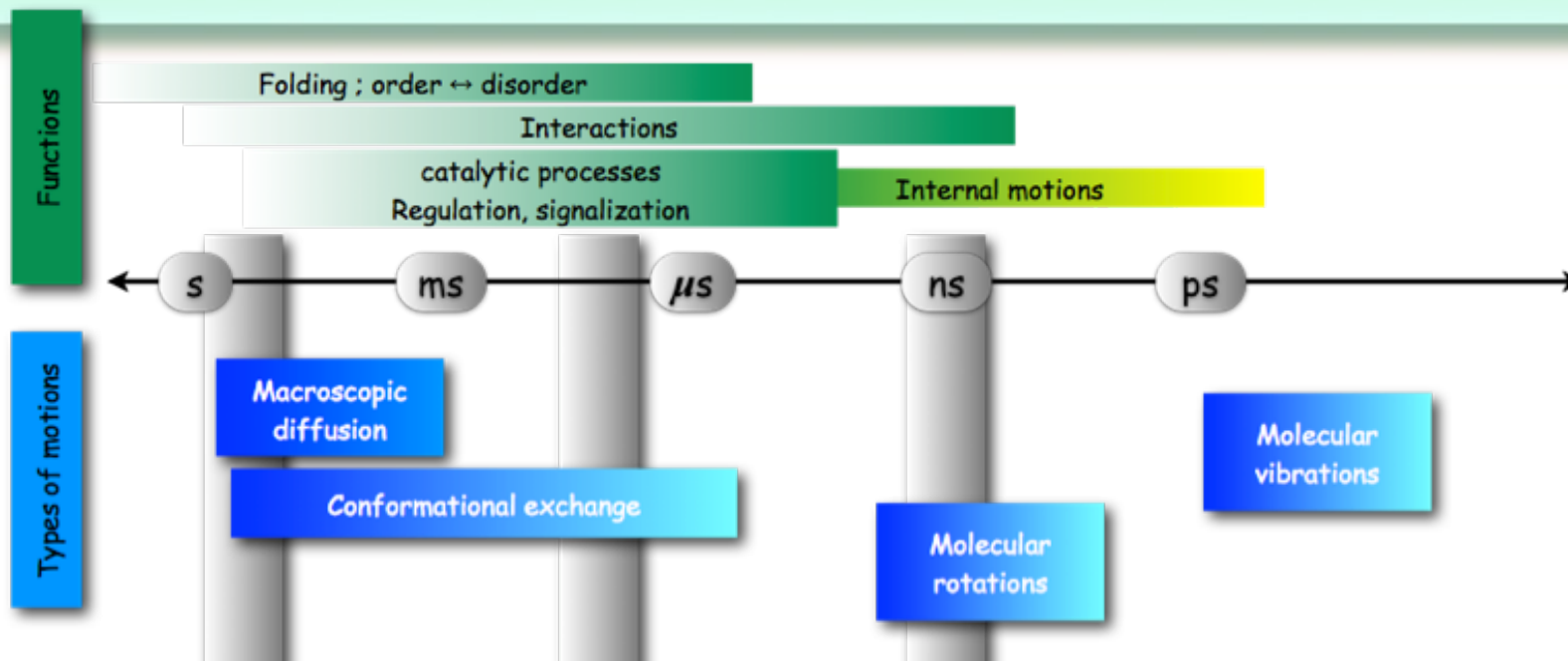
Chaperone



Cycle catalytique d'une enzyme



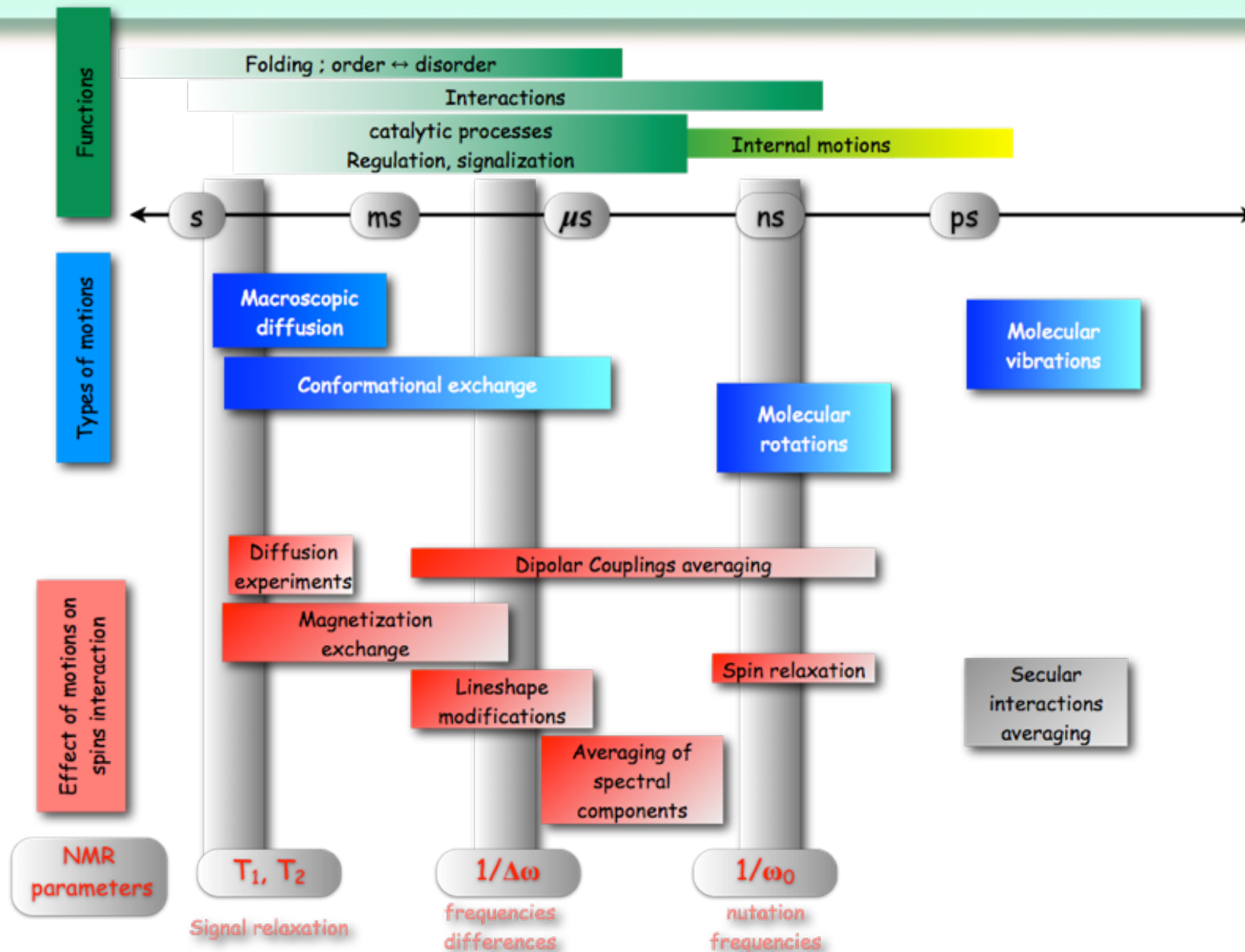
Fonction des protéines et dynamique



Techniques pour accéder à la dynamique de protéine

X-ray cristallography	B factors	time scales static disorder, crystal contacts, ...
X-Ray, neutron scattering Doniach, Chem. Rev. 2001, 101 ; Zacai, science 2000, 288.	size/shape modifications timescales (ps-ns) for ^1H positions	
Fluorescence Weiss, Nat. Struct. Biol. 2000, 7 ; Yang, Science 2003, 302 ; Haustein, Curr. Opin. Struct. Biol. 2004, 14.	ensemble / single molecule cellular context	probes
Mass Spectroscopy (HX MS) radical footprinting Wales, Mass. Spectrom. Rev. 2006, 25 ; Busenlehner, Arch. Biochem. Biophys. 2005, 433. Guan, Trends. Biochem. Sci. 2005, 30.	large molecular assemblies	
Mössbauer, Raman, 2D infrared spectroscopy		
Molecular dynamics		Forcefields ... Short timescales ...
NMR Boehr, Chem. Rev. 2006, 106, 3055. Palmer, Chem. Rev. 2004, 104, 3623.	$\Rightarrow 10^{-12} \leftrightarrow 10^5 \text{ s}$ $\Rightarrow$ Site-specific information $\Rightarrow$ multiple atomic probes ^1H, ^2H, ^{15}N, ^{13}C, ^{31}P, ... $\Rightarrow$ Simultaneous monitoring of probes $\Rightarrow$ kinetic & thermodynamic profile of dynamic processes	$\Rightarrow$ isotope labeling $\Rightarrow$ quantities $\Rightarrow$ size limitation $\Rightarrow$ complexity of the method ?

Fonction des protéines et dynamique



Plan

- ☞ Considérations pratiques de RMN et protéines
- ☞ Considérations générales sur l'importance des mouvements en biologie
- ☞ Temps et signaux RMN
- ☞ Méthodes RMN pour accéder aux différentes échelles de temps

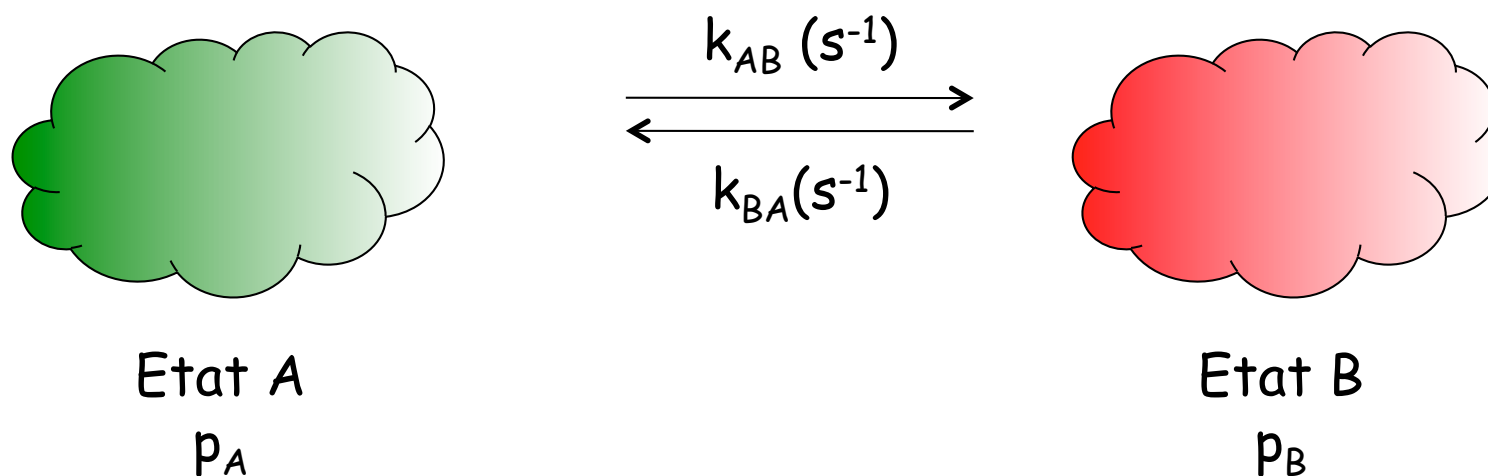
Comment la RMN voit les mouvements?

- ☞ Les mouvements moléculaire influencent les paramètres RMN: déplacement chimique - largeur de raie - relaxation
- ☞ Echelles de temps caractéristiques de RMN:
 - ☞ Durée d'une expérience RMN (1D: s-mn / 2D: mn-h / 3D : h-jour)
 - ☞ T₁: (ms-s) retour à l'équilibre pour un ensemble de spins
 - ☞ T₂: (ms-s) durée de vie du signal RMN
 - ☞ Echelle de temps spectral (déplacement chimique) : $1/\Delta\nu$ (ms)
 $\Delta\nu$: différence de déplacements chimiques entre deux sites
 - ☞ Echelle de temps de Larmor: $1/(2\pi\omega_0)$ (ps-ns)
 $\omega_0 = \gamma B_0$
 γ : noyau (^1H , ^{15}N , ...) dépendant
 B_0 : champ dépendant (500MHz, 800MHz, ...)
 ^1H à 800MHz / ^{13}C à 200MHz / ^{15}N à 800MHz

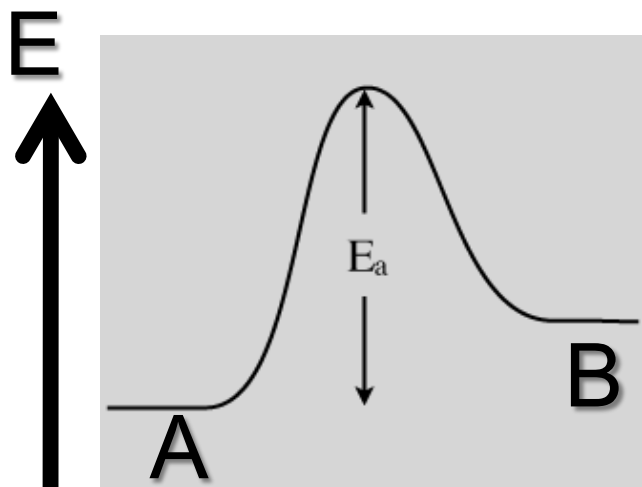
Plan

- ☞ Considérations générales sur l'importance des mouvements en biologie
- ☞ Temps et signaux RMN, quelques points théoriques
 - ☞ Un peu de thermodynamique / cinétique
 - ☞ Déplacements chimiques
 - ☞ La question de l'échelle de temps
 - ☞ Relaxation
- ☞ Méthodes RMN pour accéder aux différentes échelles de temps

Oscillation entre deux états A et B



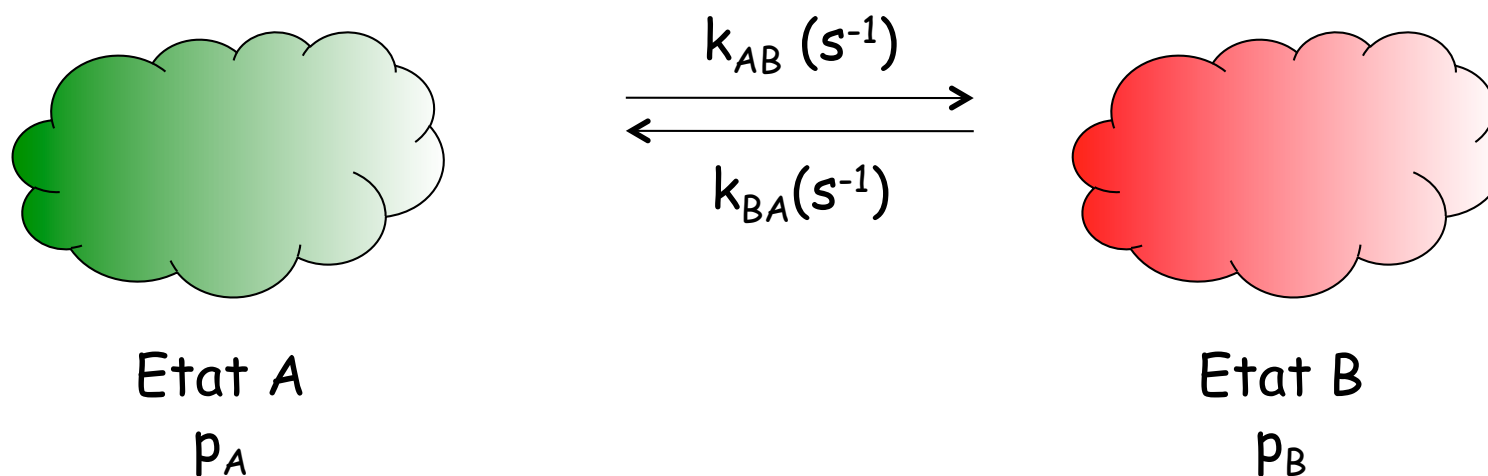
Les états A et B peuvent être différemment peuplés (p_A and p_B)



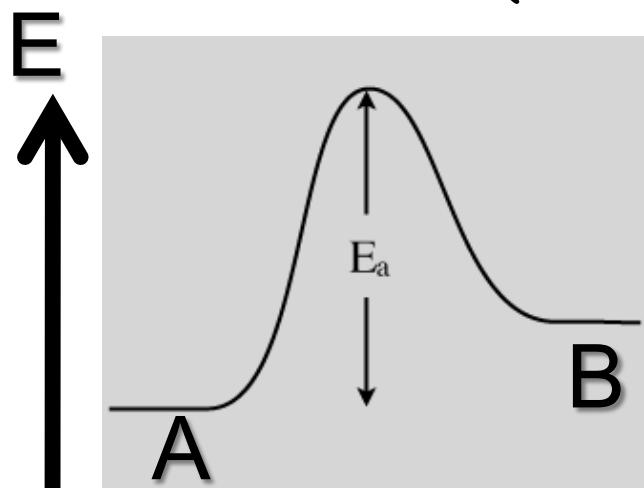
E_a : énergie d'activation

$$\frac{p_A}{p_B} = e^{\frac{E_B - E_A}{k_B T}}$$

Oscillation entre deux états A et B

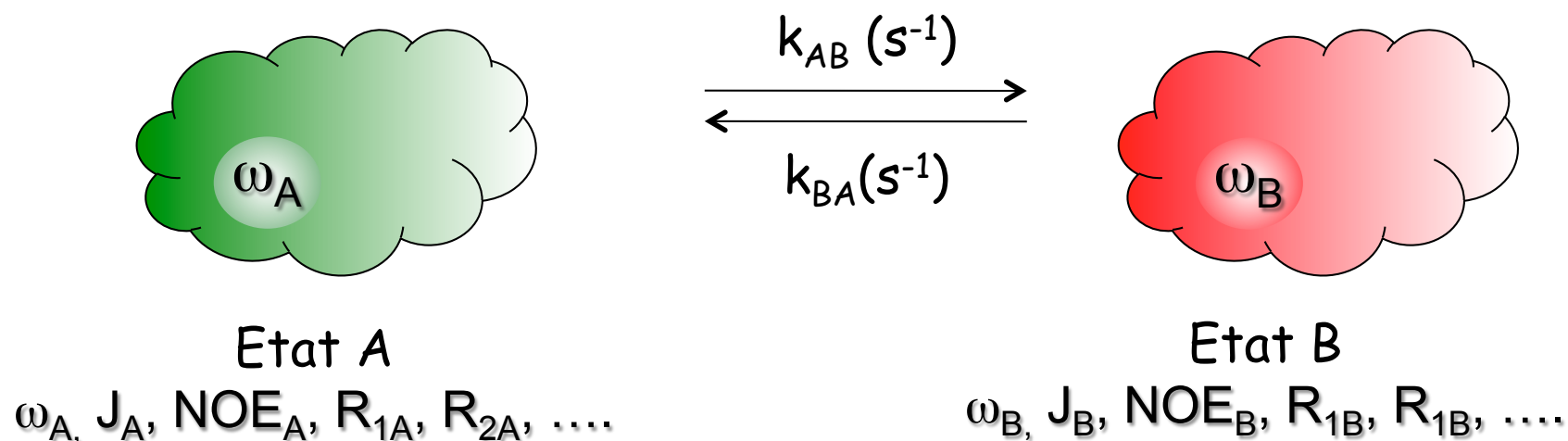


L'« oscillation » (ou échange) est caractérisée par les constantes de vitesse k_{AB} et k_{BA} .



Une grandeur intéressante est $k_{ex} = k_{AB} + k_{BA}$
 k_{ex} est reliée à E_a (loi d'Arrhenius)

Et la RMN dans tout cela?

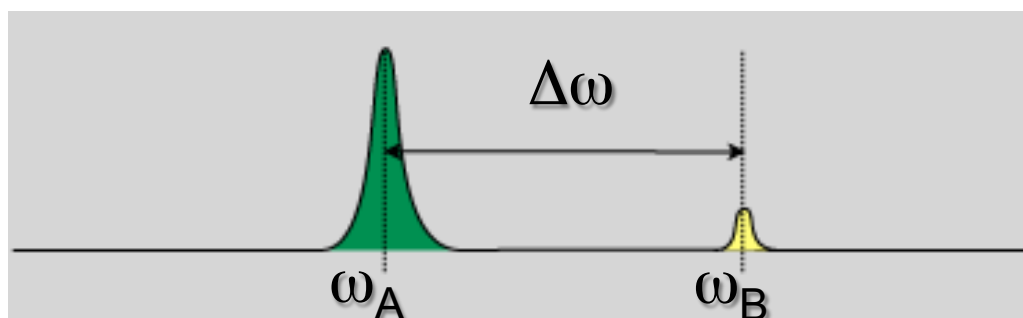


Chaque état est caractérisé par des observables RMN qui peuvent être distincts.

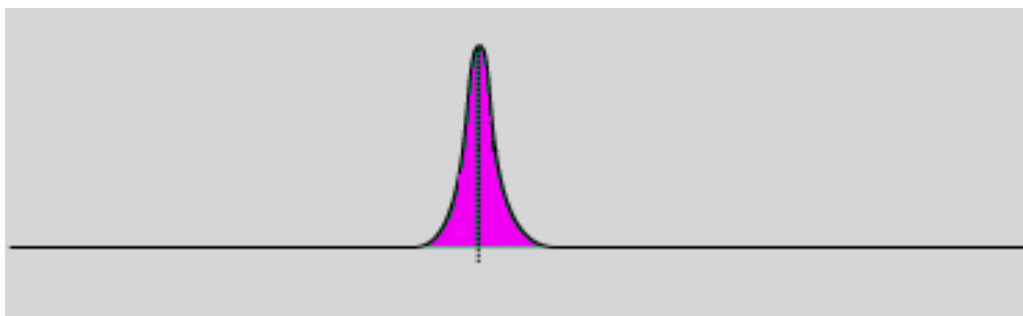
Que voit-on alors?

Spectres RMN

En l'absence d'échange entre A et B

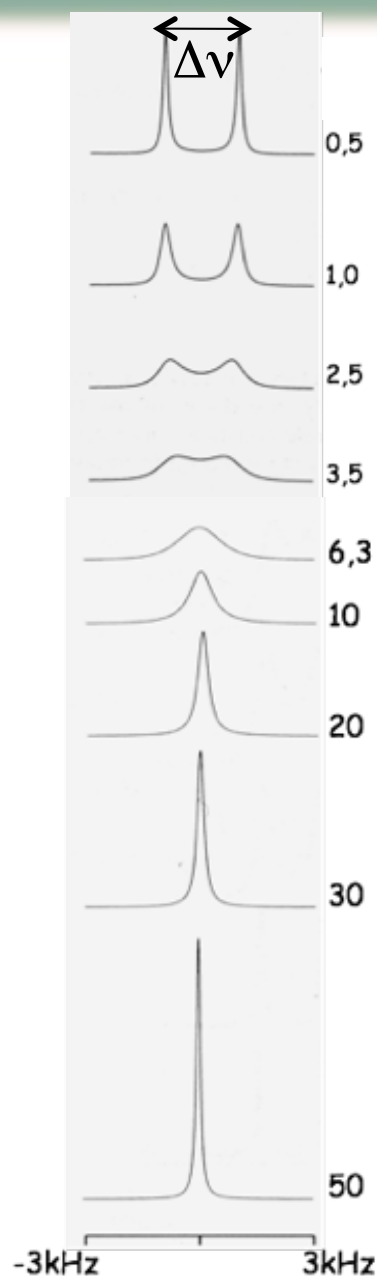


Si l'échange est très rapide



$$\omega_{\text{obs}} = p_A \omega_A + p_B \omega_B$$

Spectres RMN et échange



$$k_{ex} \lll 2\pi \Delta\nu$$

Echange lent
Raies séparées

$$k_{ex} < 2\pi \Delta\nu$$

Echange lent
intermédiaire
Raies séparées mais
élargies

$$k_{ex} \approx 2\pi \Delta\nu$$

Echange intermédiaire
Raie unique très élargie

$$k_{ex} > 2\pi \Delta\nu$$

Echange rapide
intermédiaire
Raie unique mais
élargie

$$k_{ex} \ggg 2\pi \Delta\nu$$

Echange rapide
Raie unique (moyennée)

Déplacements chimiques

En solution, les molécules échantillonnent toujours un ensemble de conformations (structures)

Les déplacements chimiques sont sensibles à la conformation, ie à la structure à un instant t

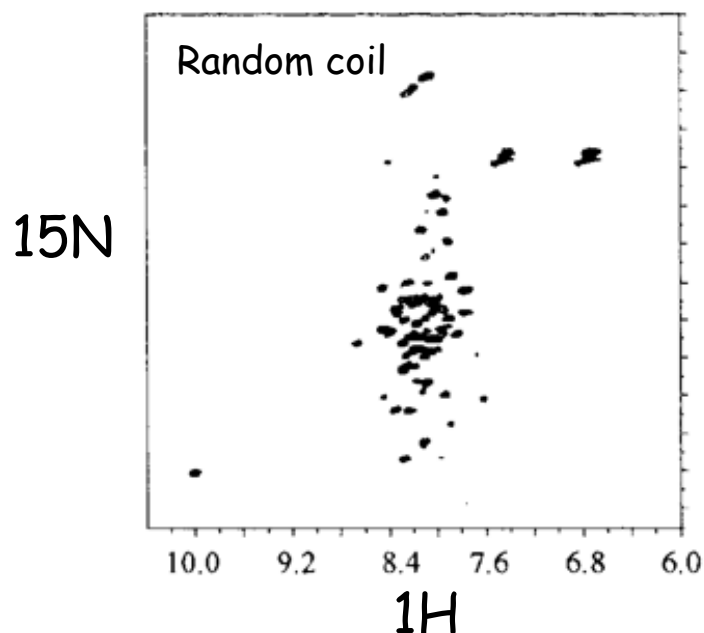
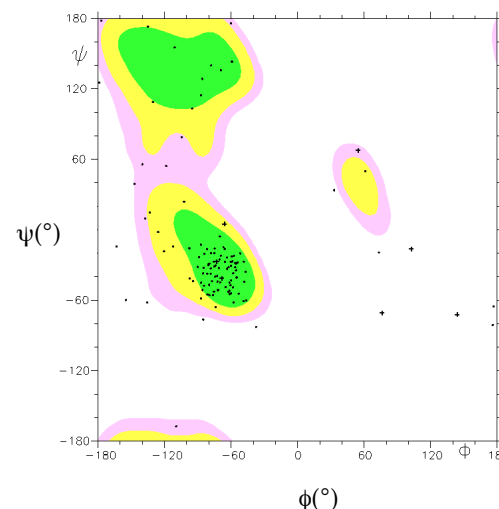
Comment les spectres RMN reflètent la modulation temporelle des déplacements chimiques?

Random coil vs structure

Random coil: pelotte statistique, toutes les conformations stables sont échantillonnées de manière équiprobables

Chaque conformation est associée à une population et une valeur de déplacement chimique

L'ensemble est échantillonné très rapidement, on observe le déplacement chimique moyenné et pondéré



Faible dispersion spectrale

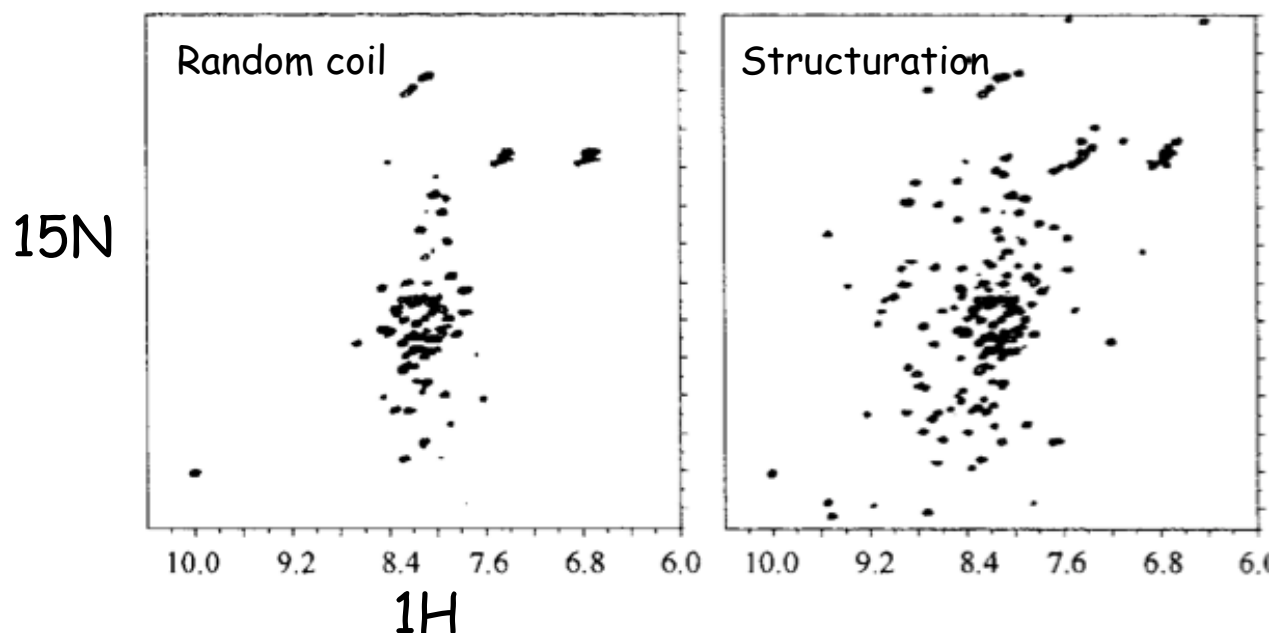
Le seul paramètre est la séquence primaire

Random coil vs structure

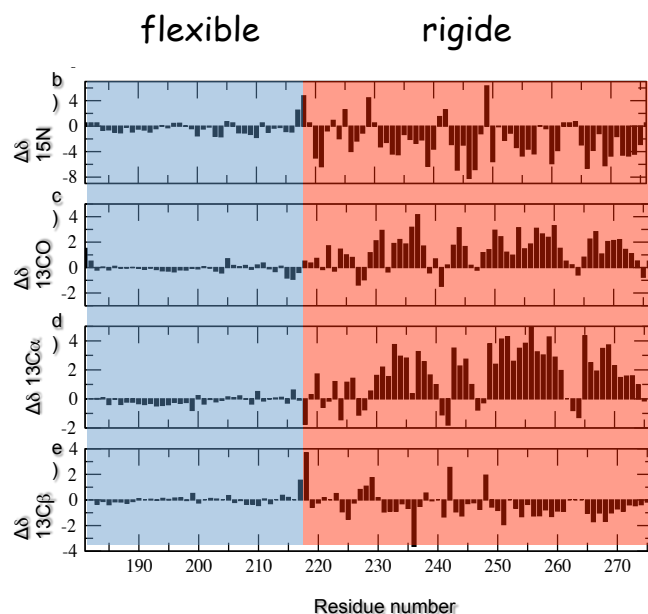
Structuration: certaines conformations sont préférées

Le déplacement chimique moyenné et pondéré dévie du random coil.

Forte dispersion spectrale

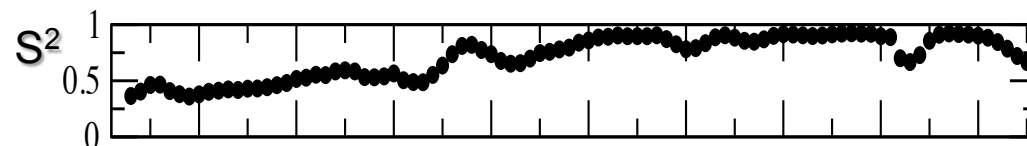
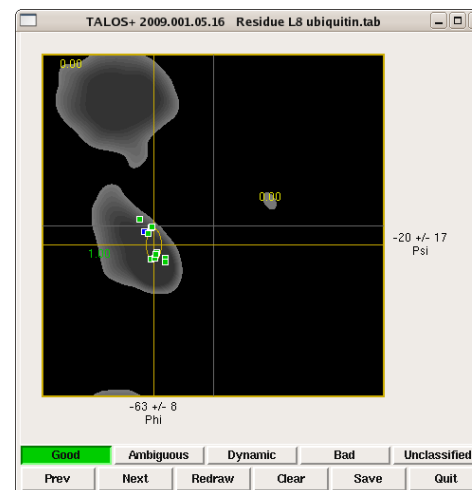


Le profil de variation des déplacements chimiques (par rapport au random coil) est riche en information sur la structure et la dynamique d'une protéine



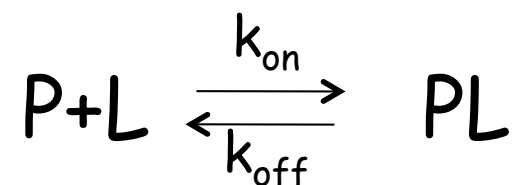
structure

dynamique



Interaction protéine-ligand

Considérons une protéine P interagissant avec une autre molécule L



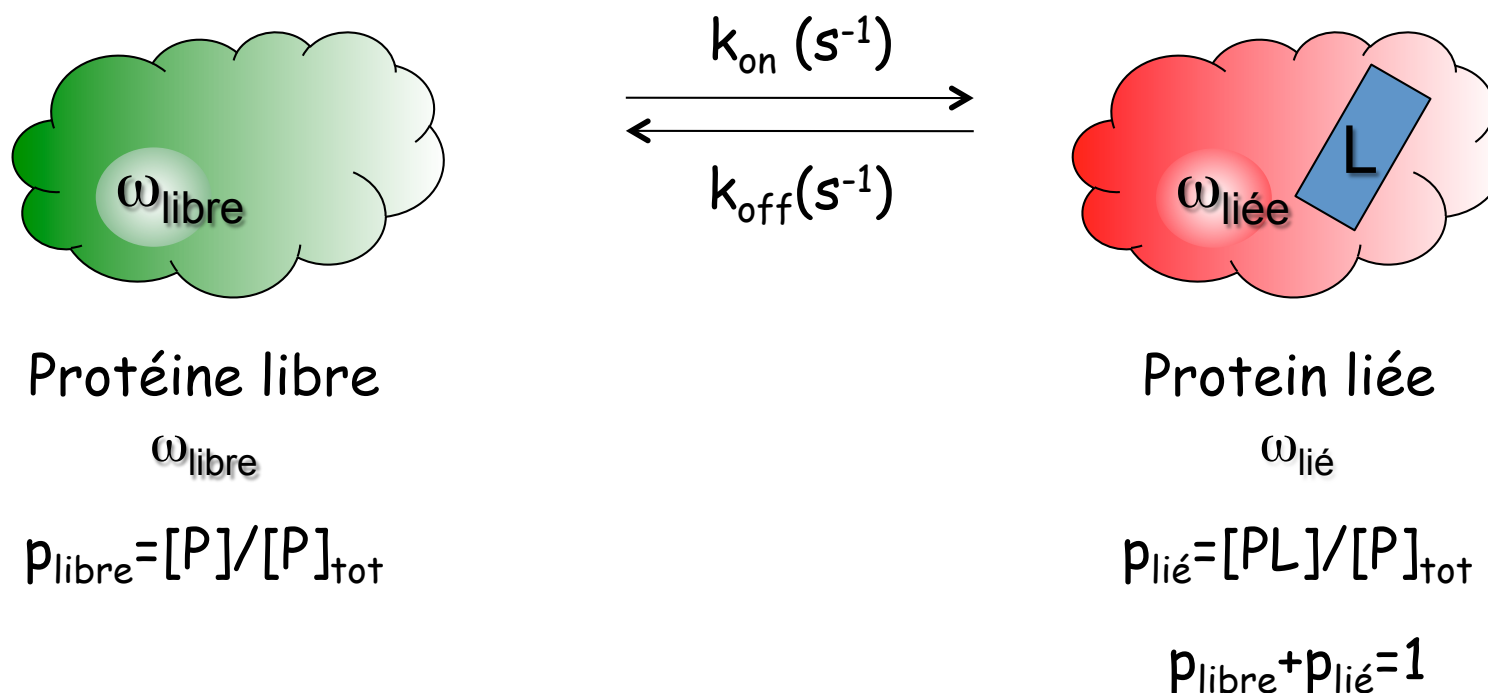
A l'équilibre, les concentrations ($[P]$, $[L]$, $[PL]$) des trois espèces sont reliées par:

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

La constante de dissociation K_d renseigne sur la stabilité de l'interaction:

faible K_d (e.g. nM) $\rightarrow$ haute concentration du complexe PL
haut K_d (mM) $\rightarrow$ basse concentration du complexe PL

Interaction protéine-ligand et RMN



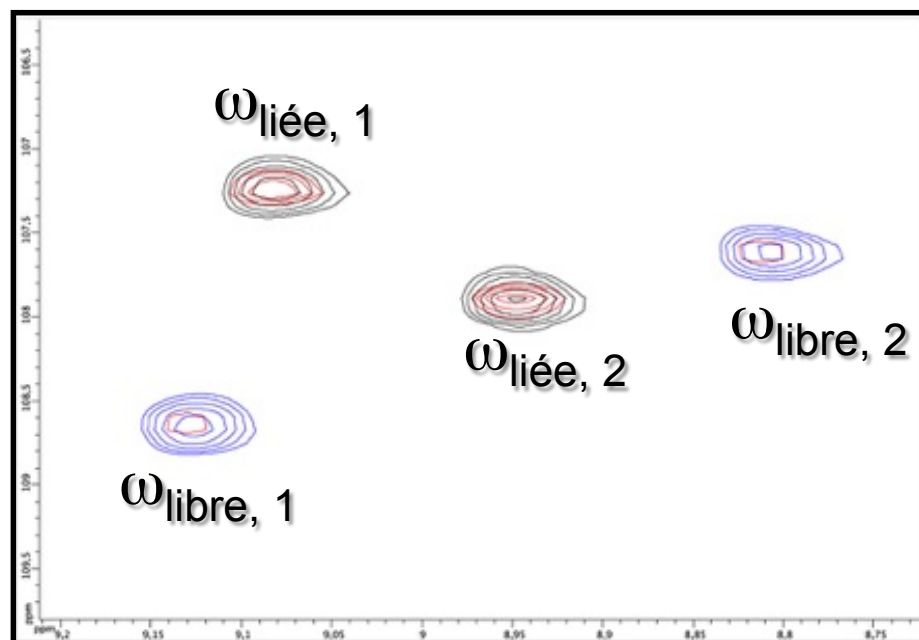
La fraction de protéine libre et liée dépend de la concentration des espèces en solution et de K_d .

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

Titration et spectres RMN

Echange lent

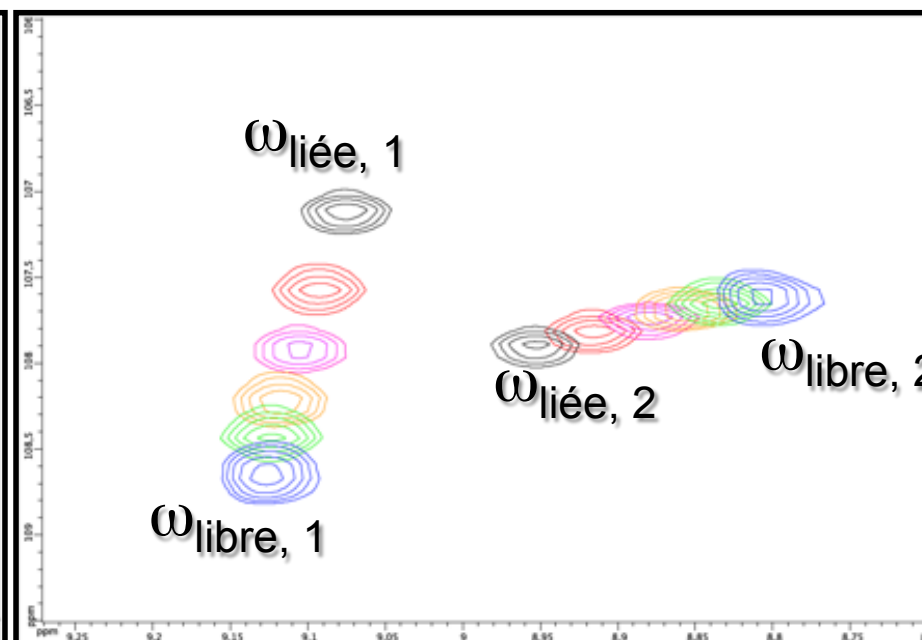
$$k_{ex} = k_{on} [L] + k_{off} \lll \Delta\omega$$



Ligand avec haute affinité
(faible K_d)

Echange rapide

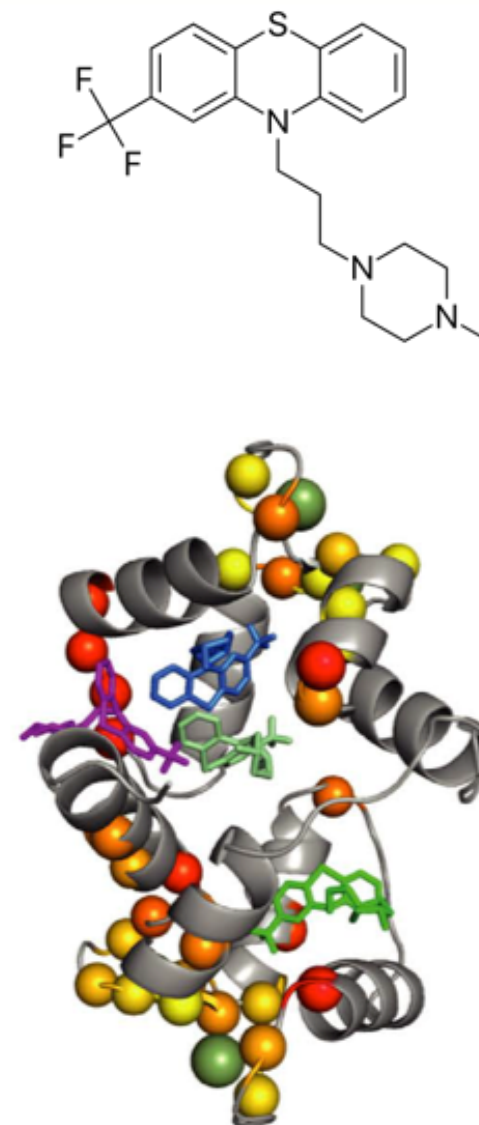
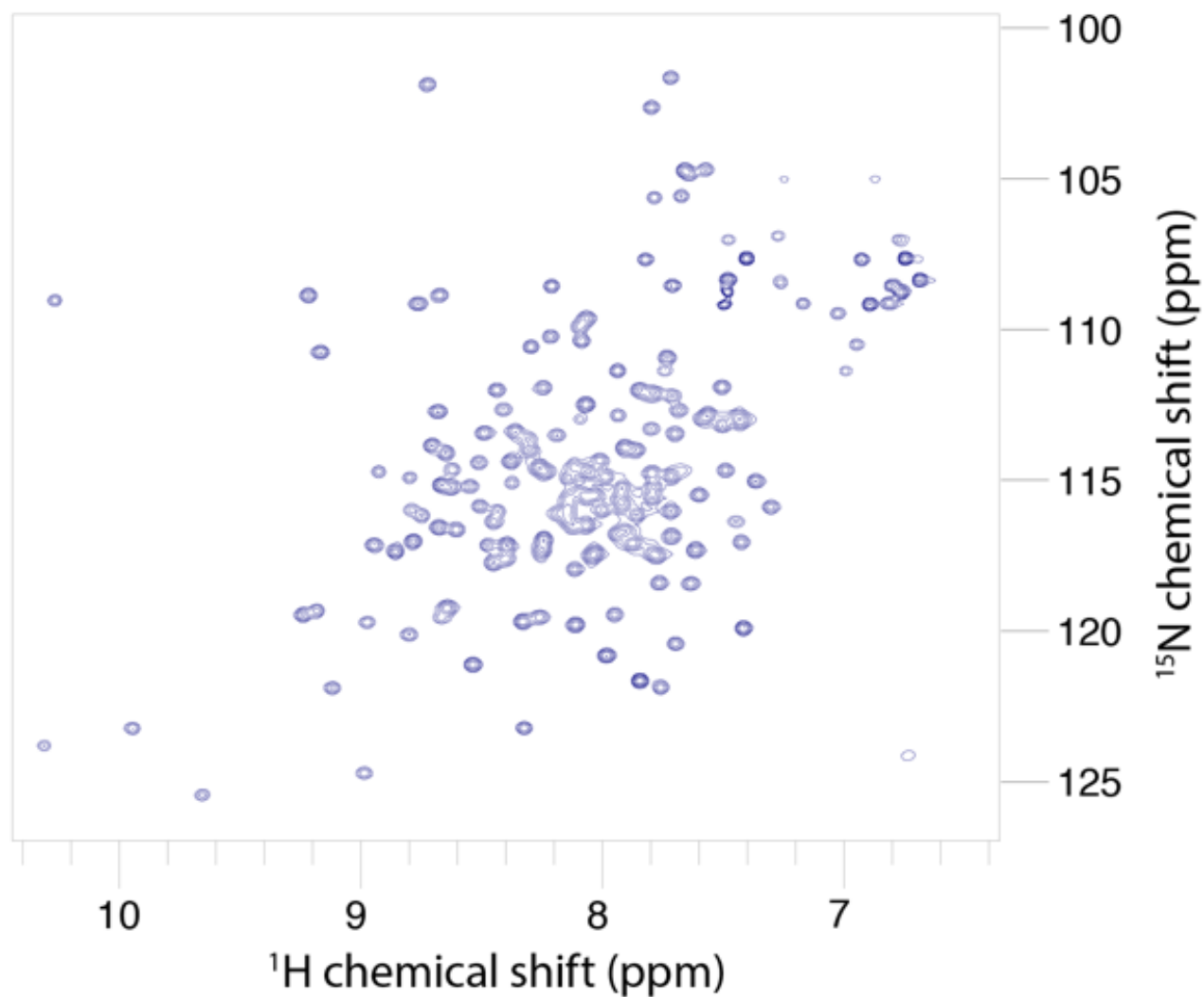
$$k_{ex} = k_{on} [L] + k_{off} \ggg \Delta\omega$$



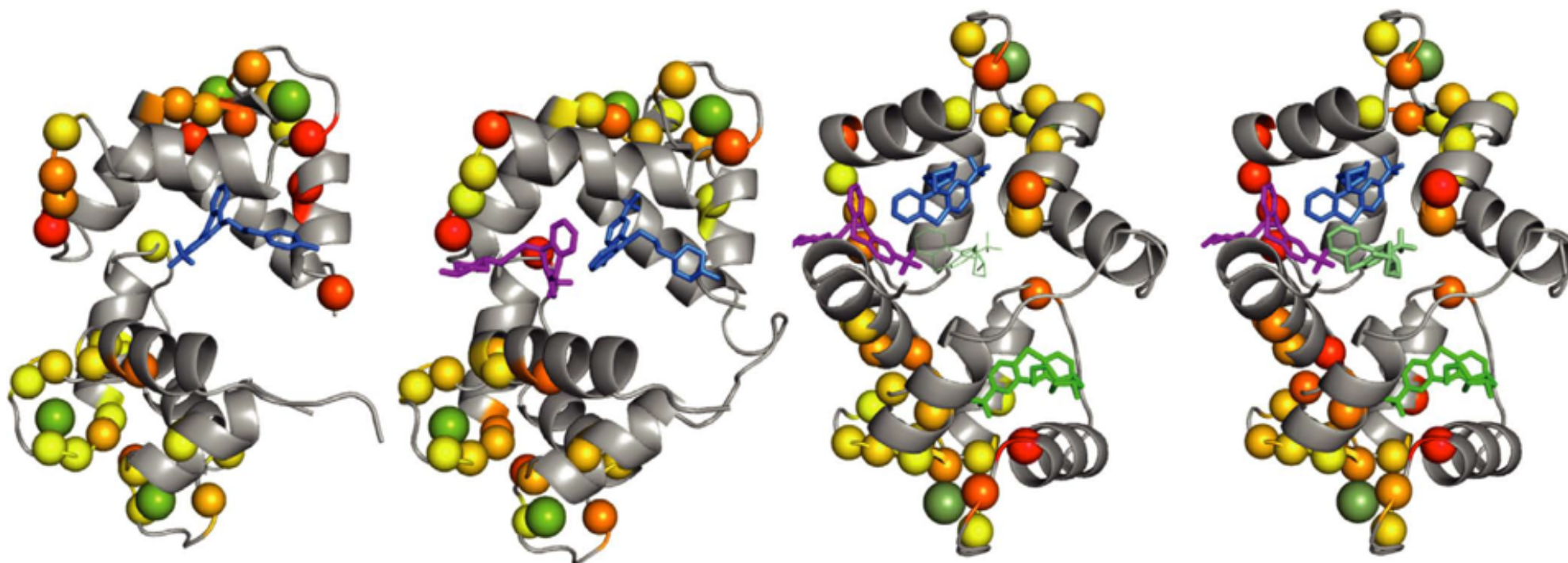
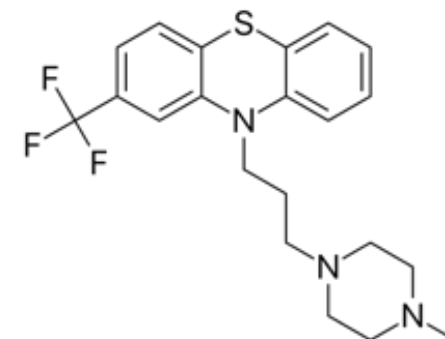
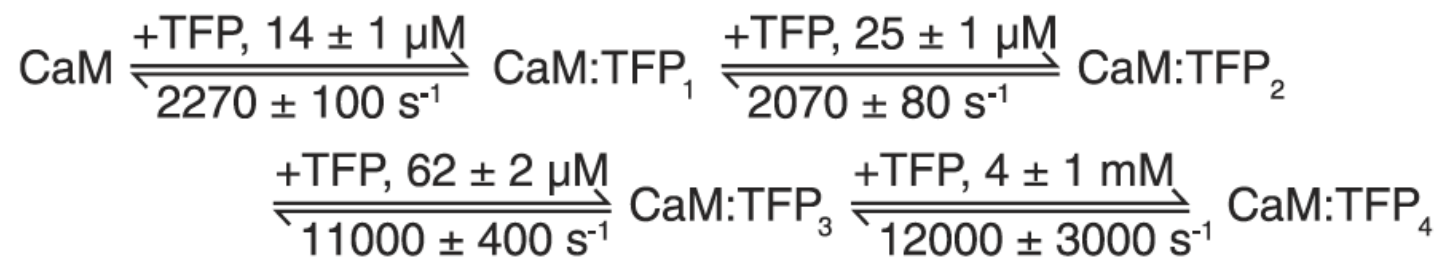
Ligand avec faible affinité
(haut K_d)

Une simple titration donne une idée de l'affinité
On peut aussi obtenir K_d , stoechiométrie, parfois k_{on}/k_{off}

Titration de la calmoduline par TFP



Titration de la calmoduline par TFP



Relaxation T1 et T2

Le temps de relaxation longitudinal T1 définit le temps de retour à l'équilibre du système de spin (ie I_z).

- o Il conditionne le délai entre deux accumulations
- o Les mouvements plus lents que T1 ne peuvent pas être caractérisés à partir d'un seul spectre RMN.

Le temps de relaxation transversale T2 définit le temps de vie du signal RMN.

- Le temps de relaxation T2 définit la largeur des résonances

Il existe d'autres temps de relaxation mais plus difficile à mesurer

T1: le temps d'équilibration

$|\beta\rangle$ 
 $|\alpha\rangle$ 



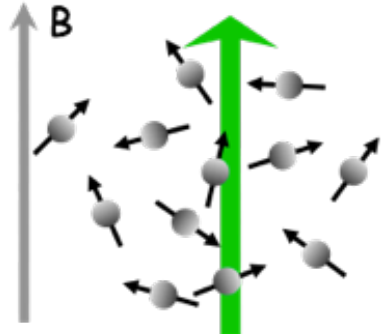
Absence de champ magnétique: $B_0=0$

$$\vec{M} = \sum \vec{\mu} = \sum \gamma \hbar \vec{I} = 0$$

T1: vitesse à laquelle système se met à l'équilibre

Polarisation résultante

$|\beta\rangle$ 
 $|\alpha\rangle$ 



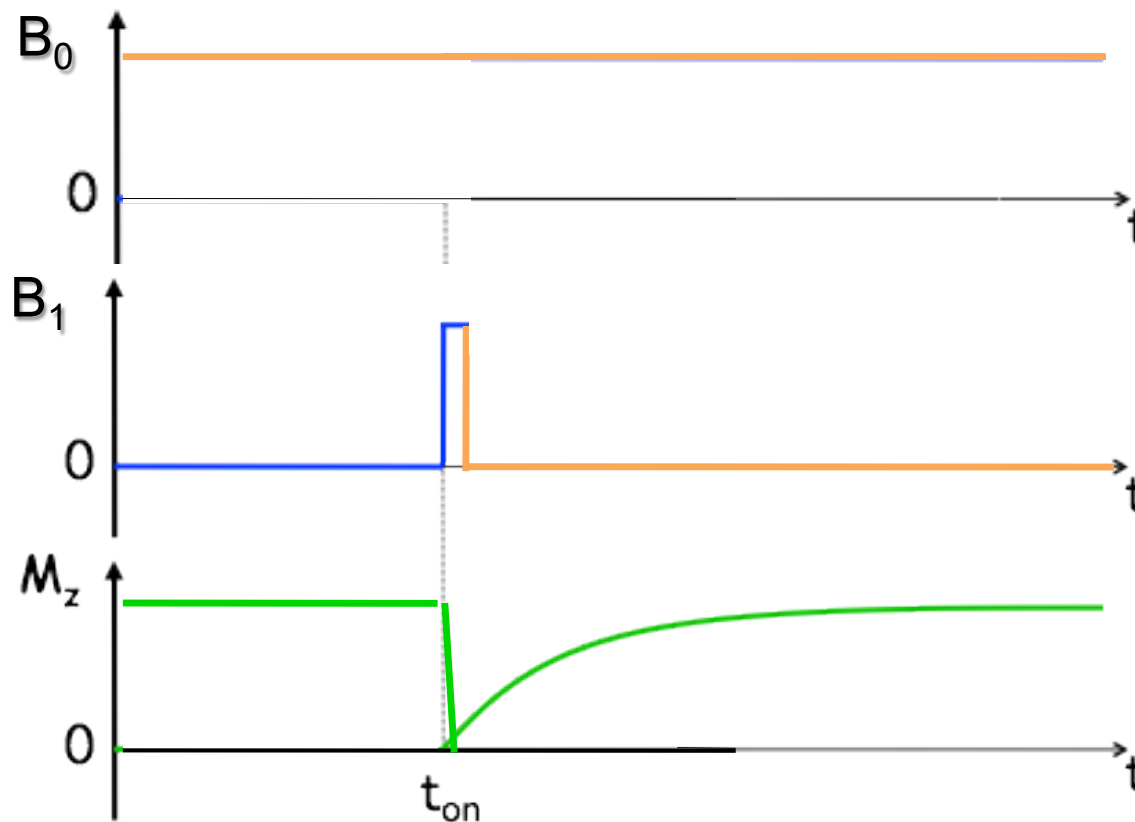
$$M_0 = N(P_\alpha - P_\beta)m = N(P_\alpha - P_\beta)\frac{\gamma\hbar}{2}$$

$$\frac{P_\alpha}{P_\beta} = \exp\left[\frac{\gamma\hbar B_0}{k_b T}\right] \approx 1 + \frac{\gamma\hbar B_0}{k_b T}$$

$$M_0 = N \frac{\gamma^2 \hbar^2 B_0}{4 k_b T} = \mu_0^{-1} V \chi B$$

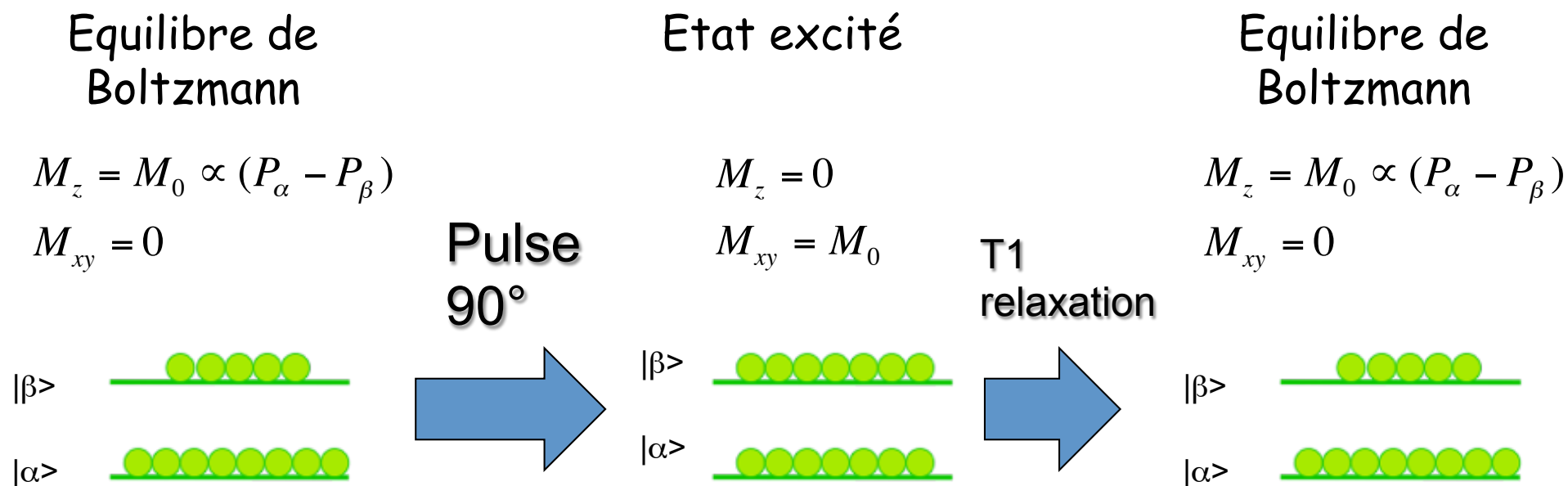
T1: le temps d'équilibration

Le temps de relaxation du système vers l'équilibre après l'application d'une impulsion courte de champ B_0 (excitation)



$$M_z^{nuc}(t) = M_{eq}^{nuc} \left(1 - \exp \left[-\frac{t - t_{on}}{T_1} \right] \right)$$

T1: le temps d'équilibration

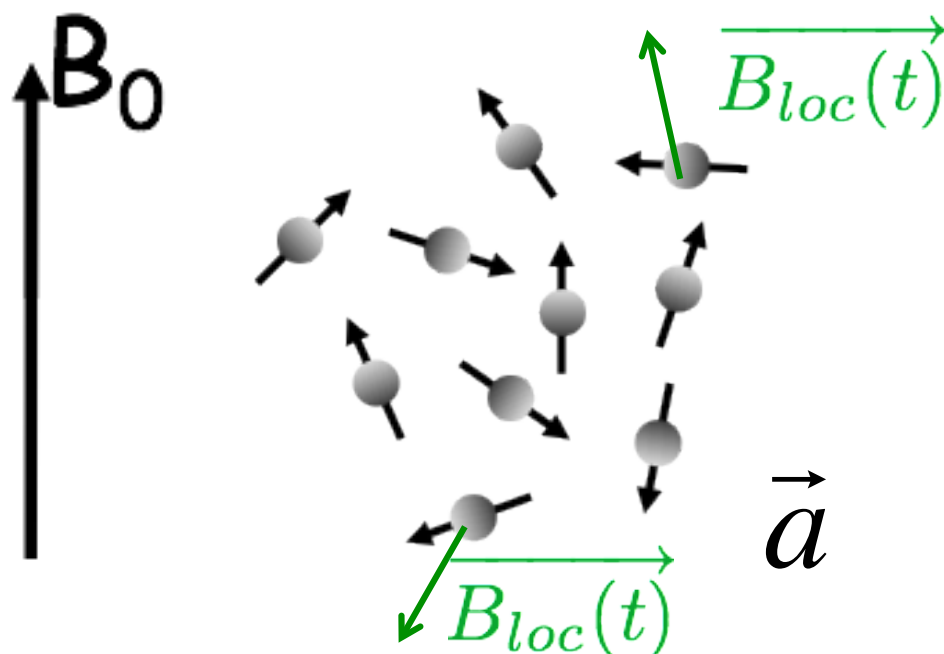


Le temps de relaxation T_1 est relié au changement de population entre les états d'énergie α and β

Les changements de niveaux d'énergie ($\beta \rightarrow \alpha$ transition) absorbent/ libèrent de l'énergie

Quelle est l'origine de cette énergie?

Le phénomène physique des transitions



Le champ local additionnel se comporte comme les champs B_1

Les molécules se réorientent



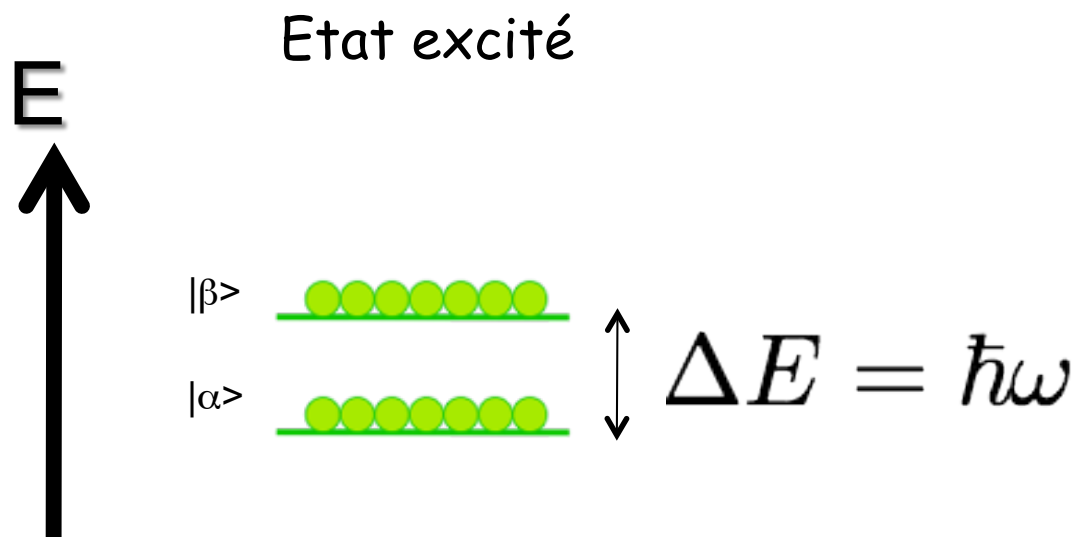
Chaque spin sent un champ local effectif

$$B_{\text{eff}} = B_0 + B_{\text{loc}}$$

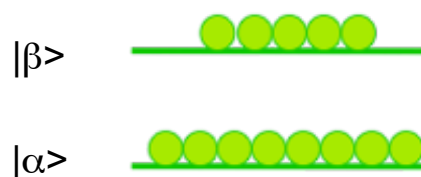
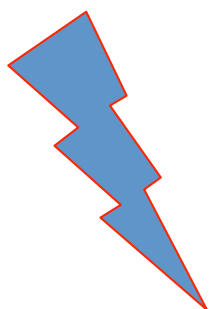


- Dépendent du temps
- Processus stochastique
(non corrélé d'une molécule à une autre)

Le phénomène physique des transitions



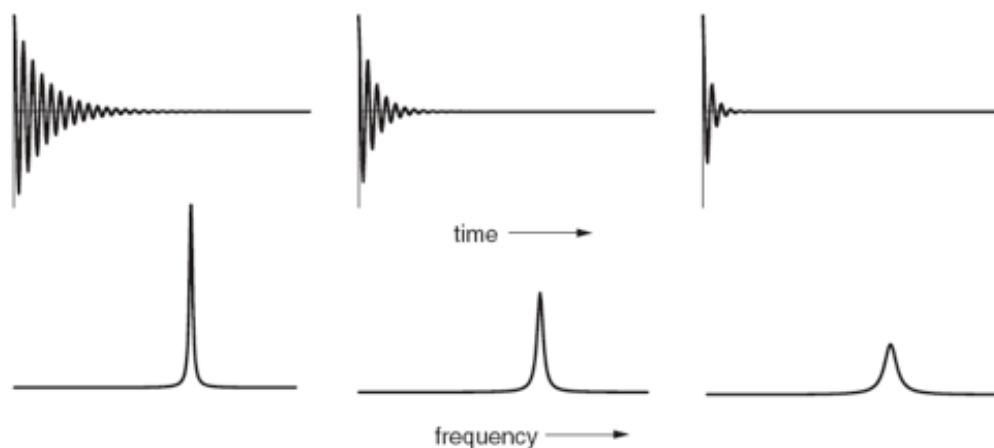
Seuls les photons générés par Beff et à la « bonne énergie » sont capables d'induire des transitions



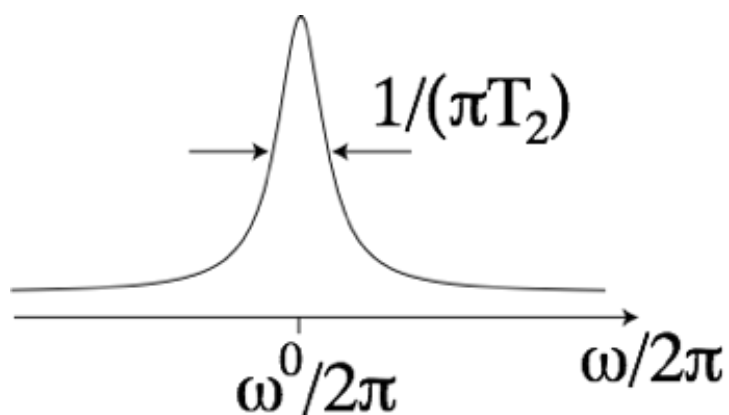
L'efficacité de T1 dépend de la distribution des mouvements au sein d'une molécule
(cf fonction densité spectrale J)

$$M_x(t) = -M_{eq} \sin(\omega_0 t) \exp(-t/T_2)$$

T_2 contrôle la forme de raie

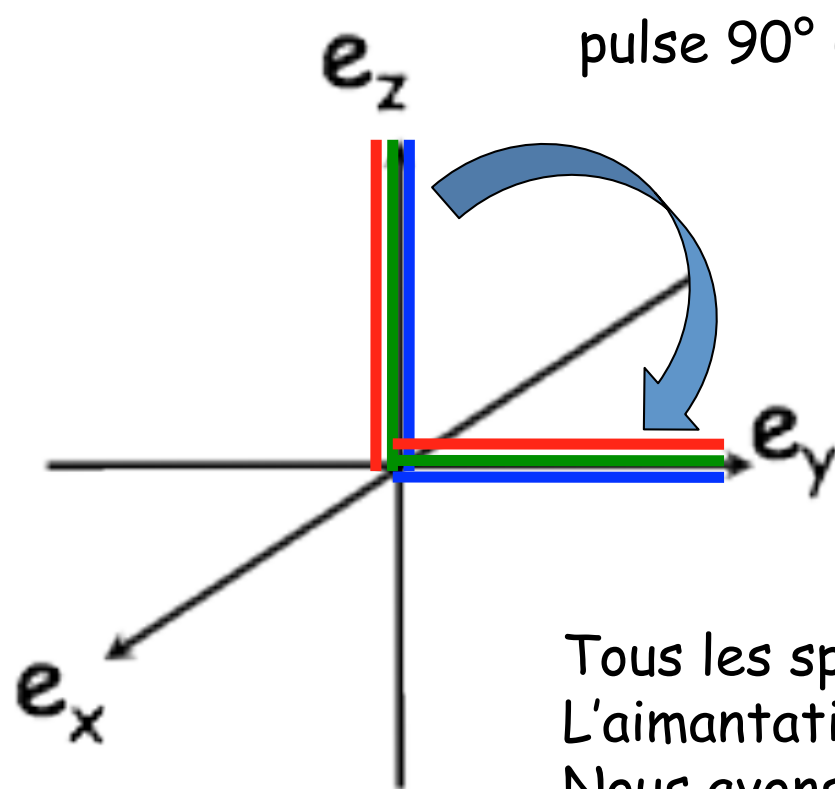


T_2 rapide mène à des pics large



T2: perte de cohérence

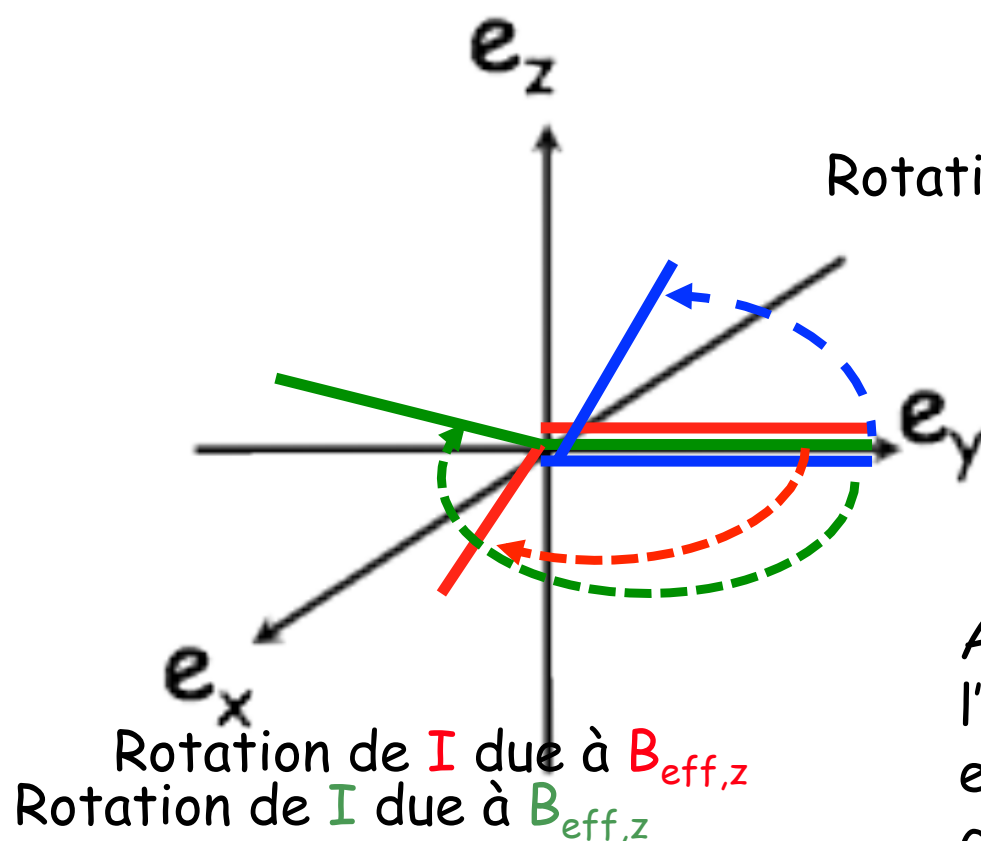
Considérons 3 spins associés à 3 copies d'une même molécule



Tous les spins sont alignés
L'aimantation nette est parallèle à l'axe e_y
Nous avons créé un état cohérent

T2: perte de cohérence

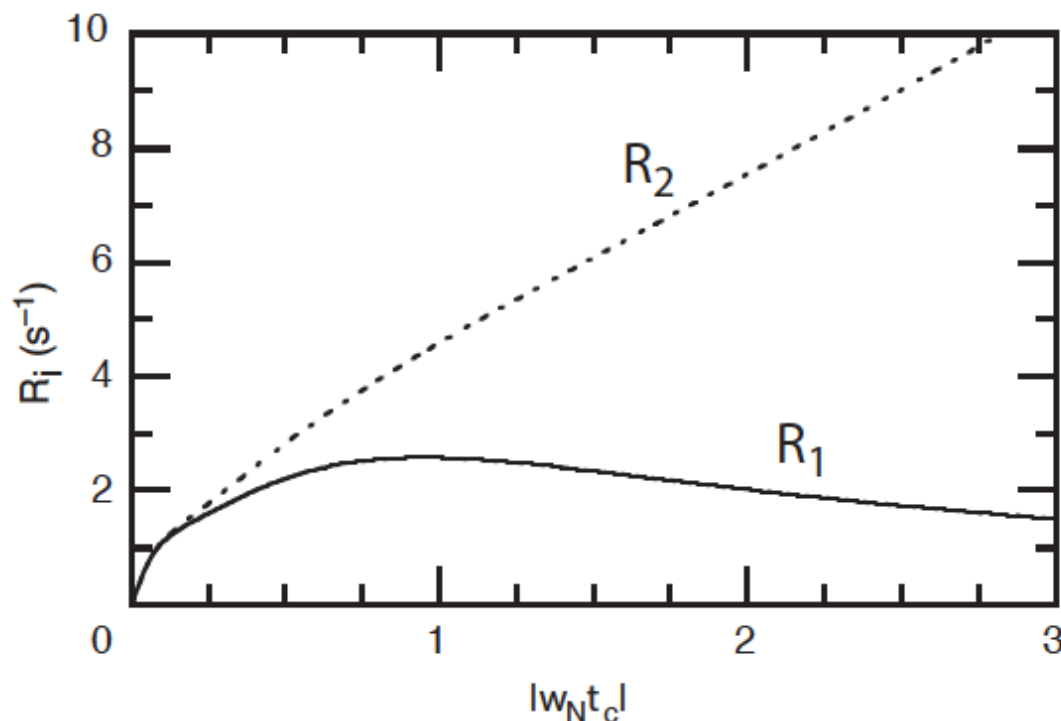
La composante z du champ stochastique Bloc induit des évolutions différentes pour les trois copies



Après une certaine durée, l'aimantation totale ($I+I+I$) décroît en intensité du fait de la perte de cohérence entre les différentes molécules

Paramètres gouvernant la relaxation

$$T=1/R$$



Cavanagh et al. 2006, Fig. 5.8

La relaxation dépend de:
Champ B_0
Nature des spins (1H , ^{15}N , ...)
Taille des molécules
Mouvements internes
Température
etc.....

Petites
Molécules globulaires

Grosses
Molécules globulaires

Plan

- ☞ Considérations générales sur l'importance des mouvements en biologie
- ☞ Temps et signaux RMN
- ☞ Méthodes RMN pour accéder aux différentes échelles de temps

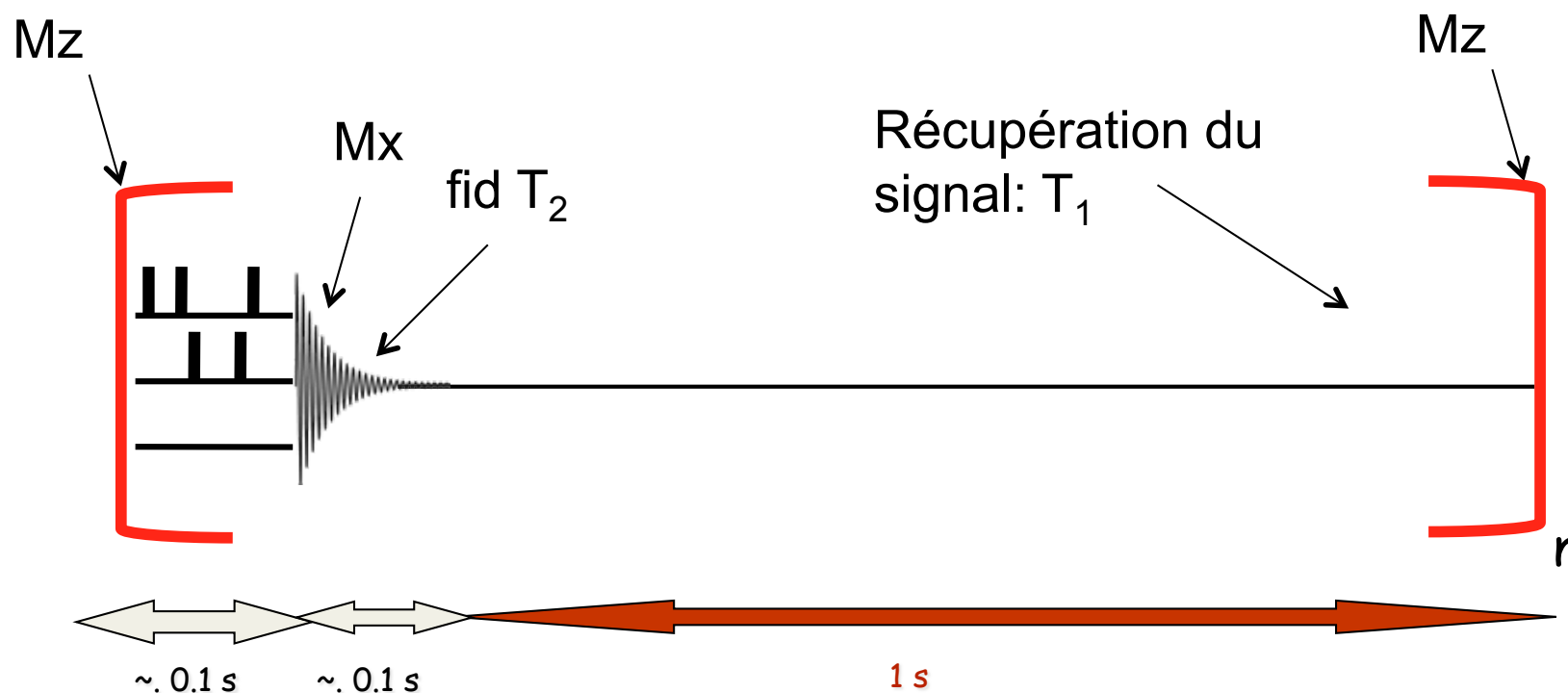
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide: μ s-ms

et finalement rapide: ps-ns

Une expérience RMN typique

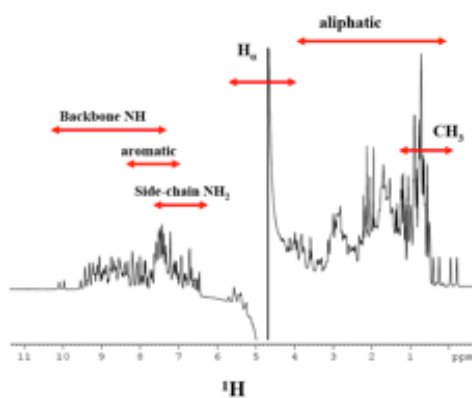


Le bloc élémentaire est répété pour augmenter le rapport signal sur bruit ou pour échantillonner la dimension indirecte (2D-3D-nD....)

Durée typique d'expériences RMN

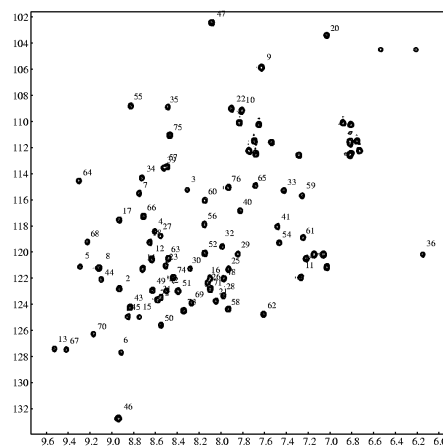
1D

s-min



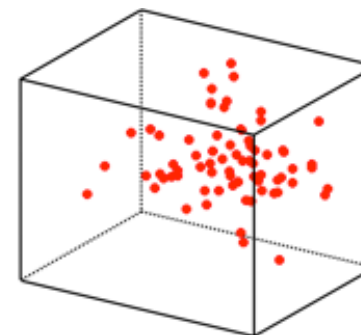
2D

min-h

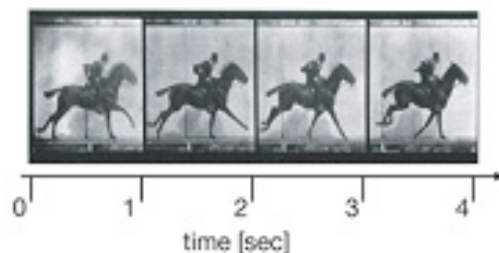


3D

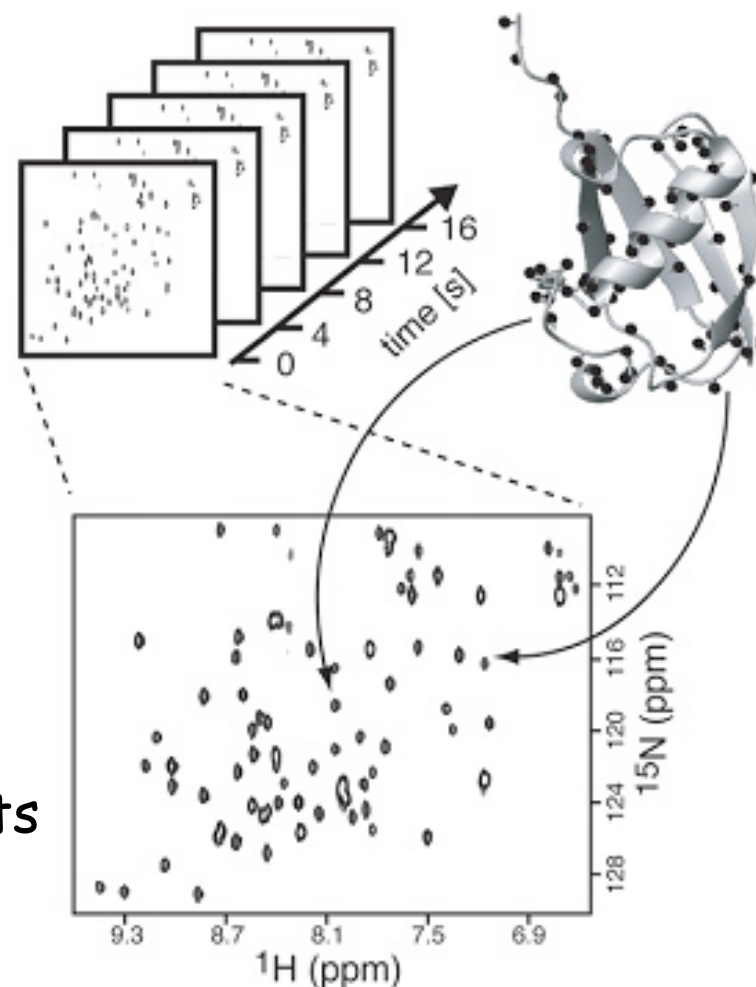
h-jour



Expérience de cinétique

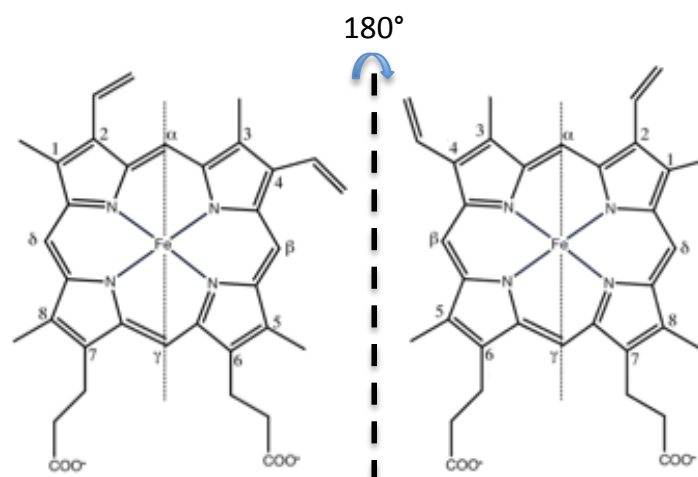
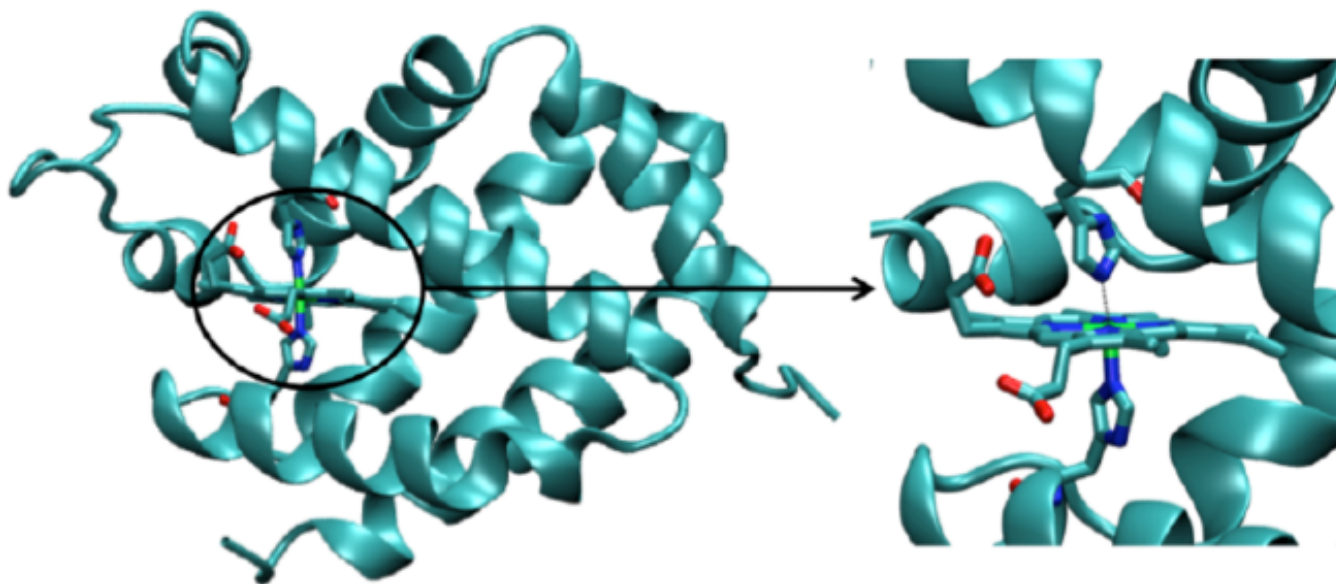


Prendre un cliché
instantané à chaque
instant Δt



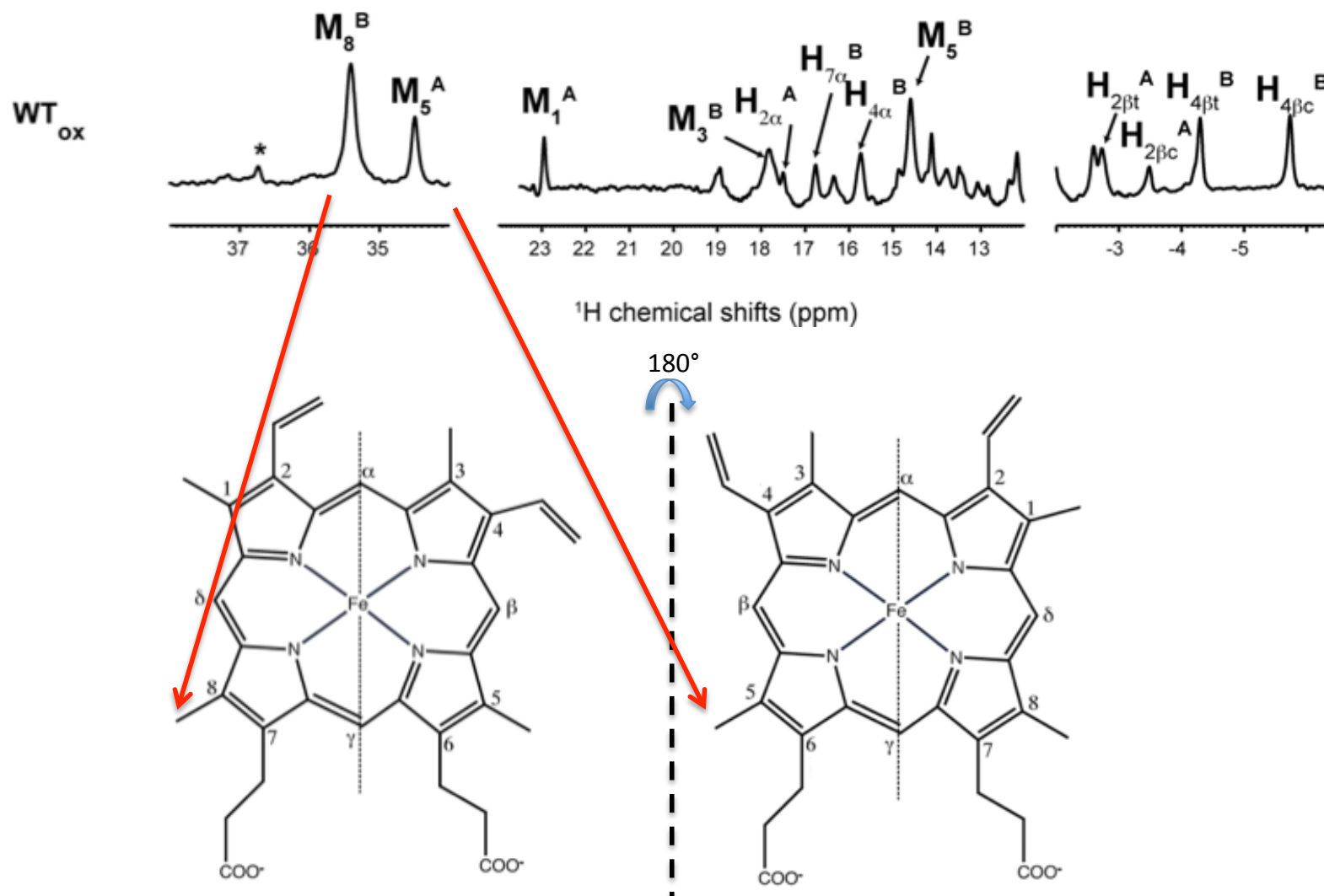
Corréler les changements
spectraux avec le
phénomène observé

Neuroglobin: une hémoprotéine



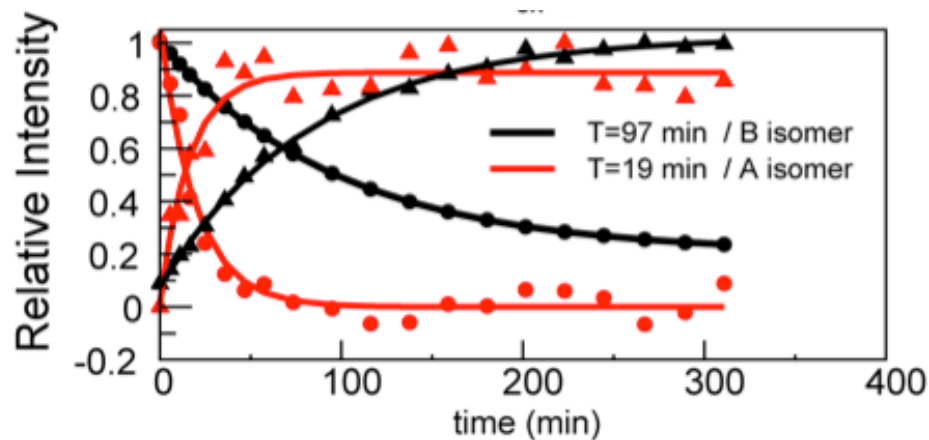
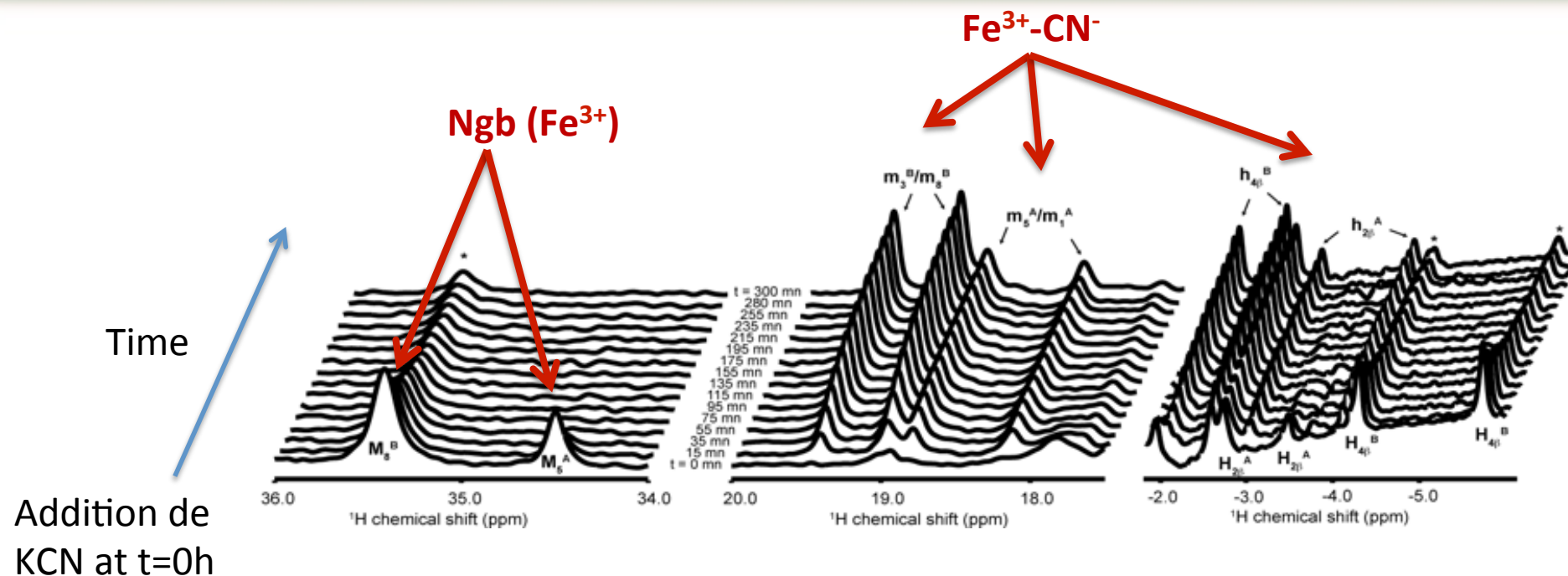
Hème B est presque symétrique

Neuroglobine: deux orientations dans la poche



Les deux orientations de l'hème (A et B) sont présentes dans la neuroglobine

Liaison de CN^- à la neuroglobine

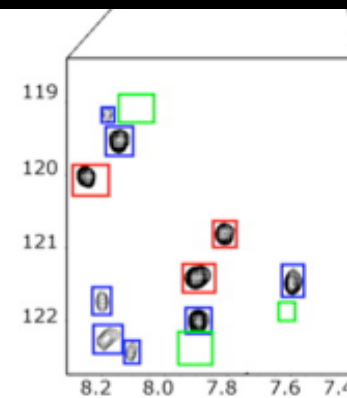
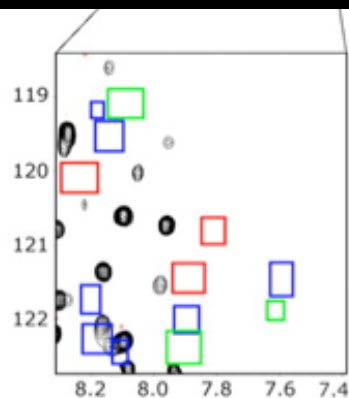
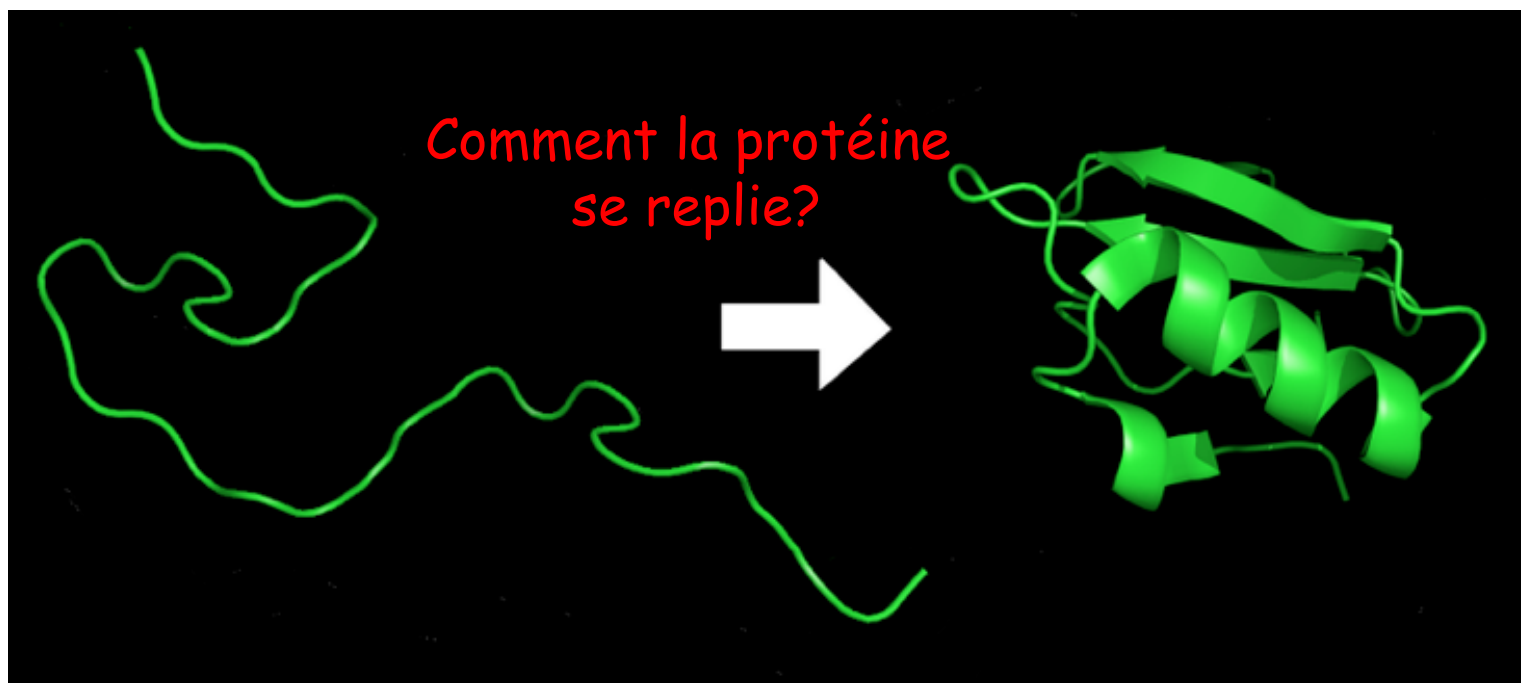


La forme minoritaire A lie CN^- 5 fois plus vite que la forme majoritaire

Bocahut et al. JBIC (2013)

Cinétiques suivies par des spectres 2D

Exemple: le chemin de repliement (folding) de la β_2 -Microglobulin



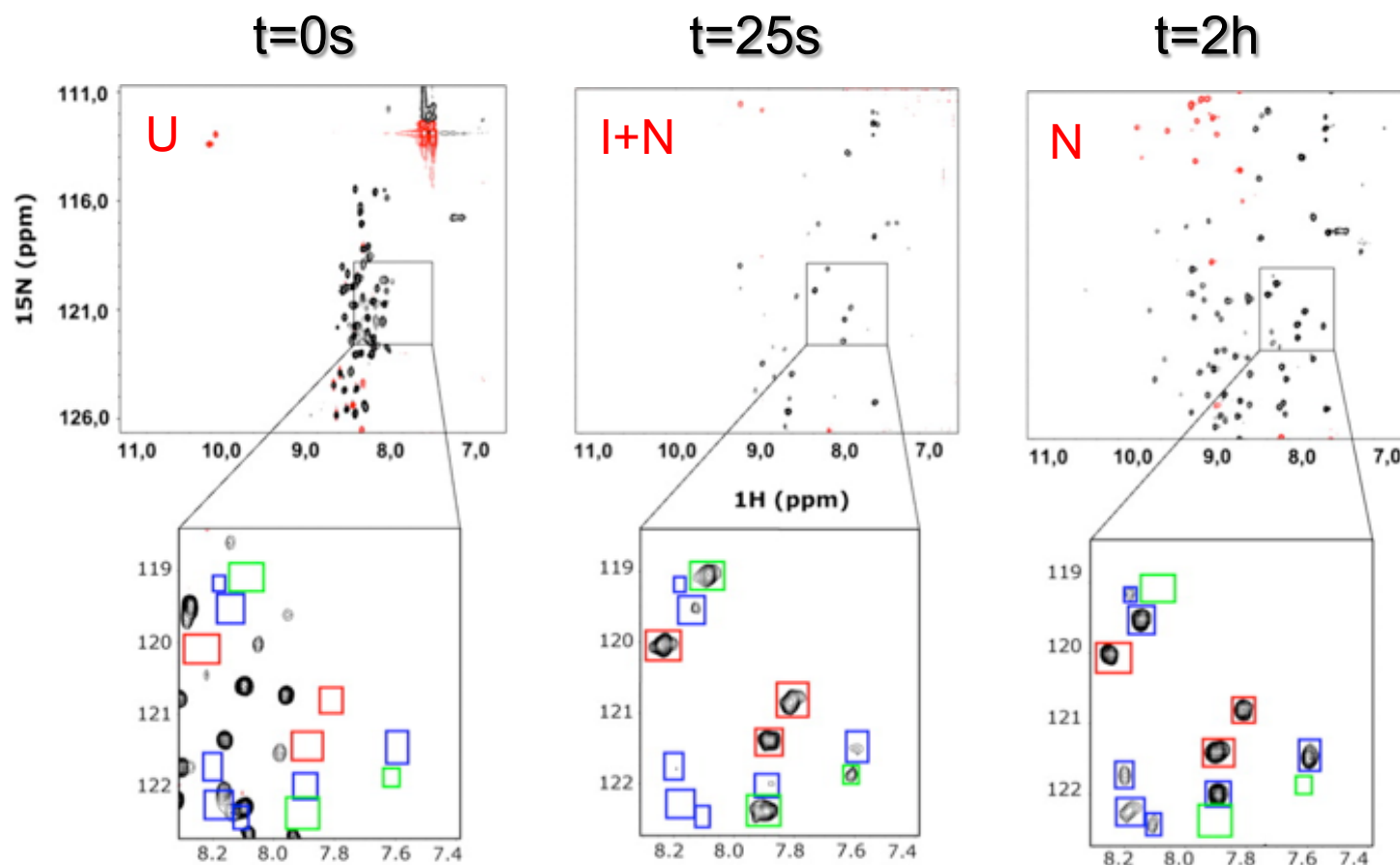
Corazza A, et al. J Biol Chem. 2010;285:5827-35.

Refolding suivi en temps réel

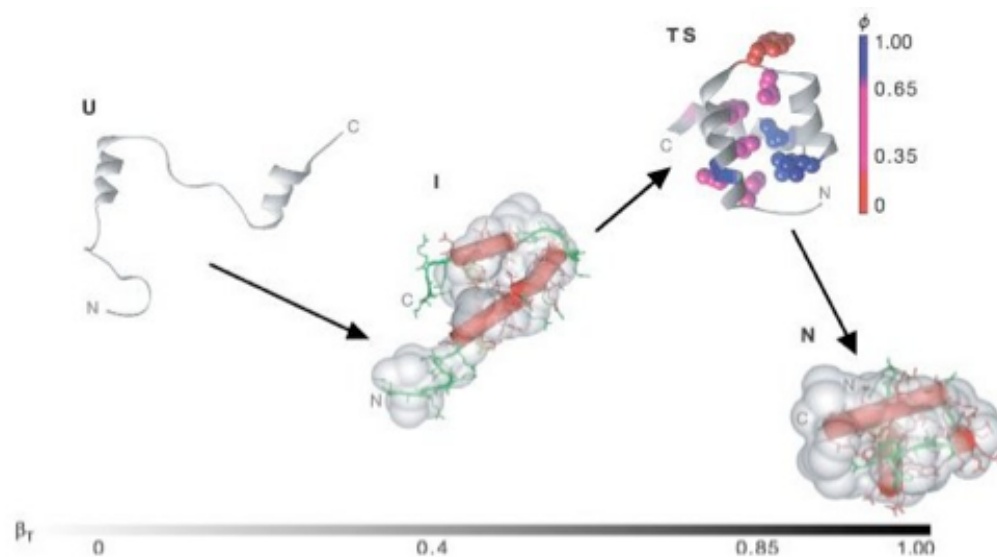
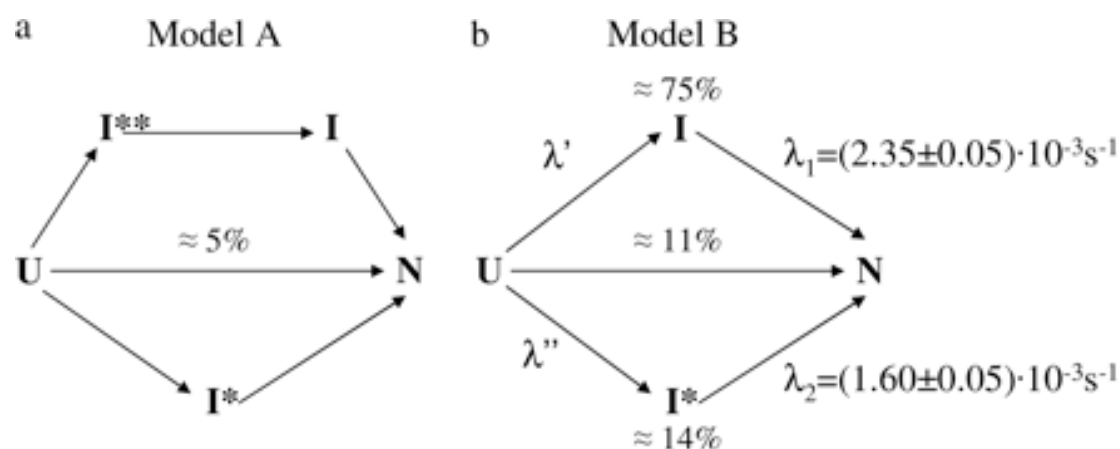
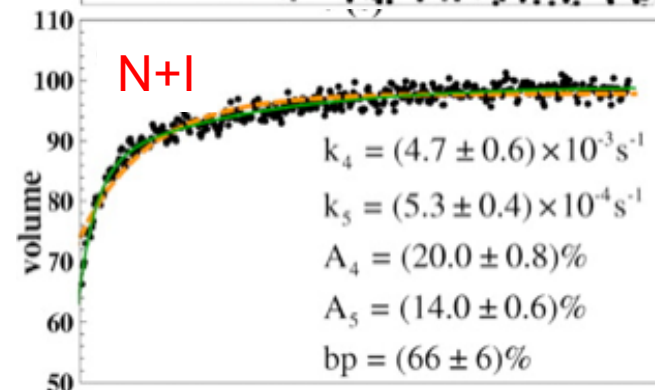
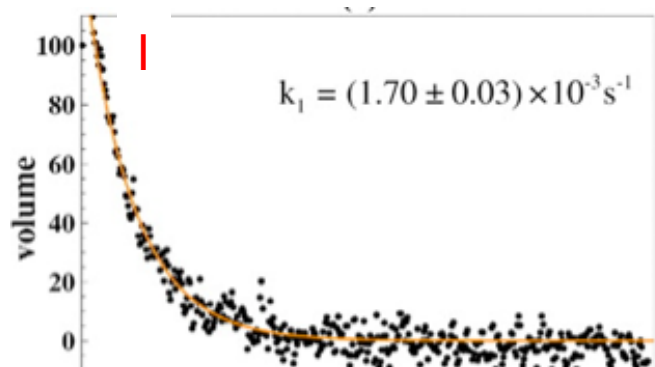
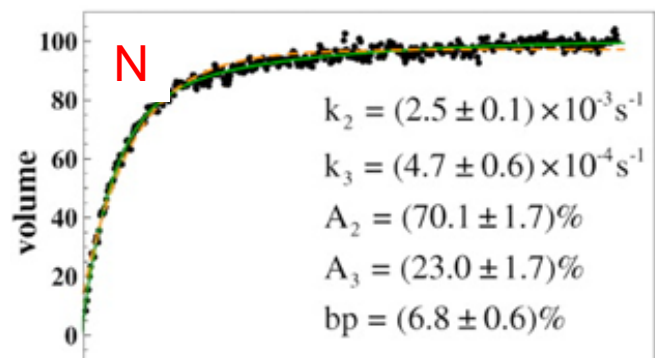
La protéine est initialement à pH 2.2

A $t=0s$, on induit un saut de pH à 7.4

-> collection de 2D HSQC chaque 15s



Mécanisme de refolding



Plan

- ☞ Considérations générales sur l'importance des mouvements en biologie
- ☞ Temps et signaux RMN
- ☞ Méthodes RMN pour accéder aux différentes échelles de temps

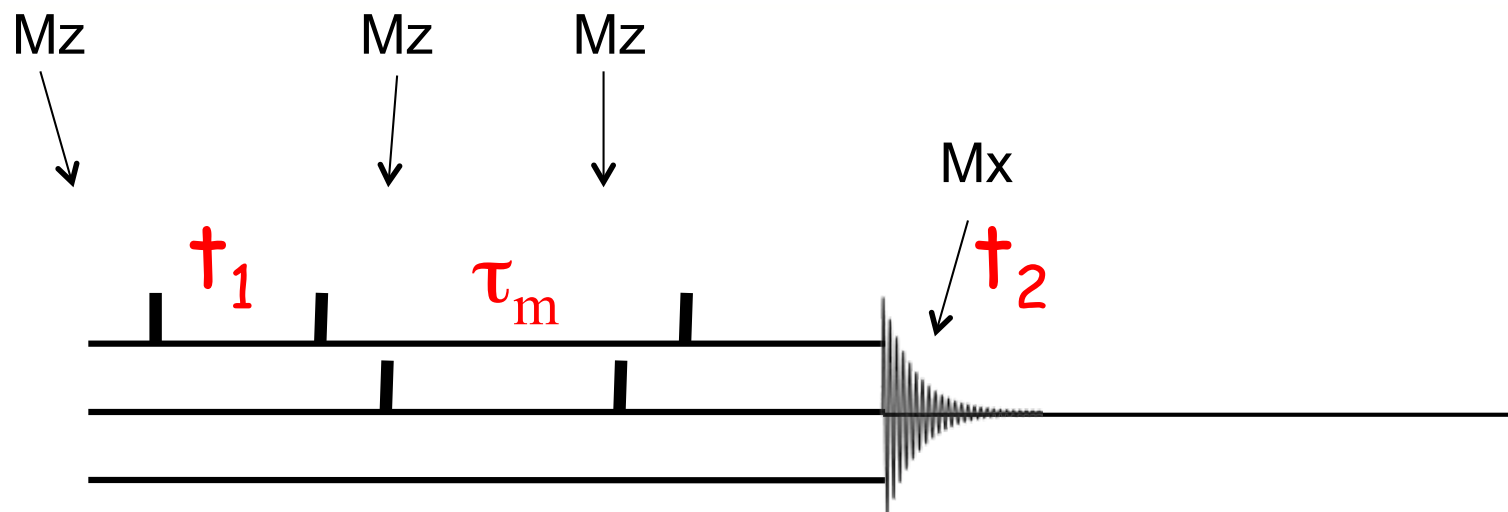
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide: μ s-ms

et finalement rapide: ps-ns

Stockage d'aimantation



L'aimantation peut être stockée pendant la séquence d'impulsion dans un état M_ρ pendant une durée τ_m puis reconvertie en M_x pour la détection

Tout phénomène dynamique ayant lieu pendant τ_m peut être étudié.
La durée maximale τ_m dépend de la durée de vie de M_ρ (et donc de sa relaxation)

Pour des protéines:

$$T_1 (^1\text{H}) \sim T_1 (^{15}\text{N}) \sim 1\text{s}$$

$$T_2 (^1\text{H}) \sim T_2 (^{15}\text{N}) \sim 10\text{-}100\text{ms}$$

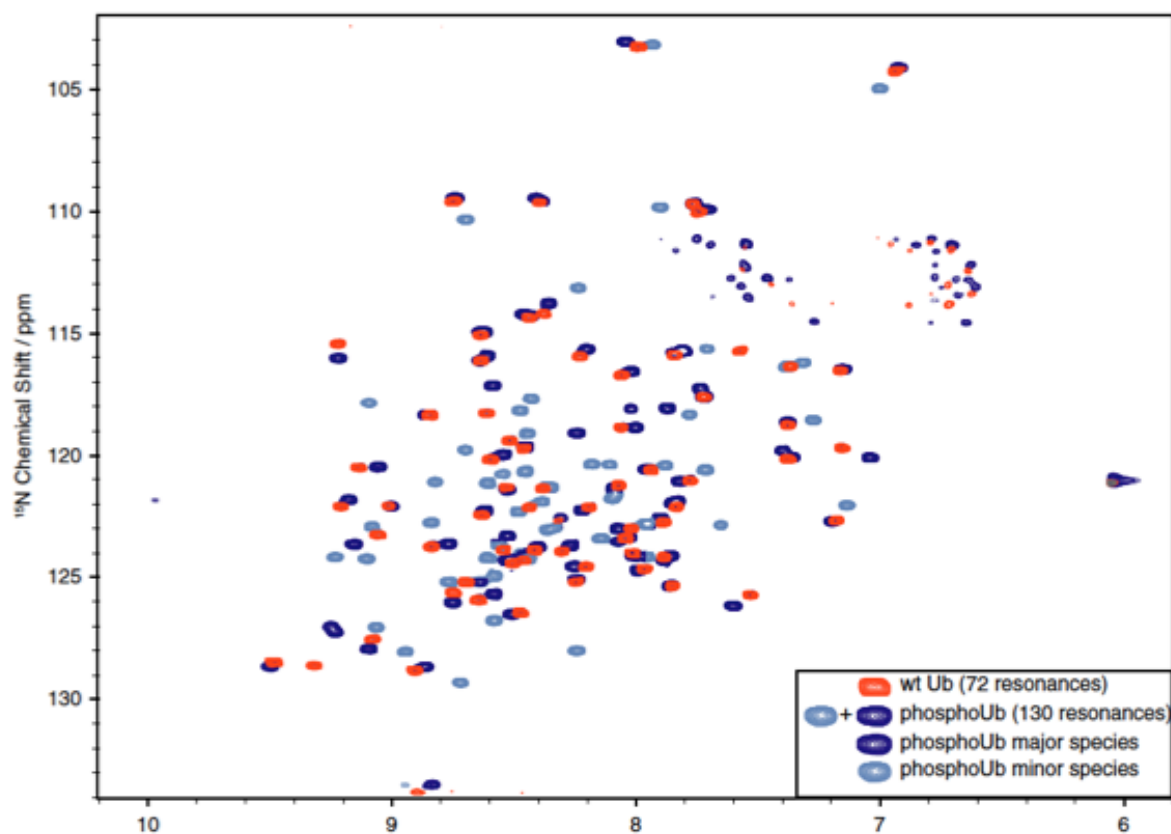
L'aimantation a une durée de vie plus longue si elle est stockée sur M_z

Echange lent entre deux conformations

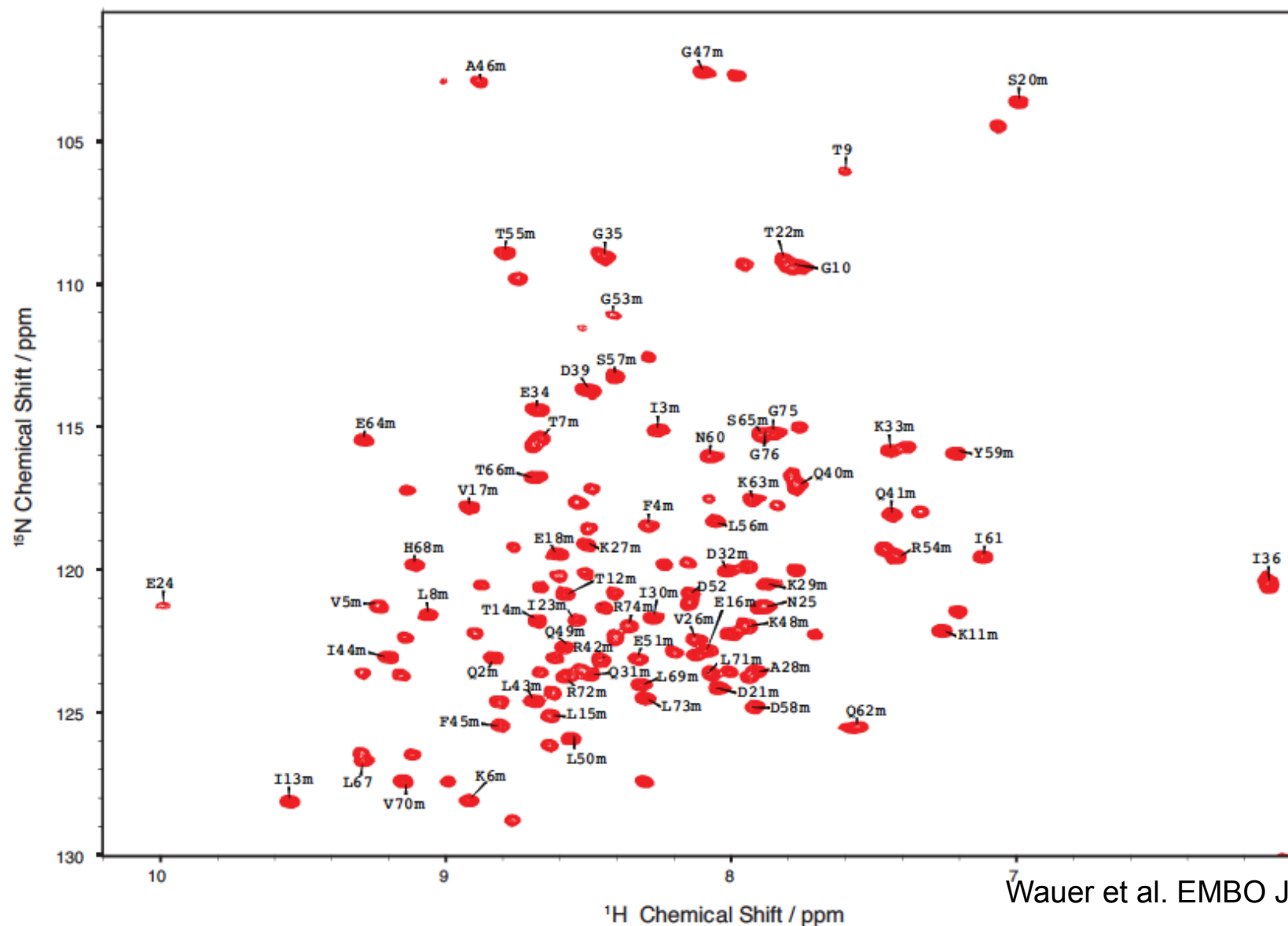


Une forme

Deux formes (pSer65)



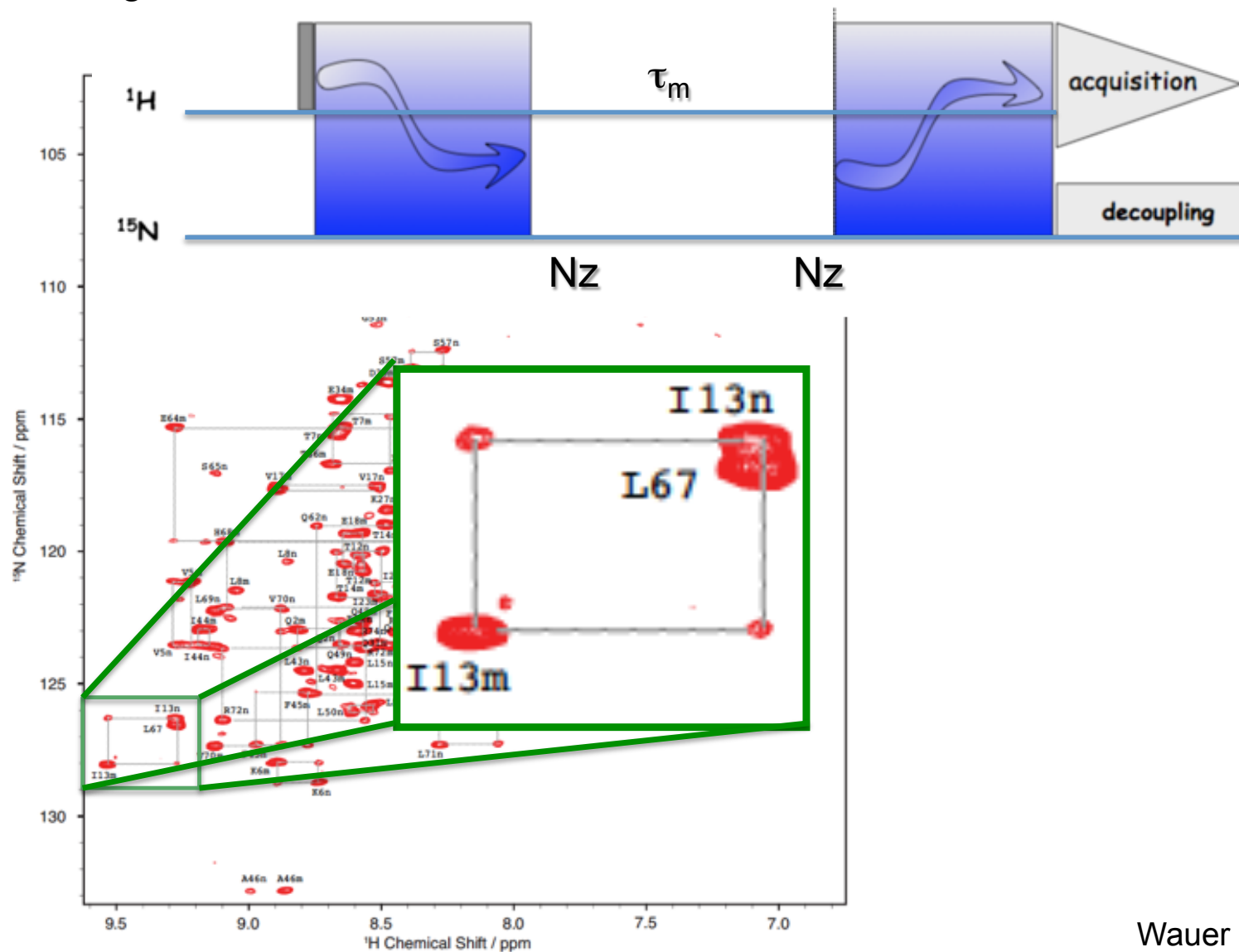
Wauer et al. EMBO J (2015)



Wauer et al. EMBO J (2015)

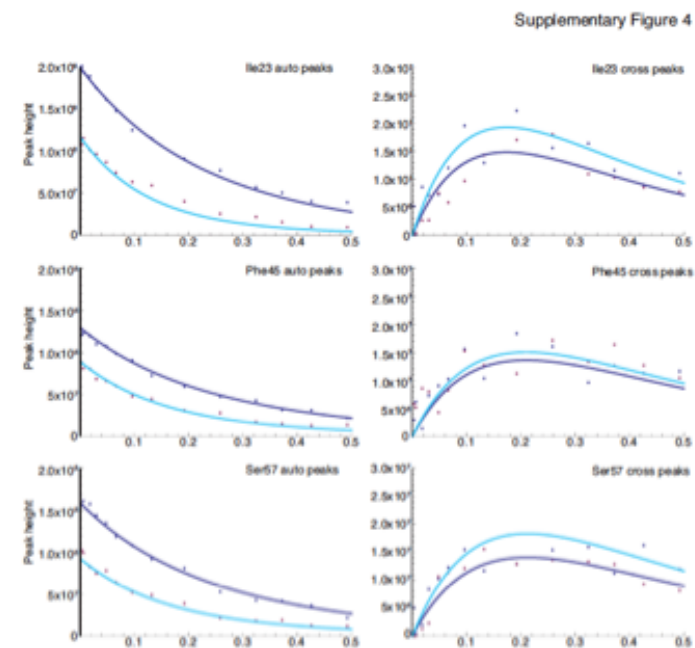
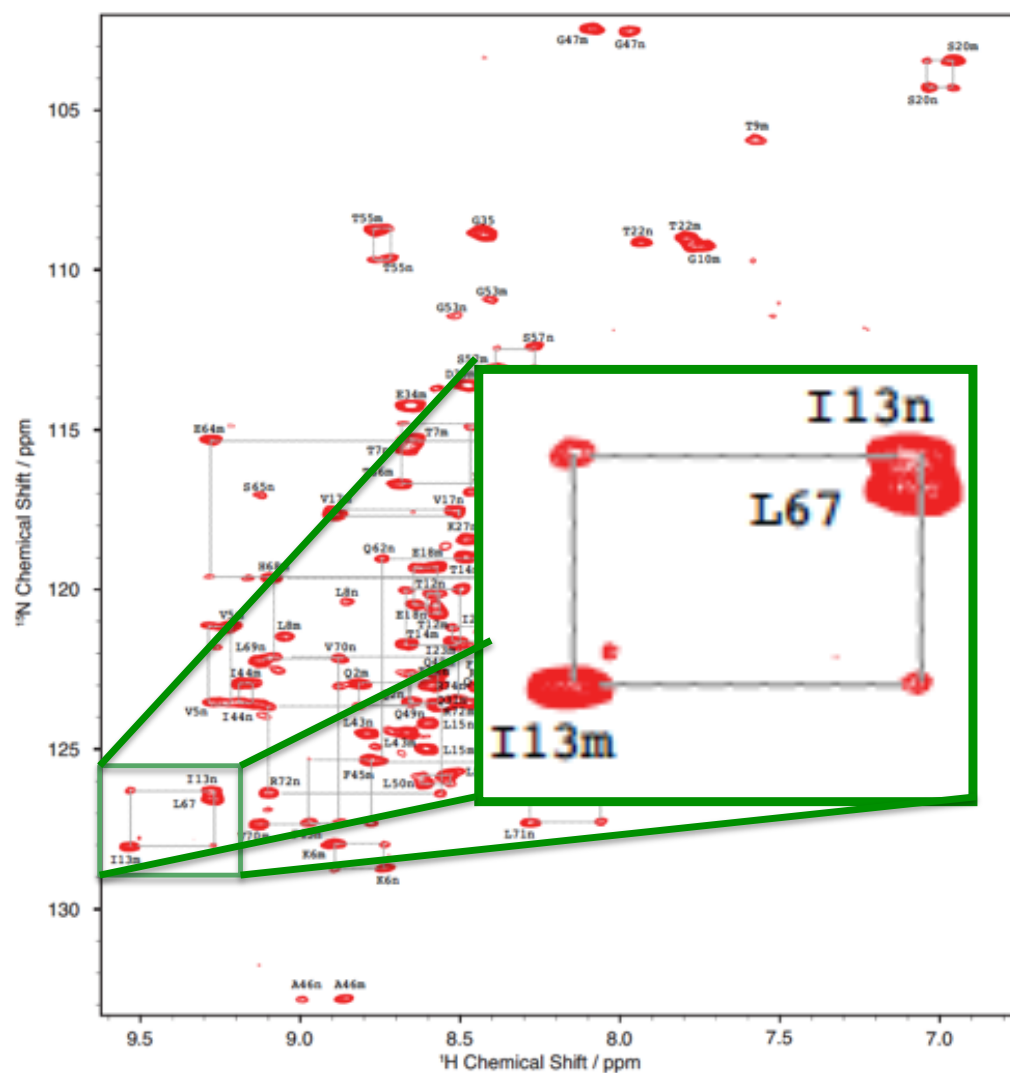
Spectroscopie d'échange ZZ

Stockage de l'aimantation sur ^{15}N durant $\tau_m = 100$ ms



Spectroscopie d'échange ZZ

Stockage de l'aimantation sur ^{15}N durant 100 ms



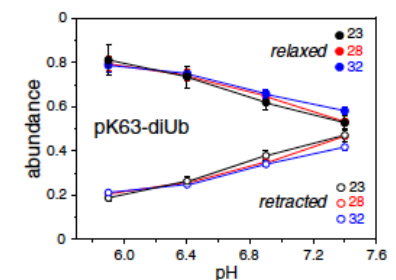
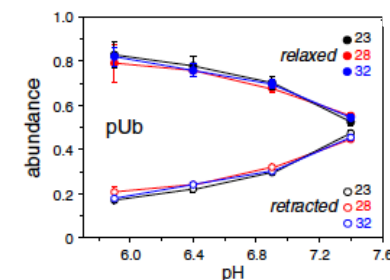
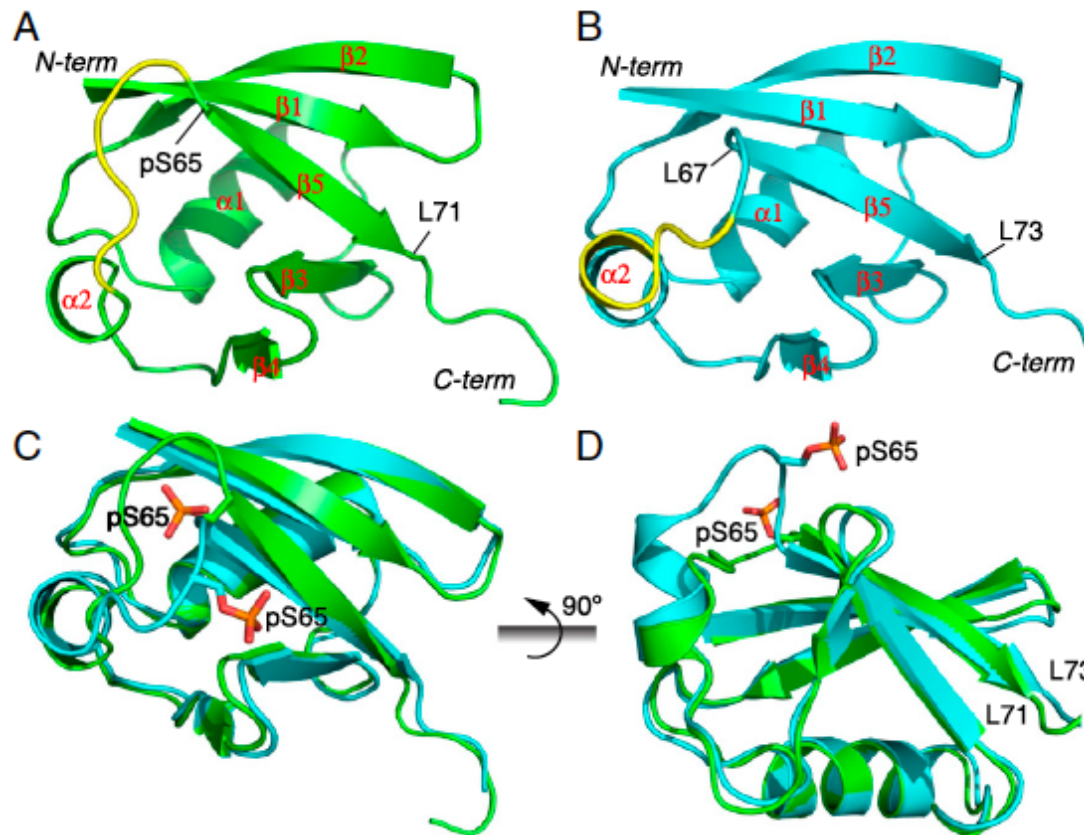
$$k_{\text{ex}} = 2\text{s}^{-1}$$

Détermination des deux structures en échange

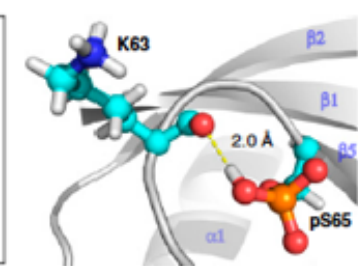
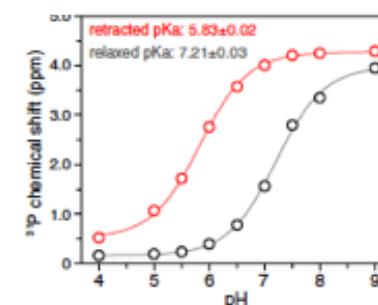
Forme relâchée
Similaire à Ub non phosphorylée

Forme reTRACTÉE

L'équilibre dépend du pH



Le pKa de la pSer65 est différent dans les deux structures

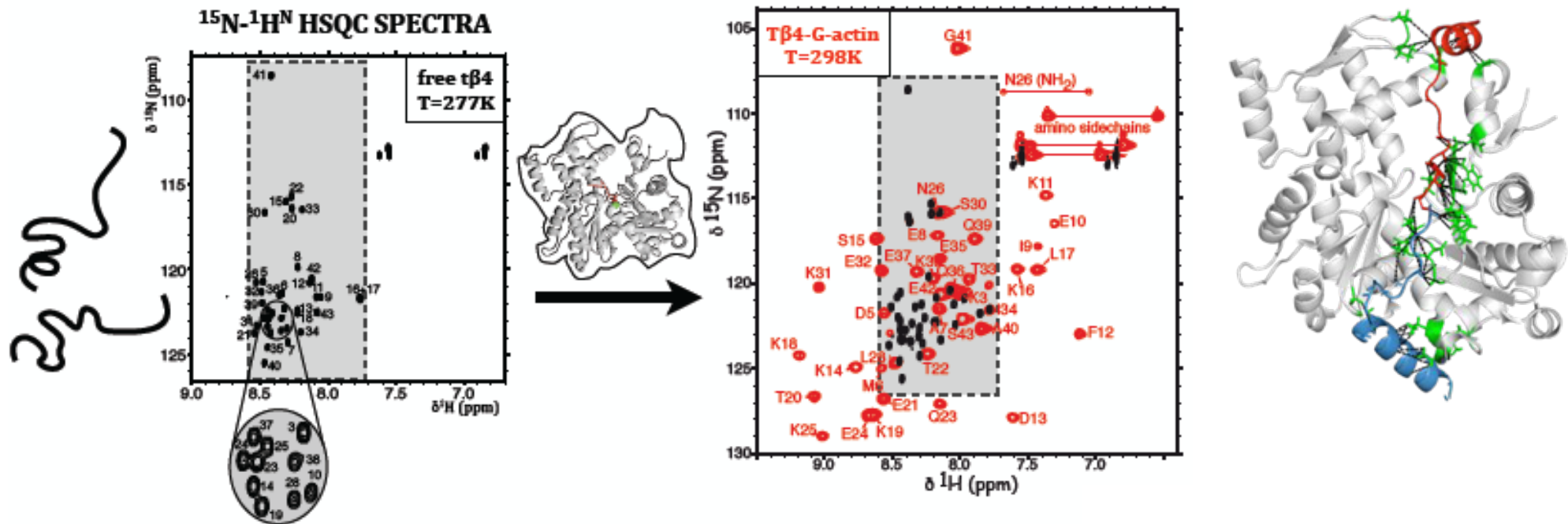


Détermination de la structure 3D de deux formes non purifiables
La phosphorylation rend la structure de l'ubiquitine sensible au pH
et donc aux interactions

Dong X et al. PNAS (2017)

Folding upon binding

Les domaines T β /WH2 régulent la polymérisation de l'actine (+ ou -)

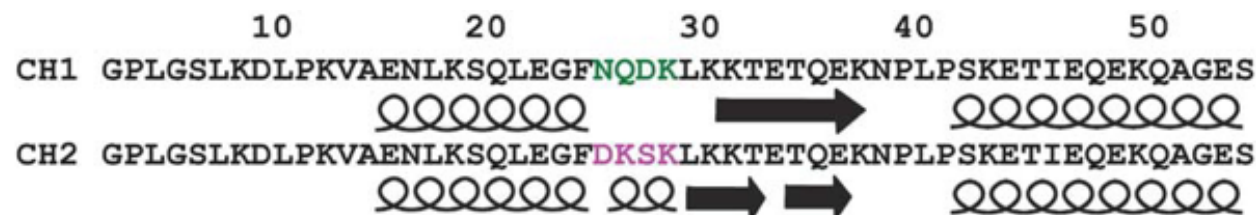


Peptide seul : complètement destructuré

Peptide en complexe avec l'actine F: adopte une structure en deux hélices α

Folding upon binding

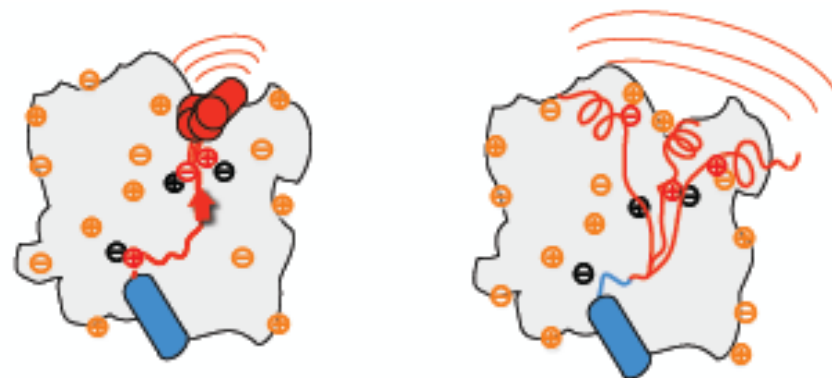
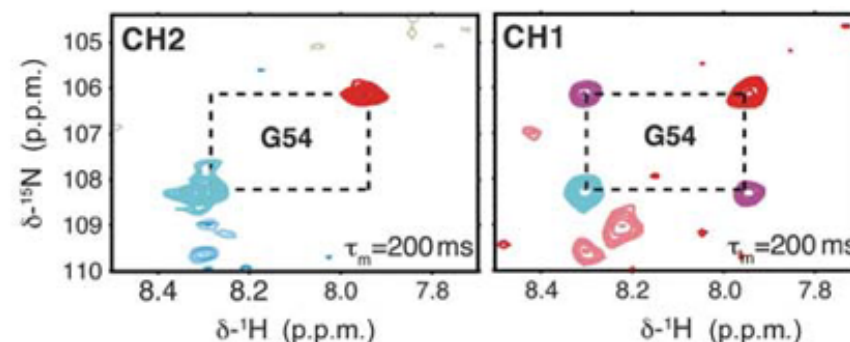
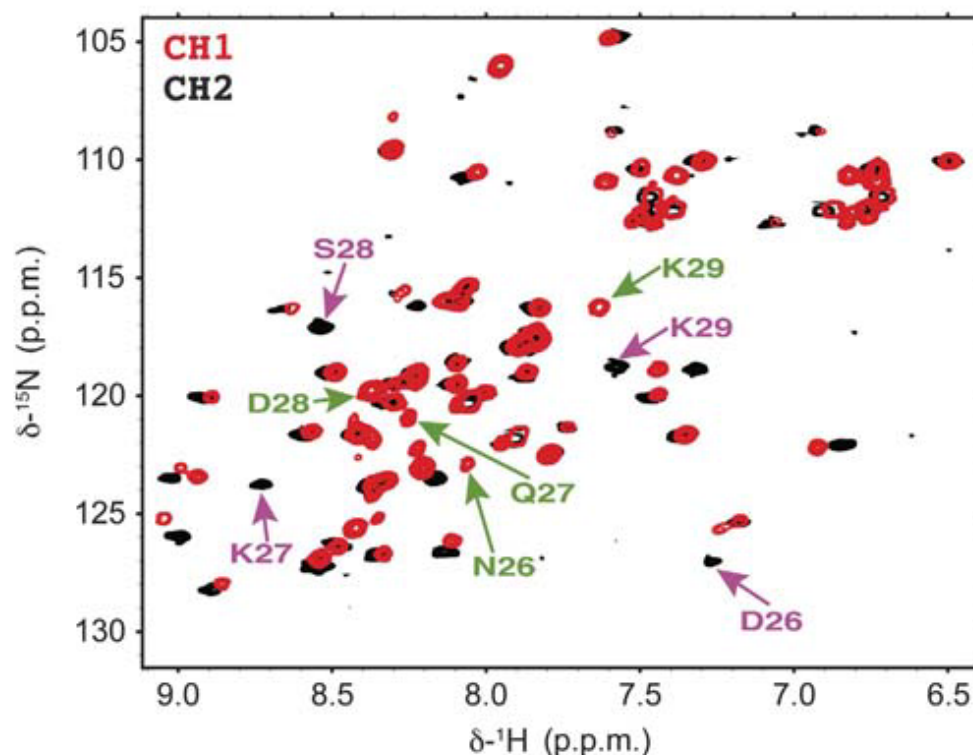
Deux peptides de séquences similaires mais d'action opposée sur l'actine



Inhibe la polymérisation

Favorise la polymérisation

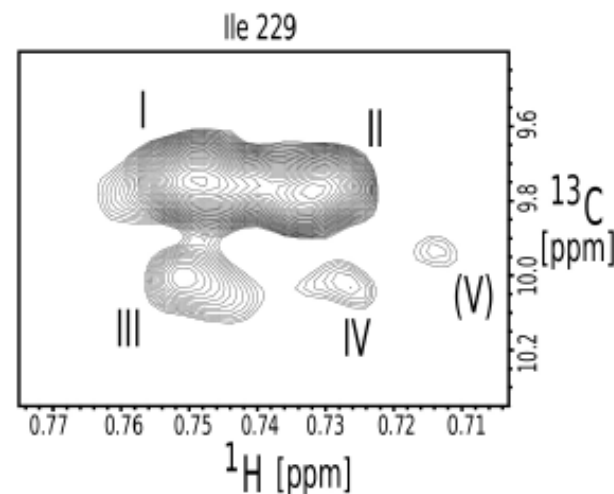
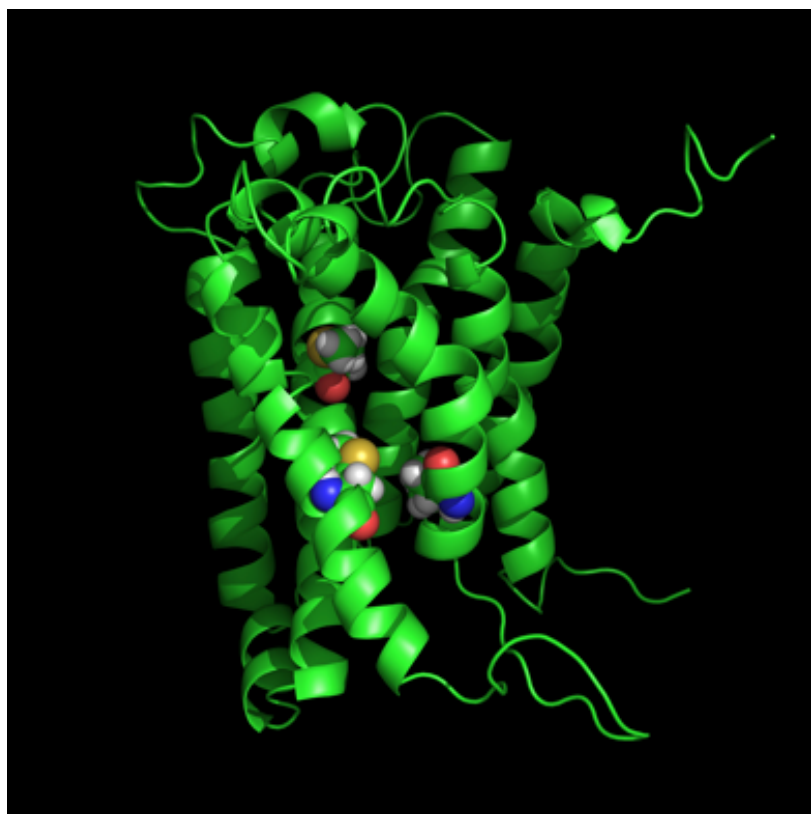
Mêmes spectres donc mêmes structures ... mais ... de dynamique différente



Paysage conformationnel de RCPG

Une seule isoleucine I229 dans le récepteur BLT2
Marquage 2H uniforme avec reprotoation des isoleucines.

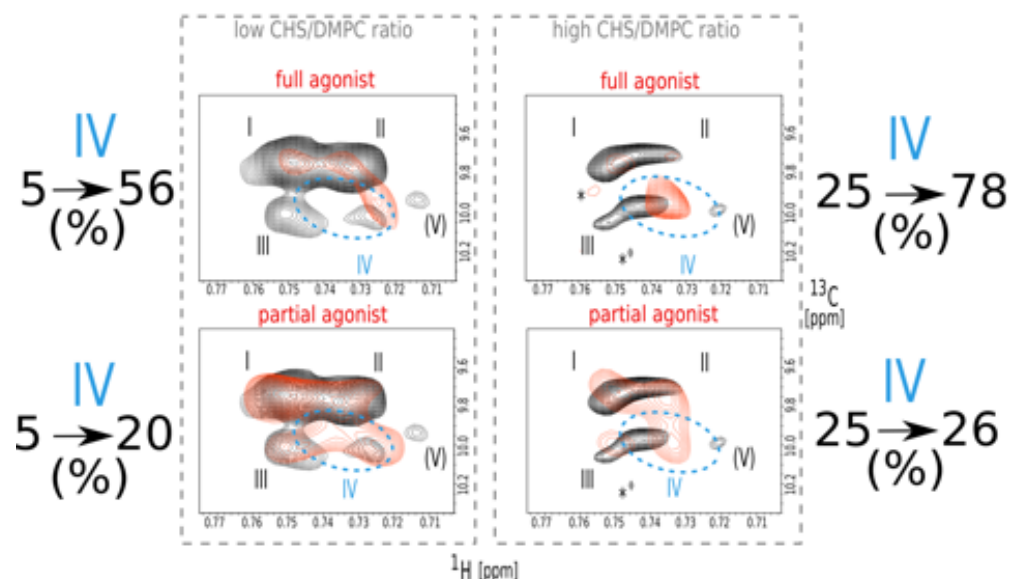
On s'attend à un seul signal dans le spectre ^{13}C HSQC



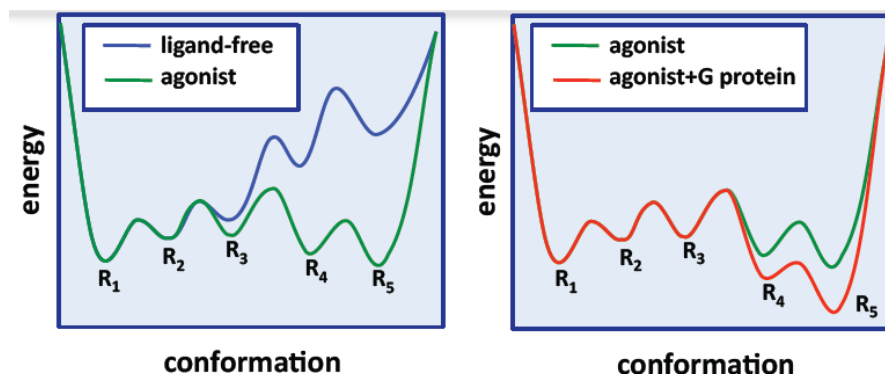
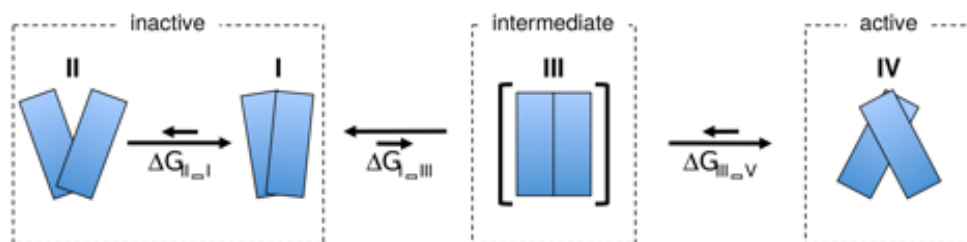
5 pics = 5 états conformationnels en échange lent
Intensité = population

Paysage conformationnel de RCPG

Les populations relatives varient avec la liaison aux agonistes/antagonistes et la composition en cholestérol



La forme active (IV) est stabilisée en présence d'agoniste ET de cholestérol



Casiraghi M. et al JACS (2016)

Plan

- ☞ Considérations générales sur l'importance des mouvements en biologie
- ☞ Temps et signaux RMN
- ☞ Méthodes RMN pour accéder aux différentes échelles de temps

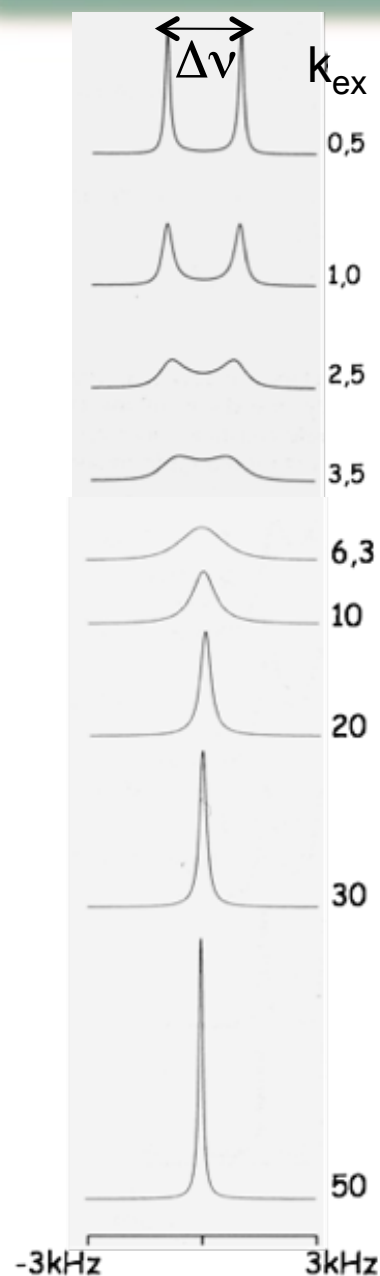
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide: μ s-ms

et finalement rapide: ps-ns

L'échange μ s-ms mène à de l'élargissement de raie



$$k_{ex} \lll 2\pi \Delta\nu$$

Echange lent
Raies séparées

$$k_{ex} < 2\pi \Delta\nu$$

$$k_{ex} \approx 2\pi \Delta\nu$$

Les pics sont élargis:

$$R_{2app} = R_2 + R_{ex}$$

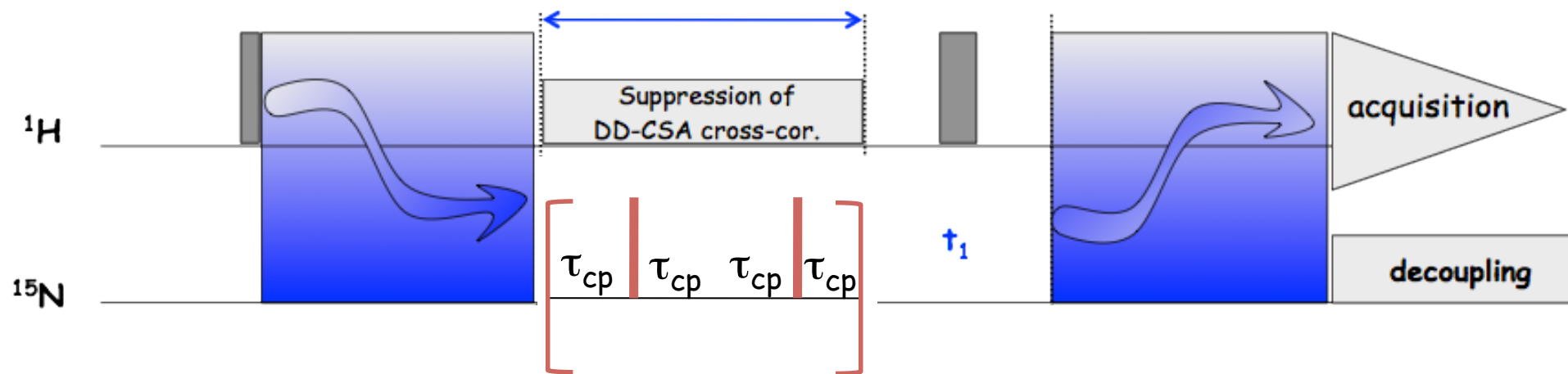
Terme additionnel
induit par l'échange

$$k_{ex} > 2\pi \Delta\nu$$

$$k_{ex} \ggg 2\pi \Delta\nu$$

Echange rapide
Raie unique (moyennée)

Expériences pour détecter les échanges μs -ms



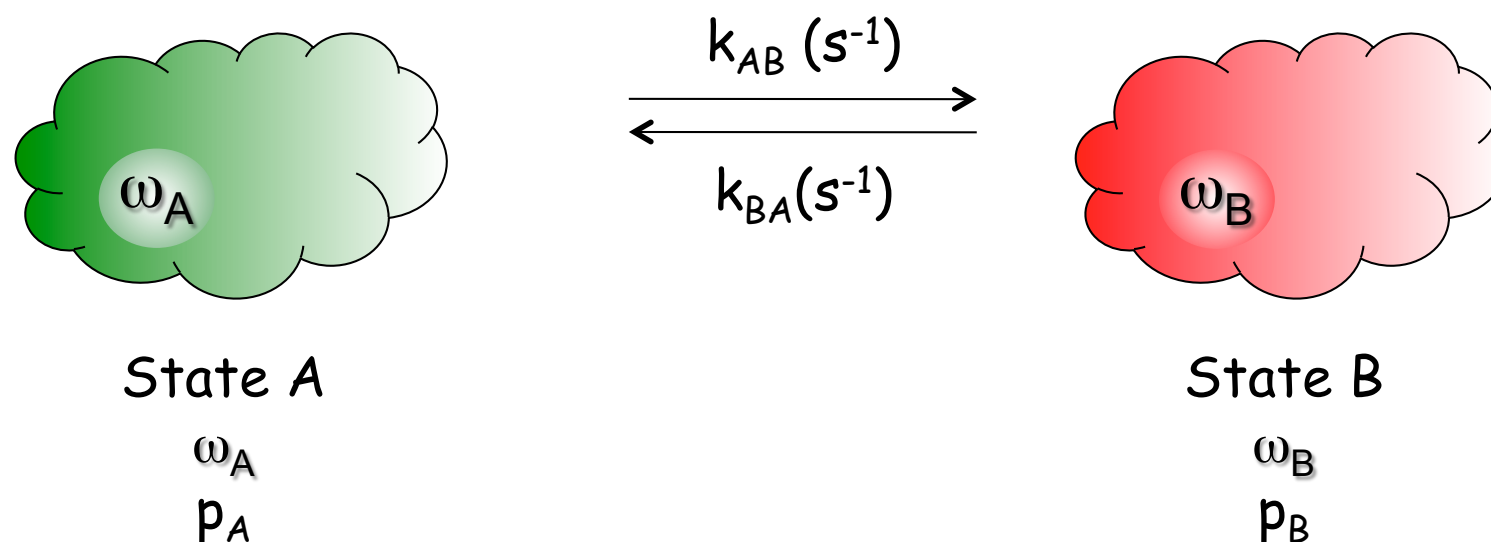
La contribution d'échange (R_{ex}) peut être réduite par l'application d'une séquence spécifique CPMG ou spin-lock ($T1\rho$):

$$R_{2app} = R_2 + R_{ex}(\tau_{cp})$$

$$\nu_{cp} = 1/\tau_{cp}$$

Experiences pour détecter les échanges ms

Dans le cas de dispersion de relaxation (CPMG)



$$R_{ex}(\tau_{CP}) = (\Delta\omega)^2 p_A p_B \tau_{ex} \left[1 - \frac{2\tau_{ex}}{\tau_{CP}} \tanh\left(\frac{\tau_{CP}}{2\tau_{ex}}\right) \right]$$

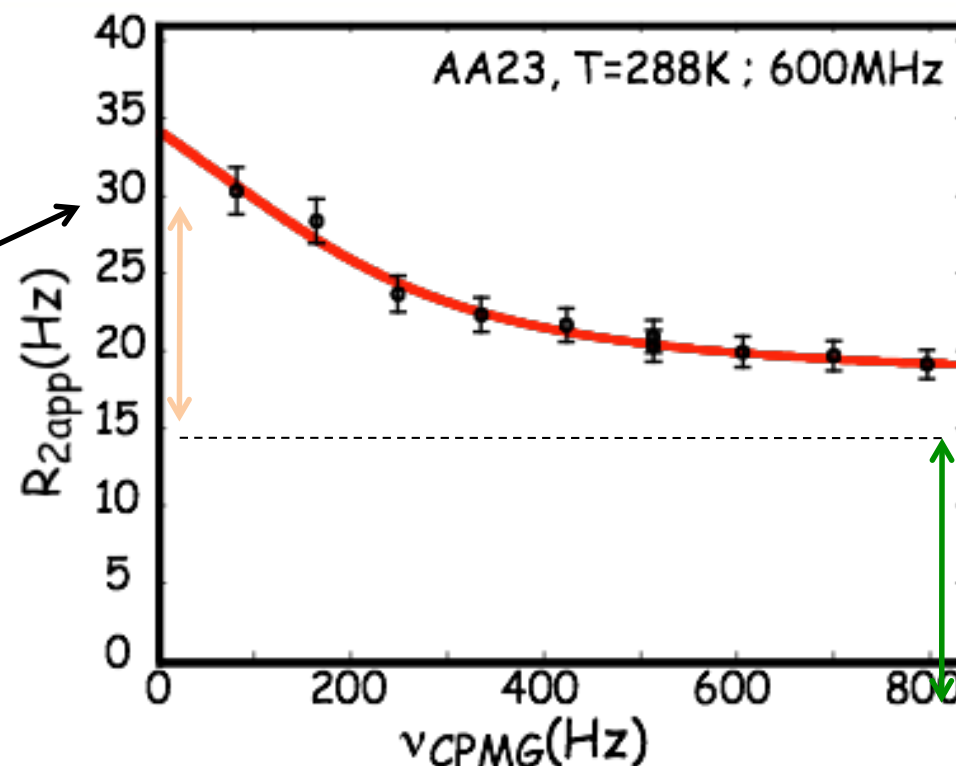
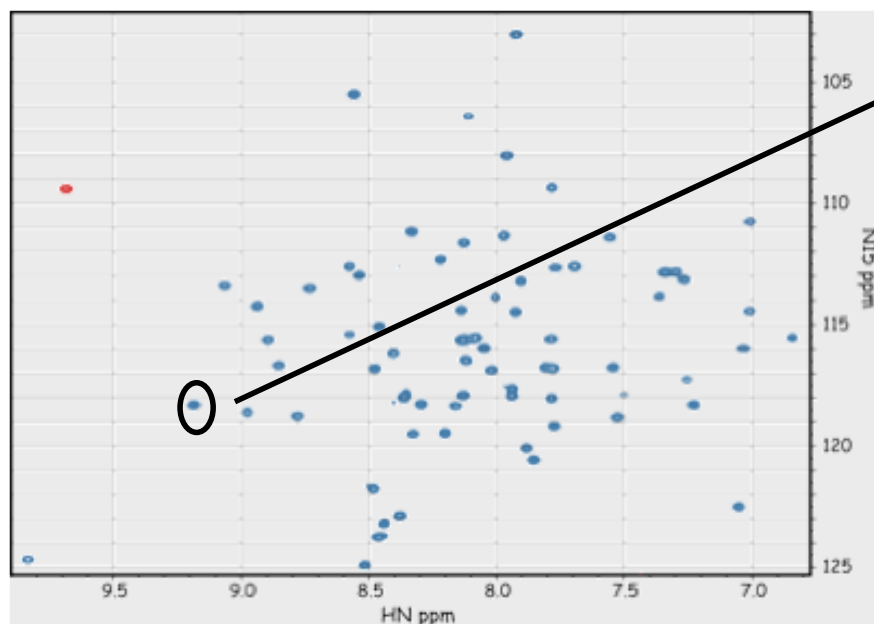
$$\frac{1}{\tau_{ex}} = k_{ex} = k_{AB} + k_{BA}$$

$$\Delta\omega = \omega_A - \omega_B$$

Accès à :

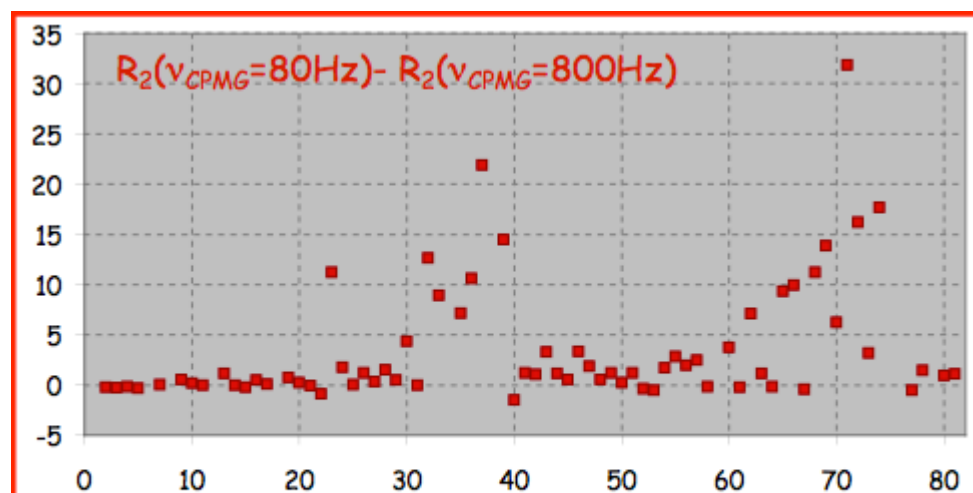
- (1) structure ($\Delta\omega$)
- (2) thermodynamique (p_A/p_B)
- (3) Cinétique (k_{ex})

Expériences pour détecter les échanges ms

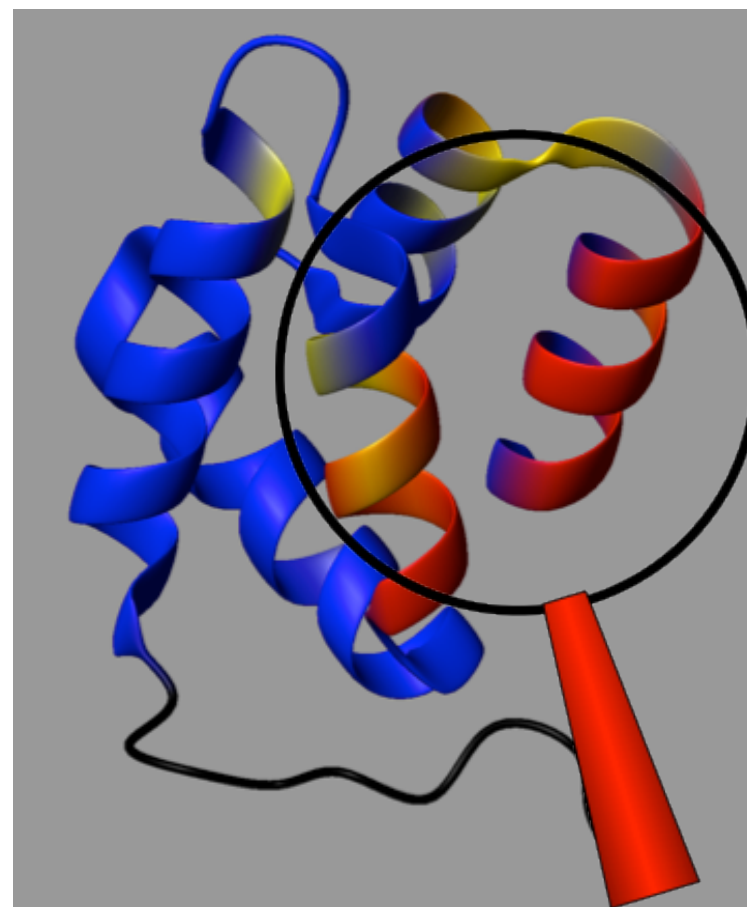


$\tau_{ex} \sim 0,7 \pm 0,2 ms$
 $\Delta\delta = 1,0 \pm 0,5 ppm$
 $\tau_{ex} = 0.7 ms$
 $\Delta\omega = 1 ppm$
 $p_B = 5\% / p_A = 95\%$

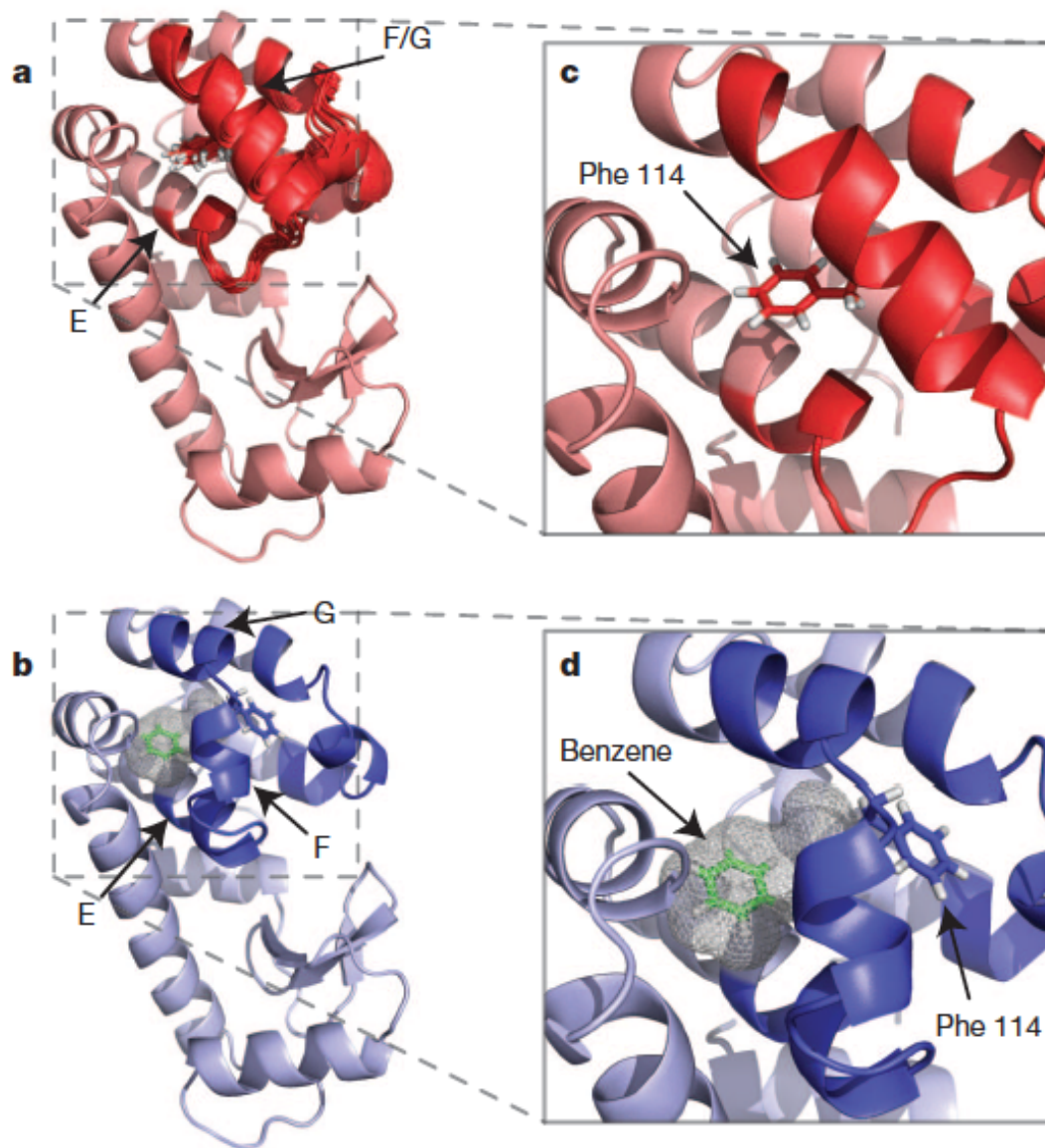
Exemple: le cas de l'annexine



Residue number



Mouvement collectif et concerté de structures secondaires
L'arrangement des deux hélices change à l'échelle de la milliseconde



Structure RMN du mutant L99A/T4L du lysozyme (état excité peuplé à 3%)



Structure RX du mutant L99A/T4L du lysozyme (état fondamental)

Bouvignies et al. Nature (2012)

Plan

- ☞ Considérations générales sur l'importance des mouvements en biologie
- ☞ Temps et signaux RMN
- ☞ Méthodes RMN pour accéder aux différentes échelles de temps

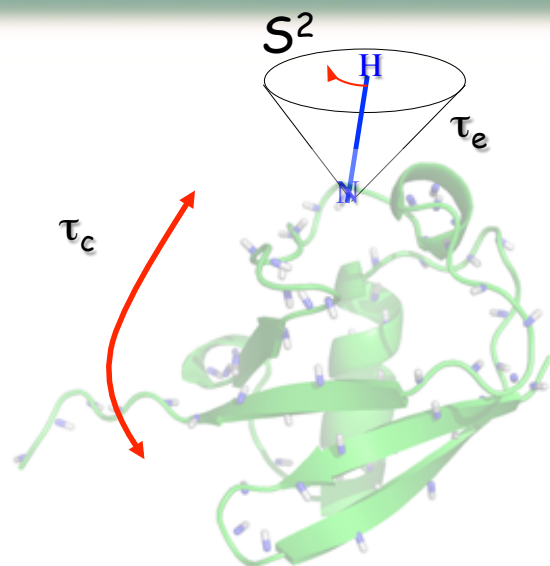
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide: μ s-ms

et finalement rapide: ps-ns

Réorientation moléculaire et mouvements internes



τ_c : temps requis pour une molécule pour tourner de 1 rad

S^2 : paramètres d'ordre décrit amplitude du mouvement interne

$S^2=1$ si complètement rigide

$S^2=0$ si complètement flexible

τ_e : temps de corrélation des mouvements internes

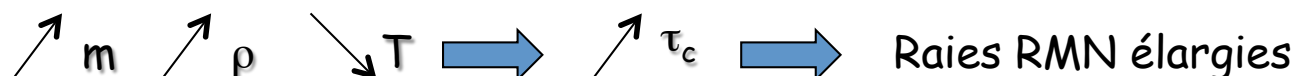
Le temps de corrélation τ_c décrit la réorientation moléculaire

Et dépend de la taille de la protéine (masse m), de la température T et de la viscosité (ρ):

$$\tau_c = \frac{\eta^* V}{k_B T}$$

Equation de Stokes-Einstein

η^* : viscosité du milieu, k_B : constante de Boltzmann, T : température

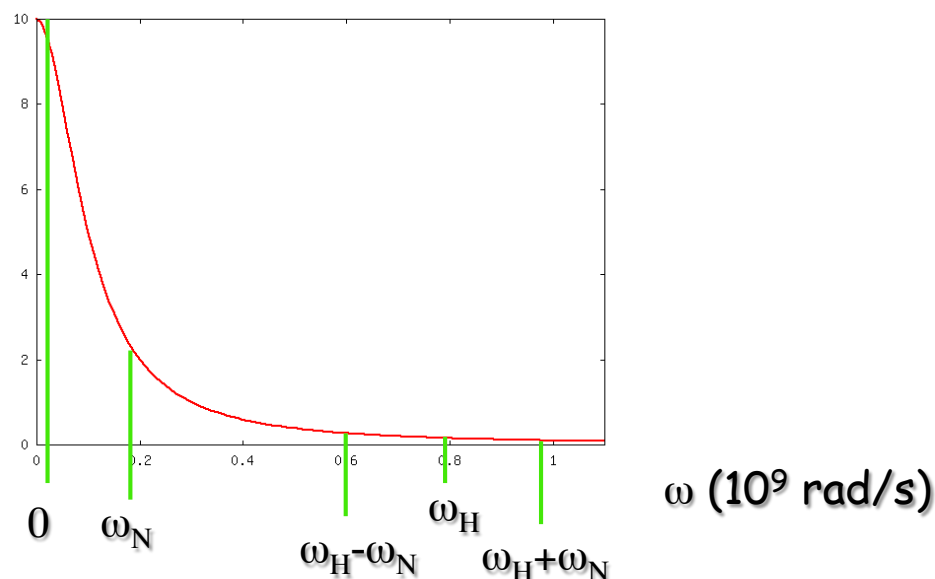


Relaxation et densité d'énergie $J(\omega)$

$$\begin{aligned}
 R_1(^{15}\text{N}_z) &= (3d + c)J(\omega_S) + dJ(\omega_I - \omega_S) + 6dJ(\omega_I + \omega_S) \\
 R_2(^{15}\text{N}_{x,y}) &= \frac{6d + 2c}{3}J(0) + \frac{3d + c}{2}J(\omega_S) + \frac{d}{2}J(\omega_I - \omega_S) + 3dJ(\omega_I) + 3dJ(\omega_I + \omega_S) \\
 \sigma^{\text{NOE}} &= d[6J(\omega_I + \omega_S) - J(\omega_I - \omega_S)]
 \end{aligned}$$

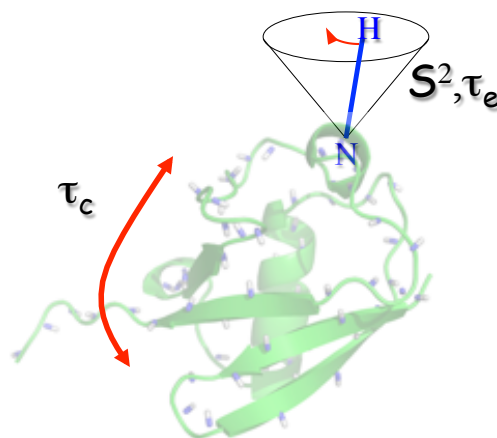
$$\begin{aligned}
 d &= \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{4r^6} \\
 c &= \frac{\omega_S^2 \delta^2 C_{SA}}{3}
 \end{aligned}$$

Fonction densité spectrale
 $J(\omega)$ (ns)



^{15}N R_1 , R_2 et NOE dépendent des mouvements aux fréquences 0, ω_H et ω_N
soit ~ 1000 MHz (ns) et ~ 100 MHz (10ns)

Approche model-free



Mesure de ^{15}N R_1 ,
 R_2 et ^1H - ^{15}N NOE
à un champ B_0



Estimation de τ_c à
partir de R_2/R_1

$$\tau_c = \frac{1}{2\omega_N^2} \sqrt{\frac{6R_2}{R_1} - 7}$$

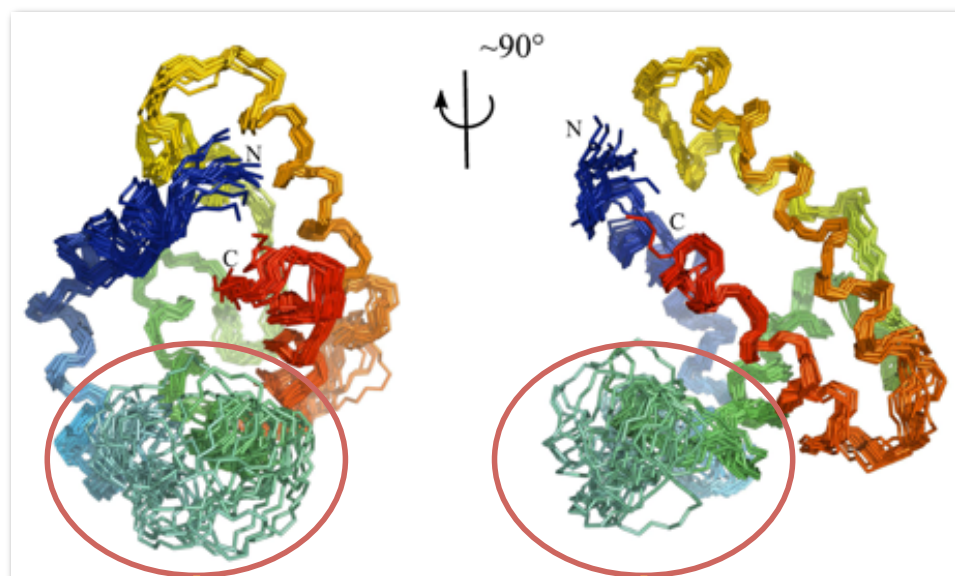
Détermination de la
réorientation globale
(éventuellement
rotation anisotrope)



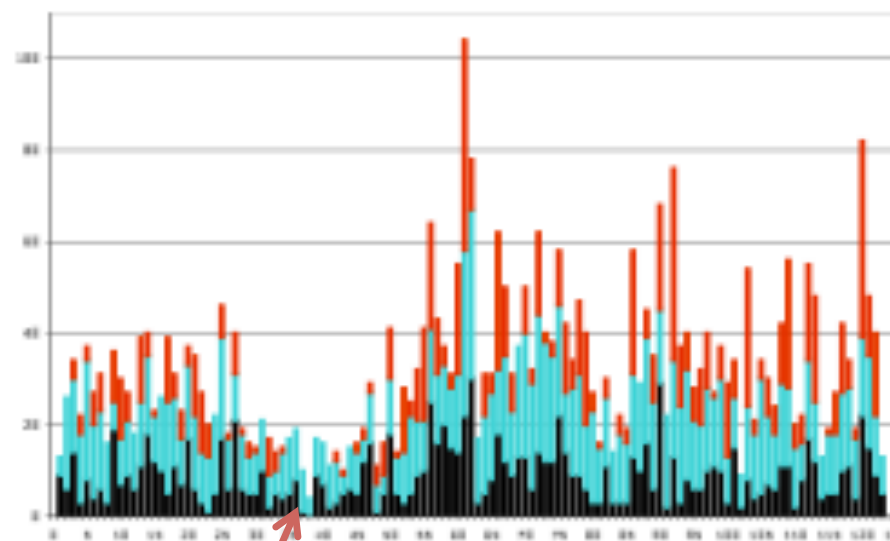
Extraction de paramètres
 S^2, τ_e, R_{ex} en ajustant les
données expérimentales

Détermination de la
mobilité locale
(formalisme model-
free)

ASP2: une protéine de liaison aux odeurs



Nombre de NOE/résidu

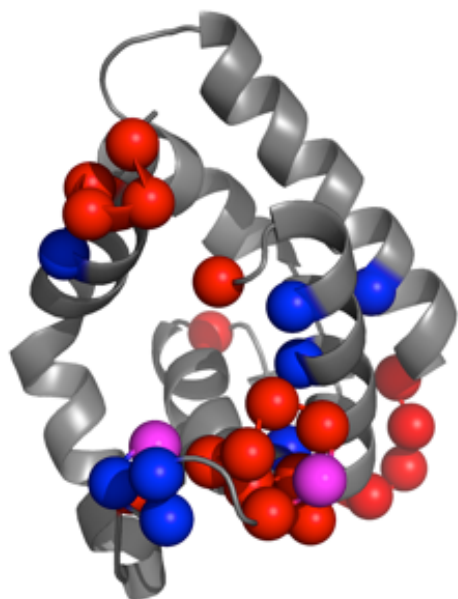


Residue number

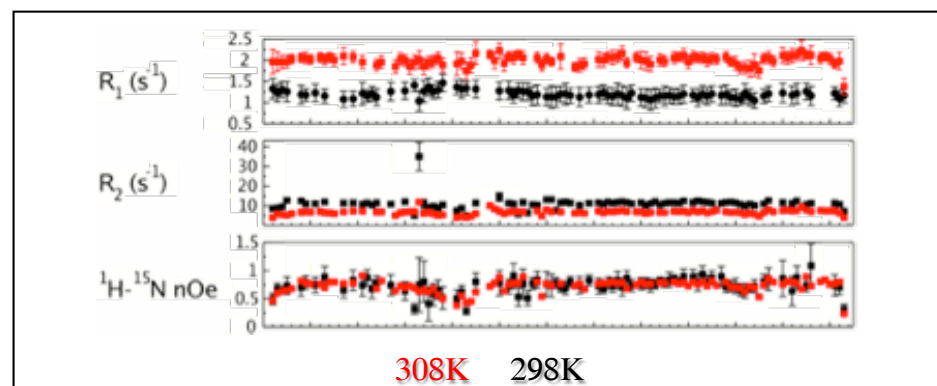
La grande dispersion structurale de la boucle est liée au faible nombre de contraintes

Vraie dynamique interne ou problème expérimental?

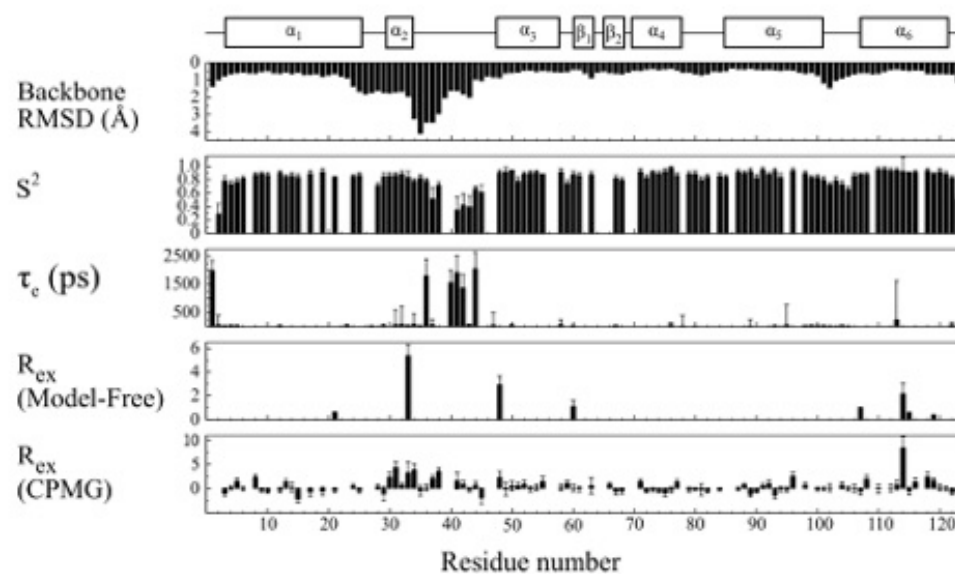
ASP2: une protéine de liaison aux odeurs



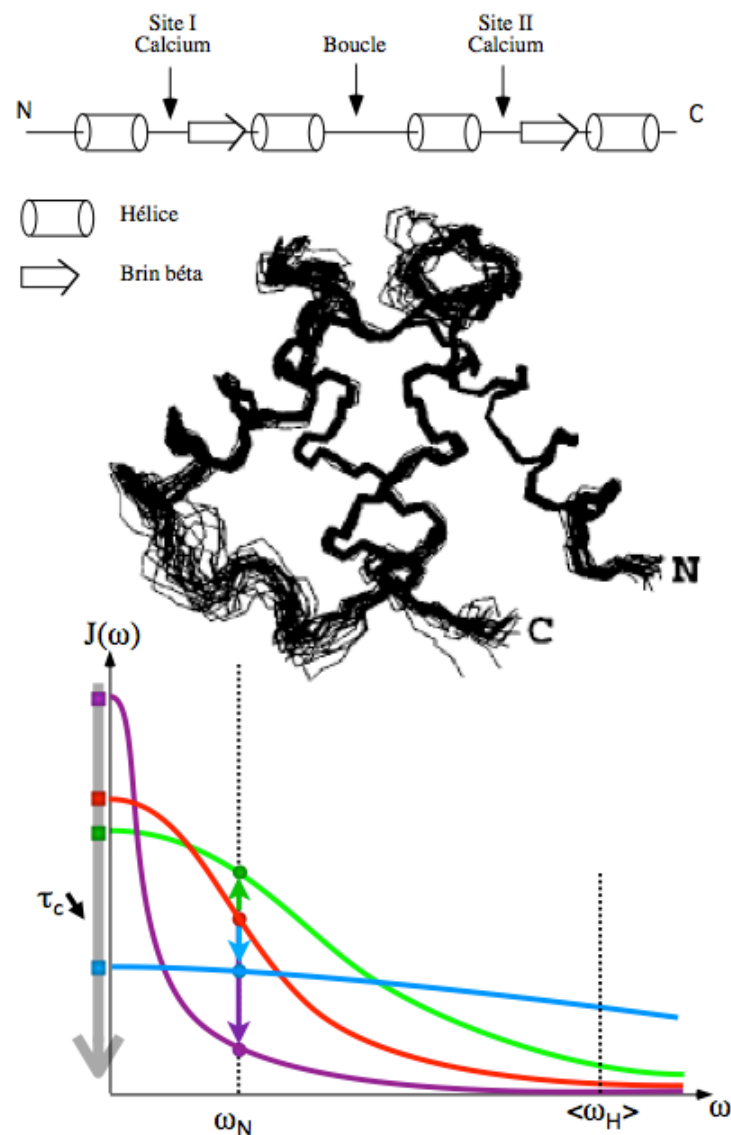
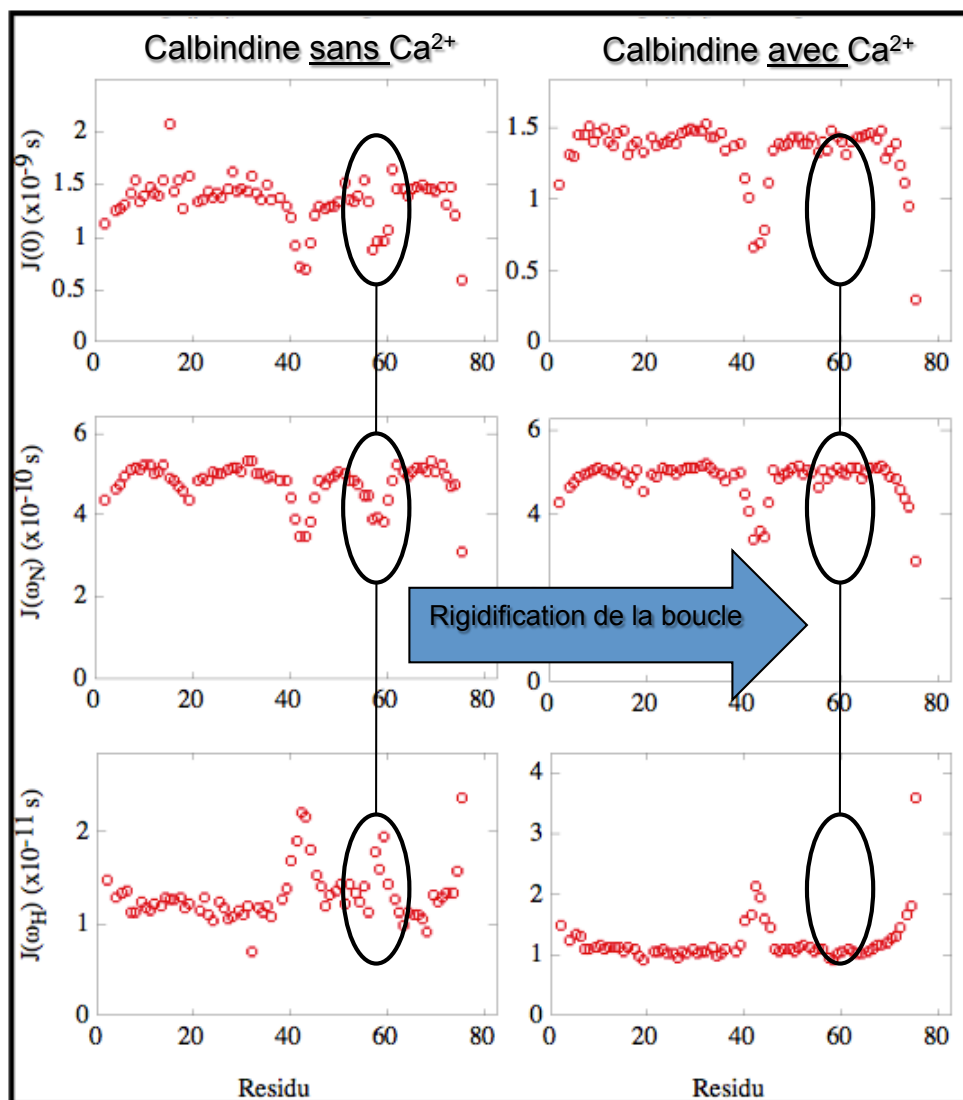
bleu: ms (CPMG)
rouge: ps-ns (R1, R2, NOE)



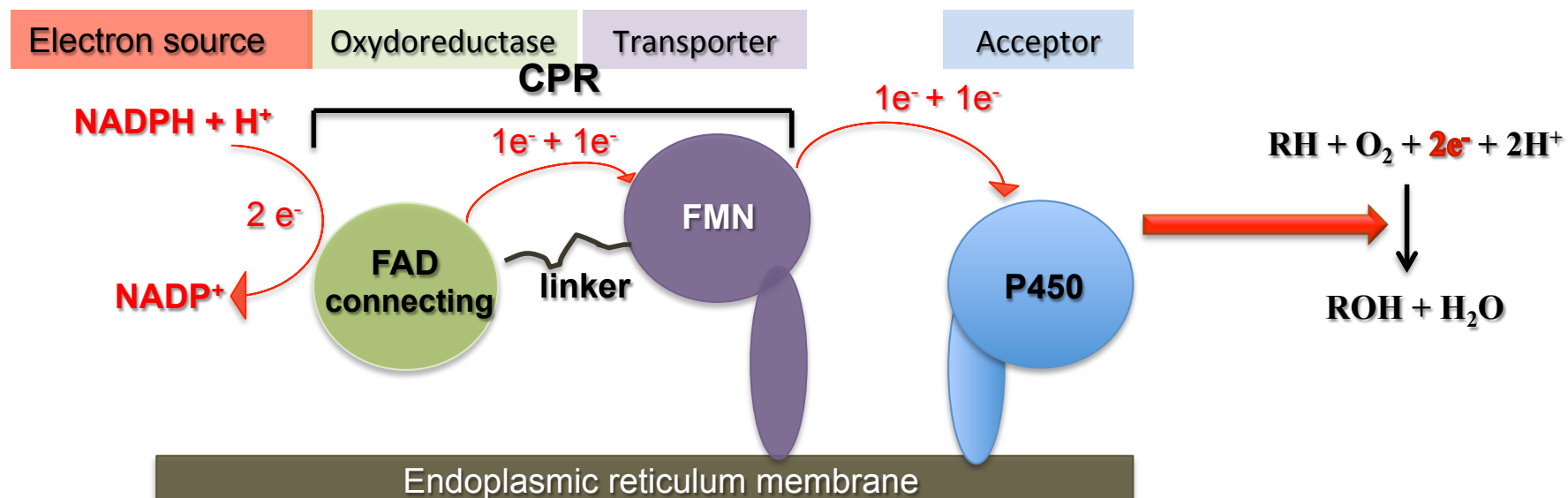
$\tau_c = 4.9$ ns (monomère!!!)



Mouvements dans des boucles



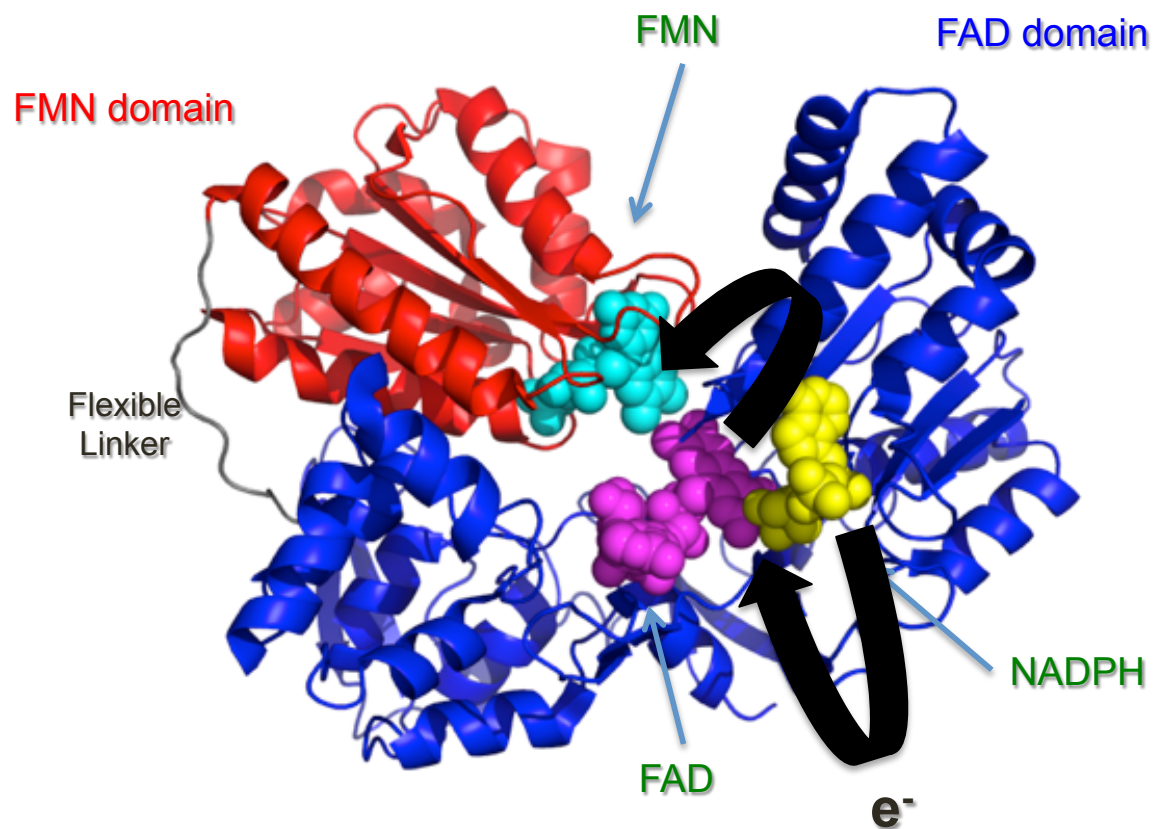
La cytochrome P450 réductase

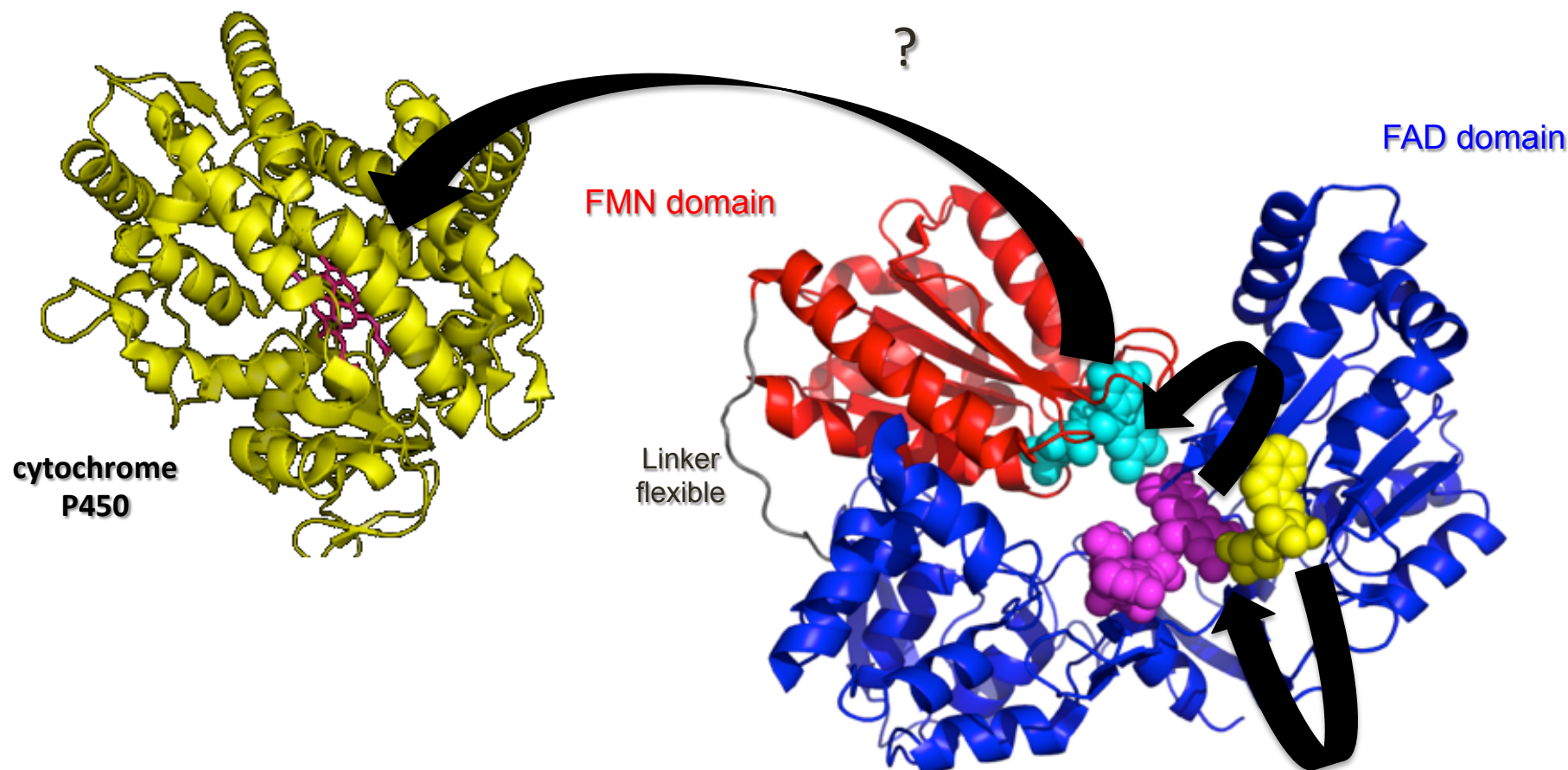


Permet la régénération du cytochrome P450 :

1. pour la biosynthèse et la dégradation de molécules endogènes
2. détoxification and biodégradation de xénobiotiques (drugs)

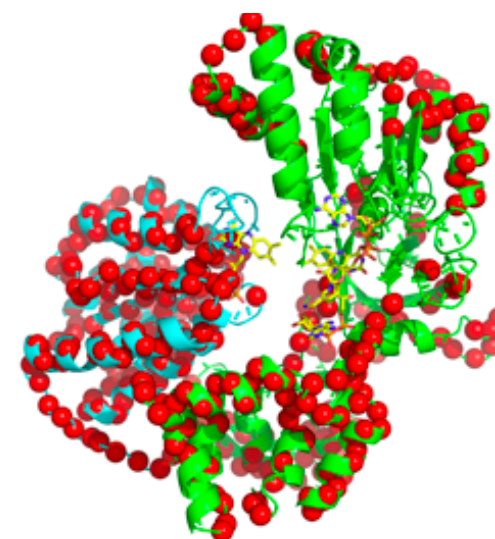
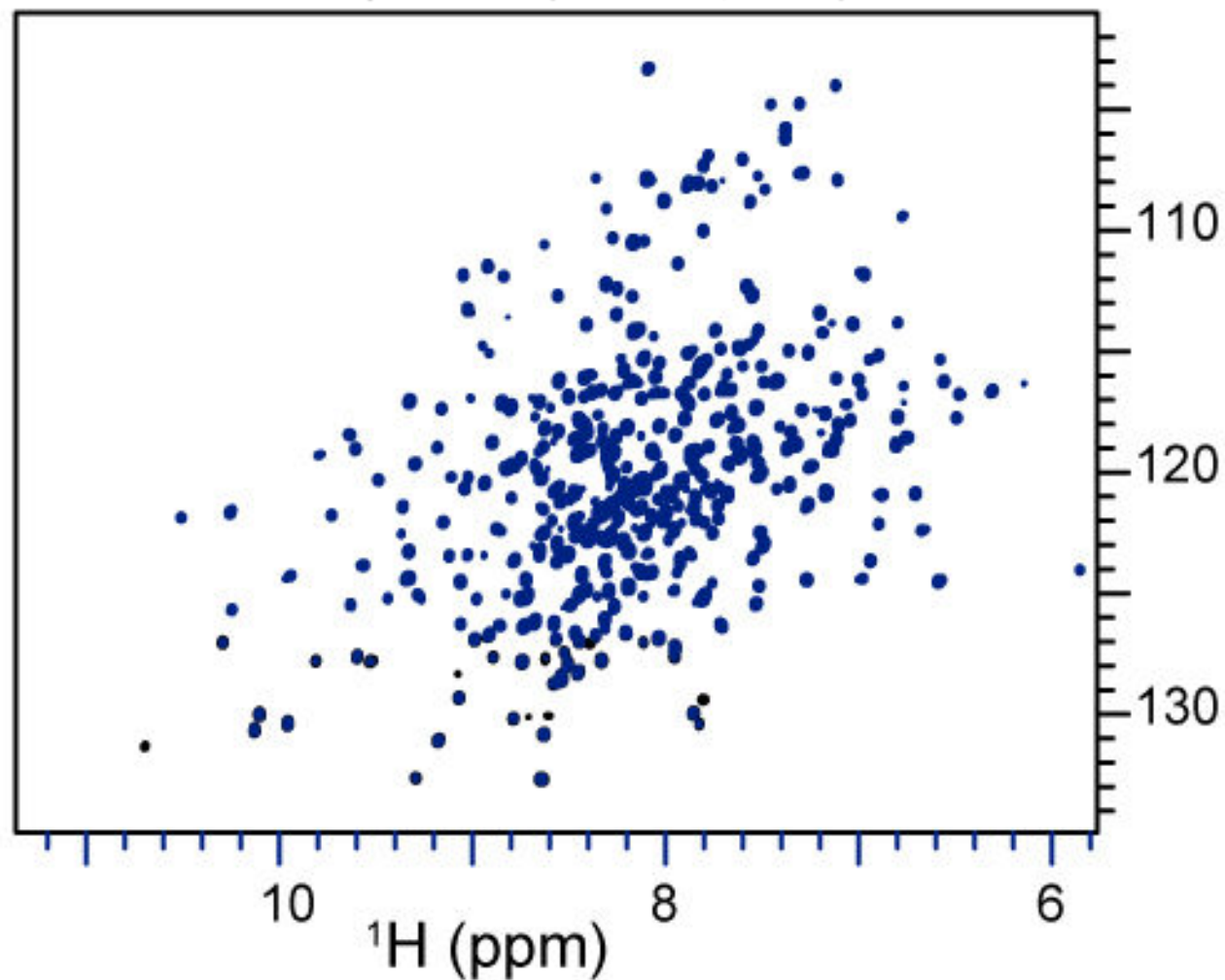
La structure RX de la CPR





Est-ce que cette conformation est préservée en solution ou biaisée par le packing?

^1H - ^{15}N TROSY spectrum (950MHz, 37°C)



70 kDa
622 aa

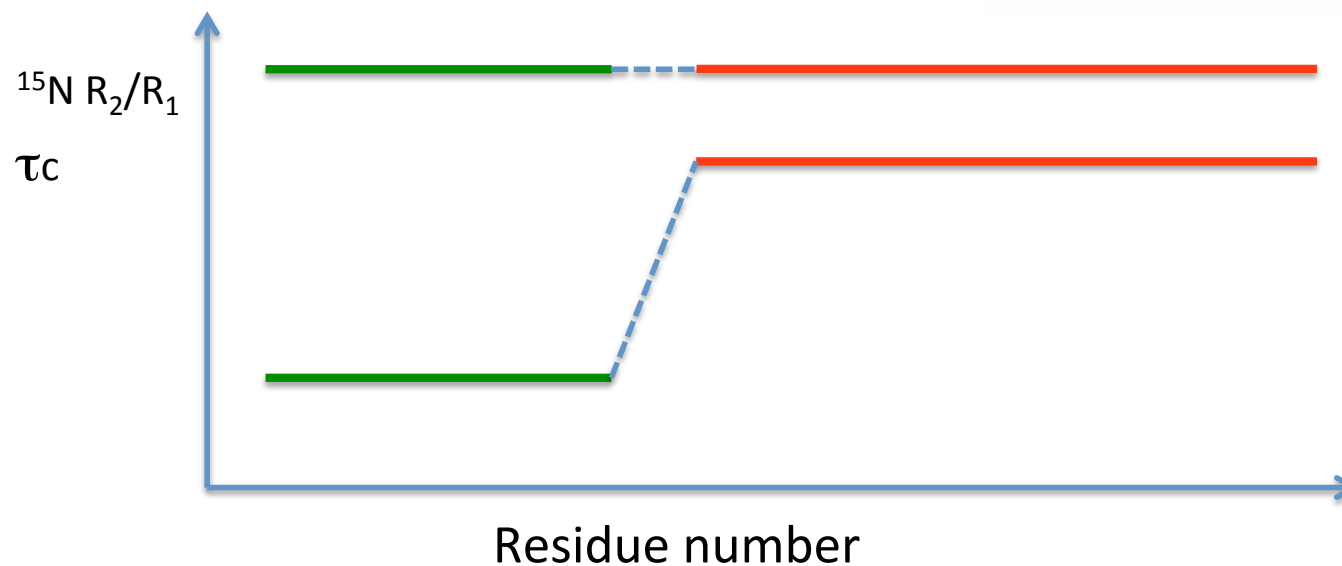
- Sans mobilité interdomaine:

La protéine se comporte comme un corps rigide
i.e. comme une grosse protéine avec un grand τ_c

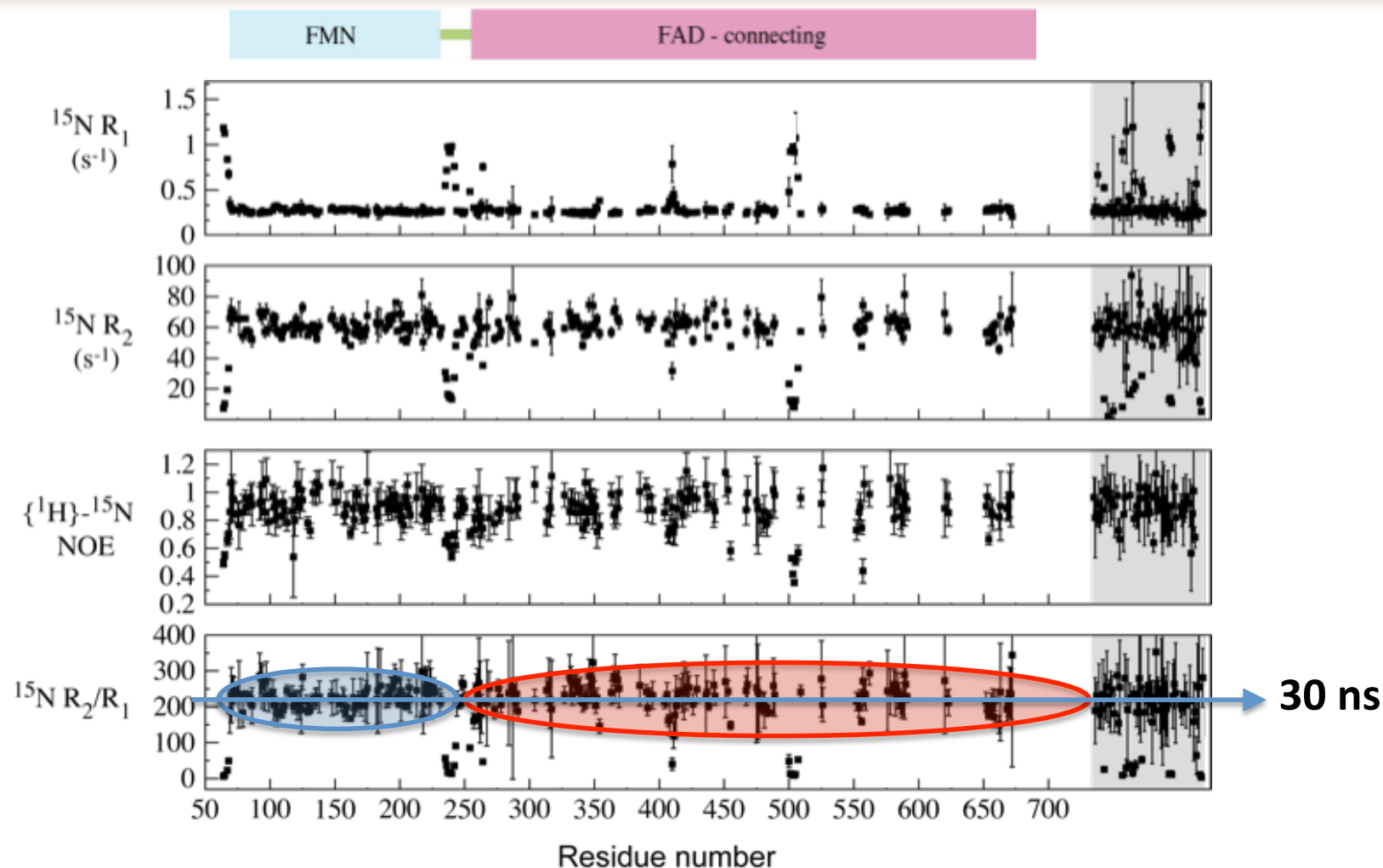


- Avec mobilité interdomaine:

Chaque domaine se comporte différemment
Comme deux petites protéines avec des petits τ_c



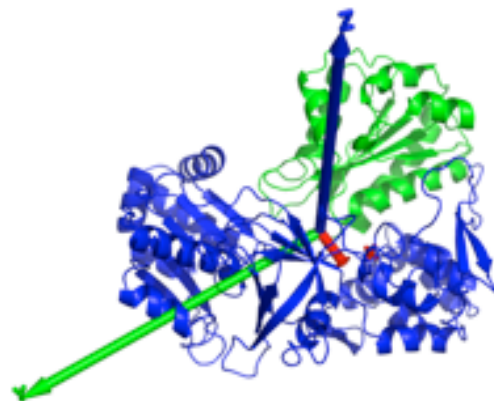
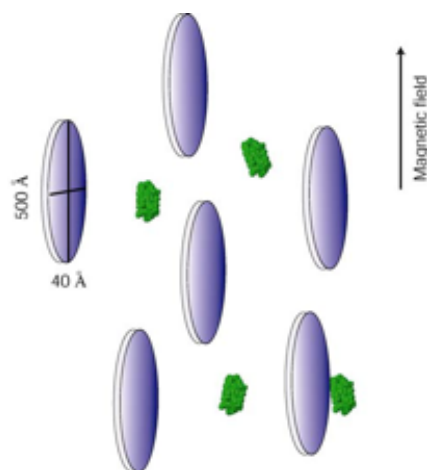
La CPR est rigide en solution



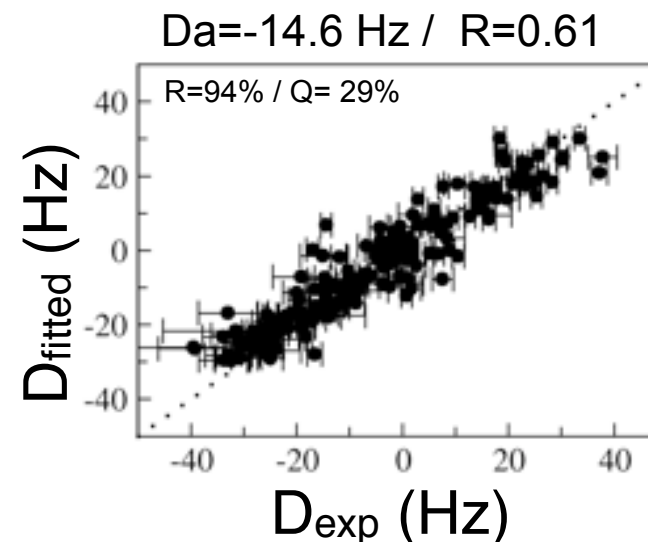
Même temps de corrélation pour les deux domaines (30ns)

La CPR adopte la structure RX

Les Couplages Dipolaires Résiduels (RDC) sont mesurés en dissolvant et en alignant partiellement la protéine dans un milieu anisotrope (PEG C12E5 / hexanol)



Tenseur expérimental



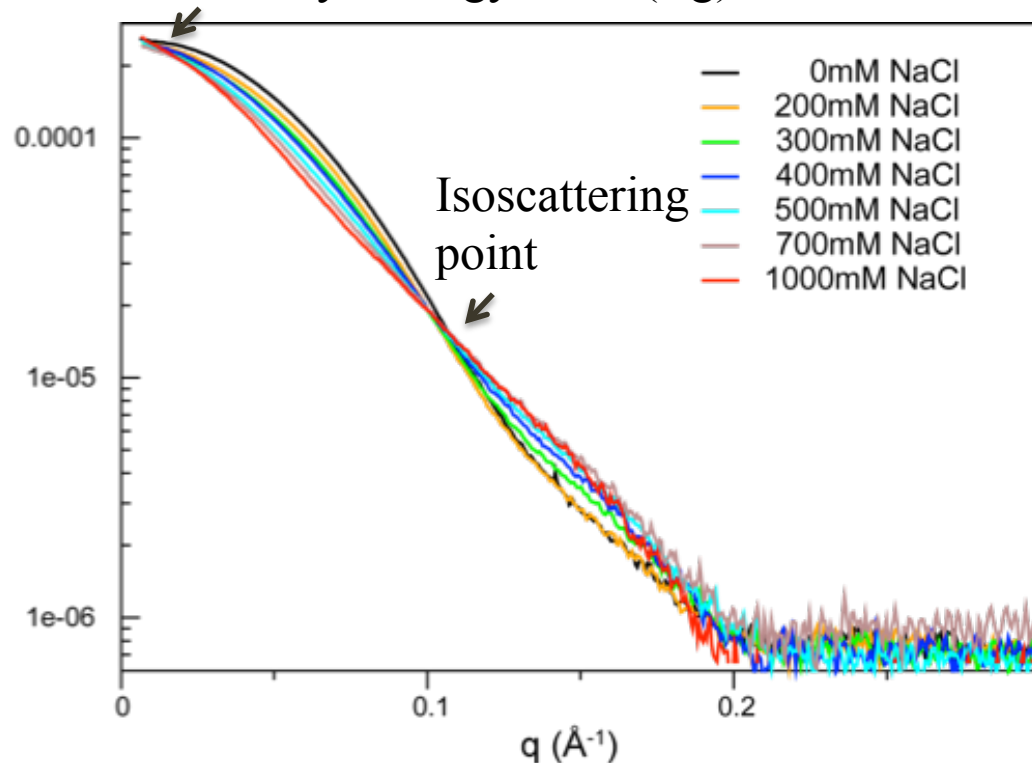
Fit des données RDC sur la structure RX

La structure cristalline de la CPR est préservée en solution ...

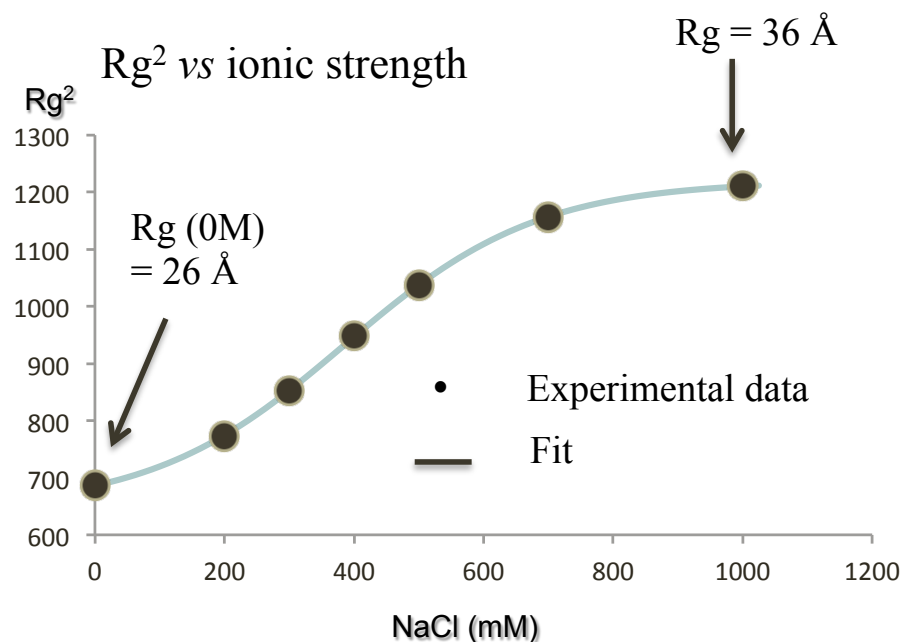
... au moins dans 20mM Tris-HCl, pH 7.4 (ie sans sel)

SAXS montre un équilibre à 2 états dépendant du sel

Pente $\sim$ rayon de gyration (R_g)



Small Angle RX scattering curve

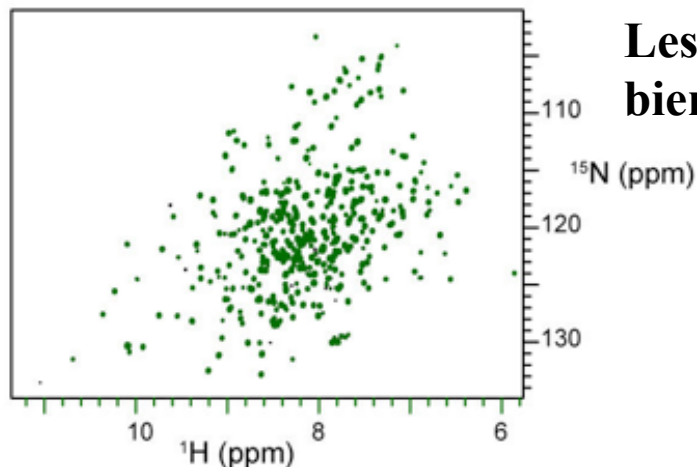
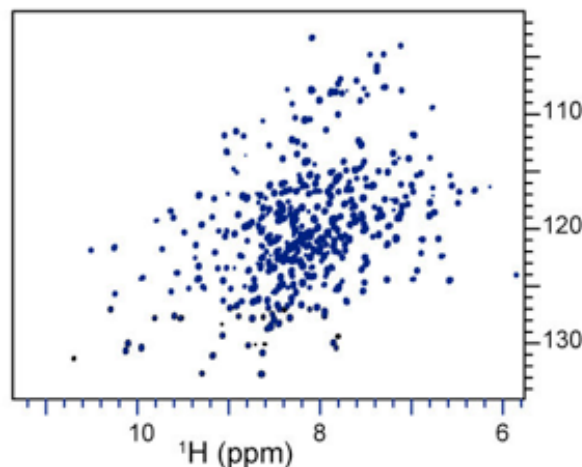


CPR explore un autre état conformationnel à haute force ionique!!

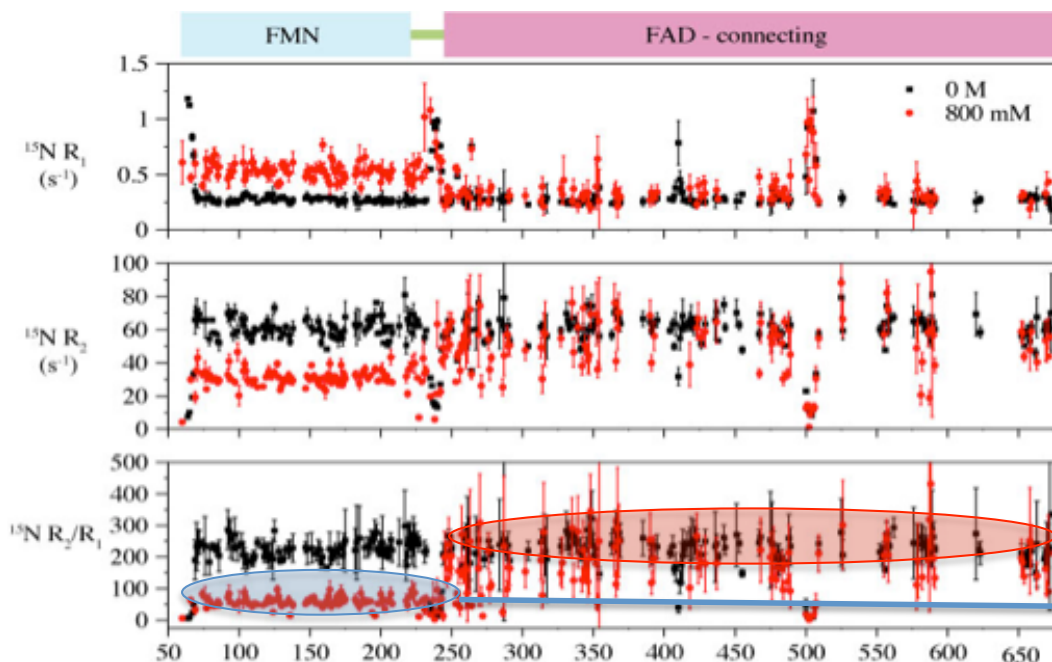
A haute force ionique, la CPR est très dynamique

0 M [NaCl]

1 M [NaCl]



Les deux domaines sont toujours bien foldés

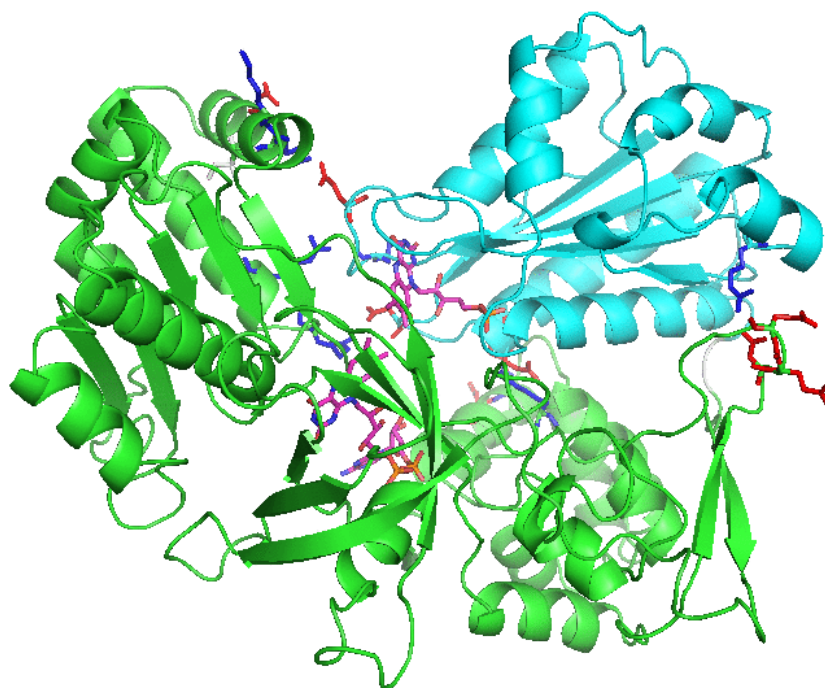


... mais sont mobiles l'un par rapport à l'autre

25 ns

11 ns

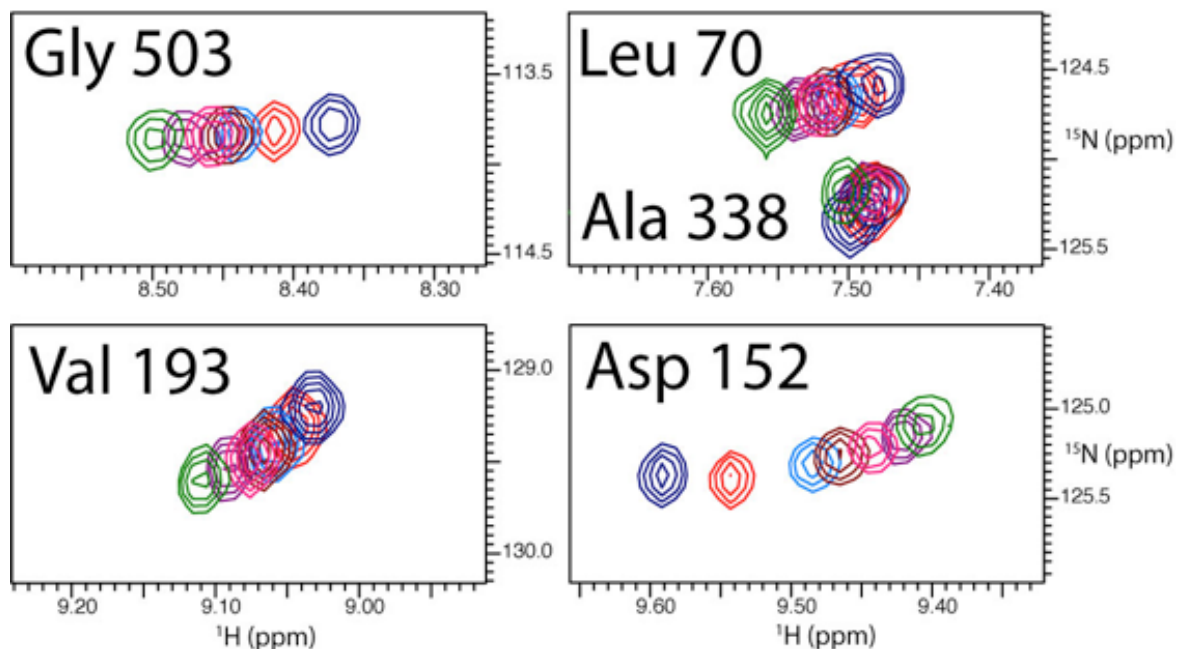
De l'électrostatique à l'interface des domaines



**Des ponts salins sont présents à l'interface
La haute force ionique casse ces ponts salins.**

Cinétique de l'ouverture/fermeture

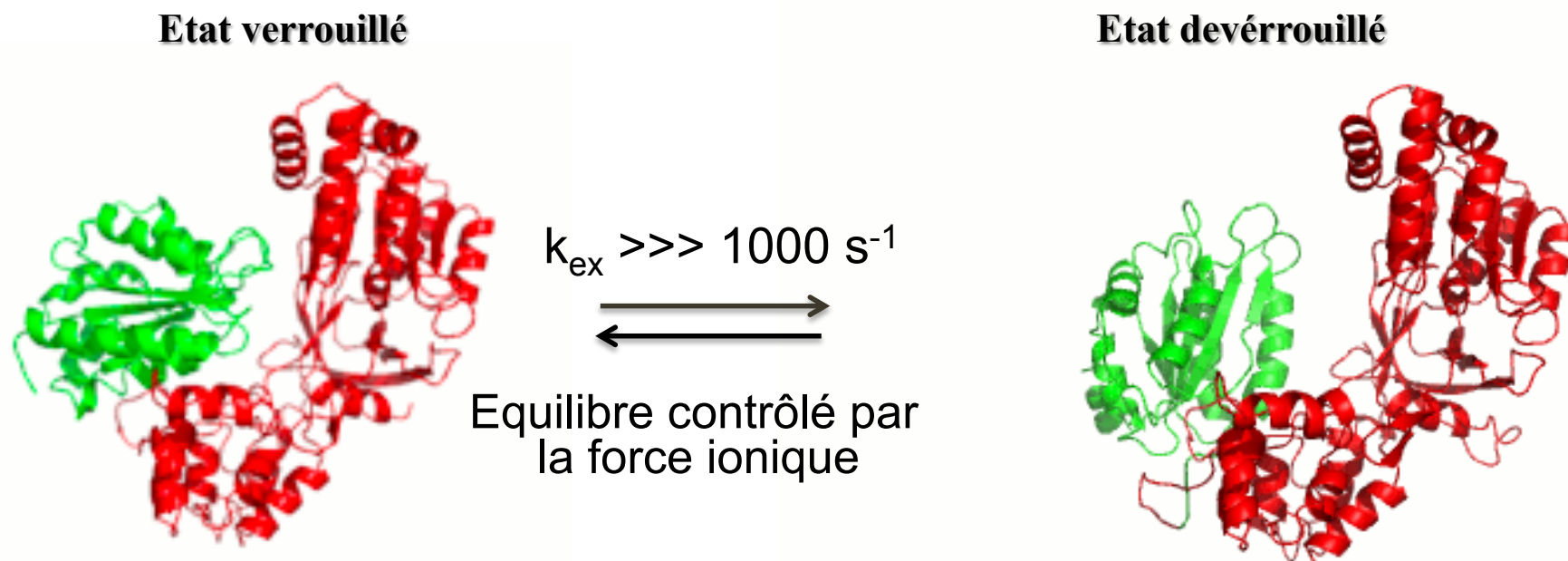
0M [NaCl] to 1M [NaCl]



^{15}N TROSY

Echange rapide à l'échelle des déplacements chimiques ($k_{\text{ex}} \gg 10^3 \text{ s}^{-1}$)
entre les états verrouillés et déverrouillés

CPR adopte un équilibre en solution



Conclusion:

- RX, SAXS et RMN pour l'étude de protéines multidomaines
- Ne pas hésiter à collecter des données dans différentes conditions pour identifier des équilibres et faciliter l'analyse structurale

Take-home message

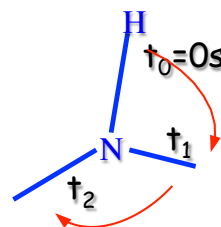
- La RMN peut faire des structures 3D sur des protéines de poids moléculaires limités...
... mais la RMN peut bien plus, sans limite de taille
- Utiliser la RMN pour voir les zones invisibles en RX (ou cryoEM) car trop flexibles, et sans limite de taille
- Structure haute résolution par RX (ou cryo EM) puis étude en solution par RMN, SAXS, ...ou utilisation de RMN pour faciliter cristallisation
- La RMN: un outil pour l'étude d'interaction moléculaire (protéine/ligand):
thermodynamique, cinétique, comme ITC, fluorescence, MST, BLI... + STRUCTURE
Pas de limite de Kd, pas de marquage gênant, en solution
...mais cher? Quantité de matière?

FIN

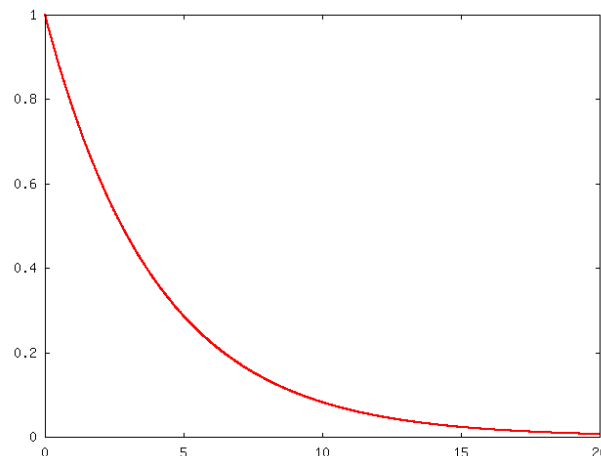


Description du mouvement de liaisons H-N

Considérons une liaison N-H qui échantillonne toutes les directions de l'espace



Fonction d'auto-correlation $G(t)$

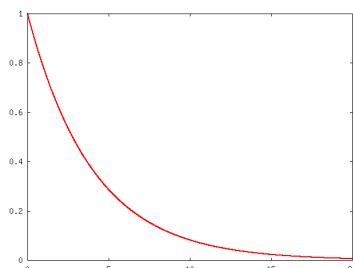


$$G(t) = e^{-\frac{t}{\tau_c}} \quad t \text{ (ns)}$$

La fonction d'auto-correlation $G(t)$ décrit la perte de similarité du vecteur H-N après un certain temps t (par rapport à $t = 0$)

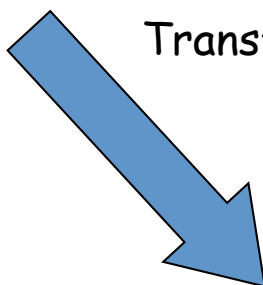
L'échelle de temps de ce processus est décrit par le temps caractéristique τ_c (temps de corrélation)

La fonction de densité spectrale

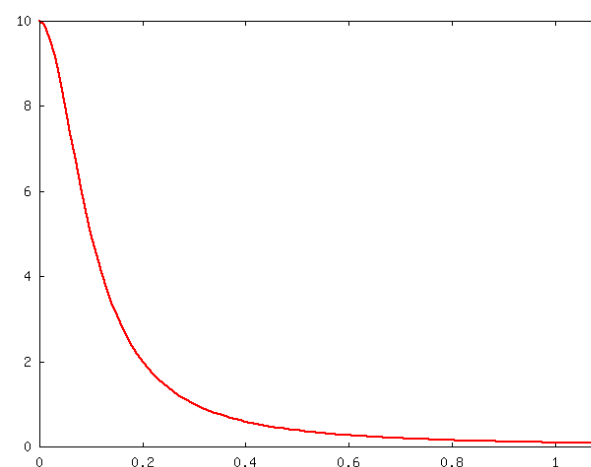


Fonction
d'auto-corrélation $G(t)$

Transformation de Fourier



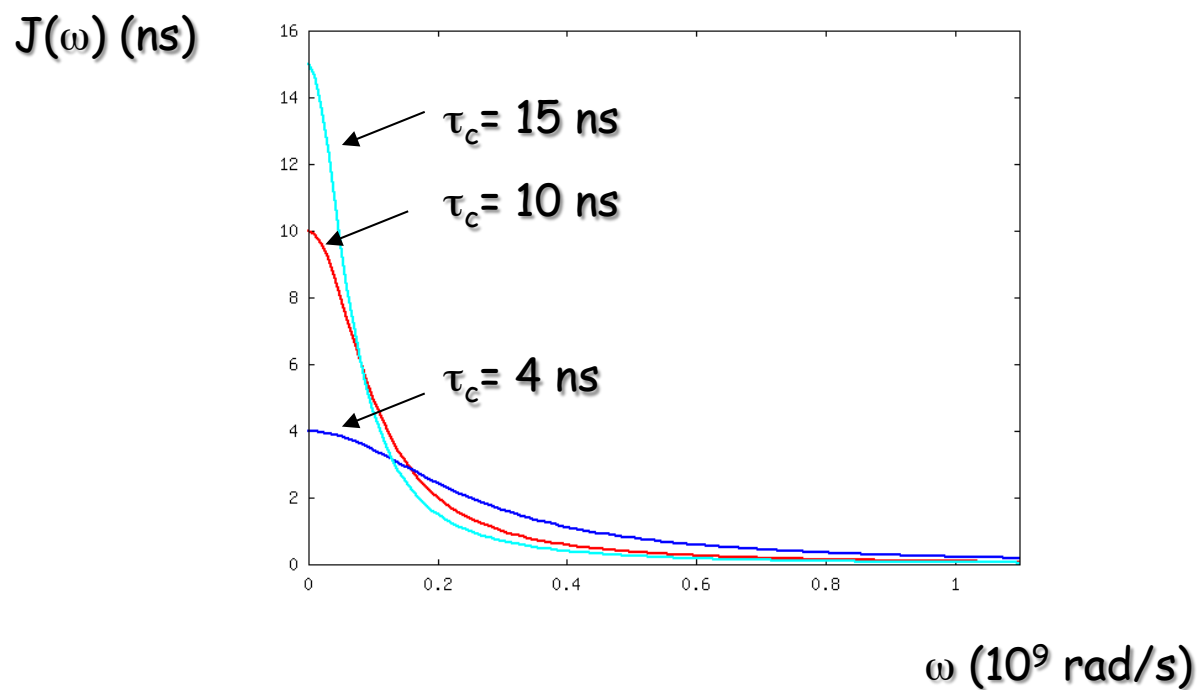
Fonction de densité spectrale $J(\omega)$ (ns)



ω (10^9 rad/s)

La fonction de densité spectrale décrit la distribution d'énergie mécanique disponible à certaines fréquences (de mouvements) ω .

La fonction de densité spectrale

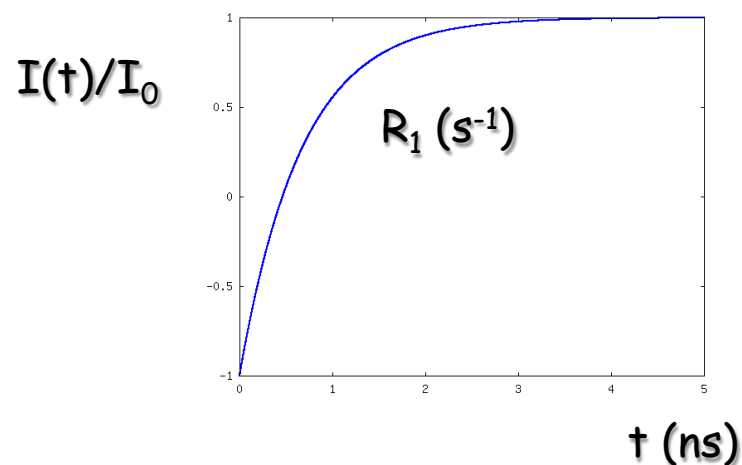


La fonction de densité spectrale dépend des mouvements

Relaxation de spin

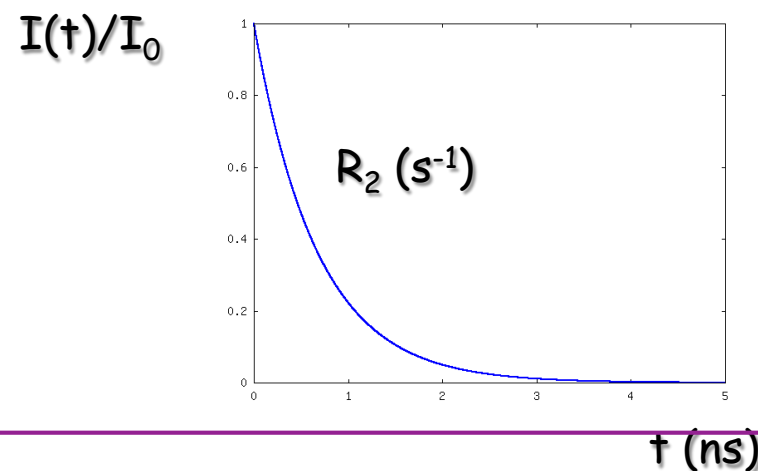
^{15}N R_1 : vitesse de relaxation longitudinale

On prépare l'état $-N_z$
Et on regarde le retour à l'équilibre

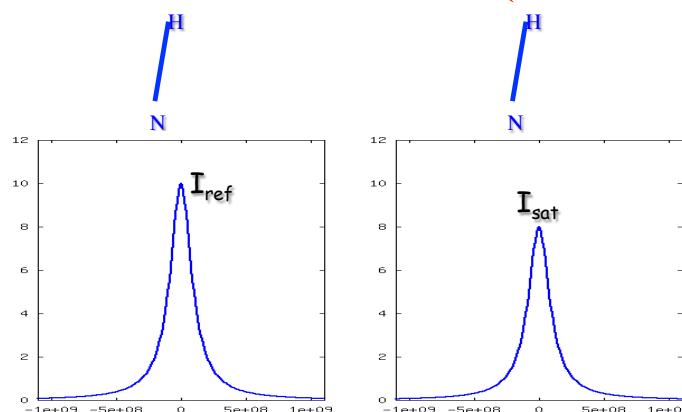


^{15}N R_2 : vitesse de relaxation transversale

On prépare l'état N_x
Et on regarde la vitesse de disparition
de la composante N_x .



$\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOE



$$\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N} \text{ NOE} = I_{\text{sat}} / I_{\text{ref}}$$

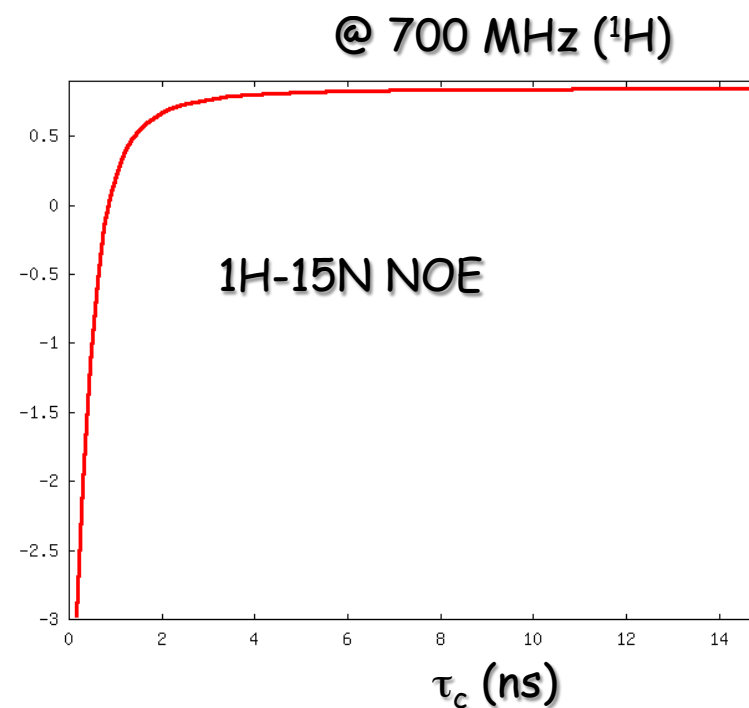
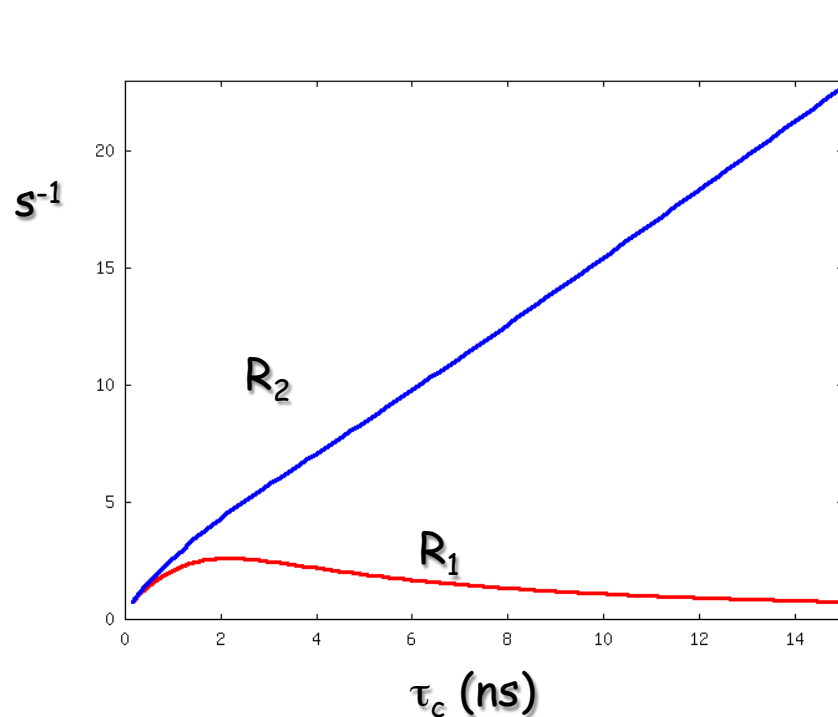
Mouvements et relaxation

$$\begin{aligned}
 R_1(^{15}\text{N}_z) &= (3d + c)J(\omega_S) + dJ(\omega_I - \omega_S) + 6dJ(\omega_I + \omega_S) \\
 R_2(^{15}\text{N}_{x,y}) &= \frac{6d + 2c}{3}J(0) + \frac{3d + c}{2}J(\omega_S) + \frac{d}{2}J(\omega_I - \omega_S) + 3dJ(\omega_I) + 3dJ(\omega_I + \omega_S) \\
 \sigma^{\text{NOE}} &= d[6J(\omega_I + \omega_S) - J(\omega_I - \omega_S)]
 \end{aligned}$$

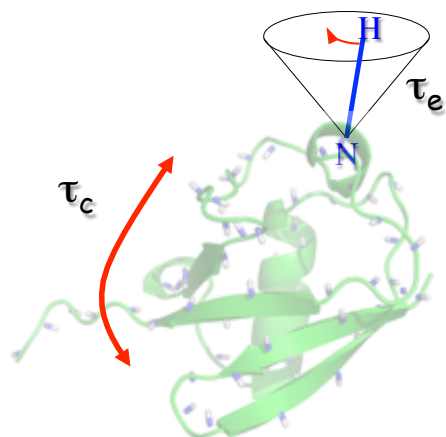
$$d = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{4r^6}$$

$$c = \frac{\omega_S^2 \delta_{\text{CSA}}^2}{3}$$

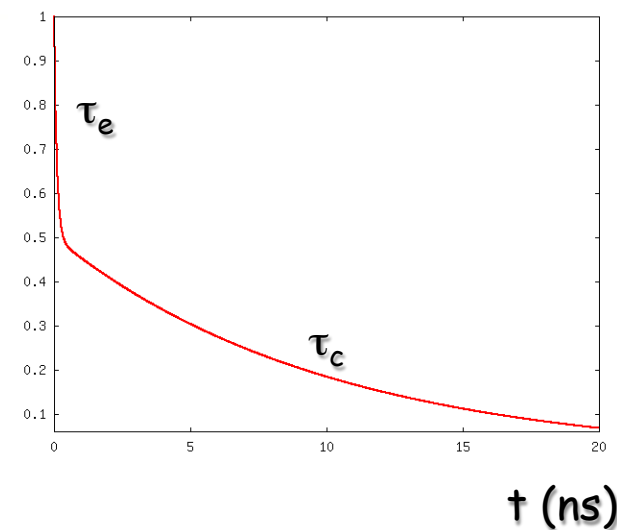
Sur la base d'un modèle simple de mouvement global, on peut prédire R1, R2 and NOE $\longrightarrow J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$



Et les mouvements internes?



Fonction d'auto-corrélation $G(t)$



$$J_{LP}(\omega) = S^2 \frac{\tau_c}{1 + (\omega\tau_c)^2} + (1 - S^2) \frac{\tau'_e}{1 + (\omega\tau'_e)^2}$$

avec $\frac{1}{\tau'_e} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_e}$

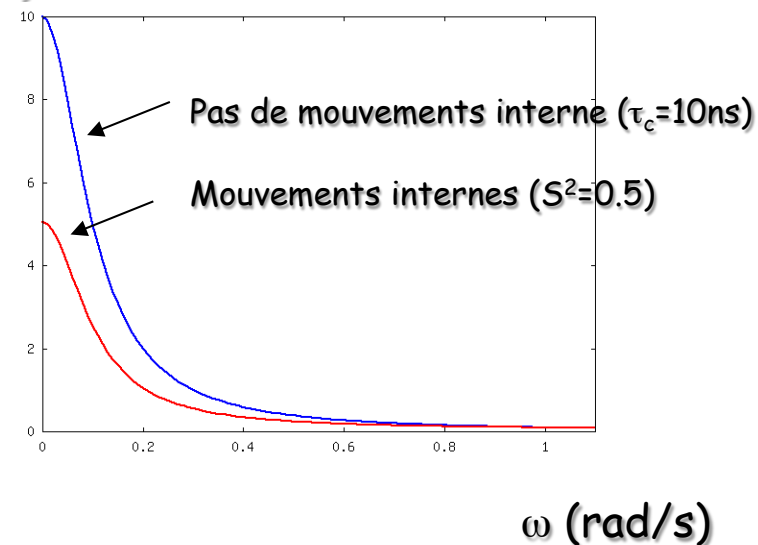
S^2 : paramètres d'ordre:

$S^2=1$ si complètement rigide

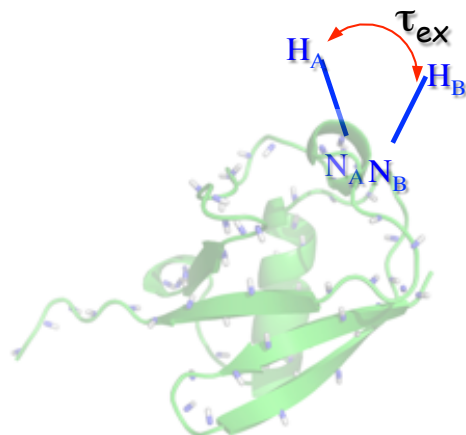
$S^2=0$ si complètement flexible

τ_e : temps de corrélation des mouvements internes

$J(\omega)$ (ns)



Et les mouvements internes lents?



Si le spin N s'échange entre le site (A)
et le site (B) à la vitesse $k_{ex}=1/\tau_{ex}$ ($k_{ex}=\mu s-ms$)

$$R_{2\text{ eff}} = R_2 + R_{ex}$$

↑
Mouvement rapide ($< ns$)

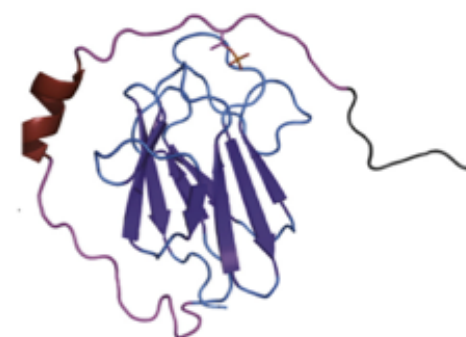
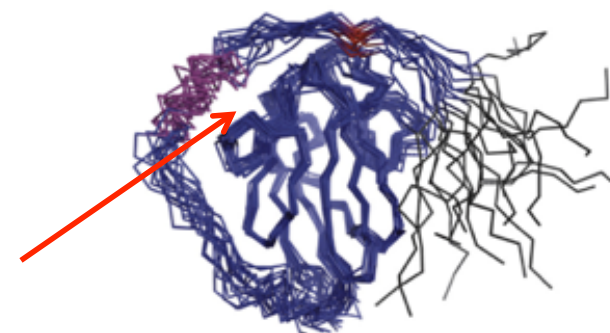
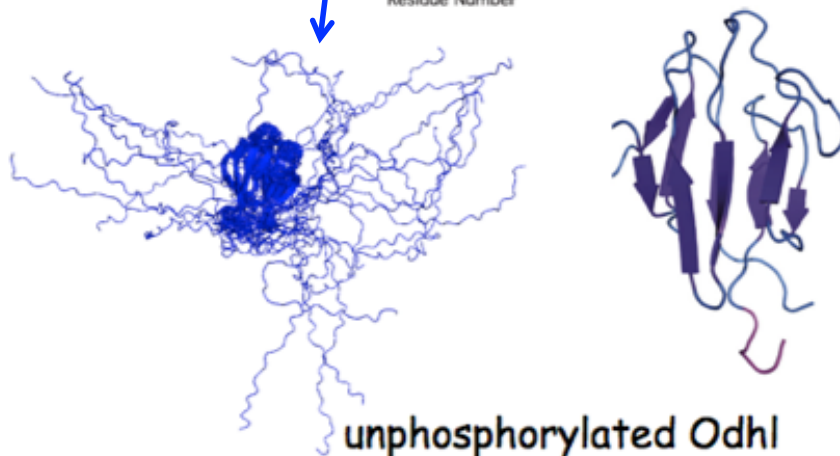
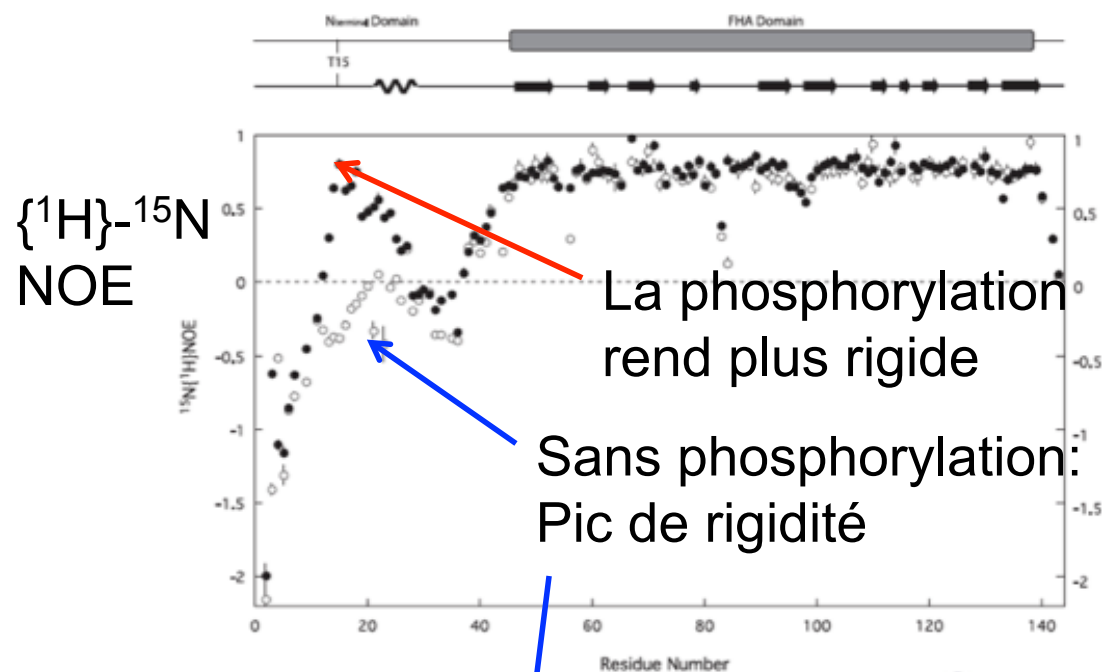
↙
Mouvement lent ($\mu s-ms$)

Mouvement interne lent (échange entre deux ou plusieurs sites)

-> Augmentation de ^{15}N R_2

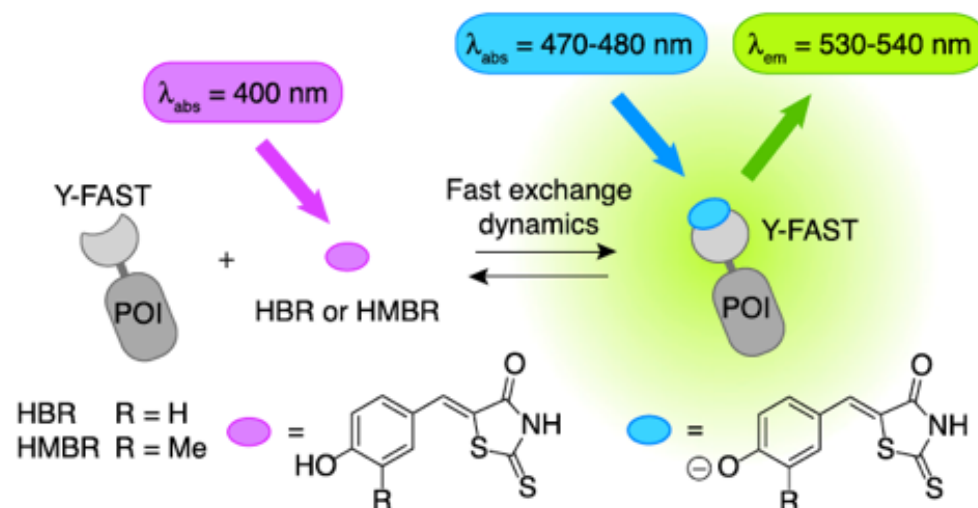
-> Elargissement de raie

Mouvements dans des boucles



phosphorylated Odhl

Le temps de corrélation: une grandeur utile



Les ligands HBR et HMBR deviennent fluorescents au contact de la protéine Y-FAST

La structure cristallographique de Y-FAST est un dimère: réel ou pas en solution?

Ligand	Température	τ_c (expérimental)	τ_c (expérimental) prédit pour un monomère
Sans HBR	293K	$8.0 \pm 0.1 \text{ ns}$	8.56 ns
Avec HBR	293K	$7.4 \pm 0.05 \text{ ns}$	8.56 ns

Y-FAST est un monomère en solution: OUF!!!!!!!!!!