

Structure et repliement des protéines

Dirk Stratmann (dirk.stratmann@upmc.fr)

<http://www.imPMC.upmc.fr/~stratmann/>

IMPMC, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

octobre 2015

Plan

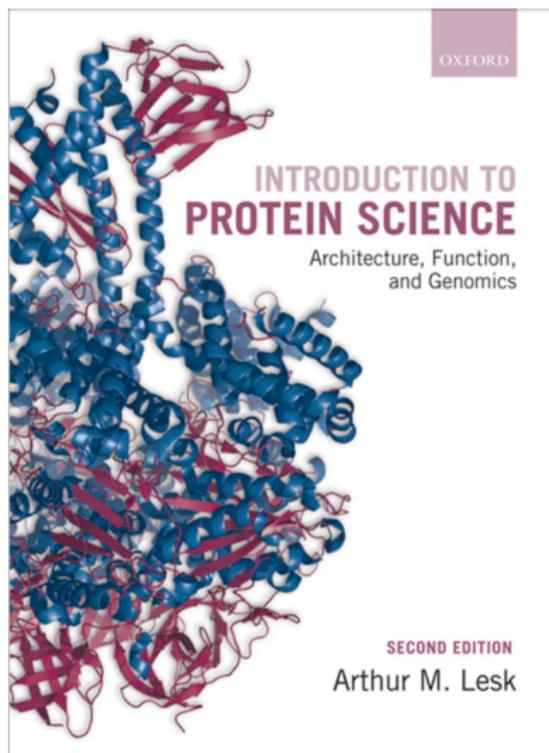
- 1 Stabilité de l'état natif, replié
- 2 Processus du repliement
- 3 Techniques expérimentales
- 4 Protéines qui se replient rapidement
- 5 Repliement par dynamique moléculaire
- 6 Repliement in vivo
- 7 Bibliographie

1 Stabilité de l'état natif, replié

- Repliement des protéines - une bonne introduction
- Stabilité de l'état natif, replié
- Énergie libre de l'état natif

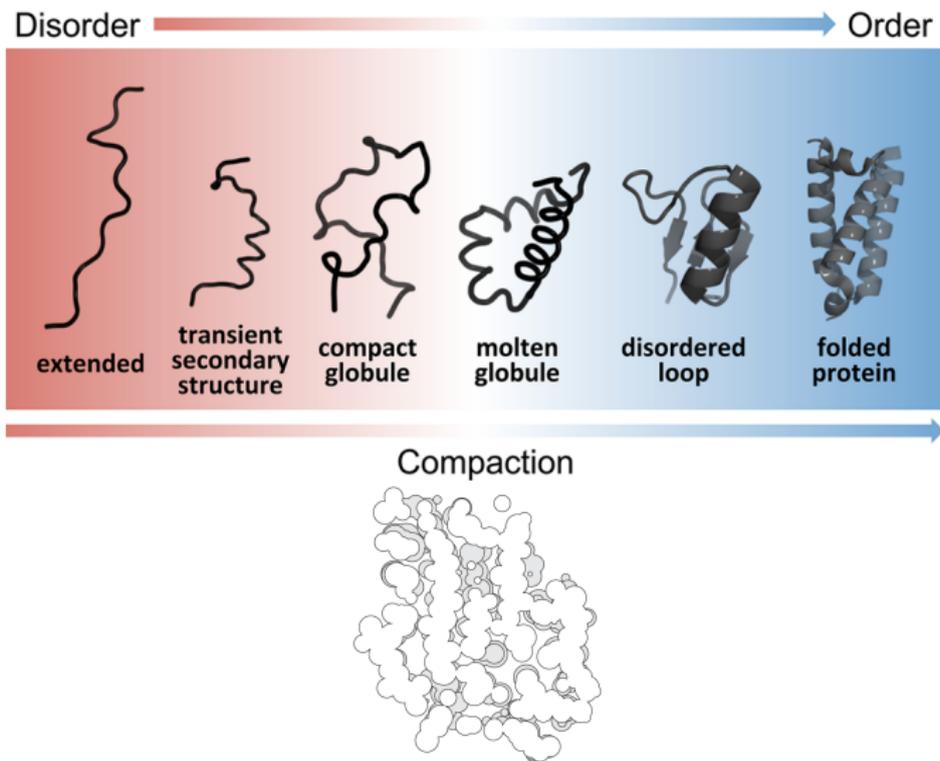
Repliement des protéines - une bonne introduction

Arthur M. Lesk - Introduction to protein science

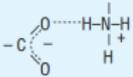
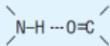
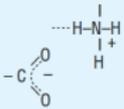


Stabilité de l'état natif, replié

Protéines globulaires



Facteurs qui stabilisent l'état natif

Chemical Interactions that Stabilize Polypeptides				
Interaction	Example	Distance dependence	Typical distance	Free energy (bond dissociation enthalpies for the covalent bonds)
Covalent bond	$-C_{\alpha}-C-$	-	1.5 Å	356 kJ/mole (610 kJ/mole for a C=C bond)
Disulfide bond	$-Cys-S-S-Cys-$	-	2.2 Å	167 kJ/mole
Salt bridge		Donor (here N), and acceptor (here O) atoms <3.5 Å	2.8 Å	12.5–17 kJ/mole; may be as high as 30 kJ/mole for fully or partially buried salt bridges (see text), less if the salt bridge is external
Hydrogen bond		Donor (here N), and acceptor (here O) atoms <3.5 Å	3.0 Å	2–6 kJ/mole in water; 12.5–21 kJ/mole if either donor or acceptor is charged
Long-range electrostatic interaction		Depends on dielectric constant of medium. Screened by water. $1/r$ dependence	Variable	Depends on distance and environment. Can be very strong in nonpolar region but very weak in water
Van der Waals interaction		Short range. Falls off rapidly beyond 4 Å separation. $1/r^6$ dependence	3.5 Å	4 kJ/mole (4–17 in protein interior) depending on the size of the group (for comparison, the average thermal energy of molecules at room temperature is 2.5 kJ/mole)

Forces : ordres grandeur

- Contribution à l'enthalpie : Interactions **non liées**
 - Force hydrophobe (groupes non polaires) : majoritaire
 - Forces de van der Waals (dipoles): 0.1 kcal/mol par atome (0.4 kJ/mol) ; entre groupes non polaires
 - Liaison hydrogène (groupes polaires) 4kcal/mol dans le vide (16 kJ/mol)
 - Ponts salins (groupes polaires). Liaisons ioniques de l'ordre de 3 kcal/mol dans l'eau (12.5 kJ/mol) ; transfert complet d'électron. Moyenne de 5 paires d'ions pour 150 résidus → 15 kcal/mol
 - Interaction π Cations
- **Agitation thermique** $k_B T = 2,5$ kJ/mol à l'ambiante, même ordre de grandeur que les liaisons non covalentes

Interactions Cations π

Interactions entre cations & électrons π = forces de liaison non covalentes

Géométrie préférée d'un cation interagissant avec un cycle benzénique = cation au dessus du centre du cycle, le long de l'axe d'ordre 6

Liaison de l'ordre de grandeur d'une liaison H

Chaînes latérales les plus favorables Phe, Tyr, **Trp** (le plus fort), His

Facteurs qui stabilisent l'état natif

Liaisons covalentes: ponts di-sulfures, exemple Crambin (1CRN):

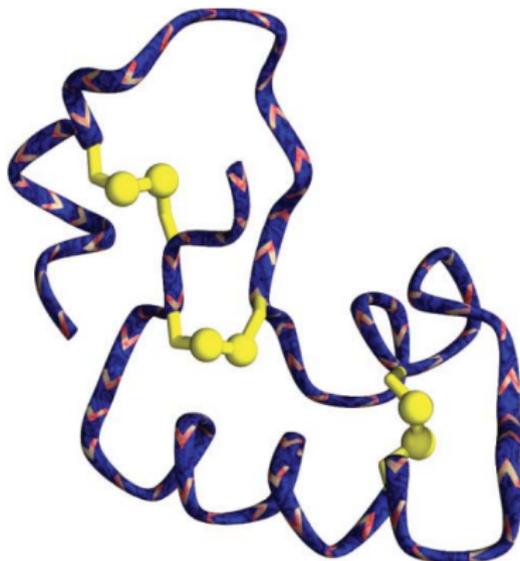
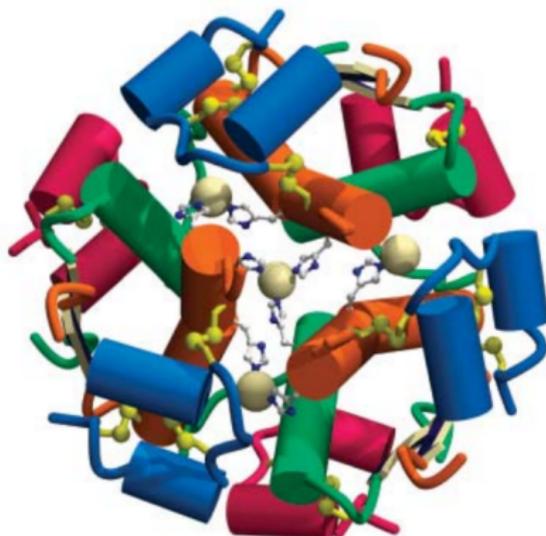


Figure 2.5 Crambin [1CRN]. The yellow double-lollypops are disulphide bridges.

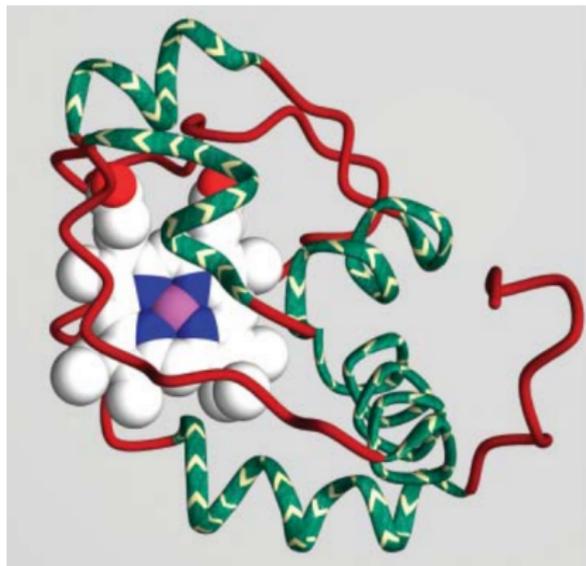
Facteurs qui stabilisent l'état natif

Ponts di-sulfures et ions métalliques, exemple insuline hexamer avec 4 zinc (4ZNI):



Facteurs qui stabilisent l'état natif

Ions métalliques dans un ligand, exemple cytochrome c (1CCR):

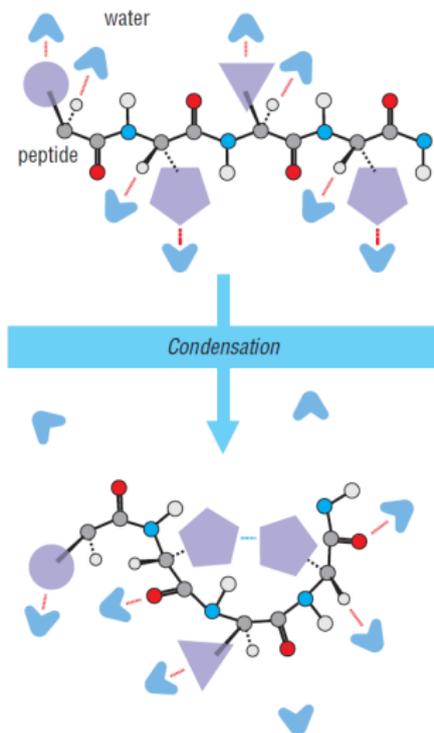


Facteurs qui stabilisent l'état natif

Liaisons hydrogènes:

- Le squelette forme des liaisons hydrogènes, car il est polaire
- État dénaturée: liaisons hydrogènes avec l'eau
- État natif: liaisons hydrogènes entre les résidus => formation de structures secondaires
- Liaisons hydrogènes aussi avec des cofacteurs et des ligands

Facteurs qui stabilisent l'état natif



Facteurs qui stabilisent l'état natif

Liaisons hydrogènes:

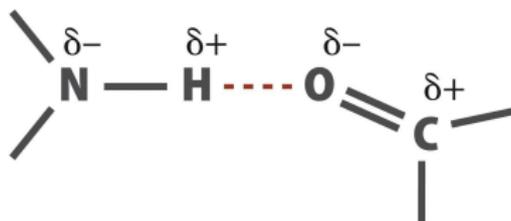


Figure 1.18 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

- Charges partielles: N: -0.4, H: +0.2, O: -0.5, C: +0.5
- Très directionnel: Angle linéaire pour N-H...O et entre 120 et 180 pour C=O...H
- Liaison légèrement covalente, car on observe du couplage J en RMN à travers la liaison hydrogène.
- Énergie: 15-20 kJ / mol (valeur égale entre peptide-peptide et peptide-eau)

Facteurs qui stabilisent l'état natif

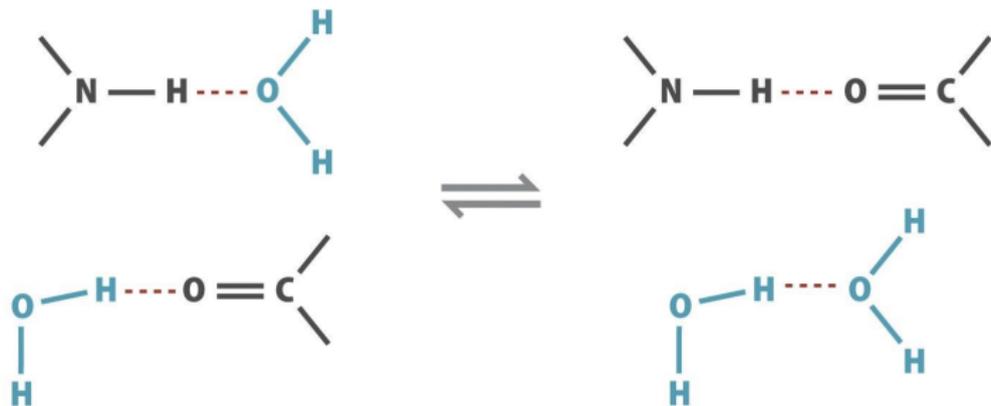
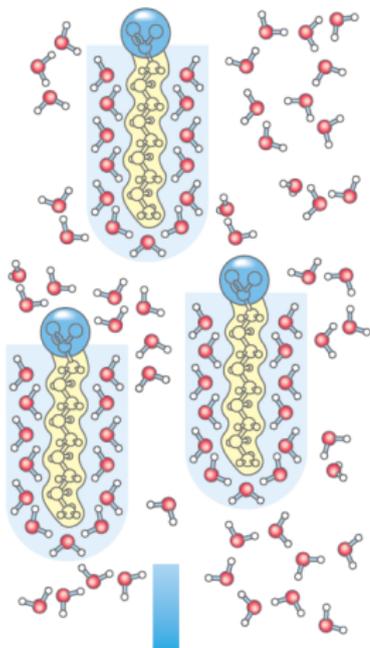


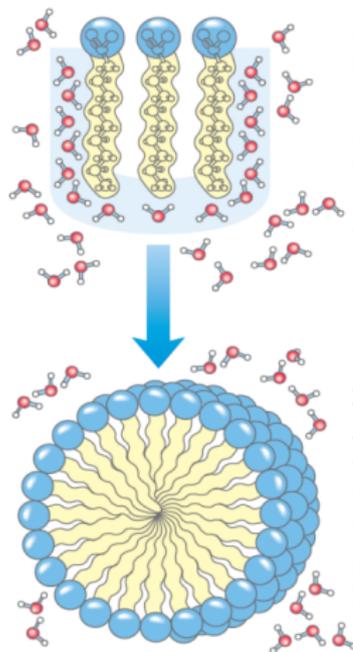
Figure 1.19 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

Effet hydrophobe, ex: micelles



Dispersion of lipids in H₂O

Each lipid molecule forces surrounding H₂O molecules to become highly ordered.



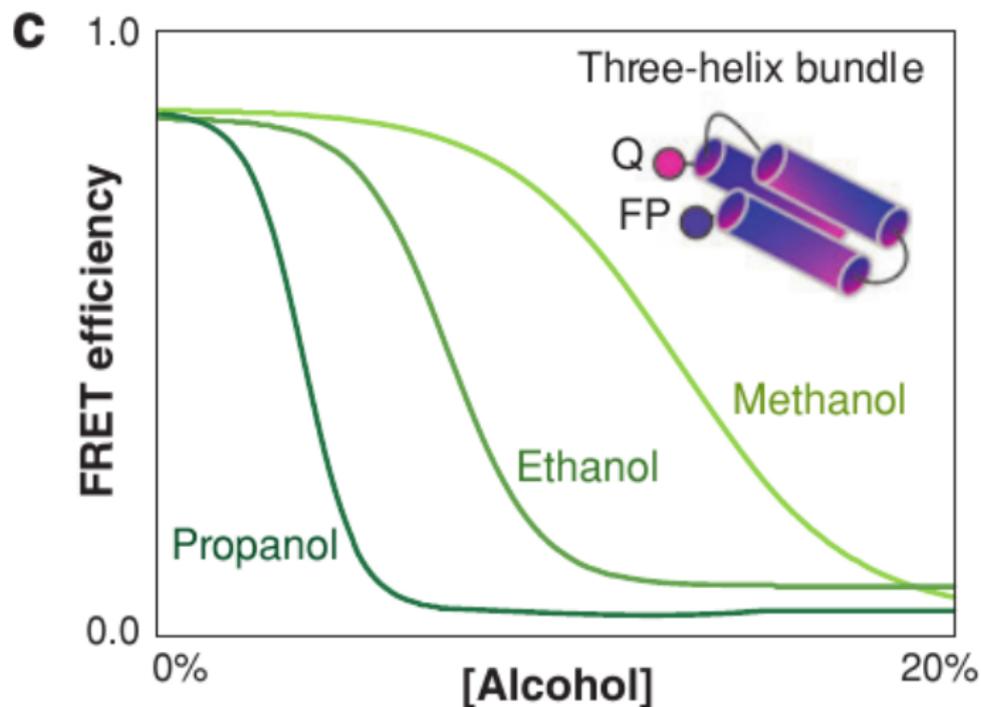
Clusters of lipid molecules

Only lipid portions at the edge of the cluster force the ordering of water. Fewer H₂O molecules are ordered, and entropy is increased.

Micelles

All hydrophobic groups are sequestered from water; ordered shell of H₂O molecules is minimized, and entropy is further increased.

Protéine dans l'acohol



Amino Acid	Group	Engleman et al.(3)	Kyte and Doolittle (2)	Hoop and Woods (4)
Phe	Nonpolar	3.7	2.8	-2.5
Met	Nonpolar	3.4	1.9	-1.3
Ile	Nonpolar	3.1	4.5	-1.8
Leu	Nonpolar	2.8	3.8	-1.8
Val	Nonpolar	2.6	4.2	-1.5
Cys	Unch/Polar	2.0	2.5	-1.0
Trp	Nonpolar	1.9	-0.9	-3.4
Ala	Nonpolar	1.6	1.8	-0.5
Thr	Unch/Polar	1.2	-0.7	-0.4
Gly	Nonpolar	1.0	-0.4	0.0
Ser	Unch/Polar	0.6	-0.8	0.3
Pro	Nonpolar	-0.2	-1.6	0.0
Tyr	Unch/Polar	-0.7	-1.3	-2.3
His	Charged (+)	-3.0	-3.2	-0.5
Gln	Unch/Polar	-4.1	-3.5	0.2
Asn	Unch/Polar	-4.8	-3.5	0.2
Glu	Charged (-)	-8.2	-3.5	3.0
Lys	Charged (+)	-8.8	-3.9	3.0
Asp	Charged (-)	-9.2	-3.5	3.0
Arg	Charged (+)	-12.3	-4.5	3.0

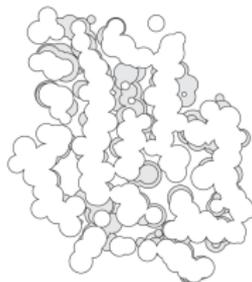
Accessible and buried surface area (ASA, BSA)

Effet hydrophobe => maximiser la surface enfouie

- Chaque \AA^2 de surface enfouie contribue à peu près à 6 J/mol pour ΔG .
- Formation d'oligomères: 1000 à 5000 \AA^2
- Très défavorable d'enfouir des chaînes latérales chargées, car elles forment déjà des liaisons très favorables avec l'eau.
- On peut avoir des surfaces hydrophobes => sites de liaisons protéine-protéine

Facteurs qui stabilisent l'état natif

Compactification:



- Améliore les forces attractives de van der Waals

van der Waals

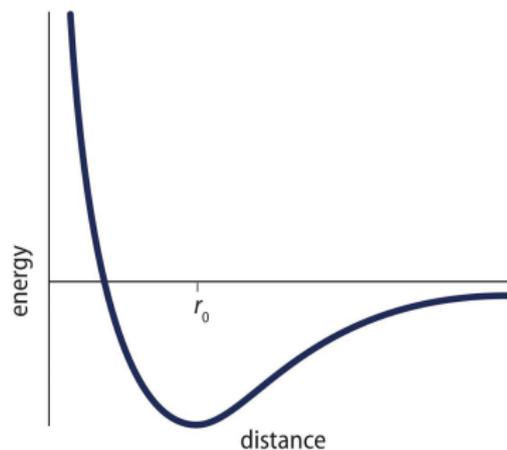


Figure 1.20 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

- Fluctuations de la densité des électrons autour du noyau d'un atome, créent un moment dipolaire temporaire.
- Ce moment dipolaire induit à un autre atome très proche aussi un moment dipolaire transitoire
- Résultat: force attractive, faible mais additive

Paramètres expérimentaux

- Température : augmente énergies vibration & rotation
- Pression (modification du solvant, liaisons H rompues)
- pH (interactions électrostatiques) : dépliement ≤ 5 & ≥ 10
- Agent chimique :
 - Urée
 - TFE (2,2,2-trifluoro-ethanol, $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$) favorise hélices
 - chlorure de guanidinium (GuHCl) très fréquent
- Mutations peuvent modifier la cinétique

Cooperativité

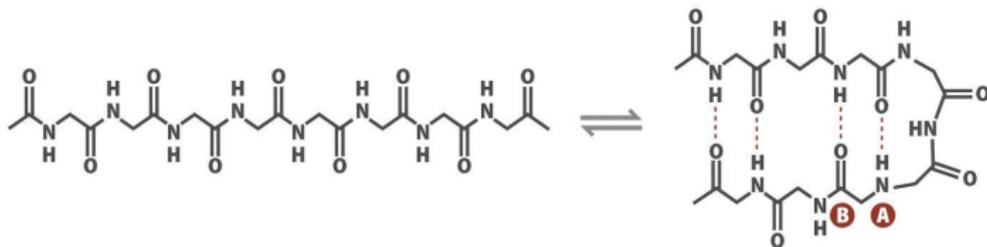


Figure 1.25 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

Coopérativité

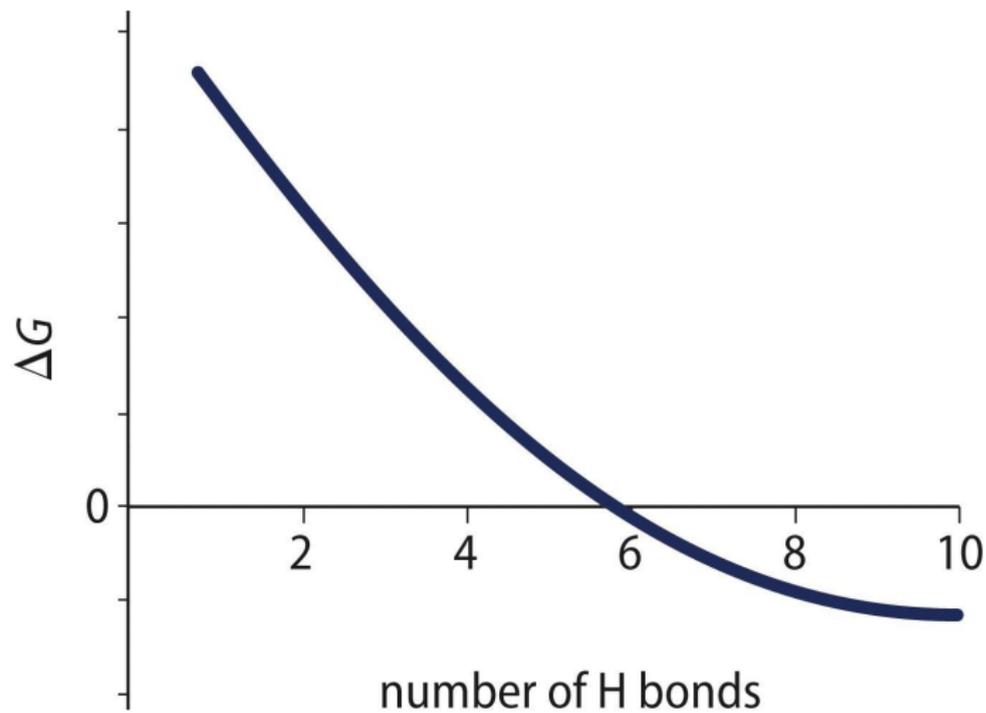
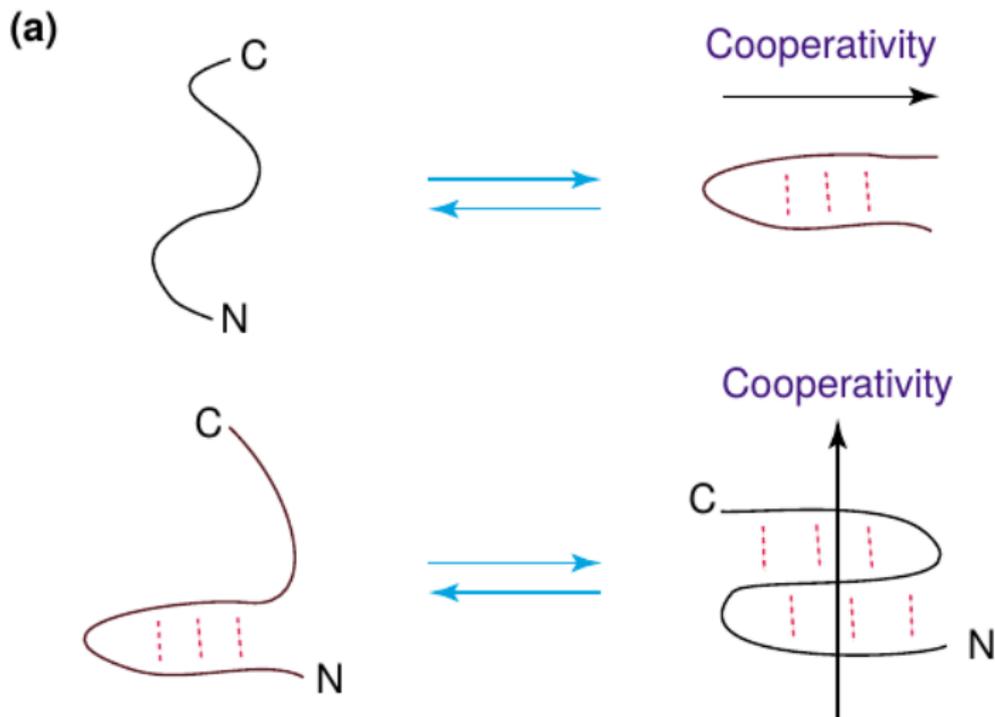
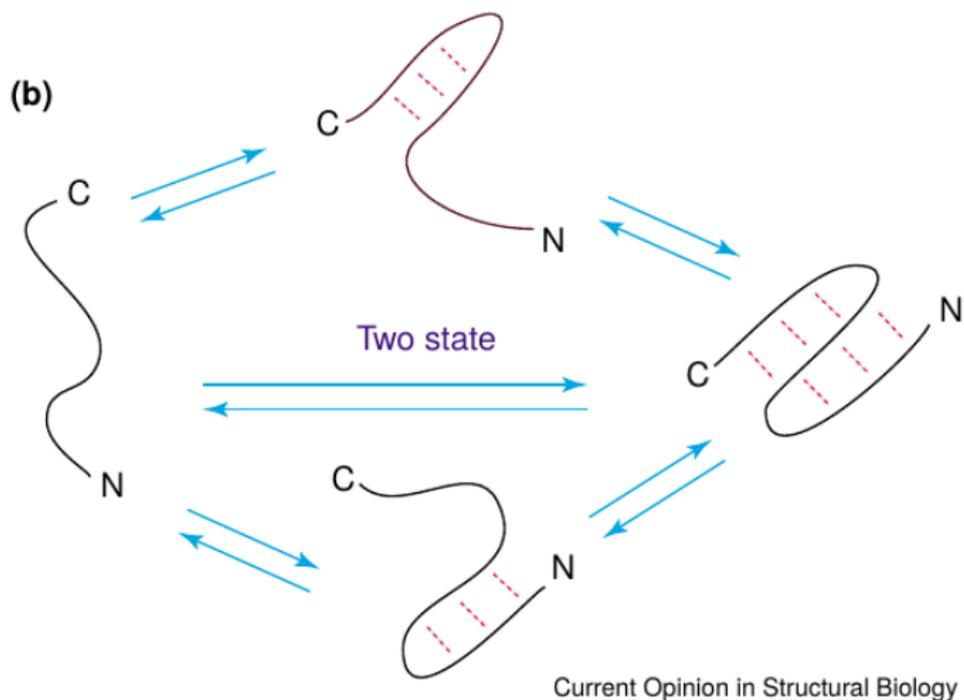


Figure 1.26 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

Cooperativité



Two or four state model ?



Compensation Enthalpie / Entropie

(a)



(b)

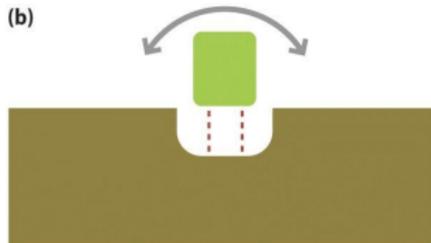


Figure 1.29 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

Compensation Enthalpie / Entropie

Plusieurs facteurs possibles:

- solvant (eau)
- mobilité protéine et ligand
- protéine dénaturée = système non-corrélé avec beaucoup de degrés de liberté
- protéine native = système hautement corrélé avec peu de degrés de liberté

Difficile de savoir d'avance qui domine dans un cas concret.

Compensation Enthalpie / Entropie

Redistribution des forces de liaison (+uniforme, +mobile => +Entropie):

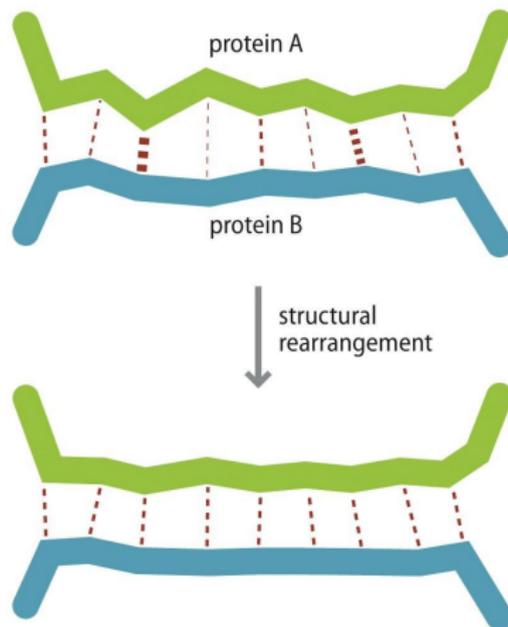
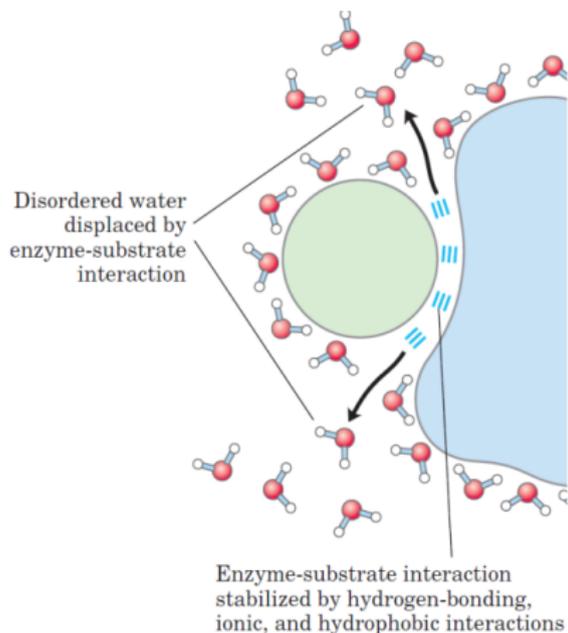
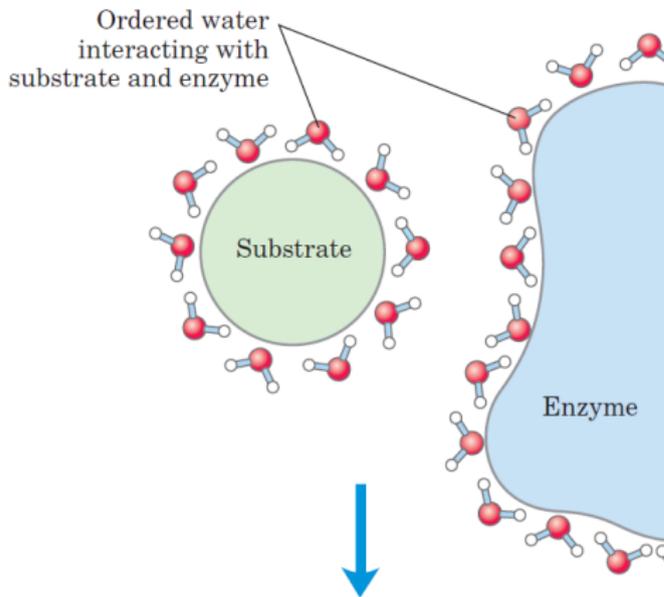


Figure 1.30 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

Désolvatation

Désolvatation:



Énergie libre de l'état natif

Enthalpie H

- $H = U + pV$, U énergie interne du système
- Exemple: chauffer un gaz depuis $T=0$, avec pression constante autour:
 - Augmenter U du gaz
 - Fournir l'énergie pV en plus pour l'expansion du gaz contre la pression extérieure
- Physique => on n'utilise souvent que U
- Chimie => on utilise H , car expériences sous pression atmosphérique constante
- ΔH *chaleur de réaction*
- $\Delta H < 0$ exothermique, $\Delta H > 0$ endothermique

Entropie S -> Énergie libre G

- Séparer le changement d'entropie en deux parties (système et externe):

$$\Delta S_{total} = \Delta S_{ext} + \Delta S_{sys}$$

- $\Delta H < 0$ exothermique => plus de désordre à l'extérieur
- $\Delta S_{ext} = \frac{-\Delta H}{T} > 0$
- Processus spontané si:

$$\Delta S_{ext} + \Delta S_{sys} = \frac{-\Delta H}{T} + \Delta S_{sys} > 0$$

Entropie S -> Énergie libre G

- Définition:

$$\Delta S_{total} = \frac{-\Delta G}{T}$$

- Conséquence:

$$\frac{-\Delta G}{T} = \frac{-\Delta H}{T} + \Delta S_{sys}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S_{sys}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

- Pourquoi avoir introduit G ?

- Processus spontané si $\Delta G < 0$, en analogie à $\Delta H < 0$ (exothermique)
- Unité de G: énergie de 1 mol ($6.02 * 10^{23}$) de particules
- Unité SI de G: kJ/mol, on trouve aussi kcal/mol, avec $1\text{kJ/mol} = 0.239\text{ kcal/mol}$
- Pour $T=25\text{ C}$ on a aussi $1\text{ kJ/mol} = 0.4 k_B T$

Énergie libre et repliement des protéines

- Stabilité d'une protéine, mesurée par: $\Delta G = G(\text{Native}) - G(\text{Dénaturée})$
- Valeurs typiques pour $T = 298 \text{ K}$: entre -20 à -60 kJ/mol
- Correspond à 2-3 liaisons hydrogènes seulement !
- ΔG relativement petit par rapport aux valeurs de ΔH et $T\Delta S$.
- Grande perte d'entropie, car plus de degré de liberté en forme dénaturée
- Compensée par la formation des liaisons intra-chaîne et l'effet hydrophobe

Énergie libre et repliement des protéines

Table 8.2 Thermodynamics of protein folding at 298 K

Protein	ΔG° (kJ mol ⁻¹)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	$T\Delta S^\circ$ (kJ mol ⁻¹)
CI2	-27.7	-135	-107.3
Eglin c	-36.9	-115	-78.1
RNase T1	-37.5	-281	-243.6
Cytochrome c	-37.1	-89	-51.9
Barnase	-48.9	-307	-258.2
Lysozyme	-57.8	-242	-184.3
Chymotrypsin	-45.7	-268	-222.4
Tendamistat	-37.5	-70	-32.5

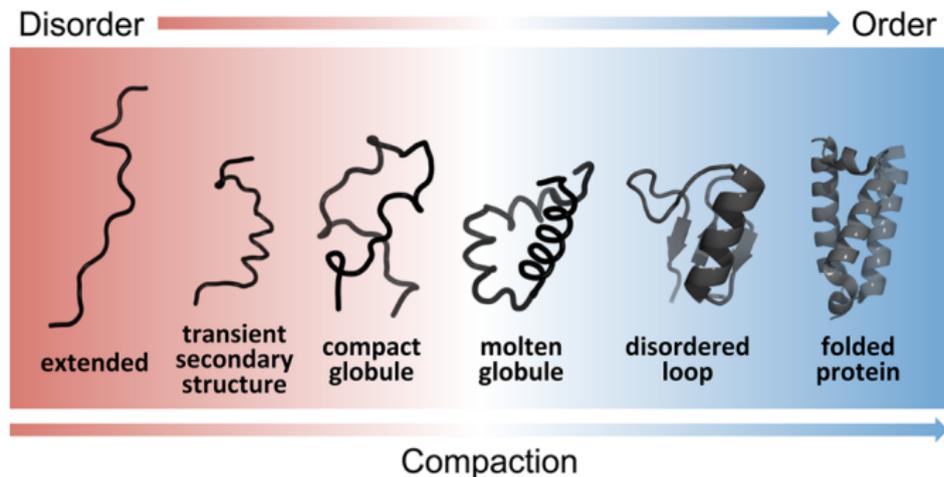
From: Makhatadze, G.I. and Privalov, P.L. (1995). Energetics of protein structure. *Adv. Prot. Chem.*, **47**, 307–425.

2 Processus du repliement

- Processus du repliement
- Réaction à deux états
- État déplié
- Mutations et $\Delta\Delta G$

Processus du repliement

Repliement



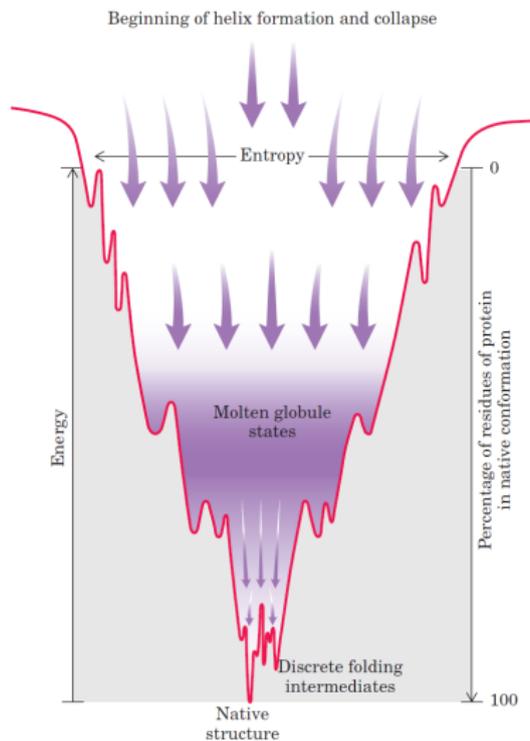
- Molten globule: interactions hydrophobes
- Structure 3D finale: liaisons hydrogènes

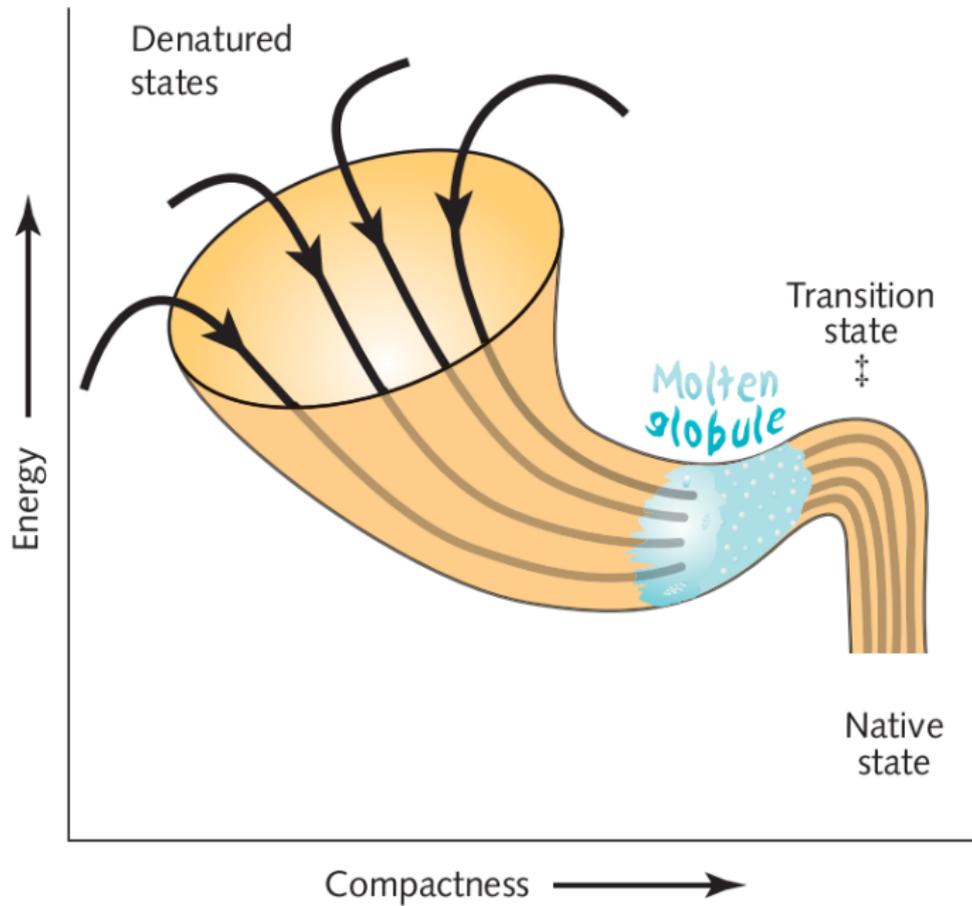
Pourquoi est le repliement des protéines si rapide ?

Paradoxe de Levinthal (1968):

- chaque résidu n'a que deux possibilité de conformation
- une protéine de 100 résidu aurait $2^{100} \approx 10^{30}$ conformations possibles.
- Conclusion: une protéine ne peut pas se replier par une recherche au hasard de la conformation native
- Elle doit suivre un chemin de repliement (*folding pathway*) plus efficace.

Entonnoir du repliement





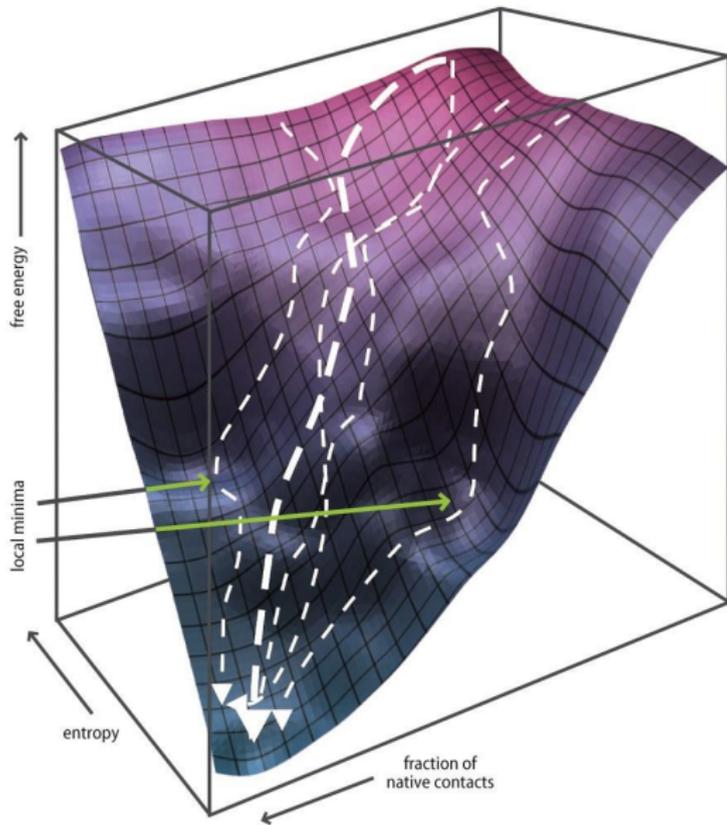
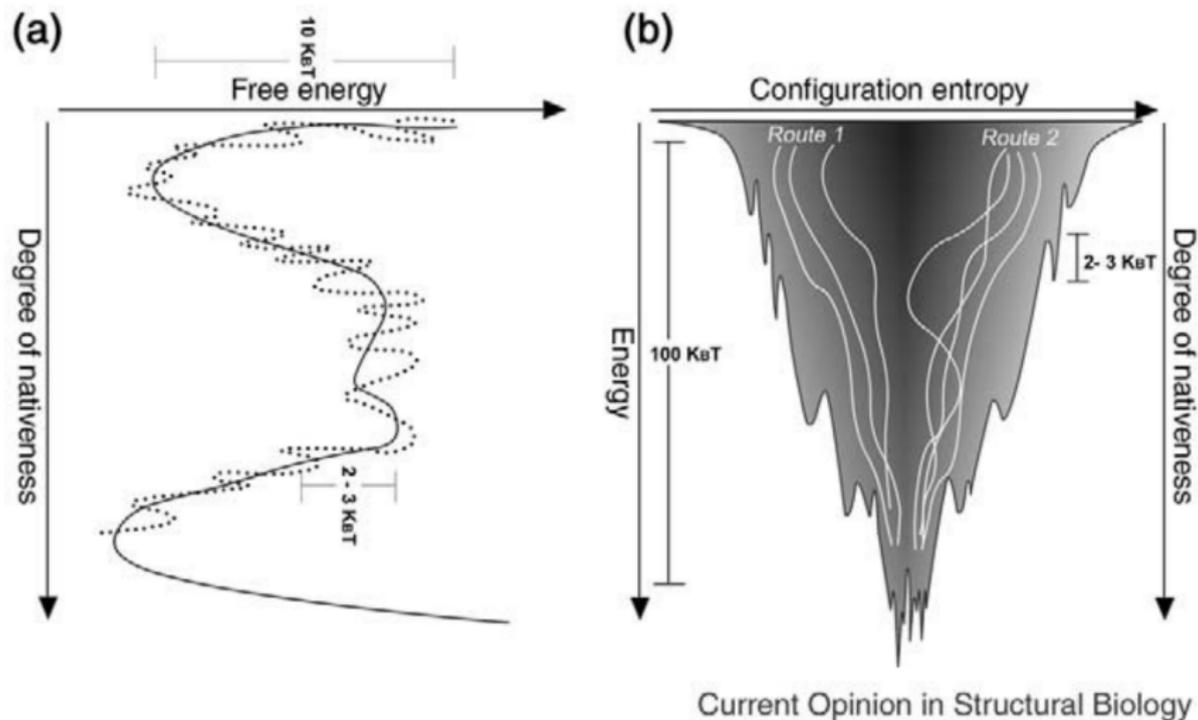
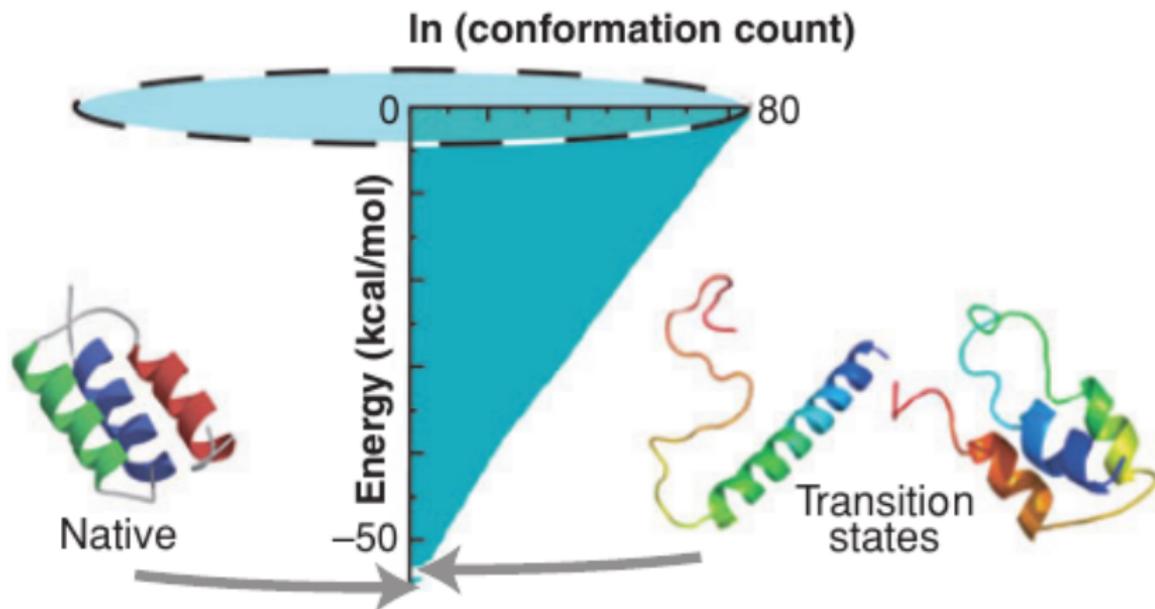


Figure 6.15 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

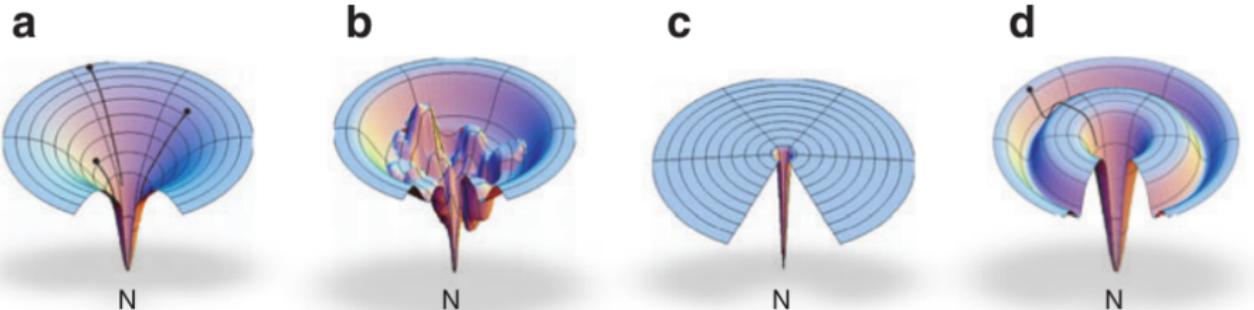
Entonnoir du repliement



Entonnoir du repliement



Entonnoir du repliement



a: fast folder

b: kinetic traps

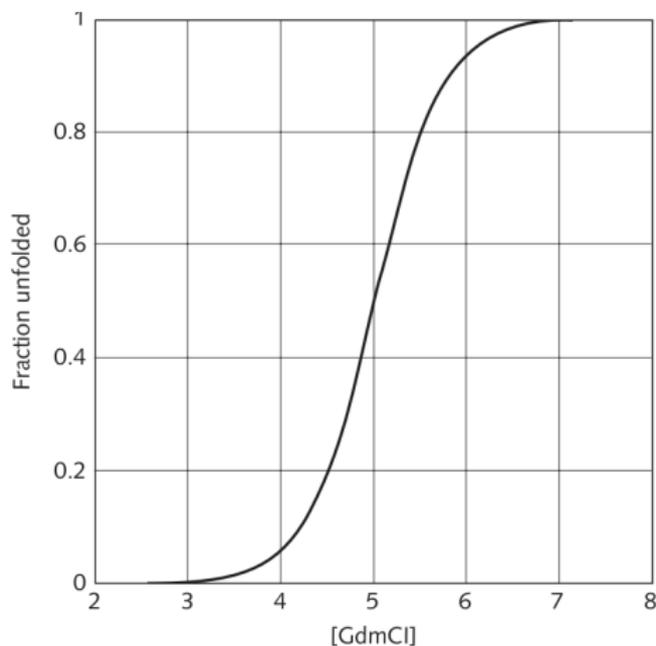
c: diffusional conformational search

d: obligatory intermediate

Ken A. Dill et al. (2008). en. In: *Annual Review of Biophysics* 37.1

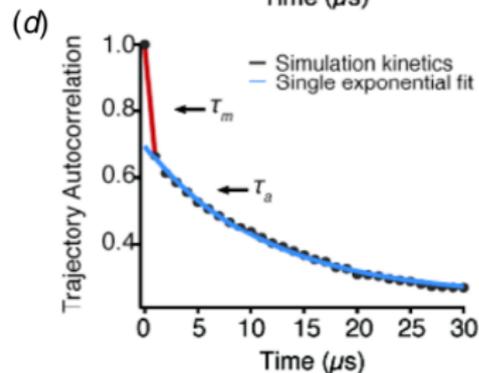
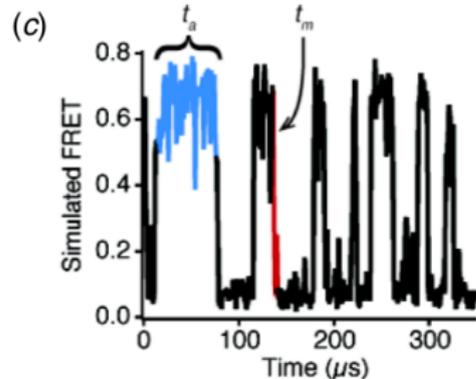
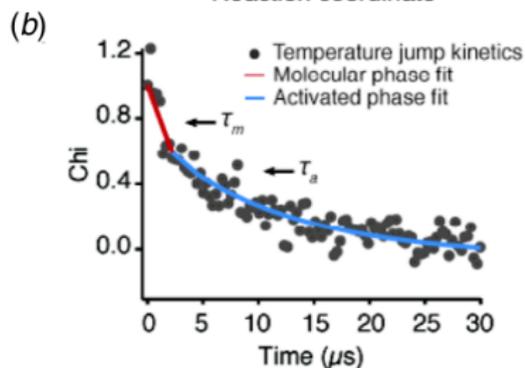
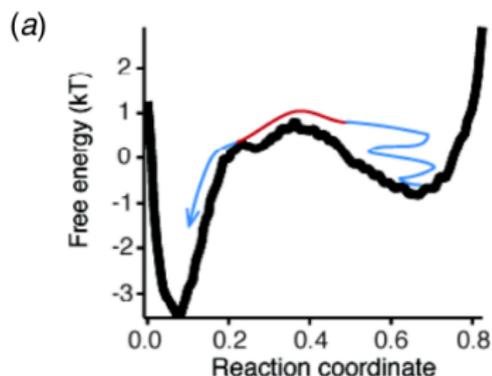
Réaction à deux états

Cinétique d'une transition entre deux états



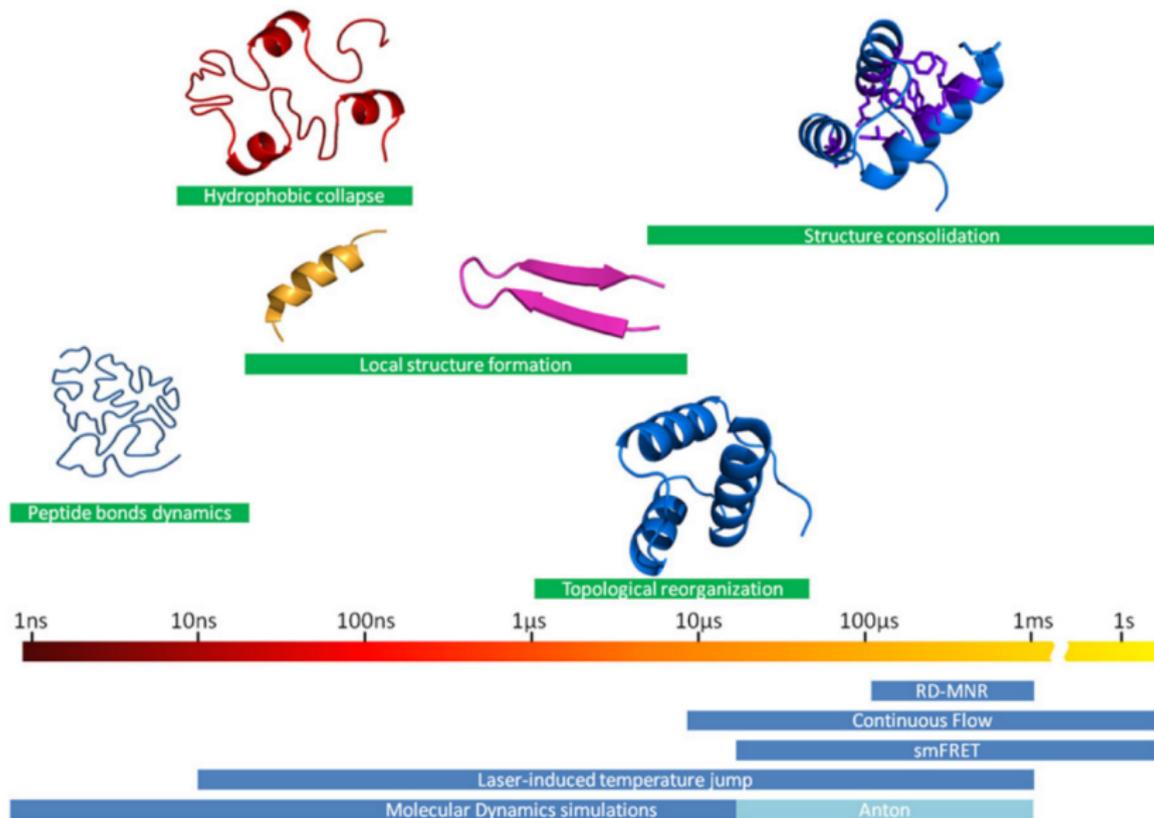
- Dénaturation (*Unfolding*)
- Transition rapide entre native et dénaturée
- => Pas d'état intermédiaire stable

Cinétique d'une transition entre deux états



Vitesses du repliement

- Hélices se forment plus rapidement que des feuillet
- Hélices \Leftrightarrow contacts proches dans la séquence
- Feuillet \Leftrightarrow contacts distants dans la séquence
- Hélices: $0.1 - 1 \mu s$, β -hairpins: $1 - 10 \mu s$
- La vitesse 'limite' du repliement: $N/50 \mu s$, N: nombre de résidus



Étapes typiques du repliement

- 1 Compactification rapide et formation de structures 2D: m_s
 - Formation du *Molten globule* avec $R_G + 10\%$ de sa valeur native
 - Analogie: liquide $+10\%$ du volume du solide (exception: eau)
- 2 Formation de la structure tertiaire: $m_s - s$
 - Chaines latérales enfouies sont encore mobiles
- 3 "Cristallisation" finale à l'état natif: $\leq s$
 - Expulsion de l'eau de l'intérieur
 - Imbrication et stabilisation des chaines latérales enfouies

Molten globule

- état intermédiaire du repliement
- compact, mais pas aussi compact qu'en native: +10% en R_G
- structures 2D proche natives
- topologie correct, mais pas la structure tertiaire
- RMN: Les protons NH ne sont pas encore protégés de l'échange avec le deutérium.
- Plus de flexibilité structural, conversion rapide entre plusieurs conformations.

État déplié

Rayon de giration

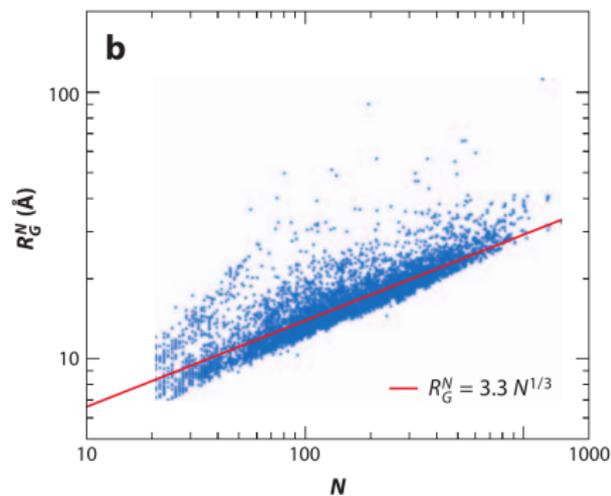
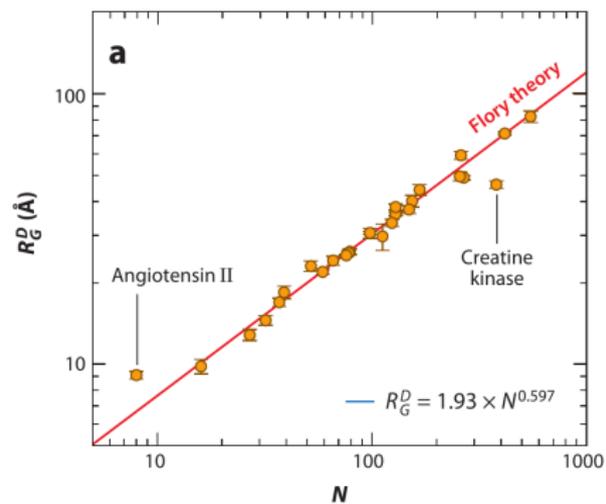
Protein	Number of residues	R_G (native)	R_G (denatured)	Ratio
PI3 kinase, SH3 domain	90	18.6	27.5	0.7
Horse heart cytochrome c	104	17.8	32.6	0.5
Hen egg white lysozyme	129	20.5	34.6	0.6
Yeast triose phosphate isomerase	247	29.7	49.7	0.6

- Si centre de gravité à l'origine, alors:

$$R_G = \sqrt{\frac{\sum_i m_i (x_i^2 + y_i^2 + z_i^2)}{\sum_i m_i}}$$

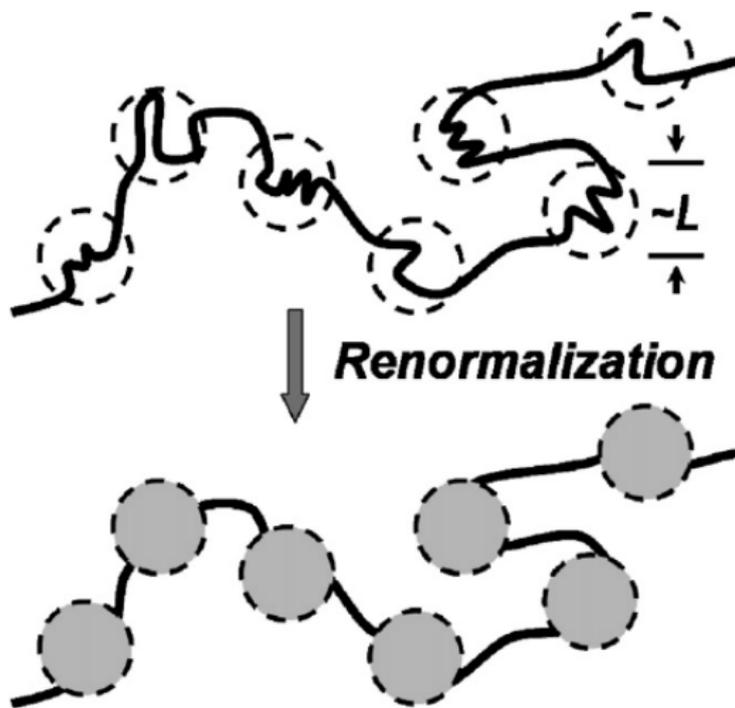
- Random coil: $R_G \propto N^{0.6}$ avec N nombre de résidus
- Globule compacte: $R_G \propto N^{0.33}$

Rayon de giration

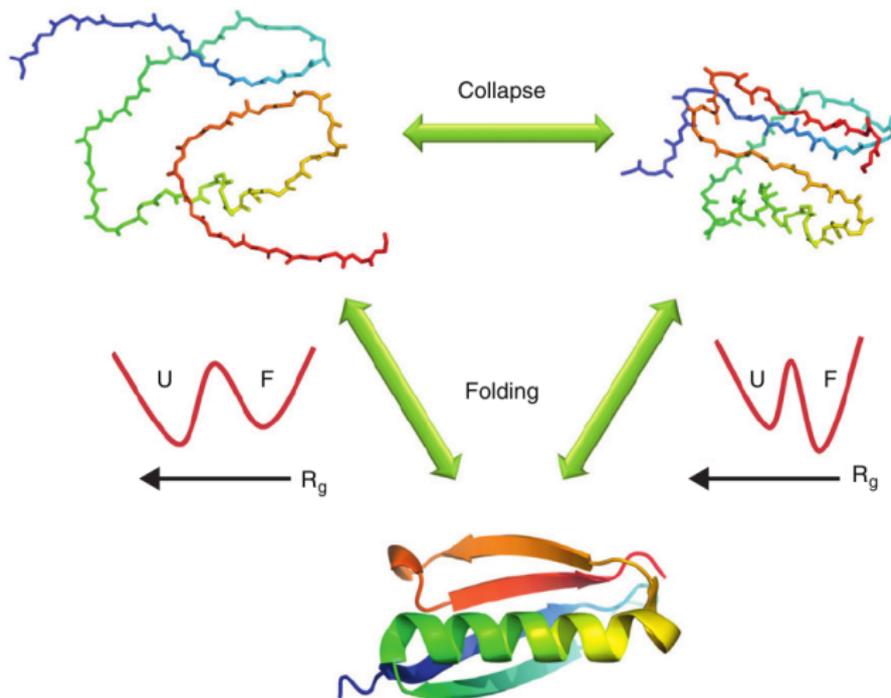


D. Thirumalai et al. (2010). In: *Annual Review of Biophysics* 39.1

Protéine dépliée = polymer sans interaction

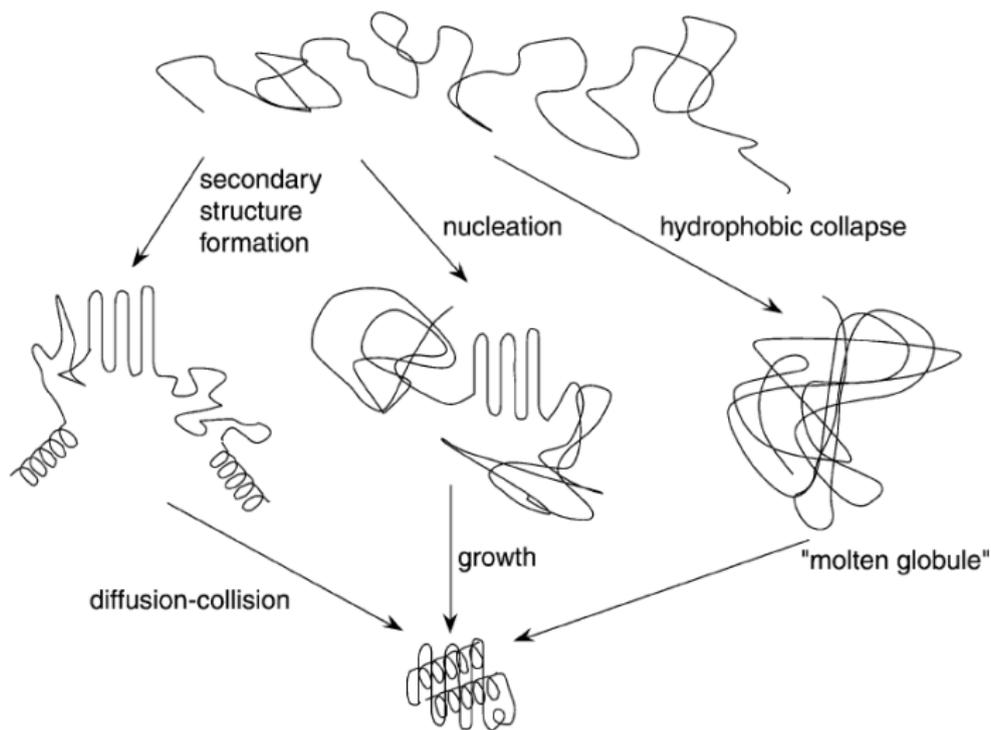


Collapse et perte d'entropie



Current Opinion in Structural Biology

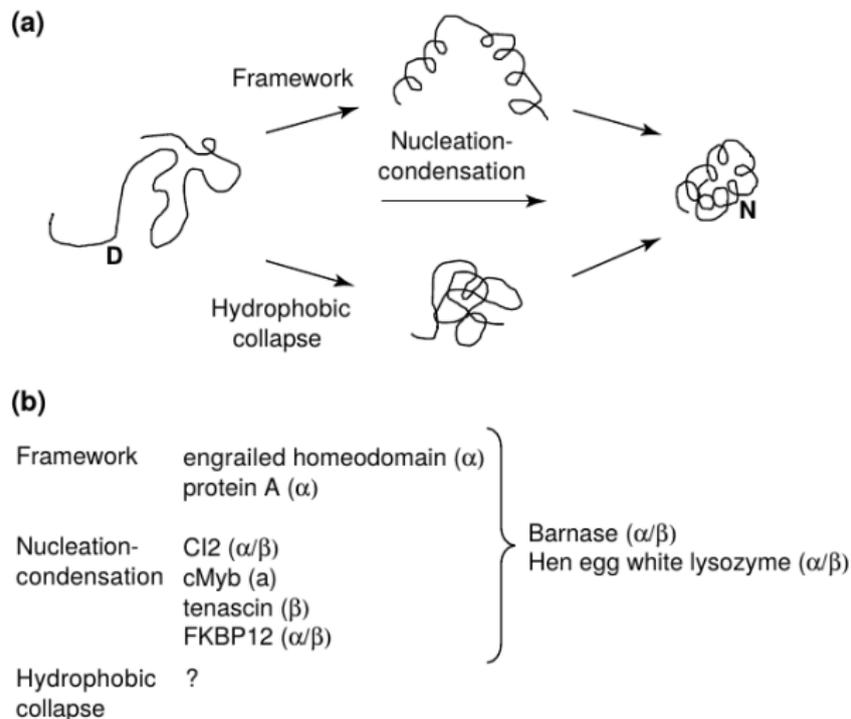
Modèles classiques pour le repliement



à gauche: "framework" ou "hierarchical",

Alan R. Fersht and Valerie Daggett (2002). In: *Cell*

Modèles classiques pour le repliement



Questions ouvertes sur le collapse/repliement

- 1 Qu'est-ce qui cause le collapse ?
 - 1 Interactions chaînes latérales (hydrophobes) OU
 - 2 Interactions squelette (liaisons hydrogènes)
- 2 Collapse graduel ou limité par une barrière (énergétique)
- 3 Relation entre collapse et formation structures secondaires
- 4 Relation entre collapse et cœur hydrophobe
- 5 Accélère ou retarde le collapse la formation de la structure native
- 6 Résultat du collapse: globule hétérogène sans structure spécifique OU molten globule avec structure spécifique et un repliement "native-like" ?

Jayant B. Udgaonkar (2013). In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Protein Folding and Stability 531.1–2

État déplié

- Obtenu avec des conditions dénaturantes:
 - Solvant dénaturant (Urea)
 - pH ou température extrême
 - haute pression
- Protéine dépliée se contracte lors de la diminution de la concentration de l'agent dénaturant dans la zone dénaturante.
- Ceci dépend de la nature chimique du dénaturant => indication pour une absence d'une structure spécifique de la protéine dépliée.
- Démonstré par des expériences sur molécule unique.

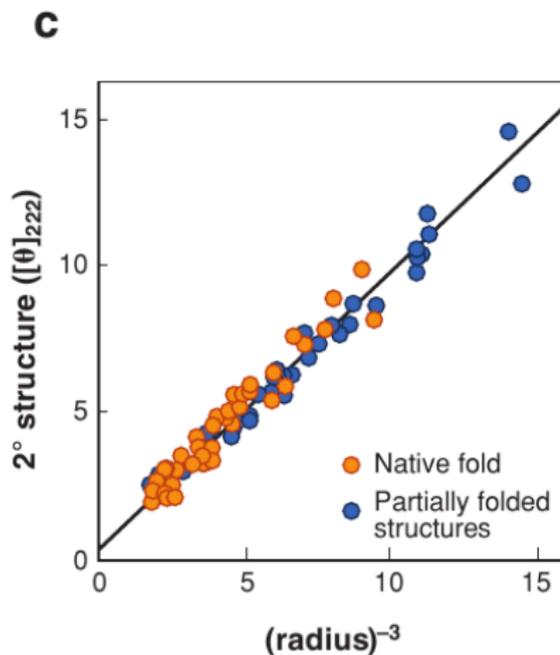
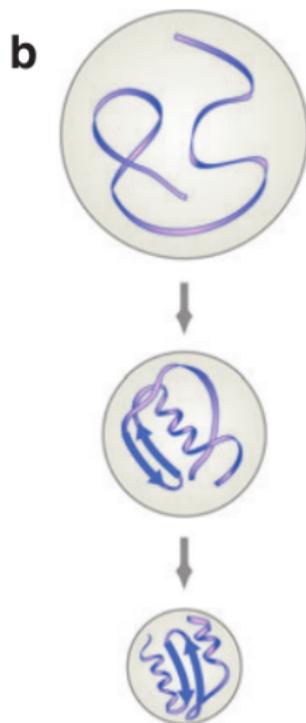
Jayant B. Udgaonkar (2013). In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Protein Folding and Stability 531.1–2

État déplié sous conditions de repliement

- Etudes d'équilibre: état effondré (collapse) sans structure spécifique "structure-less globule"
- Ressemble à des protéines intrinsèquement dépliées (IUP). Leur taille augmente aussi en ajoutant du dénaturant
- Déshydratation partielle des résidus hydrophobes compense la perte d'entropie conformationnelle (probable)

Jayant B. Udgaonkar (2013). In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Protein Folding and Stability 531.1–2

Collapse et formation structure secondaire



Mutations et $\Delta\Delta G$

Mutations et stabilité d'une protéine

- Mutations résidus par résidus
- But: obtenir l'importance d'un résidu pour la stabilité
- On a souvent quelques résidus qui sont très importants pour la stabilité
- Environ 1/3 des résidus sont assez importants pour la stabilité, sans être individuellement indispensables
- Bonne corrélation avec les résidus conservés lors d'un alignement multiple de séquences
- Différence de stabilité:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{D \rightarrow N}(\text{wildtype}) - \Delta G_{D \rightarrow N}(\text{mutant})$$

Protein	ΔT_m (°C)	$\Delta\Delta G^\ddagger$ (kJ mol ⁻¹)	Crystal structure?
WT	0.0	0.0	Yes
Arg96Lys	-0.2	0.0	Yes
Arg96Gln	-1.4	-1.3	Yes
Arg96Ala	-5.1	-8.4	Yes
Arg96Val	-6.4	-10.0	Yes
Arg96Ser	-7.0	-10.9	Yes
Arg96Glu	-7.0	-10.5	Yes
Arg96Gly	-7.1	-10.9	Yes
Arg96Met	-7.1	-11.3	Yes
Arg96Thr	-7.6	-11.7	No
Arg96Cys	-7.7	-12.1	No
Arg96Ile	-7.9	-12.1	No
Arg96Asn	-8.0	-12.6	Yes
Arg96His	-8.3	-13.0	Yes
Arg96Leu	-8.6	-13.4	No
Arg96Asp	-9.5	-14.6	Yes
Arg96Phe	-11.5	-17.6	No
Arg96Trp	-12.8	-18.8	Yes
Arg96Tyr	-13.2	-19.7	Yes
Arg96Pro	-15.5	-23.0	Yes

- Arg96 est dans une hélice => Pro déstabilise le plus
- L'enfouissement de groupement polaire sans liaisons hydrogènes => très déstabilisant
- Arg => Gly ou Ala, peu d'effet déstabilisant malgré un volume beaucoup plus petit

Mutations et état de transition

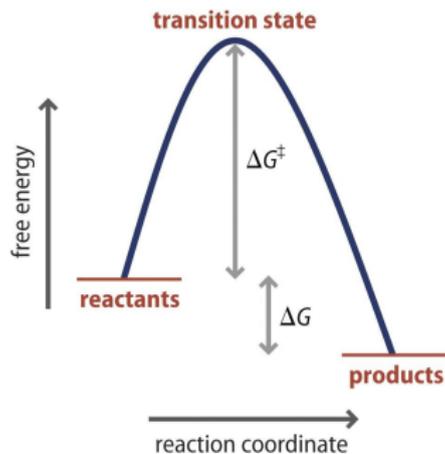


Figure S.1 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

- ΔG^\ddagger "delta G double dagger": énergie d'activation
- équilibre côté produits ici, car $\Delta G < 0$
- l'état de transition (transition state (TS)) très instable avec durée de vie de l'ordre de 10^{-12}

Etat initial

- Initial = random coil ; sans interaction à longue distance persistante ; conformations dominantes = étendues
- Difficile à obtenir expérimentalement sans agent chimique dénaturant (urée, chlorure de guanidinium)
- Dans une transition à deux états (two state kinetic folding), (D déplié & N natif)

Mutations et état de transition

catalyzed reaction

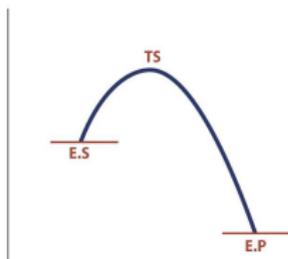
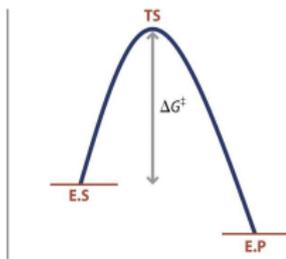


Figure 5.6 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

uncatalyzed reaction



- Enzymes (=protéines qui catalysent) réduisent l'énergie d'activation par deux moyens:
- 1) Augmentent l'énergie libre des substrats
- 2) Réduisent l'énergie libre de l'état de transition

Mutations et état de transition

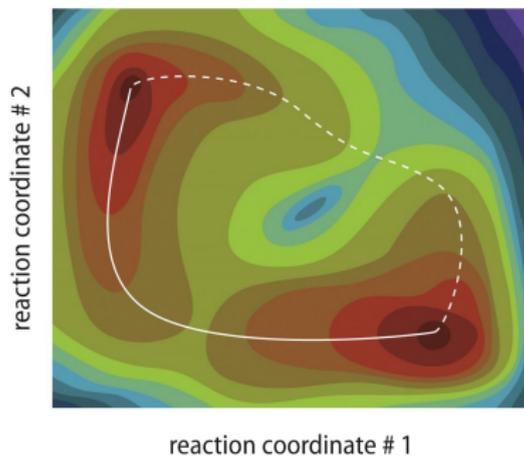
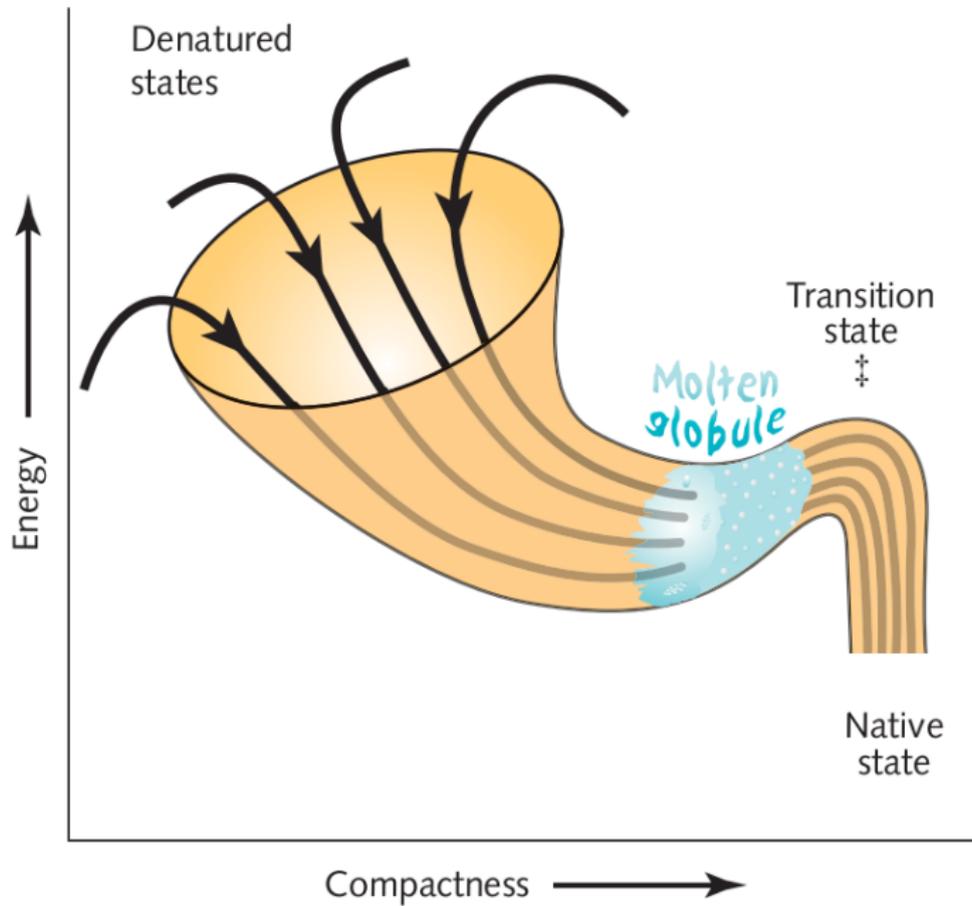


Figure 5.2 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

- Rouge: énergie faible.
- Trait continu: chemin de transition préférentiel
- Trait discontinu: chemin de transition alternative avec peu de différence énergétique



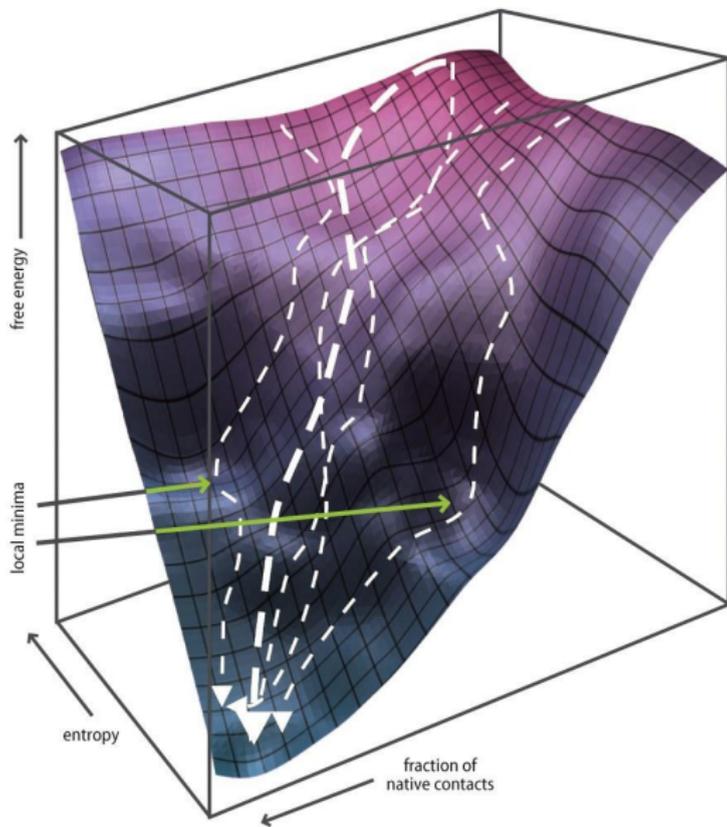


Figure 6.15 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

Mutations et état de transition

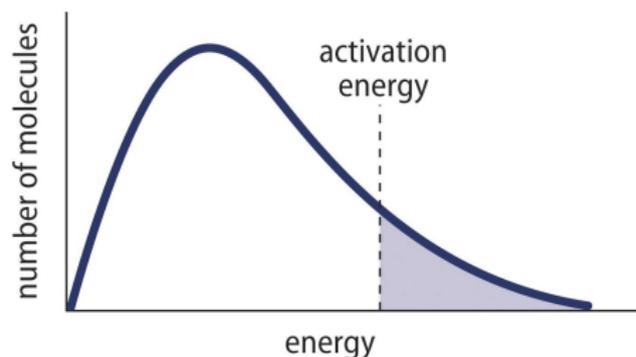


Figure 5.2.1 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

- Distribution de Boltzmann
- Vitesse de réaction
 $k = Ae^{-E_a/RT}$ (équation d'Arrhenius)
- $E_a = \Delta G^\ddagger$: énergie d'activation

Mutations et état de transition

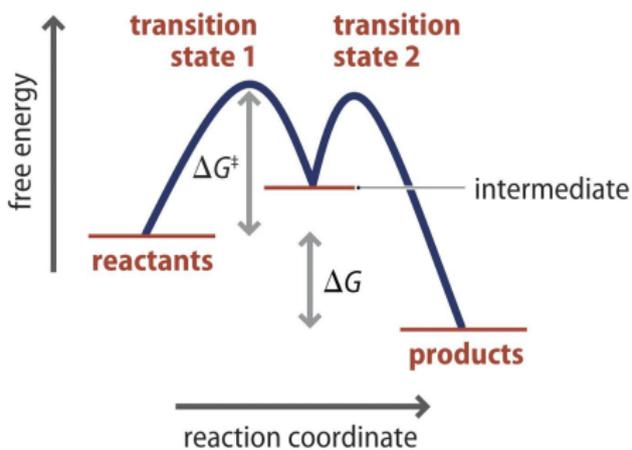


Figure 5.3 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

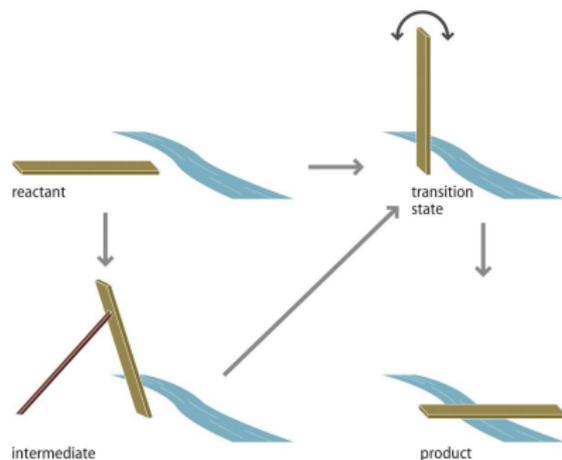


Figure 5.4 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

Etats Intermédiaires

- Correspond à un **minimum** local d'énergie. Observables
- Ensemble de structures d'énergies similaires. On a **parfois** défini ces états sous le terme de molten globule (globule fondu) :
 - quelques SSE déjà formés
 - compacité moindre que la forme native.
 - les chaînes latérales sont mal positionnées
- Plupart petites protéines se replient en 2 états. Contre exemples : cytochrome c, ubiquitine, Im7. La plupart des protéines > 100 résidus → intermédiaires très tôt
- EI peuvent ralentir ou augmenter vitesse de repliement

Mutations et état de transition

- l'état de transition (transition state (TS)) très instable avec durée de vie de l'ordre de 10^{-12}
- Inaccessible avec les méthodes expérimentales
- La cinétique du repliement de protéines mutés donne des informations sur la structure de l'état de transition du repliement
- Exemple: énergie d'activation:

$$\Delta G_{folding}^{\ddagger} = G(TS) - G(D)$$

- taux/vitesse du repliement:

$$k_{folding} = \exp[-\Delta G_{folding}/(RT)]$$

- Différences entre wild type et mutant:

$$\Delta\Delta G_{folding}^{\ddagger} = -RT \ln k_{folding}^{wt} / k_{folding}^{mut}$$

Mutations et état de transition

Mutation d'un seul résidu, exemple (a):

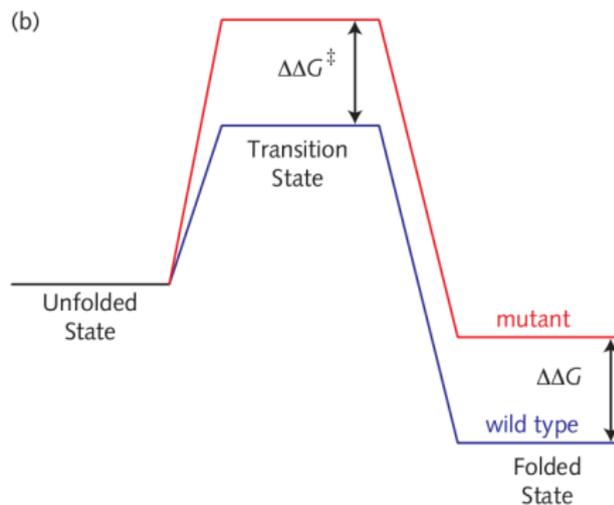
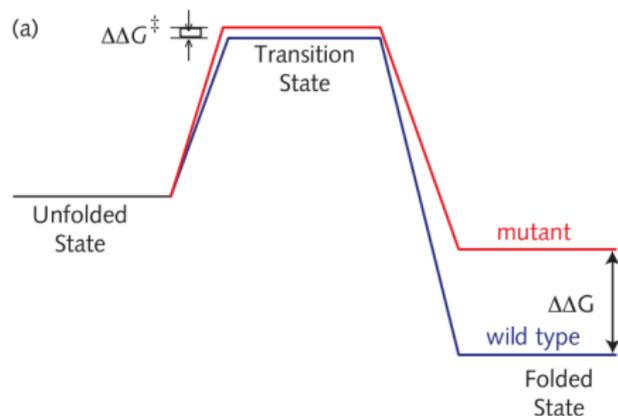
- ici, résidu en question n'a pas d'interaction intramoléculaire dans l'état dénaturé (D)
- ici, mutation a un effet déstabilisant sur l'état natif (N)
- ici, résidu en question n'a aussi pas d'interaction intramoléculaire dans l'état de transition (TS)
- Conséquences:
 - 1 L'énergie d'activation pour le repliement ne change pas:

$$\Delta G_{folding}^{\ddagger} = G(TS) - G(D)$$

- 2 L'énergie d'activation pour le dépliement sera plus bas pour le mutant:

$$\Delta G_{unfolding}^{\ddagger} = G(TS) - G(N)$$

Mutations et état de transition



Mutations et état de transition

Mutation d'un seul résidu, exemple (b):

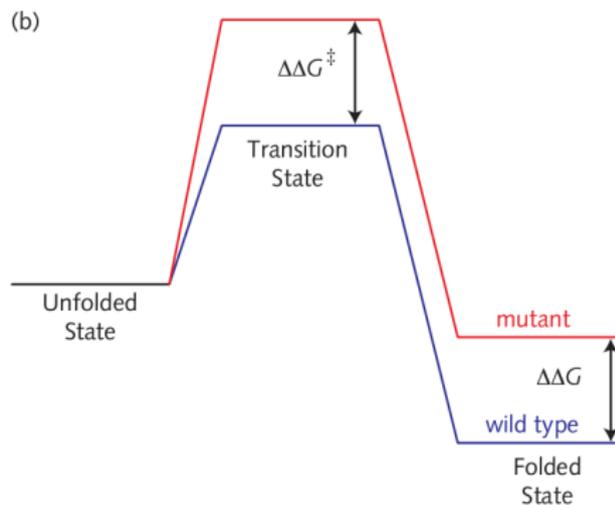
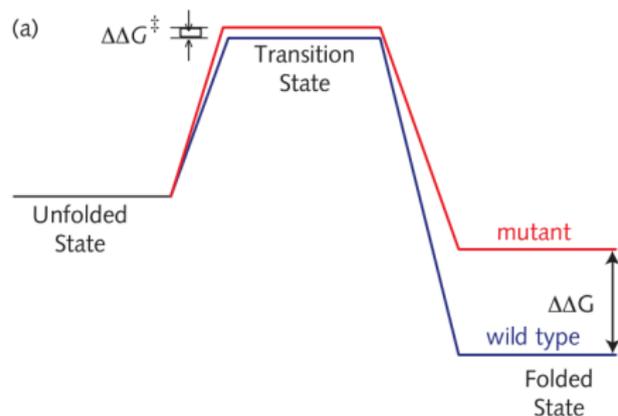
- ici, résidu en question n'a pas d'interaction intramoléculaire dans l'état dénaturé (D)
- ici, mutation a un effet déstabilisant sur l'état natif (N)
- ici, mutation a aussi un effet déstabilisant sur l'état de transition (TS), **car interaction intramoléculaire en TS est altérée**
- Conséquences:
 - 1 L'énergie d'activation pour le repliement sera plus grand pour le mutant:

$$\Delta G_{\text{folding}}^{\ddagger} = G(TS) - G(D)$$

- 2 L'énergie d'activation pour le dépliement ne change pas:

$$\Delta G_{\text{unfolding}}^{\ddagger} = G(TS) - G(N)$$

Mutations et état de transition



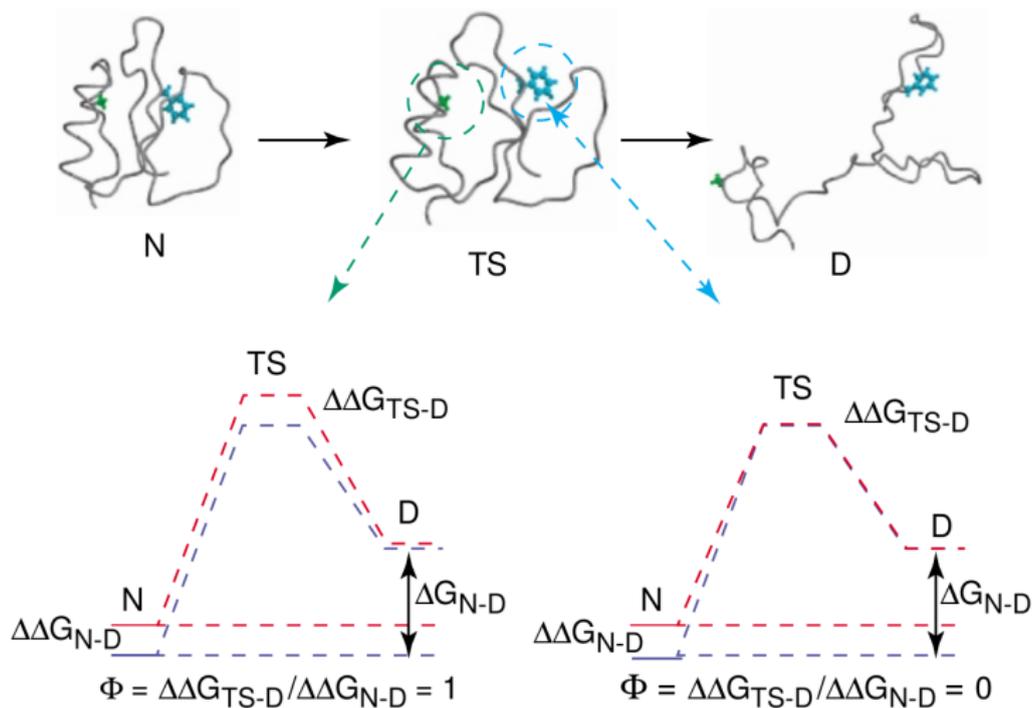
Mutations et état de transition

- En général on se trouve entre ces deux extrêmes.
- Quantification, Φ de Alan Fersht:

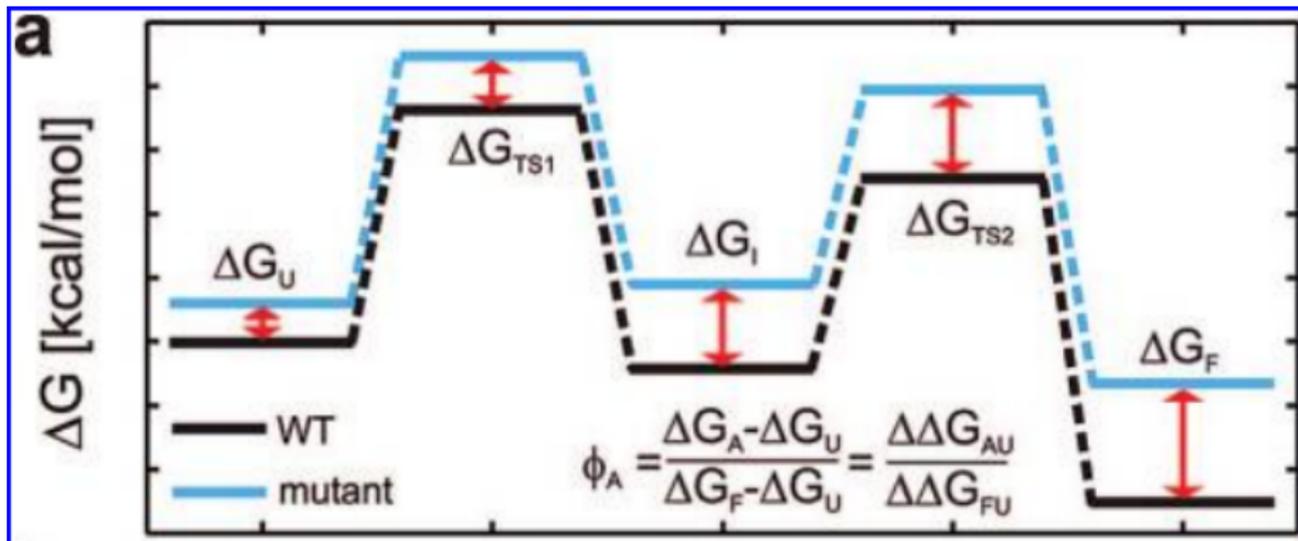
$$\Phi = \frac{\Delta G^\ddagger(\textit{wildtype}) - \Delta G^\ddagger(\textit{mutant})}{\Delta G_{N \rightarrow D}(\textit{wildtype}) - \Delta G_{N \rightarrow D}(\textit{mutant})} = \frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{\Delta\Delta G_{N \rightarrow D}}$$

- Mesure à quel point un résidu fait des contacts similaire à l'état natif dans le TS.
- Exemple (a) $\Rightarrow \Phi = 0$, Exemple (b) $\Rightarrow \Phi = 1$
- Mesures expérimentales:
 - $\Delta G_{N \rightarrow D}$: mesures d'équilibre ou cinétique
 - $\Delta\Delta G^\ddagger$: cinétiques de repliement et dépliement.

Phi-value analysis



Exemple d'analyse des valeurs phi



Domaine Fyn SH3

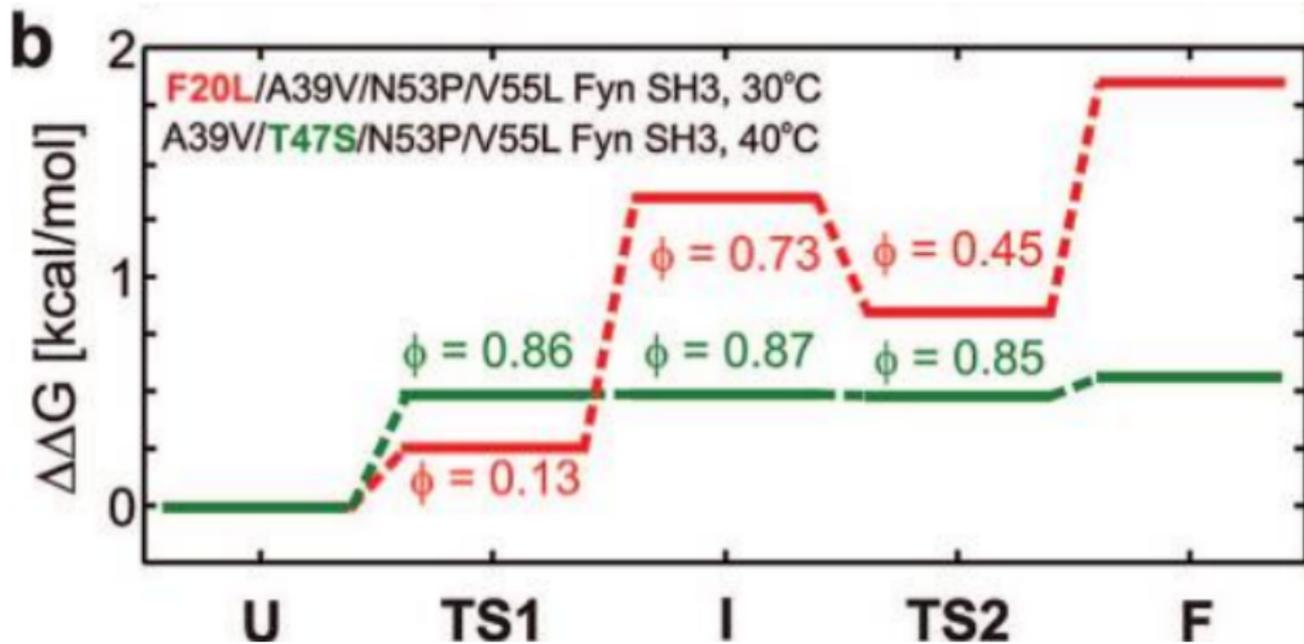
Chemin de repliement à trois états: $U \leftrightarrow I \leftrightarrow F$

ΔG_A : A = F, TS1, I, TS2 ou F

Valeurs $\Delta\Delta G$ obtenues par RMN

Dmitry M. Korzhnev and Lewis E. Kay (2008). In: *Acc. Chem. Res.* 41.3

Exemple d'analyse des valeurs phi



T47: à la surface, F20: dans le coeur hydrophobe

T47: $\phi \approx 1 \Rightarrow$ formation de contact natifs très tôt

F20: I: état compact avec interactions non-natives

F20: TS2: ces interactions doivent être rompues avant l'état F

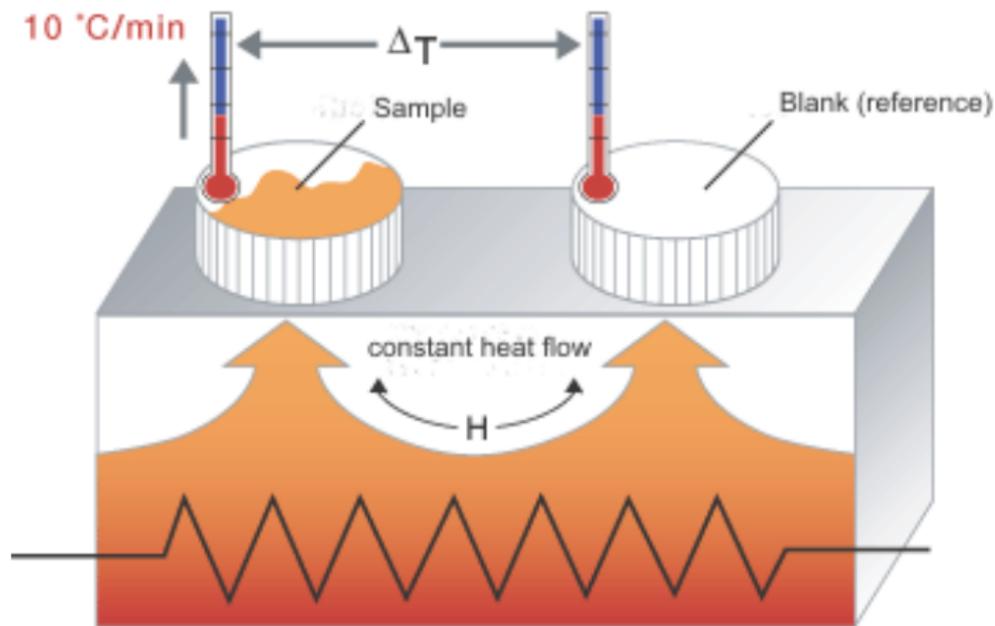
Dmitry M. Korzhnev and Lewis E. Kay (2008). In: *Acc. Chem. Res.* 41.3

3 Techniques expérimentales

- Méthodes thermodynamiques
- Techniques sur molécule unique
- RMN
- Méthodes pour cinétique "ultra rapide"

Méthodes thermodynamiques

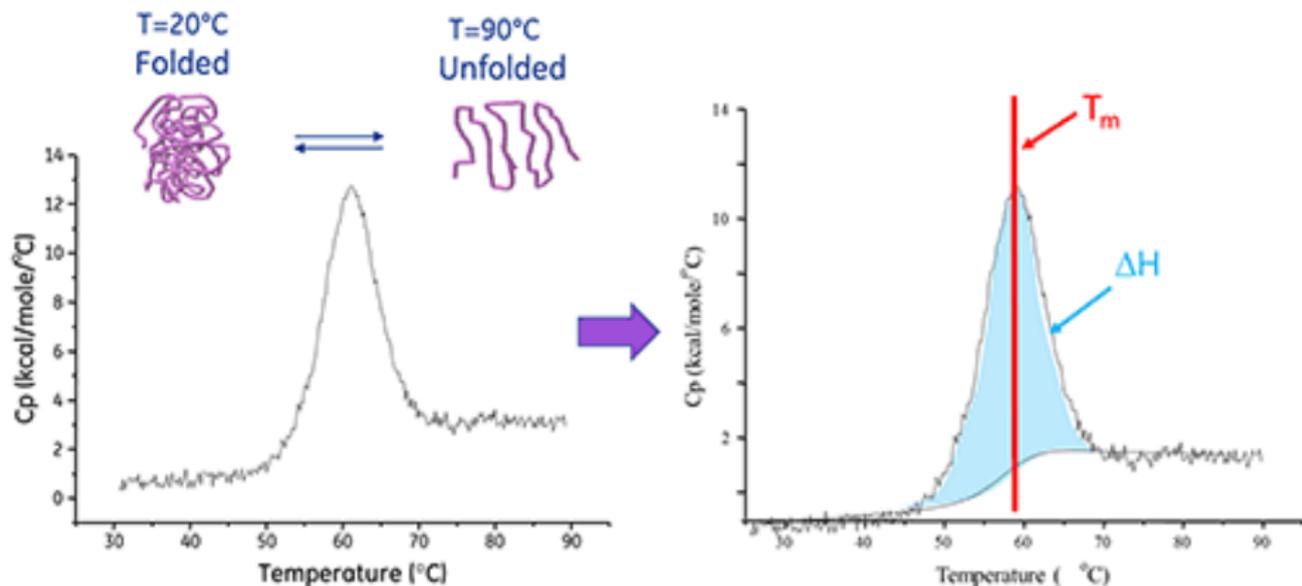
Differential scanning calorimetry (DSC)



Principe: référence et échantillon sont chauffés simultanément
Protéine absorbe de la chaleur lors du dépliement => ΔT

www.itc.tu-bs.de/Abteilungen/Makro/Methods/dsc.htm

Differential scanning calorimetry (DSC)



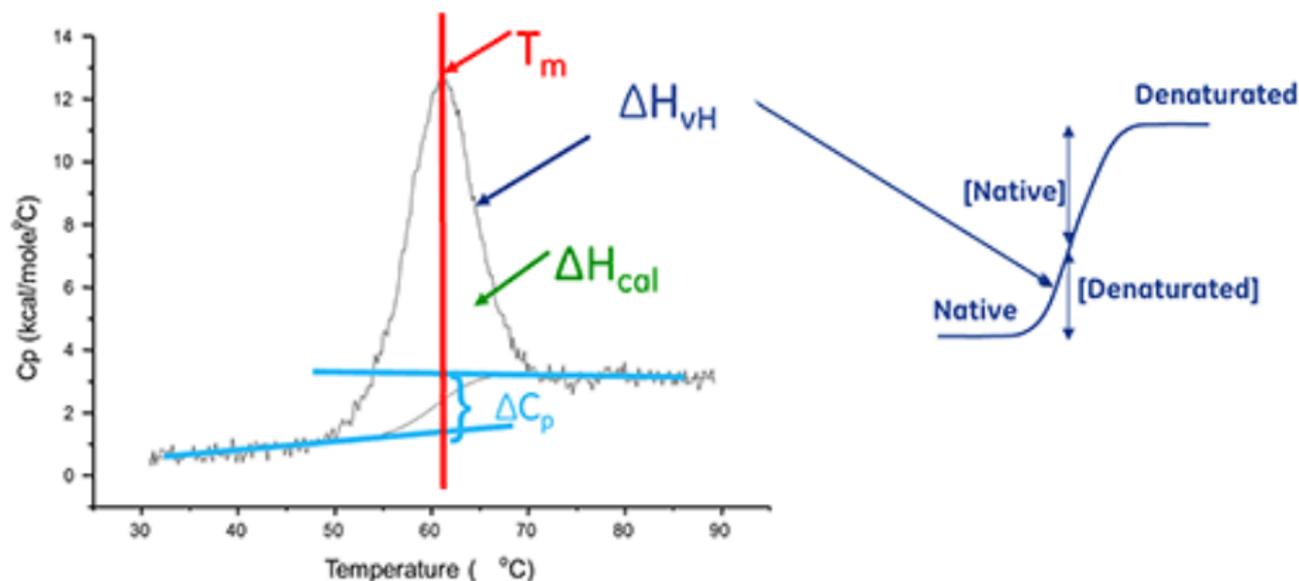
T_m : température médiane de transition thermique (thermal transition midpoint)

C_p : capacité calorifique (heat capacity)

H: enthalpie

www.malvern.com/fr/products/technology/differential-scanning-calorimetry

Differential scanning calorimetry (DSC)



T_m : température médiane de transition thermique (thermal transition midpoint)

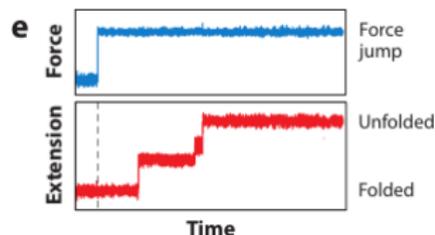
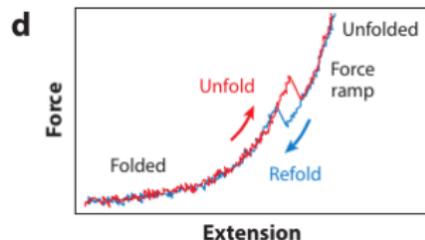
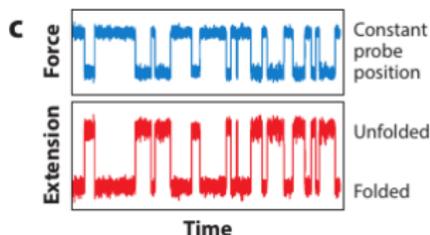
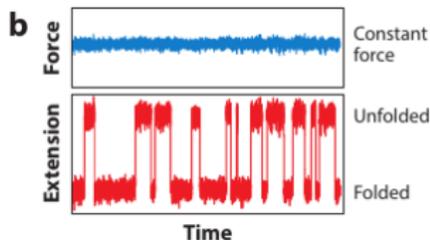
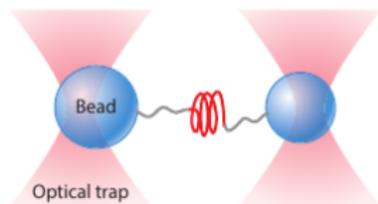
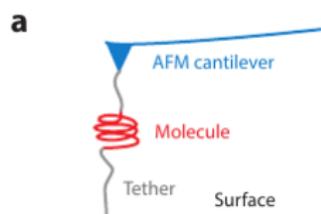
C_p : capacité calorifique (heat capacity)

H: enthalpie

www.malvern.com/fr/products/technology/differential-scanning-calorimetry

Techniques sur molécule unique

Single molecule force spectroscopy (SMFS)



a) Atomic force microscopy (AFM) and Optical tweezers

b) Constant force mode: extension fluctuates

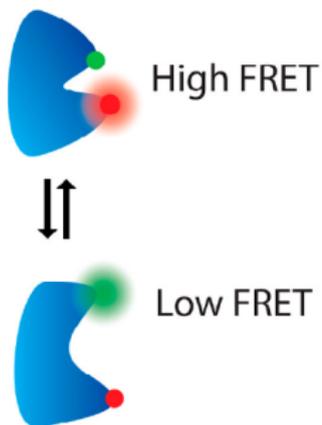
c) Constant probe position: force and extension fluctuate

d) Force-ramp mode: elastic stretching is interrupted by a "rip", hysteresis indicates a nonequilibrium process

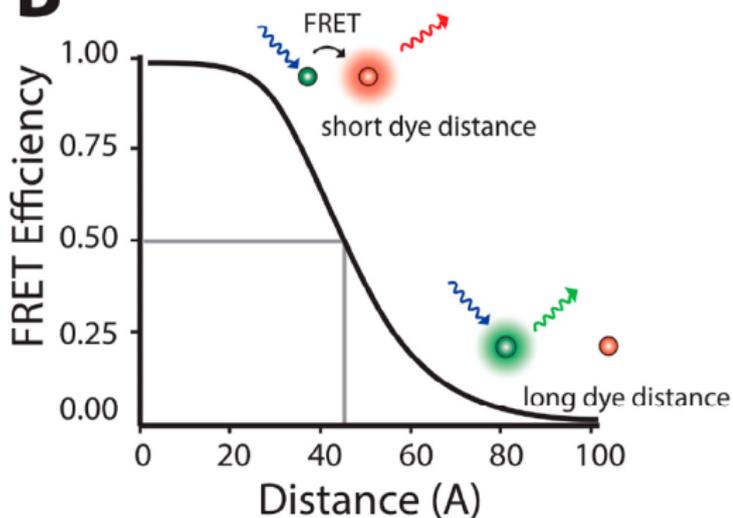
e) Force-jump mode: extension changes in steps

Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

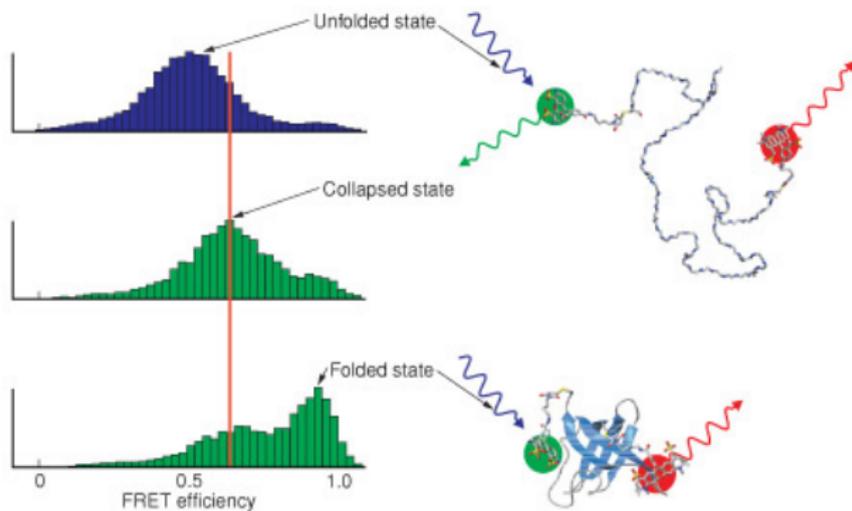
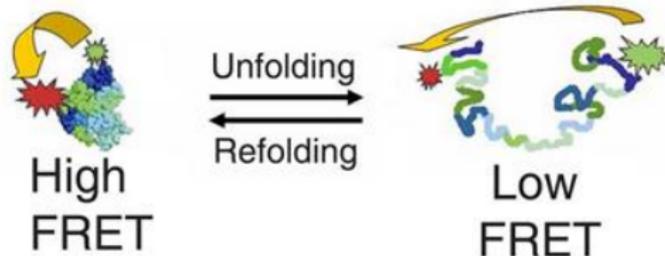
A



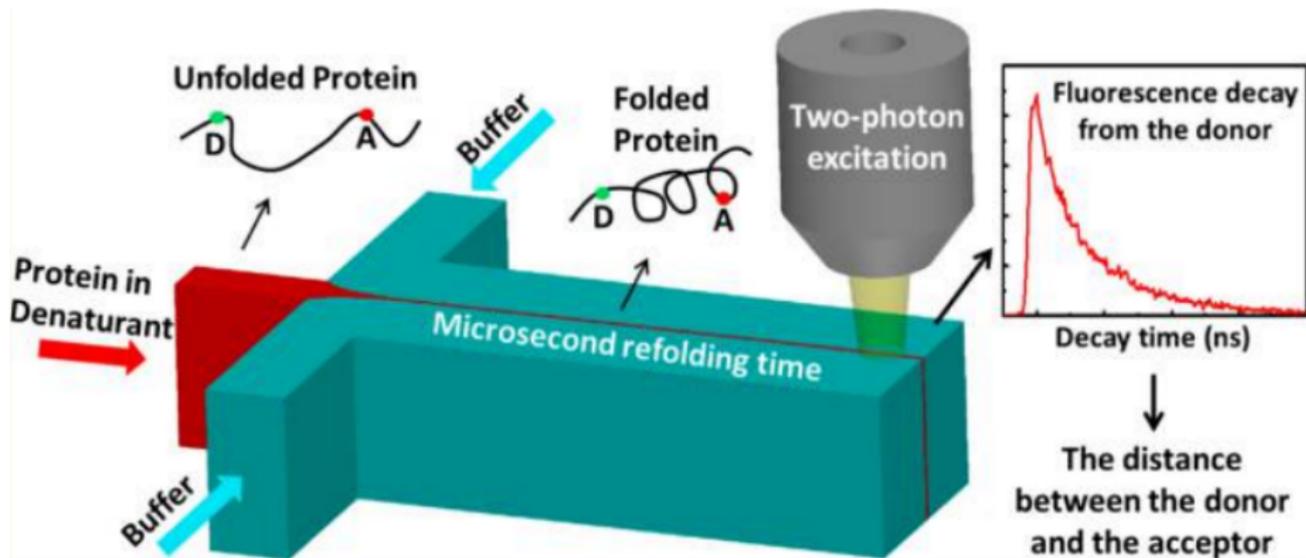
B



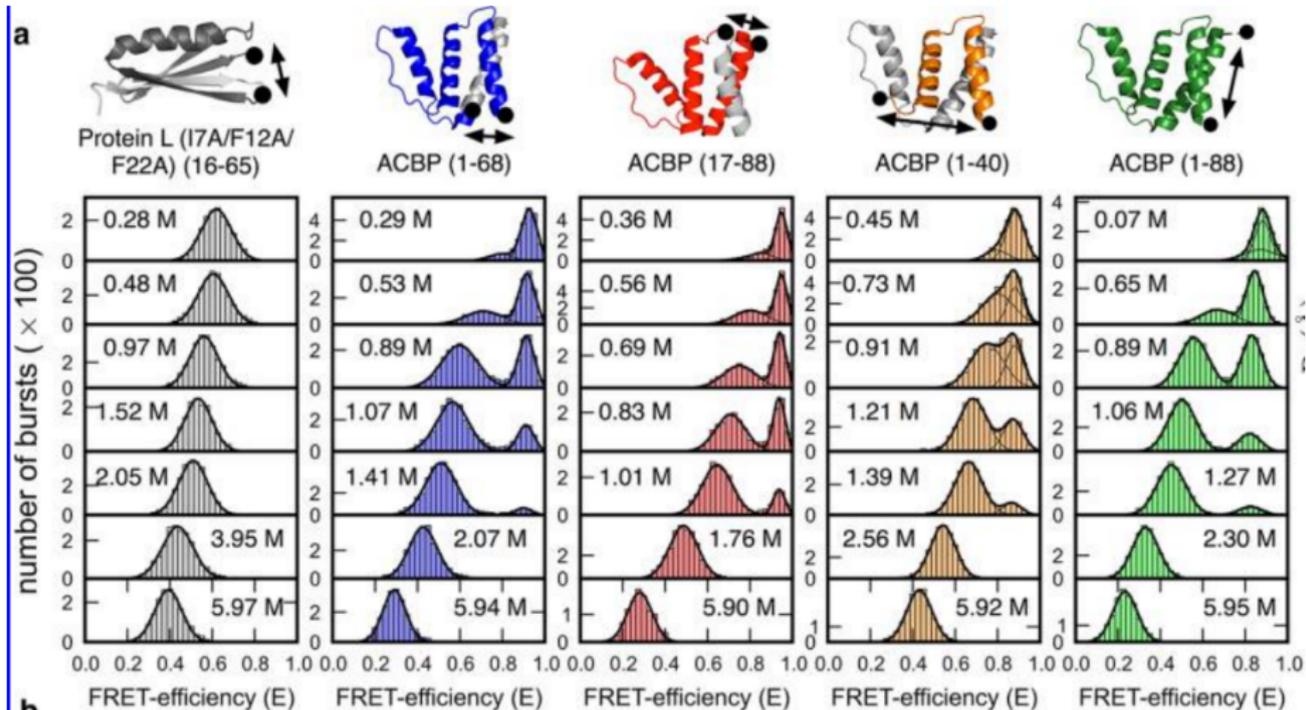
Fluorescence resonance energy transfer (FRET)



Time-resolved FRET (TR-FRET)

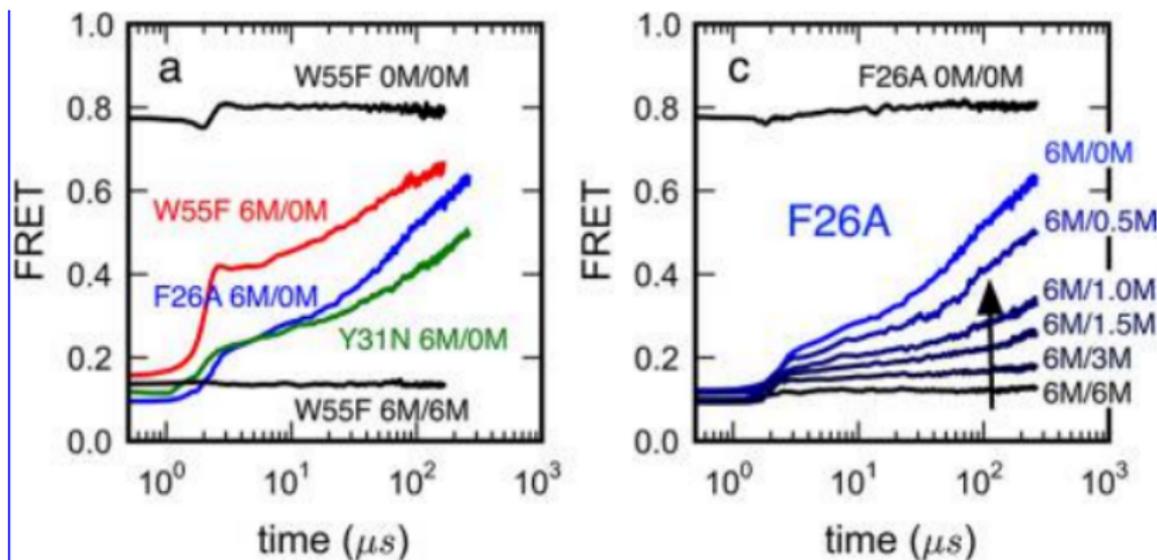


FRET sur ACBP



FRET sur ACBP - Collapse très lent

Solution dénaturant (6 M GuHCl) vers solution de repliement (0 M GuHCl):

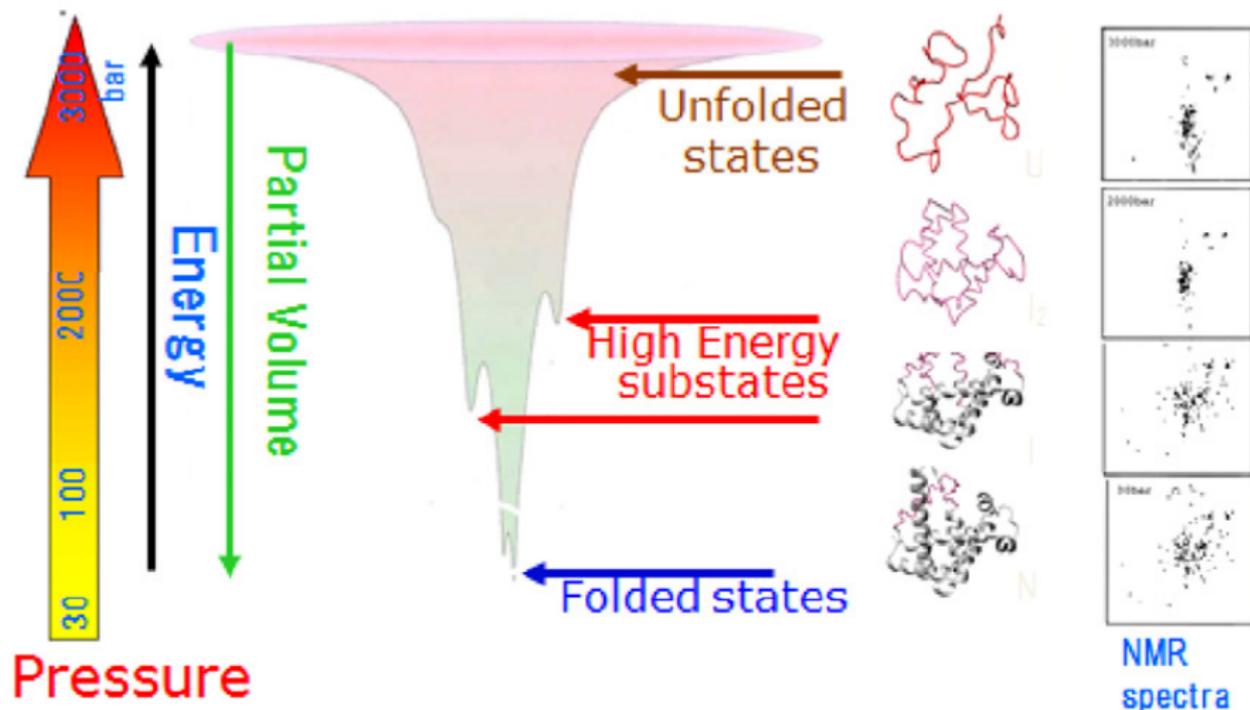


Indication pour: Formation d'une ensemble compact et hétérogènes de structures dépliées

Vincent A. Voelz et al. (2012). In: *J. Am. Chem. Soc.* 134.30

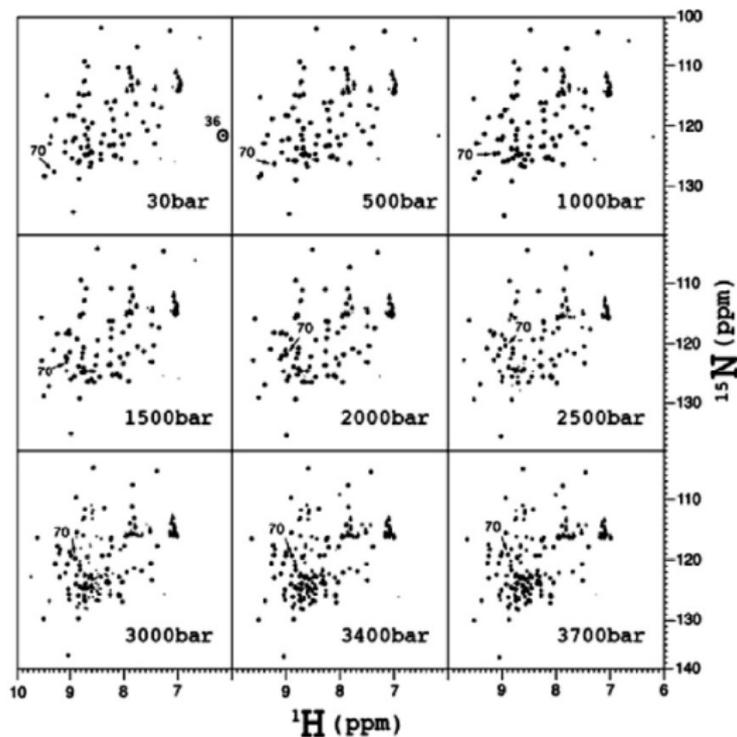
RMN

Pressure et RMN



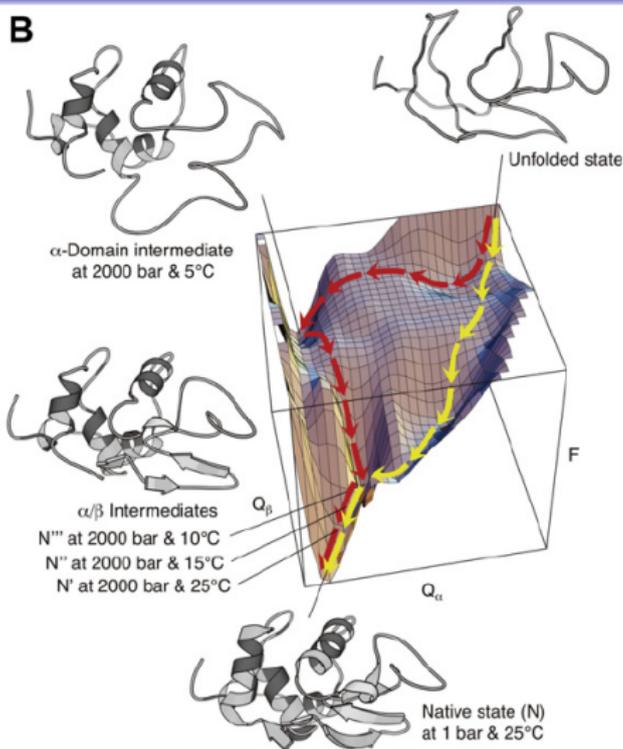
Kazuyuki Akasaka, Ryo Kitahara, and Yuji O. Kamatari (2013). In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Protein Folding and Stability 531.1-2

Pression et RMN

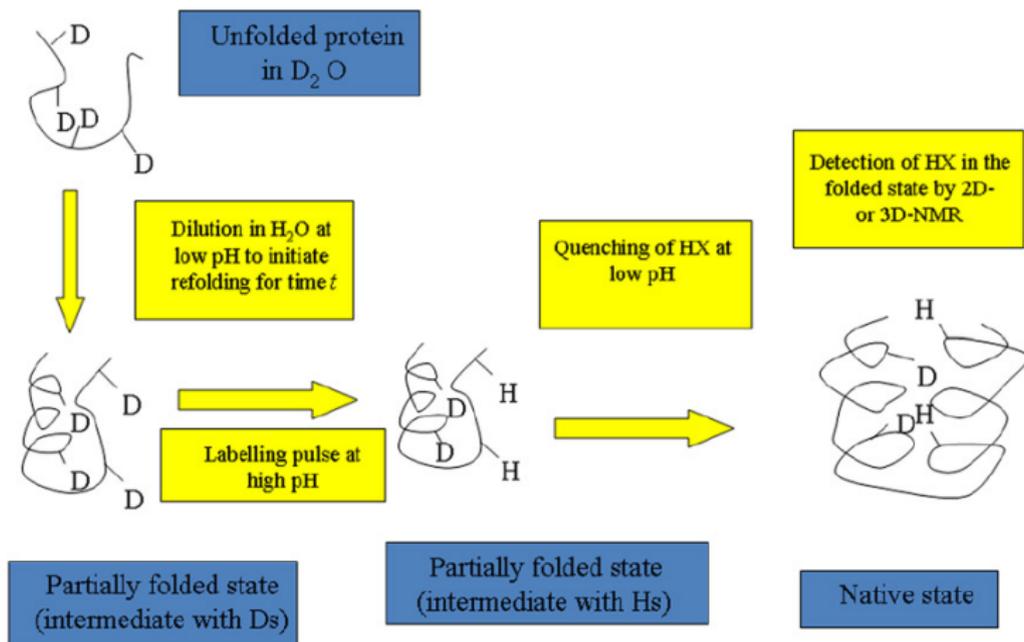


Kazuyuki Akasaka, Ryo Kitahara, and Yuji O. Kamatari (2013). In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Protein Folding and Stability 531.1–2

Pressure et RMN



Quench-flow pour détecter états intermédiaires

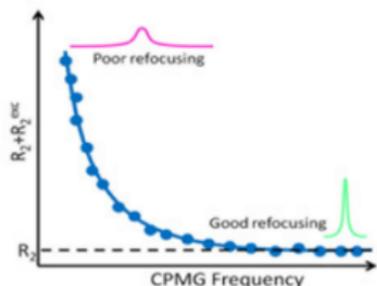
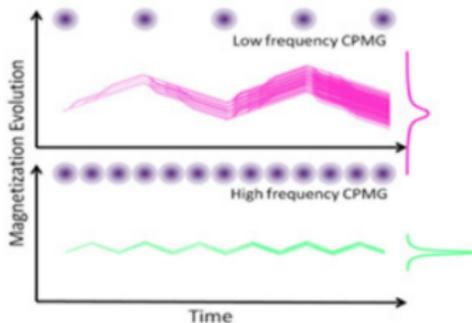
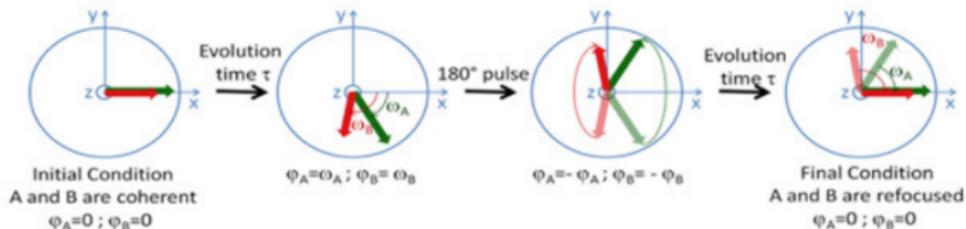


HX: hydrogen exchange

José L. Neira (2013). In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Protein Folding and Stability 531.1–2

Relaxation dispersion NMR (RD-NMR)

Relaxation Dispersion NMR

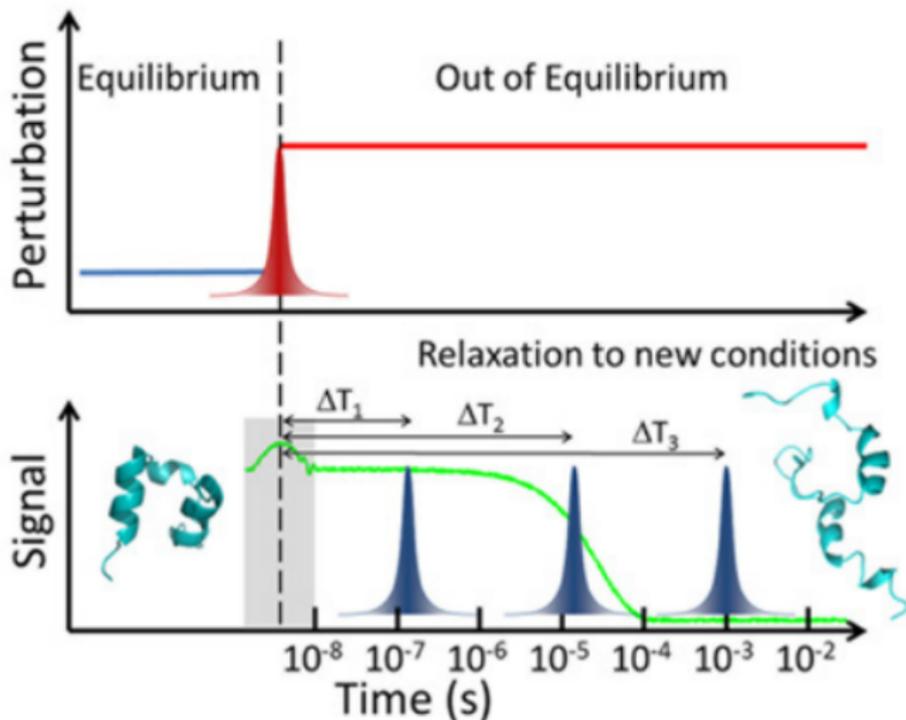


Victor Muñoz and Michele Cerminara (2016). In: *Biochem J* 473.17

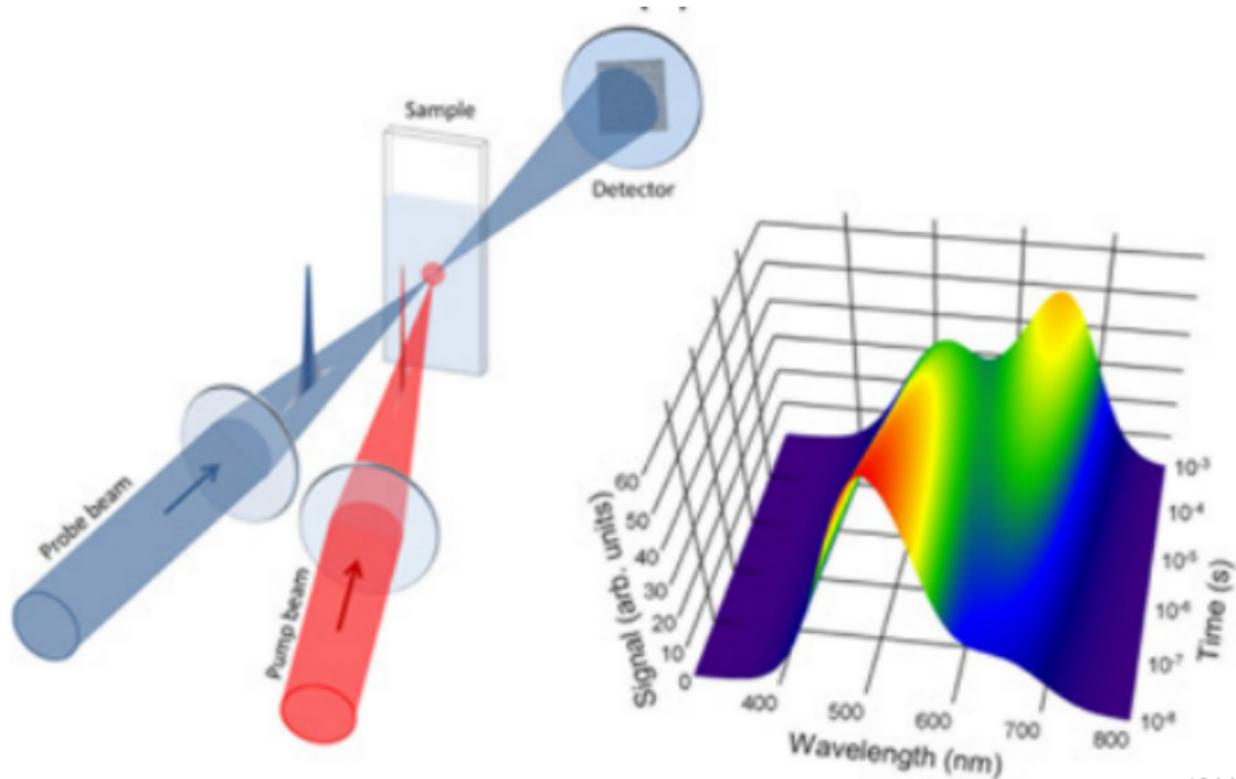
Méthodes pour cinétique "ultra rapide"

Laser T-jump

Ultrafast Kinetic Perturbation Methods



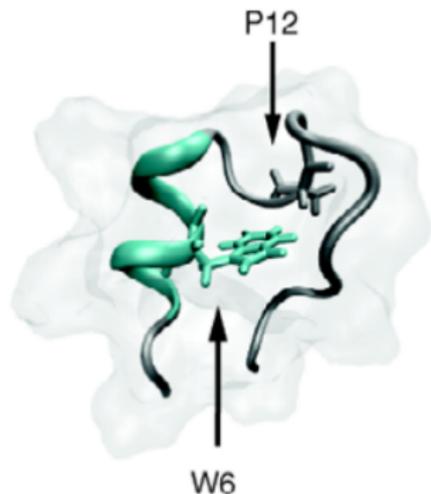
Laser T-jump



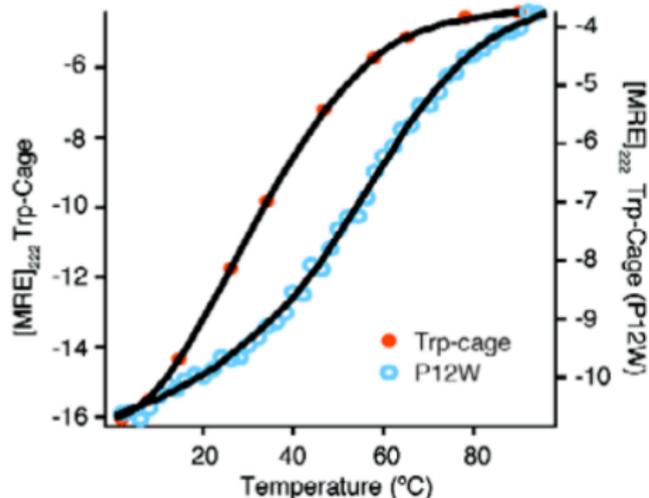
- 4 Protéines qui se replient rapidement
 - Protéines qui se replient rapidement

Protéines qui se replient rapidement

Trp-cage



(b)

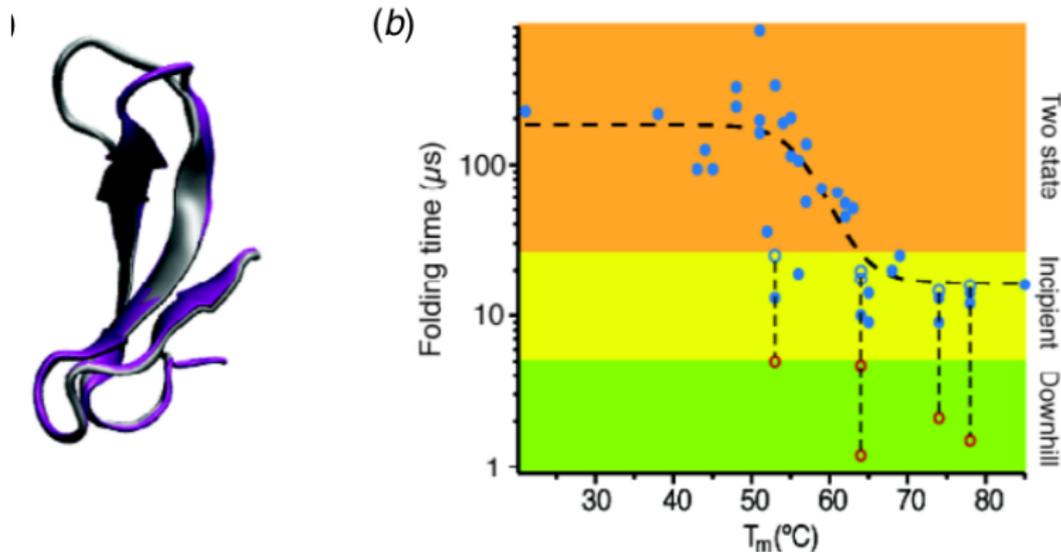


P12W: mutant plus stable et se replie plus rapidement (facteur 4)

Courbes obtenues par dichroïsme circulaire (CD)

Hannah Gelman and Martin Gruebele (2014). In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 47.2

domaine WW



forme native (en noir): longue boucle qui relie les deux brins β , important pour sa fonction de liaison

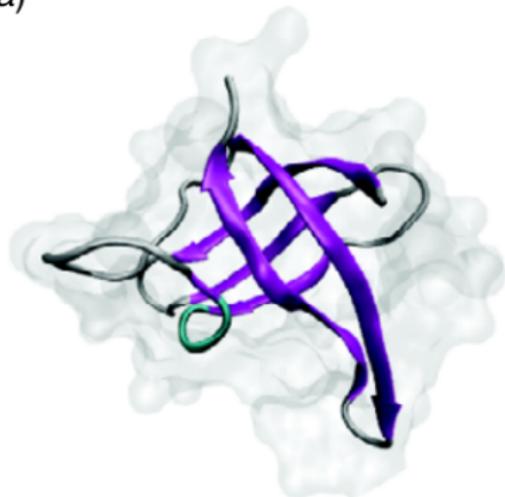
mutant stabilisé (en magenta): se replie plus rapidement, mais son activité de liaison est réduite, comme la boucle est plus petite

(b) corrélation stabilité \leftrightarrow vitesse de repliement de 35 mutants du domaine WW

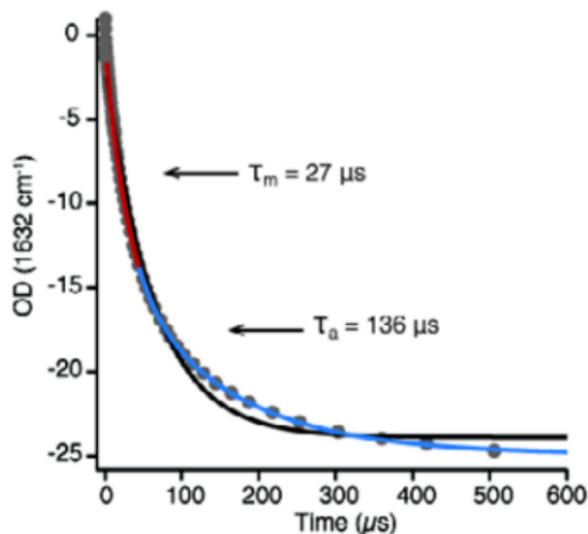
Hannah Gelman and Martin Gruebele (2014). In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 47.2

Cold shock proteins

(a)



(b)

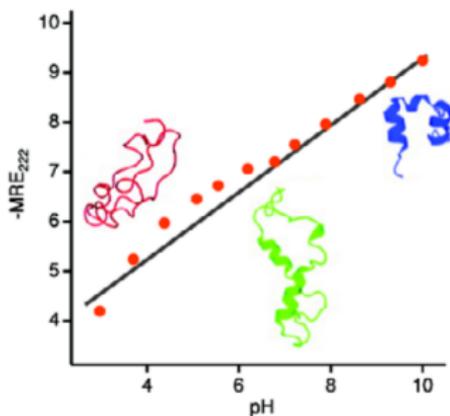


Mesure d'absorbance IR après un saut de température de 60 à 80 C
 Le fit avec deux exponentielles est meilleur qu'avec une seule (en noir)
 => La relaxation rapide $\tau_m = 27 \mu\text{s}$ est attribué au "Downhill folding"

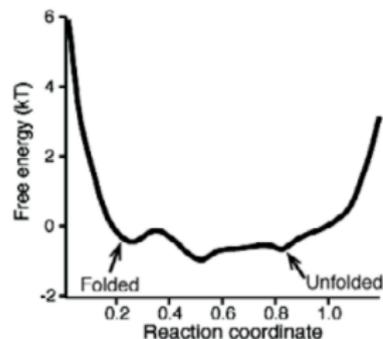
Hannah Gelman and Martin Gruebele (2014). In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 47.2

BBL - exemple du "downhill folding"

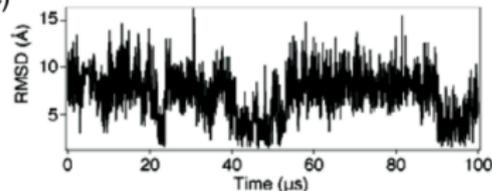
(a)



(b)



(c)



- a) CD linéaire => un seul minimum d'énergie libre
- b) Paysage d'énergie libre calculé par dynamique moléculaire
- c) Pas de transition nette, comme pour les "two-state folder"

Hannah Gelman and Martin Gruebele (2014). In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 47.2

5 Repliement par dynamique moléculaire

- Introduction
- Temps de repliement
- Markov State Models (MSM)
- Etat déplié
- Thermodynamique du repliement

Introduction

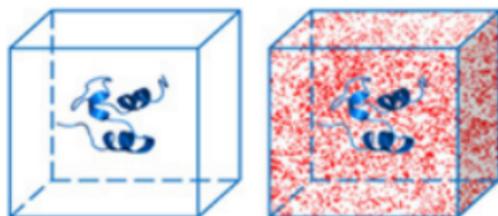
Molecular Dynamics Simulations

A. Force Field

$$U = \sum k_b (r - r_0)^2 + \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum A [1 + \cos(nT - \phi)] + \sum \sum q_i q_j / r_{ij} + \sum \sum B \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

bond stretching
bending
torsional
electrostatics
van der Waals

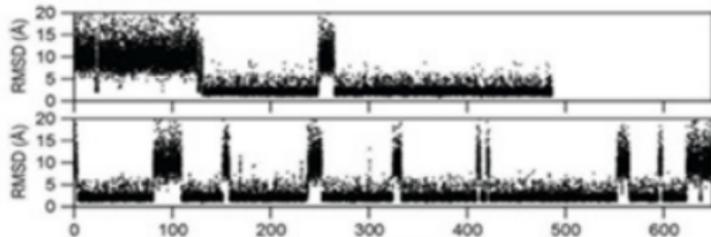
B. Simulation System



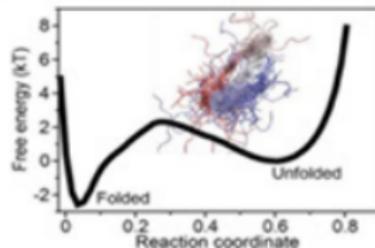
C. Specialized High Performance Computing



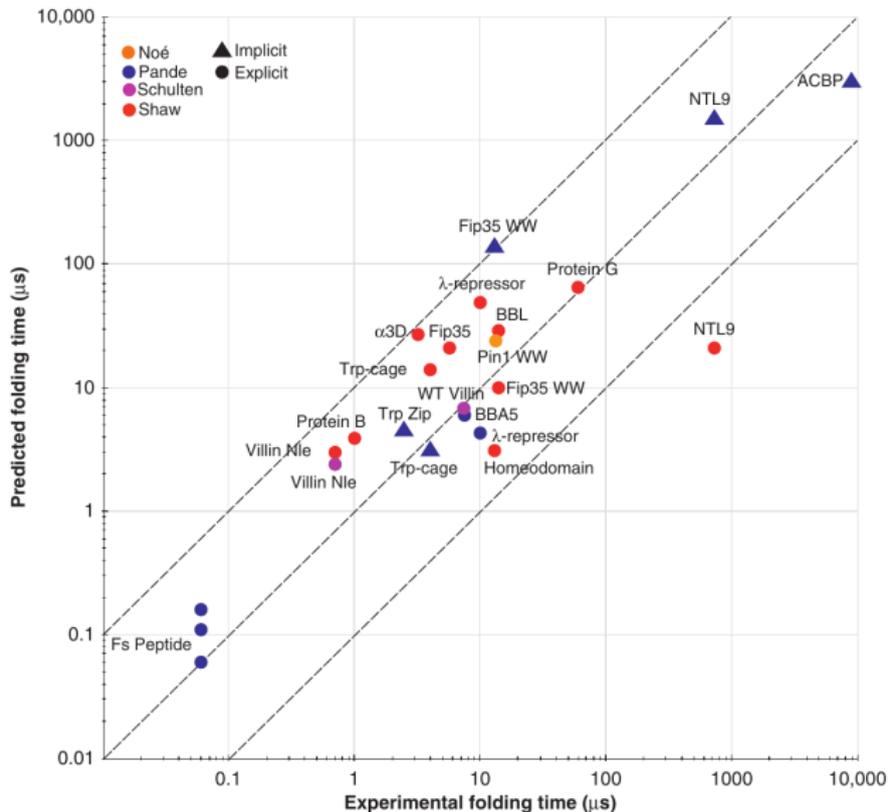
D. Molecular Trajectories



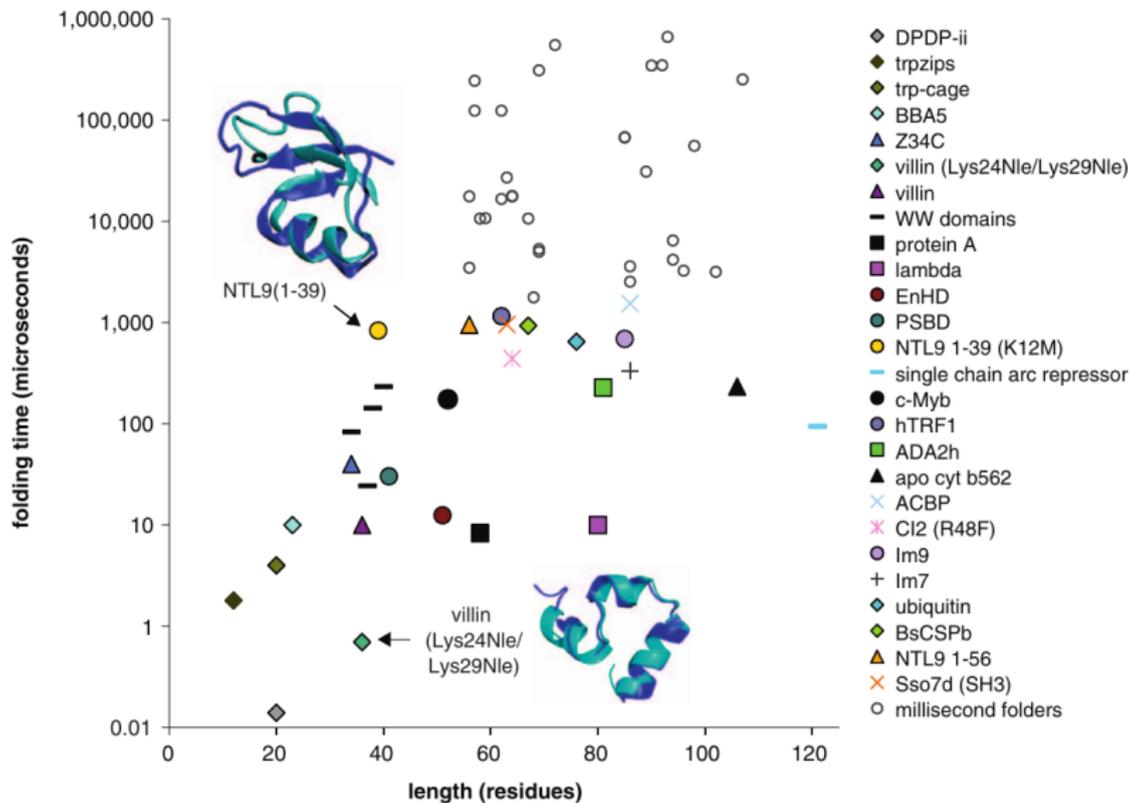
E. Free Energy Surface calculation



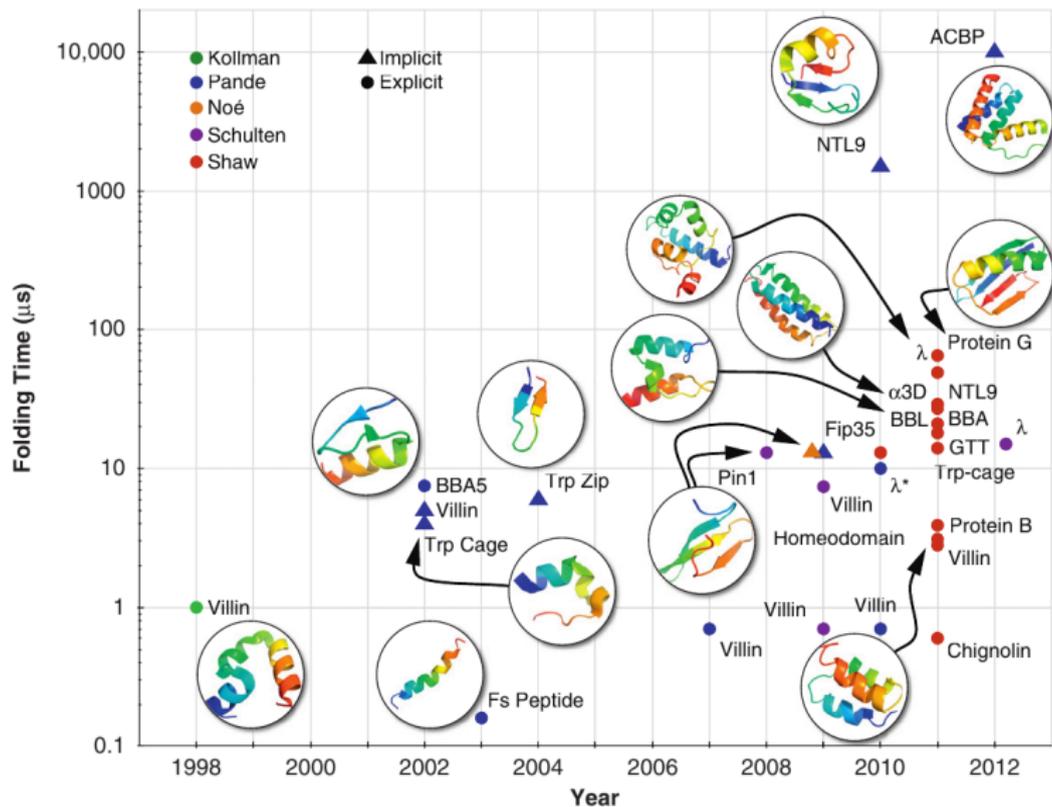
Temps de repliement



Current Opinion in Structural Biology

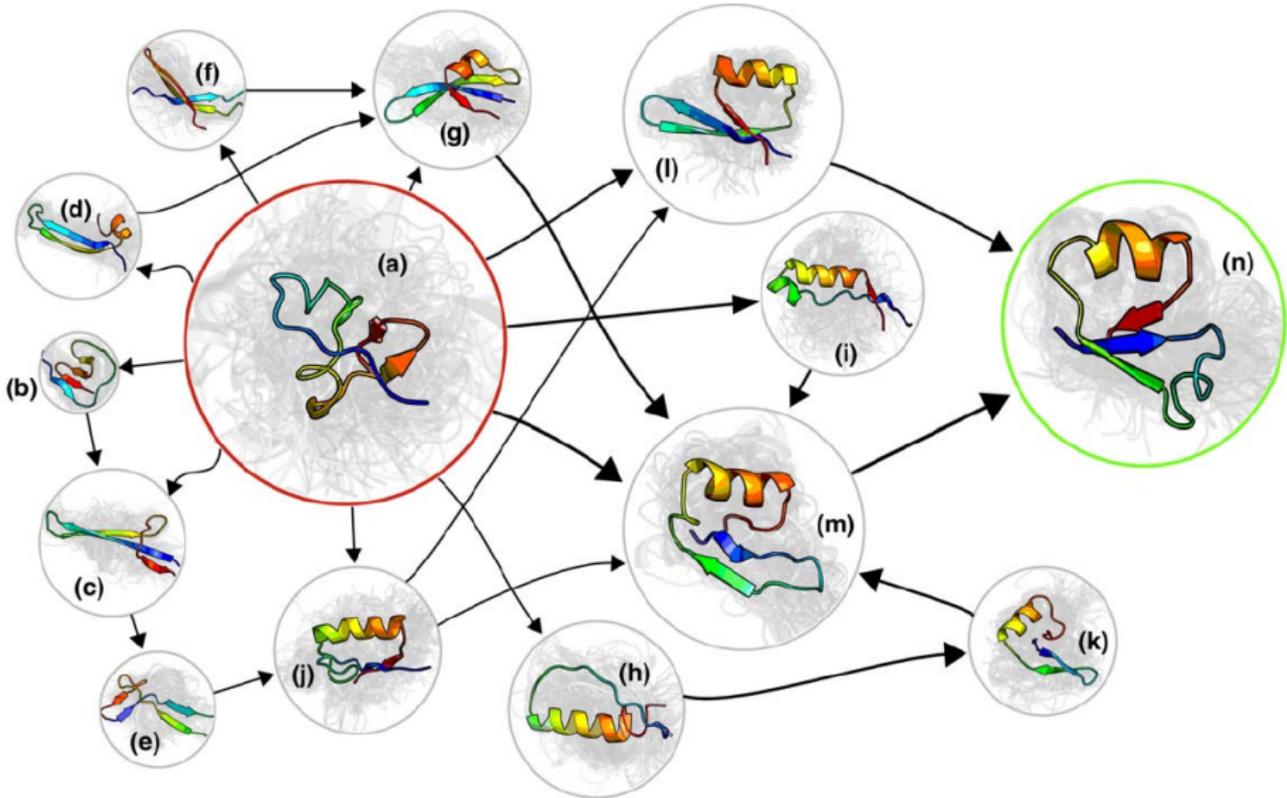


Current Opinion in Structural Biology



Current Opinion in Structural Biology

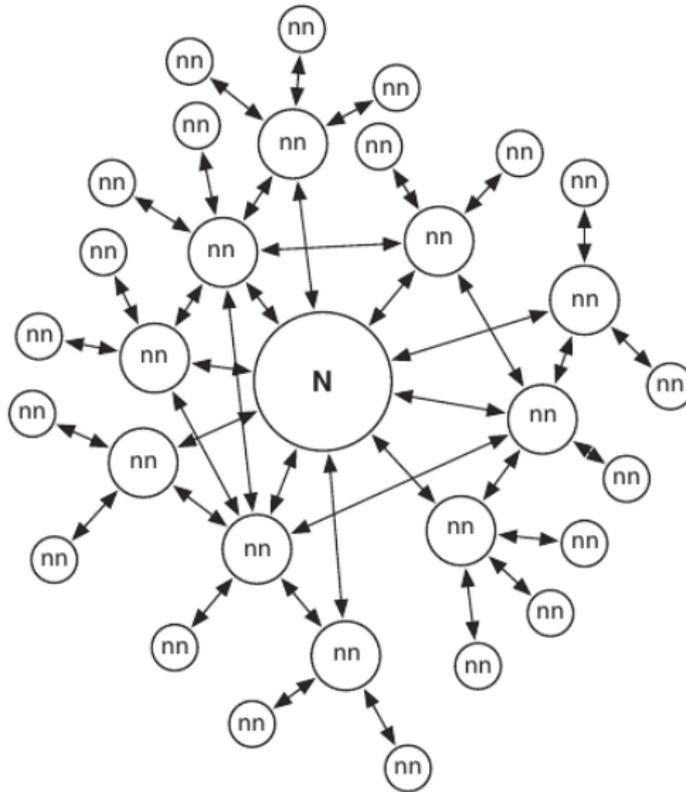
Markov State Models (MSM)



Current Opinion in Structural Biology

protéine NTL9,
Structural Biology 21.1

Gregory R Bowman, Vincent A Voelz, and Vijay S Pande (2011). en. In: *Current Opinion in*

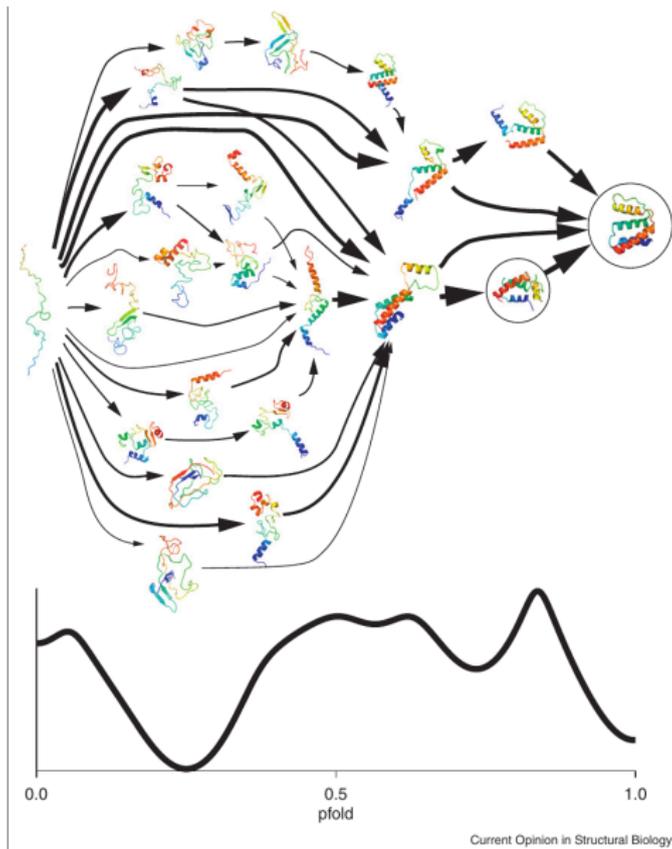


Current Opinion in Structural Biology

"Kinetic hubs", N: natif, nn: non-natif,

(2011). en. In: *Current Opinion in Structural Biology* 21.1

Gregory R Bowman, Vincent A Voelz, and Vijay S Pande

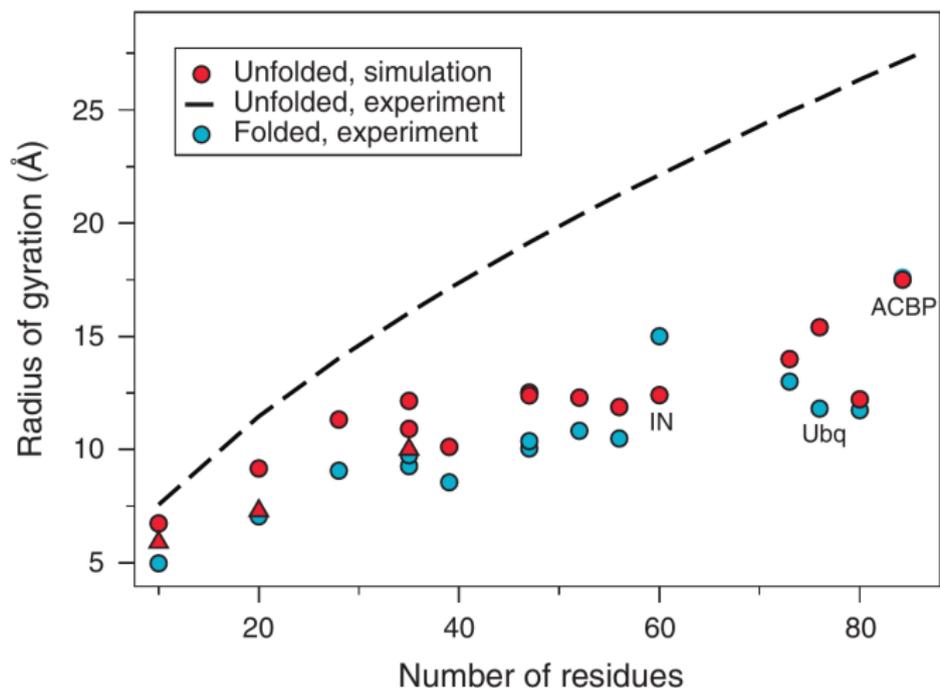


protéine ACBP,

Thomas J Lane et al. (2013). en. In: *Current Opinion in Structural Biology* 23.1

Etat déplié

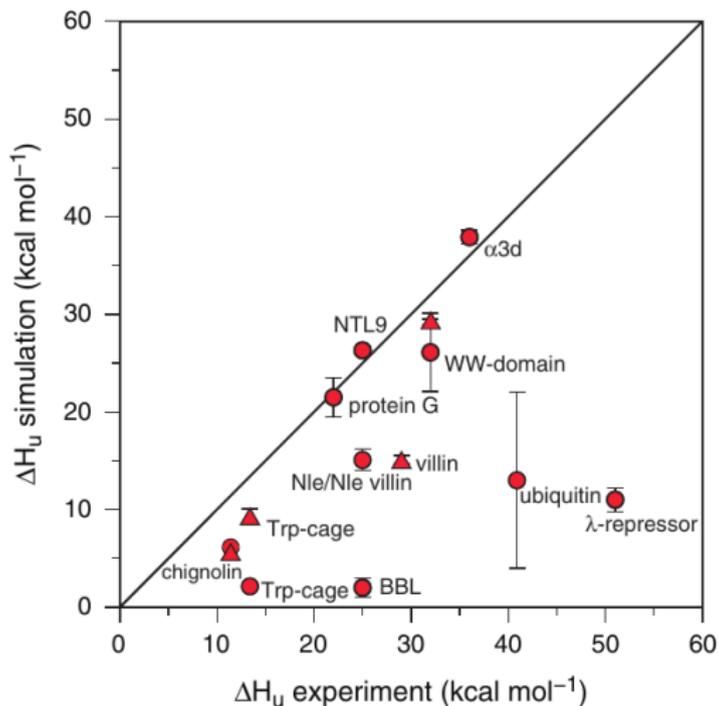
Etat déplié: difficile en MD



Current Opinion in Structural Biology

Thermodynamique du repliement

Prédiction de l'enthalpie de dépliement avec MD



Current Opinion in Structural Biology

Conclusions de Piana et al.

Peuvent les champs de forces en dynamique moléculaire reproduire les données expérimentales du repliement ?

Oui pour :

- Structure native, repliée
- Taux de repliement

Non pour:

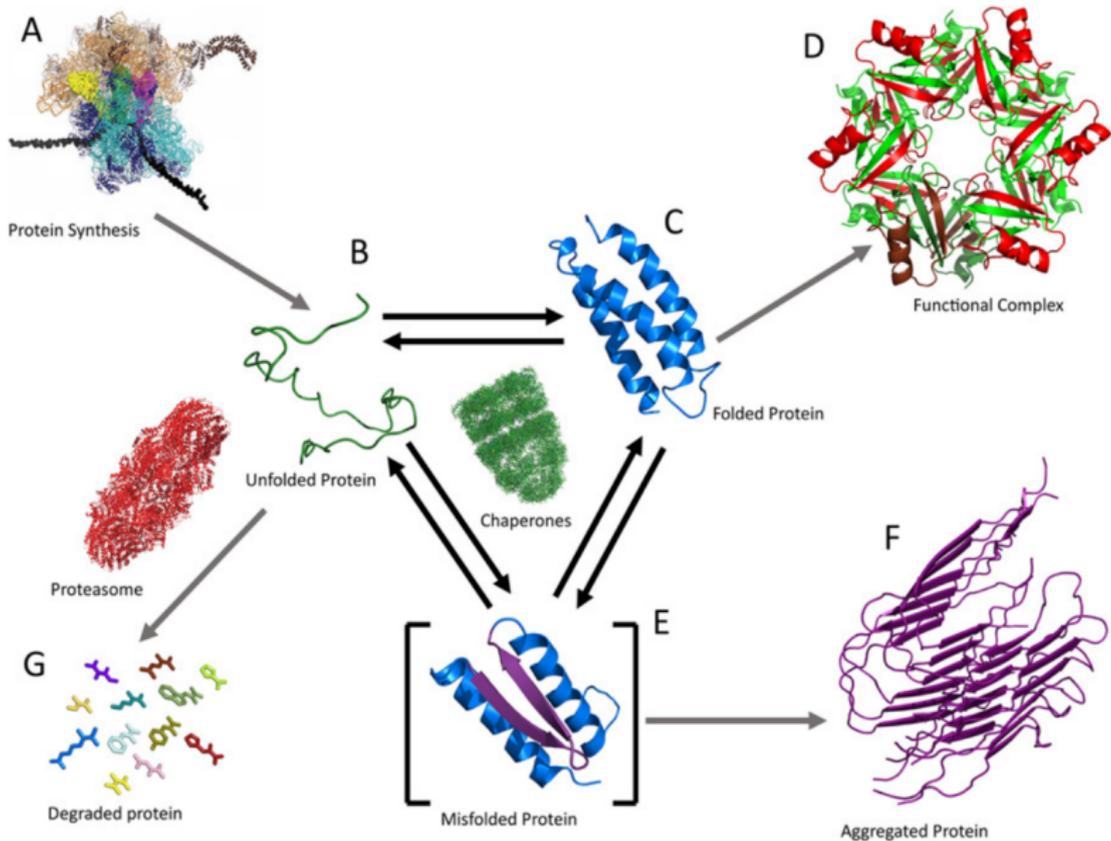
- Cinétique détaillée
- Structures dépliées
- Enthalpie de l'état repliée plus bas qu'en expérimental

6

Repliement in vivo

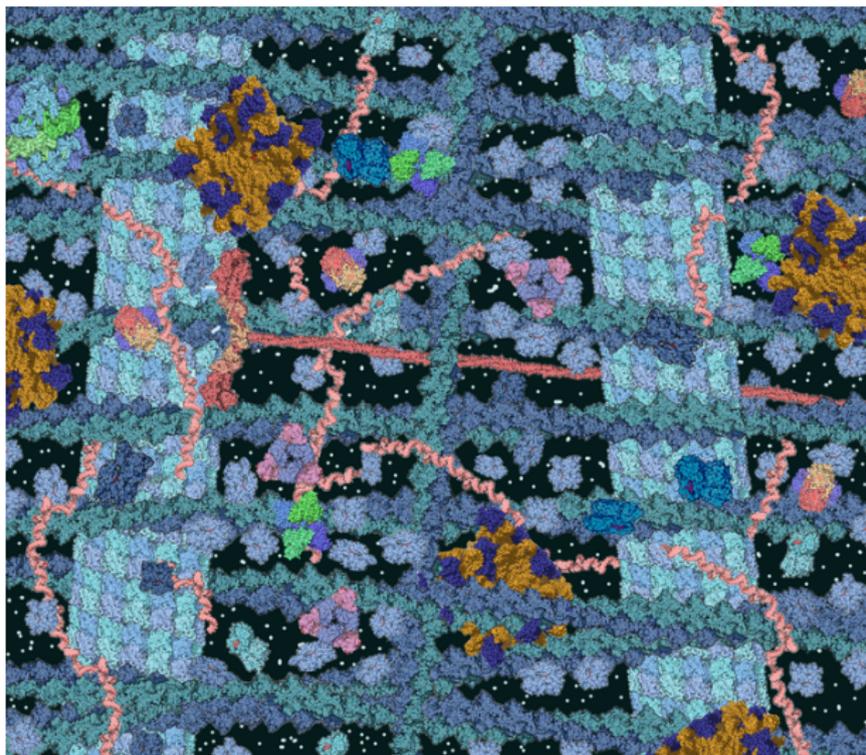
- Introduction
- Environnement cellulaire
- Chaperonnes

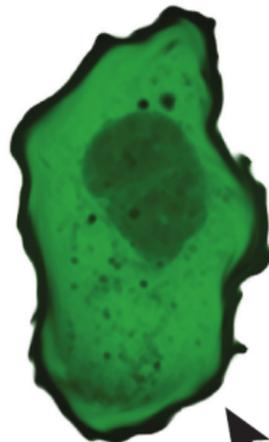
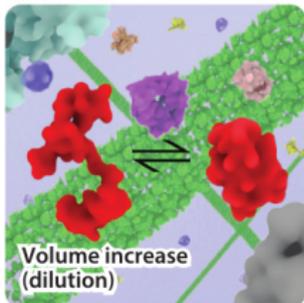
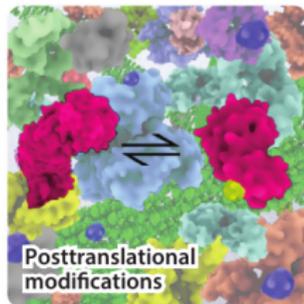
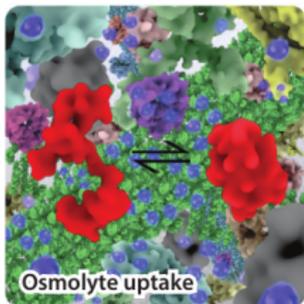
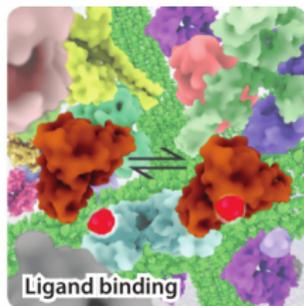
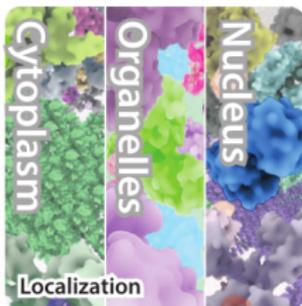
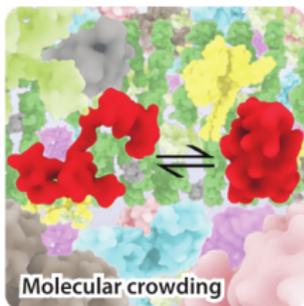
Introduction



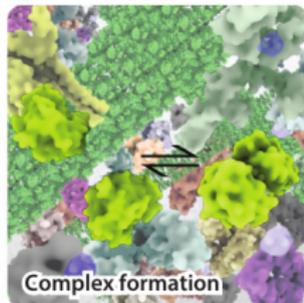
Environnement cellulaire

Molecular crowding





External conditions
(e.g., temperature,
pressure, and
osmolarity)



Chaperonnes

Chaperonnes

- Chaperonne: 19^{ème} siècle, une femme mariée et plus âgée qui veille sur une autre jeune femme non mariée pour qu'elle n'ait pas de mauvaises fréquentations.
- Analogie aux protéines:
 - supervisent l'état de protéines naissantes
 - les maintiennent sur le bon chemin du repliement
 - les éloignent de mauvaises fréquentations qui pourraient mener vers un mauvais assemblage ou agrégation
- Les chaperonnes (des protéines) catalysent le repliement, mais ne changent pas le repliement final, qui est toujours déterminé par la séquence de chaque protéine.

GroEL-GroES

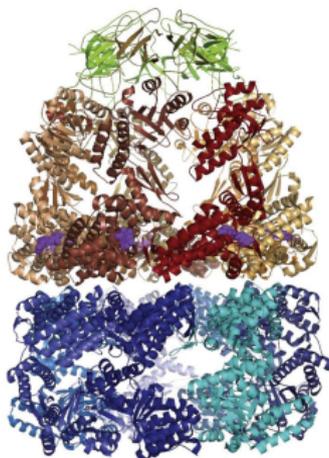
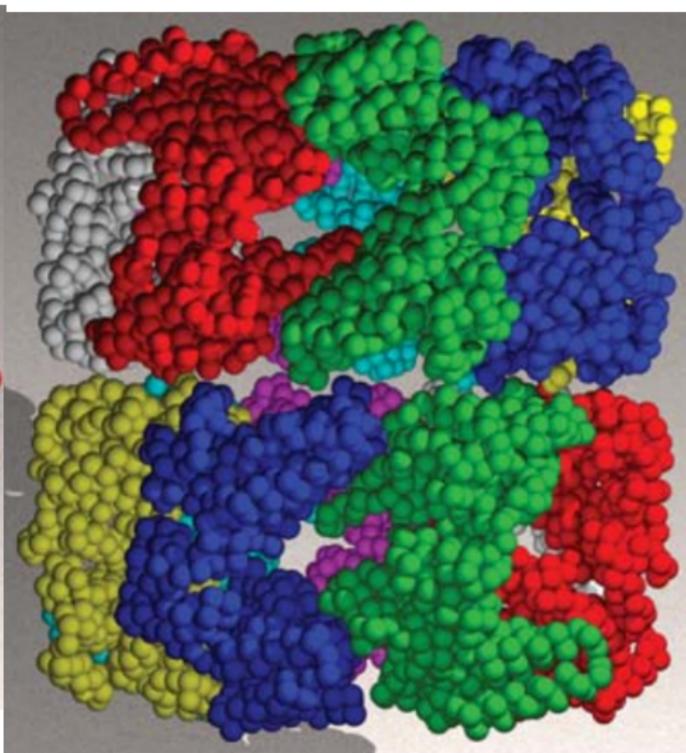
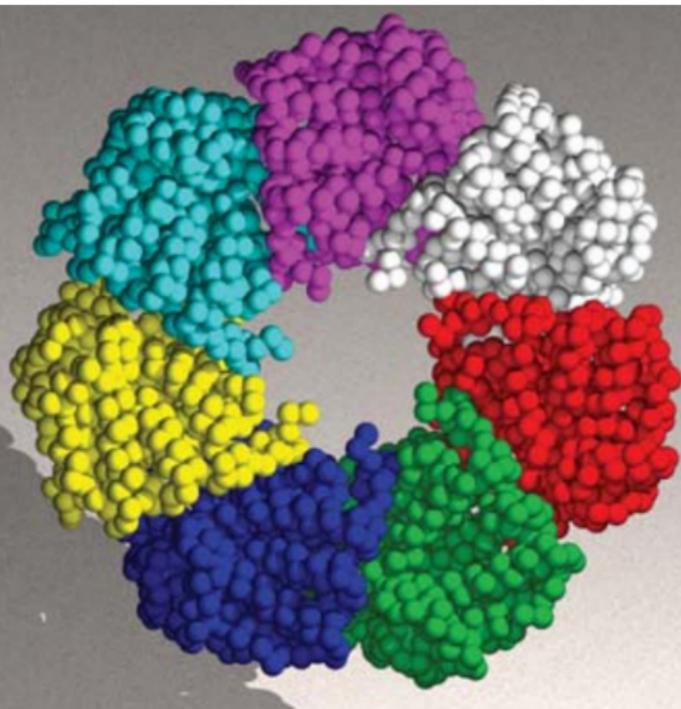


Figure 4.12.1 How Proteins Work (©2012 Garland Science)

- complexe GroEL-GroES (1PF9), "chaperonins (angl)" (aident au repliement)
- GroES en haut, GroEL au milieu et en bas
- Forme de tonneau, protéine rentre par en haut.
- Protéine est liée par la surface intérieure hydrophobe de GroEL, le temps qu'elle se replie, puis largué après un enfouissement de la surface hydrophobe de GroEL

GroEL



GroEL-GroES

- Deux produits du GroE operon
- GroEL (L pour "large"), GroES (S pour "small")
- complexe GroEL-GroES: 14 copies de GroEL (deux anneaux de 7) et 7 copies de GroES
- GroEL:
 - Protéine rentre d'un côté à l'intérieur d'un anneau
 - Une barrière entre les deux anneaux empêche la protéine de traverser les deux anneaux
 - Les deux anneaux communiquent via des changements structuraux allostériques
 - Liaison de ATP et GroES à GroEL élargissent la cavité de GroEL et induisent l'enfouissement de la surface hydrophobe de GroEL qui devient hydrophile pour pouvoir larguer la protéine.
 - La communication allostérique entre les deux anneaux empêche que GroES se lie des deux côtés de GroEL en même temps.

GroEL-GroES

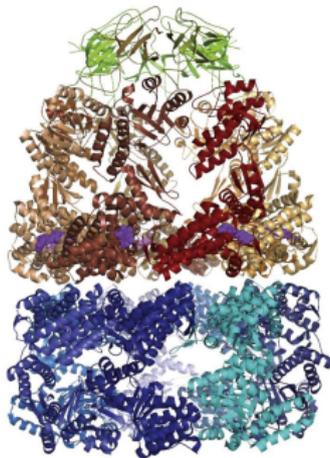
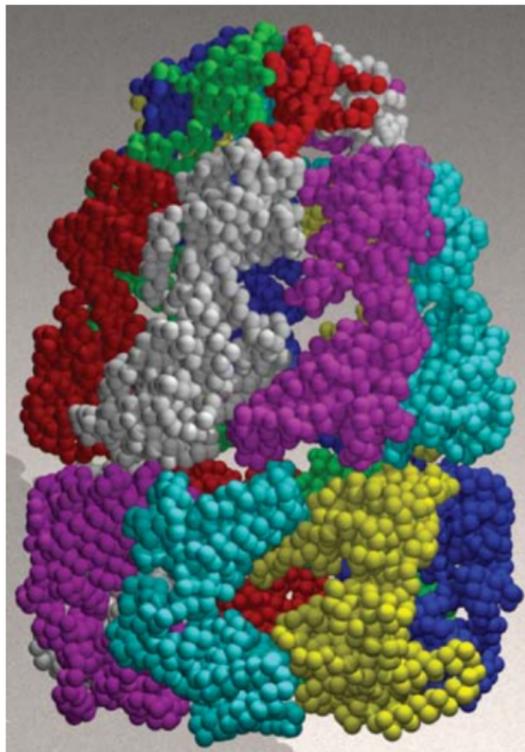


Figure 4.12.1 How Proteins Work (©2012 Garland Science)



GroEL-GroES

- La protéine à environ 20s dans la cavité de GroEL pour se replier correctement
- Si elle sort de nouveau mal replié elle peut entrer dans GroEL (d'une autre complexe) une 2ème fois
- Processus "consomme" 7 voir 14 molécules d'ATP

Changement conformationnel de GroEL



- "Hinge motion": rotation de 90 degrés du domaine apical

The end

- MERCI pour votre attention!

7 Bibliographie

Bibliographie I

- Akasaka, Kazuyuki, Ryo Kitahara, and Yuji O. Kamatari (2013). "Exploring the folding energy landscape with pressure". In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Protein Folding and Stability 531.1–2, pp. 110–115.
- Bowman, Gregory R, Vincent A Voelz, and Vijay S Pande (2011). "Taming the complexity of protein folding". en. In: *Current Opinion in Structural Biology* 21.1, pp. 4–11.
- Chen, Yiwen et al. (2008). "Protein folding: Then and now". In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Highlight Issue: Protein Folding 469.1, pp. 4–19.
- Daggett, Valerie and Alan R. Fersht (2003). "Is there a unifying mechanism for protein folding?" In: *Trends in biochemical sciences* 28.1, pp. 18–25.
- Dill, Ken A. et al. (2008). "The Protein Folding Problem". en. In: *Annual Review of Biophysics* 37.1, pp. 289–316.
- Fersht, Alan R. and Valerie Daggett (2002). "Protein folding and unfolding at atomic resolution". In: *Cell* 108.4, pp. 573–582.
- Gelman, Hannah and Martin Gruebele (2014). "Fast protein folding kinetics". In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 47.2, pp. 95–142.
- Haran, Gilad (2012). "How, when and why proteins collapse: the relation to folding". en. In: *Current Opinion in Structural Biology* 22.1, pp. 14–20.

Bibliographie II

- Korzhnev, Dmitry M. and Lewis E. Kay (2008). "Probing Invisible, Low-Populated States of Protein Molecules by Relaxation Dispersion NMR Spectroscopy: An Application to Protein Folding". In: *Acc. Chem. Res.* 41.3, pp. 442–451.
- Lane, Thomas J et al. (2013). "To milliseconds and beyond: challenges in the simulation of protein folding". en. In: *Current Opinion in Structural Biology* 23.1, pp. 58–65.
- Muñoz, Victor and Michele Cerminara (2016). "When fast is better: protein folding fundamentals and mechanisms from ultrafast approaches". In: *Biochem J* 473.17, pp. 2545–2559.
- Neira, José L. (2013). "NMR as a tool to identify and characterize protein folding intermediates". In: *Archives of Biochemistry and Biophysics. Protein Folding and Stability* 531.1–2, pp. 90–99.
- Onuchic, José Nelson and Peter G Wolynes (2004). "Theory of protein folding". en. In: *Current Opinion in Structural Biology* 14.1, pp. 70–75.
- Piana, Stefano, John L Klepeis, and David E Shaw (2014). "Assessing the accuracy of physical models used in protein-folding simulations: quantitative evidence from long molecular dynamics simulations". en. In: *Current Opinion in Structural Biology* 24, pp. 98–105.
- Searle, Mark S and Barbara Ciani (2004). "Design of β -sheet systems for understanding the thermodynamics and kinetics of protein folding". en. In: *Current Opinion in Structural Biology* 14.4, pp. 458–464.

Bibliographie III

- Thirumalai, D. et al. (2010). “Theoretical Perspectives on Protein Folding”. In: *Annual Review of Biophysics* 39.1, pp. 159–183.
- Udgaonkar, Jayant B. (2013). “Polypeptide chain collapse and protein folding”. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Protein Folding and Stability 531.1–2, pp. 24–33.
- Voelz, Vincent A. et al. (2012). “Slow Unfolded-State Structuring in Acyl-CoA Binding Protein Folding Revealed by Simulation and Experiment”. In: *J. Am. Chem. Soc.* 134.30, pp. 12565–12577.