

Étude de la Dynamique des Macromolécules en Solution par Résonance Magnétique Nucléaire.

Pau Bernado, Guillaume Bouvignies et Martin Blackledge

Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire, Institut de Biologie Structurale, 41 Rue Jules Horowitz, Grenoble 38027.

L'activité d'une protéine est liée non seulement à sa structure, mais également à sa dynamique, et il est important de connaître la nature de ses mouvements pour comprendre sa fonction biologique. La résonance magnétique nucléaire est particulièrement utile pour étudier la dynamique d'une molécule en solution sur une gamme de temps de corrélation très large. En particulier, la relaxation des spins ^{15}N ou ^{13}C donne accès aux mouvements moléculaires avec les temps caractéristiques entre les dizaines de picosecondes et le temps de corrélation rotationnelle de la molécule (autour de 10ns pour une protéine monomérique de 20kD à 300K). Les vitesses de relaxation dépendent de la flexibilité de chaque site, et peuvent être caractérisé en termes d'amplitude et de temps caractéristique locale. La précision de ces paramètres et sa compréhension en termes de fonction exigent que la réorientation globale de la molécule soit correctement prise en compte. Ces méthodes expérimentales, qui seront présentées ici brièvement, font maintenant partie de la panoplie d'expériences appliquées dans l'étude de la relation structure-dynamique d'une protéine et ses partenaires. Néanmoins les mouvements plus lents, entre la nano et la milliseconde, sont plus difficiles à étudier, et très peu d'information est disponible sur la nature de la dynamique de la chaîne peptidique dans cette gamme de temps par RMN. Très récemment de nouvelles méthodologies ont été proposées, basées sur l'alignement préférentiel d'une protéine par rapport au champ magnétique, induit par dissolution de la molécule dans un liquide cristal très dilué. Dans ces conditions les changements conformationnelles d'un temps caractéristique plus lents (jusqu'au millisecondes) peuvent être étudiés. Nous présenterons cette technique, et quelques résultats, comparant la dynamique rapide (ps-ns), et plus lents la longue de la chaîne peptidique de quatre protéines.

Outline of the main points to be presented in the lecture :

1. Summary of motional time-scales that can be sampled using NMR spectroscopy, from the pico-second to days/weeks.
2. Brief description of spin-relaxation, and the time-window that measurement of this phenomenon can provide access to (pico-seconds to nano-seconds). This provides the most precise description of molecular motion in solution available using NMR. In combination with molecular dynamics simulations a model of molecular motion can be developed. Limits of the interpretation of these data will be presented (the overall correlation time of the molecule).
3. Presentation of rotating frame dispersion experiments, that can allow access to slower motions of the order of micro to milli-seconds.
4. Recently intense interest has focussed on the use of dilute liquid crystals to weakly align proteins and thereby induce a small degree of anisotropy into the angular sampling experienced by the molecule of interest.^{1,2} First order interactions, in particular dipolar couplings are no longer averaged to zero under these conditions but retain a residual component which provides highly precise information defining the orientation of internuclear bonds relative to a molecule-fixed frame, a characteristic that makes these parameters particularly powerful for biomolecular structure determination.^{3,4,5} These measurements also report on averages over long time-scales (up to the millisecond range) and are thus highly complementary to motions detected from spin relaxation studies. Residual dipolar couplings therefore encode key information for understanding protein motions in the sub-micro to milli second range, and since the earliest work on weak alignment of proteins numerous approaches have been developed to extract this information. These time scales are of particular interest because a large number of functionally important biological processes are suggested to occur in this time range. We,⁶ and others,⁷ have recently investigated the possibility of interpreting

⁽¹⁾ Tjandra, N.; Bax, A. *Science*, **1997**, *278*, 1111-1114.

⁽²⁾ Tolman, J.R.; Flanagan, J.M.; Kennedy, M.A.; Prestegard, J.H. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1995**, *92*, 9279-9283.

⁽³⁾ Prestegard, J. H.; Al-Hashimi, H. M.; Tolman, J. R. *Quart. Rev. Biophys.* **2000**, *33*, 371-424

⁽⁴⁾ Bax, A.; Kontaxis, G.; Tjandra, N. *Methods in Enzymology*, **2001**, *339*, 127-174.

⁽⁵⁾ de Alba, E.; Tjandra, N. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **2002**, *40*, 175-197.

⁽⁶⁾ Bernado, P.; Blackledge, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 4907-4920. Bernado, P.; Blackledge, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *In Press*.

⁽⁷⁾ Meiler, J.; Prompers, J.J.; Peti, W.; Griesinger, C.; Brüschweiler, R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 6098-6107. Peti, W.; Meiler, J.; Brüschweiler, R.; Griesinger, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 5822-5833. Tolman, J.R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12020-12030. Briggman, K.B.; Tolman, J.R. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 10164-10165.

conformational averaging of residual dipolar couplings in terms of local motional models. Results, (see figure) comparing rapid motions, derived from spin relaxation measurements, and motions of the entire range up to the millisecond, derived from residual dipolar couplings will be presented. Initial results suggest that while alpha-helices retains a degree of structural integrity similar to that observed on the faster time-scale, different loop regions exhibit large amplitude motions on either fast or slower time-scales.

