

Détermination de la structure tridimensionnelle de protéines en solution par RMN¹

La RMN donne des informations localisées au niveau de chaque atome de la molécule. Ces informations reflètent la structure 3D, mais pour l'obtenir il est nécessaire de parcourir un certain nombre d'étapes. La RMN possède l'avantage de donner des informations en solution dans un environnement proche du milieu naturel et que l'on peut faire varier, ce qui permet des études en temps réels et non invasives, une autre caractéristique de la RMN qui a d'ailleurs fait son succès dans le domaine médicale. Le caractère local des informations procurées par la RMN permet également quelque fois de se concentrer sur une région particulière et d'analyser les conséquences d'une manipulation de la molécule. Des informations (qualitatives) sur les propriétés structurales, d'association ou de stabilité peuvent être obtenues rapidement par le seul examen du spectre du proton. Enfin, les propriétés de l'aimantation nucléaire que l'on observe par la RMN sont très sensibles aux aspects dynamiques, ce qui permet aussi d'obtenir des informations sur les mouvements internes. En fait, les mouvements moléculaires sont à l'origine de la richesse des observations procurées par la RMN, que ce soit en haute résolution, en imagerie médicale ou industrielle. Cette dernière propriété en fait une méthode parfaitement complémentaire de la cristallographie par RX pour la détermination de la structure 3D de molécules biologiques.

1. Informations obtenues par RMN permettant d'aboutir à la structure

Ces informations sont :

- le déplacement chimique du proton (et du ^{13}C si connu) -> attribution et structure secondaire ;
- le couplage à travers les liaisons chimiques -> angles dièdres (loi de Karplus) ;
- la distance entre protons.

1.1. Le déplacement chimique

Le déplacement chimique est non seulement caractéristique de la structure chimique (fig 1a) mais il constitue également une source d'informations structurales qualitatives (état déplié ou non, structure secondaire... fig 1b-c-d).

¹ Adapté à partir du texte « Principes de la détermination de la structure tridimensionnelle de protéines en solution par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Joël Mispelter, Institut Curie, INSERM

1.2. Le couplage

J peut varier de quelques Hz pour des couplages entre protons à quelques centaines de Hz pour des couplages directs entre ^{13}C et ^1H par exemple. Il dépend beaucoup de la nature des liaisons chimiques qui lient les deux noyaux. Dans une certaine mesure, c'est une information structurale (loi de Karplus, fig 2b). Le couplage et le déplacement chimique serviront aussi à l'attribution des résonances.

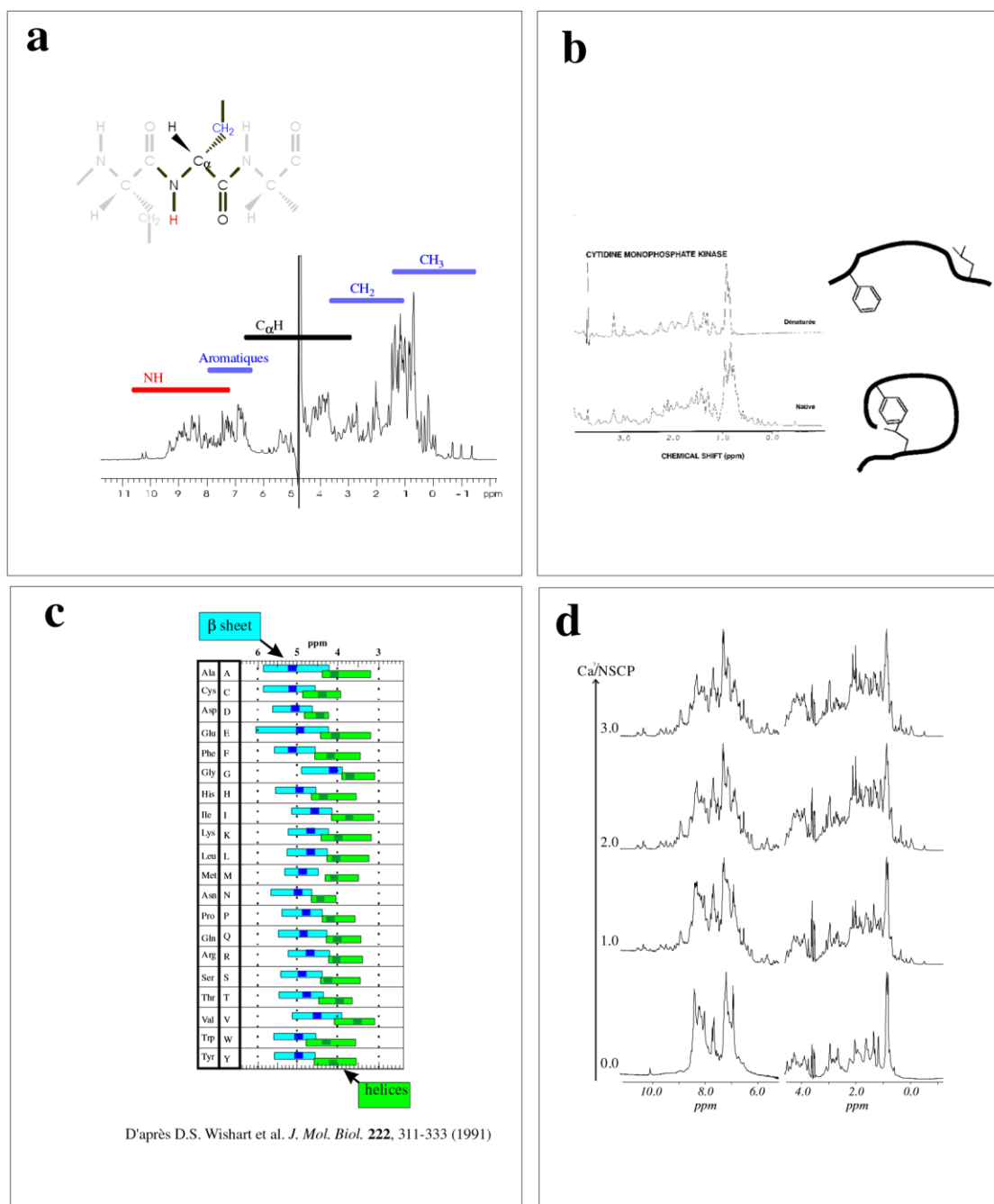


Figure 1

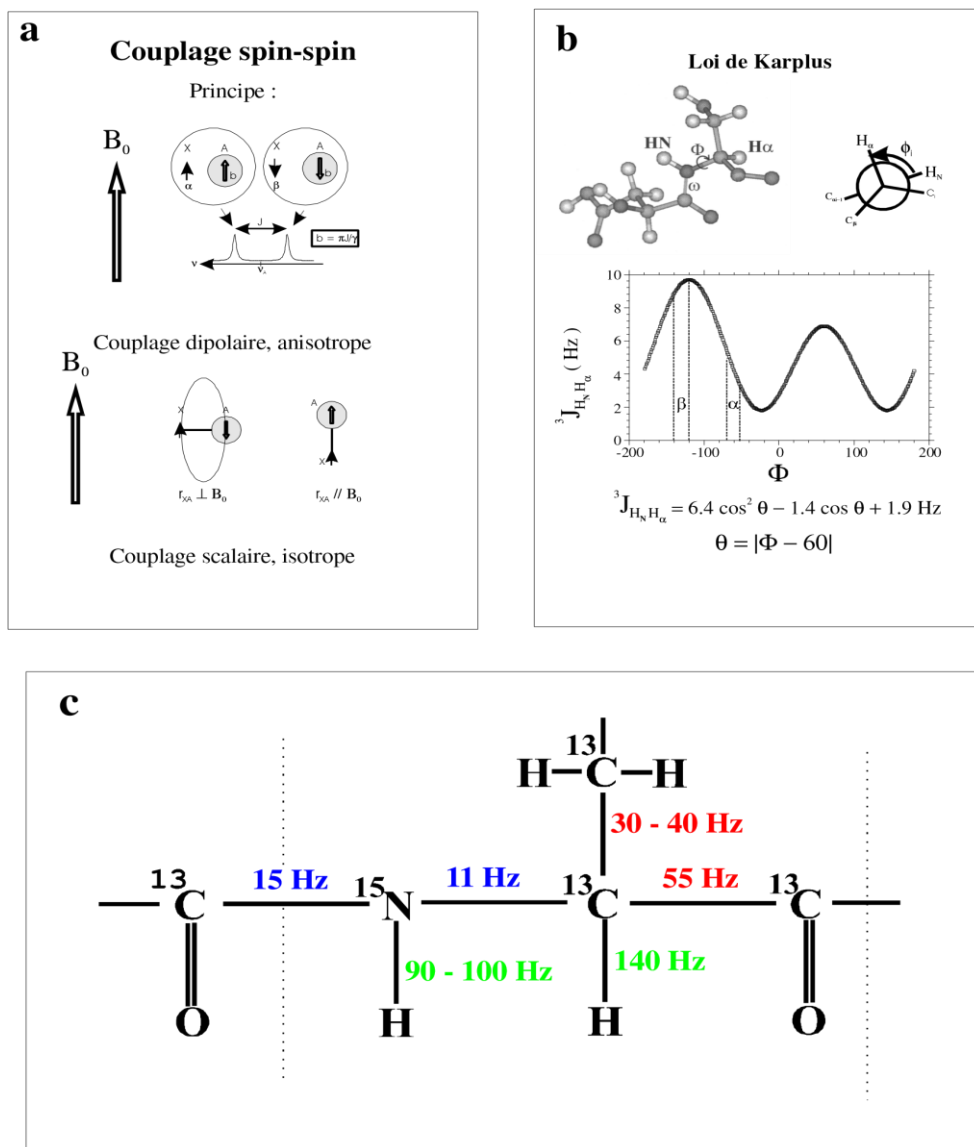


Figure 2

1.3. La largeur de raie

C'est la troisième et dernière indication qu'on « voit » dans un spectre de RMN. Elle cache en fait une information essentielle qui traduit les fluctuations temporelles des champs créés par les moments magnétiques de spin nucléaires. Ces fluctuations proviennent des mouvements moléculaires globaux et internes et sont la source du phénomène de « relaxation ». De manière schématique, plus ça bouge « vite » et plus les raies sont fines.

Cette information de largeur de raie, seule, n'est pas a priori très utile et une raie trop large est même pénalisante car elle empêche la résolution des résonances

de tous les protons de la molécule. Elle peut donner cependant une indication (très) qualitative sur l'état de l'échantillon (molécules associées ou précipitée...).

1.4. Relaxation croisée (effet NOE – Nuclear Overhauser Effect)

Cette caractéristique n'est pas à proprement parler une caractéristique spectrale directement visible dans le spectre de RMN. Les fluctuations des champs magnétiques locaux permettent non seulement une relaxation globale de l'aimantation nucléaire (qui se traduit sur le spectre par la largeur de raie), mais si les noyaux sont (et restent) proches dans l'espace il est aussi possible de mettre en évidence un effet de « relaxation mutuelle » qui reflètent directement la distance intramoléculaire entre ces noyaux. La mesure de ces effets de relaxation mutuelle ou croisée est réalisée par transfert d'aimantation et fait appel à l'Effet Nucléaire Overhauser (NOE, Nuclear Overhauser Effect). C'est la source principale des indications de distance qui permettront de remonter à la structure 3D de la molécule.

Le champ magnétique dipolaire créé par le moment magnétique de spin diminue comme le cube de la distance. L'effet de relaxation varie comme le carré des fluctuations de ce champ dipolaire. Il en résulte que ces effets de relaxation mutuelle ou croisée varient comme $1/r^6$. En pratique on pourra mettre en évidence un effet NOE pour des protons distant au plus de 5 Å environ (fig 3b).

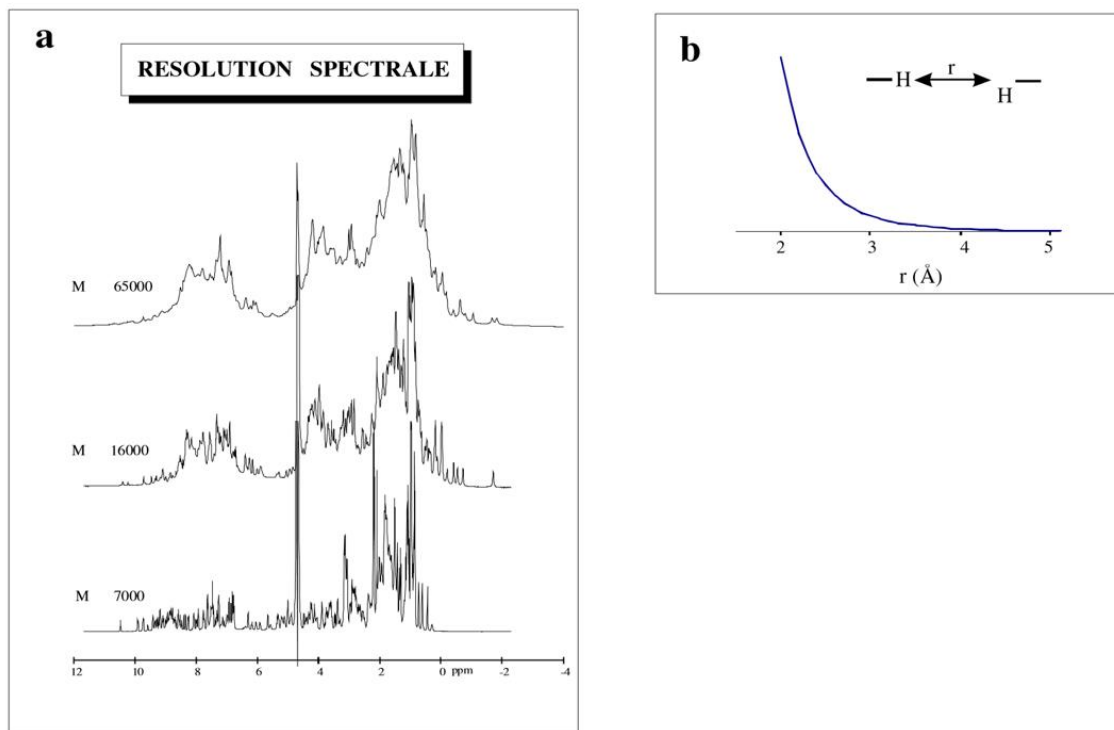


Figure 3

2. Comment obtenir ces informations ?

2.1. Attribution spectrale

Cette étape est indispensable avant la détermination de la structure. L'examen simple du spectre 1D permet de dire si la protéine est structurée ou non, si elle est sous forme monomérique, si on est en présence d'hélice α ou de feuillet β , mais on est incapable à cette étape de donner la moindre indication de structure tertiaire. Le spectre 1D ne donne aucune indication de la distance entre les protons. Ces informations de distance sont obtenues à partir d'une corrélation de type NOESY (fig 4). Encore faut-il savoir de quel proton il s'agit.

L'attribution spectrale est réalisée très schématiquement en deux étapes :

- attribution des résonances appartenant à chaque type d'acide aminé,
- attribution spécifique à chaque acide aminé de la séquence.

Cette approche en deux étapes est permise par le fait que les couplages entre protons « restent » à l'intérieur de la structure chimique de chaque acide aminé, le groupement CO de la liaison peptidique réalisant une « coupure » dans le passage de l'information de couplage J.

On fait appel ici à des expériences de RMN à deux dimensions permettant de désigner les protons présentant un couplage (attribution des types d'acides aminés) ou présentant un effet NOE (attribution séquentielle).

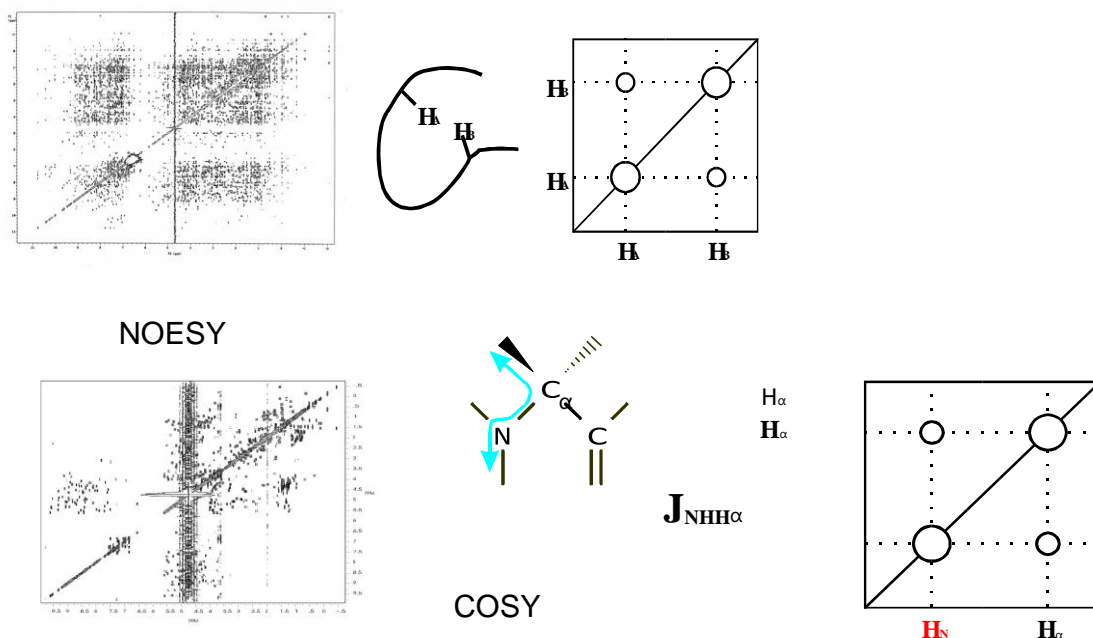


Figure 4

Attribution séquentielle

La première étape de l'attribution séquentielle est réalisée à l'aide de spectres 2D COSY et TOCSY, tandis que la seconde étape est réalisée à l'aide de la NOESY qui permet en outre de « mesurer » les distances entre les protons.

L'attribution des résonances correspondant aux différents résidus débute par les protons NH puis remonte aux protons H α et enfin aux chaînes latérales. La carte COSY montre clairement les couplages entre NH et H α . Toutefois il est assez délicat de remonter ensuite sur les chaînes latérales du fait de la superposition importante des résonances. On s'en sort à cette étape avec l'expérience TOCSY qui indique sur une même colonne tous les protons appartenant à un résidu donné, en partant du NH. Ces expériences permettent une attribution assez simple des types d'acide aminé correspondant à chaque résonance NH, à condition que la superposition ne soit pas trop grande.

La seconde étape de l'attribution séquentielle à l'aide du NOESY consiste à repérer les enchaînements d'acides aminés grâce aux proximités spatiales des protons H α et H β d'un résidu avec le proton NH du résidu suivant (fig 5c-d). Une superposition de cartes COSY/TOCSY et NOESY est très utile dans ce cas. En fait, on reconnaît aussi dans les cartes NOESY des connections NH(i)/H α (i) car ces protons sont souvent proches et donnent lieu à des connections intra-résidus à la même position que dans le COSY et /ou le TOCSY.

3. Détermination de la structure 3D

3.1. Structure primaire

Du fait de la nécessité de l'attribution séquentielle, la séquence de la protéine doit être connue. La RMN peut seulement permettre de corriger des erreurs mineures de séquence.

3.2. Structure secondaire

Le déplacement chimique et le couplage $^3J_{\text{HNHC}\alpha}$ sont une source d'information pour la structure secondaire. Il existe d'autres particularités des structures secondaires qui se traduisent en RMN par des caractéristiques que l'on peut aisément mettre en évidence.

En particulier des effets NOE entre proton H α et NH amide de résidus voisins (H α HN(i, i+1)) sont caractéristiques de feuillet β , tandis que des effets NOE entre protons amide du squelette porté par des résidus voisins (NHNH(i, i+1)) sont caractéristiques d'hélice α (fig 6a). Les distances sont en effet assez bien définies dans ces structures secondaires (respectivement 2.2 et 2.8 Å). Dans les structures en hélice α , on trouvera en plus des effets NOE entre les protons H α et HN de résidus éloignés i, i+3.

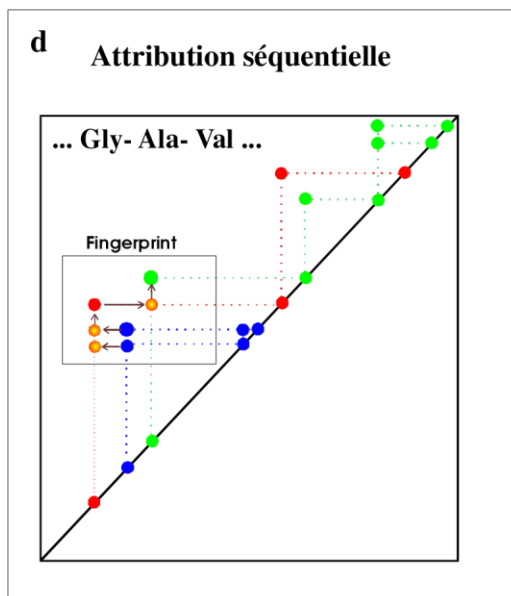
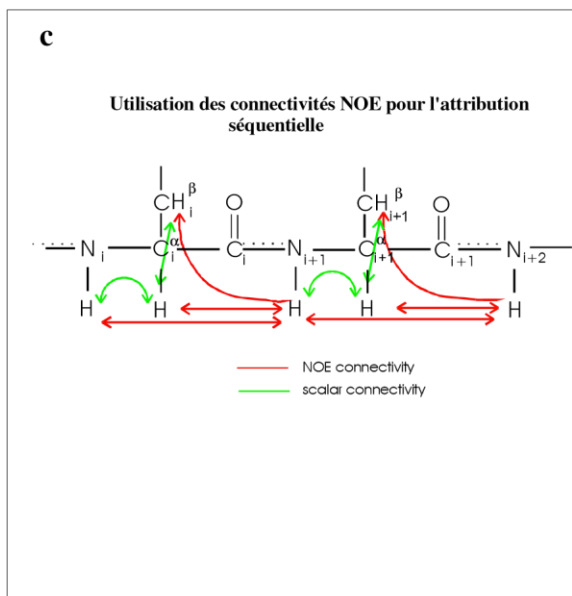
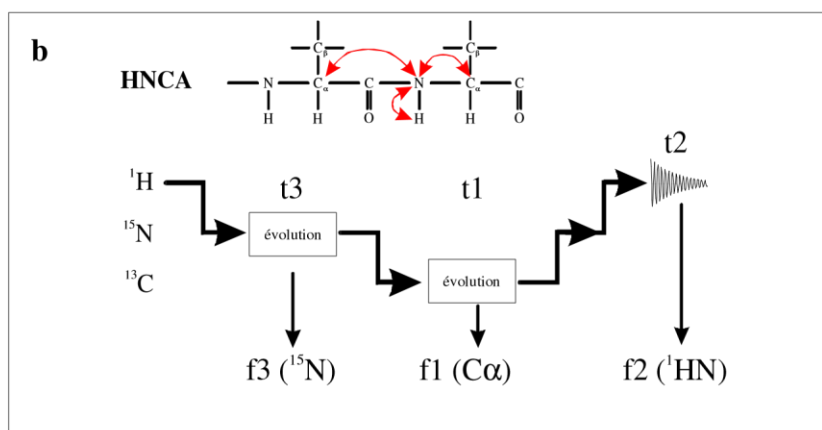
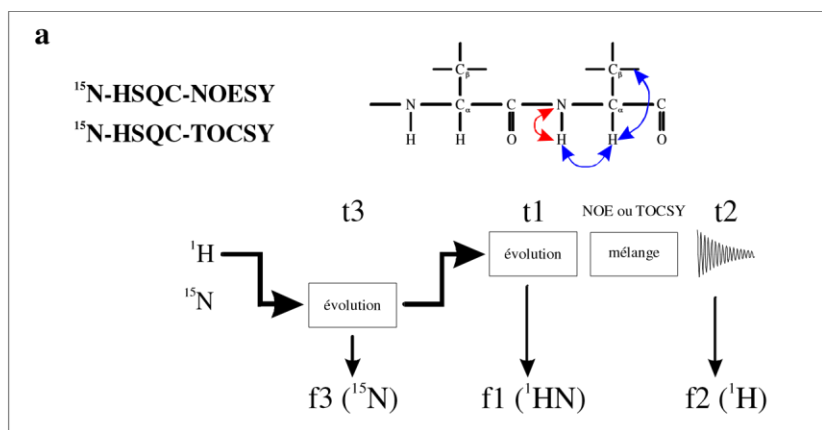


Figure 5

Outre des informations de distance entre protons et d'angles de liaisons, la mise en évidence de liaisons hydrogènes est une source utile pour la structure secondaire (fig 6b). On les rencontre en effet peu ou pas dans les boucles, mais plutôt dans les éléments de structure bien définie.

La caractérisation par RMN d'une liaison hydrogène est indirecte. Elle consiste à mesurer le temps que met un proton (amide) à être échangé par un atome de deutérium. Lorsqu'un proton est impliqué dans une liaison hydrogène, son temps de vie est très long (des dizaines d'heures, voire plusieurs jours). Après lyophilisation et solubilisation dans D₂O on effectue des enregistrements de spectres permettant d'observer les N-H (soit COSY, soit HSQC ¹⁵N). Ces indications apportent des informations sur la structure secondaire et, par la suite, constituent des contraintes dans l'étape de modélisation. Cependant, l'atome accepteur ne peut être mis directement en évidence par RMN. Il est suggéré par la modélisation.

L'ensemble de toutes ces données permet de localiser les éléments de structure secondaire dans la séquence primaire (fig 6c).

3.3. Repliement tertiaire

Il est évident que le repliement tertiaire pourra être obtenu par la connaissance des distances entre protons de résidus éloignés dans la séquence primaire. Cela impliquera non seulement les protons du squelette, mais aussi ceux des chaînes latérales. En outre, dans le cas de feuillet β , des informations de distances (effet NOE) H α -H α , NH-NH et H α -NH de résidus éloignés dans la séquence primaire permettent de mettre en évidence la présence et l'orientation de feuillet β (fig 6d). Ces informations permettent d'aligner les segments β , de connaître l'orientation de feuillets et de définir la topologie de la protéine (fig 6e).

A ce niveau ces informations restent qualitatives. L'analyse suivante des cartes NOE a une importance capitale pour la détermination finale de la structure tertiaire. En fait, la mesure des distances par effet NOE est imprécise. L'effet est très faible, de quelques %. Les mouvements internes peuvent aussi fausser considérablement certaines estimations de distances. Par contre, le calcul des cartes NOE à partir d'une structure peut être très précis. Une ou plusieurs étapes de modélisation moléculaire permettront donc d'affiner la structure et de corriger d'éventuelles erreurs d'attribution dans l'étape initiale. Le calcul de la structure peut ainsi être résumé par le diagramme simplifié de la figure 7a. L'évolution de la structure au cours du calcul est représentée sur la figure 7b. A partir de la séquence linéaire, un premier jeu de structure est obtenu à partir des données de distances (et d'angles). Ces structures sont ensuite soumises à un nouveau calcul qui inclut les contraintes RMN (distances, angles et liaisons hydrogènes).

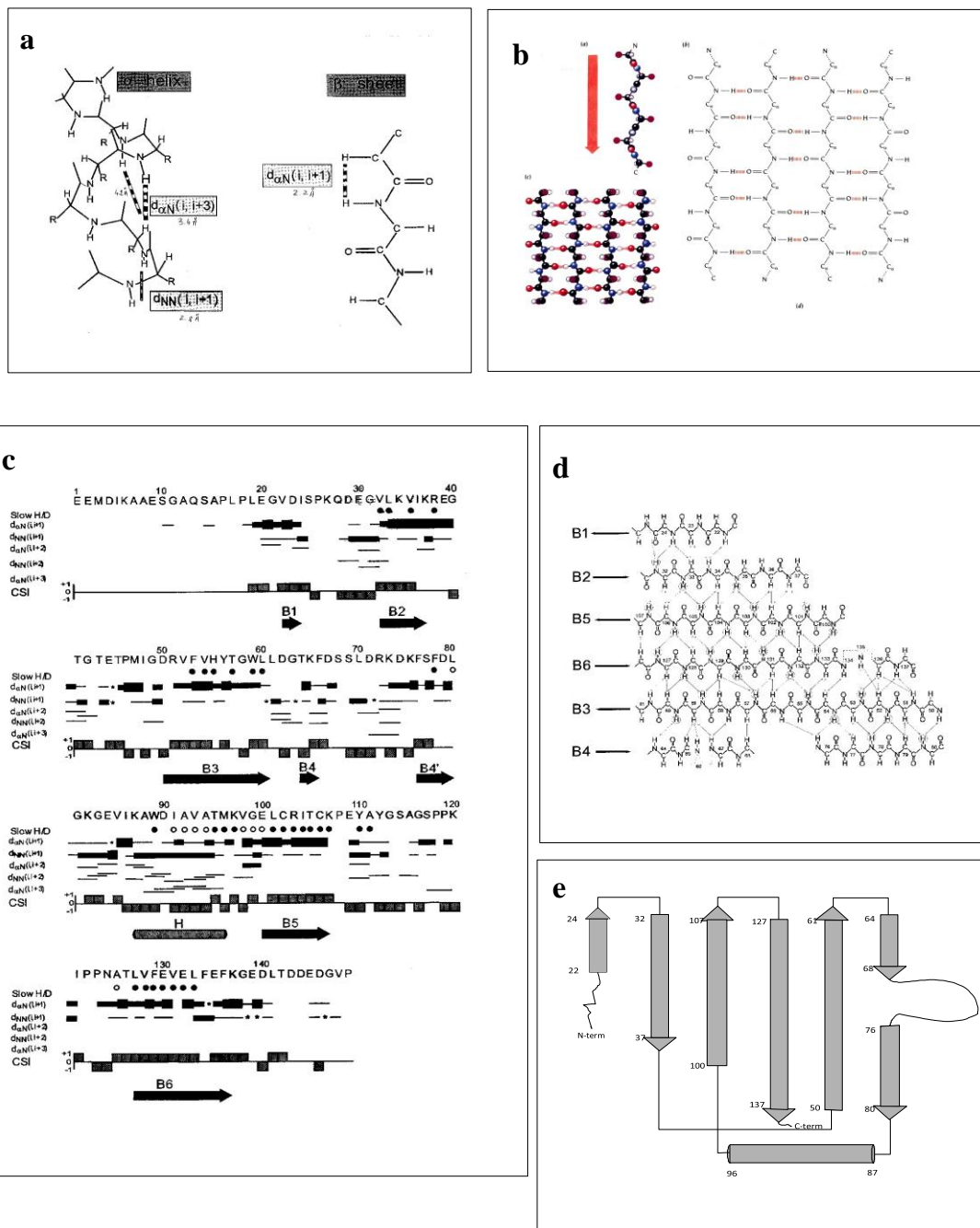


Figure 6

4. Les structures obtenues par RMN et leur évaluation

Du fait de la méthodologie suivie pour aboutir à la structure 3D, on n'obtient pas une structure unique, mais un ensemble de structures, en général bien superposées (fig 7c) dans les régions de structure secondaire définie.

Cette caractéristique des structures RMN est parfaitement corrélée avec le nombre de contraintes RMN incluses dans le calcul. En effet, les effets NOE (et les couplages), dont résultent les contraintes, ne peuvent être mesurés précisément que dans les régions relativement bien structurées et où les mouvements internes sont de faible amplitude et très rapides (échelle de la dizaine de ps). On dispose en général de moins de contraintes dans les boucles, ce qui se traduit par une dispersion plus importante qui décrit en fait une réalité physique. Les régions qui présentent plusieurs conformations d'énergie très voisine correspondent en effet à des zones dites « flexibles ». On peut par ailleurs accéder à des informations sur la dynamique de ces molécules grâce à l'analyse de la relaxation en RMN.

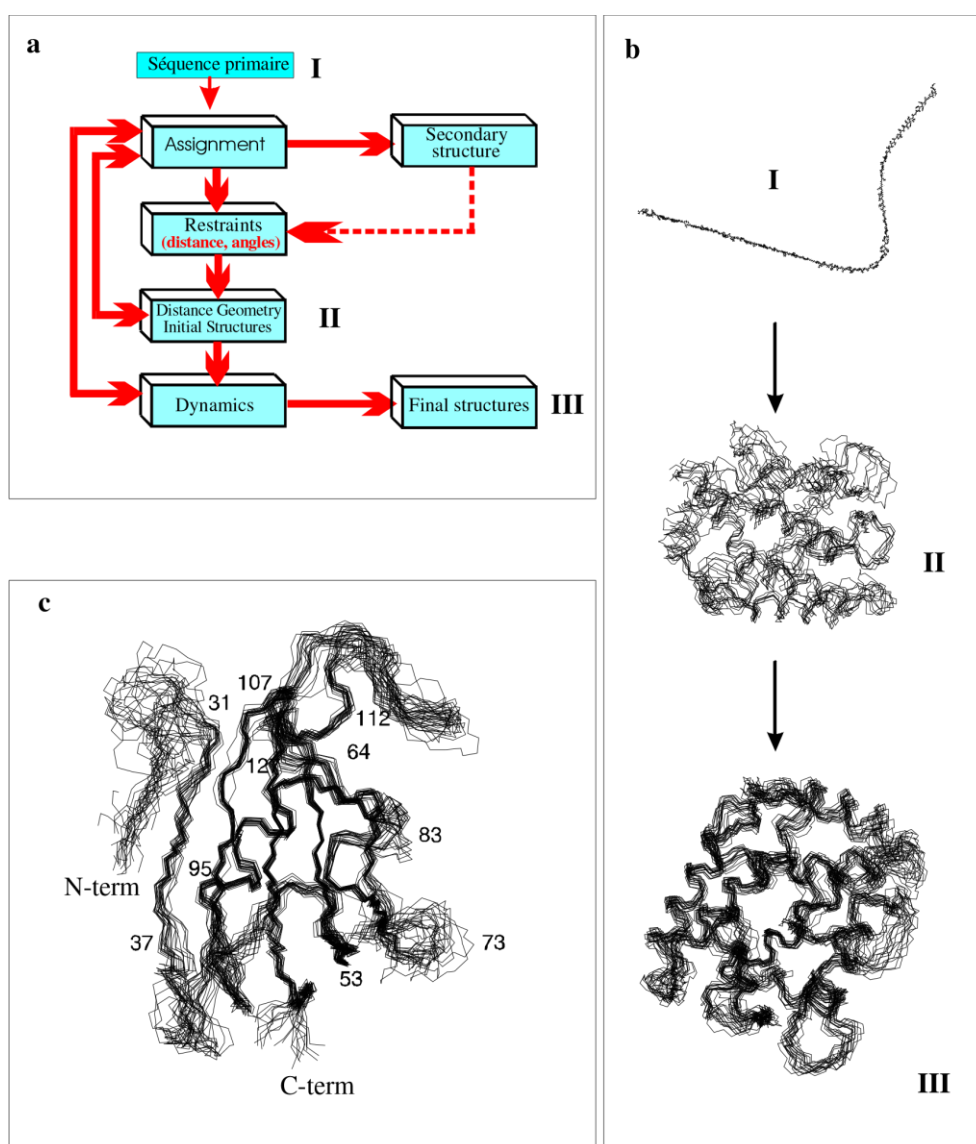


Figure 7