

# **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

1980

1990

2000

2010

Champ magnétique disponible (résolution/sensibilité)

400 MHz

600 MHz

800 MHz

1 GHz

1.2 GHz

Marquage isotopique

Homonucléaire  
( $^1\text{H}$ )

Hétéronucléaire  
( $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ )

Deutération  
( $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$ )

Deutération + méthyl

Taille de protéine accessible

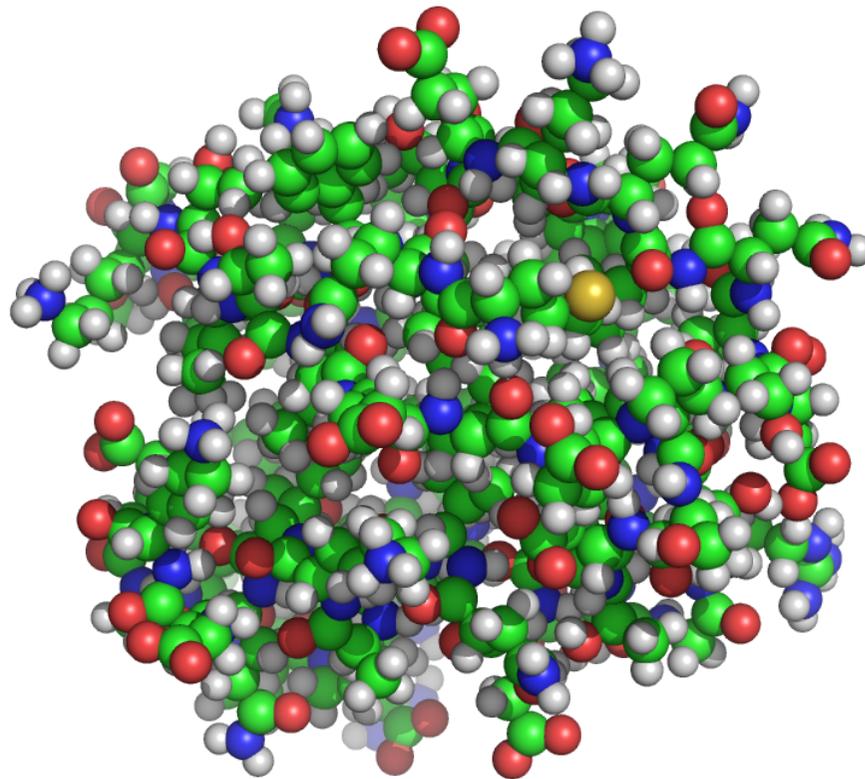
~10-20

~20-100

~100-200

200-300 acides aminés (structure)

0.5 – 1 MDa (autre)



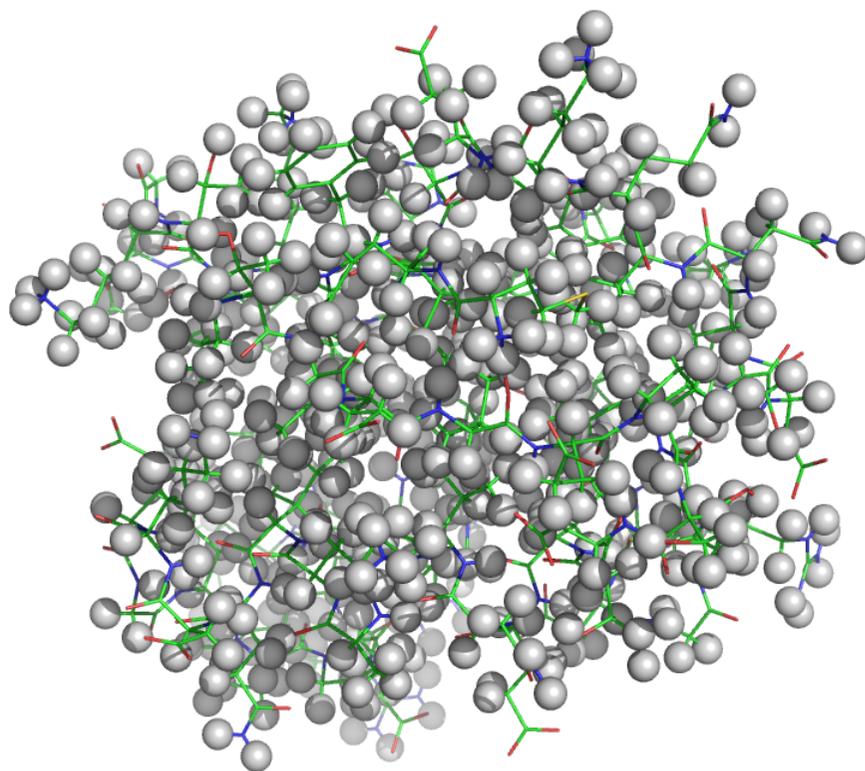
Abondance naturelle

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

# Un cadeau de la nature

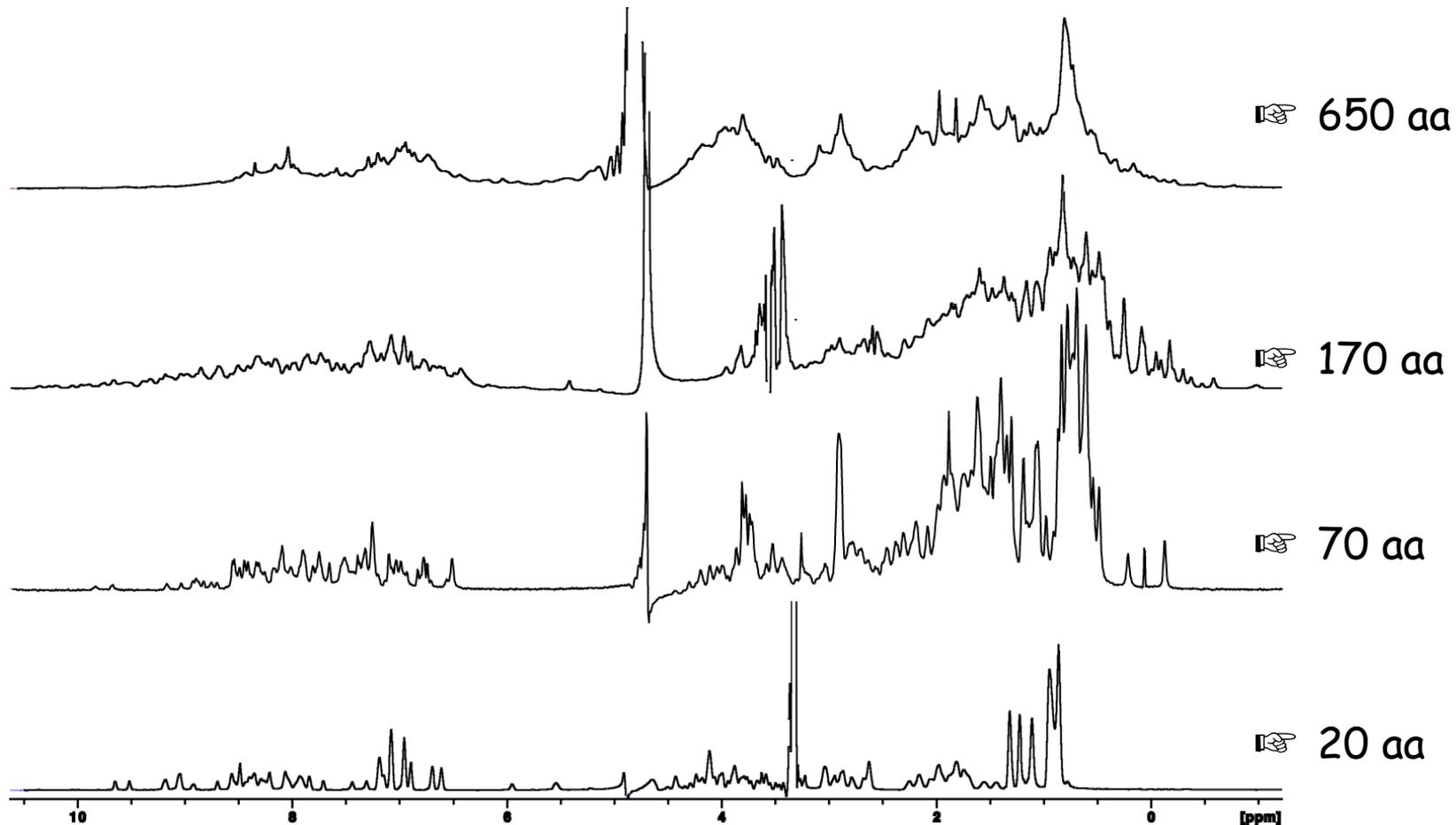
Noyau	Abondance naturelle (%)	Rapport gyromagnétique ( $10^7 \times \text{rad/Txs}$ )	$\nu_0$ à 11.7 T	Sensibilité relative
$^1\text{H}$	99.98	26.752	500.13	1
$^{13}\text{C}$ ( $S=1/2$ )	1.11	6.728	125.76	1.6%
$^{15}\text{N}$ ( $S=1/2$ )	0.36	-2.712	50.70	0.1%

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



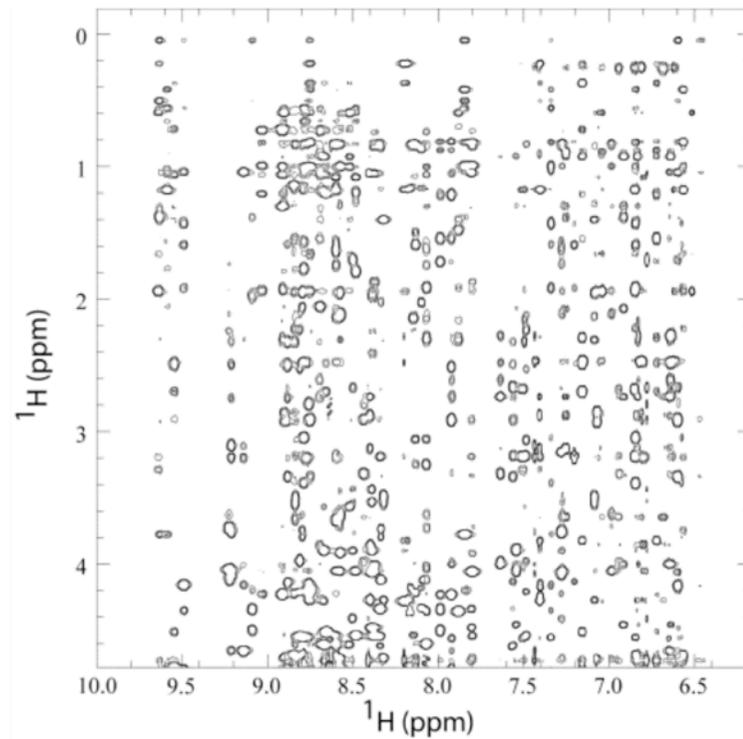
Abondance naturelle



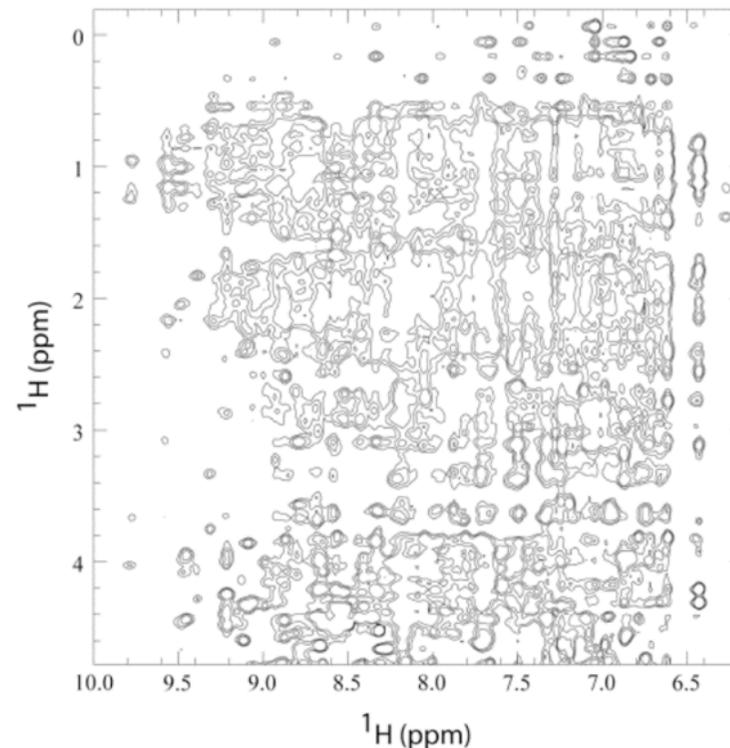


Au-delà de ~100 résidus, l'encombrement des spectres rend l'attribution quasiment impossible

# La 2D ne suffit pas



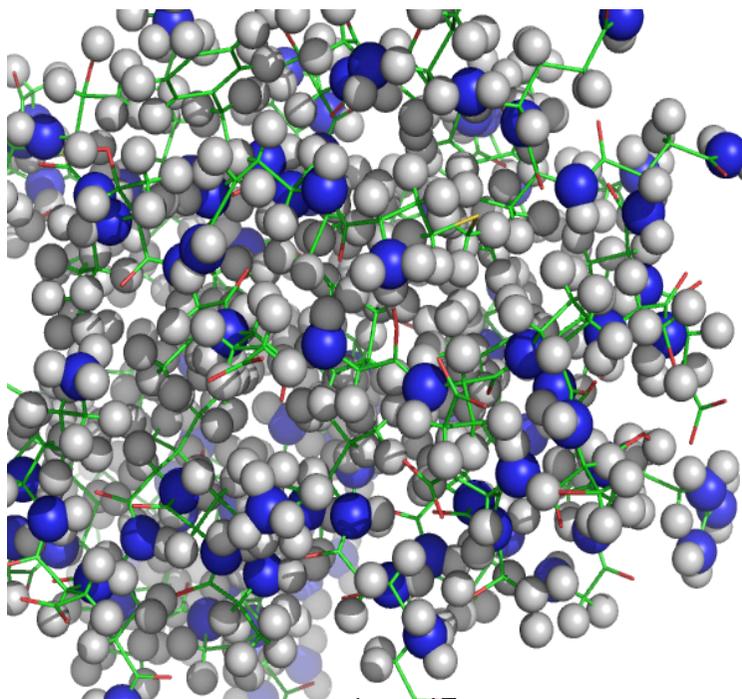
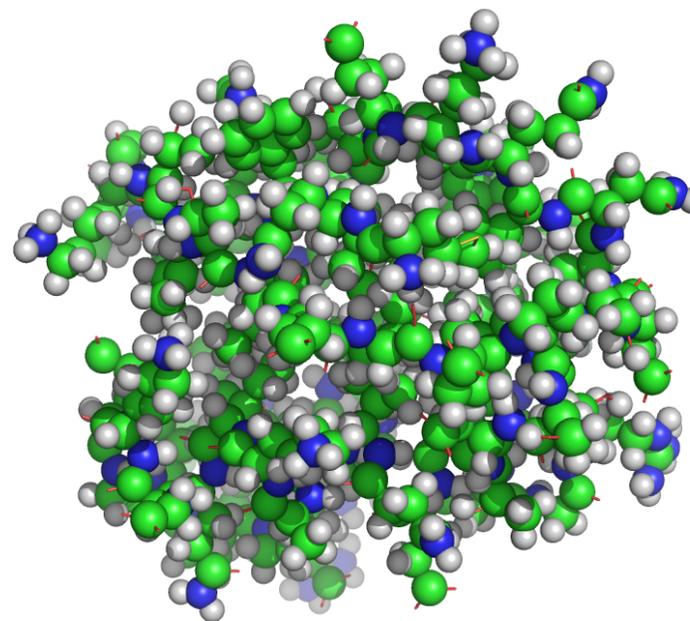
8 kDa (Tendamistat)



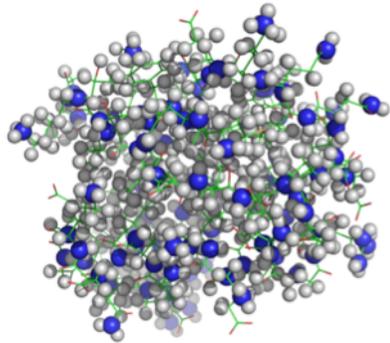
21 kDa (Cdc42)

- ☞ Les superpositions spectrales deviennent inextricables
- ☞ Les risques de mauvaise attribution sont augmentés

Solution: injecter plus d'informations

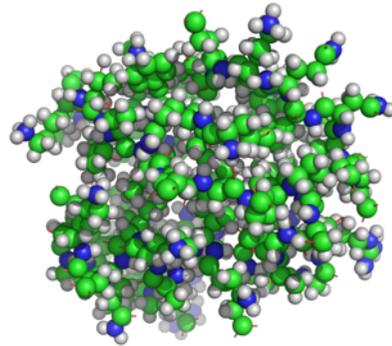
Marquage  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ Marquage  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ 

# Marquage isotopique



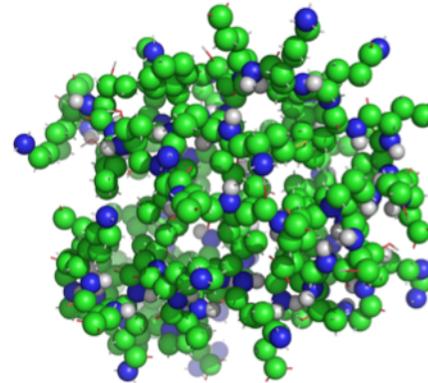
Marquage  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$

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



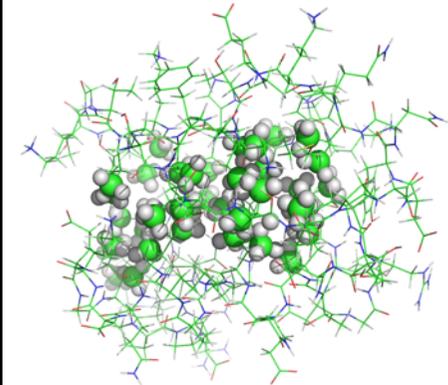
Marquage  $^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$

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



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

Source :  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  
 $^{13}\text{C}$ -glucose et  $\text{D}_2\text{O}$



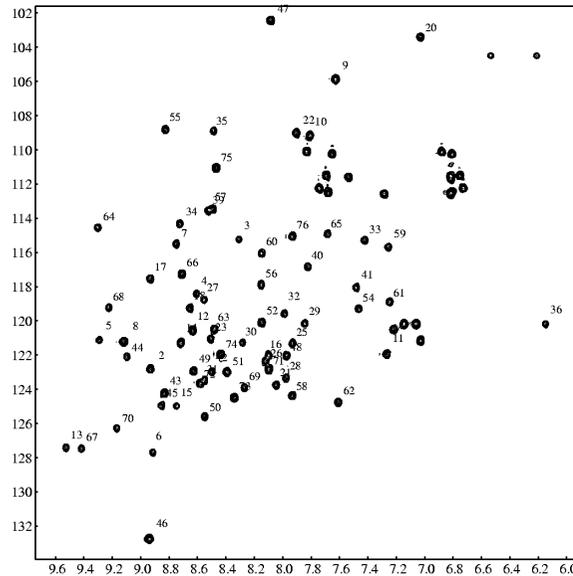
Marquage  $^2\text{H} / ^{13}\text{C}\text{H}_3$

Source :  $\text{D}_2\text{O}$  et  
précurseur d'acides  
aminés

et autres: marquages spécifiques de certains acides aminés

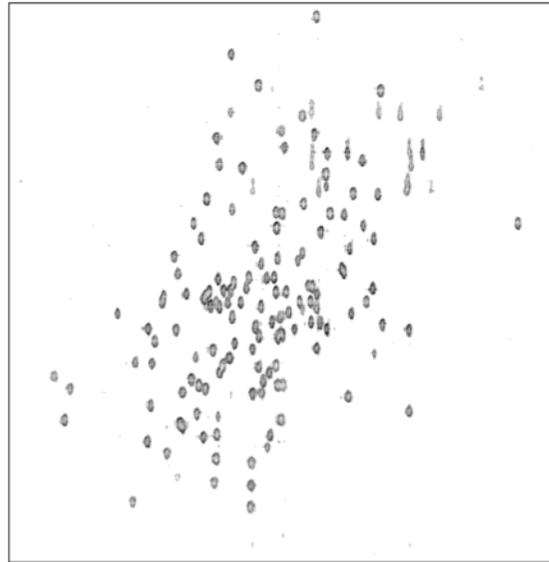
# Taille de protéine

Marquage  $^{15}\text{N}$

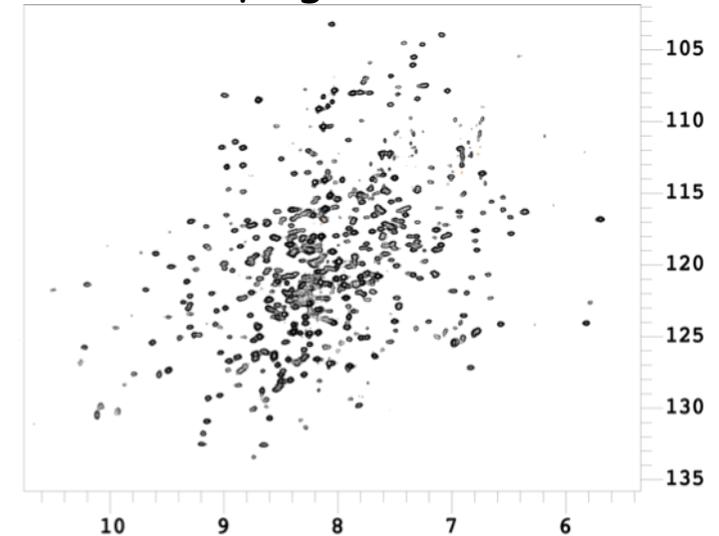


76 aa

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



150 aa



600 aa

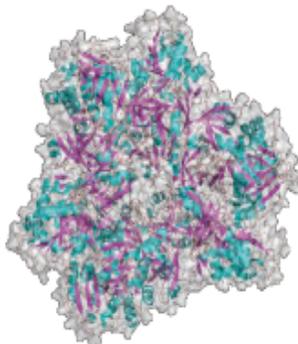
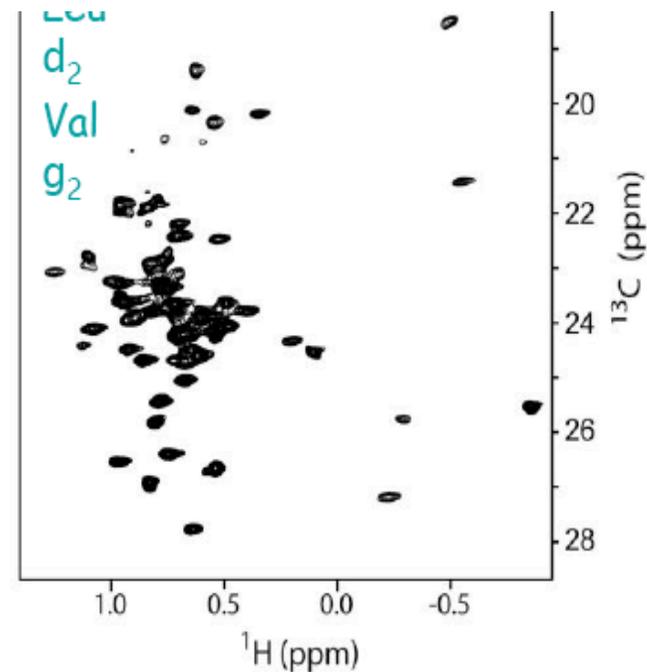
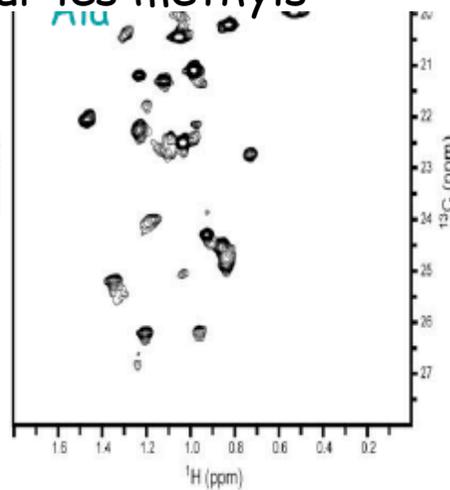
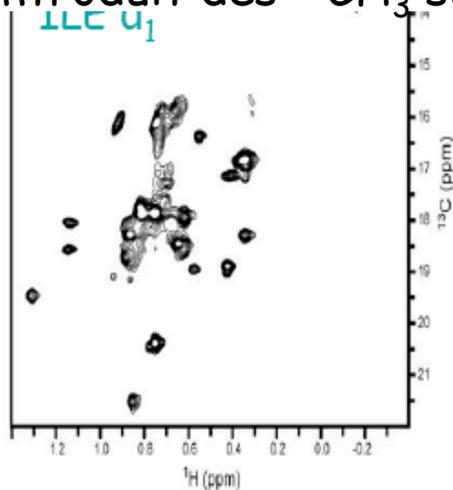
- ☞ Les spectres  $^{15}\text{N}$ -HSQC restent (presque parfaitement) résolus même pour des protéines > 600 aa (acides aminés)

# Très gros objets (0.5 MDa)

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

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

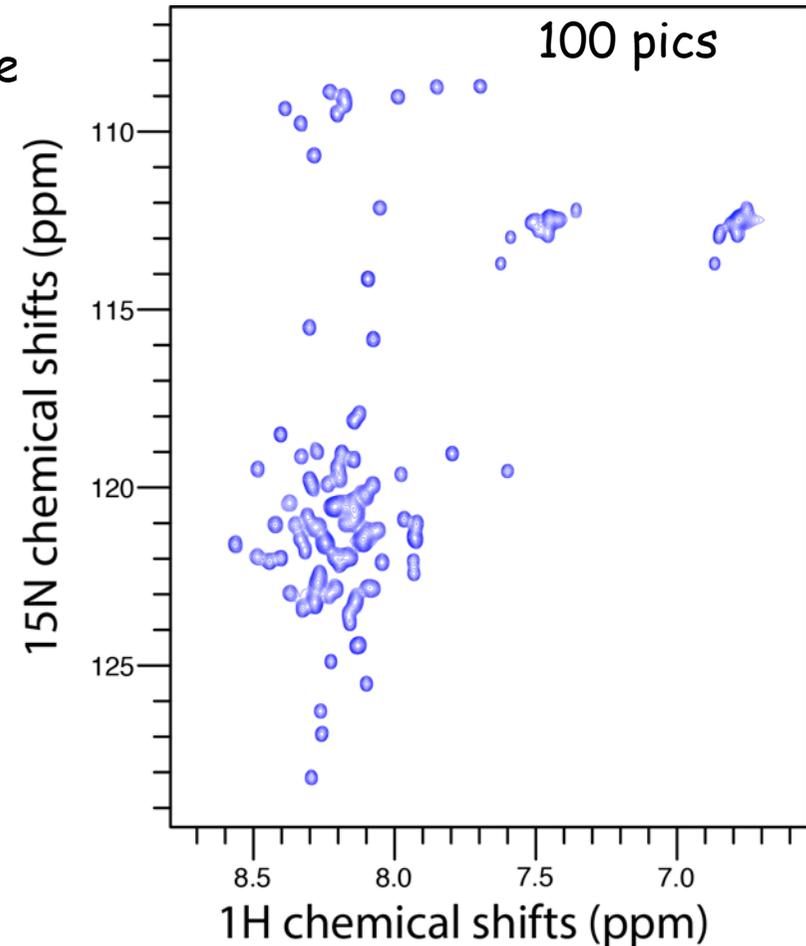
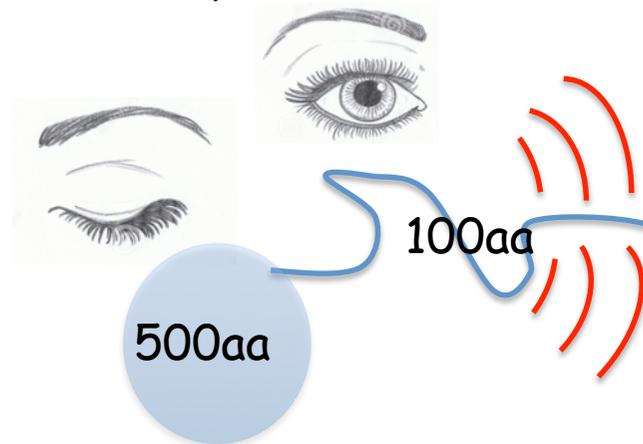
$t_c = 240$  ns

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

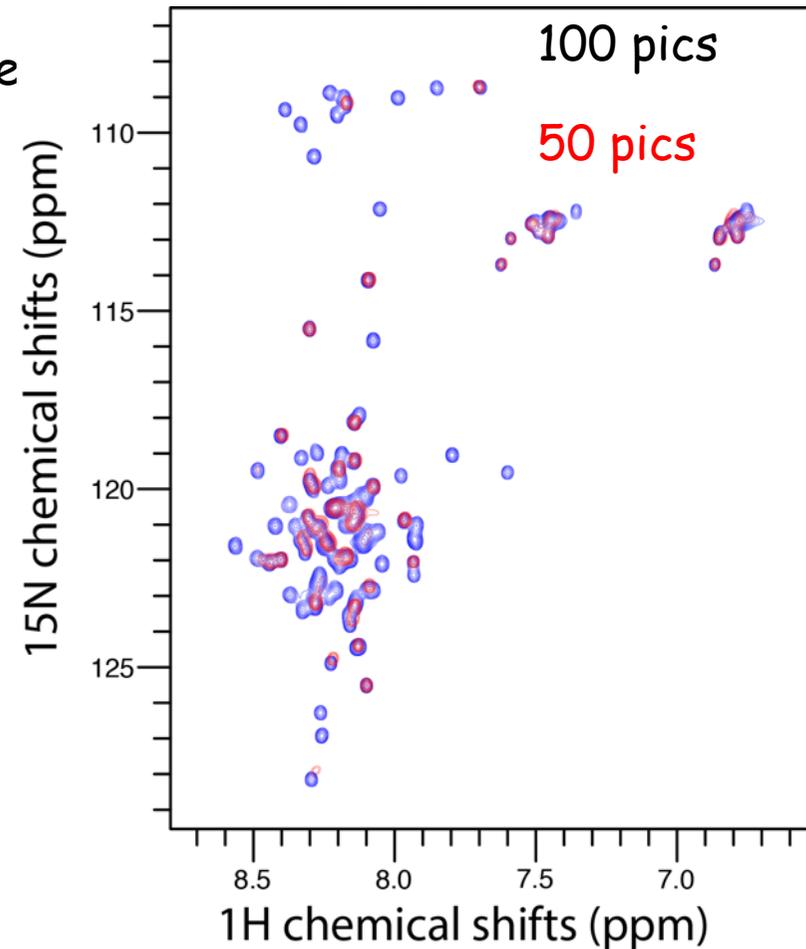
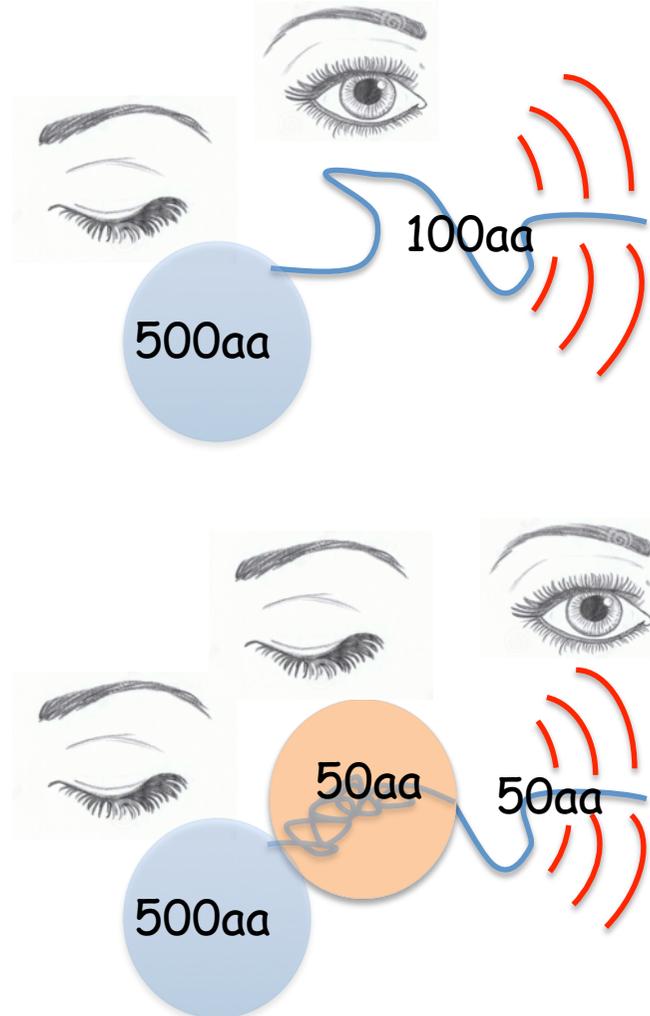


Les 100 pics  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  visibles se comportent comme une IDP: raies fines, intenses, au centre du spectre  $^1\text{H}$  et facilement attribuables

# 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

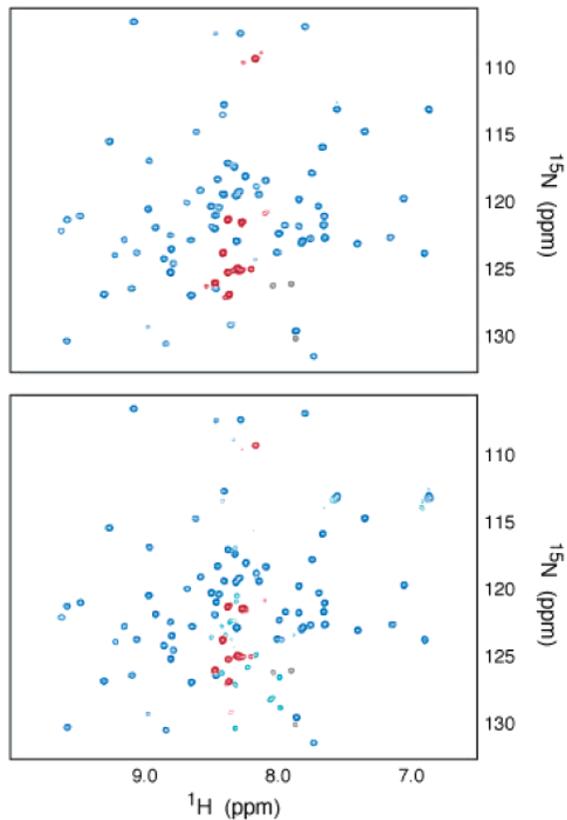
Seuls les pics des résidus flexibles sont visible



Footprinting sur des protéines intactes  
Alternative à la protéolyse ménagée

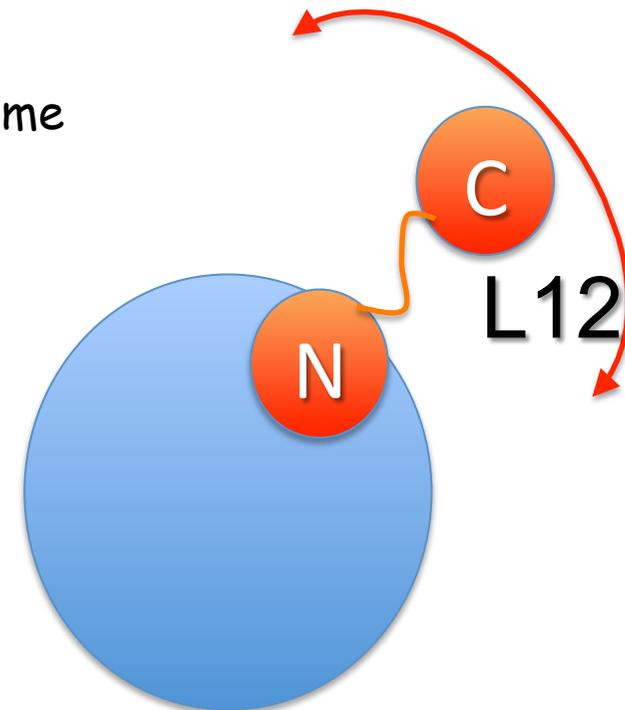
# De la RMN sur le ribosome?

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



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

Ribosome 70S intact  
marqué  $^{15}\text{N}$



# 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...



- ☞ Protéine: de  $\sim 1 \mu\text{M}$  à  $5 \text{ mM}$
- ☞ Volume: 200 à  $500 \mu\text{L}$
- ☞ Tampon: pas de restriction *a priori*



- ☞ Attention au pH si spectre  $^{15}\text{N}$  (labilité de  $\text{H}_\text{N}$  accélérée)
- ☞ Attention à la concentration en sel (pas trop élevée mais alternatives)
- ☞ Un peu (5-10%) de  $\text{D}_2\text{O}$  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

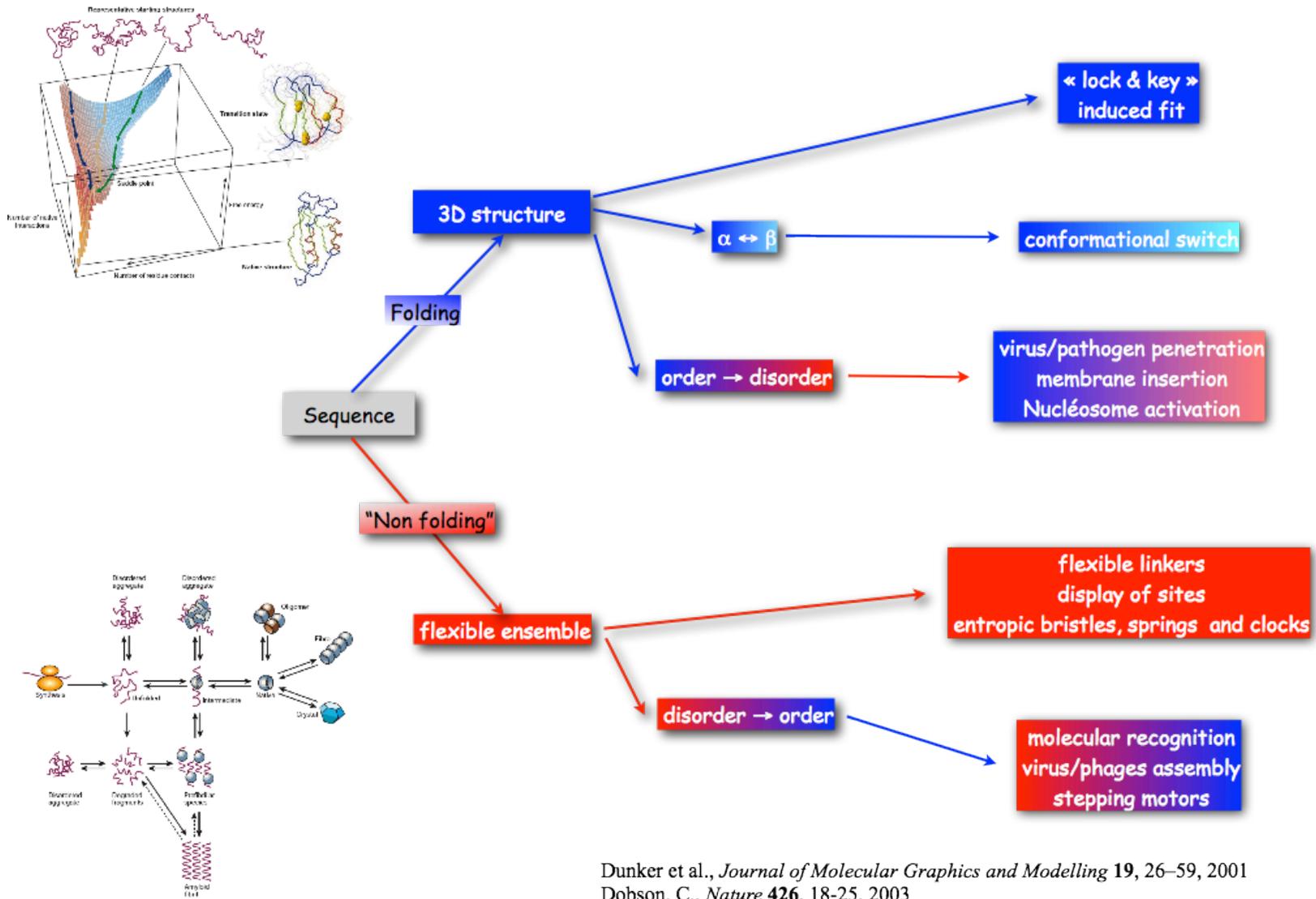
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide:  $\mu$ s-ms

et finalement rapide: ps-ns

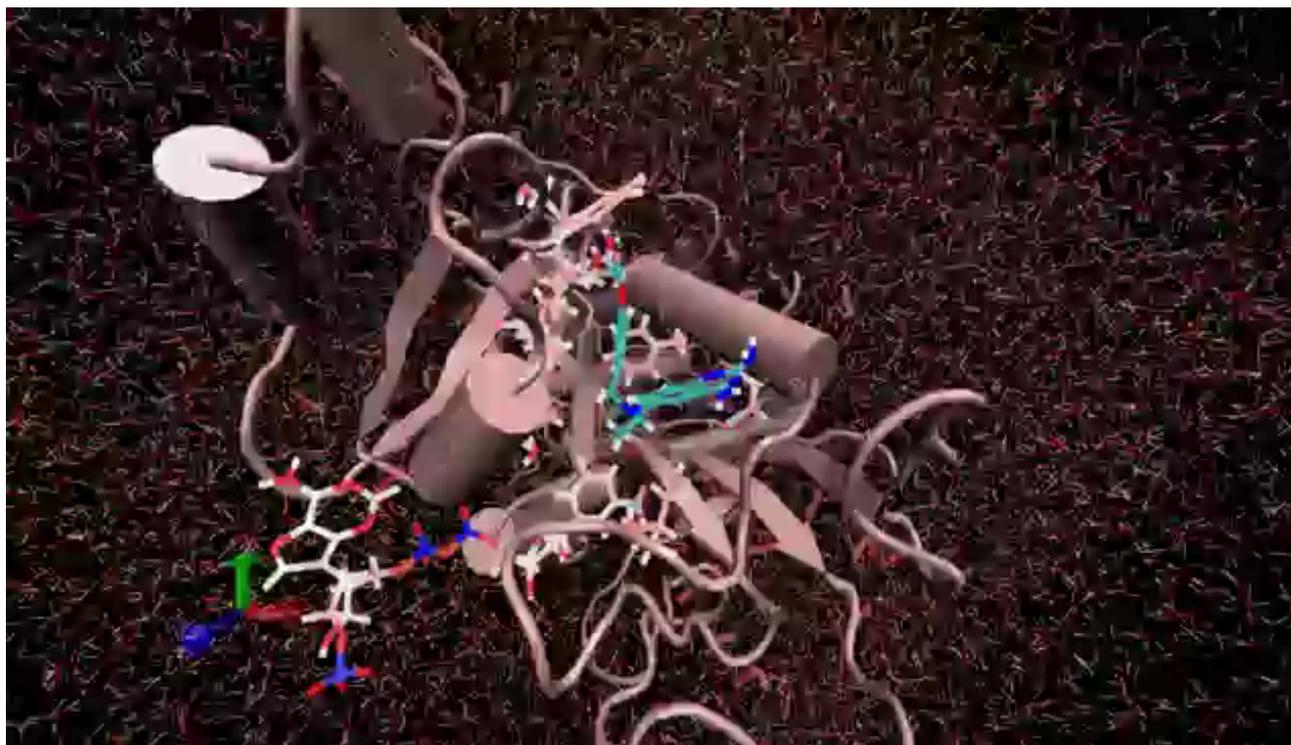
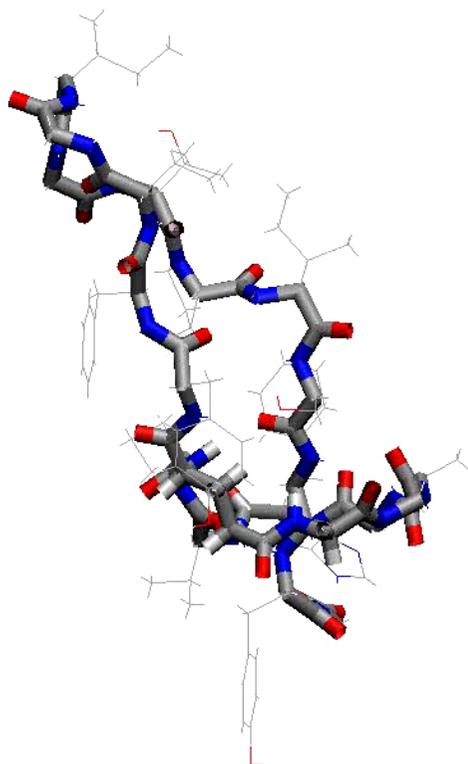
# Les Protéines: des objets dynamiques



Dunker et al., *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **19**, 26–59, 2001  
Dobson, C., *Nature* **426**, 18–25, 2003

# Les protéines sont des molécules dynamiques

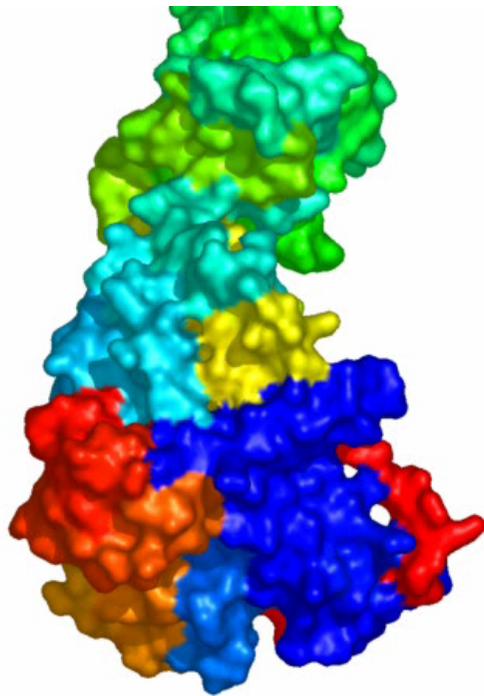
Mouvements dans la gamme picoseconde-nanoseconde



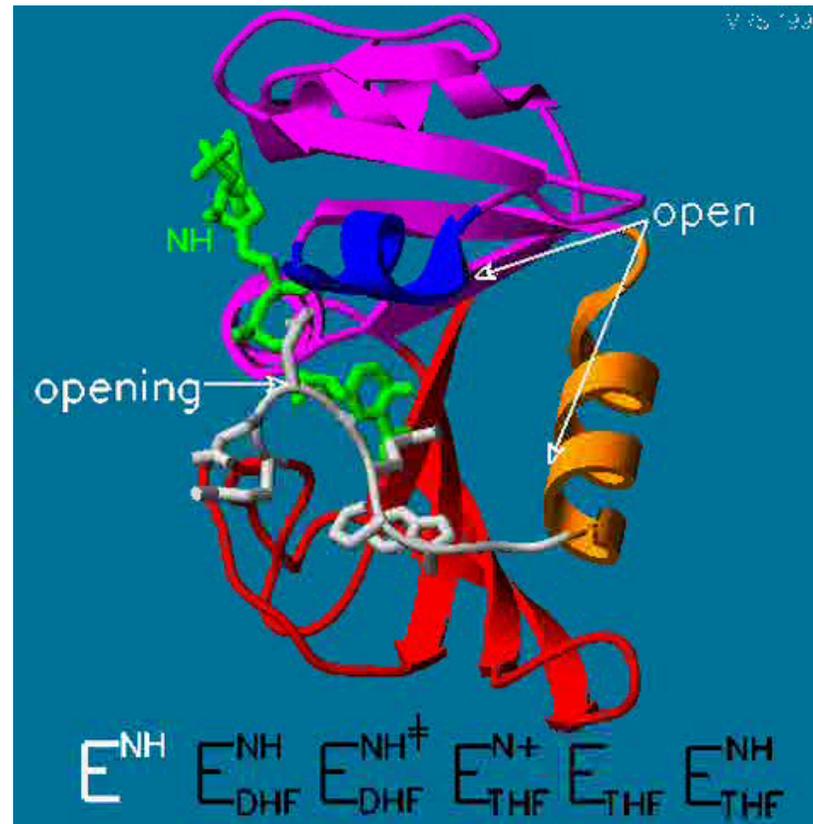
<https://www.youtube.com/watch?v=raQI0l69kvg>

# Les protéines sont des molécules plastiques

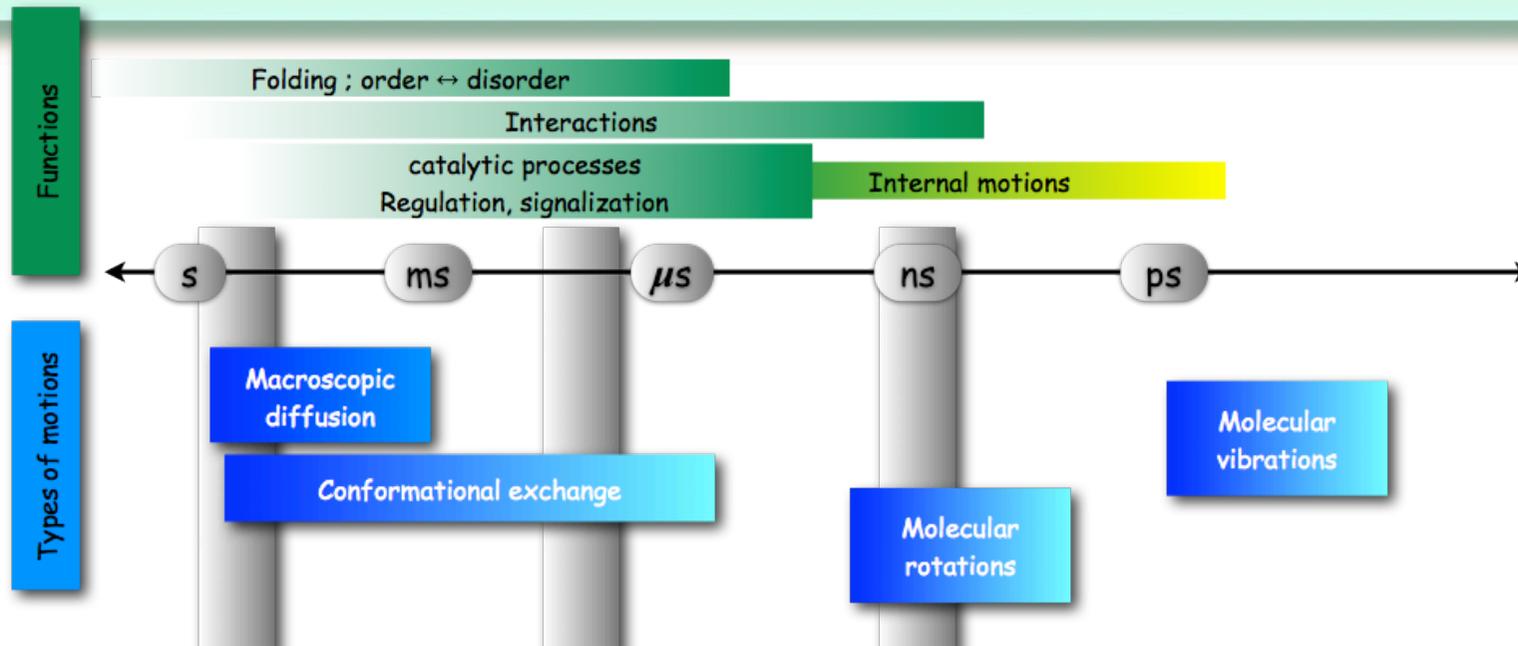
## Chaperone



## Cycle catalytique d'une enzyme



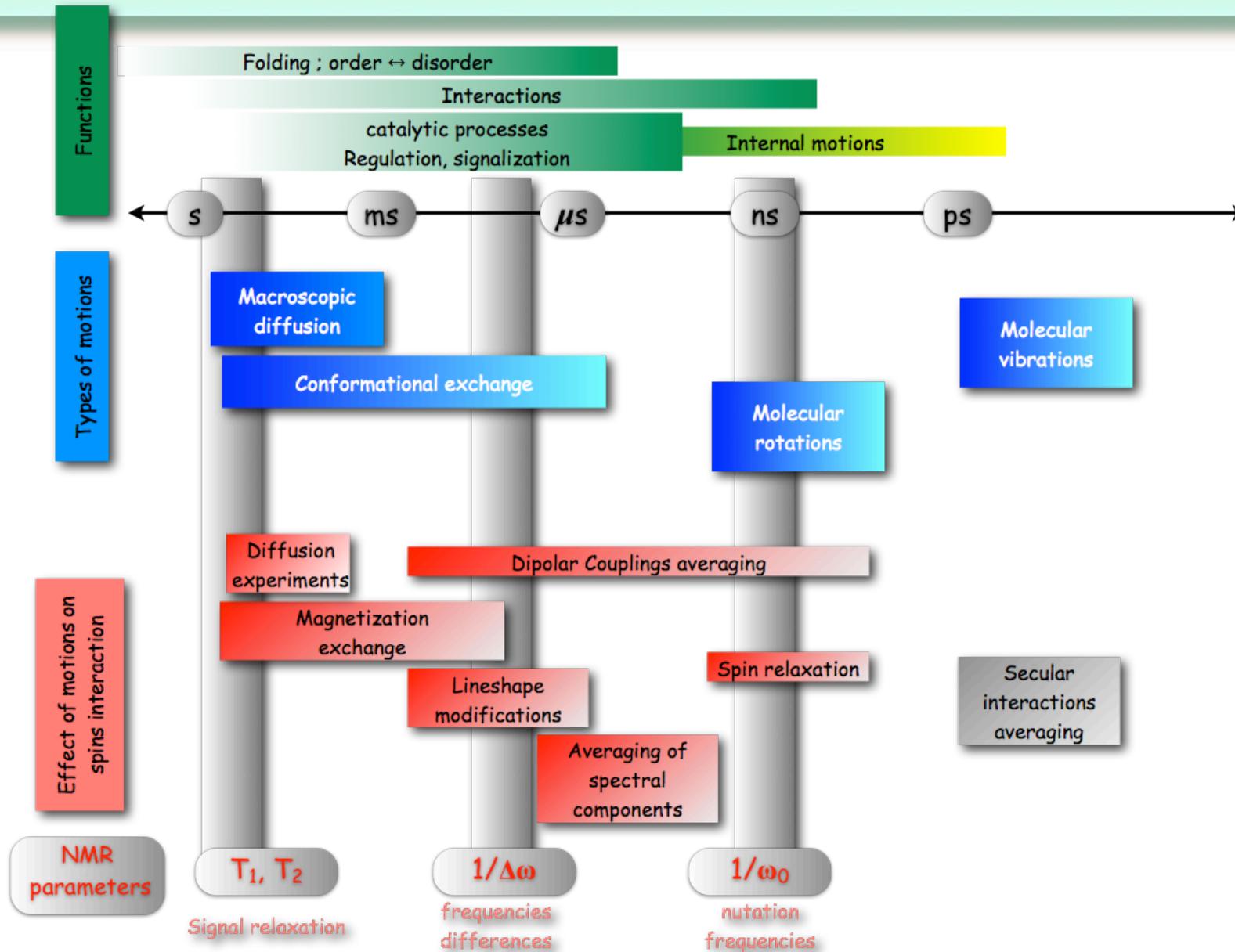
# Fonction des protéines et dynamique



# Techniques pour accéder à la dynamique de protéine

X-ray cristallography	B factors	time scales static disorder, crystal contacts, ...
<b>X-Ray, neutron scattering</b> Doniach, Chem. Rev. 2001, 101 ; Zcai, science 2000, 288.	size/shape modifications timescales (ps-ns) for <sup>1</sup> H positions	
<b>Fluorescence</b> Weiss, Nat. Struct. Biol. 2000, 7 ; Yang, Science 2003, 302 ; Haustein, Curr. Opin. Struct. Biol. 2004, 14.	ensemble / single molecule cellular context	probes
<b>Mass Spectroscopy (HX MS) radical footprinting</b> Wales, Mass. Spectrom. Rev. 2006, 25 ; Busenlehner, Arch. Biochem. Biophys. 2005, 433. Guan, Trends. Biochem. Sci. 2005, 30.	large molecular assemblies	
<b>Mössbauer, Raman, 2D infrared spectroscopy</b>		
<b>Molecular dynamics</b>		Forcefields ... Short timescales ...
<b>NMR</b>  Boehr, Chem. Rev. 2006, 106, 3055. Palmer, Chem. Rev. 2004, 104, 3623.	<ul style="list-style-type: none"> <li>⇨ 10<sup>-12</sup> ↔ 10<sup>5</sup> s</li> <li>⇨ Site-specific information</li> <li>⇨ multiple atomic probes <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, ...</li> <li>⇨ Simultaneous monitoring of probes</li> <li>⇨ kinetic &amp; thermodynamic profile of dynamic processes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⇨ isotope labeling</li> <li>⇨ quantities</li> <li>⇨ size limitation</li> <li>⇨ complexity of the method ?</li> </ul>

# 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

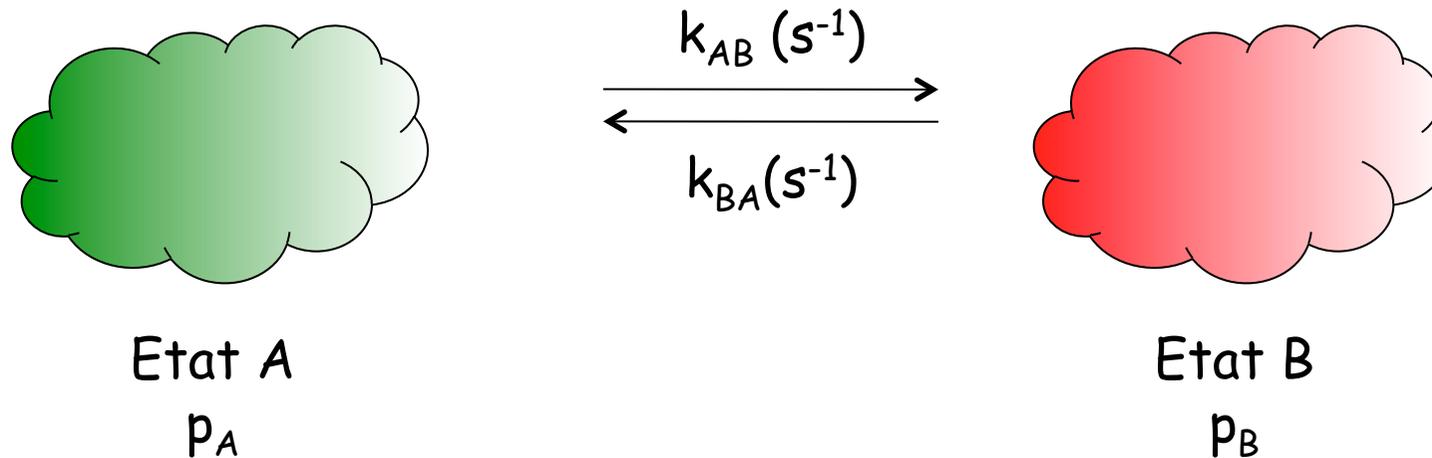
# Comment la RMN voit les mouvements?

- ☞ 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)  
$$\omega_0 = \gamma B_0$$
 $\gamma$ : noyau ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , ...) dépendant  
 $B_0$ : champ dépendant (500MHz, 800MHz, ...)  
 $^1\text{H}$  à 800MHz /  $^{13}\text{C}$  à 200MHz /  $^{15}\text{N}$  à 800MHz

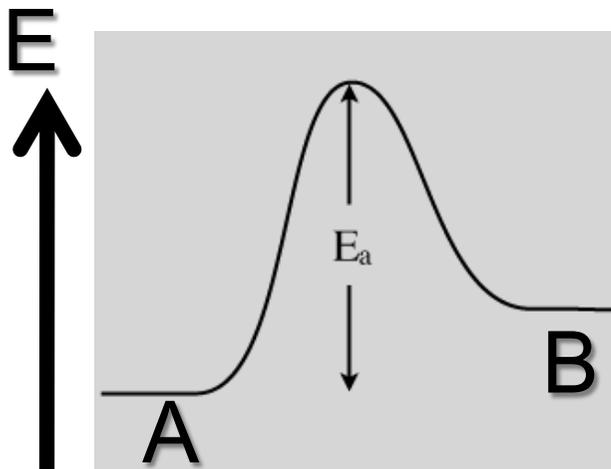
# Plan

- ☞ 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



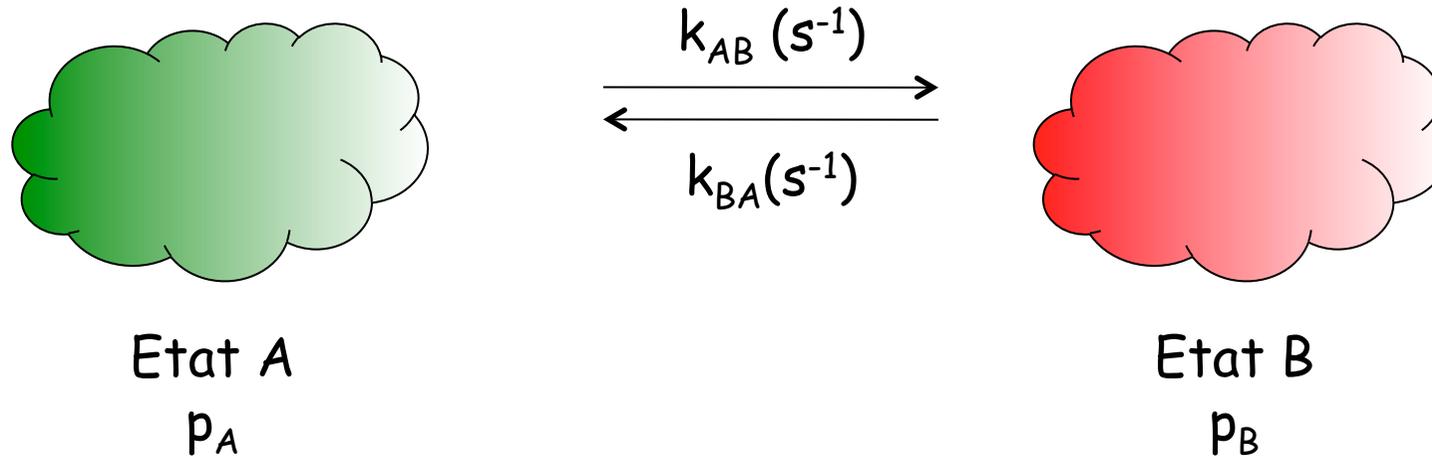
Les états A et B peuvent être différemment peuplés ( $p_A$  and  $p_B$ )



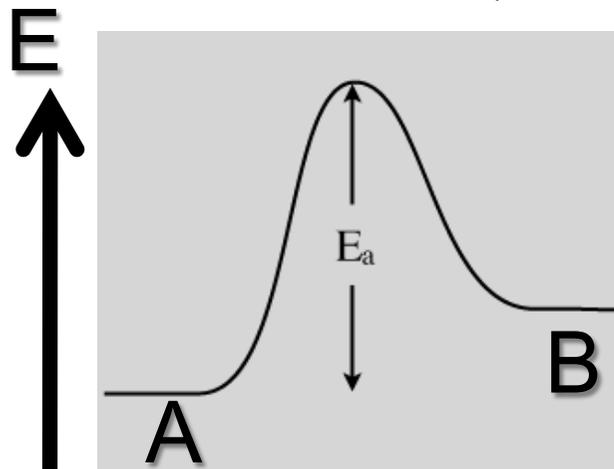
$E_a$ : énergie d'activation

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

# Oscillation entre deux états A et B

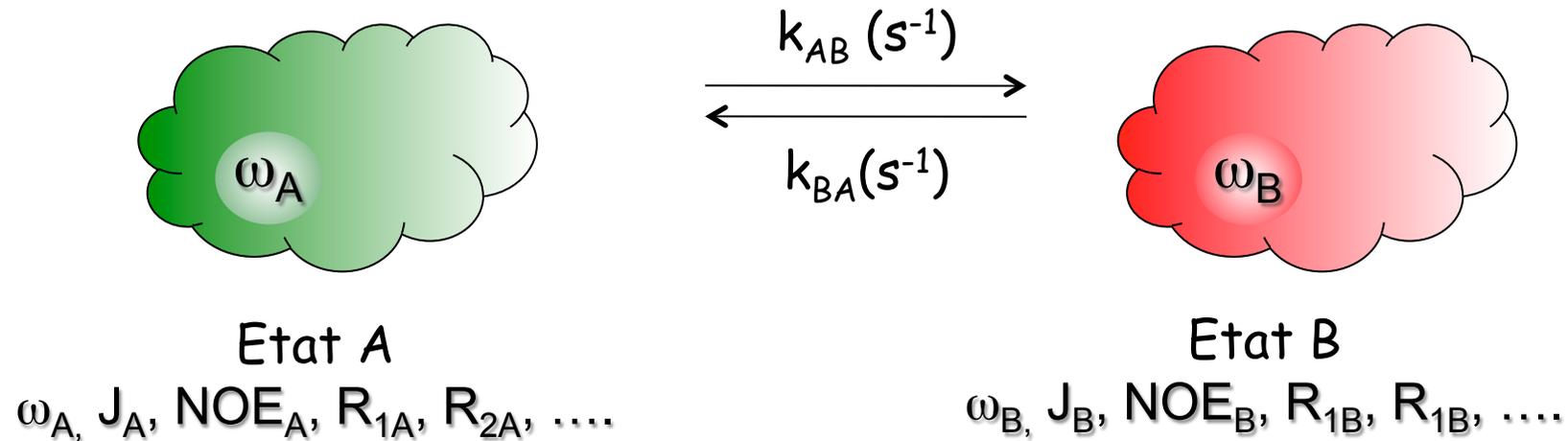


L'« oscillation » (ou échange) est caractérisée par les constantes de vitesse  $k_{AB}$  et  $k_{BA}$ .



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?

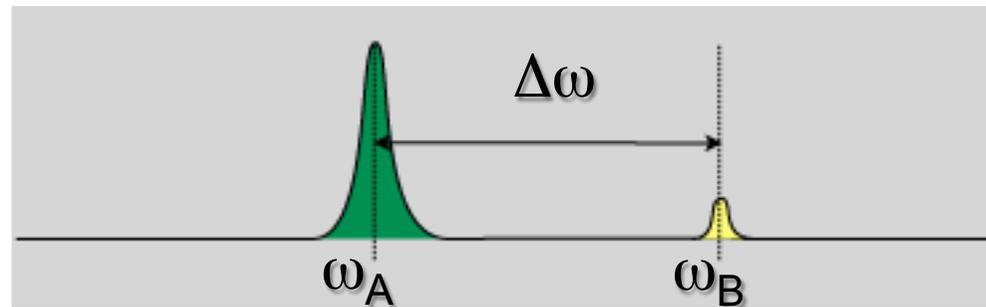


Chaque état est caractérisé par des observables RMN qui peuvent être distincts.

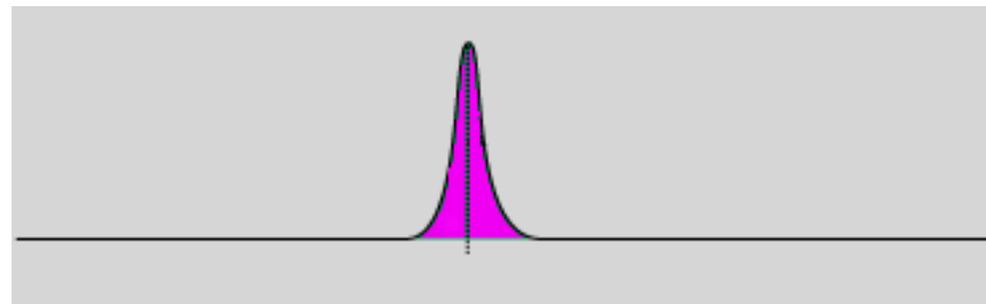
Que voit-on alors?

# Spectres RMN

En l'absence d'échange entre A et B

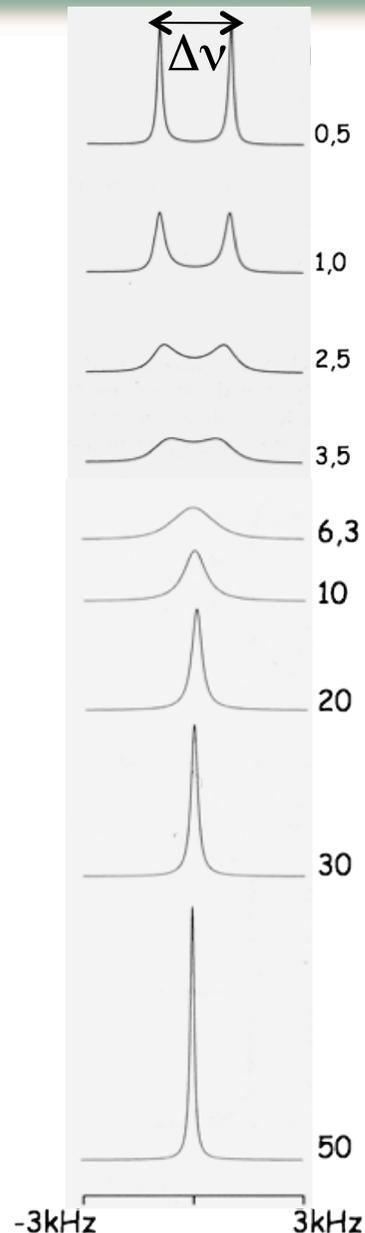


Si l'échange est très rapide



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

# 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  $t$

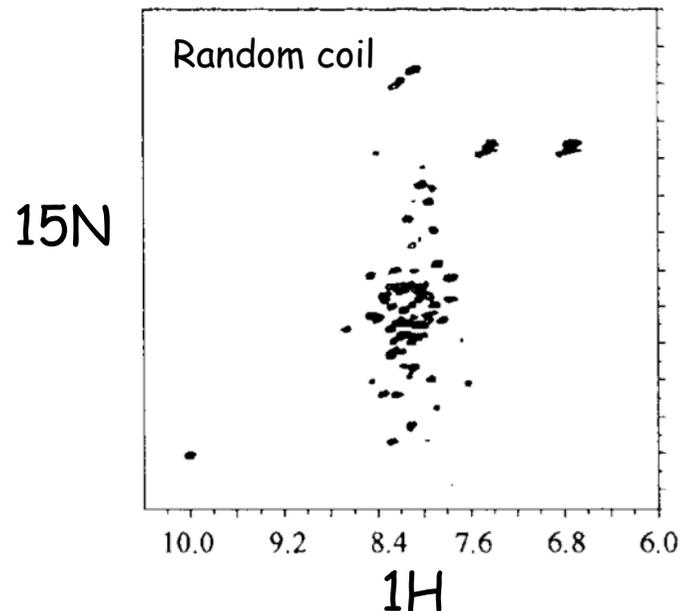
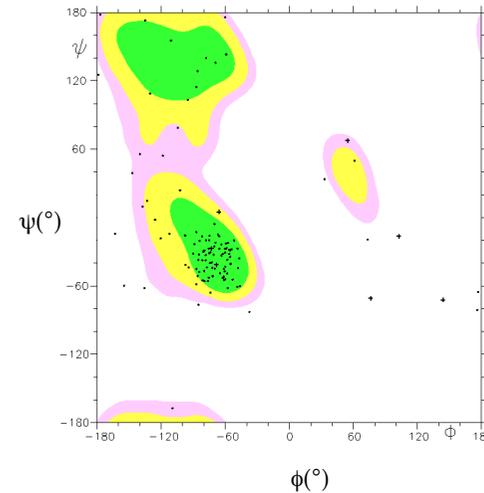
Comment les spectres RMN reflètent la modulation temporelle des déplacements chimiques?

# 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**

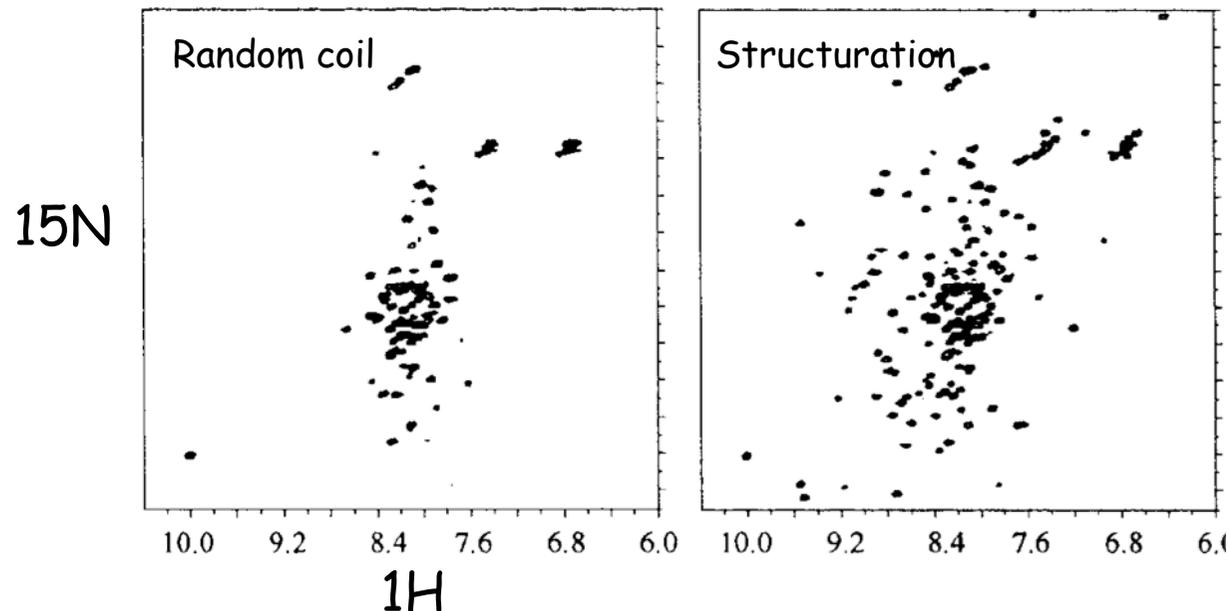
Le seul paramètre est la séquence primaire

# Random coil vs structure

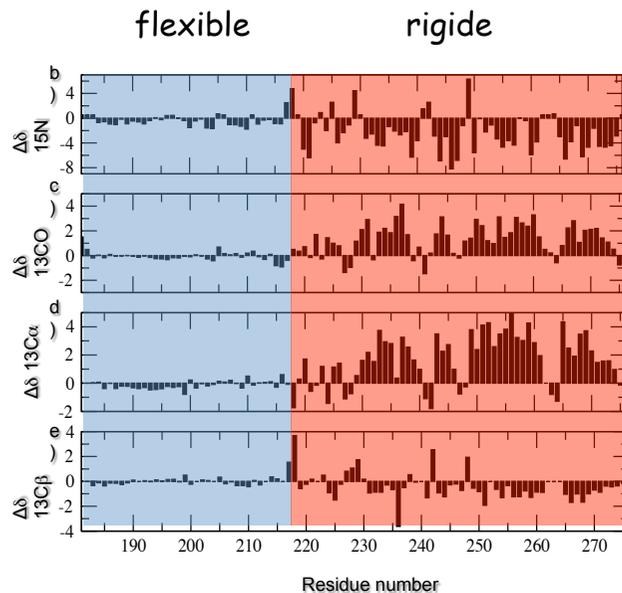
Structuration: certaines conformations sont préférées

Le déplacement chimique moyenné et pondéré dévie du random coil.

## Forte dispersion spectrale

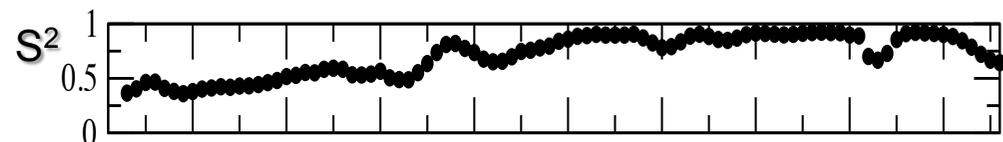
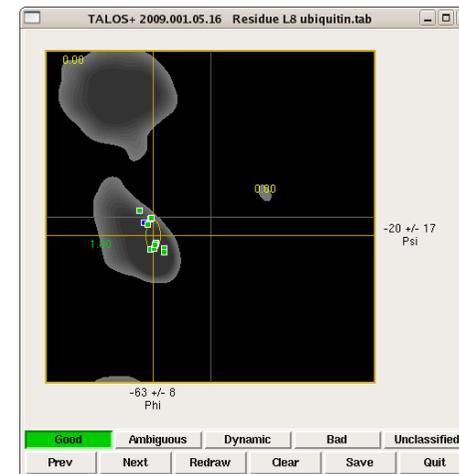


Le profil de variation des déplacements chimiques (par rapport au random coil) est riche en information sur la structure et la dynamique d'une protéine



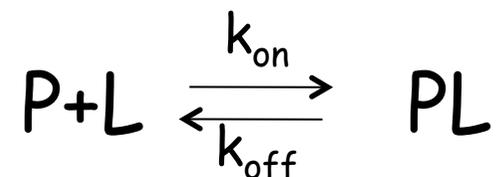
structure

dynamique



# Interaction protéine-ligand

Considérons une protéine P interagissant avec une autre molécule L



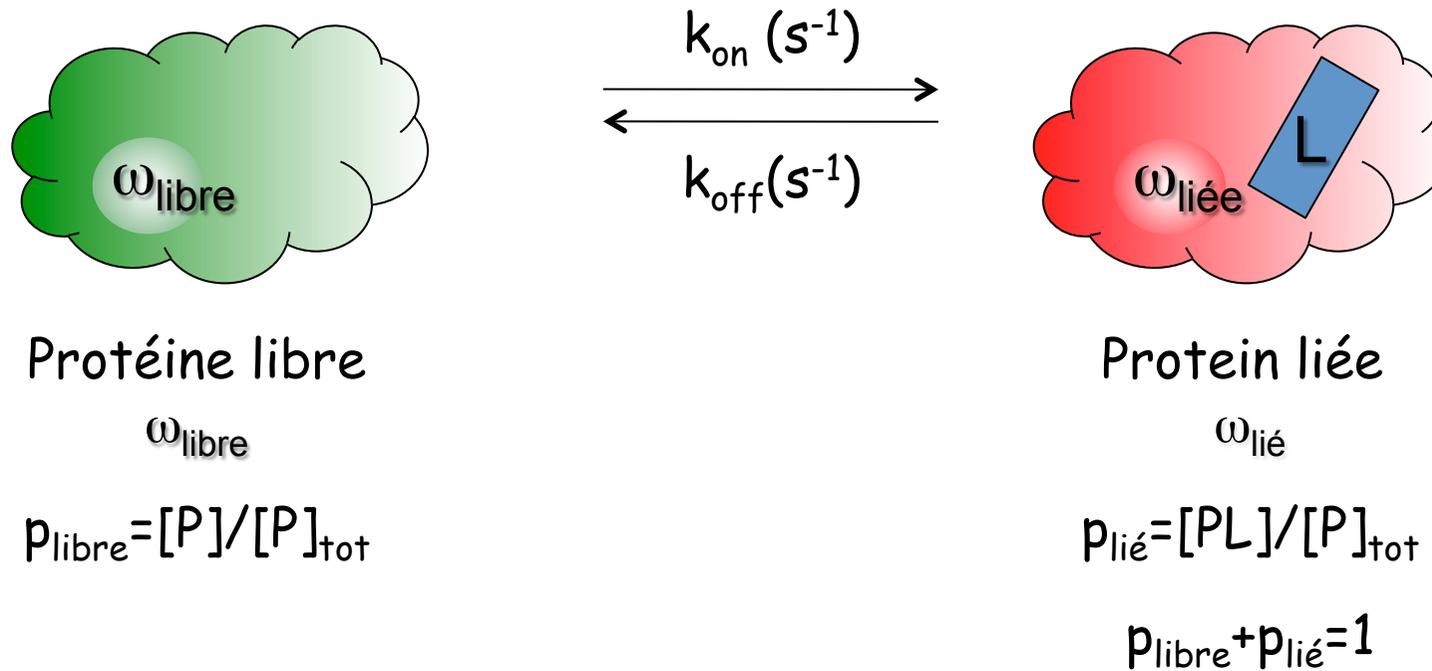
A l'équilibre, les concentrations ( $[P]$ ,  $[L]$ ,  $[PL]$ ) des trois espèces sont reliées par:

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

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



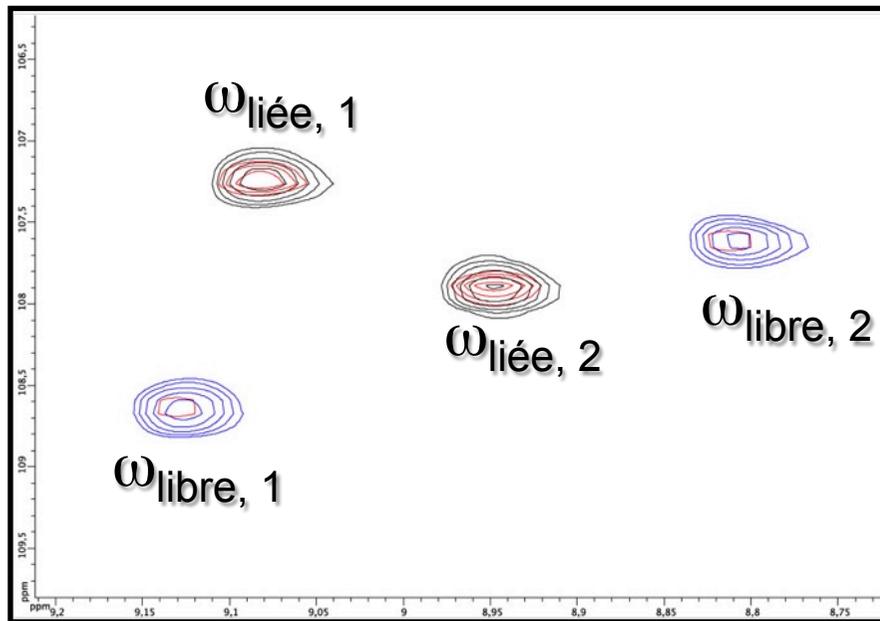
La fraction de protéine libre et liée dépend de la concentration des espèces en solution et de  $K_d$ .

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

# Titration et spectres RMN

## Echange lent

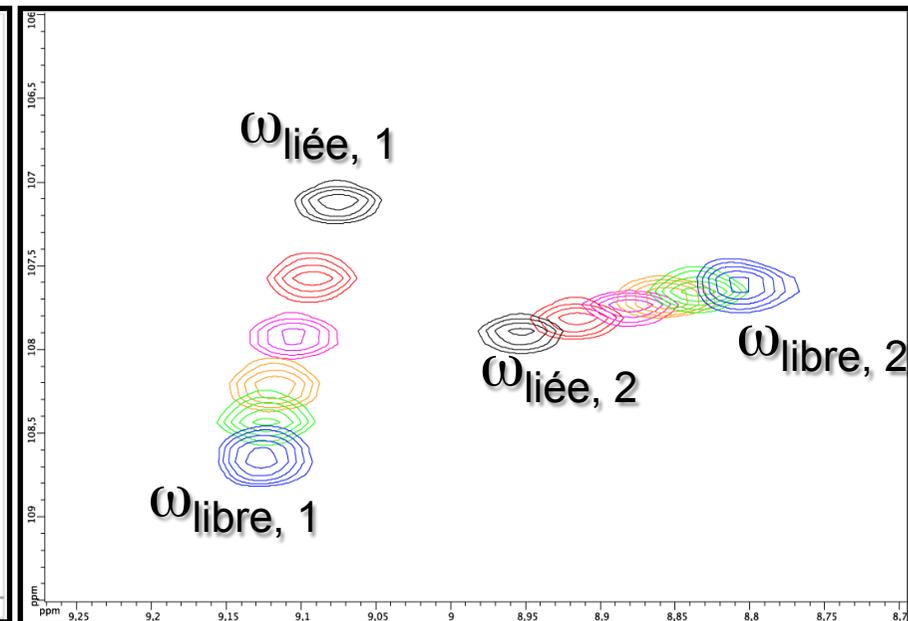
$$k_{\text{ex}} = k_{\text{on}} [L] + k_{\text{off}} \lll \Delta\omega$$



Ligand avec haute affinité  
(faible  $K_d$ )

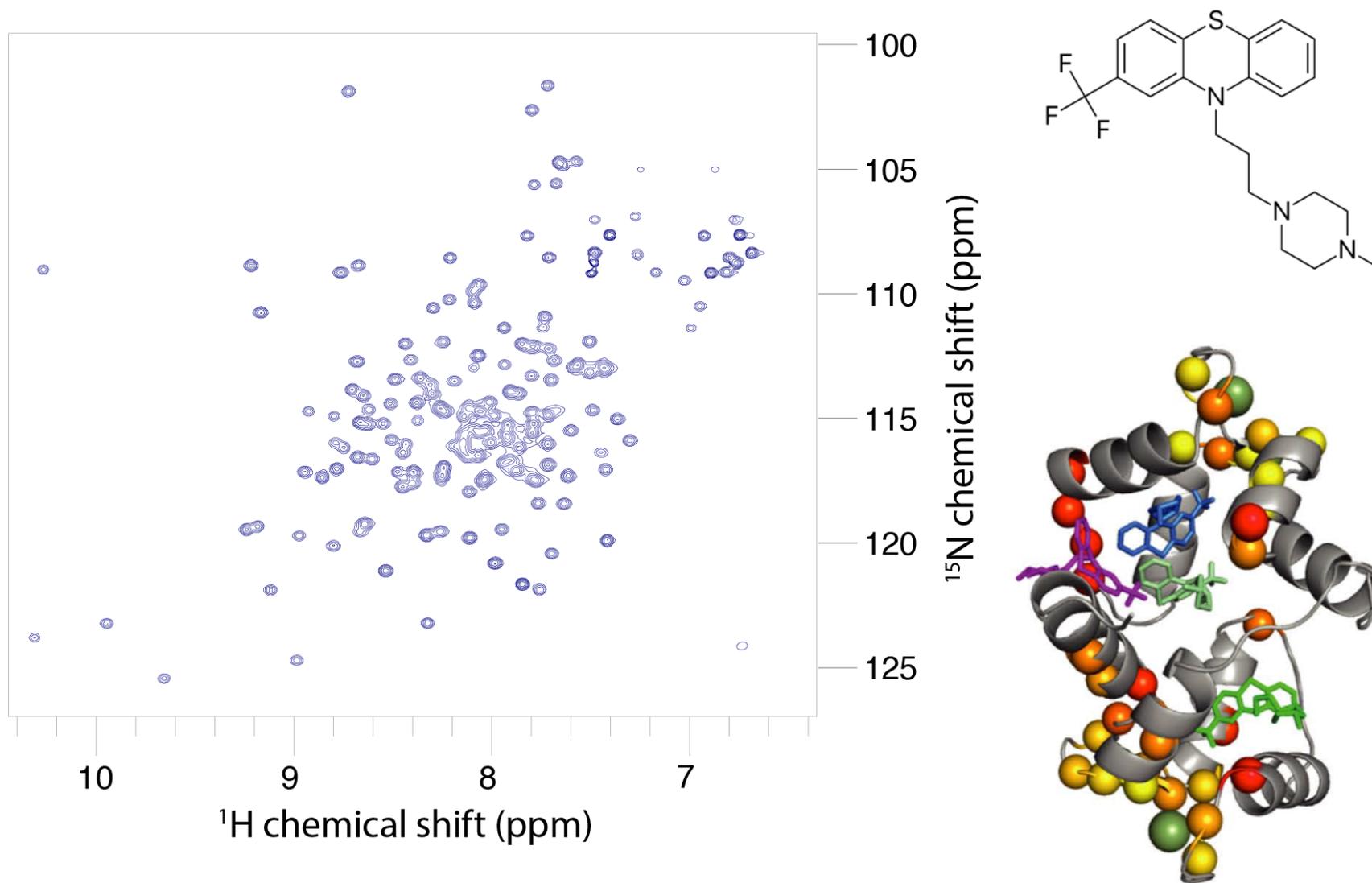
## Echange rapide

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

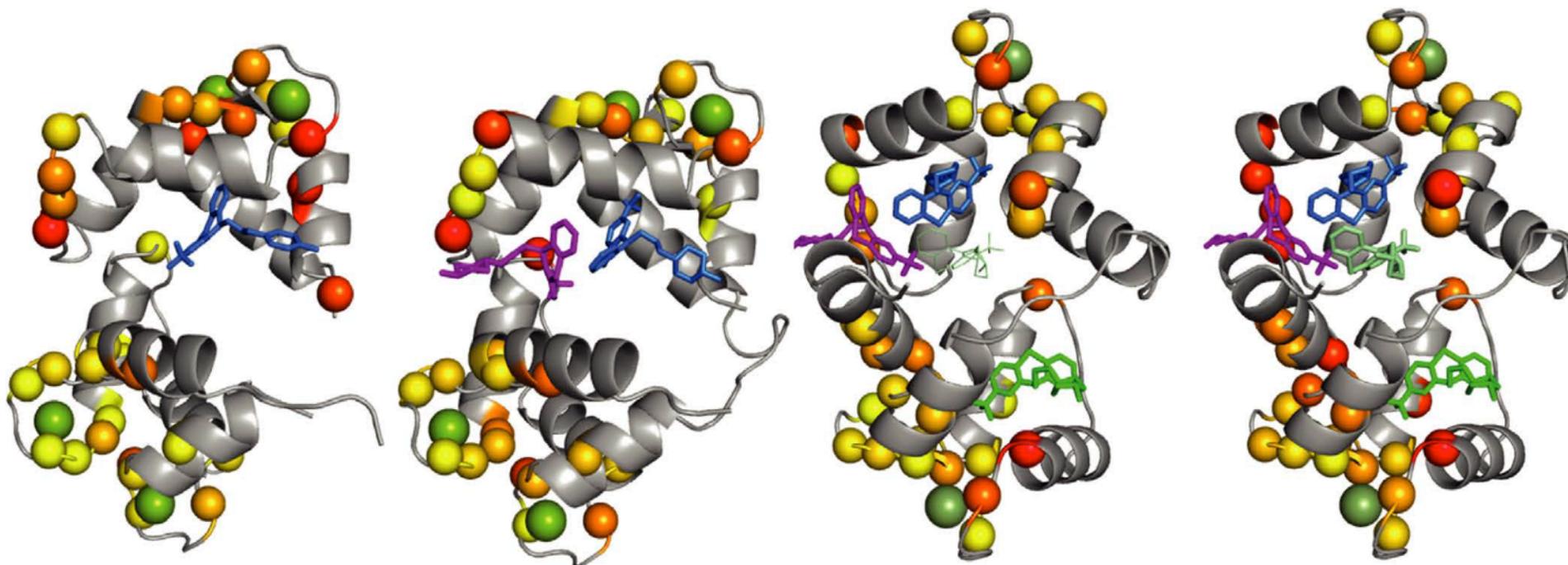
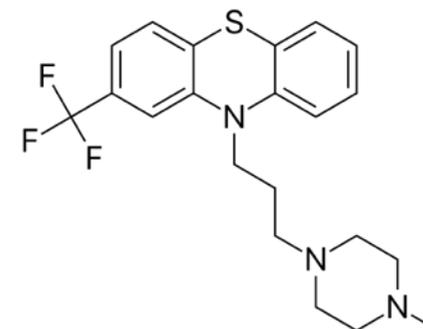
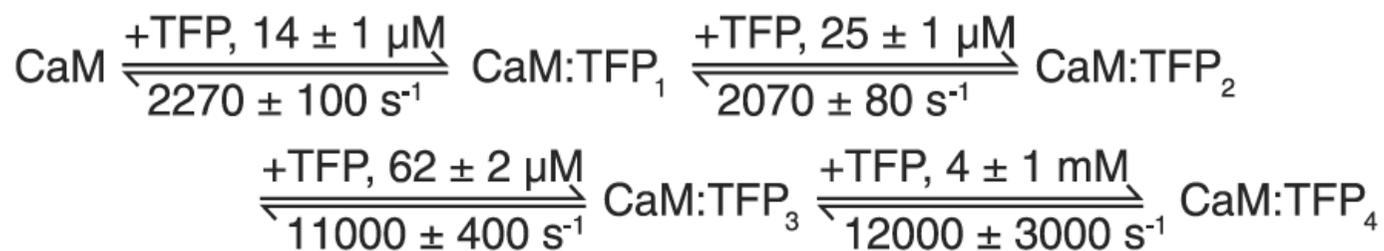


Ligand avec faible affinité  
(haut  $K_d$ )

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



# 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 Iz).**

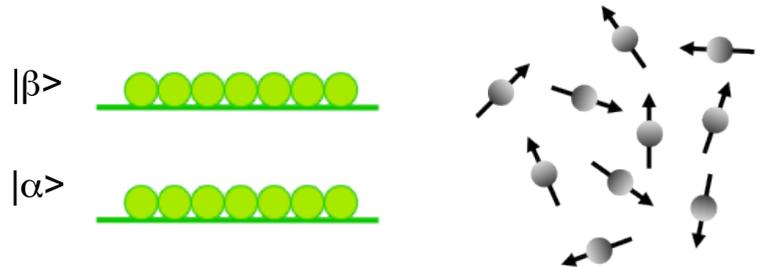
- o Il conditionne le délai entre deux accumulations
- o Les mouvements plus lents que T1 ne peuvent pas être caractérisés à partir d'un seul spectre RMN.

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

- Le temps de relaxation T2 définit la largeur des résonances

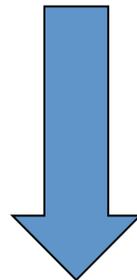
Il existe d'autres temps de relaxation mais plus difficile à mesurer

# T1: le temps d'équilibration



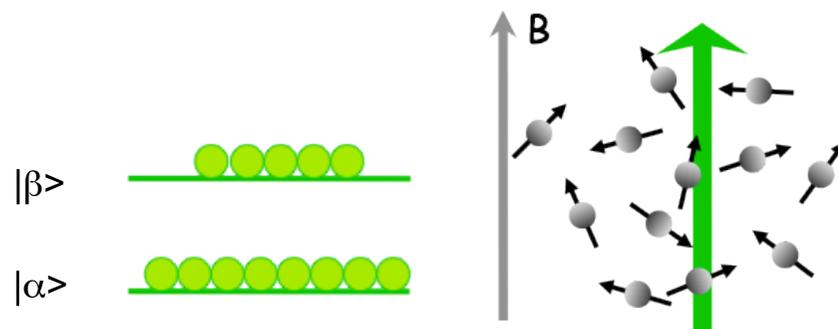
Absence de champ magnétique:  $B_0=0$

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



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

**Polarisation résultante**



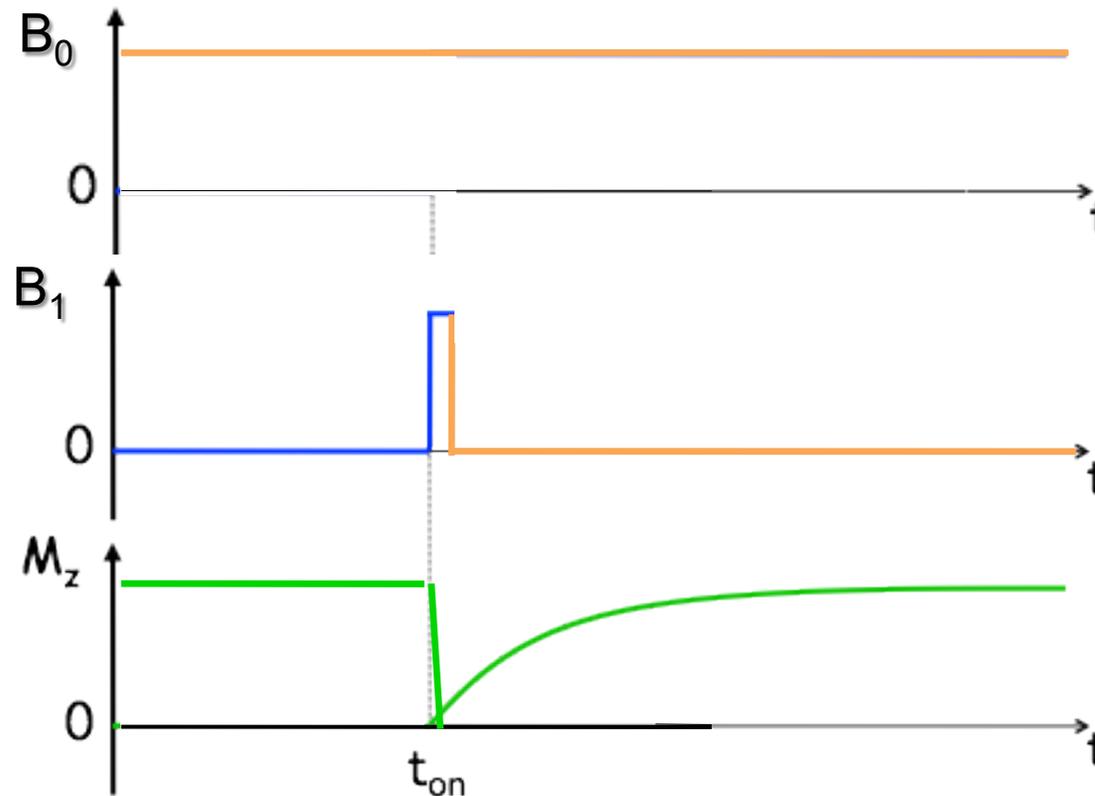
$$M_0 = N(P_\alpha - P_\beta)m = N(P_\alpha - P_\beta)\frac{\gamma\hbar}{2}$$

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

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

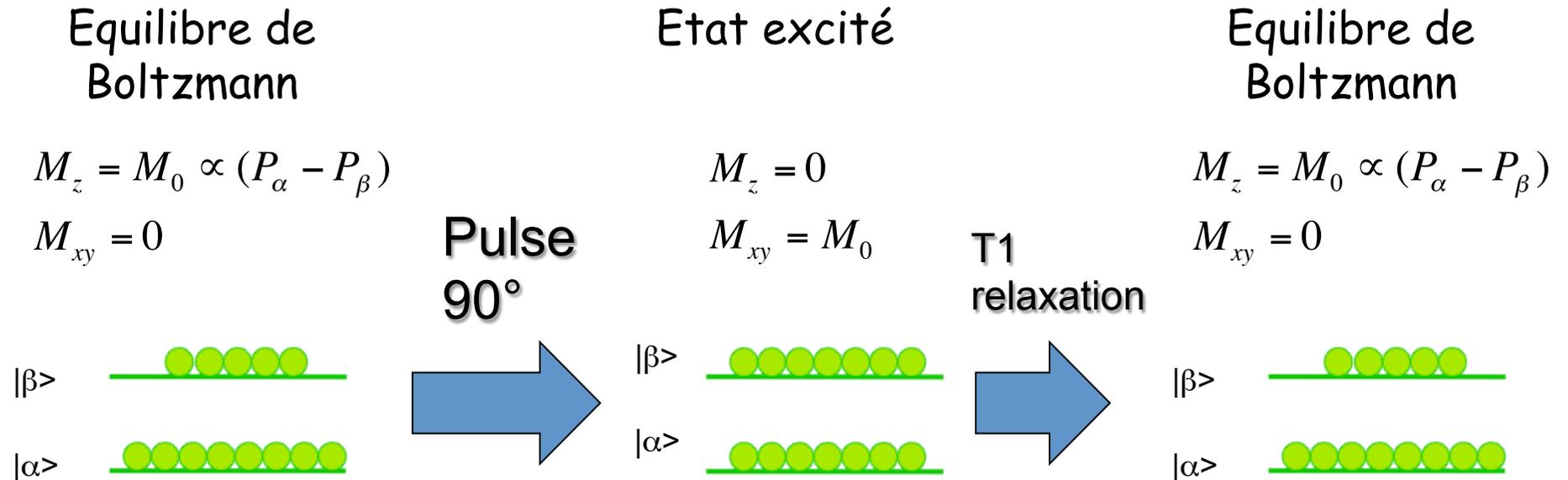
# T1: le temps d'équilibration

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

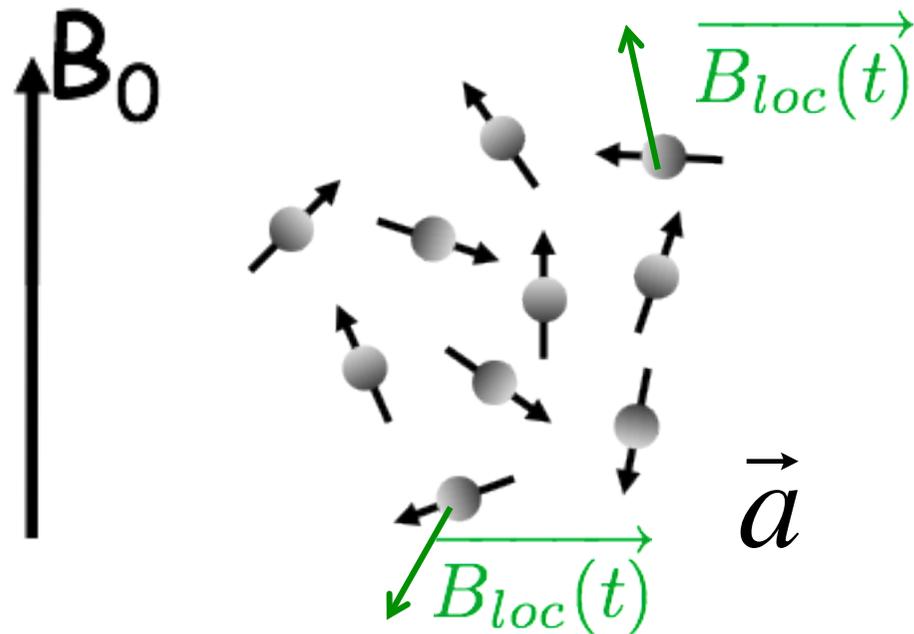


Le temps de relaxation  $T_1$  est relié au changement de population entre les états d'énergie  $\alpha$  and  $\beta$

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



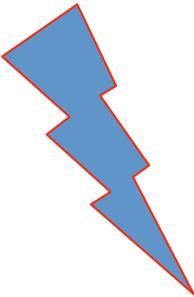
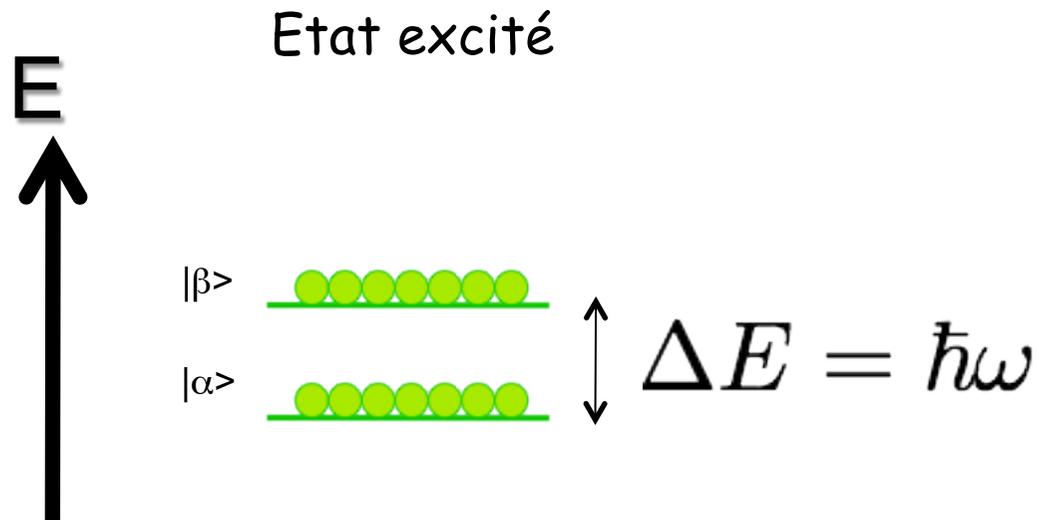
Chaque spin sent un champ local effectif

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

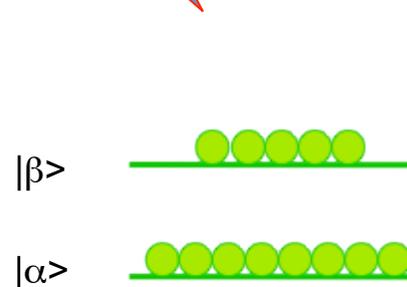


- Dépendent du temps
- Processus stochastique (non corrélé d'une molécule à une autre)

# Le phénomène physique des transitions

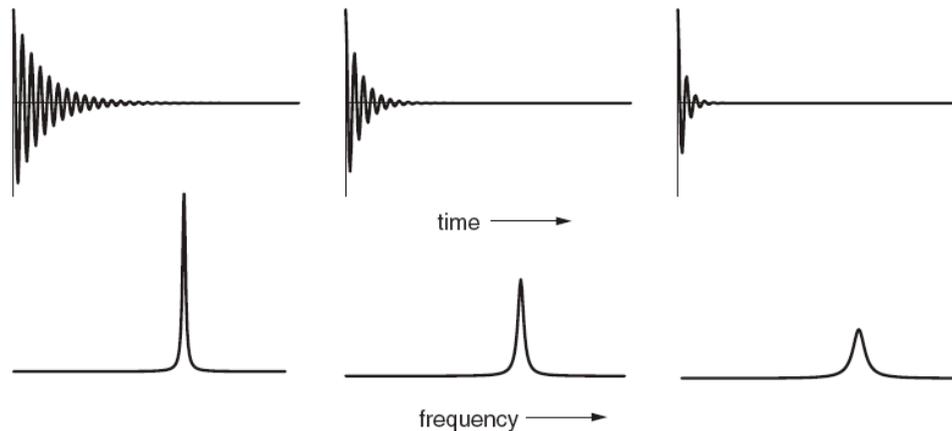


Seuls les photons générés par Beff et à la « bonne énergie » sont capables d'induire des transitions



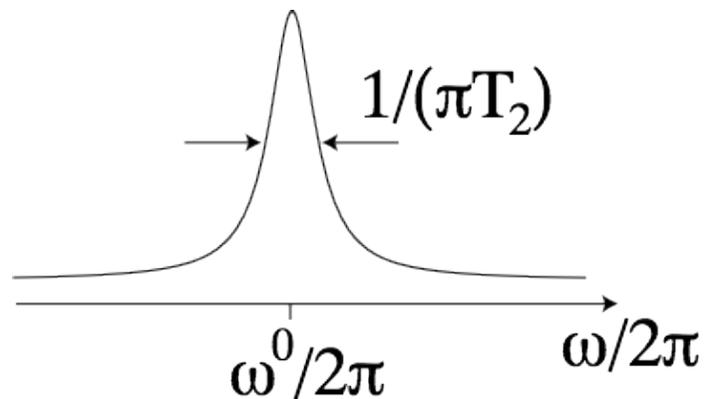
L'efficacité de T1 dépend de la distribution des mouvements au sein d'une molécule  
(cf fonction densité spectrale J)

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



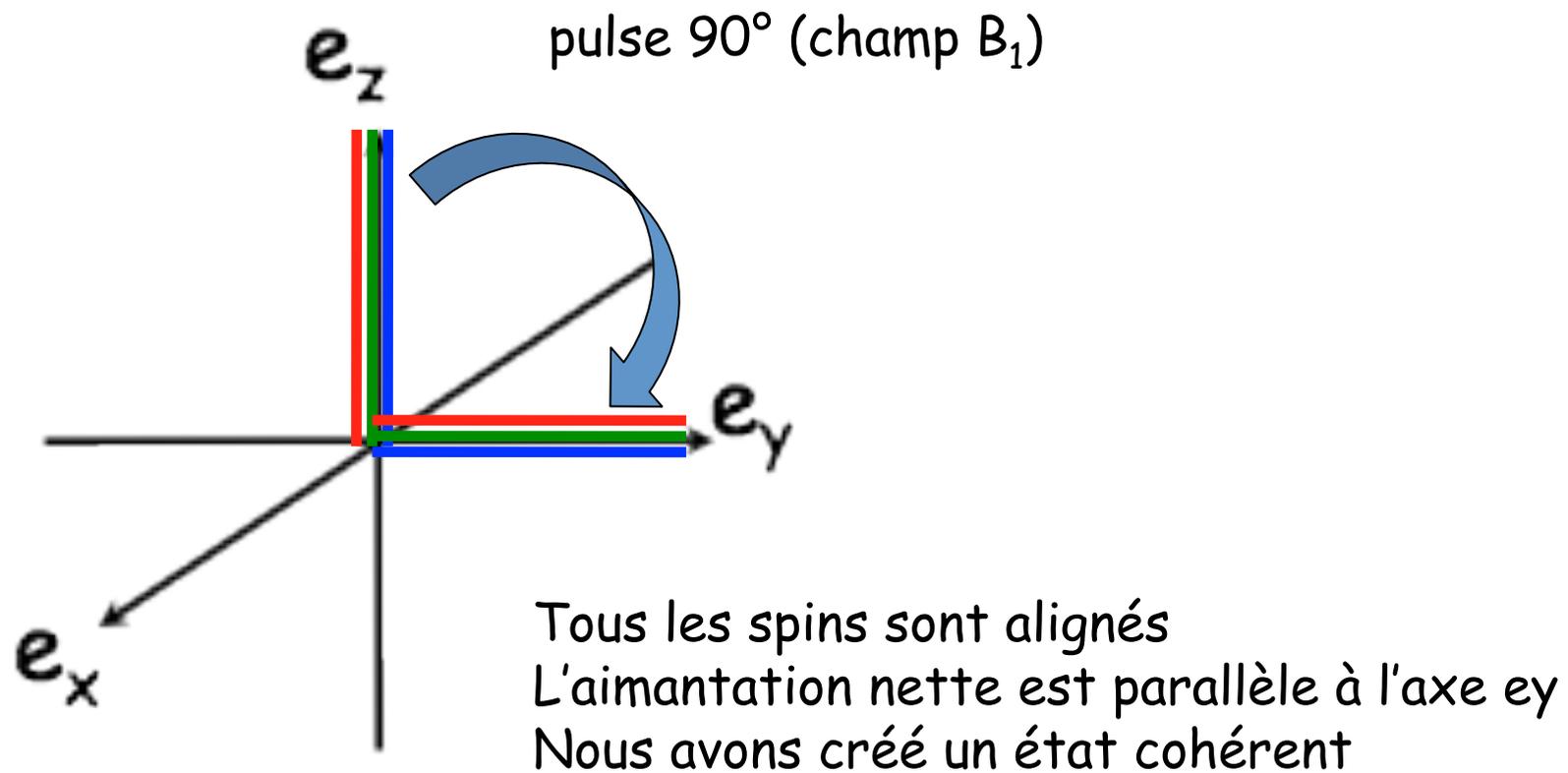
$T_2$  contrôle la forme de raie

$T_2$  rapide mène à des pics large



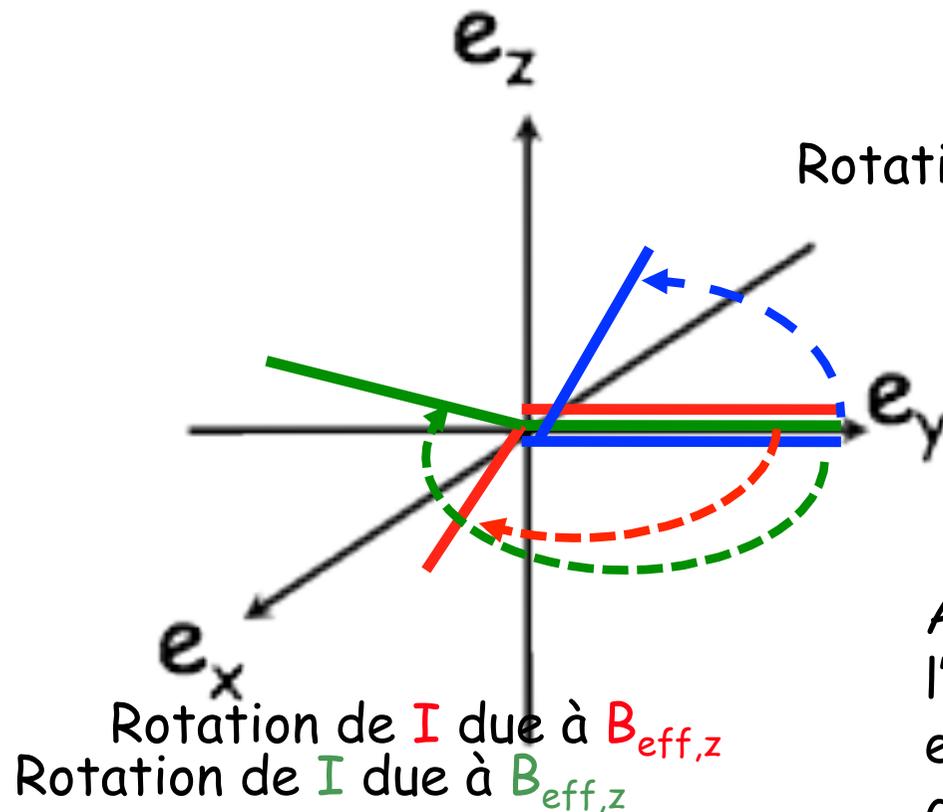
## T2: perte de cohérence

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



## T2: perte de cohérence

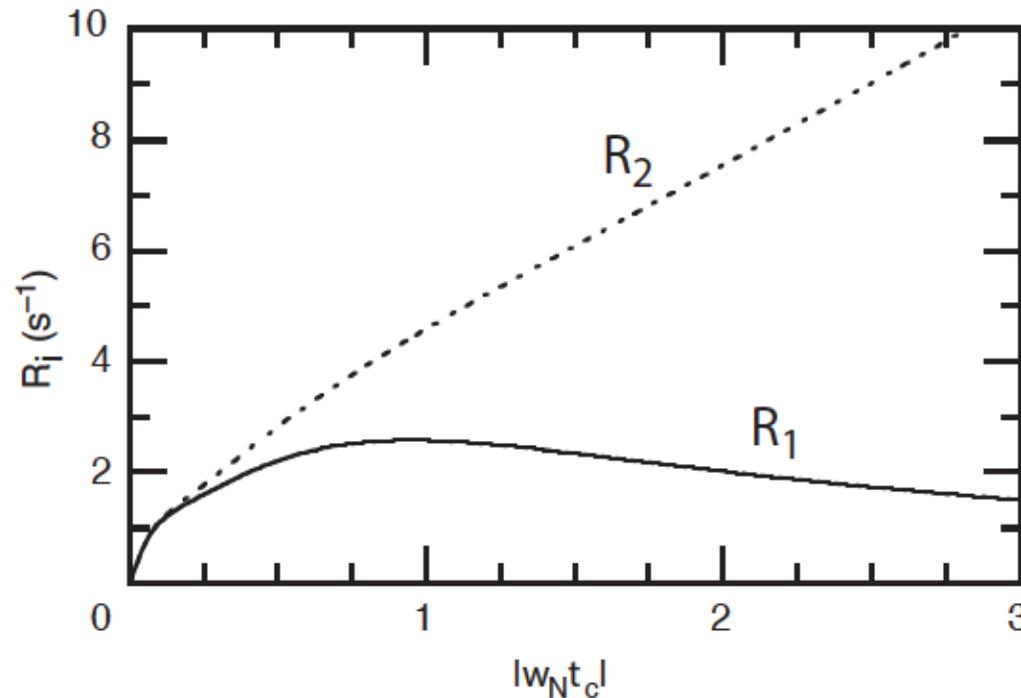
La composante z du champ stochastique Bloc induit des évolutions différentes pour les trois copies



Après une certaine durée, l'aimantation totale ( $\mathbf{I}+\mathbf{I}+\mathbf{I}$ ) 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 ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ , ...)  
 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

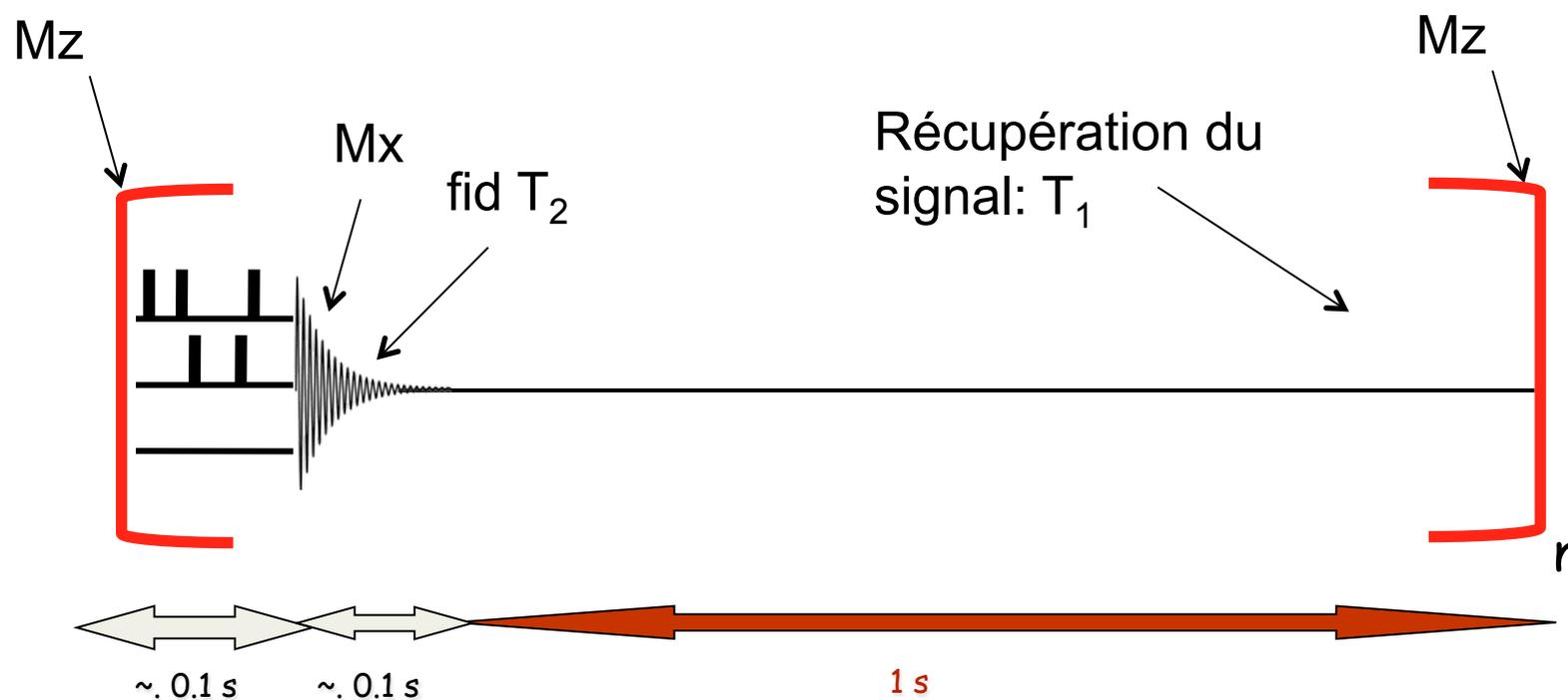
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide:  $\mu$ s-ms

et finalement rapide: ps-ns

# Une expérience RMN typique

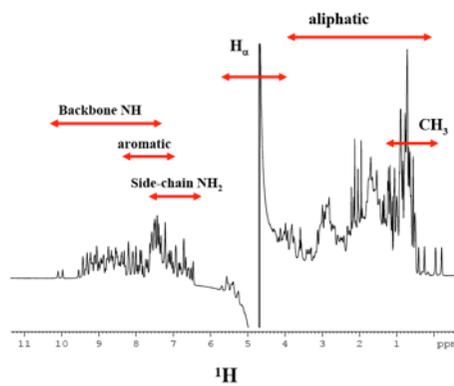


Le bloc élémentaire est répété pour augmenter le rapport signal sur bruit ou pour échantillonner la dimension indirecte (2D-3D-nD...)

# Durée typique d'expériences RMN

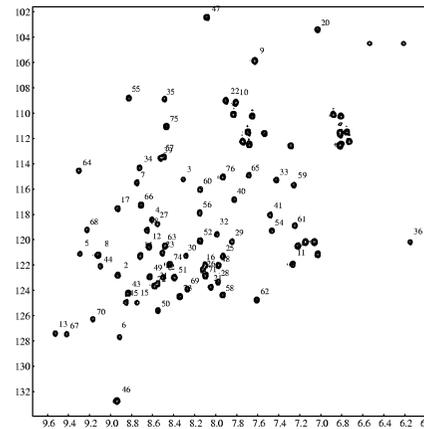
1D

s-min



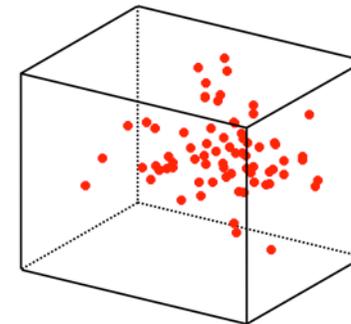
2D

min-h

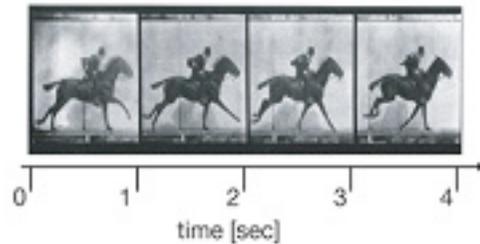


3D

h-jour

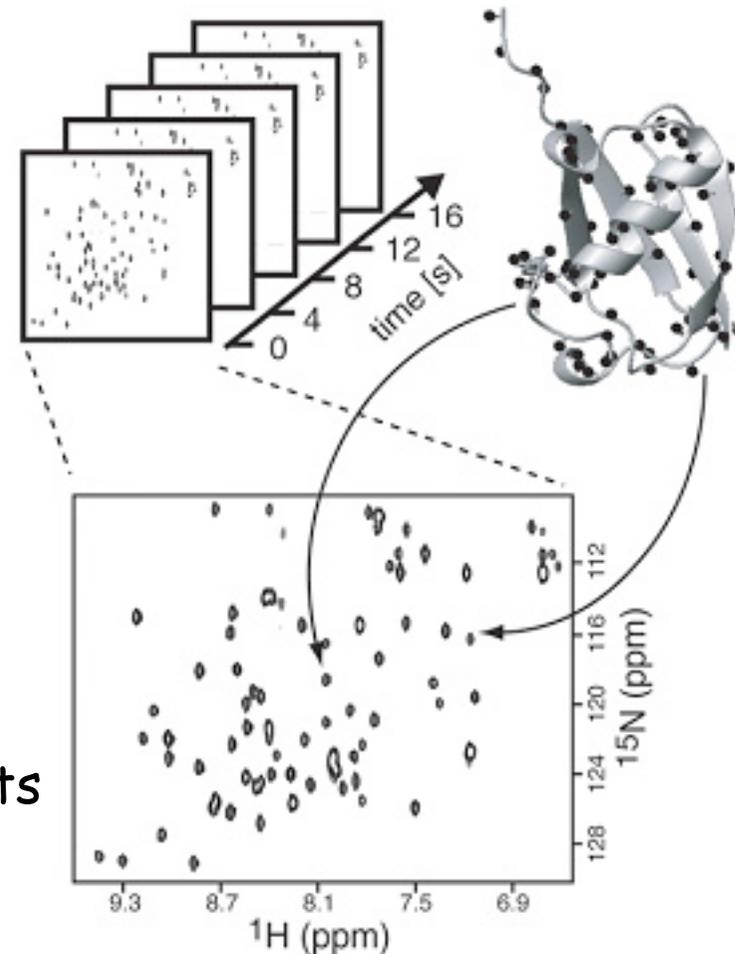


# Expérience de cinétique

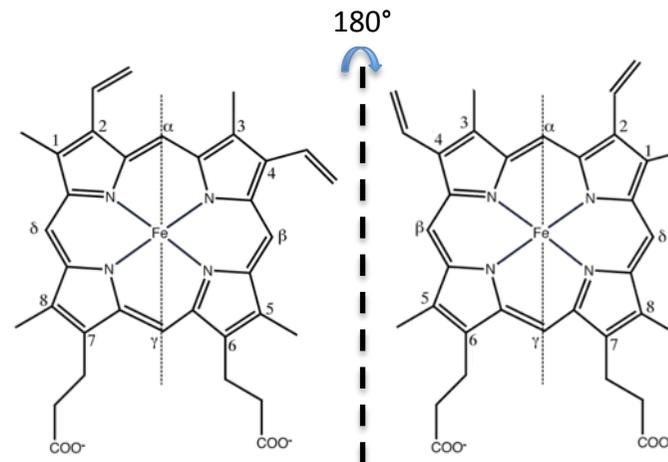
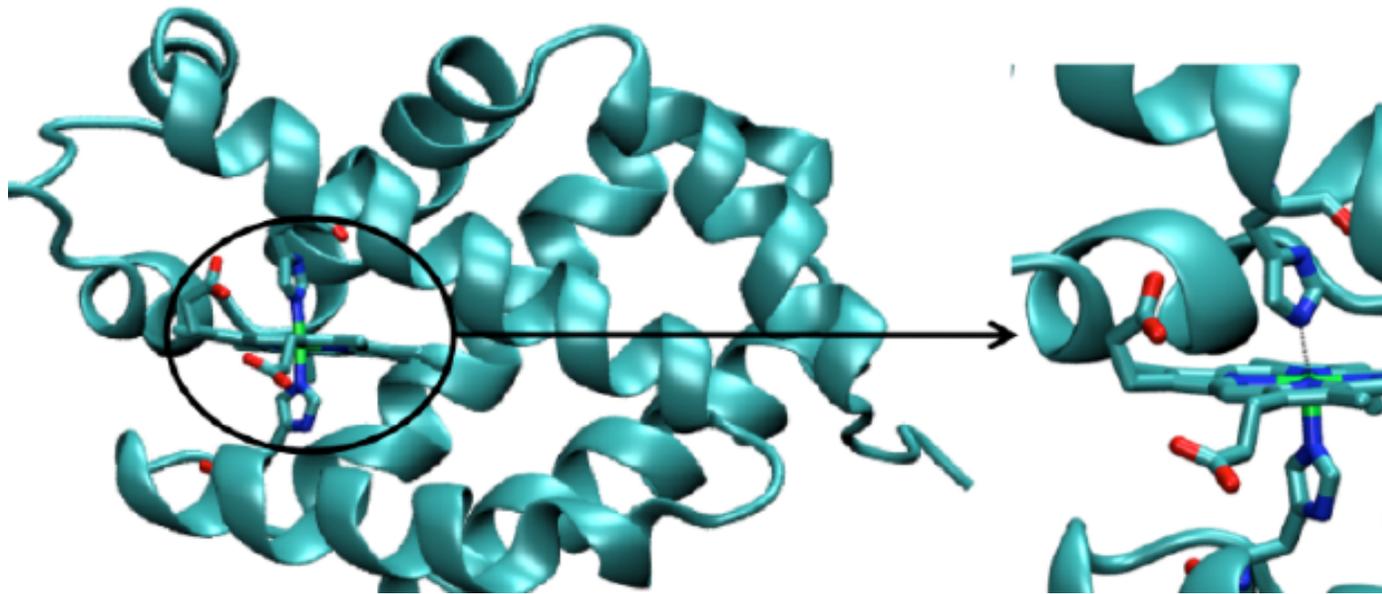


Prendre un cliché  
instantané à chaque  
instant  $\Delta t$

Corréler les changements  
spectraux avec le  
phénomène observé

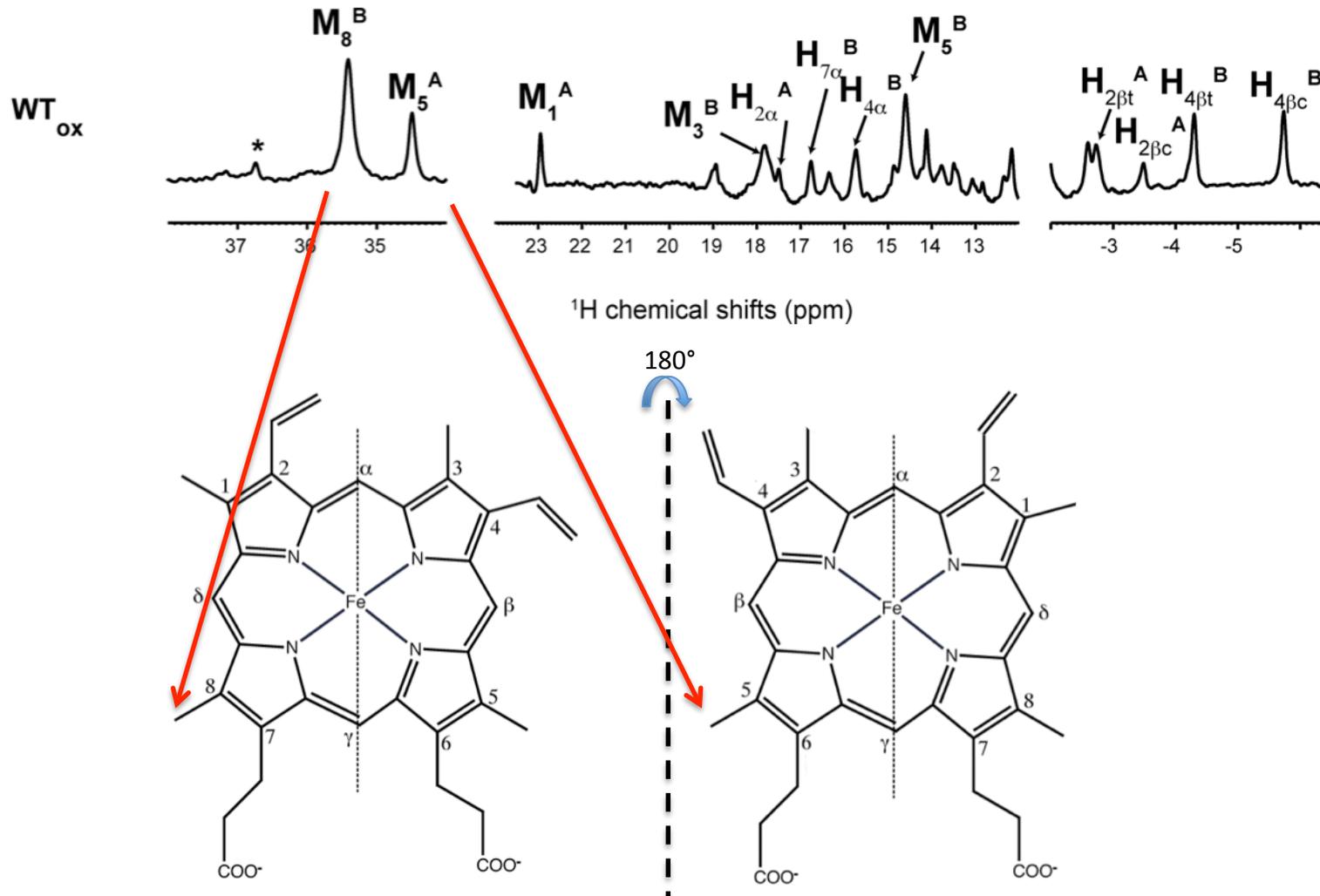


# Neuroglobin: une hémoprotéine



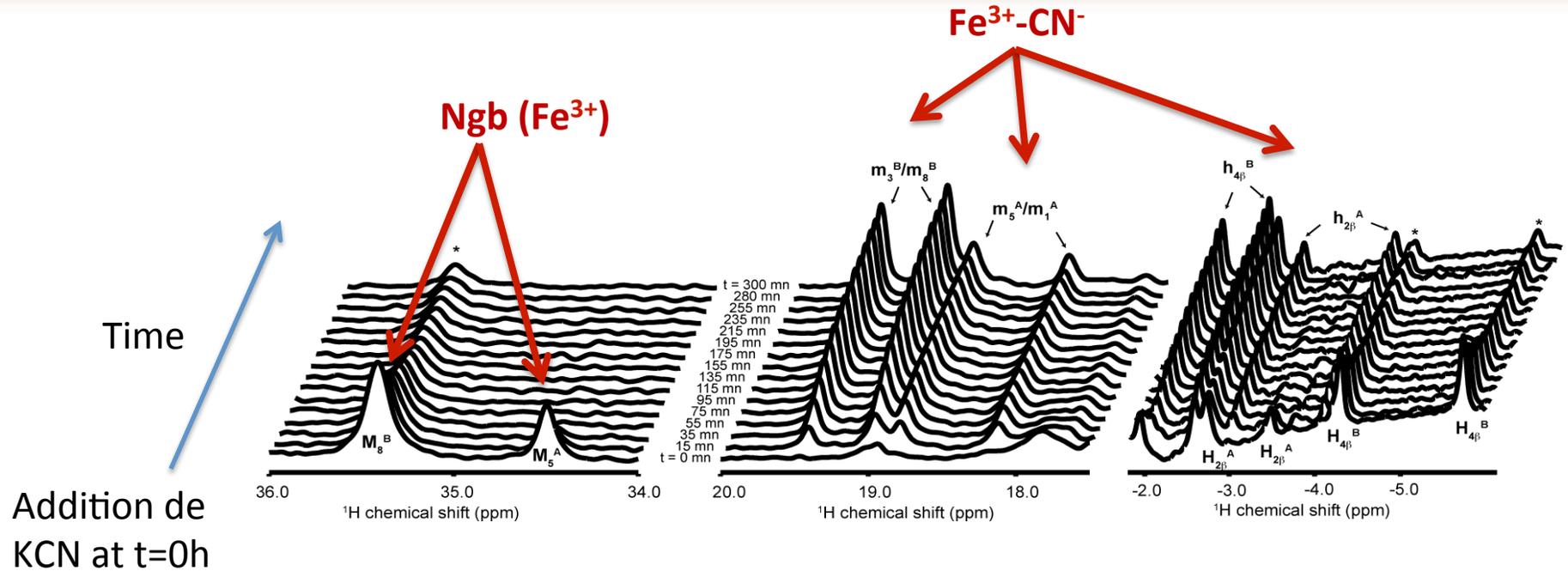
Hème B est presque symétrique

# Neuroglobine: deux orientations dans la poche



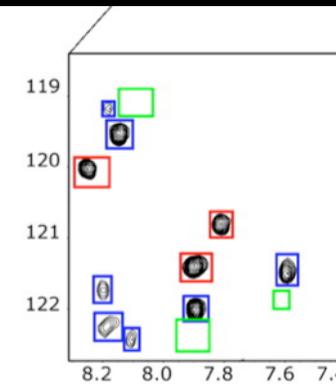
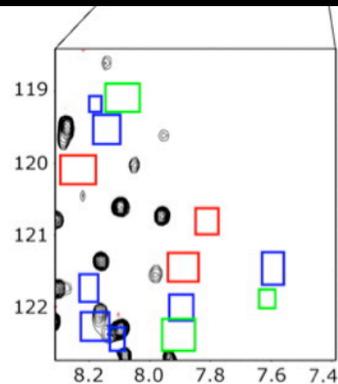
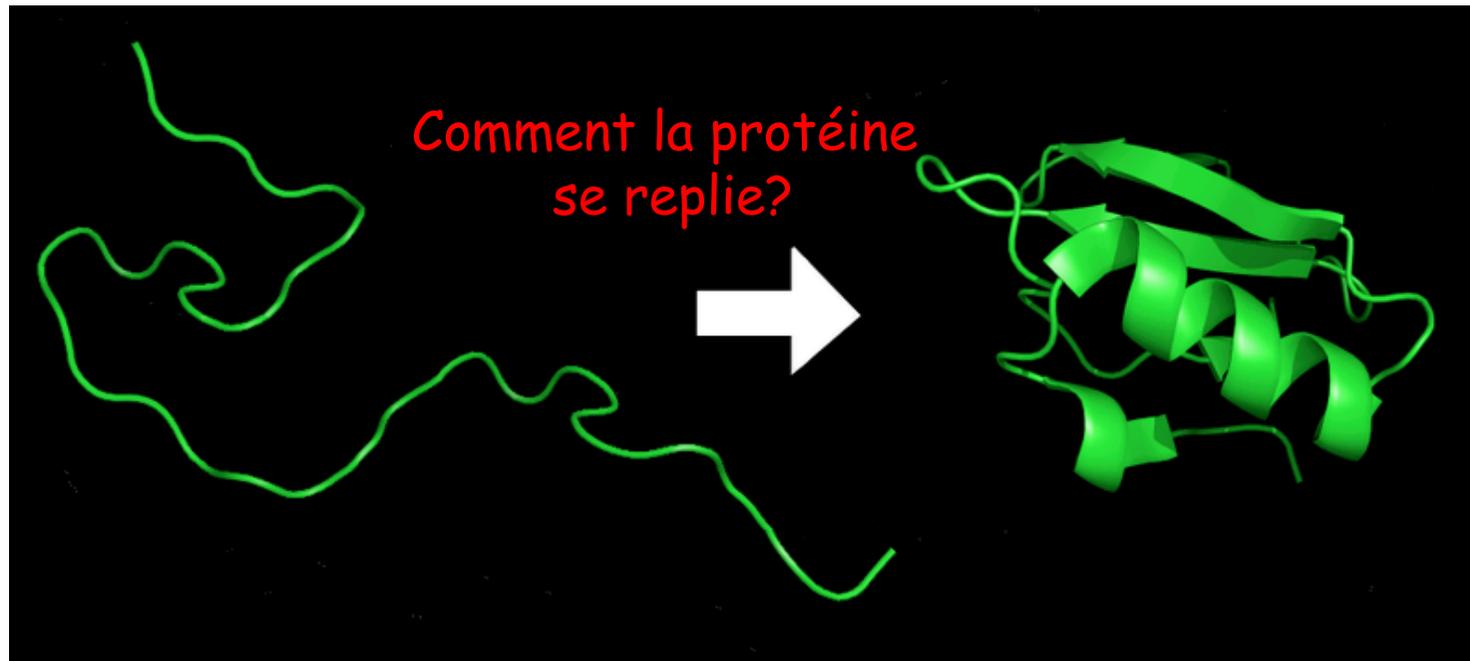
Les deux orientations de l'hème (A et B) sont présentes dans la neuroglobine

# Liaison de $CN^-$ à la neuroglobine



La forme minoritaire A lie CN<sup>-</sup> 5 fois plus vite que la forme majoritaire

Exemple: le chemin de repliement (folding) de la  $\beta_2$ -Microglobulin

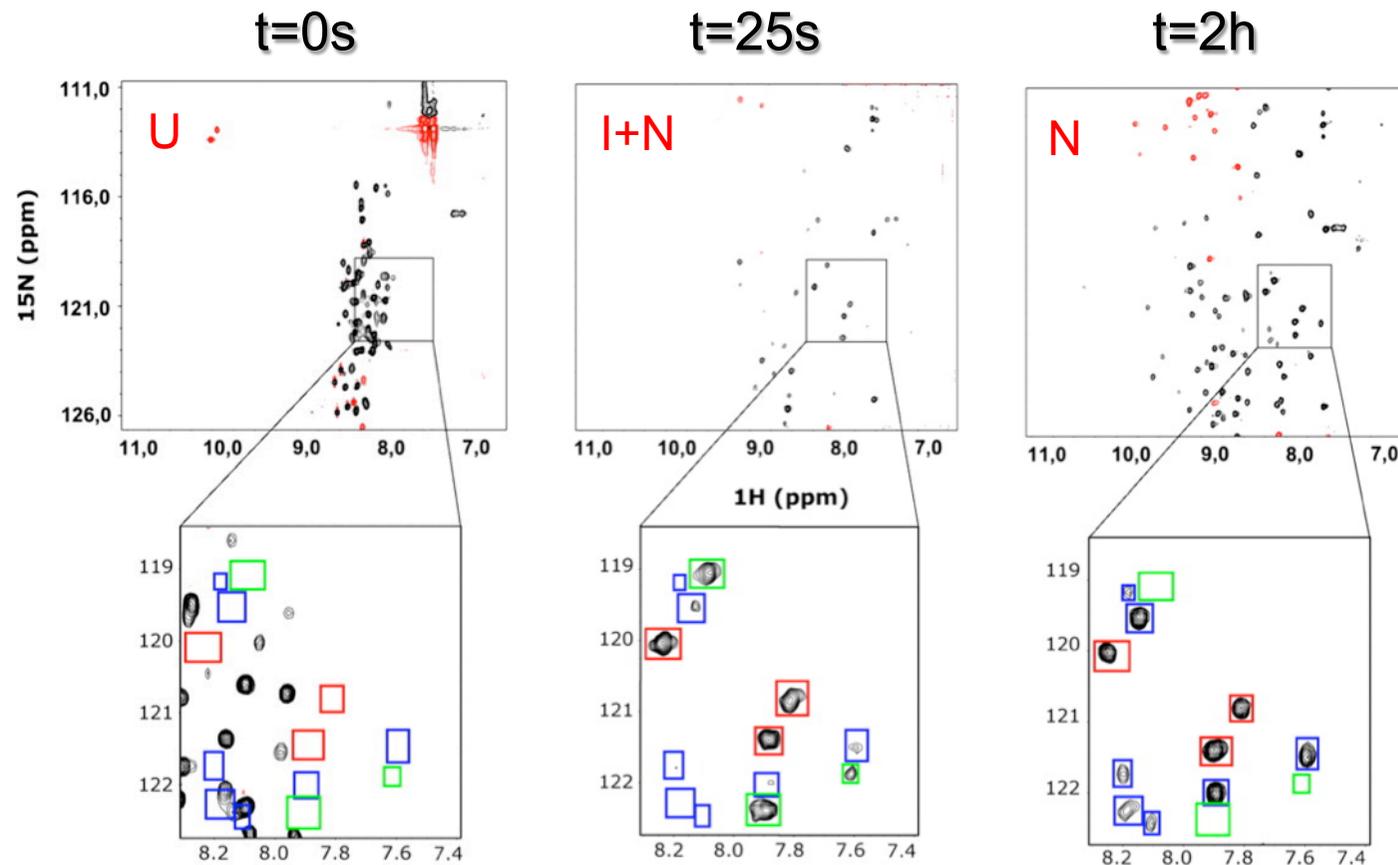


# Refolding suivi en temps réel

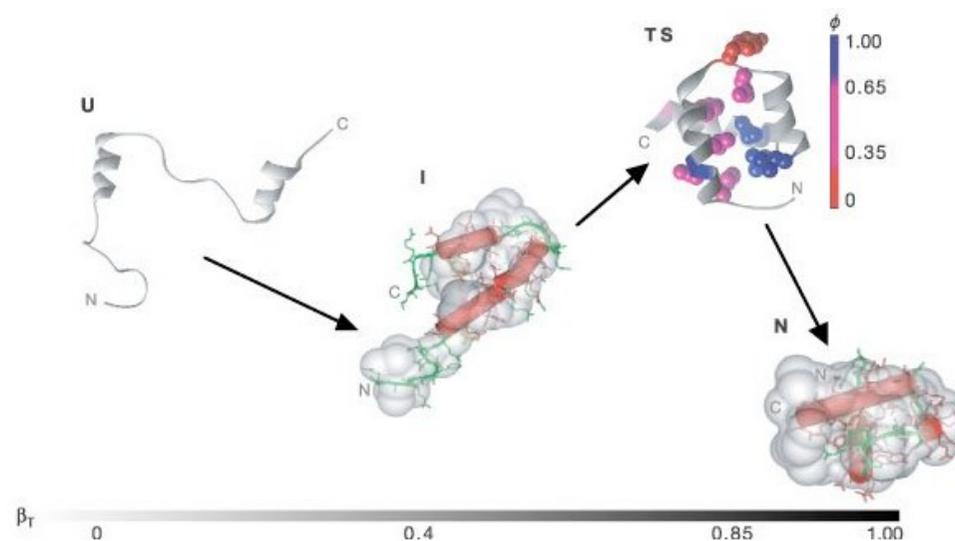
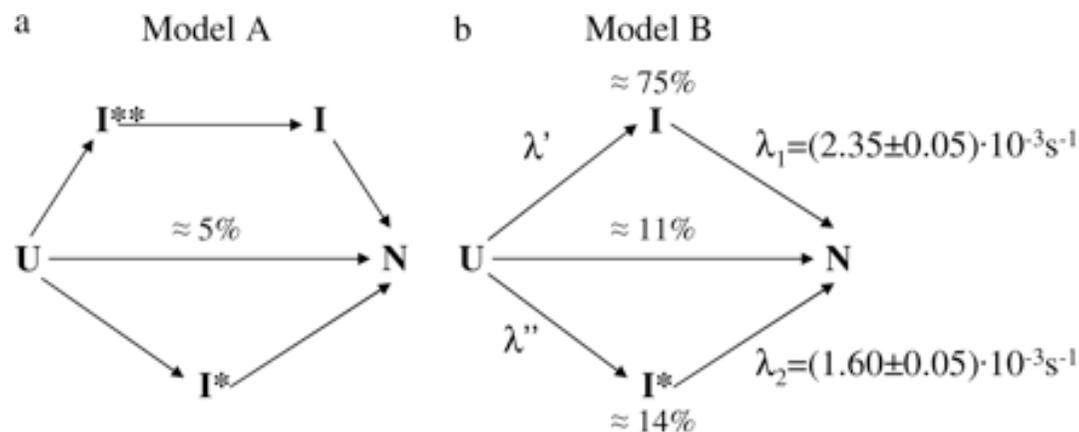
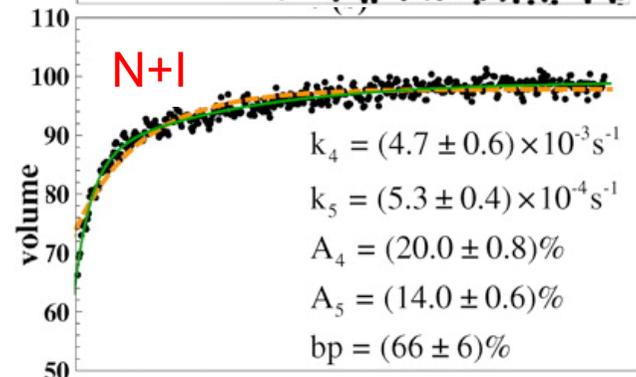
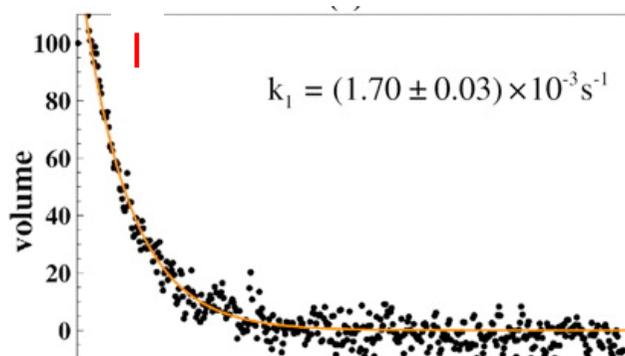
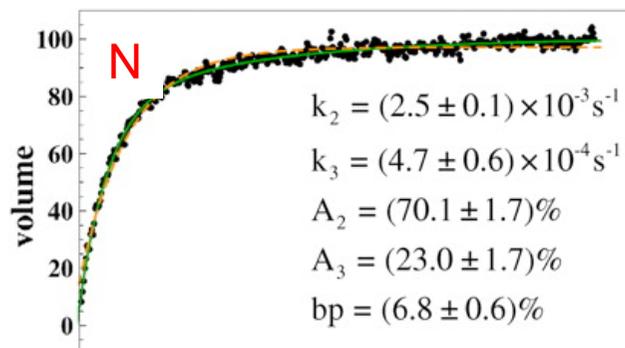
La protéine est initialement à pH 2.2

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

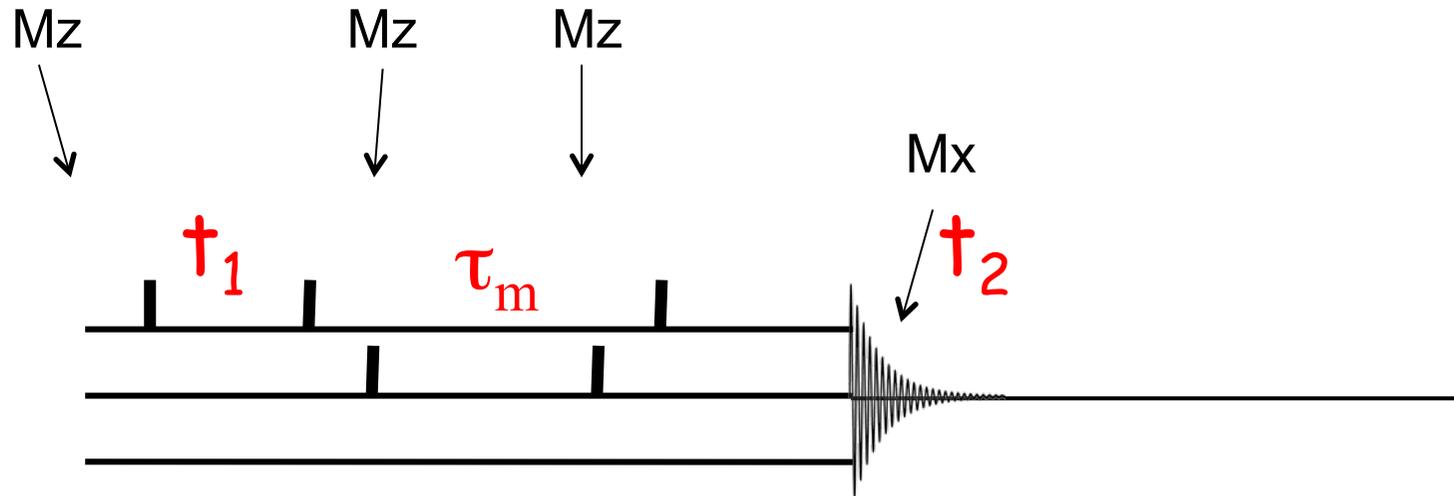
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide:  $\mu$ s-ms

et finalement rapide: ps-ns

# Stockage d'aimantation



L'aimantation peut être stockée pendant la séquence d'impulsion dans un état  $M_\rho$  pendant une durée  $\tau_m$  puis reconvertie en  $M_x$  pour la détection

Tout phénomène dynamique ayant lieu pendant  $\tau_m$  peut être étudié.  
 La durée maximale  $\tau_m$  dépend de la durée de vie de  $M_\rho$  (et donc de sa relaxation)

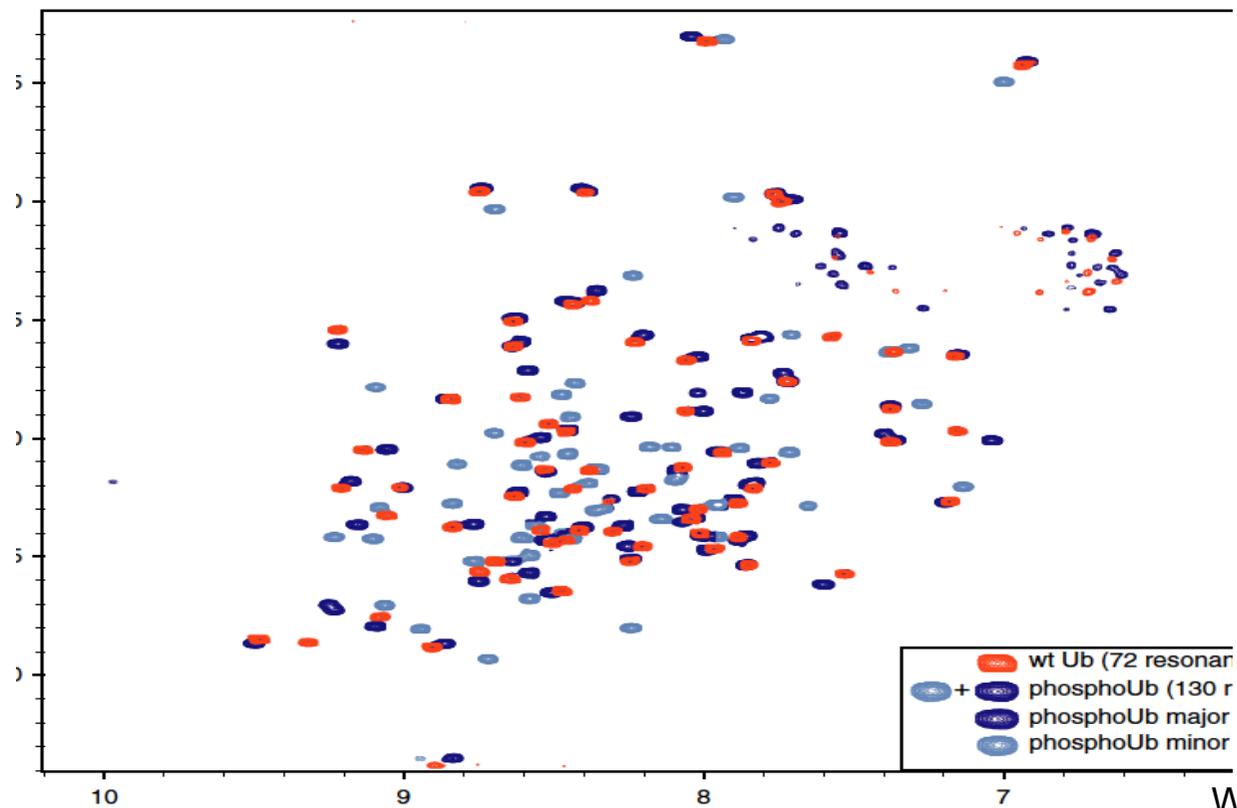
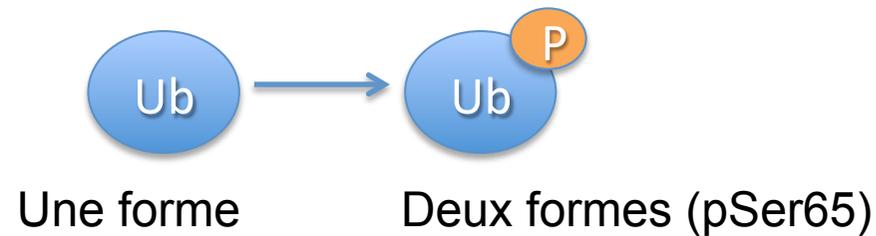
Pour des protéines:

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

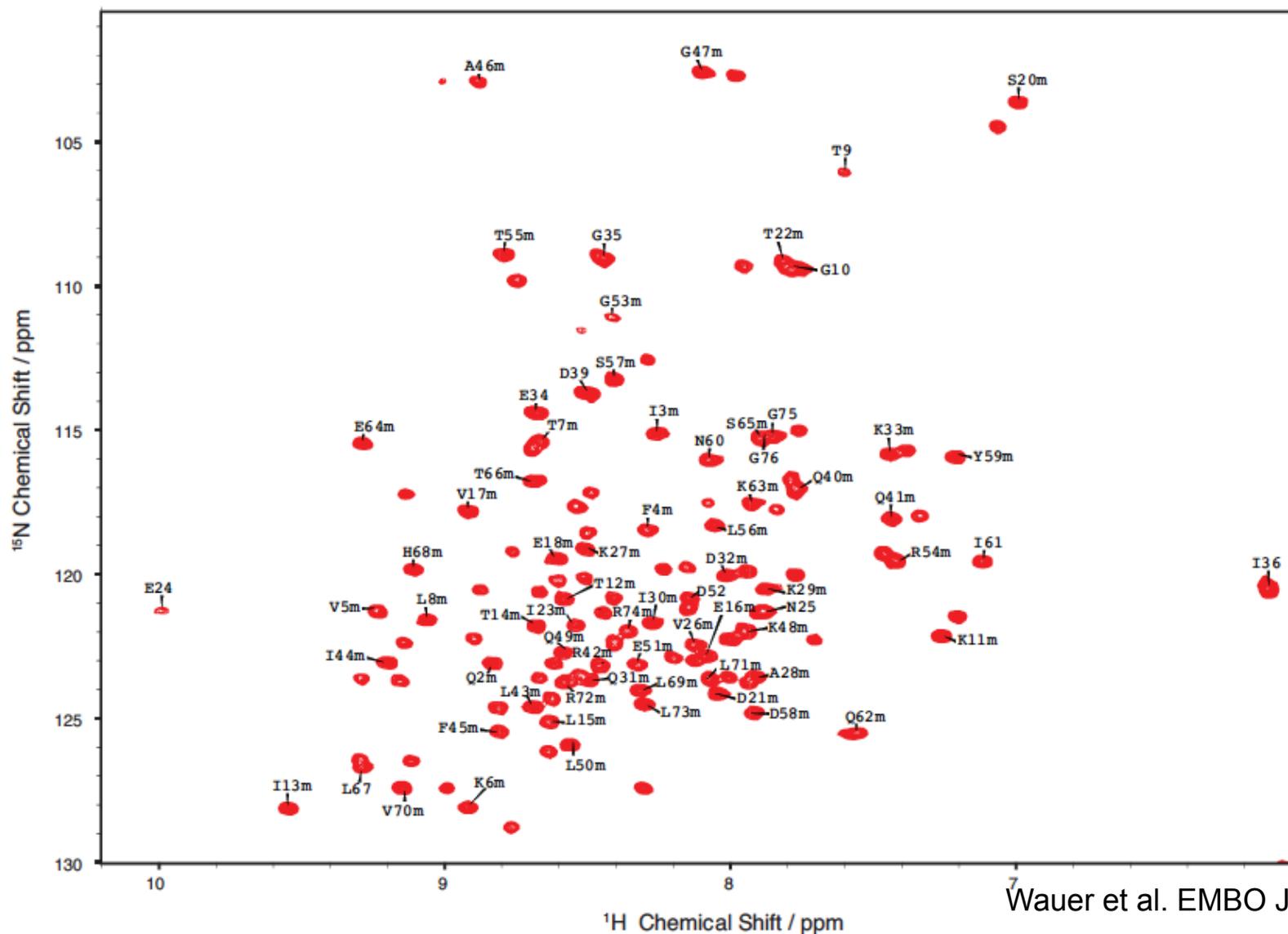
$$T_2 (^1\text{H}) \sim T_2 (^{15}\text{N}) \sim 10\text{-}100\text{ms}$$

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

# Echange lent entre deux conformations

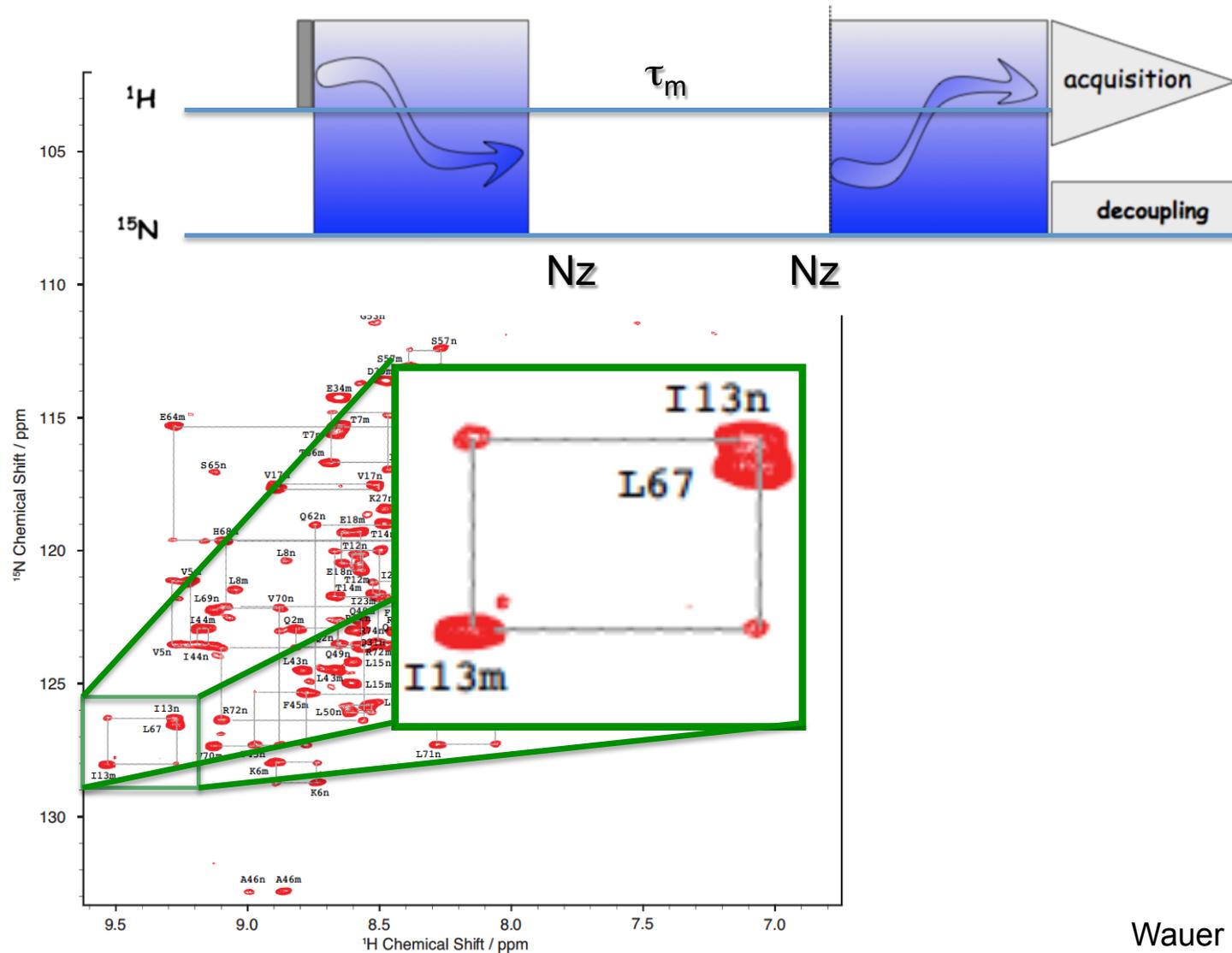


# Echange lent entre deux conformations

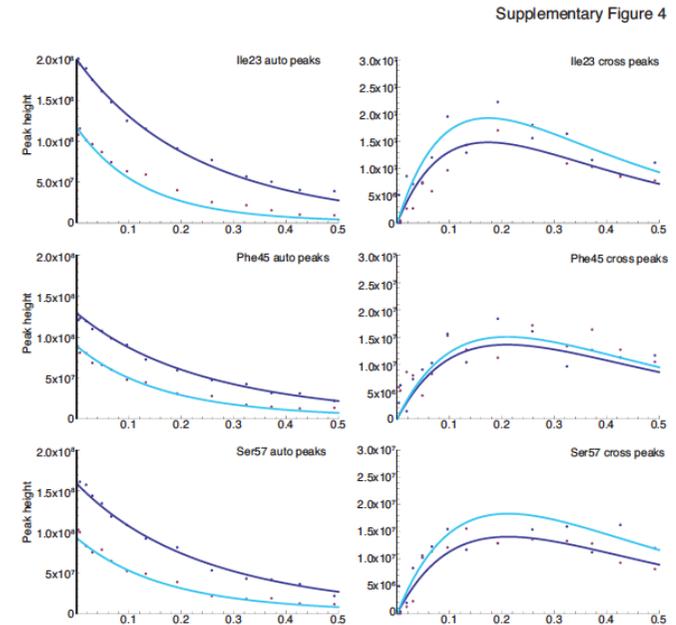
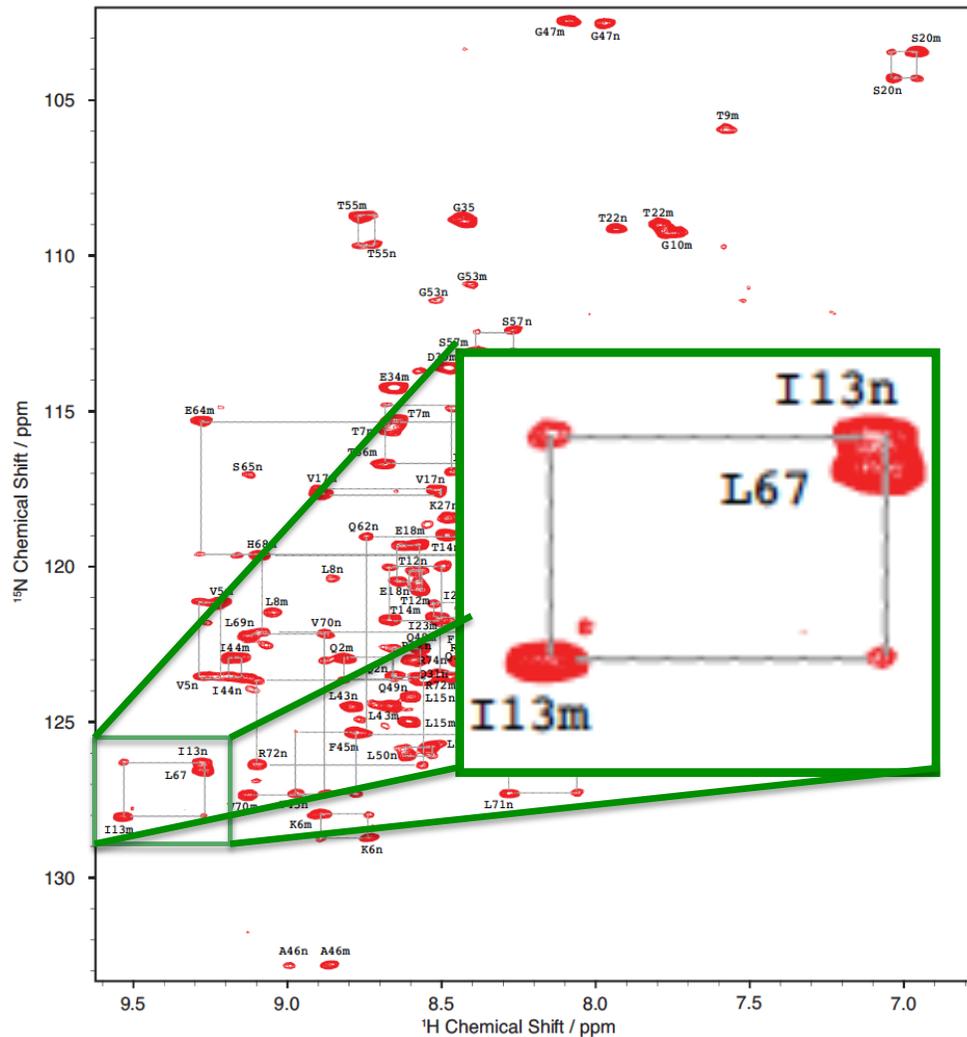


# Spectroscopie d'échange ZZ

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



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



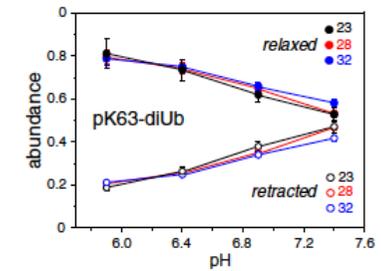
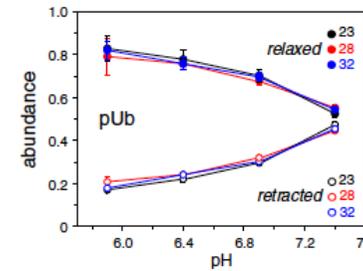
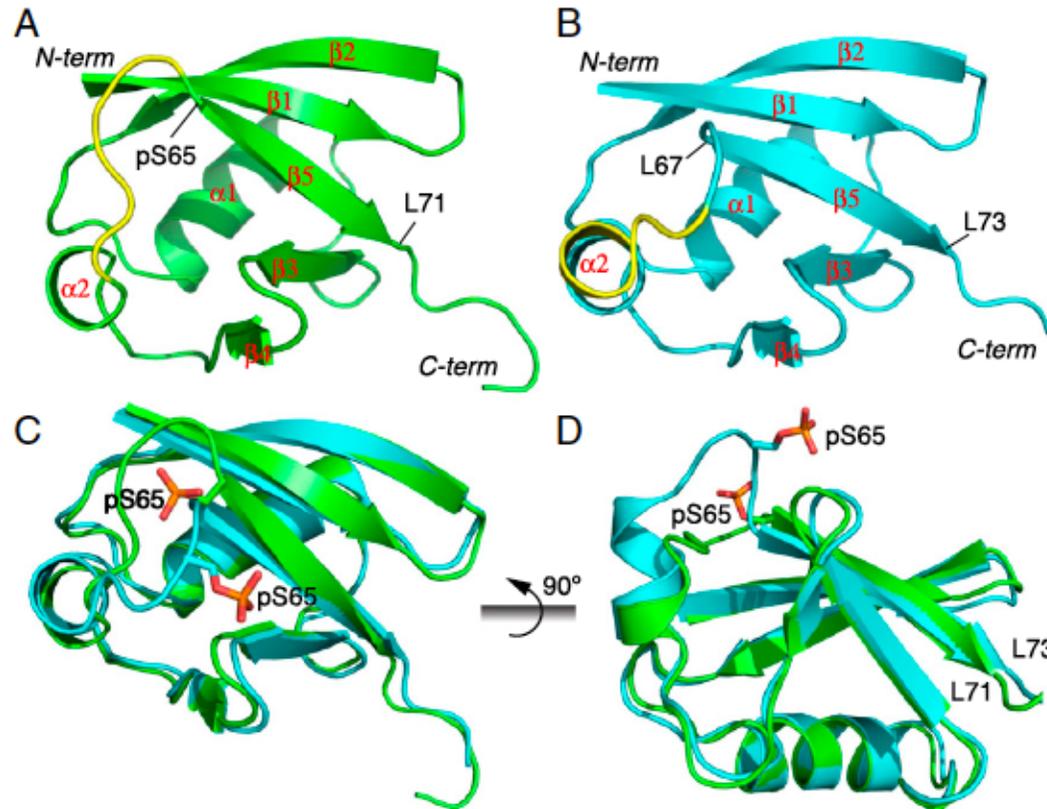
$$k_{\text{ex}} = 2\text{s}^{-1}$$

# Détermination des deux structures en échange

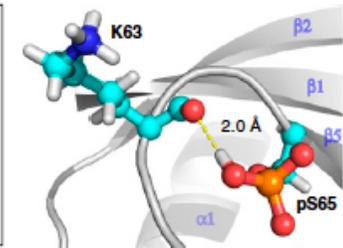
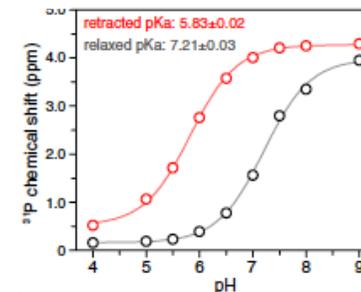
Forme relâchée  
Similaire à Ub non phosphorylée

Forme reTRACTÉE

L'équilibre dépend du pH



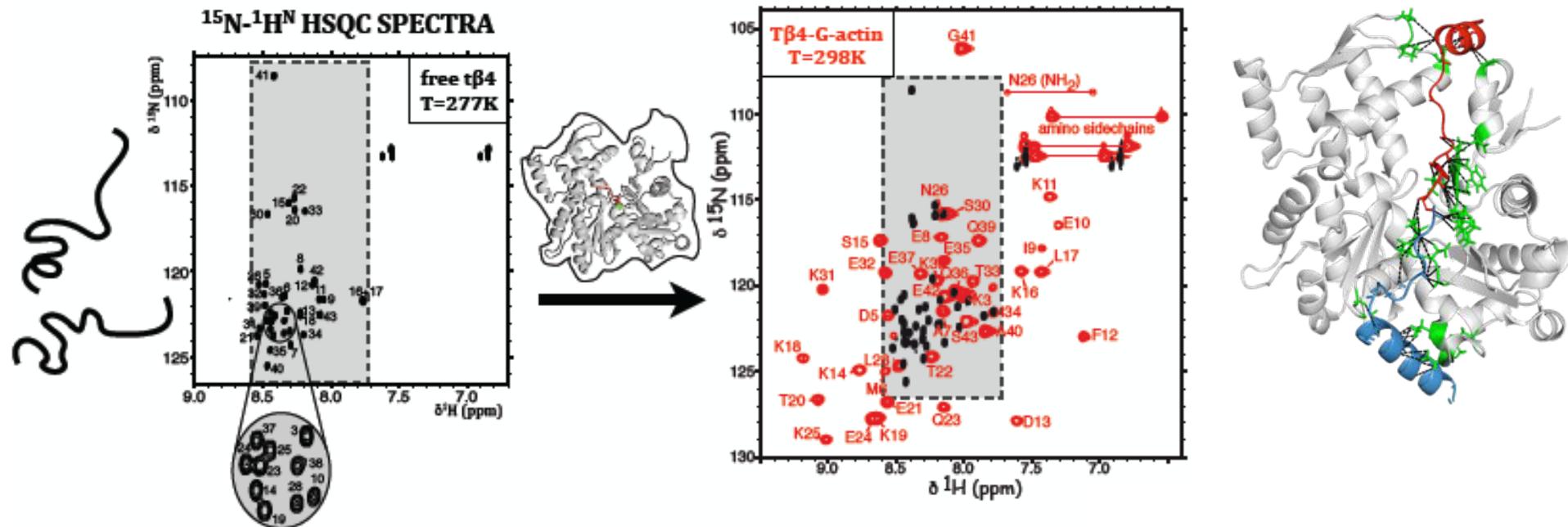
Le pKa de la pSer65 est différent dans les deux structures



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

# Folding upon binding

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

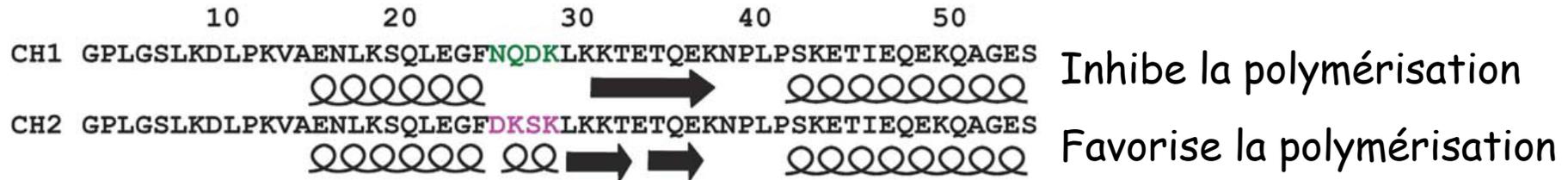


Peptide seul : complètement destructuré

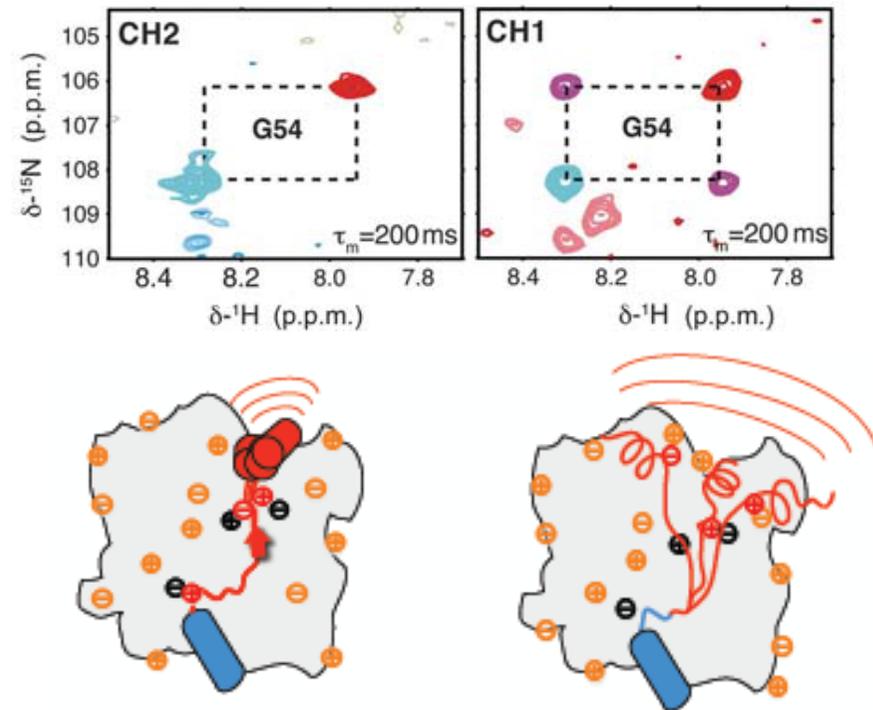
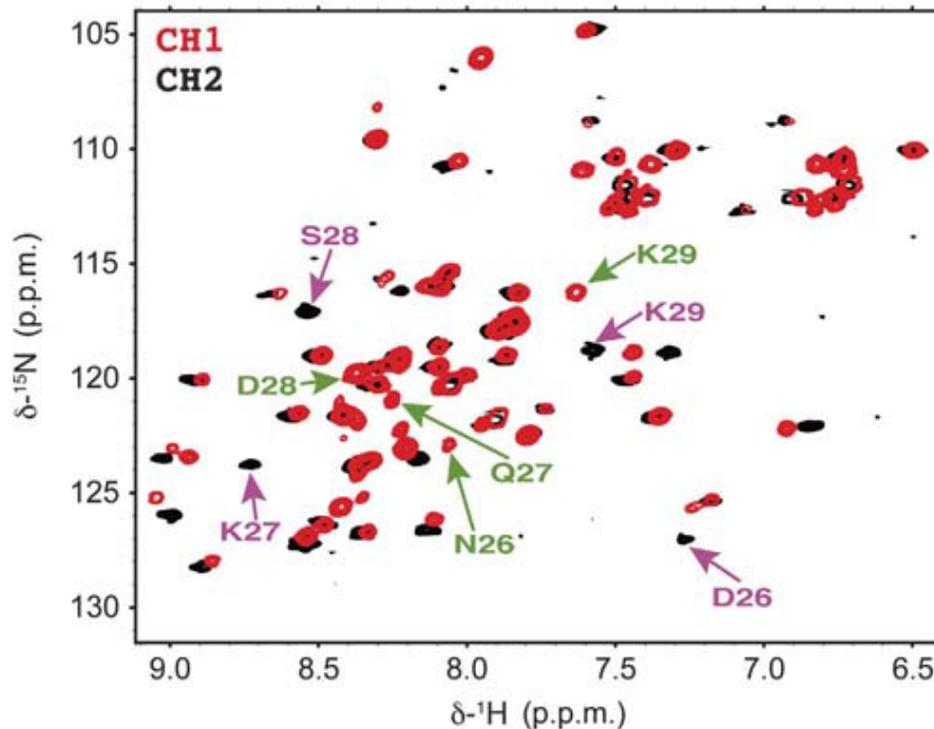
Peptide en complexe avec l'actine F: adopte une structure en deux hélices  $\alpha$

# Folding upon binding

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

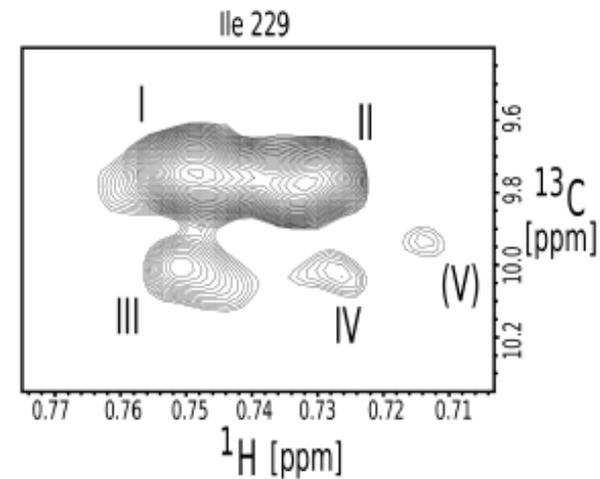
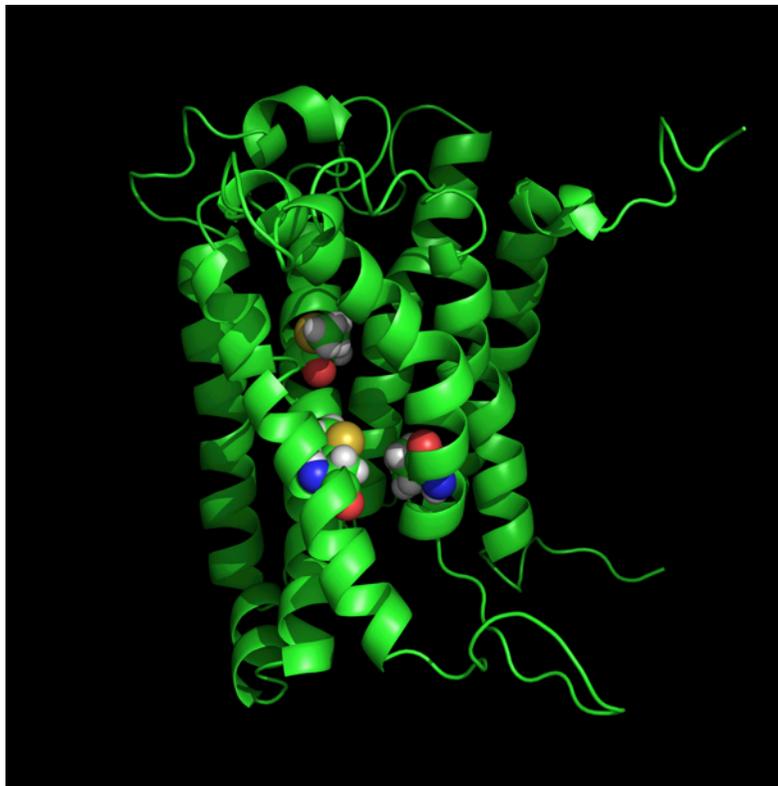


Mêmes spectres donc mêmes structures ... mais ... de dynamique différente



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

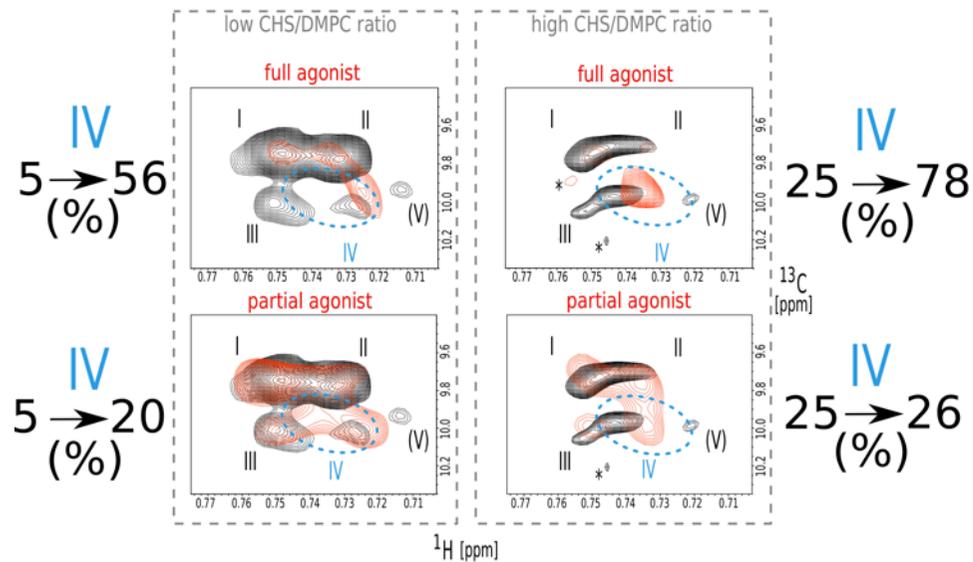
On s'attend à un seul signal dans le spectre  $^{13}\text{C}$  HSQC



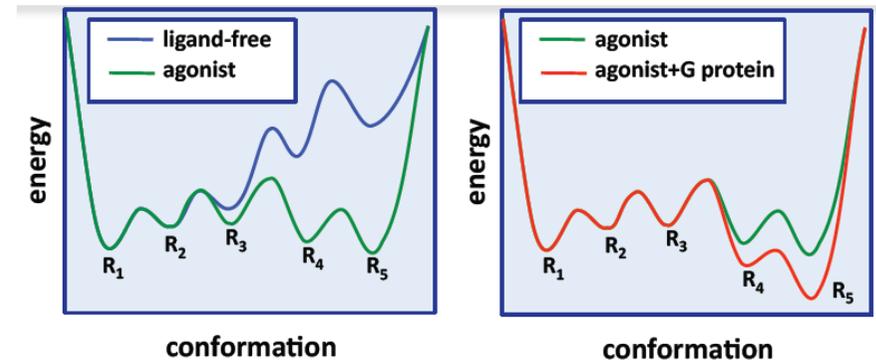
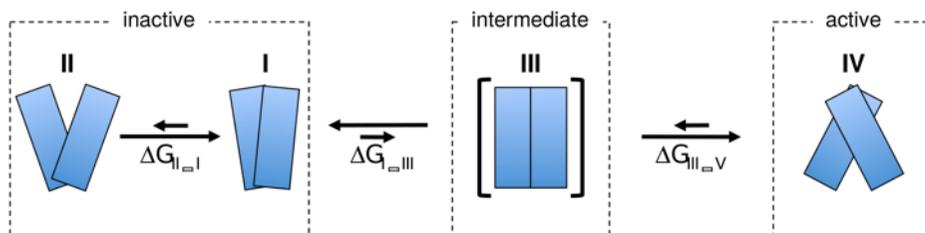
5 pics = 5 états conformationnels en échange lent  
Intensité = population

# 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

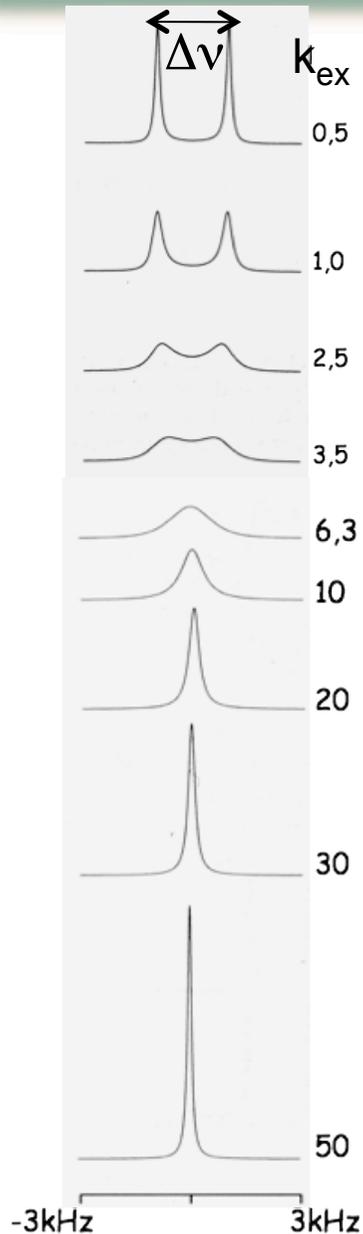
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide:  $\mu$ s-ms

et finalement rapide: ps-ns

# L'échange $\mu$ 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:

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

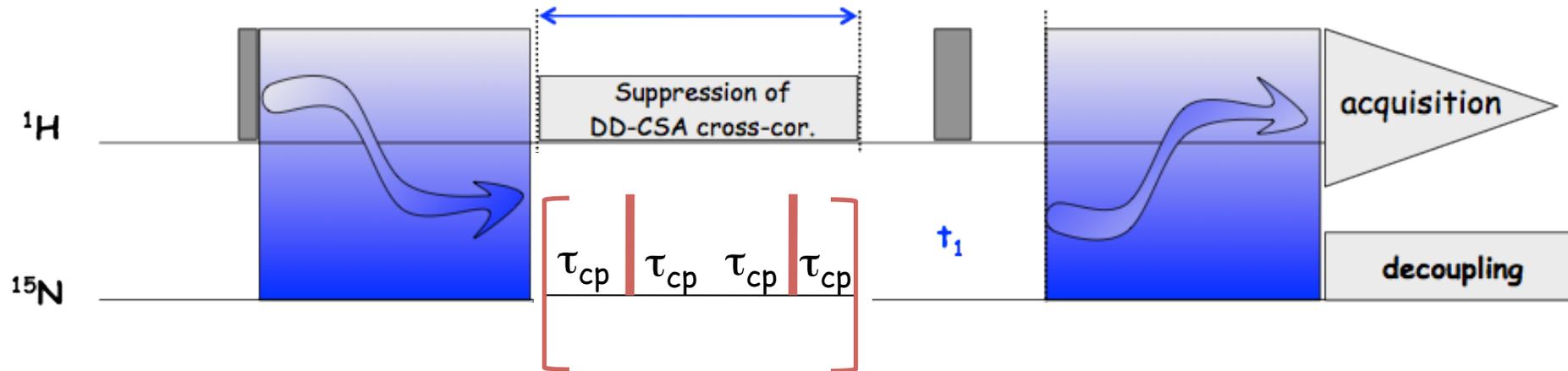
Terme additionnel  
induit par l'échange

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

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

Echange rapide  
Raie unique (moyennée)

# Expériences pour détecter les échanges $\mu$ s-ms



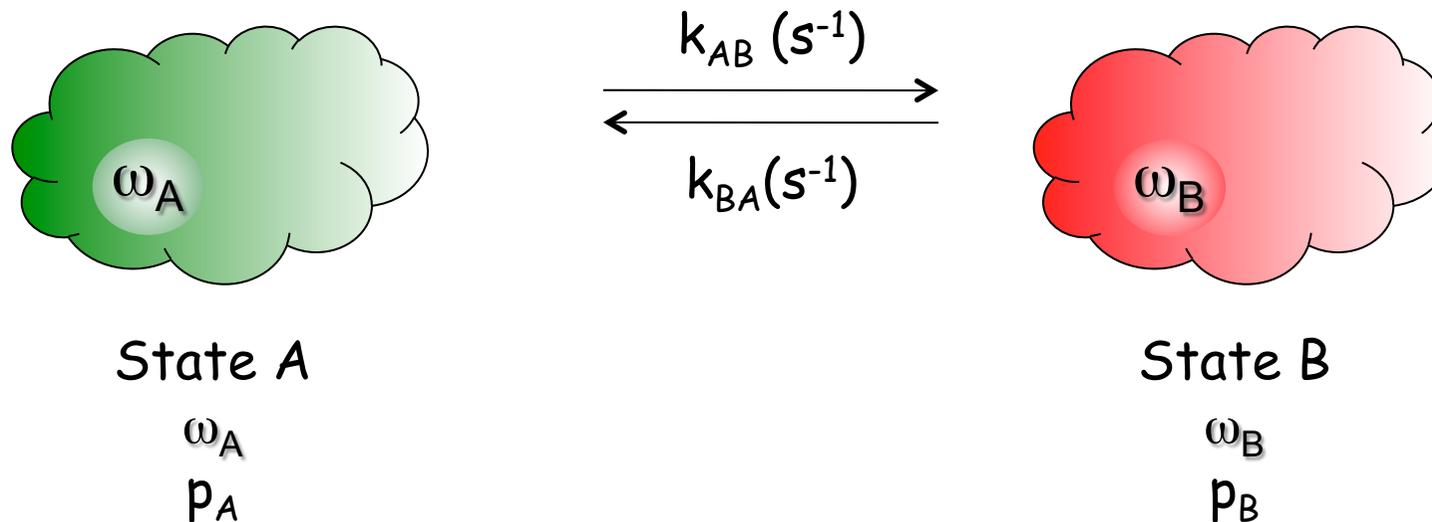
La contribution d'échange ( $R_{ex}$ ) peut être réduite par l'application d'une séquence spécifique CPMG ou spin-lock ( $T1\rho$ ):

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

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

# Experiences pour détecter les échanges ms

Dans le cas de dispersion de relaxation (CPMG)



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

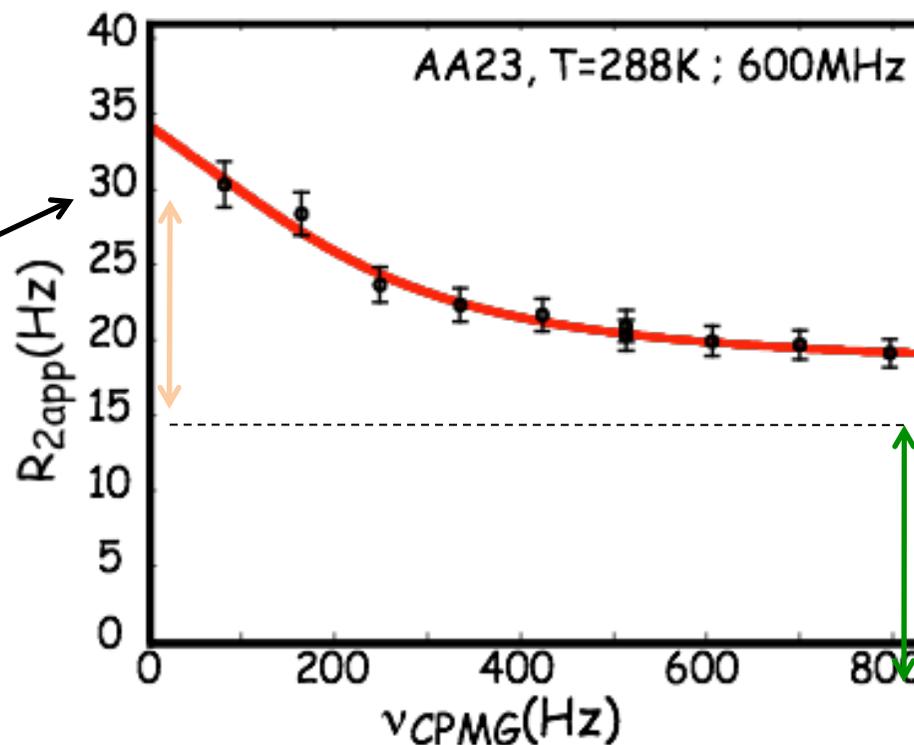
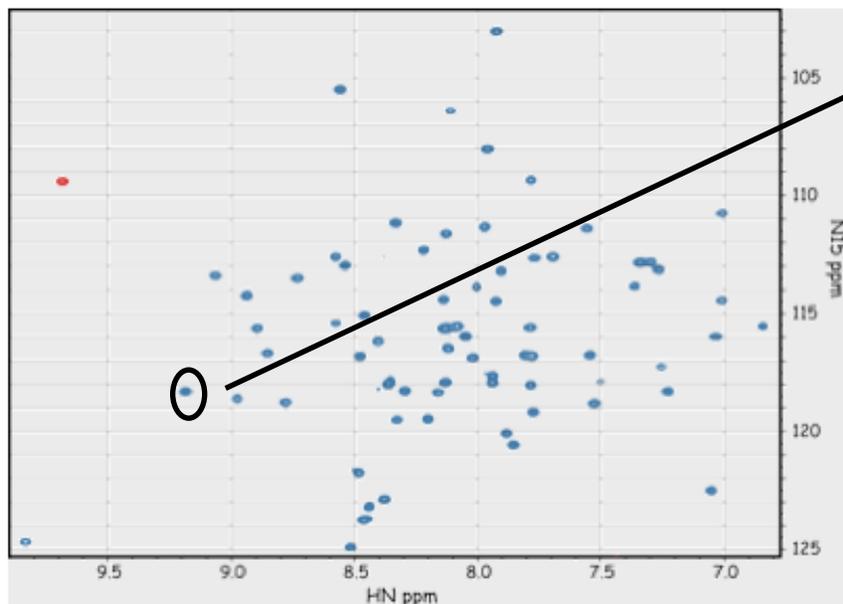
$$\frac{1}{\tau_{ex}} = k_{ex} = k_{AB} + k_{BA}$$

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

Accès à :

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

# Expériences pour détecter les échanges ms



$$\tau_{ex} \sim 0,7 \pm 0,2 \text{ ms}$$

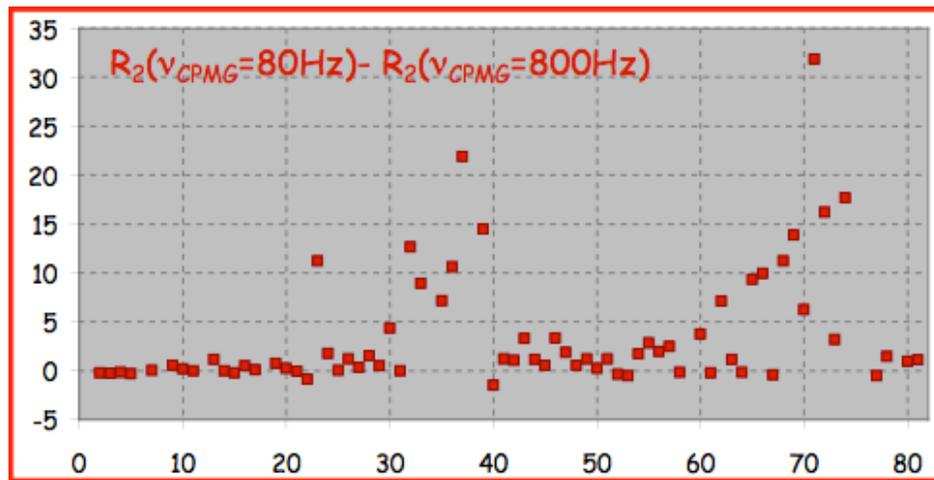
$$\Delta\delta = 1,0 \pm 0,5 \text{ ppm}$$

$$\tau_{ex} = 0.7 \text{ ms}$$

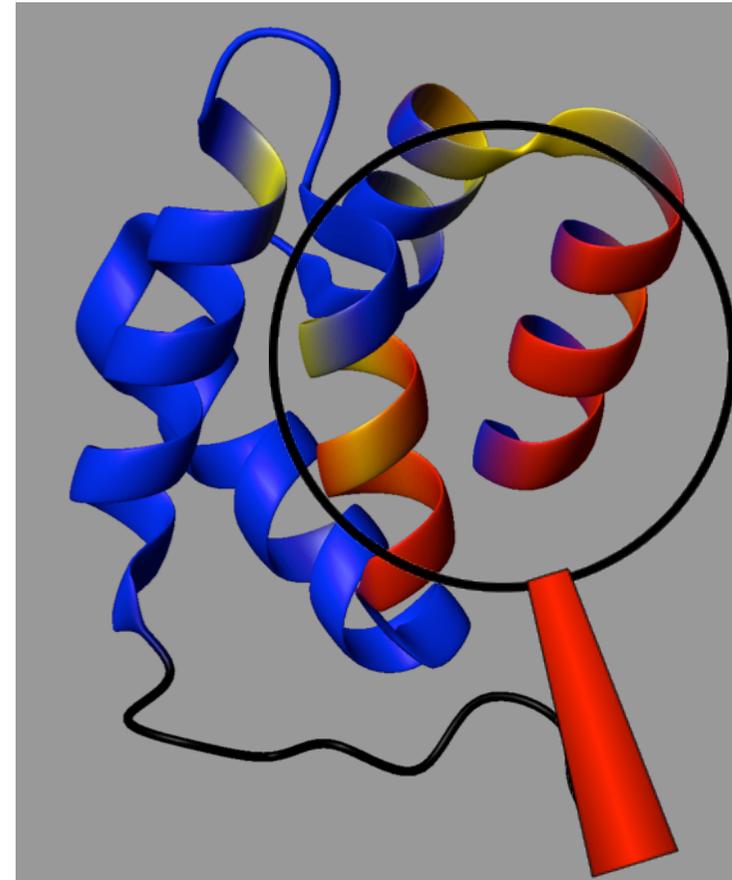
$$\Delta\omega = 1 \text{ ppm}$$

$$p_B = 5\% / p_A = 95\%$$

# Exemple: le cas de l'annexine

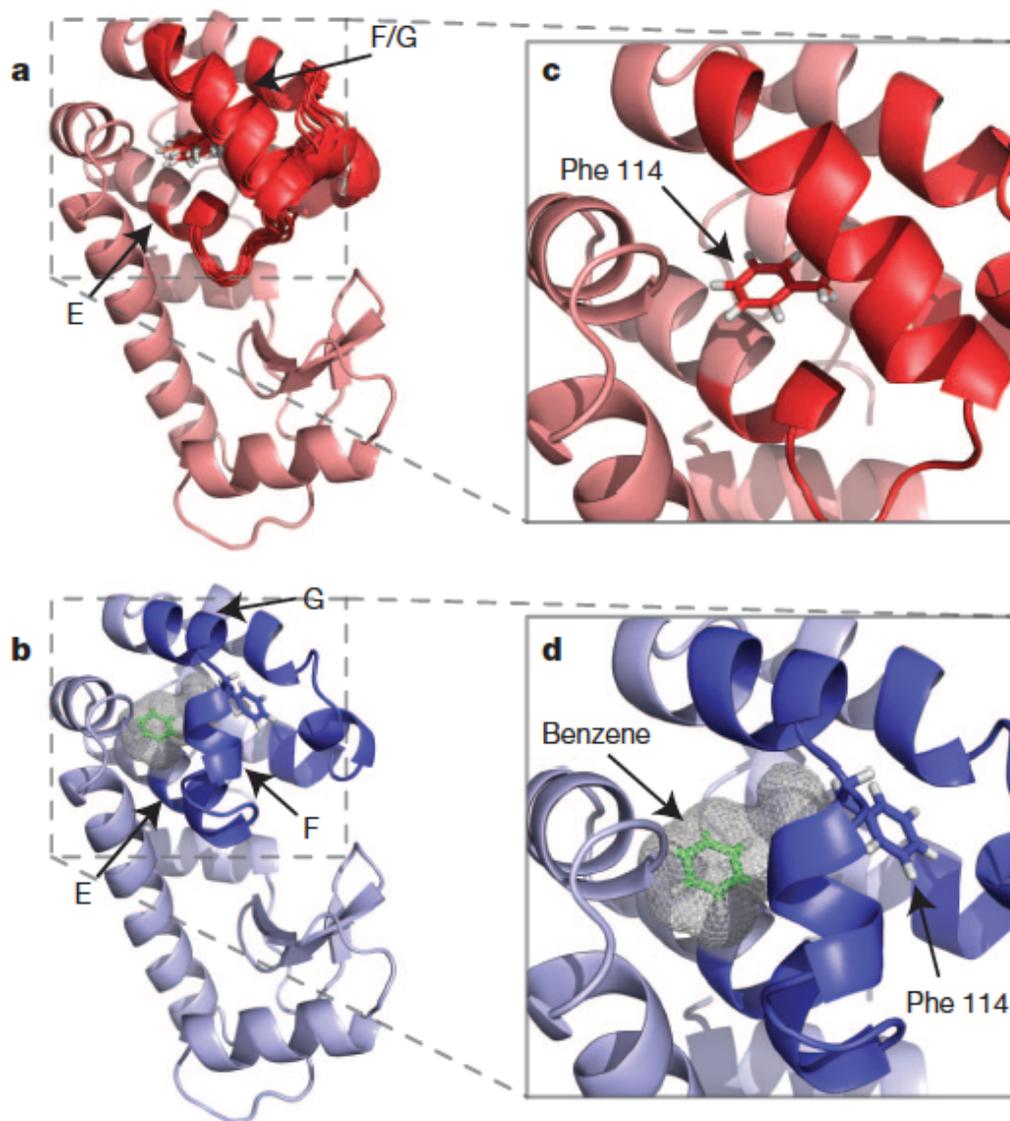


Residue number



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

# Structure haute résolution d'un état excité



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

Voir Journal Club

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

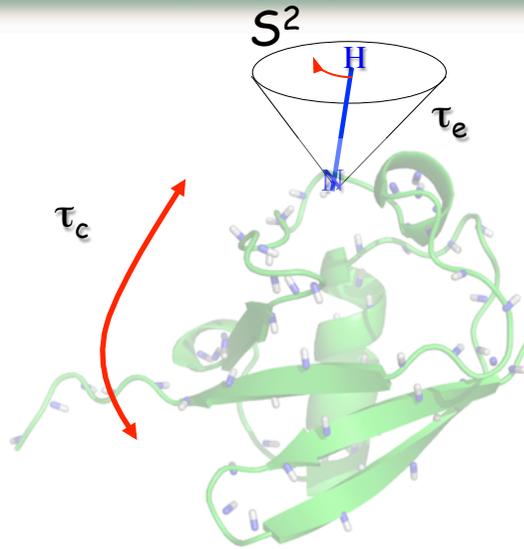
Des échelles très lentes : s-jour- an

à intermédiaire lent: ms-s

à intermédiaire rapide:  $\mu$ s-ms

et finalement rapide: ps-ns

# Réorientation moléculaire et mouvements internes



$\tau_c$  : 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

$\tau_e$ : temps de corrélation des mouvements internes

Le temps de corrélation  $\tau_c$  décrit la réorientation moléculaire

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

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

Equation de Stokes-Einstein

$\eta^*$  : viscosité du milieu,  $k_B$  : constante de Boltzmann,  $T$  : température

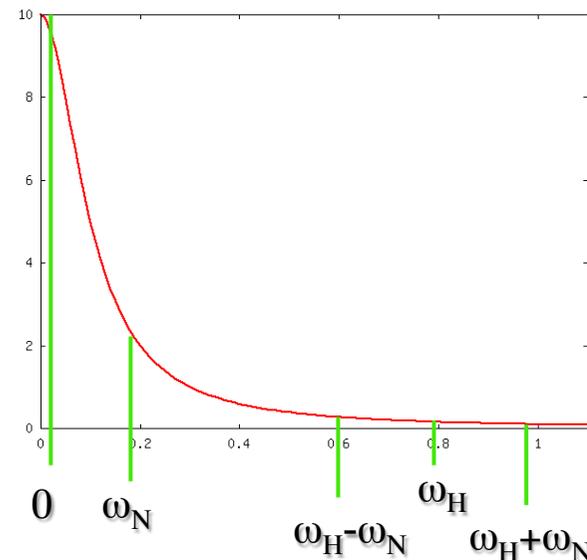


# Relaxation et densité d'énergie $J(\omega)$

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

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

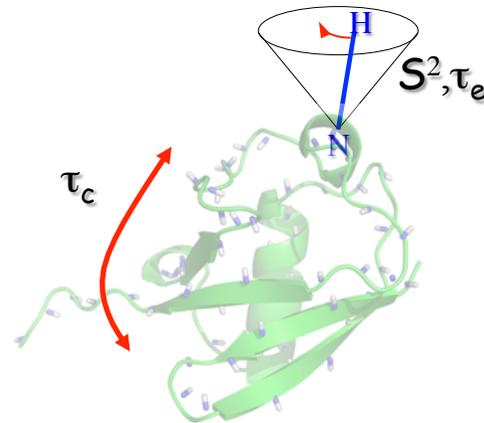
Fonction densité spectrale  
 $J(\omega)$  (ns)



$\omega$  ( $10^9$  rad/s)

$^{15}\text{N}$   $R_1$ ,  $R_2$  et NOE dépendent des mouvements aux fréquences  $0$ ,  $\omega_H$  et  $\omega_N$   
 soit  $\sim 1000$  MHz (ns) et  $\sim 100$  MHz (10ns)

# Approche model-free



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



Estimation de  $\tau_c$  à  
 partir de  $R_2/R_1$

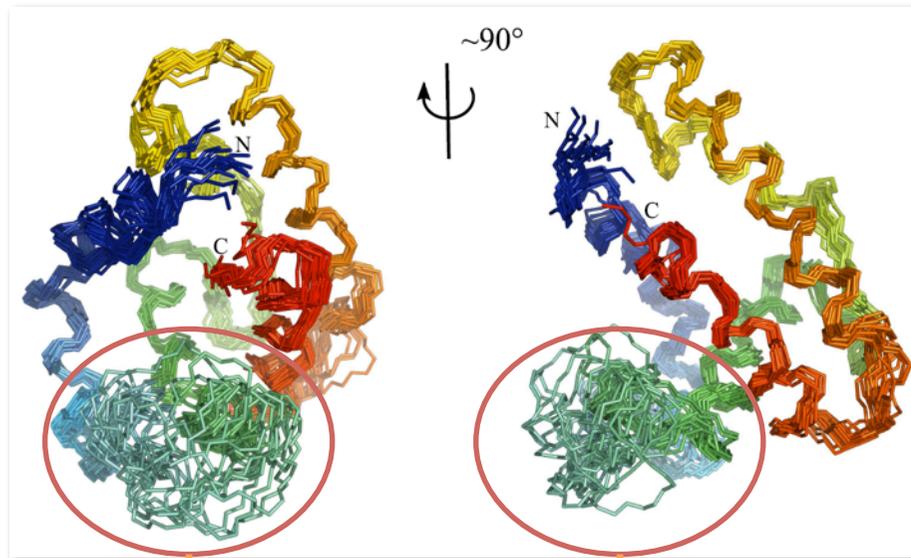
$$\tau_c = \frac{1}{2\omega_N^2} \sqrt{\frac{6R_2}{R_1} - 7}$$

Détermination de la  
*réorientation globale*  
 (éventuellement  
 rotation anisotrope)

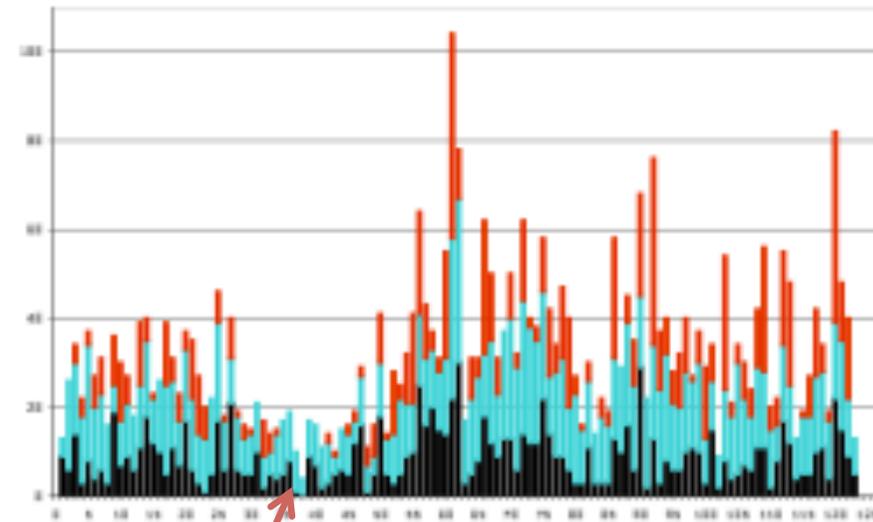


Extraction de paramètres  
 $S^2$ ,  $\tau_e$ ,  $R_{ex}$  en ajustant les  
 données expérimentales

Détermination de la  
*mobilité locale*  
 (formalisme model-  
 free)



Nombre de NOE/résidu

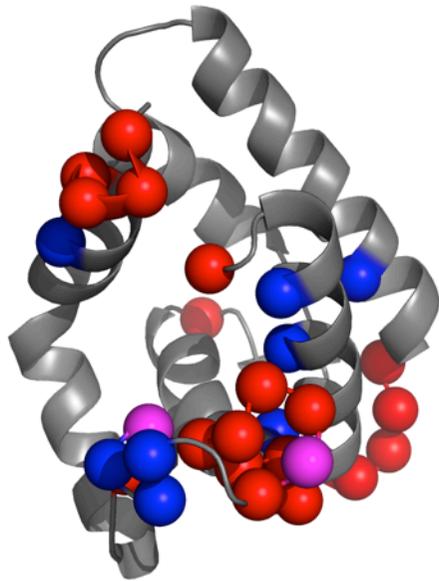


Residue number

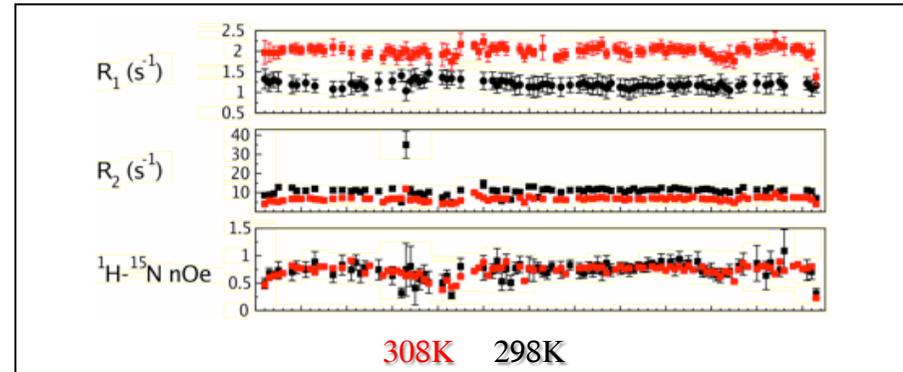
La grande dispersion structurale de la boucle est liée au faible nombre de contraintes

Vraie dynamique interne ou problème expérimental?

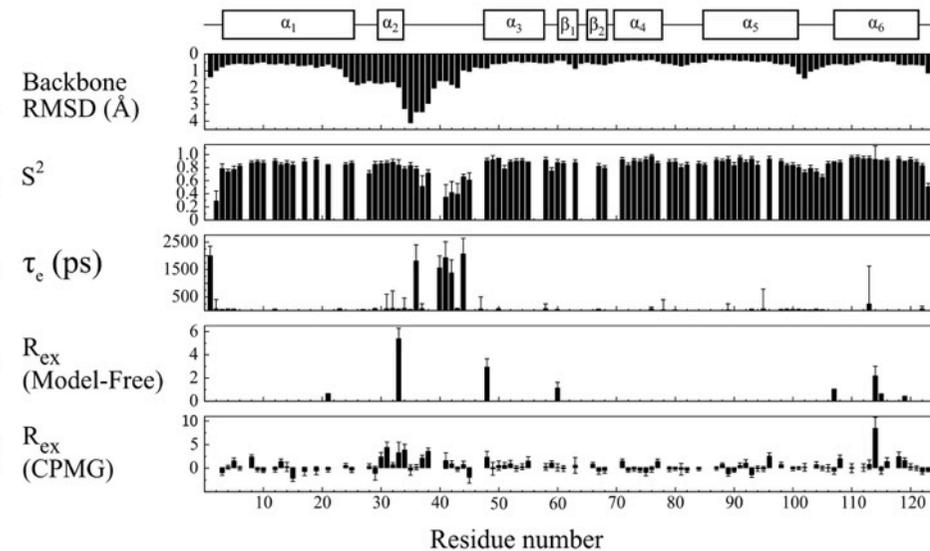
# ASP2: une protéine de liaison aux odeurs



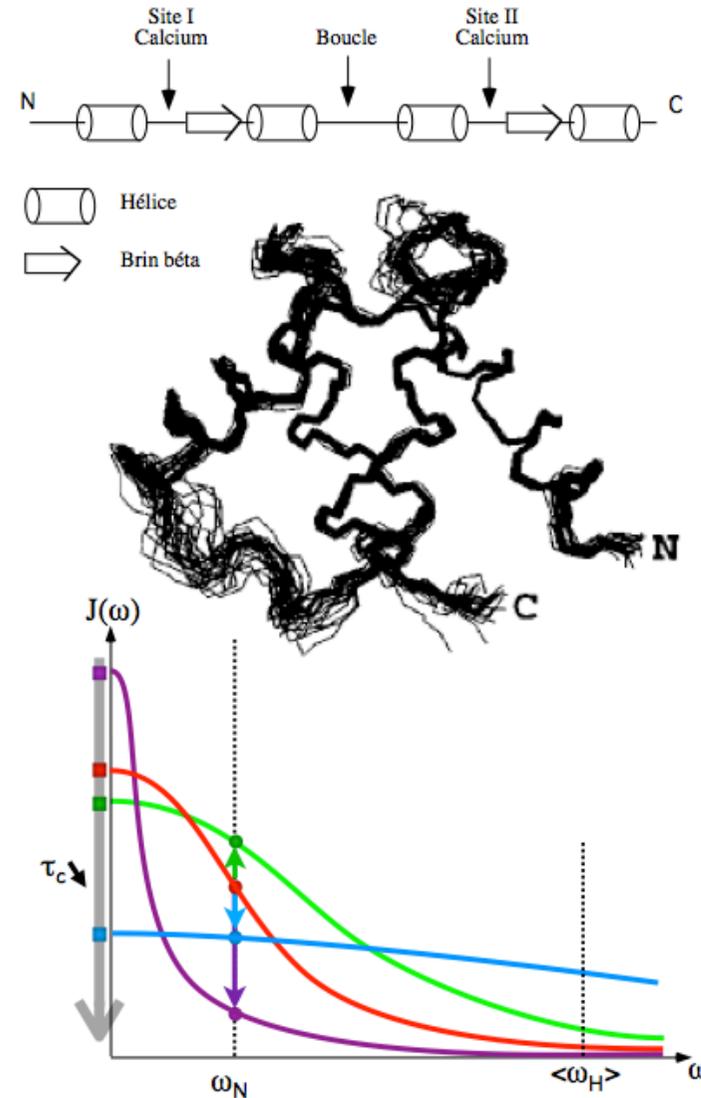
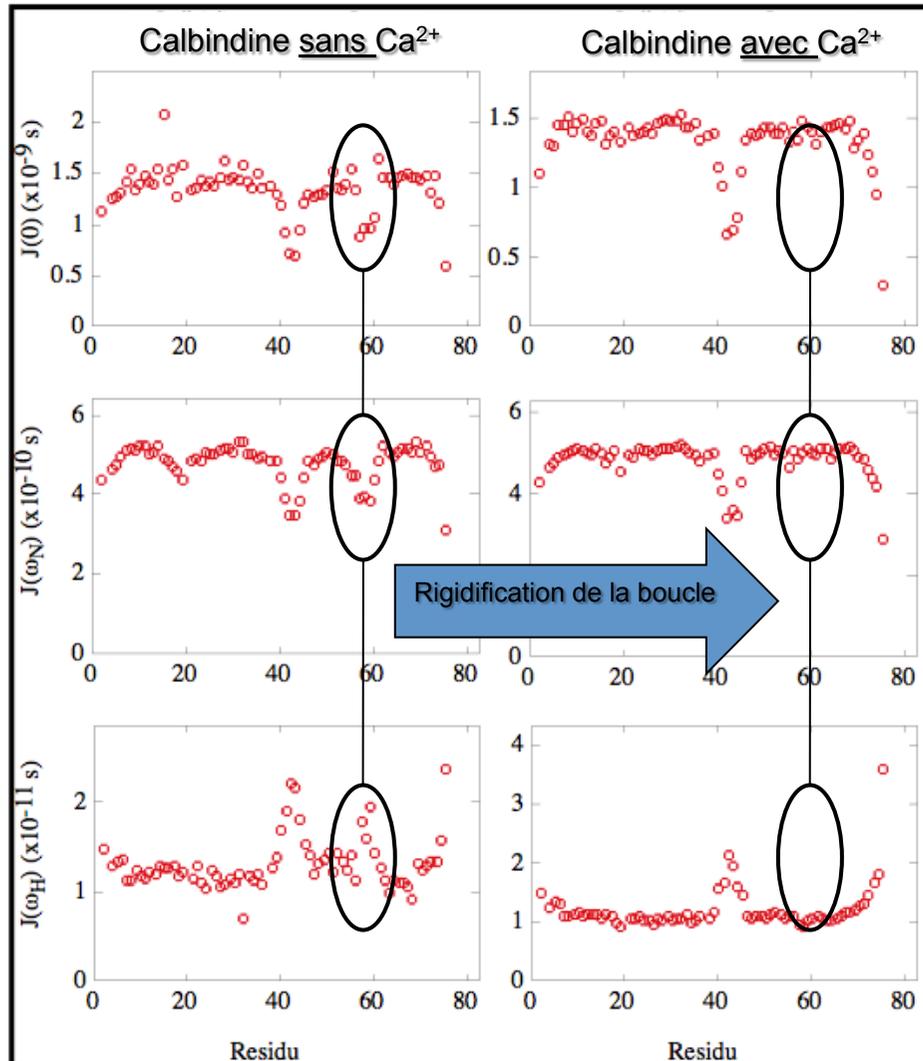
bleu: ms (CPMG)  
rouge: ps-ns (R1, R2, NOE)



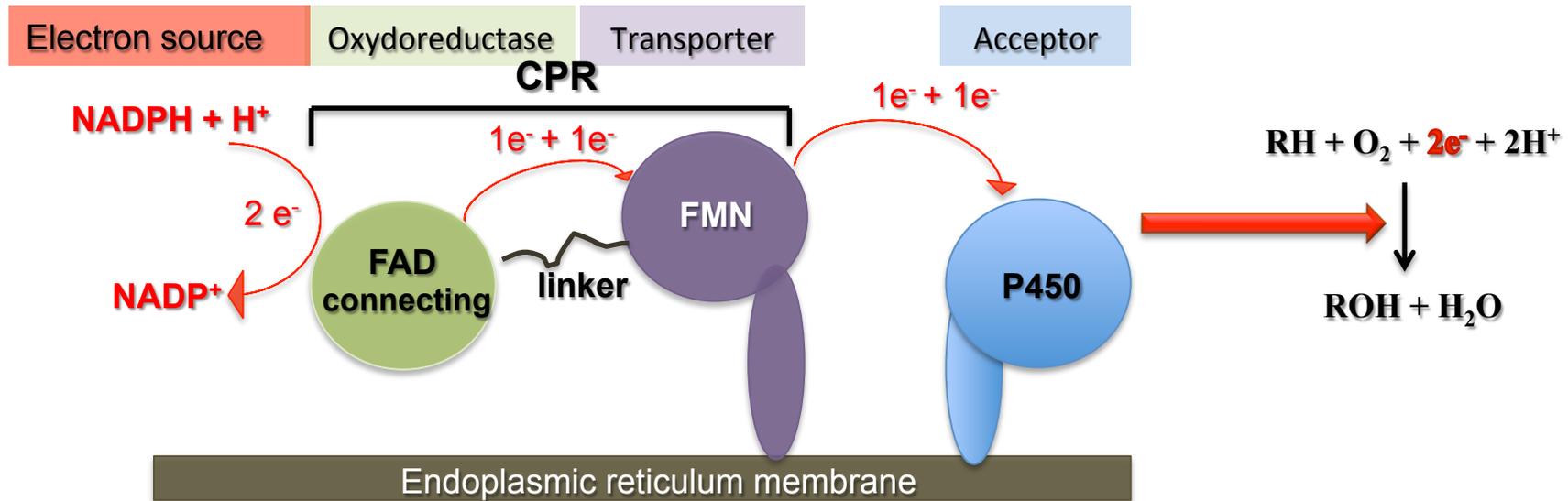
$\tau_c = 4.9$  ns (monomère!!!)



# Mouvements dans des boucles

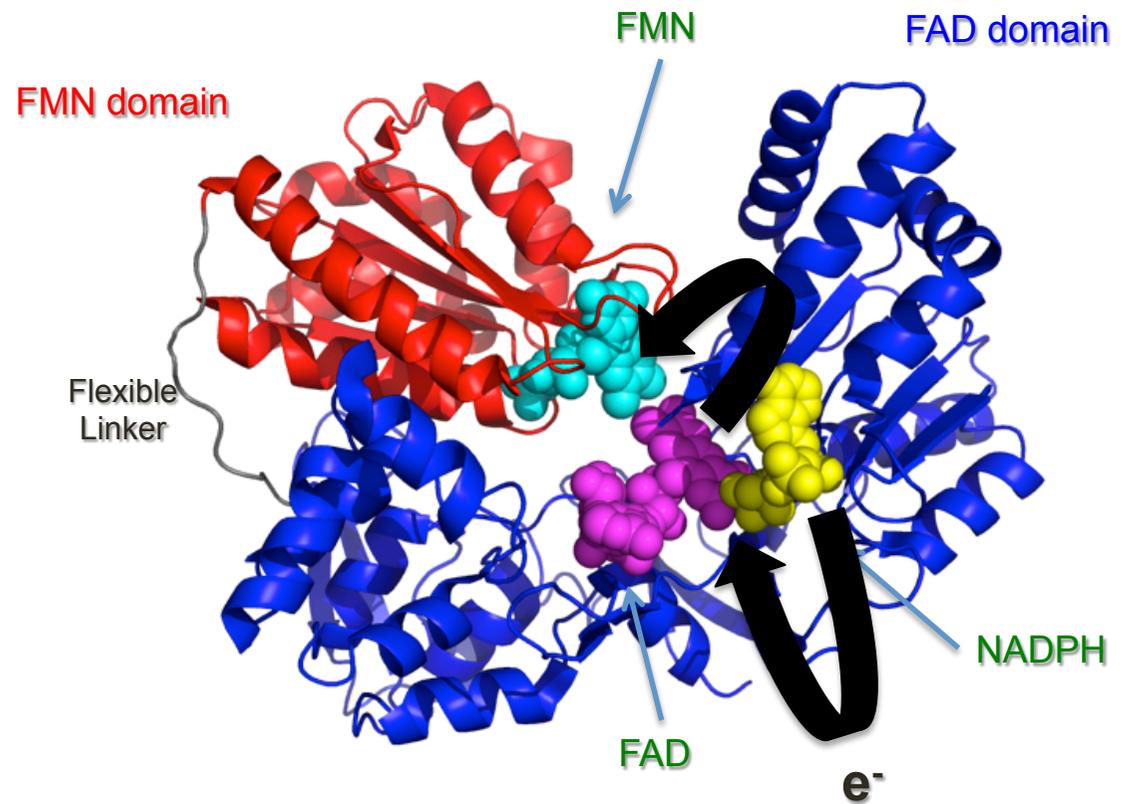


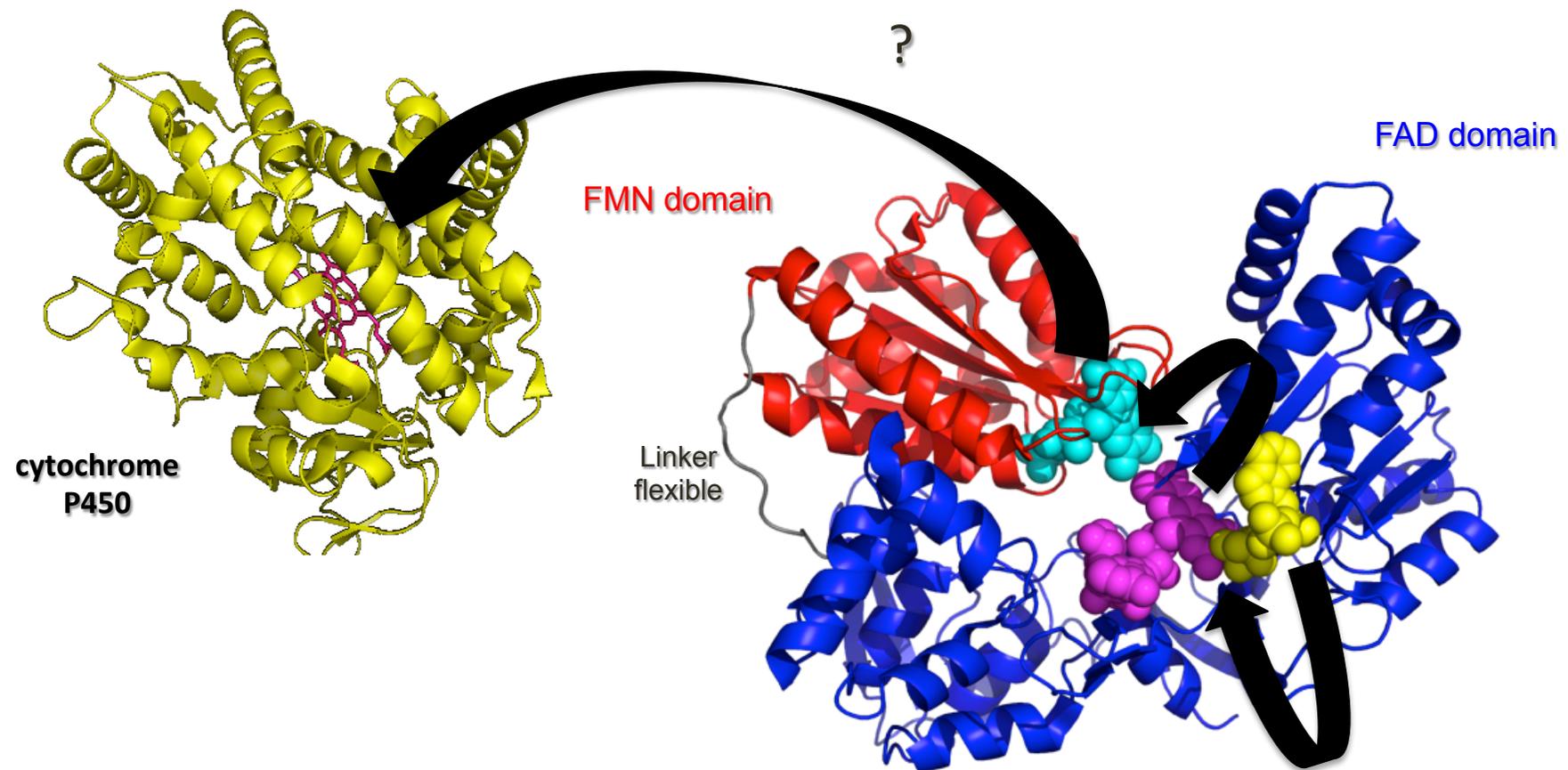
# La cytochrome P450 réductase



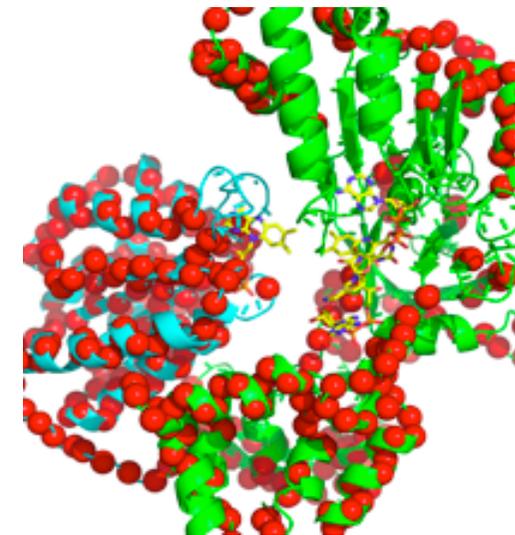
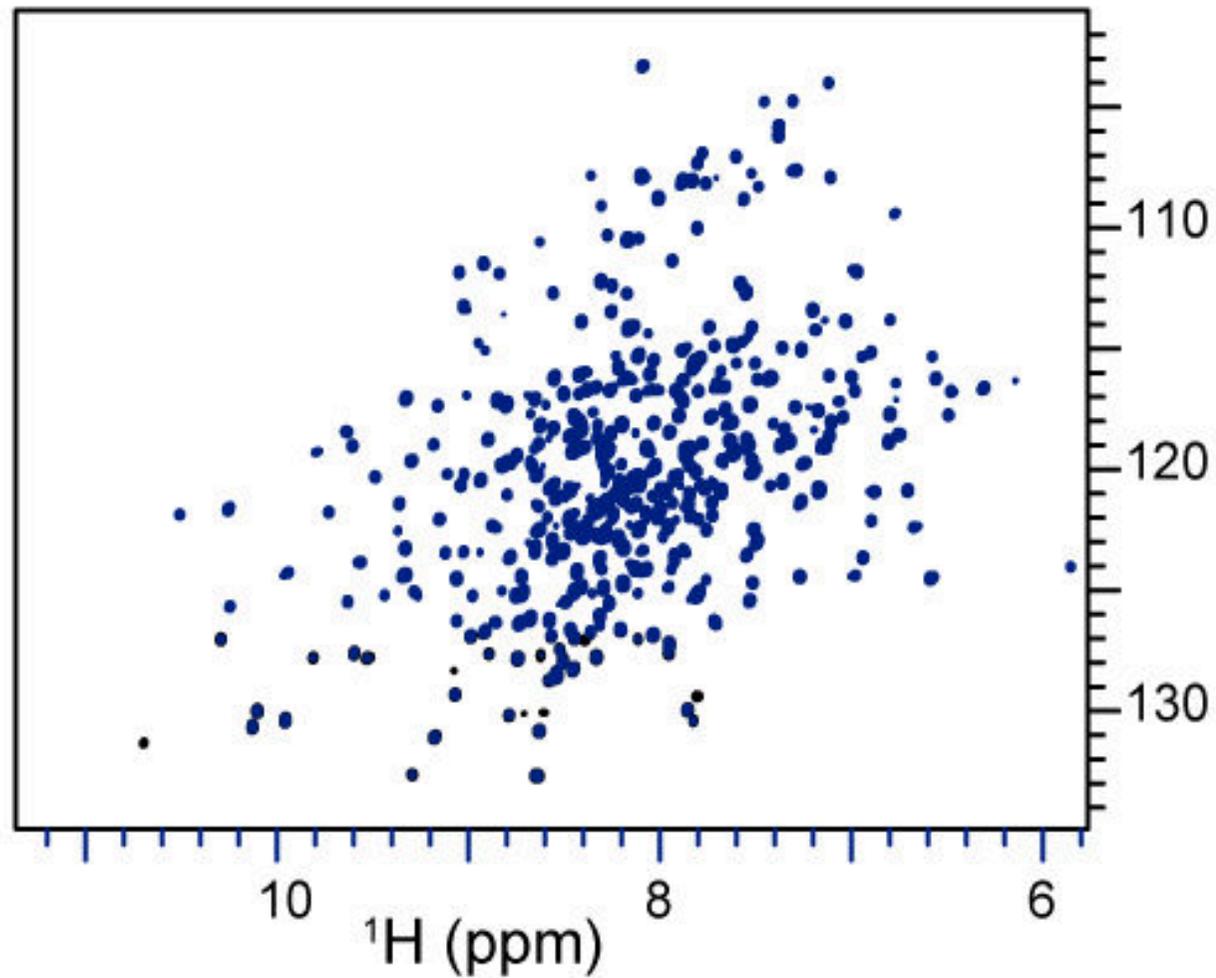
Permet la régénération du cytochrome P450 :

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





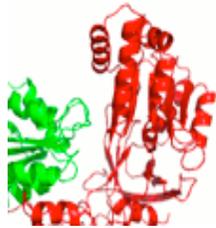
Est-ce que cette conformation est préservée en solution ou biaisée par le packing?

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

70 kDa  
622 aa

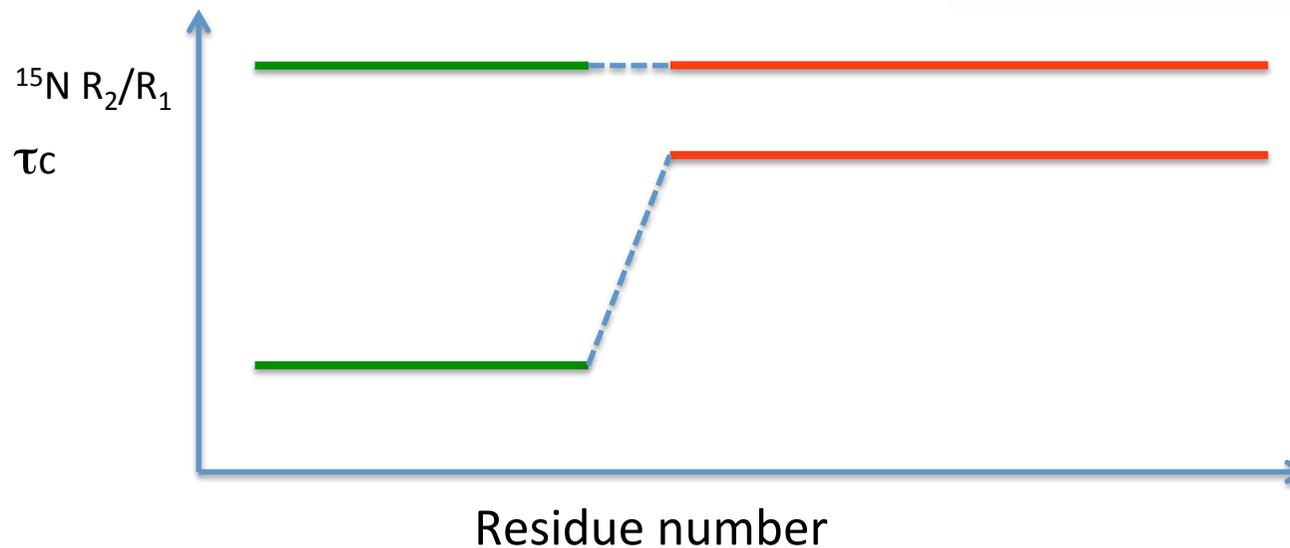
- Sans mobilité interdomaine:

La protéine se comporte comme un corps rigide  
i.e. comme une grosse protéine avec un grand  $\tau_c$

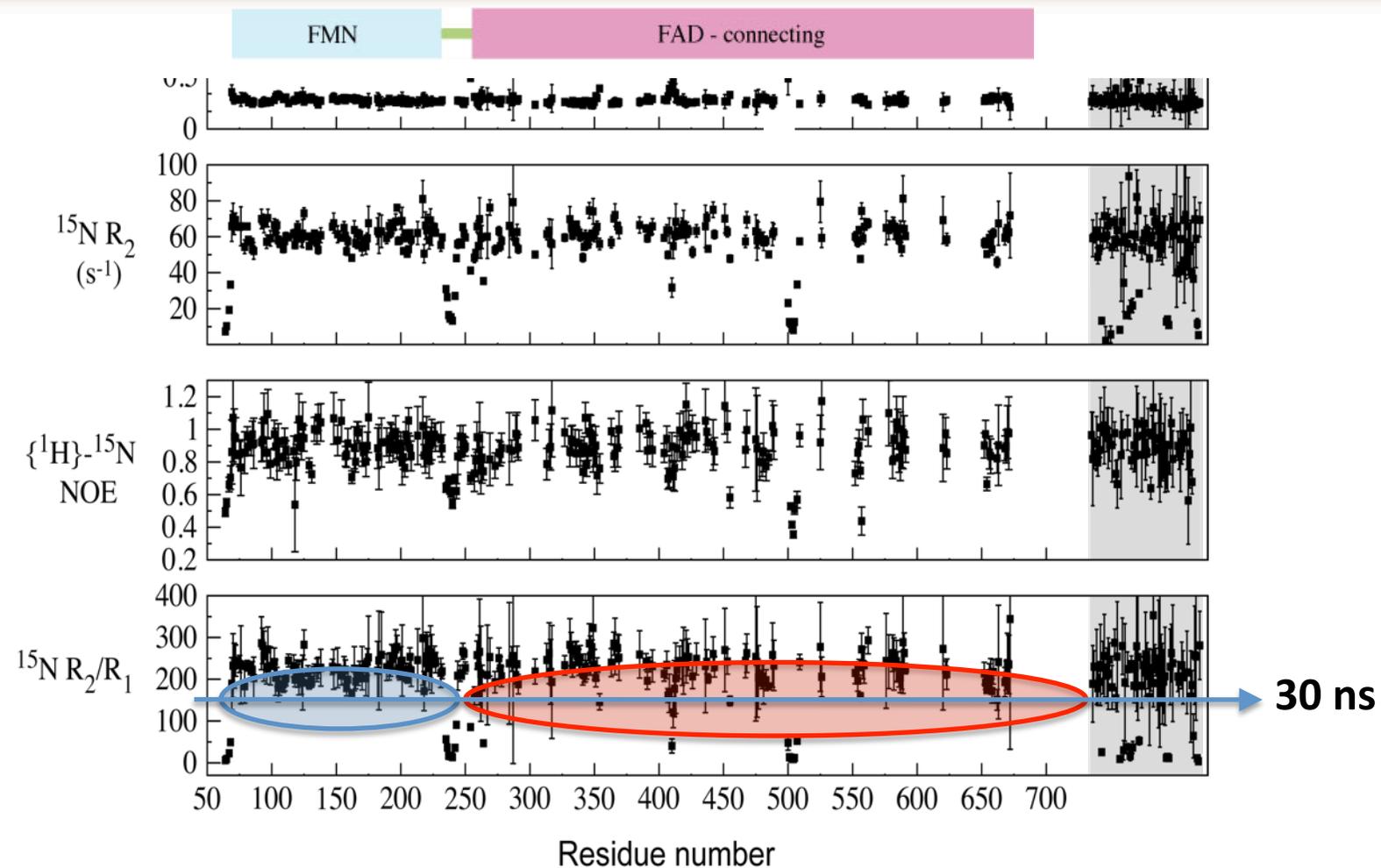


- Avec mobilité interdomaine:

Chaque domaine se comporte différemment  
Comme deux petites protéines avec des petits  $\tau_c$



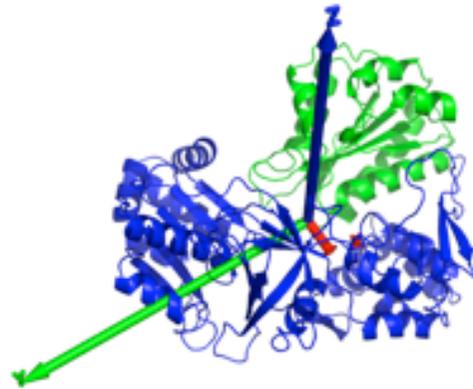
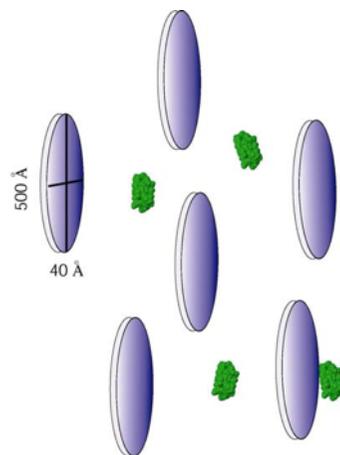
## La CPR est rigide en solution



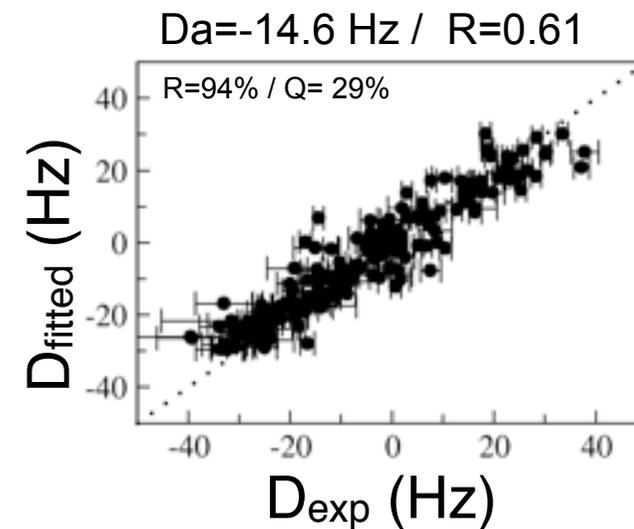
Même temps de corrélation pour les deux domaines (30ns)

# 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

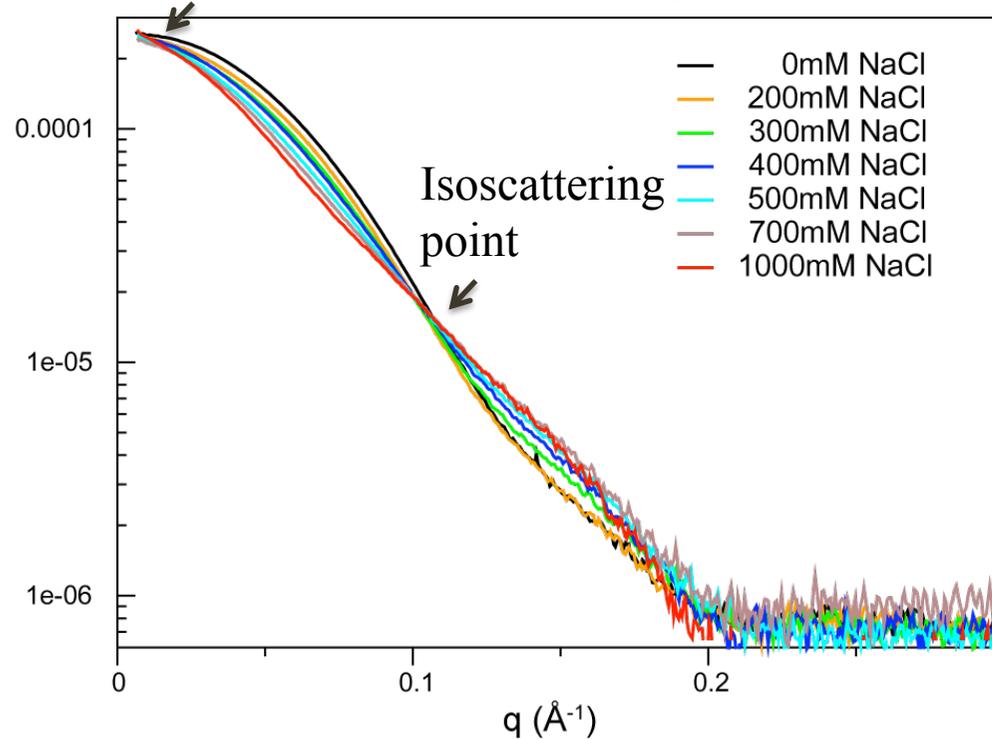


Fit des données RDC sur la structure RX

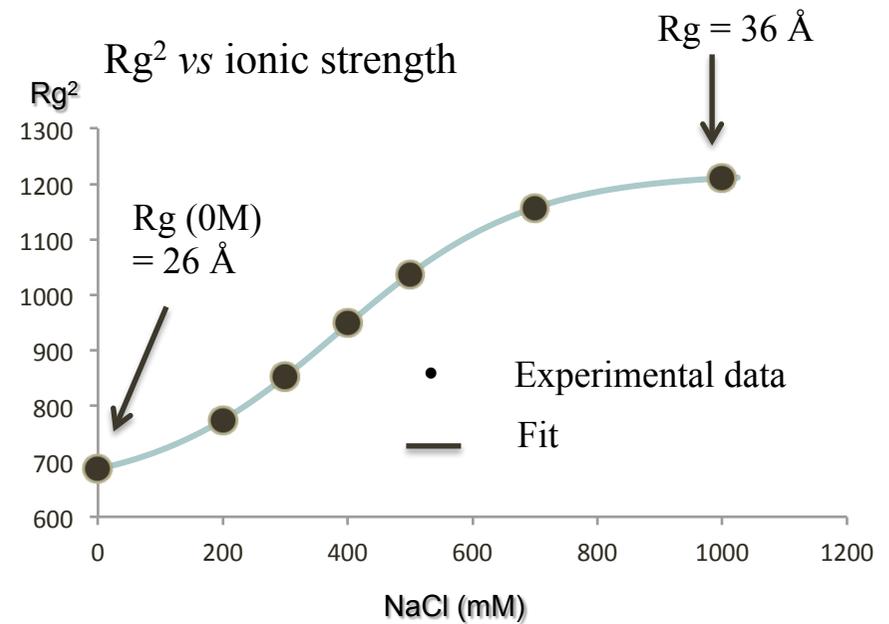
**La structure cristalline de la CPR est préservée en solution ...**

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

Pente  $\sim$  rayon de gyration ( $R_g$ )



Small Angle RX scattering curve

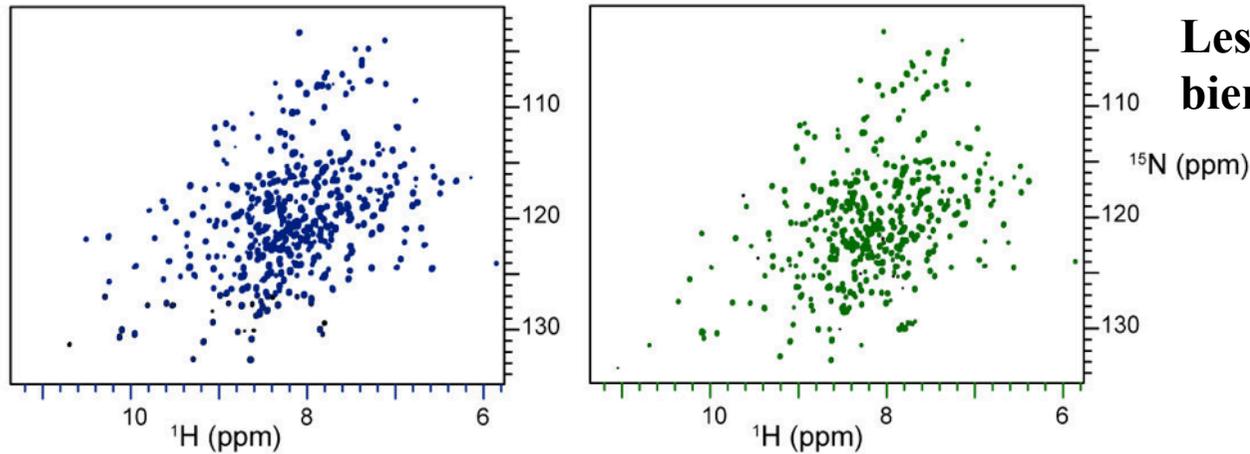


**CPR explore un autre état conformationnel à haute force ionique!!**

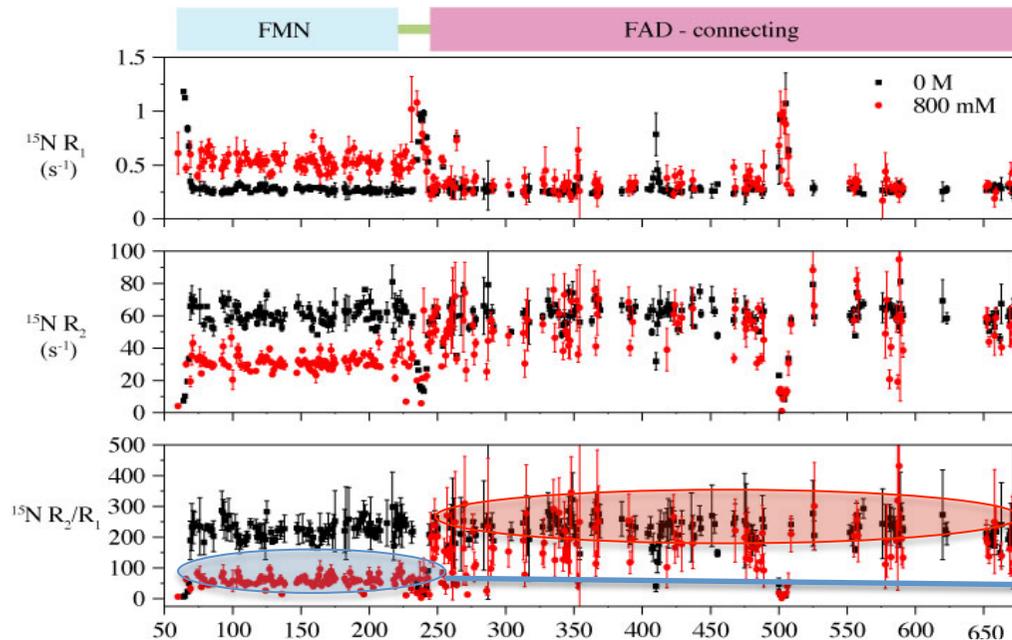
# A haute force ionique, la CPR est très dynamique

0 M [NaCl]

1 M [NaCl]



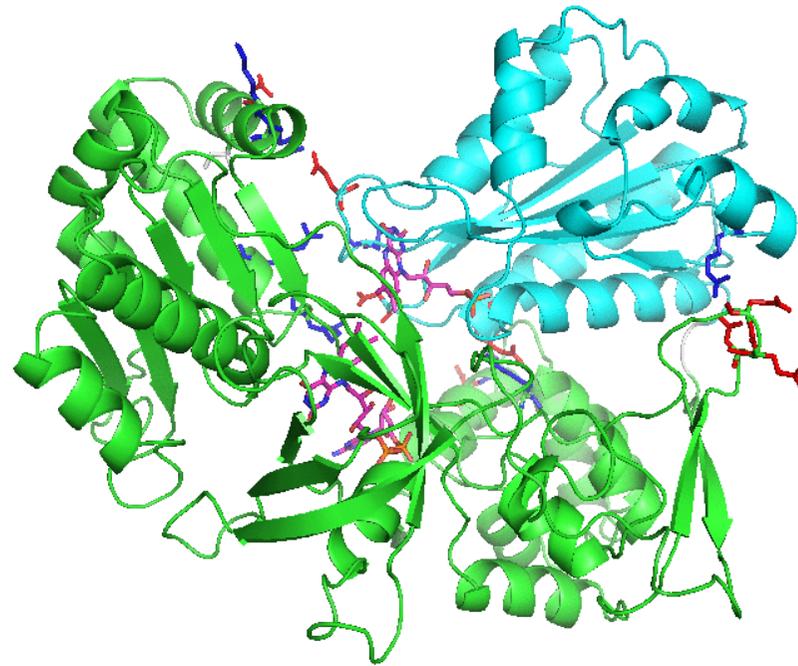
Les deux domaines sont toujours bien foldés



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

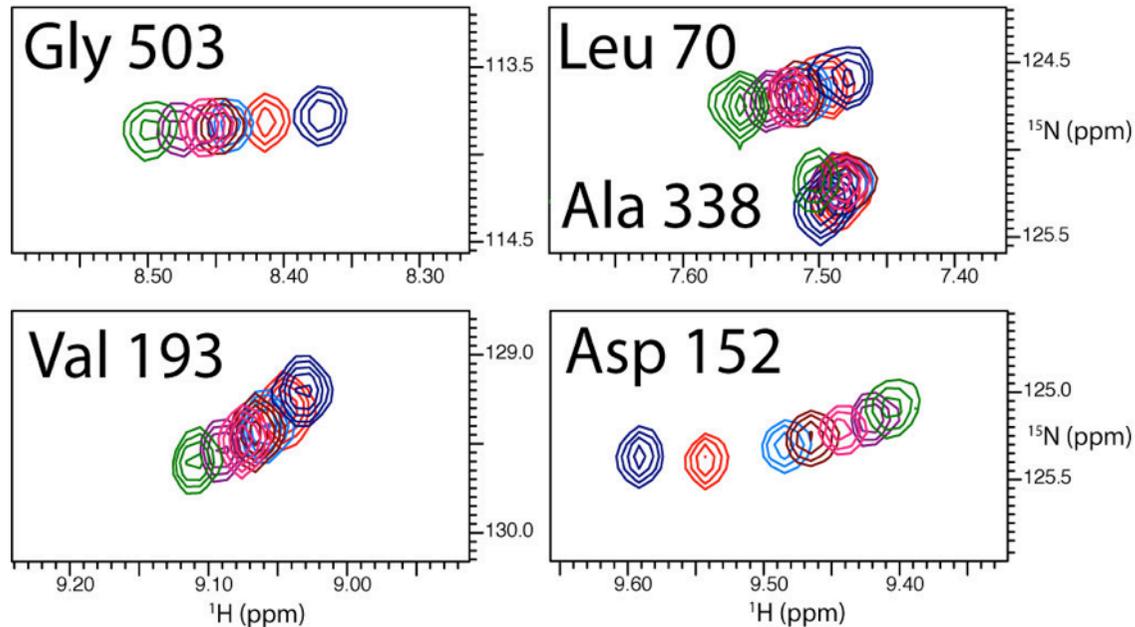
25 ns

11 ns

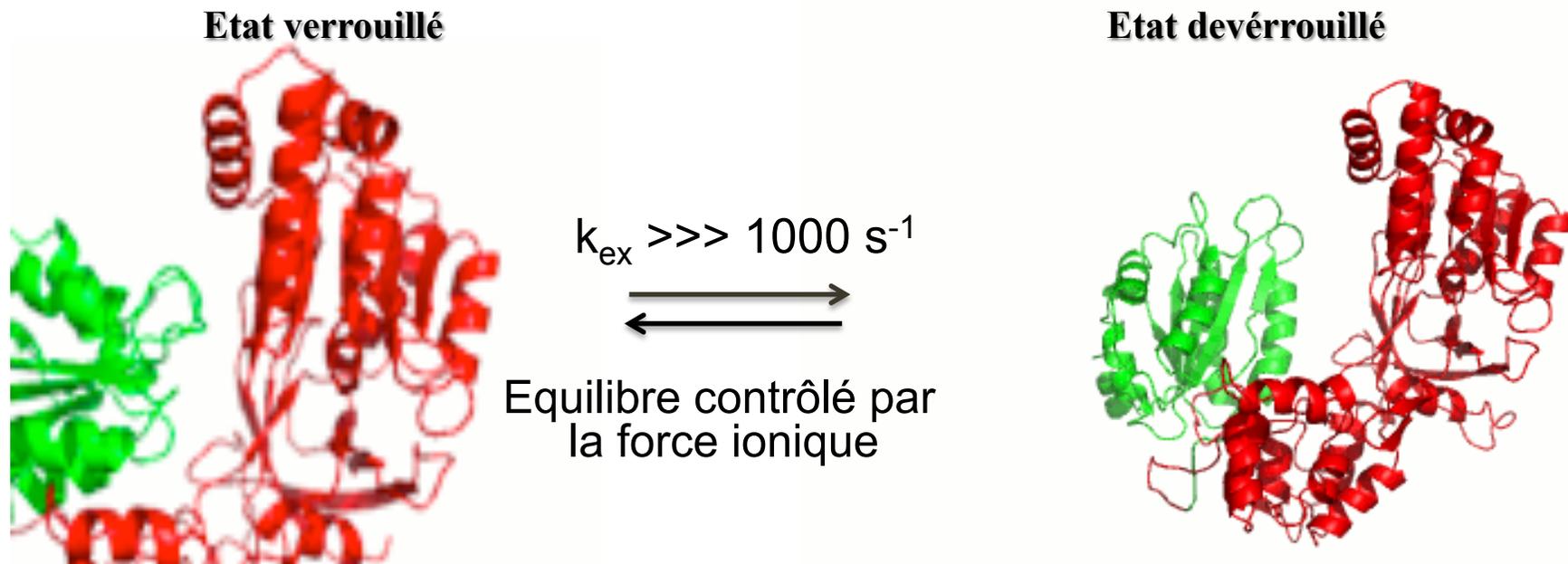


**Des ponts salins sont présents à l'interface  
La haute force ionique casse ces ponts salins.**

0M [NaCl] to 1M [NaCl]

 $^{15}\text{N}$  TROSY

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



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

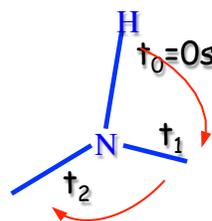
# Take-home message

- 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  $K_d$ , pas de marquage gênant, en solution  
...mais cher? Quantité de matière?

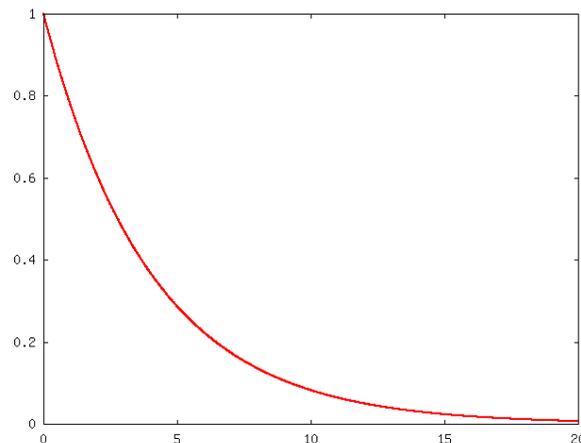
# FIN



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



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

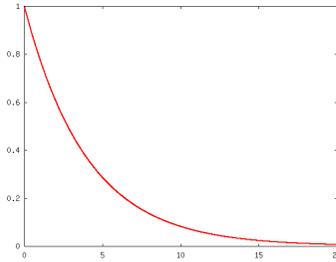


$$G(t) = e^{-\frac{t}{\tau_c}} \quad t \text{ (ns)}$$

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

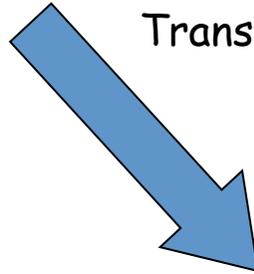
L'échelle de temps de ce processus est décrit par le temps caractéristique  $\tau_c$  (temps de corrélation)

# La fonction de densité spectrale

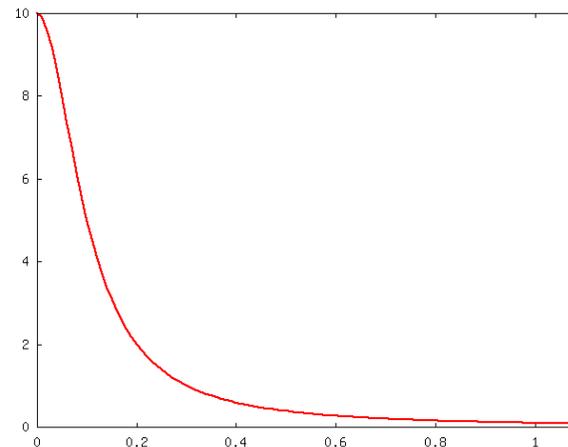


Fonction  
d'auto-corrélation  $G(t)$

Transformation de Fourier



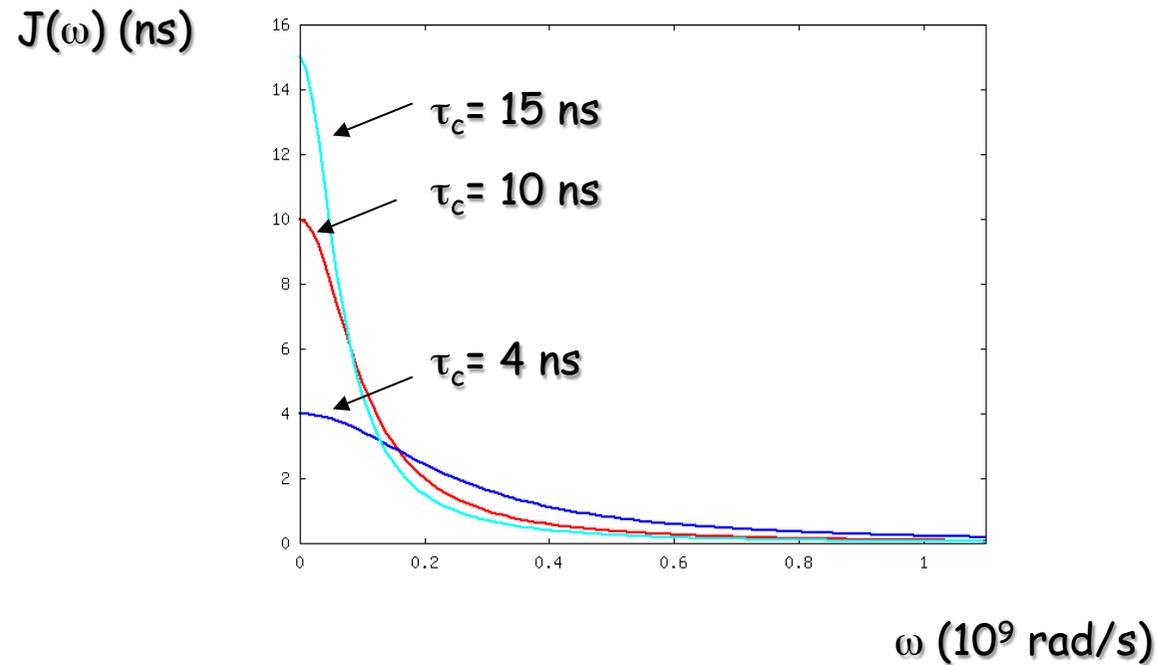
Fonction de densité spectrale  $J(\omega)$  (ns)



$\omega$  ( $10^9$  rad/s)

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

# La fonction de densité spectrale

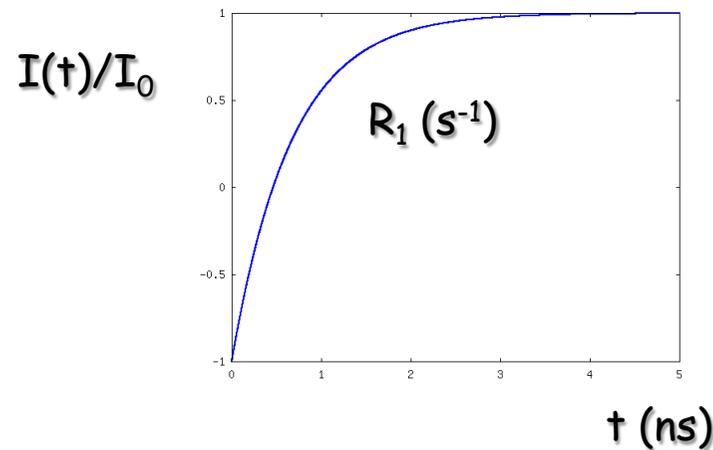


La fonction de densité spectrale dépend des mouvements

# Relaxation de spin

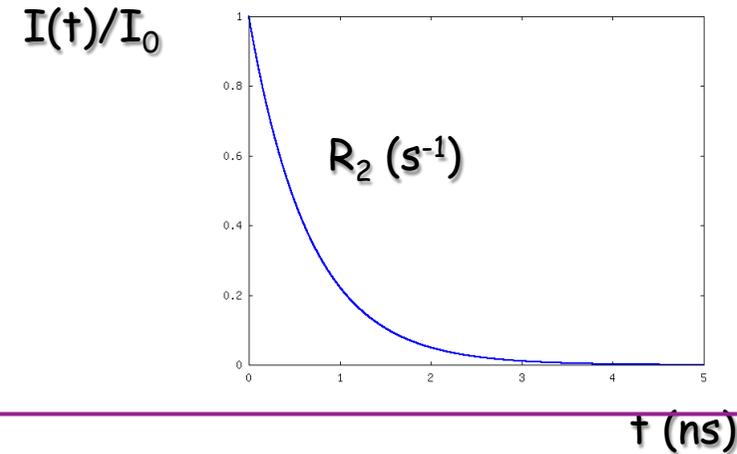
$^{15}\text{N}$   $R_1$  : vitesse de relaxation longitudinale

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

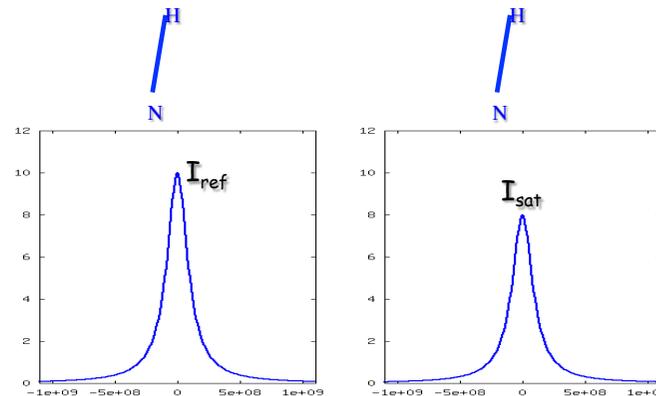


$^{15}\text{N}$   $R_2$  : vitesse de relaxation transversale

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



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

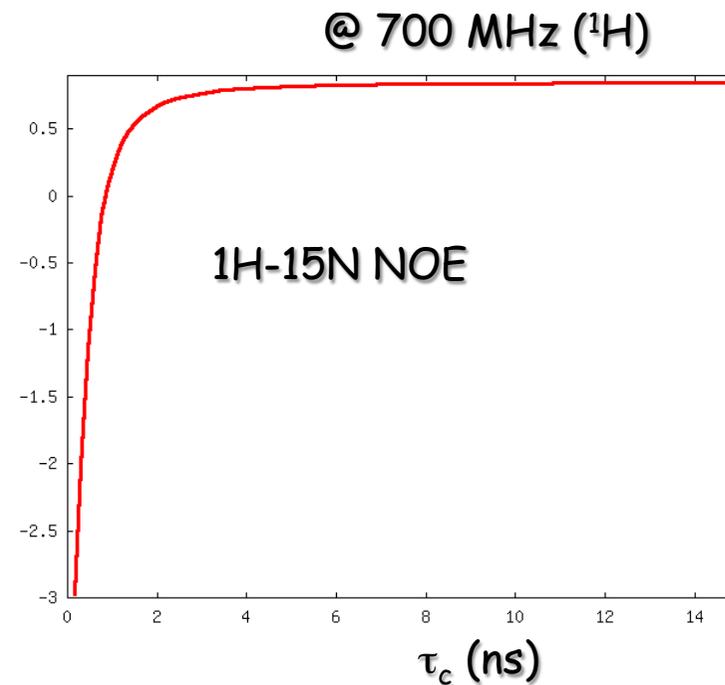
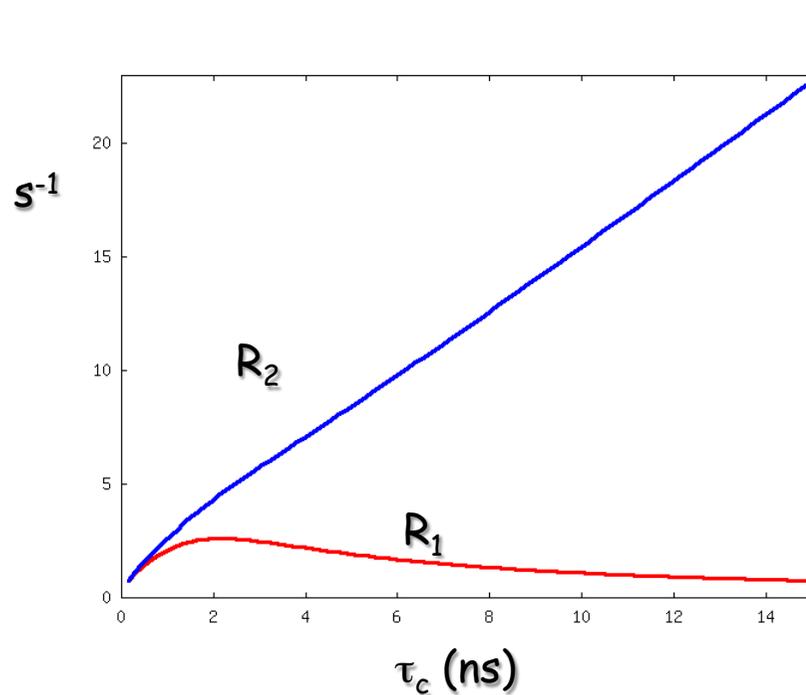
# Mouvements et relaxation

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

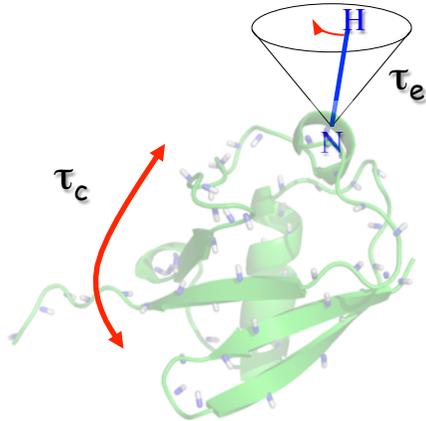
$$d = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{4r^6}$$

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

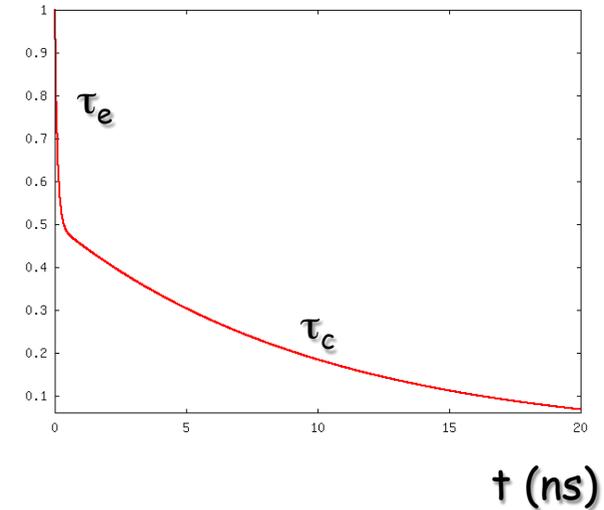
Sur la base d'un modèle simple de mouvement global, on peut prédire  $R_1$ ,  $R_2$  and NOE  $\rightarrow J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$



# Et les mouvements internes?



Fonction d'auto-corrélation  $G(t)$



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

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

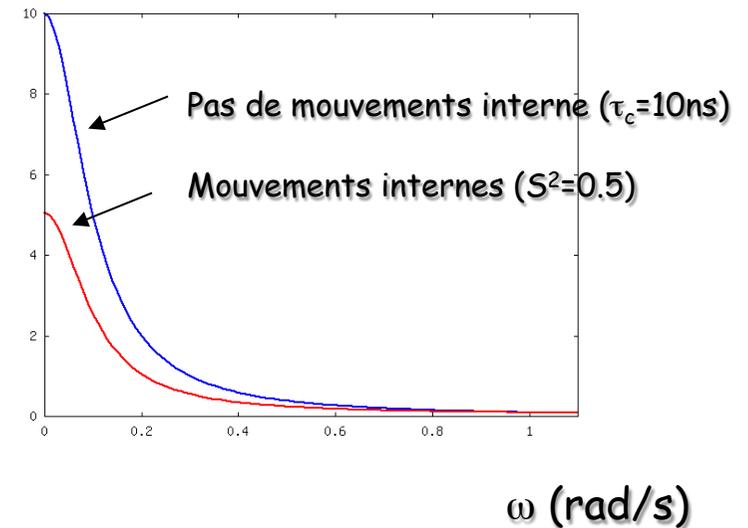
$S^2$ : paramètres d'ordre:

$S^2=1$  si complètement rigide

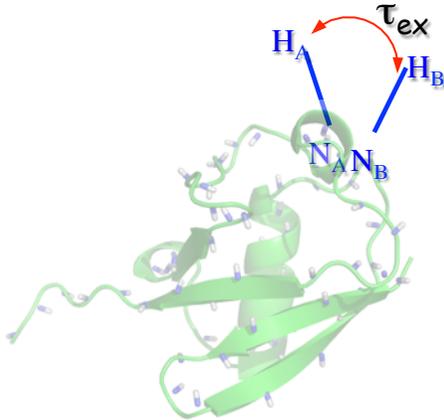
$S^2=0$  si complètement flexible

$\tau_e$ : 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  $k_{ex}=1/\tau_{ex}$  ( $k_{ex}=\mu\text{s}-\text{ms}$ )

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

Mouvement rapide (<ns)

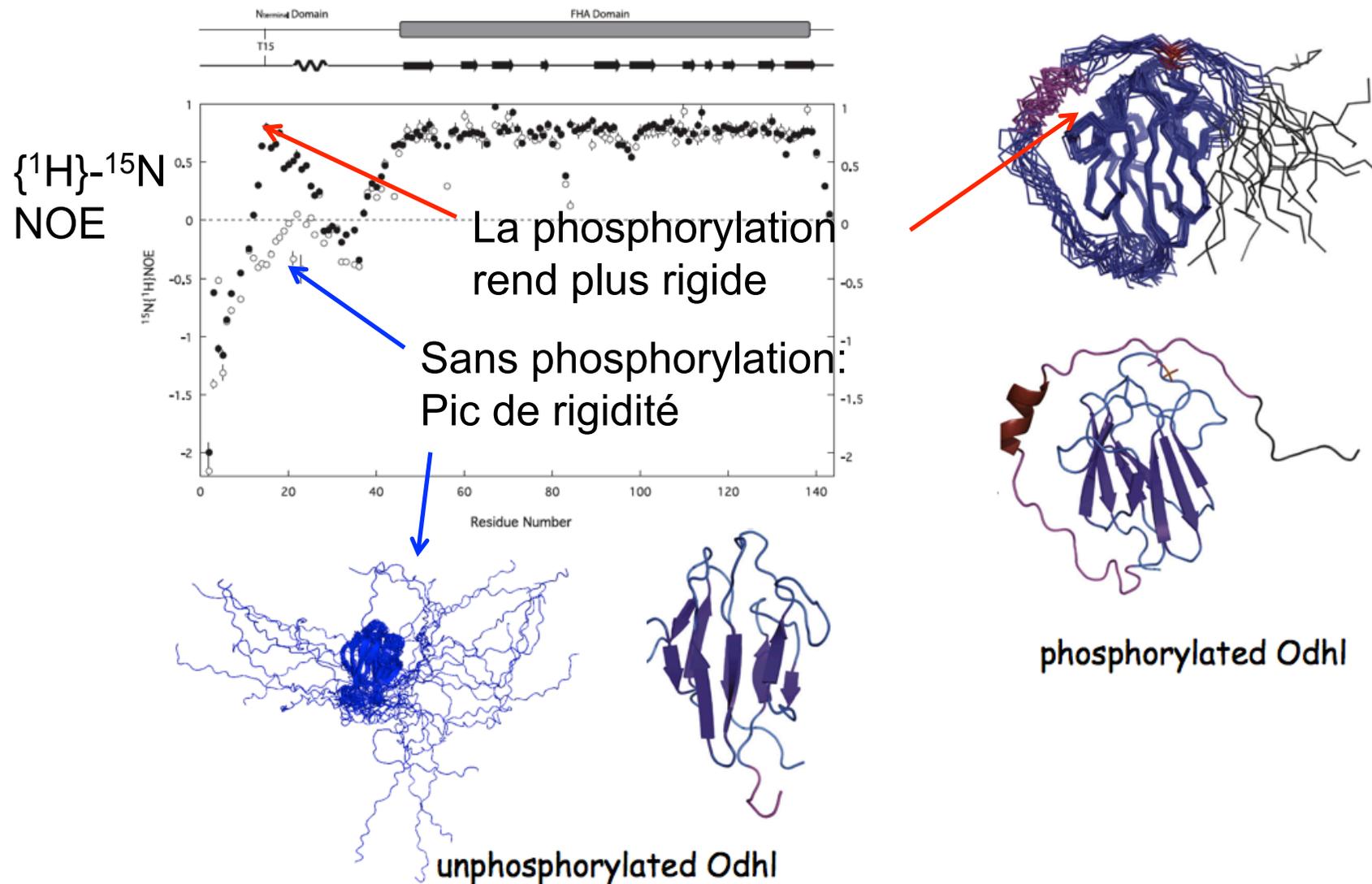
Mouvement lent ( $\mu\text{s}-\text{ms}$ )

Mouvement interne lent (échange entre deux ou plusieurs sites)

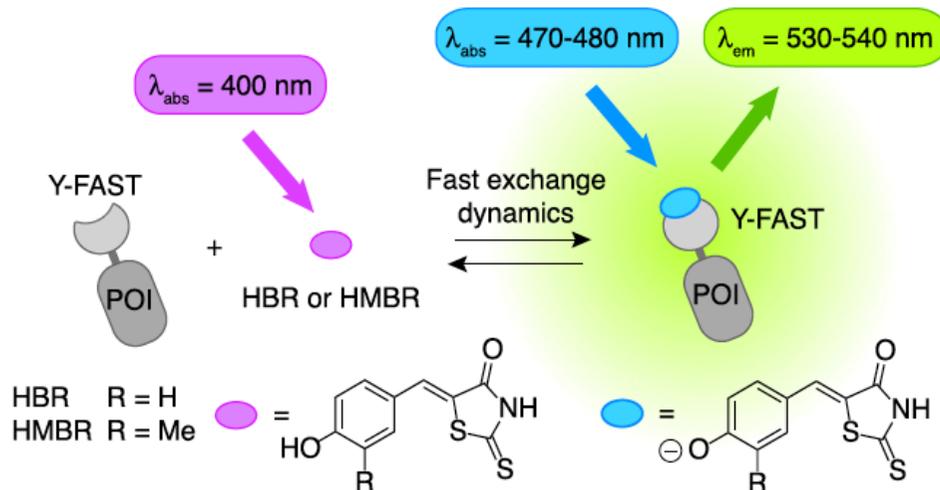
-> Augmentation de  $^{15}\text{N}$   $R_2$

-> Elargissement de raie

# Mouvements dans des boucles



# 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	$\tau_c$ (expérimental)	$\tau_c$ (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!!!!!!!!!!