



HAL
open science

L'échelle atomique comme support pour la biologie : Biochimie et biophysique des protéines (dés)ordonnées par RMN in vitro et en cellules

François-Xavier Theillet

► **To cite this version:**

François-Xavier Theillet. L'échelle atomique comme support pour la biologie : Biochimie et biophysique des protéines (dés)ordonnées par RMN in vitro et en cellules. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2022. tel-04714883

HAL Id: tel-04714883

<https://hal.science/tel-04714883v1>

Submitted on 30 Sep 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

**L'échelle atomique comme support pour la biologie :
Biochimie et biophysique des protéines (dés)ordonnées par RMN *in vitro* et en cellules.**

**Habilitation à diriger des recherches
de l'Université Paris-Saclay**

**présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette,
le 17 Novembre 2022, par**

Francois-Xavier THEILLET

Composition du jury

Carine TISNÉ Directrice de Recherche, CNRS-IBPC	Rapportrice
Olivier LEQUIN Professeur, Sorbonne Université	Rapporteur
Bruno KIEFFER Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
Herman VAN TILBEURGH Professeur, Université Paris-Saclay	Examineur
Carine VAN HEIJENOORT Directrice de Recherche, CNRS-ICSN	Examinatrice
Isabelle LANDRIEU Directrice de Recherche, CNRS-Institut Pasteur Lille	Examinatrice

Titre : L'échelle atomique comme support pour la biologie : biochimie et biophysique des protéines (dés)ordonnées par RMN *in vitro* et en cellules.

Mots clés : RMN, protéines intrinsèquement désordonnées, modifications post-traductionnelles, protéines amyloïdes, signalisation cellulaire, biologie structurale in-cell.

Résumé : Ce manuscrit présente les éléments factuels de mon cursus et de mes activités de recherche, puis décrit mes travaux de recherche passés et présents ; j'y propose aussi mes réflexions sur les suites à leur donner. Cette présentation est chronologique, et donne pour chaque période un panorama des connaissances antérieures aux projets pour comprendre leur contexte, puis montre leur intégration dans les développements postérieurs.

Mes activités se sont construites autour de la spectroscopie RMN et des questions qu'elle pouvait renseigner spécifiquement. Je me suis intéressé successivement à l'analyse conformationnelle des polysaccharides bactériens et leur reconnaissance par le système immunitaire (thèse), puis à l'analyse conformationnelle et biochimique des protéines désordonnées *in vitro* et in-cell (post-doctorat et CR-CNRS), que j'étends aux protéines multidomaines contenant des régions désordonnées et aux kinases (CR-CNRS).

Les lecteurs trouveront de nombreuses informations sur le travail de production recombinante et purification de protéines (en bactérie, « cell-free » et cellules d'insecte et mammifères ; p53, Mdm2, Elk1, Oct4, Sox2, Esrrb, α -synucléine, ..., nombreuses kinases), et d'améliorations de sensibilité pour la spectroscopie RMN (séquences d'impulsions, marquages isotopiques innovants). Les méthodes développées visent à permettre la compréhension : i) de la signalisation cellulaire transmise par les protéines désordonnées et leurs sites de modifications post-traductionnelles multiples ; ii) du comportement structural et des interactions des protéines en cellule. Ils ont trouvé des applications dans l'étude de mécanismes moléculaires liés aux cancers et aux maladies neurodégénératives.

Je décris enfin les avancées récentes de la communauté et leur impact sur les orientations à donner à mes activités.

Title : Atomic scale description to support biology : biochemistry and biophysics of (dis)ordered proteins using NMR *in vitro* and in cells.

Keywords : NMR, intrinsically disordered proteins, post-translational modifications, amyloid proteins, cell signaling, in-cell structural biology.

Abstract : This manuscript presents facts and numbers about my cursus and my research activities, then describes my past and present works; I also give my feelings and thoughts about their future developments. The plan is chronological. For every period, I present the prior knowledge to understand the context and the rationale of the projects, and then their integrations in the later scientific developments.

My activities are based on the use of NMR spectroscopy and the specific questions that it can be tackle. I focused successively on the analysis of the conformational behavior of bacterial polysaccharides and their recognition by the host immune system (PhD thesis), and then on the analysis of the conformational behavior and the biochemistry of intrinsically disordered proteins *in vitro* and in cell (postdoc and CR-CNRS); I work also now on multidomain proteins integrating disordered regions and their kinases.

These works rely on a huge effort in protein recombinant production and purification (using bacteria, cell-free expression, insect and mammalian cells; p53, Mdm2, Elk1, Oct4, Sox2, Esrrb, α -synuclein, ..., and numerous kinases), and in improving NMR sensitivity (pulse sequences, novel isotopic labeling). The readers will find profuse information on these ends. The developed methods aim at expanding knowledge on: i) cell signaling carried out via disordered proteins and their multiple post-translational modifications; ii) structural behavior and interactions of proteins in cells. They found applications in studies about molecular mechanisms linked to cancers and neurodegenerative diseases. I describe in late sections the recent advances in the broad field of biochemistry that must and will impact the future directions of my activities.

1. Curriculum vitae et production	5
1.1. Parcours professionnel.....	5
1.2. Parcours académique.....	5
1.3. Prix, bourses, Financements.....	5
1.4. Activités d'encadrement	5
1.5. Contributions pour la société.....	8
1.6. Production scientifique	8
2. Avant-propos – Démarche	14
3. Travaux de jeune chercheur : 2005-2016.....	15
3.1. Travaux de thèse.....	15
3.1.1. Contexte – Des vaccins glycoconjugués contre les shigelloses ?.....	15
3.1.2. Mime peptidique de l'Ag-O du sérotype 2a de S. flexneri.....	16
3.1.3. Dynamique structurale de complexes anticorps:oligosaccharide	16
3.1.4. Comportements conformationnels des Ag-Os de 12 sérotypes de S. flexneri	16
3.1.5. La biologie structurale pour les polysaccharides : des capacités prédictives limitées ?.....	17
3.2. Post-doctorat.....	18
3.2.1. Contexte - Les IDPs et 2 interrogations : leurs PTMs multiples et leur structure en cellule.....	18
3.2.2. Caractérisation des PTMs de protéines par RMN.....	19
3.2.2.a. Caractéristiques spectroscopiques des PTMs	19
3.2.2.b. Applications à des reporters d'activité enzymatique - Limites de l'approche	20
3.2.2.c. Applications à des protéines portant de nombreux sites de PTMs	21
3.2.3. Biologie structurale in cell	22
3.2.3.b. RMN in cell dans Escherichia coli	24
3.2.3.c. L'α-synucléine observé par RMN in cell dans des cellules mammifères	25
3.2.3.d. Tétramère, monomère ? Une controverse vivace autour de l'α-synucléine	27
3.2.3.e. Une nouvelle méthode pour la structure in-cell de protéines repliées	28
3.2.4. Biophysique des IDPs.....	30
3.2.4.a. Amélioration de la sensibilité pour la spectroscopie RMN des IDPs	30
3.2.4.b. Hélicité de p53 : conséquences sur la signalisation cellulaire.....	30
3.2.4.c. Revues	31
3.2.4.d. Les IDPs et la séparation de phase, une évolution récente	32
4. Travaux actuels : 2017-2022	33
4.1. Protéines intrinsèquement désordonnées et signalisation cellulaire	34
4.1.1. Etat des lieux en 2015 : Les IDPs et leur étude par RMN.....	34
4.1.1.a. Les IDPs, leur fonction, leurs modifications et leur caractérisation structurale.....	34
4.1.1.b. Apports et limites des caractérisations structurales des IDPs par RMN	34
4.1.1.c. Caractériser les IDPs en conditions physiologiques ?.....	35
4.1.2. Les facteurs de transcription de pluripotence Oct4, Sox2, Nanog, Esrrb	36
4.1.2.a. Contexte, questions	36
4.1.2.b. Production et attribution des spectres	38
4.1.2.c. Phosphorylation, biotinylation, pull-downs de mESCs et protéomique.....	42
4.1.2.d. La séparation de phase et les limites de nos approches.....	47
4.1.3. Caractériser les IDPs par RMN en conditions physiologiques : la détection ¹³ C directe.....	48
4.1.4. Amélioration des protocoles de suivi de phosphorylation par RMN.....	51
4.1.5. Le facteur de transcription Elk1.....	51
4.1.6. Mdm2, l'ubiquitine-ligase de p53.....	53
4.1.6.a. Contexte, questions	53
4.1.6.b. Produire les fragments de Mdm2 et Mdm2 entière, attributions des spectres RMN	55
4.1.6.c. Les phosphorylations de Mdm2 : le contexte	60
4.1.6.d. Les phosphorylations de Mdm2 : notre travail	61
4.1.6.e. L'interaction Mdm2:RPL11, phosphoMdm2:RPL11	64
4.1.6.f. Produire les fragments de p53 et p53 entière	66
4.1.6.g. L'interaction Mdm2:p53, phosphoMdm2:p53, des fragments et des surprises	67
4.1.6.h. Production de Mdm2 en cellule eucaryote et analyse.....	72
4.1.6.i. MdmX.....	72
4.1.7. Chk2 et les clusters de phosphorylation ATM/ATR/DNA-PK	73

4.1.7.a. Contexte, questions	73
4.1.7.b. Premiers résultats	75
4.1.8. Contributions diverses au laboratoire et dans la communauté	77
4.1.8.a. Les IDPs et leurs phosphorylations.....	77
4.1.8.b. Caractériser la déamidation et les iso-aspartates par RMN.....	78
4.2. Production de Ser/Thr/Tyr kinases.....	79
4.2.1. Établir une banque de kinases/phosphatases recombinantes actives.....	79
4.2.1.a. Productions de kinases en E. coli : la moitié des structures dans la PDB, mais pas si simples dans beaucoup de cas	80
4.2.1.b. Productions en cellules d'insecte : tests, améliorations de rendements.....	84
4.2.1.c. Productions en cellules mammifères : tests, améliorations de rendements	86
4.2.1.d. Quel système eucaryote utiliser pour la production recombinante ?	87
4.2.2. Biologie structurale des kinases par RMN	88
4.2.2.a. Contexte, état de l'art	88
4.2.2.b. Nos cibles privilégiées	92
4.3. Développements pour la RMN in-cell	93
4.3.1. RMN in-cell, les limites peuvent-elles être repoussées ?	93
4.3.2. Utilisation du système d'expression cell-free pour un marquage spécifique précis	94
4.3.3. Évaluation de l'intérêt de la deutération partielle pour le S/N en RMN ^1H - ^{15}N	96
4.3.4. Établissement de lignées cellules stables inductibles.....	98
4.3.5. Marquages spécifiques par acides aminés ^{13}C et/ou ^{15}N ou $^2\text{D}\alpha$ - β - ^{15}N	100
5. Perspectives – Motivations.....	104
5.1. Si peu de temps : abandonner sélectivement ou persévérer systématiquement ?.....	104
5.2. Directions futures – Une époque scientifique exaltante, et comment y contribuer ? A quoi sommes-nous bons ?.....	106
5.2.1. Mon panorama de la biochimie actuelle et de ses grandes avancées	106
5.2.2. Quelles questions aborder pour que notre expertise soit la plus utile ?.....	106
5.2.2.a. Que faire avec les IDPs ? Identifier des partenaires et des états de PTMs natifs est nécessaire... ..	107
5.2.2.b. Produire des protéines phosphorylées	108
5.2.2.c. La biologie structurale in-cell.....	109
6. Après-propos.....	110
6.1. Réflexions brèves sur le paysage – Quels contrats pour les nouveaux entrants, quel avenir pour la biochimie et la RMN françaises ?.....	110
6.2. Remerciements	113
Références.....	113

1. Curriculum vitae et production

1.1. Parcours professionnel

- 09/2005 – 08/2009 **Doctorat**, Institut Pasteur, Paris, France
2006 – 2009 **Monitorat** (192h, Chimie générale, Spectroscopie, Thermodynamique) Univ. P&M Curie Paris, France
- 01/2010 – 09/2015 **Post-doctorat**, Leibniz Institute for Pharmacology FMP, Berlin, Allemagne
Temps consacré à la recherche : 100%
Employeur : Forschungverbund Berlin e.V.
- 10/2015 – présent **CRCN**, CNRS, I2BC, UMR9198, Gif-sur-Yvette, France
Temps consacré à la recherche : 100%
Employeur : CNRS

1.2. Parcours académique

- 2002 – 2004 **L3-M1 Physique-Chimie appliquée aux Systèmes biologiques**
ENS-Lyon, élève normalien
- 2004 – 2005 **M2 Ingénierie Structurale et Fonctionnelle des Biomolécules**
ENS-Lyon / Univ. Paris R. Descartes, France
- 2005 – 2009 **Doctorat en Biophysique Moléculaire**
Institut Pasteur / Université P&M Curie Paris, France
Directrice de thèse : Dr. Muriel Delepierre.
« *Comportements conformationnels et antigénicités de l'Ag-O de Shigella flexneri et de ses mimes.* ». Thèse soutenue le 29 septembre 2009 à l'Institut Pasteur (<http://www.theses.fr/2009PA066562>). Rapporteurs : Pr. A. Imberti, Pr. F. Dardel ; Examineurs : Pr. G. Trugnan, Pr. P. Sansonetti

1.3. Prix, bourses, Financements

- 2021 CEA-Financement de Thèse
2020 ANR/DFG PRCE (3 ans)
2018 Partenariat industriel avec Cortecnet (évaluation d'un système d'expression « cell-free »)
2018 Financement I2BC Collaboration-Interdépartements
2017 CEA Bottom-up exploratory program
2015 "Hosting of High-Level Researchers" Programme ANR (4 ans)
2013 Magnetic Resonance in Chemistry Award for Young Scientist (MRC journal)
2010 Financement post-doctoral ARC (1 an)
2009 Prix Jacques Monod (pour des études moléculaires de la régulation cellulaire), Fondation de France

1.4. Activités d'encadrement

Université Paris-Saclay

Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

Depuis ma nomination comme chercheur au CNRS en 2016, j'ai encadré 6 stages M1 et 7 stages M2, j'ai co-encadré 1 thèse, et je co-encadre actuellement 2 thèses. J'ai également supervisé les activités de 3 ingénieures d'étude en CDD (18 à 40 mois). Les détails sont fournis ci-dessous :

Stages M1 :

- 2015-2016 : - **Baptiste Nguyen**, Univ. Paris-Sud, Parcours Biologie-Santé, Plateforme Génomique, Biologie Moléculaire et Cellulaire, « Caractérisation des modifications post-traductionnelles du facteur de pluripotence Nanog. ».
- **Marie Sorin**, Univ. Paris-Sud, Parcours Biologie-Santé, Plateforme Génomique, Biologie Moléculaire et Cellulaire, « Caractérisation des modifications post-traductionnelles du facteur de pluripotence Oct4. ».
- 2018-2019 : - **Bilgee Bayanaa**, Sorbonne Université, M1 Biologie moléculaire et cellulaire, « Production et purification de la protéine tyrosine-kinase Src humaine. ».
- **Cladice Varela-Moreira**, Sorbonne Université, M1 Biologie moléculaire et cellulaire, « Expression et purification de CDK1/2 pour l'analyse des phosphorylations sur des facteurs de pluripotence. ».
- 2019-2020 : - **Sarah Eissa**, Sorbonne Université, M1 Chimie, « Production recombinante de MAP-kinases actives. ».
- 2021-2022 : - **Nicolas Texier**, Sorbonne Université, M1 Biologie moléculaire et cellulaire, « Caractérisation biochimique et structurale de la kinase Plk1, une cible anti-cancer. ».

Stages M2 :

- 2016-2017 : - **Bryan Hegy**, Univ. Paris-Sud, M2 Biologie Santé, Ingénierie et Chimie des Biomolécules, « Caractérisation de l'interaction entre l' α -synucléine et les membranes lipidiques par RMN. ».
- **Chafiaa Bouguechtouli**, Univ. P&M Curie, M2 Biologie moléculaire et cellulaire, Parcours Biochimie et Biologie Moléculaire, « Etude des modifications post-traductionnelles par RMN de deux facteurs de Transcription de pluripotence : Esrrb et Nanog. ».
- **Benjamin Bacri**, Univ. P&M Curie, M2 Biologie moléculaire et cellulaire, Parcours Biochimie et Biologie Moléculaire, « Post-Translational Modifications of Sox2. ».
- 2017-2018 : - **Jéromine Carlo**, M2 Biologie-Santé, Ingénierie et Chimie des Biomolécules, « Structural characterization of the interaction between the protein α -Synuclein and lipid membranes. ».
- 2018-2019 : - **Amel Benabdi**, Sorbonne Université, M2 Biologie moléculaire et cellulaire, Parcours Biochimie et Biologie Moléculaire, « Influence des phosphorylations sur l'interaction entre les régions centrales de p53 et Mdm2. ».
- 2020-2021 : - **Hélène Chérot**, Univ. Paris-Saclay, M2 Biologie-Santé, Ingénierie et Chimie des Biomolécules, « Etude de la régulation de la kinase Plk1. ».
- **Yingyue Luo**, Univ. Paris-Saclay, M2 Biologie-Santé, Ingénierie et Chimie des Biomolécules, « Caractérisation des interactions intramoléculaires de MDM2. ».

Encadrement IE :

- 2017-2020 (40 mois) : - **Chafiaa Bouguechtouli** (M2 Univ. P&M Curie), Production recombinante de facteurs de pluripotence Sox2, Esrrb, Production recombinante de kinases, Production d' α -synucléine, Purification de mitochondries.
- 2017-2019 (18 mois) : - **Rania Ghouil** (M2 Univ. P&M Curie), Evaluation et optimisation de kits d'expression cell-free Tayio Nippon-Sanso, Production recombinante de kinases.

2017-2019 (18 mois) : - **Ania Alik** (M2 Univ. Paris-Sud), Production recombinante de Mdm2, Production recombinante de kinases.

Thèse co-encadrée :

Soutenue en 2021 : - **Manon Julien**, Univ. Paris-Saclay, École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique du Fondamental à l'Appliqué (ITFA), co-encadrement Sophie Zinn-Justin « Plk1 mitotic phosphorylation in the N-terminal region of the BRCA2 protein: identification, characterization and role in protein interactions. » (<http://www.theses.fr/2021UPASQ011>).

Thèses encadrées :

Débutées en 2021 : - **Yingyue Luo**, Univ. Paris-Saclay, École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique du Fondamental à l'Appliqué (ITFA), « Régulation de la réponse aux dommages de l'ADN par les clusters de phosphorylation du réseau de signalisation de p53. » (<http://www.theses.fr/s306151>).
- **Hélène Chérot**, Univ. Paris-Saclay, École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique du Fondamental à l'Appliqué (ITFA), « Biologie structurale in-cell à l'échelle atomique par résonance magnétique : étudier l'inhibition de cibles anti-cancer, les kinases, dans l'environnement natif. » (<http://www.theses.fr/s302900>).

Co-publication avec les jeunes chercheuses co-dirigées :

1- Proper chromosome alignment depends on BRCA2 phosphorylation by PLK1

Ehlén Å, Martin C, Miron S, **Julien M**, ..., Carreira A

Nature Commun, 2020, 11, 1819

2- Sensitivity-Enhanced ¹³C-NMR Spectr. for Monitoring Phosphorylation at Physiological Temp. and pH.

Alik A*, Bouguechtouli C*, **Julien M***, Bermel W, **Ghouil R**, Zinn-Justin S, Theillet FX.

*co-1st-authors

Angew Chem, 2020, 59, 10411-10415

3- ¹H, ¹³C and ¹⁵N backbone resonance assignment of the human BRCA2 N-terminal region

Julien M, Miron S, Carreira A, Theillet FX, Zinn-Justin S.

Biomol. NMR Assign, 2020, 14, 79–85

4- Multiple site-specific phosphorylation of IDPs monitored by NMR

Julien M, Bouguechtouli C, Alik A, ...Zinn-Justin S, Theillet FX

Methods Mol. Biol., 2020, 2141, pp. 793–817

Formations à l'encadrement doctoral :

- Participation à la "Formation à l'encadrement des doctorant(e)s" de l'Université Paris-Saclay (16-17 avril 2019).

Participation à des activités d'accompagnement de la formation doctorale :

- Jury Poster/Présentation Orale de la Journée de l'École Doctorale (ED569) 2018, 2019, 2022.
- Comités de suivi de thèse (2022 : Muhammed Bilal Abdul-Shukoor, Université Bordeaux ; Lucy Martin, Université de Lille).

1.5. Contributions pour la société

Actions de vulgarisation et cours académiques :

En réponse à des sollicitations en 2016-2018, j'ai participé à des actions de vulgarisation scientifique, notamment sur la thématique de la présentation des protéines (journaux, radio France Culture, associations locales, aide à TPEs de lycéens). J'ai écrit un article sur l'utilisation de la RMN en Chémobiologie dans le numéro spécial « Chémobiologie » de l'Actualité Chimique 2021.

J'ai délivré des cours ponctuels en M1 et chaque année en M2 pour le cours M2 Pasteur de Biochimie des protéines (thème : les modifications post-traductionnelles). J'assurerai une vingtaine d'heures de TD de Biochimie à l'Université Versailles-St-Quentin au semestre 1 de l'année 2022-23.

Actions d'évaluation de productions et projets scientifiques :

Je suis régulièrement contacté pour être référé pour des revues scientifiques à comité de lecture par les pairs (JBNMR, Biochemistry, JACS, Angew Chem, Nat Struct Mol Biol, ...), j'accepte entre 3 et 5 fois par an.

J'ai également été référé pour l'ANR et pour quelques programmes de financements locaux (UPSaclay, ...), et j'évalue des demandes de temps d'acquisition pour l'infrastructure nationale IR-RMN, désormais Infranalytics (~6 par an).

Actions d'animation de la communauté scientifique :

Je coordonne le club scientifique interne I2BC (Club Post-Translational Modifications ; 60 personnes). J'ai été membre du comité d'organisation de la conférence « Biologie Structural Intégrative 2021 » (250 participants) ; activités de collaborations externes de la plate-forme RMN de l'I2BC.

Activités de recherche interdisciplinaire et/ou lien avec les milieux socio-économiques

Collaboration avec l'entreprise Cortecnet (Voisins-le-Bretonneux) : tests et améliorations de kits de marquages isotopiques commercialisés par l'entreprise, aide/consulting pour le suivi client, externalisation de l'analyse RMN via la plate-forme RMN I2BC (2017-2019).

Collaboration avec Sanofi : évaluation des interactions excipients/anticorps et conséquence sur la viscosité des formulations thérapeutiques, analyse RMN via la plate-forme RMN I2BC. (2022-2025).

1.6. Production scientifique

J'ai dressé des listes de mes contributions scientifiques écrites et orales ci-dessous.

Bibliométrie

Publications dans des journaux à revue par les pairs : 37

1^{er} auteur : 13 ; auteur correspondant : 7

Chapitre de livres : 1 ; Brevet : 1

Nombre de citations (Scopus, septembre 2022) : 2133 - h-index : 20

Publications dans des revues internationales avec comité de lecture par les pairs

- (1) **Theillet, F.-X.**; Saul, F. A.; Vulliez-Le Normand, B.; Hoos, S.; Felici, F.; Weintraub, A.; Mulard, L. A.; Phalipon, A.; Delepierre, M.; Bentley, G. A. Structural Mimicry of O-Antigen by a Peptide Revealed in a Complex with an Antibody Raised against Shigella Flexneri Serotype 2a. *J. Mol. Biol.* **2009**, *388* (4), 839–850. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.057>.

- (2) Dose, A.; Liokatis, S.; **Theillet, F.-X.**; Selenko, P.; Schwarzer, D. NMR Profiling of Histone Deacetylase and Acetyl-Transferase Activities in Real Time. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (5), 419–424. <https://doi.org/10.1021/cb1003866>.
- (3) **Theillet, F.-X.**; Binolfi, A.; Liokatis, S.; Verzini, S.; Selenko, P. Paramagnetic Relaxation Enhancement to Improve Sensitivity of Fast NMR Methods: Application to Intrinsically Disordered Proteins. *J. Biomol. NMR* **2011**, *51* (4), 487–495. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9577-2>.
- (4) **Theillet, F.-X.***; Simenel, C.; Guerreiro, C.; Phalipon, A.; Mulard, L. A.; Delepierre, M. Effects of Backbone Substitutions on the Conformational Behavior of Shigella Flexneri O-Antigens: Implications for Vaccine Strategy. *Glycobiology* **2011**, *21* (1), 109–121. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq136>.
- (5) **Theillet, F.-X.***; Frank, M.; Normand, B. V.-L.; Simenel, C.; Hoos, S.; Chaffotte, A.; Belot, F.; Guerreiro, C.; Nato, F.; Phalipon, A.; Mulard, L. A.; Delepierre, M. Dynamic Aspects of Antibody:Oligosaccharide Complexes Characterized by Molecular Dynamics Simulations and Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance. *Glycobiology* **2011**, *21* (12), 1570–1579. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr059>.
- (6) Binolfi, A.; **Theillet, F.-X.**; Selenko, P. Bacterial In-Cell NMR of Human α -Synuclein: A Disordered Monomer by Nature? *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40* (5), 950–954. <https://doi.org/10.1042/BST20120096>.
- (7) Cordier, F.; Chaffotte, A.; Terrien, E.; Prehaud, C.; **Theillet, F.-X.**; Delepierre, M.; Lafon, M.; Buc, H.; Wolff, N. Ordered Phosphorylation Events in Two Independent Cascades of the PTEN C-Tail Revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (50), 20533–20543. <https://doi.org/10.1021/ja310214g>.
- (8) Liokatis, S.; Stützer, A.; Elsässer, S. J.; **Theillet, F.-X.**; Klingberg, R.; van Rossum, B.; Schwarzer, D.; Allis, C. D.; Fischle, W.; Selenko, P. Phosphorylation of Histone H3 Ser10 Establishes a Hierarchy for Subsequent Intramolecular Modification Events. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19* (8), 819–823. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2310>.
- (9) **Theillet, F.-X.**; Liokatis, S.; Jost, J. O.; Bekei, B.; Rose, H. M.; Binolfi, A.; Schwarzer, D.; Selenko, P. Site-Specific Mapping and Time-Resolved Monitoring of Lysine Methylation by High-Resolution NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (18), 7616–7619. <https://doi.org/10.1021/ja301895f>.
- (10) **Theillet, F.-X.**; Smet-Nocca, C.; Liokatis, S.; Thongwichian, R.; Kosten, J.; Yoon, M.-K.; Kriwacki, R. W.; Landrieu, I.; Lippens, G.; Selenko, P. Cell Signaling, Post-Translational Protein Modifications and NMR Spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **2012**, *54* (3), 217–236. <https://doi.org/10.1007/s10858-012-9674-x>.
- (11) Rose, H. M.; Stuver, M.; Thongwichian, R.; **Theillet, F.-X.**; Feller, S. M.; Selenko, P. Quantitative NMR Analysis of Erk Activity and Inhibition by U0126 in a Panel of Patient-Derived Colorectal Cancer Cell Lines. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834* (7), 1396–1401. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.023>.
- (12) **Theillet, F.-X.**; Kalmar, L.; Tompa, P.; Han, K.-H.; Selenko, P.; Dunker, A. K.; Daughdrill, G. W.; Uversky, V. N. The Alphabet of Intrinsic Disorder: I. Act like a Pro: On the Abundance and Roles of Proline Residues in Intrinsically Disordered Proteins. *Intrinsically Disordered Proteins* **2013**, *1* (1), e24360. <https://doi.org/10.4161/idp.24360>.
- (13) **Theillet, F.-X.**; Rose, H. M.; Liokatis, S.; Binolfi, A.; Thongwichian, R.; Stuver, M.; Selenko, P. Site-Specific NMR Mapping and Time-Resolved Monitoring of Serine and Threonine Phosphorylation in Reconstituted Kinase Reactions and Mammalian Cell Extracts. *Nat. Protoc.* **2013**, *8* (7), 1416–1432. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.083>.
- (14) Borchers, W.[#]; **Theillet, F.-X.[#]**; Katzer, A.; Finzel, A.; Mishall, K. M.; Powell, A. T.; Wu, H.; Manieri, W.; Dieterich, C.; Selenko, P.; Loewer, A.; Daughdrill, G. W. Disorder and Residual

- Helicity Alter P53-Mdm2 Binding Affinity and Signaling in Cells. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 1–5. #equal contributions <https://doi.org/10.1038/nchembio.1668>.
- (15) Gauthier, C.; Chassagne, P.; **Theillet, F.-X.**; Guerreiro, C.; Thouron, F.; Nato, F.; Delepiepierre, M.; Sansonetti, P. J.; Phalipon, A.; Mulard, L. A. Non-Stoichiometric O-Acetylation of Shigella Flexneri 2a O-Specific Polysaccharide: Synthesis and Antigenicity. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12 (24), 4218–4232. <https://doi.org/10.1039/c3ob42586j>.
- (16) Kosten, J.; Binolfi, A.; Stuver, M.; Verzini, S.; **Theillet, F.-X.**; Bekei, B.; van Rossum, M.; Selenko, P. Efficient Modification of Alpha-Synuclein Serine 129 by Protein Kinase CK1 Requires Phosphorylation of Tyrosine 125 as a Priming Event. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, 5 (12), 1203–1208. <https://doi.org/10.1021/cn5002254>.
- (17) **Theillet, F.-X.**; Binolfi, A.; Frembgen-Kesner, T.; Hingorani, K.; Sarkar, M.; Kyne, C.; Li, C.; Crowley, P. B.; Gierasch, L.; Pielak, G. J.; Elcock, A. H.; Gershenson, A.; Selenko, P. Physicochemical Properties of Cells and Their Effects on Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). *Chem. Rev.* **2014**, 114 (13), 6661–6714. <https://doi.org/10.1021/cr400695p>.
- (18) Danielsson, J.; Mu, X.; Lang, L.; Wang, H.; Binolfi, A.; **Theillet, F.-X.**; Bekei, B.; Logan, D. T.; Selenko, P.; Wennerstrom, H.; Oliveberg, M. Thermodynamics of Protein Destabilization in Live Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, 112 (40), 12402–12407. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511308112>.
- (19) Smith, M. J.; Marshall, C. B.; **Theillet, F.-X.**; Binolfi, A.; Selenko, P.; Ikura, M. Real-Time NMR Monitoring of Biological Activities in Complex Physiological Environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2015**, 32, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.003>.
- (20) Thongwichian, R.; Kosten, J.; Benary, U.; Rose, H. M.; Stuver, M.; **Theillet, F.-X.**; Dose, A.; Koch, B.; Yokoyama, H.; Schwarzer, D.; Wolf, J.; Selenko, P. A Multiplexed NMR-Reporter Approach to Measure Cellular Kinase and Phosphatase Activities in Real-Time. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137 (20), 6468–6471. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b02987>.
- (21) Binolfi, A.; Limatola, A.; Verzini, S.; Kosten, J.; **Theillet, F.-X.**; May Rose, H.; Bekei, B.; Stuver, M.; van Rossum, M.; Selenko, P. Intracellular Repair of Oxidation-Damaged α -Synuclein Fails to Target C-Terminal Modification Sites. *Nat. Commun.* **2016**, 7, 10251. <https://doi.org/10.1038/ncomms10251>.
- (22) Müntener, T.; Häussinger, D.; Selenko, P.; **Theillet, F.-X.*** In-Cell Protein Structures from 2D NMR Experiments. *J Phys Chem Lett* **2016**, 7 (14), 2821–2825. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b01074>.
- (23) Mylona, A.; **Theillet, F.-X.**; Foster, C.; Cheng, T. M.; Miralles, F.; Bates, P. A.; Selenko, P.; Treisman, R. Opposing Effects of Elk-1 Multisite Phosphorylation Shape Its Response to ERK Activation. *Science* **2016**, 354 (6309), 233–237. <https://doi.org/10.1126/science.aad1872>.
- (24) Samson, C.; Herrada, I.; Celli, F.; **Theillet, F.-X.**; Zinn-Justin, S. 1H, 13C and 15N Backbone Resonance Assignment of the Intrinsically Disordered Region of the Nuclear Envelope Protein Emerin. *Biomol NMR Assign* **2016**, 10 (1), 179–182. <https://doi.org/10.1007/s12104-015-9662-7>.
- (25) **Theillet, F.-X.**; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; Rose, H. M.; Stuver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; van Rossum, M.; Goldfarb, D.; Selenko, P. Structural Disorder of Monomeric α -Synuclein Persists in Mammalian Cells. *Nature* **2016**, 530 (7588), 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature16531>.
- (26) Samson, C.; Celli, F.; Hendriks, K.; Zinke, M.; Essawy, N.; Herrada, I.; Arteni, A.; Theillet, F.; Alpha-Bazin, B.; Armengaud, J.; Coirault, C.; Lange, A.; Zinn-Justin, S. Emerin Self-assembly Mechanism: Role of the LEM Domain. *FEBS J* **2017**, 284 (2), 338–352. <https://doi.org/10.1111/febs.13983>.

- (27) Celli, F.; Petitalot, A.; Samson, C.; **Theillet, F.-X.**; Zinn-Justin, S. 1H, 13C and 15N Backbone Resonance Assignment of the Lamin C-Terminal Region Specific to Prelamin A. *Biomol NMR Assign* **2018**, *12* (2), 225–229. <https://doi.org/10.1007/s12104-018-9813-8>.
- (28) Shenoy, J.; El Mammeri, N.; Dutour, A.; Berbon, M.; Saad, A.; Lends, A.; Morvan, E.; Grélard, A.; Lecomte, S.; Kauffmann, B.; **Theillet, F.-X.**; Habenstein, B.; Loquet, A. Structural Dissection of Amyloid Aggregates of TDP-43 and Its C-Terminal Fragments TDP-35 and TDP-16. *FEBS J.* **2019**. <https://doi.org/10.1111/febs.15159>.
- (29) Alik, A.; Bouguechtouli, C.; Julien, M.; Bermel, W.; Ghouil, R.; Zinn-Justin, S.; **Theillet, F.-X.*** Sensitivity-Enhanced 13 C-NMR Spectroscopy for Monitoring Multisite Phosphorylation at Physiological Temperature and PH. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**. <https://doi.org/10.1002/anie.202002288>.
- (30) Bodor, A.; Haller, J. D.; Bouguechtouli, C.; **Theillet, F.-X.**; Nyitray, L.; Luy, B. Power of Pure Shift H α C α Correlations: A Way to Characterize Biomolecules under Physiological Conditions. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (18), 12423–12428. <https://doi.org/10.1021/acs.anal-chem.0c02182>.
- (31) Ehlén, Å.; Martin, C.; Miron, S.; Julien, M.; **Theillet, F.-X.**; Ropars, V.; Sessa, G.; Beaufepere, R.; Boucherit, V.; Duchambon, P.; El Marjou, A.; Zinn-Justin, S.; Carreira, A. Proper Chromosome Alignment Depends on BRCA2 Phosphorylation by PLK1. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1819. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15689-9>.
- (32) Julien, M.; Bouguechtouli, C.; Alik, A.; Ghouil, R.; Zinn-Justin, S.; **Theillet, F.-X.*** Multiple Site-Specific Phosphorylation of IDPs Monitored by NMR. In *Intrinsically Disordered Proteins: Methods and Protocols*; Kragelund, B. B., Skriver, K., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2020; pp 793–817. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0524-0_41.
- (33) Julien, M.; Miron, S.; Carreira, A.; **Theillet, F.-X.**; Zinn-Justin, S. 1H, 13C and 15N Backbone Resonance Assignment of the Human BRCA2 N-Terminal Region. *Biomolecular NMR Assignments* **2020**, *14* (1), 79–85. <https://doi.org/10.1007/s12104-019-09924-8>.
- (34) Verzini, S.; Shah, M.; **Theillet, F.-X.**; Belsom, A.; Bieschke, J.; Wanker, E. E.; Rappsilber, J.; Binolfi, A.; Selenko, P. Megadalton-Sized Dityrosine Aggregates of α -Synuclein Retain High Degrees of Structural Disorder and Internal Dynamics. *J. Mol. Biol.* **2020**, *432* (24), 166689. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.023>.
- (35) Marcelot, A.; Petitalot, A.; Ropars, V.; Le Du, M.-H.; Samson, C.; Dubois, S.; Hoffmann, G.; Miron, S.; Cuniasse, P.; Marquez, J. A.; Thai, R.; **Theillet, F.-X.**; Zinn-Justin, S. Di-Phosphorylated BAF Shows Altered Structural Dynamics and Binding to DNA, but Interacts with Its Nuclear Envelope Partners. *Nucleic Acids Research* **2021**, *49* (7), 3841–3855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab184>.
- (36) **Theillet, F.-X.*** In-Cell Structural Biology by NMR: The Benefits of the Atomic Scale. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (10), 9497–9570. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00937>.
- (37) **Theillet, F.-X.***; Luchinat, E. In-Cell NMR: Why and How? *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2022**, *132–133*, 1–112. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2022.04.002>.

Présentations orales en conférence/workshops internationaux : 17 sélectionnées, 10 invitées (*)

1- 07/2009 15th European Carbohydrate Symposium, Vienne, Autriche.

"Mimicking bacterial polysaccharide antigens by synthetic oligosaccharides : conformational studies on *Shigella flexneri* 2a."

2- 12/2009 GTBio 2009, Paris, France. "Dynamic interactions antibody:polysaccharide."

"¹³C NMR for IDPs."

- 3- 08/2012 25th International Conference on Magnetic Resonance in Biological System, Lyon, France.
"Post-translational protein modifications by NMR spectroscopy."
- 4- 06/2013 IDPbyNMR Workshop, Hersonissos, Grèce.
"In-cell dynamics, interactions & structural features of the human amyloidogenic protein α -synuclein."
- 5- 07/2013 EUROMAR Conference, Hersonissos, Grèce.
"In-cell dynamics, interactions & structural features of the human amyloidogenic protein α -synuclein."
- 6- 09/2014 EMBO/FEBS Conference, Paris, France.
"Studying Post-Translational Modifications using NMR."
- 7- 07/2015 EBSA European Biophysical Congress, Dresden, Allemagne.
"Disorder and helicity control p53 signaling."
- 8- 08/2015 ISMAR Magnetic Resonance Conference, Shanghai, République Populaire de Chine.
"Post-translational modifications by NMR."
- 9- 04/2016 GERM Magnetic Resonance Conference, Lisbon, Portugal.
"NMR for in-cell structural biology and post-translational modifications."
- 10- 06/2016* Magn. Resonance for Cellular Structural Biology Workshop, Grosseto, Italie.
"NMR for in-cell structural biology."
- 11- 06/2016 Gordon Research Conf., Disordered proteins, Les Diablerets, Suisse.
"Elk1 phosphorylation and feedback."
- 12- 08/2016 ICMRBS Magnetic Resonance for Biological Systems, Kyoto, Japon.
"NMR for in-cell structural biology."
- 13- 03/2017 Advanced Isotopic Labeling Methods for Struct. Biol. Grenoble, France.
"Paramagnetic tags for in-cell NMR and EPR."
- 14- 07/2017* IUPAB/EBSA, "New&Notable" plenary presentation, Edinburgh, Ecosse.
"Structural disorder of α -synuclein persists in mammalian cells."
- 15- 07/2017 European Biophysics ARBRE-MOBIEU meeting, Edinburgh, Ecosse.
"NMR for in situ structural biology."
- 16- 08/2017 Gordon Research Conference, PTMs networks, Hong-Kong, République Populaire de Chine. "NMR spectroscopy for PTMs."
- 17- 09/2017* FGMR meeting, Bayreuth, Allemagne.
"NMR for post-translational modifications and in-cell structural biology."
- 18- 10/2017* 8th Asia-Pacific IDP Symposium, Seoul, Corée du Sud.
"NMR for post-translational modifications and in-cell structural biology."
- 19- 07/2018* EUROMAR Magnetic Resonance Conference, Nantes, France.
"Disordered proteins closer to physiological conditions."
- 20- 08/2018 ICMRBS Magnetic Resonance for Biological Systems, Dublin, Ireland.
"Disordered proteins closer to physiological conditions."
- 21- 10/2018* 9th Asia-Pacific IDP Symposium, Seoul, Corée du Sud.
"Disordered proteins closer to physiological conditions."
- 22- 11/2018* In-cell NMR Workshop, Rosario, Argentine.
"NMR for post-translational modifications." & "How to get atomic details in cells?"
- 23- 03/2019 Advanced Isotopic Labeling Methods for Struct. Biol. Grenoble, France.
"Amino acids α -deuteration makes kinases (almost) NMR friendly."
- 24- 10/2019* 10th Asia-Pacific IDP Symposium, Seoul, Corée du Sud.
"IDPs are Intrinsically Disordered Phosphoproteins."
- 25- 10/2019* 58th Annual Meeting of the NMR Society of Japan, Tokyo, Japon.
"Amino acids α -deuteration makes kinases (almost) NMR friendly."

- 26- 03/2022* Advanced Isotopic Labeling Methods for Struct. Biol. Grenoble, France.
"Novel mammalian expression systems and isotope labeling for in-cell NMR studies."
27- 09/2022 Advanced Isotopic Labeling Methods for Struct. Biol. Grenoble, France.
"Novel mammalian expression systems and isotope labeling for in-cell NMR studies."

Conférences/workshops nationaux :

- 1- 06/2007 Congrès du groupe thématique de RMN de la SFBBM, Dourdan.
" Comportements structuraux et reconnaissances spécifiques par le système immunitaire d'oligosaccharides fragments de l'Ag-O de *Shigella flexneri* 2a. "
- 2- 05/2008 6è congrès des jeunes chercheurs de l'Institut Pasteur, Paris.
" Mimicry of bacterial polysaccharide antigens by synthetic oligosaccharides and peptides : structural studies on the *Shigella flexneri* 2a model. "
- 3- 02/2009 Journée Hiver 2008-2009 RMN GbP, Paris.
"Interactions dynamiques entre un mAb et son antigène naturel polysaccharidique. "
- 4- 03/2009 21è congrès du GERM, Fréjus.
"Mimicry of bacterial polysaccharide antigens by oligosaccharides : structural studies on *Shigella flexneri* 2a. "
- 5- 06/2014 GERM, Biarritz.
"RMN in cellula, quels résultats? »
- 6- 12/2016 SFB GTBio, Obernai.
"Transcription factor Elk1 phosphorylation and feedback. "
- 7- 06/2017 Ecole Magnetisme Resonance Magnetique, Carry-le-Rouet.
"Protein structure and dynamics in cells studied by NMR. "
- 8- 05/2022 Journées scientifiques du GDR Chembio, Toulouse.
"Novel mammalian expression systems and isotope labeling for in-cell NMR studies. "

Séminaires invités : 21

Brevets Internationaux :

- Mulard LA, Phalipon A, Vulliez-Le Normand B, **Theillet FX**, Bentley G, Saul F, Delepierre M, Felici F. *Immunogenic polypeptides that mimic the surface polysaccharide o-antigen from serotype 2a shigella flexneri, method for obtaining the same, and their use in vaccine and diagnostic compositions* WO2009141455 A1. **2009**.

2. Avant-propos – Démarche

L'exercice de synthèse auquel je me soumetts ici n'est pas strictement défini par l'Université et par l'arrêté relatif à l'habilitation à diriger les recherches. Il s'agit d'« *un dossier de travaux, accompagnés d'une synthèse de l'activité scientifique du candidat permettant de faire apparaître son expérience dans l'animation d'une recherche.* » Il doit démontrer une démarche originale dans un domaine scientifique, la maîtrise d'une stratégie autonome de recherche scientifique dans un domaine suffisamment large, et la capacité à l'encadrement de jeunes chercheurs.

J'ai décidé d'organiser la présentation de cette synthèse en suivant l'ordre chronologique de mes travaux depuis la thèse de doctorat, en séparant les périodes correspondant aux positions que j'occupais. À chaque étape, j'ai expliqué le contexte et les questions initiales dans lesquels s'inscrivaient mes recherches, puis les résultats obtenus et leurs portées, les travaux qui n'ont pas abouti aussi, et enfin leur intégration dans les années postérieures. Cette organisation laissera apparaître naturellement, je l'espère, le recul sur mes activités, le champ disciplinaire et ses évolutions.

La mise en contexte, initial ou postérieur, s'accompagne nécessairement d'explications sur les choix de directions scientifiques et personnelles. Ces choix peuvent en effet être rationalisés, surtout *a posteriori*, mais ils sont aussi ceux des préférences et des instincts. Les introductions et les conclusions peuvent ainsi ressembler un peu à de l'égo-histoire, que je n'aime pas trop, mais qui est inévitable au cours de cet exercice : il faut bien expliquer ces instincts de chercheur qui font son parcours de recherche pour en faire voir la logique. Et pour faire voir « les capacités à concevoir, animer et coordonner des activités de recherche et de valorisation. » J'ajouterai : et à rebondir face à l'inattendu et aux évènements, les activités de recherche ne se déployant que dans un paysage toujours changeant.

J'évoquerai dans un dernier chapitre comment je compte orienter mes travaux en fonction de l'état actuel de ce paysage socio-économico-scientifique du moment.

J'ai profité de l'écriture de ce manuscrit pour mettre à jour ma bibliographie, faire un état des lieux de mes travaux et un répertoire des constructions peptidiques utilisées (fichier texte disponible dans le répertoire MyCore). La lecture dans le détail de ces travaux sera peut-être un peu fastidieuse, mais c'est aussi dans le détail que se trouve l'expérience acquise. Les sous-chapitres d'introduction et de conclusion sont sans doute suffisants pour les mettre en perspective.

3. Travaux de jeune chercheur : 2005-2016

3.1. Travaux de thèse

Sujet de la thèse : Comportements conformationnels et antigénicités des Ag-Os de *Shigella flexneri* et de leurs mimes.

Direction : Dr. Muriel Delepierre

Laboratoire : Unité de RMN des Biomolécules, UMR 3528, Institut Pasteur, Paris.

Publications : - Mulard LA et al. (2009) Brevet international WO2009141455 A1.

- Theillet FX et al. (2009) *J Mol Biol*, 388, 839-850.¹ (11 citations)
- Theillet FX et al. (2011) *Glycobiology*, 21, 109-121.² (35 citations)
- Theillet FX et al. (2011) *Glycobiology*, 21, 1570-1579.³ (14 citations)
- Theillet FX et al. (2012) In *Anticarbohydrate Antibodies*, Springer (Vienna), 1-36.⁴ (11 citations)
- Gauthier C et al. (2014) *Org Biomol Chem*, 12, 4218-4232.⁵ (24 citations)

3.1.1. Contexte – Des vaccins glycoconjugués contre les shigelloses ?

Dans le cadre de la définition d'antigènes à visées vaccinales, j'ai mené une étude structurale sur les Antigènes-O (Ag-Os) de *Shigella*, bactérie responsable de 200 millions par an de cas de dysenteries dans le monde.⁶ L'Ag-O est la partie polysaccharidique, non-toxique du lipopolysaccharide bactérien, composée d'unités oligosaccharidiques répétées. Sa composition est variable entre les souches et définit des sérotypes reconnus par le système immunitaire à l'issue d'une infection. Les équipes de l'Institut Pasteur cherchent à établir de nouvelles stratégies vaccinales contre *S. flexneri*, ardemment encouragées par l'OMS (<https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals/diseases/shigella>). L'utilisation de fragments synthétiques de l'Ag-O liés à une protéine porteuse induisant une mémoire immunitaire était envisagée.^{7,8}

En collaboration avec des cristallographes (Equipe G. Bentley), des chimistes (Equipe L.A. Mulard) et des immunologistes (Equipe A. Phalipon) de l'Institut Pasteur, j'ai étudié des fragments oligosaccharidiques de l'Ag-O, qui peuvent être de bonnes cibles immunogéniques,^{7,8} mais dont on ignorait les structures tridimensionnelles. Je préfère d'ailleurs parler de comportements conformationnels plutôt que de structures rigides : les polysaccharides présentent plusieurs conformations favorisées énergétiquement à chaque liaison glycosidique, dont aucune n'est sélectionnée par un repliement stable du polymère, comme on peut l'observer pour les protéines. J'ai établi des correspondances entre ces comportements conformationnels et immunogénicités de ces oligosaccharides et j'ai mis en évidence les ressemblances conformationnelles entre les Ag-Os des différents sérotypes.

Cette description des molécules étudiées a contribué à consolider la pertinence du projet vaccinal, et, modestement sans doute, aidé à l'obtention de financements importants de l'Union Européenne (projet Stopenterics, FP7, <https://cordis.europa.eu/project/id/261472/fr>) et de la Fondation Gates pour des tests cliniques. Des tests cliniques de phase I et II ont été menés depuis et ont montré la faisabilité d'un passage à l'échelle industrielle, l'immunogénicité et la sûreté de vaccins glycoconjugués.^{8,9}

3.1.2. Mime peptidique de l'Ag-O du sérotype 2a de *S. flexneri*

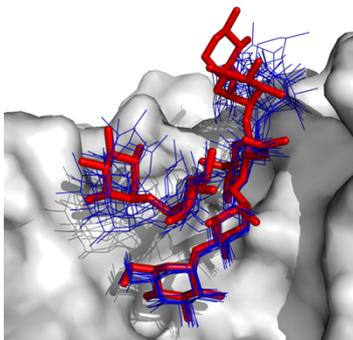
Des peptides « mimes » de polysaccharides Ag-O bactériens peuvent être sélectionnés par criblages contre des anticorps anti-Ag-O en utilisant le phage-display. L'utilisation de tels peptides mimes avait été envisagée dans les années 2000 pour induire une réaction immunitaire mémoire contre des bactéries pathogènes.¹⁰ Les peptides peuvent en effet induire une réponse engendrant une mémoire immunitaire, contrairement aux polysaccharides seuls. J'ai mené l'étude conformationnelle d'un peptide mime par RMN, et de son interaction avec un anticorps monoclonal (mAb) protecteur par RMN et calorimétrie.

J'ai caractérisé les structures d'un peptide mime nommé « B1 » et de l'Ag-O du sérotype 2a de *S. flexneri*, et montré que B1 était un mime structural de l'Ag-O de *S. flexneri* 2a.¹ Cependant, les anticorps obtenus après immunisation de souris par le peptide B1 ne reconnaissaient pas l'Ag-O de *S. flexneri* 2a. Ainsi, nous avons montré pour la première fois que même lorsqu'un peptide mime de polysaccharide présente un haut degré de mimétisme structural, son mimétisme immunologique était difficilement prévisible.

Les stratégies visant à utiliser des mimes peptidiques de polysaccharides à des fins vaccinales ont disparu de la littérature dans les années 2010, à notre connaissance.

3.1.3. Dynamique structurale de complexes anticorps:oligosaccharide

Nous voulions définir les fragments optimaux pour un vaccin contre *S. flexneri* 2a utilisant un oligosaccharide synthétique comme antigène. J'ai mené une étude structurale sur des oligosaccharides synthétiques et leur interaction avec un mAb protecteur par RMN, modélisation informatique (dynamique moléculaire), fluorescence et ITC.



En intégrant toutes ces données, j'ai décrit la structure et la flexibilité de complexes anticorps:oligosaccharide.^{3,5} Nous avons ainsi montré pour la première fois que les oligosaccharides fragments de l'Ag-O qui adoptaient à l'état libre la conformation reconnue par le mAb avaient les meilleures affinités et aussi les meilleures immunogénicités.³ Nous pouvons ainsi choisir rationnellement les fragments d'Ag-O pour une composition vaccinale.

Figure 1 : Structures d'un fragment de l'Ag-O de *S. flexneri* 2a en complexe avec un mAb (rouge : en cristal ; lignes bleues : dynamiques moléculaires).

Theillet FX et al. (2011) *Glycobiology*, 21, 1570-1579³

3.1.4. Comportements conformationnels des Ag-Os de 12 sérotypes de *S. flexneri*

L'espèce *S. flexneri* présente 14 sérotypes,^{8,11} dont les Ag-Os présentent le même squelette saccharidique mais des substitutions différentes (glycosyls ou acétyls). Il faudrait définir une stratégie vaccinale protectrice contre un maximum de sérotypes. J'ai mené une étude structurale par RMN et modélisation informatique sur les Ag-Os de 12 sérotypes.

Nous avons montré que ces substitutions réduisent l'espace conformationnel accessible pour le squelette des Ag-Os, et ne suscitent pas de nouvelles conformations.² Cela m'avait amené à émettre une hypothèse : la présentation au système immunitaire d'une série limitée de sérotypes combinés pourrait induire une réponse protectrice contre un plus grand nombre de sérotypes.

Cette hypothèse était cohérente avec les reconnaissances croisées, mais très partielles, de différents sérotypes de *S. flexneri* par des sera post-infections.^{11,12} Des immunogénicités croisées issues d'immunisations multivalentes ont été observées par la suite, qui montraient des réactivités envers des sérotypes absents des formules vaccinales testées.¹²⁻¹⁵ Les vaccins anti-Shigella devront nécessairement produire une immunogénicité couvrant un maximum de sérotypes, afin d'éviter l'échappement de sérotypes non-contrôlés.¹⁶⁻¹⁸

3.1.5. La biologie structurale pour les polysaccharides : des capacités prédictives limitées ?

Mes travaux de thèse m'ont permis d'explorer nombre de techniques et de concepts propres aux approches de biologie structurale, en les appliquant à un sous-domaine assez peu populaire, la biologie structurale des polysaccharides. J'ai eu la satisfaction de trouver des explications physiques aux observations expérimentales, depuis la biophysique des interactions macromoléculaires jusqu'aux immunogénicités des oligosaccharides étudiés. Cependant, j'ai également eu le sentiment que ces explications pouvaient sans doute se généraliser assez directement : les oligosaccharides devaient être suffisamment longs pour avoir un comportement structural et exposer des épitopes similaires aux Ag-Os dont ils étaient les fragments, et pour être de bons mimes pour le système immunitaire. Ainsi, de nombreux candidats vaccins glycoconjugués ont été proposés qui montrent leur efficacité, sans que les stratégies correspondantes ne nécessitent de biologie structurale pour être conçues.¹⁹⁻²²

Des modélisations de polysaccharides de *S. flexneri* ont été reproduites depuis par d'autres groupes, de nouveaux oligosaccharides et des interactions avec des anticorps aussi, qui vérifient globalement les résultats obtenus au cours de ma thèse.²³⁻²⁶ J'avais accompli des travaux tardifs de modélisation de polysaccharides intégrant des saccharides désoxygénés (un C-OH devient un CH sur le cycle), qui sont parfois produits chez les êtres vivants et peuvent être synthétisés.²⁷ Mon hypothèse était qu'ils permettraient de bloquer les liaisons glycosidiques dans des conformations uniques, ce qui aurait pu être avantageux pour leur immunogénicité si l'épitope « désoxy » n'était pas exposé au solvant. Mes modélisations par dynamique moléculaire confirmaient le blocage conformationnel dans certains cas. Ce travail et les développements de champ de force correspondant n'ont pas été publiés : ils requerraient un travail de synthèse important pour des vérifications expérimentales, qui n'ont pas été entreprises.

A ma connaissance, les techniques d'études structurales de polysaccharides en solution et de leurs interactions avec des protéines n'ont pas beaucoup évolué depuis ma thèse, utilisant les données limitées des NOEs ou de STD-NMR, et éventuellement de cristallographie et de dynamique moléculaire.²⁸⁻³⁰ Est-ce à cause des limites évoquées en termes de capacités prédictives, ou du manque d'attractivité du champ scientifique, mesurable aux faibles facteurs d'impacts des publications sur les carbohydrates ? La caractérisation des carbohydrates était et reste considérée comme ingrate, offrant peu d'observables sur des objets trop flexibles et sans activité enzymatique ; les connaissances sur les interactions carbohydrate:lectines/anticorps ont surtout progressé au cours des 10 dernières années grâce à l'essor des approches « glycan-arrays ».³¹⁻³³ Quelques accomplissements récents sont à mettre au crédit des approches de biologie structurale, notamment concernant la caractérisation des parois cellulaires de microorganismes ou de plantes³⁴⁻³⁶ (voir aussi les chapitres correspondant dans ma revue récente Theillet & Luchinat, 2022³⁷) ; celles-ci ont été permises par des marquages isotopiques et les développements en RMN du solide au cours des années 2010. D'autre part, une découverte récente pourrait donner lieu à des études de biologie structurale très intéressantes : la présentation de glycopeptides -fragments de composés glycoconjugués vaccinaux- par le MHCII a été démontrée avec l'existence associée de cellules T CD4+ reconnaissant

spécifiquement les carbohydrates.^{19,38} Ces exemples ne donnent certainement pas une vue exhaustive d'un champ scientifique duquel je me suis détaché en grande partie.

Pendant, l'impact (scientifique et éditorial) des études structurales sur les carbohydrates en solution ne s'est pas amélioré dans les années 2010 à mon avis, ce qui était mon intuition dissuasive au moment de chercher une thématique de post-doctorat. Si les facteurs d'impacts ne donnent bien sûr pas une vision complète de l'intérêt des travaux, ils sont malgré tout présents dans les discussions décidant de l'avenir des jeunes chercheurs, de leur recrutement et de leurs financements. Ce dernier aspect a guidé en partie ma réflexion concernant le choix de post-doctorat. L'opportunité qui s'est présentée alors m'a convaincue de me tourner vers les protéines : l'ambition d'observer ces polymères directement dans les cellules, proposée par Dr. P. Selenko à Berlin, me semblait enthousiasmante et suffisamment difficile pour mon goût.

3.2. Post-doctorat

Axes principaux :

- Caractérisation des modifications post-traductionnelles (PTMs) de protéines par RMN.
- Étude structurale de l' α -synucléine *in cellulo*.
- Études des protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs)

Direction : Dr. Philipp Selenko

Laboratoire : In-cell NMR Group, Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin.

- Publications :**
- Dose A et al. (2011) **ACS Chem Biol**, 20, 419-424.³⁹ (39 citations)
 - Theillet FX et al. (2011) **J Biomol NMR**, 51, 487-491.⁴⁰ (38 citations)
 - Theillet FX et al. (2012) **J Am Chem Soc**, 134, 7616-7619.⁴¹ (43 citations)
 - Liokatis S et al. (2012) **Nat Struct Mol Biol**, 19, 819-823.⁴² (65 citations)
 - Binolfi A et al. (2012) **Biochem Soc Trans**, 40, 950-954.⁴³ (104 citations)
 - Theillet FX et al. (2012) **J Biomol NMR**, 54, 217-236.⁴⁴ (121 citations)
 - Cordier F et al. (2012) **J Am Chem Soc**, 134, 20533-20543.⁴⁵ (44 citations)
 - Rose HM et al. (2013) **Biochim Biophys Acta**, 1834, 1396-1401.⁴⁶ (14 citations)
 - Theillet FX et al. (2013) **Intrinsically Disordered Prot**, e24360.⁴⁷ (147 citations)
 - Theillet FX et al. (2013) **Nat Protoc**, 8, 1416-1432.⁴⁸ (60 citations)
 - Theillet FX et al. (2014) **Chem Rev**, 114, 6661-6714.⁴⁹ (291 citations)
 - Kosten J et al. (2014) **ACS Chem Neurosci**, 5, 1203-1208.⁵⁰ (47 citations)
 - Borcherds W, Theillet FX et al. (2014) **Nat Chem Biol**, 10, 1000-2.⁵¹ (115 citations)
 - Smith MJ et al. (2015) **Curr Opin Struct Biol**, 32, 39-47.⁵² (47 citations)
 - Thongwichian R et al. (2015) **J Am Chem Soc**, 137, 6468-6471.⁵³ (13 citations)
 - Danielsson et al. (2015) **Proc Natl Acad Sci USA**, 112, 12402-7.⁵⁴ (146 citations)
 - Binolfi A et al. (2016) **Nat Commun**, 7, 10251.⁵⁵ (69 citations)
 - Theillet FX et al. (2016) **Nature**, 530, 45-50.⁵⁶ (526 citations)
 - Müntener T ... Theillet FX (2016) **J Phys Chem Lett**, 7, 2821-2825.⁵⁷ (73 citations)
 - Mylona A et al. (2016) **Science**, 354, 233-237.⁵⁸ (72 citations)
 - Verzini S et al. (2020) **J Mol Biol**, 432, 166689.⁵⁹ (4 citations)

3.2.1. Contexte - Les IDPs et 2 interrogations : leurs PTMs multiples et leur structure en cellule.

J'ai rejoint le groupe du Dr. Philipp Selenko alors qu'il finissait son installation au sein du FMP de Berlin en 2010. Ses objectifs étaient centrés sur le développement de méthodes pour observer des protéines *in cellula* par RMN. J'ai apporté mes connaissances pour l'amélioration de la sensibilité des expériences, j'ai formé à la RMN les étudiants en thèse et les post-doctorants du laboratoire. J'ai assuré le soutien de la plate-forme européenne INSTRUCT pour la RMN in-cell à

Berlin. Dans ce cadre, j'ai aidé à réaliser et analyser les expériences de nombreux chercheurs : j'ai travaillé en collaboration avec ~25 groupes de recherche de 14 pays. Mes travaux ont permis de publier 21 articles.

Une publication en 2008 de P. Selenko avait rapporté la faisabilité de l'observation de phosphorylation sur un peptide désordonné injecté dans des ovocytes de grenouilles.⁶⁰ Ceci lui avait permis d'obtenir plusieurs financements pour étudier par RMN in-cell les activités kinases en cellules sur des peptides reporters, et pour étudier la structure et l'agrégation de l' α -synucléine en lien avec la maladie de Parkinson. Les peptides désordonnés étaient donc au centre de l'activité du laboratoire, ce qui, rétrospectivement, a permis à nos activités d'être productives : ces peptides peuvent produire des signaux RMN d'intensités bien plus importantes que les protéines repliées, un facteur déterminant pour la RMN in-cell.

Je me suis donc intéressé à la caractérisation par RMN des protéines dites intrinsèquement désordonnées, i.e. protéines qui, isolées, ne présentent pas de structure tridimensionnelle stable.⁶¹ Grâce à leur grande surface exposée au solvant, elles sont très utilisées par le vivant pour la signalisation cellulaire à travers leurs modifications post-traductionnelles et leurs interactions avec des partenaires -leurs tendances conformationnelles sont donc importantes à étudier.⁶²⁻⁶⁵

Ces protéines ou régions de protéines désordonnées (IDPs/IDRs) étaient progressivement acceptées par la communauté scientifique au cours des années 2000,⁶⁶⁻⁷⁰ la RMN en solution est l'outil essentiel de leur caractérisation et le champ scientifique de leur étude était en expansion au début des années 2010 : elles représentent notamment environ un tiers des protéomes mammifères.⁶¹ Ces aspects me semblaient très prometteurs et motivants. Plus qu'à leur description structurale précise, je me suis attaché à la caractérisation de leurs modifications post-traductionnelles (PTMs) et à leur étude structurale en cellules, en utilisant la RMN en solution comme outil principal.

3.2.2. Caractérisation des PTMs de protéines par RMN

3.2.2.a. Caractéristiques spectroscopiques des PTMs

La caractérisation de PTMs se fait habituellement par Western-blot ou par spectrométrie de masse. Ces méthodes ont une grande sensibilité, mais détectent difficilement les PTMs inattendues ou voisines et multiples.^{48,71} La caractérisation par RMN de PTMs est complémentaire avec ces méthodes, en permettant de définir des schémas complexes faisant intervenir de nombreuses modifications sur des sites non-définis à l'avance (Fig. 2). J'ai développé les outils RMN pour les caractérisations de phosphorylations, acylations, méthylations et oxydations de méthionines, pour lesquelles j'ai produit les échantillons (expression/purification de protéines, extraits actifs de cellule mammifères).^{39,41,42,44,45,48,55,55,56,58} Au cours des années 2010, d'autres groupes ont approfondi et étendu ces caractérisations de PTMs par RMN, e.g. glycosylations, sulfonations, oxydations, déamidations...⁷²⁻⁷⁹

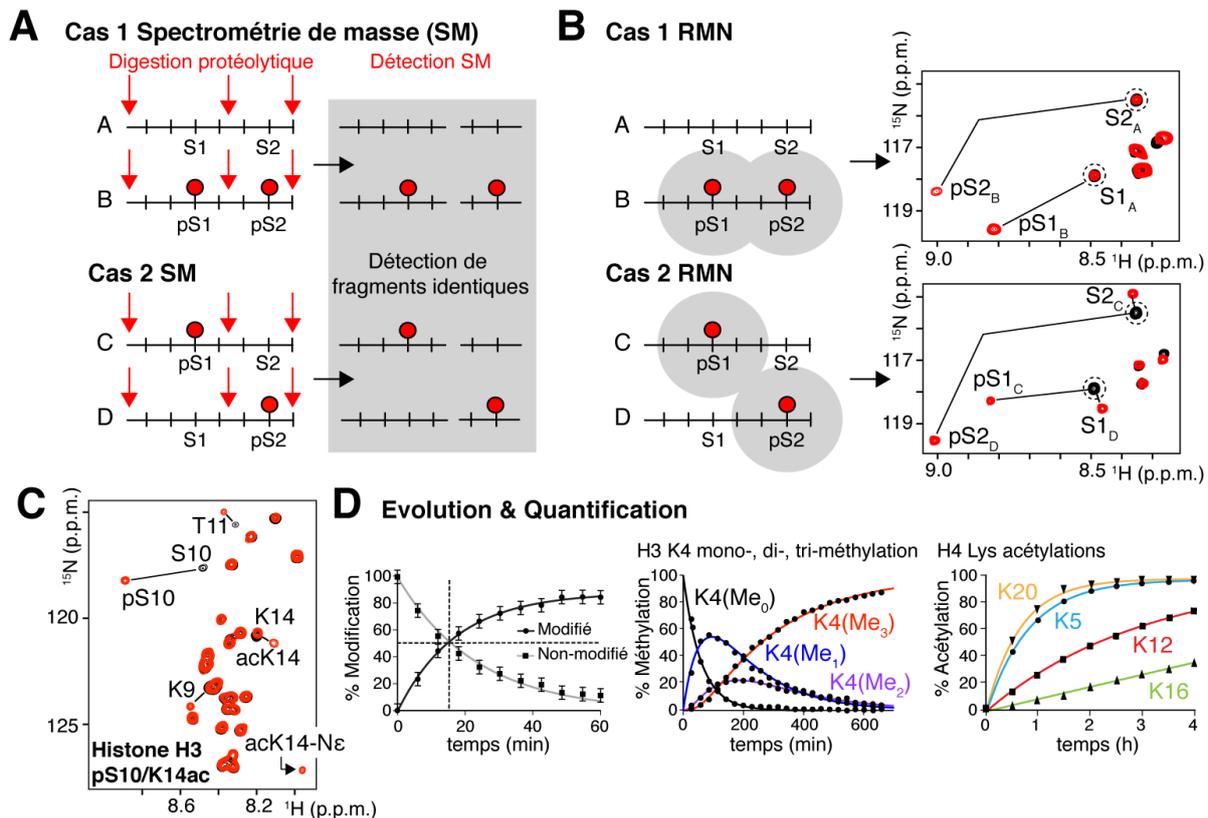


Figure 2 : **A.** Caractérisation des sites de PTMs par spectrométrie de masse. **B.** Caractérisation des sites de PTMs par RMN dans les mêmes situations. **C.** Superposition de spectres de l'histone H3 non-modifiée (noir) et modifiée dans un extrait de cellules HeLa (rouge). **D.** Caractérisation des cinétiques de plusieurs PTMs en une seule expérience.^{41,42,44,48}

3.2.2.b. Applications à des reporters d'activité enzymatique - Limites de l'approche

On peut suivre par RMN sans purification du substrat les cinétiques de PTM sur un substrat marqué par les isotopes ^{15}N ou ^{13}C dans un milieu complexe dans lequel les molécules (contenant majoritairement les isotopes ^{14}N ou ^{12}C) ne participent pas au signal RMN détecté. On peut ainsi quantifier l'activité d'une enzyme de PTM dans des cellules ou des extraits cellulaires en introduisant un peptide « reporter » marqué isotopiquement et présentant un site de PTM spécifique pour cette enzyme. J'avais mis au point des protocoles de préparation d'échantillon, d'acquisition et d'analyse de cinétiques par RMN en extrait cellulaire publiés en 2013,⁴⁸ qui ont été mis à profit pour cette stratégie.

Deux étudiants en thèse du laboratoire de P. Selenko ont défini et synthétisé une quinzaine de reporters d'activités de kinases. Je les ai initiés à la spectroscopie RMN des protéines et les ai aidés dans leurs activités quotidiennes. Ces travaux ont donné lieu à la publication de deux articles en 2014-15.^{46,53}

Cette stratégie a été peu citée et reprise par la suite. Elle s'inspirait directement des travaux de S.P. Gygi (Harvard Medical School, où P. Selenko avait effectué son post-doctorat) qui utilisait la spectrométrie de masse et des peptides reporters pour quantifier les activités kinases d'extraits cellulaires, éventuellement issu de biopsies.⁸⁰⁻⁸² La spectrométrie de masse (MS) offrait dès 2009 une sensibilité >1000 fois supérieure à la RMN pour la détection de ces peptides reporters, évitant ainsi de nombreux problèmes : i) de faibles concentrations de peptides peuvent être utilisées en MS, inférieures aux K_m rencontrés, tandis que la RMN nécessitait des concentrations > 50 μM ; ii) l'activité de quelques dizaines de cellules pouvait être mesurée avec la MS, tandis que la RMN utilisait des millions de cellules ; ii) l'évaluation des vitesses de phosphorylation était effectuée à des

temps d'incubation faibles avec la MS, évitant l'altération progressive de l'activité de l'extrait observée après ~1 heure.

Malgré ces aspects plus favorables, cette stratégie de quantification par MS ne s'est pas imposée comme outil courant de recherche ou de diagnostic ; seule une poignée de publications ont utilisé des peptides reporters de phosphorylation pour l'évaluation d'activité de kinases par MS au cours des 10 dernières années, à notre connaissance. Plusieurs raisons peuvent être évoquées, mentionnées dès 2009^{80,83} : i) un peptide reporter n'est jamais purement spécifique d'une seule kinase (S.P. Gygi avait proposé de quantifier la phosphorylation de plusieurs peptides cibles d'une même voie de signalisation de kinase et aux spécificités relatives connues, permettant une déconvolution et l'évaluation de l'activité de certaines voies de signalisations kinases dans l'échantillon) ; ii) lors de leur production, les extraits cellulaires souffrent de l'agrégation de nombreux composants cellulaires, de dilution, de réactions non-natives entre enzymes qui ne se rencontreraient pas dans la cellule, etc... ces événements produisant des activités kinases non-représentatives ; iii) les méthodes de protéomiques et phosphoprotéomiques quantitatives sont extrêmement efficaces, qui permettent une évaluation plus directe des activités effectives de kinases en cellules sur des milliers de cibles peptidiques endogènes⁸⁴⁻⁸⁶ ; iv) la caractérisation du « kinome » par isolation des kinases et leur quantification par MS depuis des lysats de cellules est elle aussi très efficace^{87,88} ; v) des peptides reporters de phosphorylation ont été intégrés à des constructions à fluorescence activable, conçus pour observer les activations de kinases en cellules en temps-réel.^{89,90}

Ces (longues) considérations permettent de dessiner les contours du paysage scientifique actuel dans ce domaine, et d'orienter les efforts de développements vers des applications utiles de la caractérisation des PTMs par RMN.

3.2.2.c. Applications à des protéines portant de nombreux sites de PTMs

A notre avis, la caractérisation des PTMs par RMN prend tout son intérêt lorsqu'un substrat présente de nombreux sites de modifications voisins. Cette situation est très souvent rencontrée, car elle permet aux organismes de réguler de manière plus robuste la transmission d'un signal au sein d'une cellule : chez l'humain par exemple, la moitié des sites de phosphorylation sont distants de 4 acides aminés ou moins d'un autre site de phosphorylation.^{91,92}

J'ai mené des études biochimiques de PTMs par RMN, en produisant les échantillons (production recombinante dans *E. coli*, extraits actifs de cellules mammifères) et développé les outils RMN. Nous avons notamment publié dans *Nature Protocols* des protocoles pour ces applications.⁴⁸ J'ai depuis publié des méthodes et protocoles complémentaires qui ont approfondi cette expertise (cf. Chapitre 3).

J'ai établi des mécanismes de modification que d'autres méthodes n'auraient pas pu mettre en évidence sur des histones ou des facteurs de transcription comme p53 ou Elk1, qui ont appuyé des travaux de biologie cellulaire menés en parallèle par nos collaborateurs.^{42,45,50,51,58} L'étude sur Elk1 montre combien la caractérisation par RMN peut aider à la compréhension mécanistique d'une voie de signalisation : nos collaborateurs cherchaient depuis 15 ans à qualifier les fonctions positives ou négatives de 8 sites phosphorylés par la kinase Erk ; la détermination des vitesses de phosphorylation respectives de ces 8 sites par RMN nous a amenés à l'hypothèse que les sites de Elk1 phosphorylés rapidement ou lentement pourraient avoir des fonctions différentes ; la mutation de ces sites (classé en 3 groupes) en cellule a permis de montrer en effet que les sites phosphorylés rapidement permettaient le recrutement du complexe Mediator (et donc l'activation de l'expression des gènes cibles), tandis que les sites phosphorylés plus lentement avaient la fonction inverse. Nous avons ainsi mis en évidence un système de rétrocontrôle nouveau, qui limite les conséquences de l'activation de Erk par elle-même sans action de phosphatase : un stimulus de croissance ou de stress prolongé ou trop intense stoppe par lui-même l'activation de l'expression des gènes cibles de Elk1. L'apport d'information spécifique résidu par résidu de la RMN a été décisif dans ce cas.

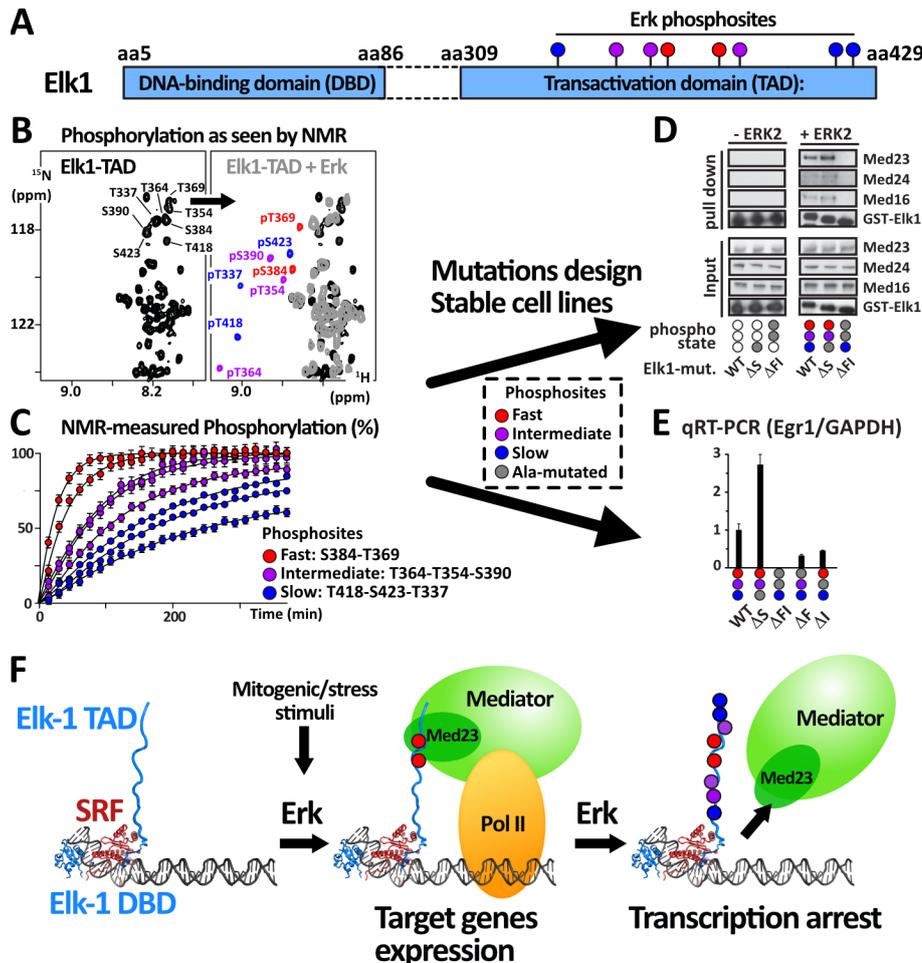


Figure 3 : **A**. Structure primaire du facteur de transcription Elk1 ; **B**. Spectres ^1H - ^{15}N HSQC du TAD de Elk1 avant et après phosphorylation par Erk *in vitro* ; **C**. Cinétiques de phosphorylation site par site établie à partir des acquisitions de spectres RMN successif pendant la réaction de phosphorylation ; **D**. Pull-down révélés par Western-blots des constituants du complexe Mediator en présence de divers mutants de Elk1 ; **E**. qRT-PCR de Egr1 après activation de Erk en cellules mammifères exprimant les divers mutants de Elk1 ; **F**. Schéma du mécanisme d'activation et désactivation de l'expression des gènes de Elk1 en fonction de la phosphorylation de Elk1 (SRF : Serum Response Factor).⁵⁸

3.2.3. Biologie structurale in cell

3.2.3.a. La RMN in-cell en 2010 - Contexte, et questions

Il avait été montré qu'il était possible observer par RMN une protéine en cellule et d'obtenir de l'information résidu-spécifique au cours des années 2000. Cette approche reposait sur le principe de l'utilisation d'un filtre isotopique de RMN (Figure 4) : les cellules étaient cultivées dans un milieu contenant les isotopes en abondance naturelle (i.e. 98.9% de ^{12}C et 1.1% de ^{13}C , 99.6% de ^{14}N et 0.4% de ^{15}N), et la protéine d'intérêt était produite dans un milieu enrichi en ^{13}C ou en ^{15}N ; les séquences RMN utilisées permettaient de n'observer que les espèces marquées isotopiquement en ^{13}C ou ^{15}N . L'observation en cellules par RMN du ^{19}F avait également été utilisée pour des protéines contenant des acides aminés non-naturels intégrant un ^{19}F à la fin des années 1990, mais cette approche ne sera réutilisée que dans les années 2010 avec l'apparition de cryosondes intégrant un canal ^{19}F .^{93,94}

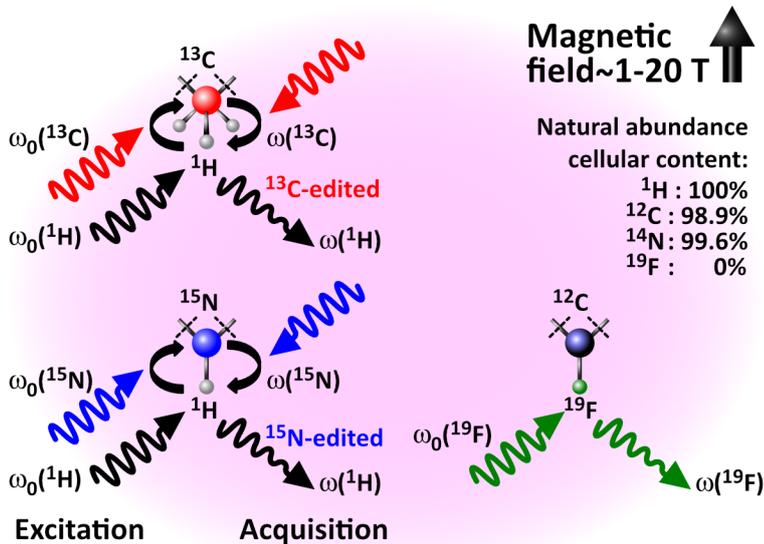


Figure 4 : Schéma explicatif du principe de filtre isotopique RMN. Dans un champ magnétique intense, les impulsions électromagnétiques (flèches sinusoïdes) peuvent perturber la magnétisation d'une population de spins nucléaires sélectivement, selon leur fréquence de résonance RMN respectives (qui dépend du rapport gyromagnétique γ). Les noyaux ^1H et ^{19}F sont excités et détectés préférentiellement, car leur haut γ permet la meilleure sensibilité. Des impulsions supplémentaires sur les $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ permettent (i) les transferts de magnétisation à travers les liaisons covalentes, (ii) d'échantillonner les fréquences RMN résidu-spécifique des noyaux, et (iii) le transfert final de la magnétisation vers les ^1H

pour l'acquisition.

Les stratégies de production d'échantillon étaient les suivantes (Figure 5). Plusieurs groupes avaient utilisé des bactéries surexprimant une protéine d'intérêt, ou injecté une protéine purifiée très concentrée dans des ovocytes de grenouilles.^{60,95,95-103} En 2009, un groupe japonais avait résolu la structure d'une petite protéine en bactéries vivantes par RMN ; un autre groupe avait réussi à transloquer des protéines modèles et à les observer en cellules mammifères. Toutes ces études s'appliquaient à de petites protéines repliées ou des peptides désordonnés. Un obstacle important s'était révélé : la relaxation des signaux RMN des protéines in-cell était fortement accélérée, en comparaison de ce qui était connu *in vitro*, notamment en bactérie où de nombreuses protéines étaient simplement inobservables. De premières explications émergeaient, qui laissaient à penser que la viscosité intracellulaire n'était pas la principale responsable de ces relaxations accrues, mais que les interactions non-spécifiques (e.g. l'ubiquitine exprimée en bactérie où elle n'a pas de partenaire).¹⁰⁴ Ces questions ont été étudiées dans les années 2010 et sont bien mieux comprises aujourd'hui.¹⁰⁵

S'il semblait que les premières protéines modèles observées en cellule avait la même structure que *in vitro*, de nombreuses recherches semblaient alors accessibles. La caractérisation structurale des protéines *in cell* permettrait notamment de mieux appréhender le degré de validité des études de biologie structurale menées *in vitro*. Ceci était particulièrement vrai pour les IDPs dont la flexibilité conformationnelle est telle que le milieu intracellulaire pourrait influencer fortement leur comportement structural.^{37,49,106}

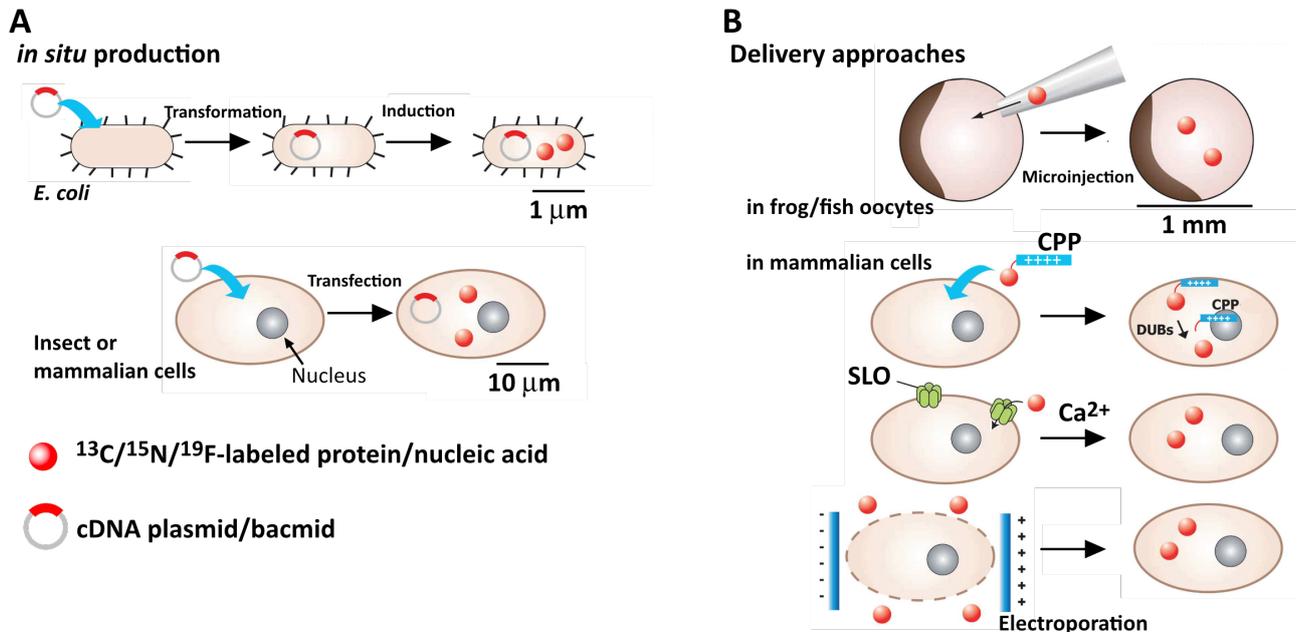


Figure 5 : Méthodes de production d'échantillons pour la RMN in-cell. **A.** Accumulation de protéine marquée dans *E. coli*/cellules d'insecte/cellules mammifères par surexpression en milieu contenant des précurseurs d'acides aminés marqués ^{13}C et ou ^{15}N . **B.** Translocation de la protéine/l'oligonucléotide d'intérêt marqué ^{13}C et/ou ^{15}N préalablement purifiée ; ceci peut s'effectuer par microinjection de protéine marquée dans des ovocytes de *Xenopus laevis*, ou dans le cas des cellules mammifères, par l'utilisation de peptides pénétrant (CPPs), de toxines formant des pores dans les membranes (PFTs, ici la Streptolysin O, SLO) ou par électroporation. Adapté de Theillet, Chem Rev 2022.¹⁰⁵

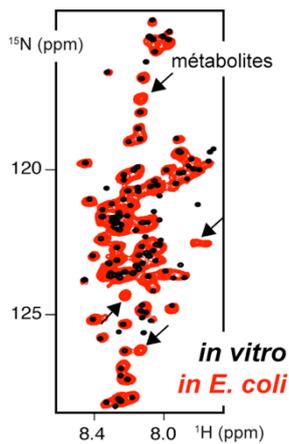
Au cours de mes travaux de post-doctorat dans le domaine de la RMN in-cell, les informations les plus intéressantes pour les biologistes ont été obtenues au sujet de l' α -synucléine. C'est en effet une IDP de 140 acides aminés dont les agrégats amyloïdes sont retrouvés chez les patients atteints par la maladie de Parkinson.¹⁰⁷ Diverses questions se posent relatives à sa très grande flexibilité : l' α -synucléine se comporte-t-elle de manières différentes structurellement *in vitro* et *in vivo* ? Et dans différents types cellulaires (neurones, cellules épithéliales..) ? La prédisposent-ils à l'agrégation ? Une publication de 2011 du laboratoire de D. Selkoe affirmait que l' α -synucléine extraite de diverses lignées cellulaires humaines était en réalité un tétramère hélicale en cellule, et émettait l'hypothèse que sa monomérisation était une étape préliminaire à son agrégation.¹⁰⁸ Ils avaient ensuite montré en 2013 la nécessité d'effectuer un cross-linking en cellules pour extraire une forme tétramérique hélicale d' α -synucléine, qui se trouvaient déstabilisée par la lyse cellulaire (un peu en contradiction avec la publication précédente).¹⁰⁹ Deux autres groupes avaient affirmé purifier en 2011-2012 des formes d' α -synucléine recombinante montrant une forte hélicité après purification en présence d'octyl- β -D-glucopyranoside (BOG), un détergent non-ionique.¹¹⁰ Ces observations faisaient fortement écho à l'affinité de l' α -synucléine pour les membranes lipidiques, avec lesquelles elle interagit en adoptant une conformation hélicale.^{111,112} Cette étude très controversée, dont les résultats ont été remis en question par plusieurs groupes,^{113,114} était rejetée par une majorité de la communauté travaillant sur le sujet. Ses auteurs ont néanmoins maintenu leur hypothèse, avec beaucoup de vigueur, comme nous le discuterons plus bas. C'est dans ce contexte que nous avons travaillé à l'étude du comportement structurel de l' α -synucléine en cellules, et que j'ai développé des méthodes pour l'observation par RMN des protéines dans les cellules.

3.2.3.b. RMN in cell dans *Escherichia coli*

Deux équipes avaient affirmé que l' α -synucléine était tétramérique et repliée dans des conditions cellulaires,^{108,115} et que seules les conditions de purification sont responsables de l'état

monomérique non-replié. L'un de ces articles (Wang et al., PNAS 2011) rapportait l'existence de l' α -synucléine tétramérique lorsqu'elle était surexprimée dans *E. coli* -la construction peptidique était GST- α Syn.¹¹⁵ Ces conclusions s'appuyaient sur des spectres RMN de l' α -synucléine purifiée dans des conditions dites douces et non-dénaturantes, en présence du détergent BOG. Ces spectres étaient en tout point similaires à ceux obtenus par toute la communauté, i.e. des spectres de protéines désordonnées.

J'ai établi les protocoles pour la spectroscopie RMN *in cell* de protéines surexprimées dans *E. coli*, que nous avons utilisés pour étudier l' α -synucléine sans étape de purification. Nous avons montré que les spectres RMN du monomère désordonné habituel obtenu après purification –y compris avec BOG- étaient exactement superposables à ceux de la protéine *in cell* (Fig. 5).⁴³ Des résultats



similaires ont été obtenues par une autre équipe (C. Waudby, J Christodoulou). Nous avons ainsi montré l'absence de preuves expérimentales pour les affirmations publiées par Wang et al. Notre étude en bactérie ne réfutait en rien les arguments de Bartels et al. concernant l'état tétramérique hélical de l' α -synucléine extraite de cellules humaines.¹⁰⁸

Figure 5 : Spectres RMN de l' α -synucléine purifiée dans des conditions dénaturantes (noir) *in cellulo* (rouge). Les signaux RMN dans *E. coli* sont plus larges en raison de la très grande viscosité intracellulaire. (Binolfi A et al. (2012) *Biochem Soc Trans*, 40, 950-954)⁴³

3.2.3.c. L' α -synucléine observé par RMN *in cell* dans des cellules mammifères

J'ai produit des échantillons de protéines *in cell* en utilisant l'électroporation pour la translocation de ¹⁵N- α -synucléine recombinante purifiée dans 5 lignées cellulaires mammifères. Les cellules analysées contenaient entre 5 et 100 μ M d' α -synucléine transloquée. J'ai caractérisé ces échantillons par RMN en mesurant notamment des paramètres de relaxation (T1, T2, HN-nOes). J'ai également développé le marquage de protéines par des étiquettes paramagnétiques stables dans la cellule pour la mesure de distances intramoléculaires par RMN et par RPE. Cette étude a requis la production et purification de plusieurs grammes d' α -synucléine, et de dizaines de milliards de cellules mammifères.

J'ai ainsi montré que l' α -synucléine observable par RMN et RPE *in cell* : i) est observée à l'état de monomère, ii) a le même rayon de gyration que *in vitro*; iii) a les mêmes conformations locales que *in vitro*, iv) interagit avec des entités cellulaires non-identifiées sur 2 régions bien définies.⁵⁶ Il s'agissait de la première vraie preuve expérimentale de la possibilité pour une protéine de se comporter en IDP en cellule mammifère, un résultat fondamental pour la communauté.

Ces observations étaient faites sur des cellules réattachées sur des boîtes de culture, ayant intégré l' α -synucléine 5-6 heures avant leur transfert dans un tube RMN. Les expériences RMN étaient réalisées sur le culot cellulaire obtenu (~150 millions de cellules) sans apport de milieu frais, à 283 K et pendant ~18 heures. Les cellules étaient donc dans un état de latence, leur ATP étant épuisé ~2 heures après leur transfert dans le tube RMN. L'intégrité des cellules et l'absence de re-largage d' α -synucléine était vérifié systématiquement. Ces conditions expérimentales limitent considérablement le champ d'interprétation de nos résultats. Ceux-ci montraient la stabilité de l' α -synucléine en tant que protéine monomérique désordonnée, dont le comportement structural était très similaire à celle observée avec la protéine purifiée *in vitro*. Ceci ne contredisait pas la possibilité de trouver d'autres formes dans des cellules plus « physiologiques », ou simplement que des évènements co-translationnels puissent diriger l' α -synucléine vers d'autres conformations. Cependant,

si un monomère cytosolique venait à exister, il pourrait être stable et adopter le comportement conformationnel décrit. Les interprétations fonctionnelles devaient être évitées.

Ces résultats ont été reproduits et confirmés 3 ans plus tard par une équipe suisse,¹¹⁶ qui ajouta à la description une observation intéressante : l' α -synucléine introduite dans les cellules HEK adhère aux membranes lipidiques de manière prépondérante après inhibition/silencing des chaperons Hsp90/Hsc70. Ici aussi, les observations RMN avaient été réalisées à basse température (279 K). Nous pouvons aussi mentionner la démonstration de l'absence de température de dénaturation en extraits cellulaires observée par spectrométrie de masse/protéomique.¹¹⁷

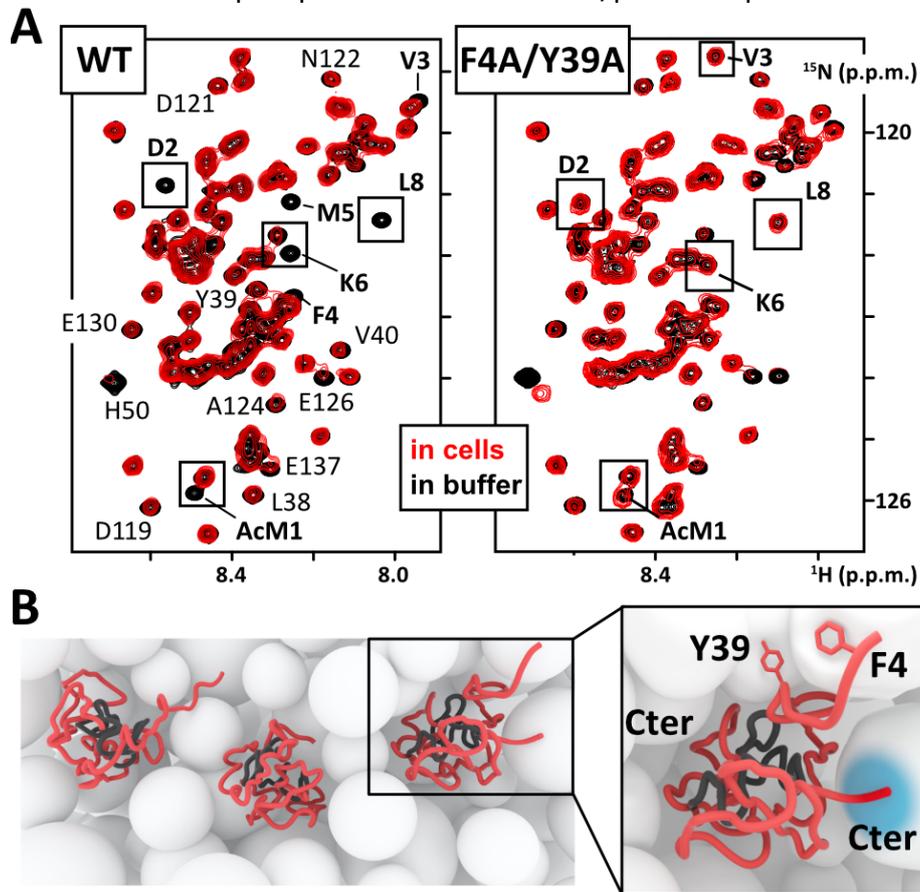


Figure 6 : A. Spectres 2D ^1H - ^{15}N LHSQC d' α -synucléine en cellules mammifères (lignée cellulaire A2780, les spectres obtenus dans les lignées HeLa, ou les lignées neuronales B65, SK-N-SH et RCSN-3 étaient extrêmement similaires).⁵⁶ La protéine avait été exprimée de manière recombinante en *E. coli*, purifiée, et transloquée dans les cellules mammifères par électroporation. La protéine était acétylée en N-terminal pendant la production recombinante, par co-expression avec l'acétyltransférase NatB, mais la forme recombinante non N-ter-acétylée transloquée en cellule mammifère était 100% acétylée après 5 heures d'incubation dans les cellules mammifères (cette modification était pensée comme co-translationnelle auparavant, nous avons constaté qu'elle pouvait être aussi pos-translationnelle). La N-ter-acétylation génère un changement d'environnement chimique important révélé par des déplacements chimiques caractéristiques sur les 10 premiers acides aminés. Le spectre RMN in-cell de l' α -synucléine sauvage montre des intensités atténuées pour les acides aminés du N-terminal par rapport au spectre in vitro, tandis que le spectre de la forme mutante F4A-Y39A n'est pas affecté en N-terminal ; les diminutions d'intensité en C-terminal sont par contre observées dans les deux cas. **B.** Représentation schématique du comportement conformationnel de l' α -synucléine en cellules mammifères, tel qu'observé par RMN et RPE in-cell à 283 K. La protéine est désordonnée, et les régions N- et C-terminales protègent la région centrale amyloïdogénique de toutes interactions avec les macromolécules cellulaires ; l' α -synucléine interagit région de manière transitoire avec des molécules cellulaires, interactions centrées sur les résidus Phe4 et Tyr39, et la région C-terminal très acide. Burmann et al. ont montré que les chaperones cellulaires Hsp90 et Hsc70 étaient les principales contributrices des interactions avec Phe4 et Tyr39.¹¹⁶

3.2.3.d. *Tétramère, monomère ? Une controverse vivace autour de l'α-synucléine*

Nos résultats ont eu un impact sur la communauté, qui les a notamment intégrés dans la controverse autour de la forme native que l'α-synucléine adopterait en cellule. Comme je l'ai expliqué précédemment, nos résultats ne devraient pas être surinterprétés, et ne prouvaient que la possibilité pour l'α-synucléine d'adopter une forme monomérique désordonnée en cellule. D. Selkoe et ses co-auteurs ont combattu nos conclusions, convaincus de leur hypothèse des « tétramères » stabilisables par cross-linking et de l'hypothèse d'un monomère comme étape vers la fibrillation. La surface académique, financière et d'influence de ce laboratoire a permis et suscité des études cherchant à explorer cette hypothèse.

En 2015, U. Dettmer, post-doctorant chez D. Selkoe, a extrait des « tétramères » de cerveaux humains,^{118,119} et a conçu un triple-mutant Glu->Lys qui les défavorise par rapport au monomère et provoque plus d'inclusions toxiques en cellule, événements également observés avec les mutants de maladie de Parkinson familiale.^{119,120} De manière inquiétante, l'extraction de « tétramères » montrait des résultats extrêmement variables ; certains échantillons ne générant aucun tétramère ont été laissés à température ambiante 4 jours et généraient finalement des conformations hélicales, synonymes de tétramères pour ces auteurs dans leurs publications.¹¹⁸ L'association de l'α-synucléine à des membranes en conformation hélicale, stabilisée par cross-linking, avait également été observée en la laissant incuber en présence de cellules neuronales par une équipe italienne, qui n'en concluait qu'une interaction α-synucléine:membrane lipidique banale, connue depuis le début des années 2000.¹²¹ Des publications d'autres groupes ont également isolés après cross-linking des oligomères hélicaux d'α-synucléine en présence de membranes lipidiques ou d'extraits de cerveaux,¹²² ou en simple présence d'acide arachidonique.¹²³ Cependant, ces « tétramères » sont apparemment perdus dans les cellules déficientes en glucocérébrosidase 1 (clivant le glucosylcéramide en glucose et céramide).¹²⁴ D. Selkoe et ses coauteurs ont ensuite montré que la triple mutation Glu->Lys provoquait une affinité accrue pour toutes les membranes lipidiques et l'accumulation toxique d'inclusions d'α-synucléine intégrant des vésicules lipidiques.¹²⁵⁻¹²⁷ Ce mutant induit un phénotype très proche de la maladie de Parkinson en modèle animal,¹²⁸ affecte la forme et la fonctionnalité des vésicules synaptiques, et diminue la capacité de l'α-synucléine à interagir avec ses partenaires dans les synaptosomes.¹²⁹ D. Selkoe et ses coauteurs insistent dans ces publications sur la disparition de « tétramères » plutôt que sur la perte fonctionnelle du mutant d'α-synucléine et l'accumulation de vésicules lipidiques, qui rappellent pourtant les images de microscopie électronique de corps de Lewy (les agrégats associés à la maladie de Parkinson).¹³⁰

Pourtant, à partir de 2018, il a été montré que l'inhibition de la stéaryl-coA désaturase (SCD), une enzyme importante pour la formation de lipides monoinsaturés favorisant l'interaction avec l'α-synucléine, atténuait la toxicité de l'α-synucléine.¹³¹ Ces résultats ont été confirmés par D. Selkoe et ses coauteurs sur leurs modèles de triples mutants en cellules et chez l'animal.¹³²⁻¹³⁵ Ils ont de plus montré que la surexpression d'α-synucléine ou l'expression du mutant familial E46K augmentent le contenu en acides gras monoinsaturés et la formation de gouttelettes lipidiques, qui eux-mêmes augmentent la toxicité de l'α-synucléine.¹³⁵ La diminution de ces acides mono-insaturés s'accompagne aussi de l'augmentation du contenu en « tétramères » d'α-synucléine. De manière intéressante, certains mutants qui diminuent l'affinité pour les membranes lipidiques sont également toxiques et augmentent l'agrégation de l'α-synucléine chez l'animal, sans doute en liaison avec la perte fonctionnelle au niveau des synapses.¹³⁶ Il est ainsi difficile de séparer les différentes conséquences des mutations utilisées, entre perte fonctionnelle à la synapse, ou formation d'inclusions de protéines associées à des gouttelettes lipidiques, et adoption possible de « tétramères ». La perte de ces derniers est toujours présentée comme l'explication systématique de la toxicité par D. Selkoe.

L'intense communication en congrès et sur les forums de D. Selkoe et ses coauteurs à ce sujet n'a donc pas cessé depuis 2011. Il est difficile pour moi, et pour une grande partie de la communauté, de discerner les éléments totalement convaincants de l'existence et de la pertinence de ces « tétramères » dans les publications présentées ici. Des corrélations y sont souvent interprétées comme des causalités, des résultats de collègues réinterprétés comme des arguments en faveur de tétramères. Il est clair que D. Selkoe et ses coauteurs sont influencés par le succès de la stabilisation par le tafamidis du tétramère la transthyrétine (PDB : 3TCT), dont la monomérisation puis l'agrégation sont responsables des dépôts amyloïdes des amyloses à transthyrétine.^{137,138} S'il existe, un tétramère natif et sain d' α -synucléine serait une cible thérapeutique très attirante. Il est en tout cas dommage que ses défenseurs n'aient jamais fourni les chromatogrammes de leur purification à plusieurs longueurs d'onde et n'aient jamais couplé leurs chromatographies d'exclusion à une analyse MALS, ou DLS.

Comme nous l'avons vu, les publications récentes liées à l'implication de l' α -synucléine dans la maladie de Parkinson s'orientent vers une autre cible, la régulation du métabolisme et du trafic lipidique, ce qui diminuera peut-être la tension autour de la controverse tétramère:monomère. De plus, une importante publication a montré en 2022 que l' α -synucléine module la stabilité des ARNm en interagissant avec des protéines de P-bodies, interactions médiées par sa région N-terminale en compétition avec les interactions avec des membranes lipidiques.¹³⁹ Ceci permettrait de bien compléter le schéma explicatif des conséquences nocives d'accumulation d' α -synucléine cytoplasmique ou du recrutement accru d' α -synucléine par des vésicules lipidiques.

Les controverses autour de l' α -synucléine ne vont pas s'éteindre pour autant à mon avis. Des publications récentes ont montré la possibilité d'observer de la séparation de phase avec cette protéine, dans des conditions peu physiologiques (hautes concentrations de protéine partiellement protéolysée, faibles concentrations de sels, test *in vitro* avec du PEG changeant radicalement les propriétés physiques du solvant, très hautes concentrations et stress cellulaire pour les tests en cellule...), mais qui ne manquent déjà pas de trouver ses adeptes et ses adversaires.¹⁴⁰ (La coacervation d' α -synucléine avec Tau est également explorée).^{141,142}

3.2.3.e. Une nouvelle méthode pour la structure *in-cell* de protéines repliées

Au cours de mes investigations sur l' α -synucléine en cellule, j'ai utilisé des chélateurs non-réductibles de lanthanide attachée à la protéine pour évaluer les distances intra- et inter-moléculaires *in-cell* via le mécanisme de Paramagnetic Relaxation Enhancement (PRE). Ce genre d'étiquette est aussi utilisé pour la résolution de structure de protéines *in vitro*, en utilisant soit les PRE, soit les PseudoContactShifts (PCSs) qui offrent une qualité et une précision d'information structurale plus grande (distance + orientation des noyaux observés par rapport au centre paramagnétique lanthanide).^{143,144} J'avais à l'esprit d'appliquer cette approche en cellule pour obtenir des informations structurales et éventuellement résoudre une structure de protéine *in-cell*. Les études rapportant de telles résolutions de structure utilisaient jusqu'alors les techniques plus habituelles d'attribution de résonances et de mesures de NOEs obtenus avec des spectres tridimensionnels. Cette approche nécessitait des concentrations intracellulaires de 1 mM ou plus^{145,146} (de récentes améliorations ont fait descendre ces concentrations à $\sim 150 \mu\text{M}$).^{147,148} Je pensais que les PCSs permettraient de réaliser cette tâche à des concentrations plus faibles en n'utilisant que des spectres bidimensionnels.

Les étiquettes paramagnétiques utilisées pour les PREs et l' α -synucléine n'étaient pas assez précises et trop flexibles pour réaliser des études utilisant les PseudoContactShifts (PCSs). J'ai contacté Pr. Daniel Haüssinger (Univ. Basel), qui a conçu des ligands de lanthanides très rigides et permettant des mesures de PCSs très intenses. Ses étiquettes sont de loin les plus performantes à mon avis. Nous avons conçu une étiquette résistante aux conditions réductrices cellulaires, que nous avons attaché à trois mutants cystéine de la petite protéine modèle GB1. De manière satisfaisante,

j'ai pu mesurer les PCSs désirés après avoir injecté ces protéines dans des ovocytes de *Xenopus laevis* (**Figure 7**). Les spectres pouvaient être enregistrés à des concentrations intracellulaires de 50 μM en une heure à 600 MHz. De manière très intéressante, ces étiquettes ont même permis un alignement partiel de nos protéines dans le champ magnétique, permettant ainsi la mesure de couplages scalaires résiduels (RDCs) qui eux aussi donnent de l'information structurale (i.e. les orientations respectives des vecteurs NH amides). Les déplacements chimiques étaient extrêmement similaires in-cell et *in vitro* ; les structures calculées étaient donc logiquement extrêmement similaires.⁵⁷

Un groupe chinois et un groupe japonais ont proposé des approches très similaires à quelques semaines d'intervalle.^{149,150} Ce genre de phénomène révèle souvent la qualité d'une idée. Malgré de nombreuses citations, cette idée n'a pas été remise en œuvre. La faible disponibilité des étiquettes est peut-être responsable. Mais il faut aussi noter que toutes les structures in-cell publiées montrent des structures identiques à celles obtenues *in vitro* ; ceci est logique puisque ces études cherchaient à montrer la faisabilité de leur approche sur des petites protéines modèles très stables, et elles ont parfaitement réussi à cet égard. Ces approches trouveraient donc sans doute un intérêt plus grand pour la communauté si des différences ou des ressemblances étaient observées en cellule pour des protéines adoptant plusieurs conformations.

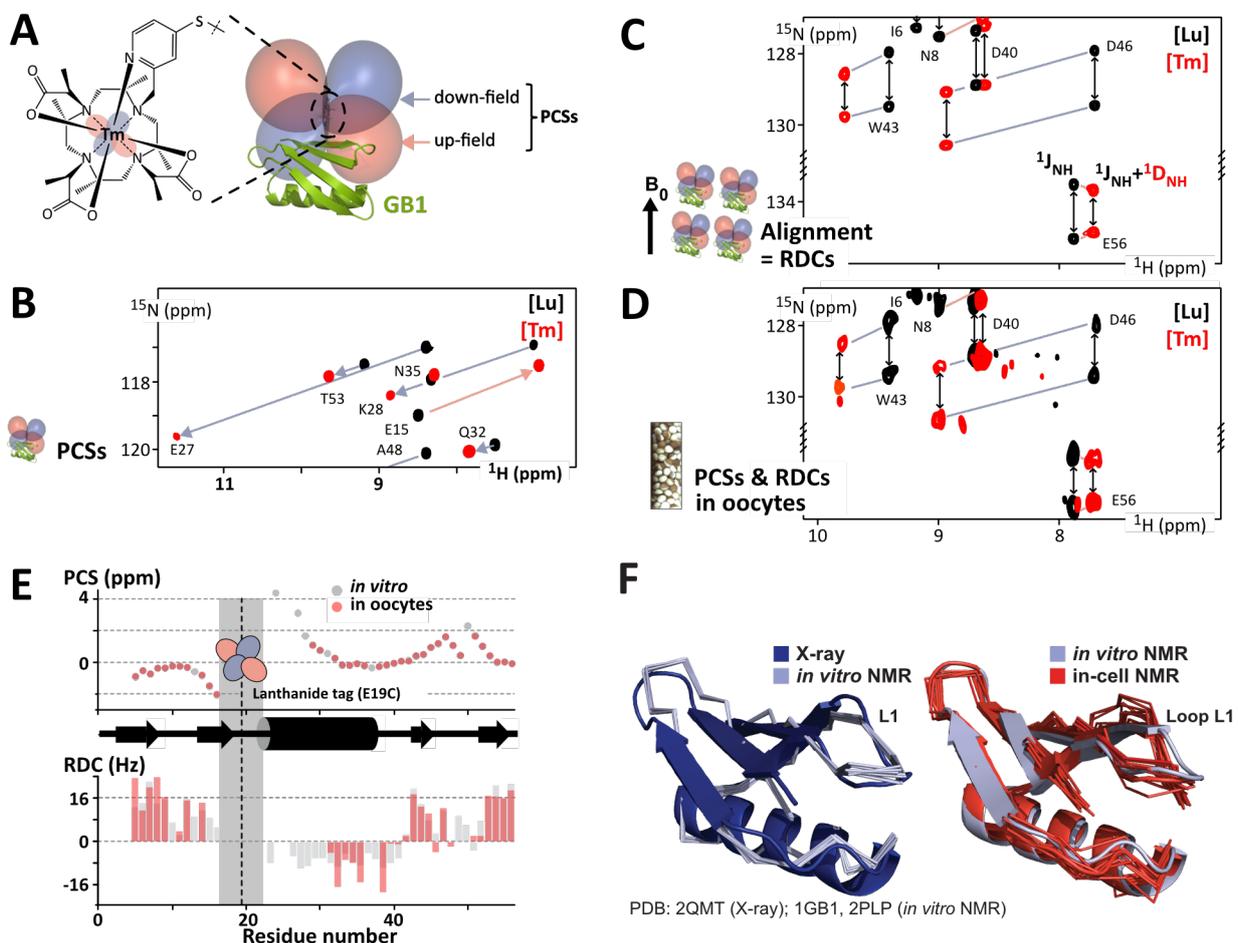


Figure 7 : Principes de l'utilisation des PCSs et RDCs mis en œuvre pour la RMN in-cell. **A**. Représentation du chélateur de lanthanides DOTA-M7Py, lié de manière covalente à la protéine étudiée. Ce schéma montre l'exemple de mutant cystéine GB1-E19C-DOTA-M7Py[Lu/Tm]. Lu(III) est utilisé comme référence diamagnétique ; Tm(III) est paramagnétique avec un tenseur d'anisotropie fort. **B**. Les PCSs sont mesurés avec la différence de déplacements chimiques dans les situations dia- ou para-magnétiques, en utilisant des expériences classiques ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC ou HSQC. **C**. Les RDCs sont mesurés avec la différence de couplages scalaires mesurée entre les situations dia- ou para-magnétiques dans des spectres ^1H - ^{15}N IPAP-HSQC. **D**. Les PCSs et les RDCs peuvent être mesurés en cellule, ici dans des ovocytes de *X. laevis* dans lesquels ^{15}N -GB1-E19C-DOTA-

M7Py[Lu/Tm] a été préalablement injecté ; le filtre isotopique produit par l'utilisation d'expériences ^1H - ^{15}N HSQC permet l'observation sélective de la protéine étudiée. **E.** Les PCSs et RDCs mesurés étaient très similaires *in vitro* et en cellule pour GB1. **F.** Les structures obtenues en utilisant les PCSs et RDCs mesurés en cellule comme contraintes dans GPS-ROSETTA produisent des structures très proches de celles obtenues *in vitro* par RMN ou cristallographie. Adapté de Müntener et al. (2016) *J Phys Chem Lett*.⁵⁷

3.2.4. Biophysique des IDPs

J'ai développé ou été associé à de nombreux projets succincts proches de mes axes de recherche principaux. J'ai résumé ci-dessous ceux qui sont publiés.

3.2.4.a. Amélioration de la sensibilité pour la spectroscopie RMN des IDPs

Les protéines sont présentes en cellule dans des concentrations faibles (micromolaire ou inférieures), et les cinétiques de modifications d'un substrat dépendent de sa concentration. J'ai travaillé à l'optimisation de la sensibilité des expériences RMN.

J'ai défini des conditions augmentant la sensibilité d'un facteur 2 pour les expériences d'acquisition rapide²⁶, portant les limites de détection d'IDPs à ~ 1 - $2 \mu\text{M}$. Cette amélioration s'appuyait sur : i) l'utilisation d'un chélateur d'ions des métaux de transition (DO2A, un dérivé du DOTA utilisé pour le Gd^{3+} en IRM), permettant d'obtenir un composé paramagnétique à la relaxation électronique adéquate pour accélérer les T1 et non les T2 des molécules étudiées, en l'occurrence Ni^{2+} -DO2A²⁻ ; ii) l'optimisation de l'effet d'accélération apparent des T1 des protons amides chez les IDPs, due à l'échange rapide entre les protons amides et les protons de l'eau.

Ces premiers travaux ont beaucoup influencé le reste de mon post-doctorat. L'utilisation des chélateurs de métaux a permis les études structurales sur l' α -synucléine en cellules, et la résolution de la structure de GB1 par les PCSs. J'ai également mis à profit la compréhension de l'échange de protons amides avec les protons de l'eau pour améliorer la sensibilité de la RMN, qui a été essentielle pour l'étude de l' α -synucléine en cellule. Cet échange est malgré tout très problématique à beaucoup d'égards : il rend quasiment impossible l'étude par RMN des IDPs en conditions physiologiques de pH et de température. J'ai cherché à développer l'utilisation de séquences d'impulsion qui ne souffriraient pas de cet échange, recherches que j'ai reprise des années plus tard en revenant en France.

2.2.4.b. Hélicité de p53 : conséquences sur la signalisation cellulaire

La région N-terminale de p53 adopte une conformation en hélice lorsqu'elle interagit avec Mdm2, son principal partenaire et régulateur.¹⁵¹ Le site d'interaction de p53 est entouré de prolines n'interagissant pas avec Mdm2. Nous avons quantifié les degrés d'hélicité en fonction des mutations de proline de p53 et leurs conséquences sur les affinités avec Mdm2 *in vitro*. En collaboration avec Gary Daughdrill de l'Université de Floride, et Alexander Loewer du Max Delbrück Center de Berlin, nous avons montré que ces différences d'affinités peuvent empêcher l'arrêt du cycle cellulaire par p53. Ainsi, l'hélicité des IDPs observées *in vitro* peut avoir un grand rôle dans l'homéostasie cellulaire (**Figure 8**).⁵¹

Cette étude a été très appréciée par la communauté s'intéressant aux IDPs, puisqu'elle fournissait l'exemple le plus abouti et le mieux démontré de l'importance du caractère flexible des IDPs pour la régulation fine des affinités dans la signalisation cellulaire.

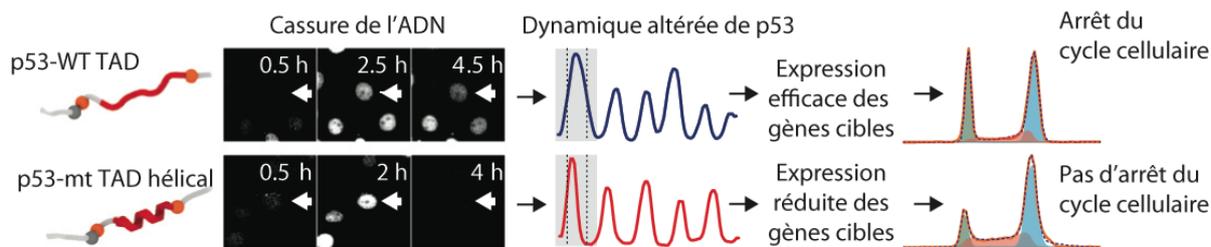


Figure 8 : Conséquences de l'hélicité de p53 sur le comportement cellulaire. Des mutations induisant une plus grande hélicité de la région de transactivation N-terminale de p53 (p53TAD) permettent une meilleure affinité entre p53 et Mdm2 (E3-ubiquitine-ligase), et donc la dégradation plus rapide de p53. Cette instabilité rend l'arrêt du cycle cellulaire par p53 peu efficace, puisque le facteur de transcription a une durée de vie plus courte et moins de temps pour déclencher l'expression de ses gènes cibles. (Theillet et al. (2014) *Nat Chem Biol*, 10, 1000-1002)⁵¹

2.2.4.c. Revues

Cette attention portée aux IDPs, à leurs spécificités et à l'importance des prolines en leur sein nous a amené à en discuter avec Vladimir Uversky, l'un des leaders dans la recherche sur les IDPs. Nous en avons conclu qu'il serait intéressant d'écrire une revue à ce sujet, qui traite donc de l'importance des prolines pour les fonctions des IDPs.⁴⁷ La proline est en effet l'acide aminé dont les IDPs sont les plus enrichies par rapport aux protéines globulaires, ce qui correspond à des caractéristiques physiques et fonctionnelles intéressantes. Les prolines permettent notamment aux d'IDPs d'adopter des conformations globales plus étendues, de diminuer leur contenu en structures secondaires (important pour éviter l'agrégation, ou la formation de motifs d'interactions), de former des motifs de phosphorylation. La capacité accrue des prolines à adopter la conformation *cis* reste apparemment d'une importance marginale, très peu d'exemples existant d'une fonction ou d'un impact quelconque sur des interactions ou des PTMs. J'avais finalement répertorié et caractérisé manuellement tous les complexes IDPs:protéines globulaires présents à l'époque dans la PDB, afin de savoir si des prolines se trouvaient régulièrement à proximité des motifs hélicaux d'interactions d'IDPs, comme celui que nous avons caractérisé sur p53 ; je ne trouvais finalement pas d'enrichissement en proline notable, ce qui interdisait une généralisation du rôle des prolines dans la régulation fine des affinités des interactions IDPs:protéines repliées.

Nous avons également été invités à écrire une revue dans le journal *Chemical Reviews* sur les connaissances de l'époque concernant l'influence de l'environnement cellulaire (encombrement stérique, interactions non-spécifiques, PTMs spécifiques et non-spécifiques, etc..) sur la structure, la mobilité et la fonction des IDPs.⁴⁹ Peu de choses concrètes étaient connues sur les IDPs en cellule, et l'écriture de cette revue m'a surtout donné l'occasion de trouver et lire toute l'information alors disponible sur la composition et les caractéristiques physiques de l'intérieur cellulaire. Cette revue est d'ailleurs souvent citée pour ces informations concrètes sur la cellule. Les indications concernant le comportement conformationnel des IDPs en cellule étaient peu nombreuses alors, et les effets de l'encombrement stérique (« Crowding ») étaient discuté principalement à partir des études *in vitro*. J'y renseignais également les aspects, fondamentaux à mon avis, de l'inhomogénéité dues aux modifications post-traductionnelles non-stœchiométriques observées chez les IDPs. Ce travail important, réalisé essentiellement à quatre mains avec Andres Binolfi (qui avait traité les aspects liés à l'agrégation des IDPs en cellule), m'a permis de consolider mes connaissances sur le contenu cellulaire et d'avoir des représentations mentales mieux définies, de mieux appréhender les questions à se poser dans le domaine. L'une d'entre elles n'avait été que très peu traitée à l'époque : la séparation de phase liquide:liquide, qui est souvent favorisée par des régions désordonnées de protéine ; cet aspect avait été mis au jour notamment par l'équipe de S. McKnight en 2012,¹⁵²⁻¹⁵⁴ et a été

progressivement rationalisée à partir de 2015.^{155,156} C'est le point aveugle le plus dommageable de cette revue soumise en 2013.

Une dernière revue dans le journal *Current Opinion in Structural Biology* s'intitule « Real time NMR monitoring of biological activities in complex physiological environments ». En collaboration avec Mitsuhiro Ikura (Université de Toronto), nous y présentons les derniers développements de l'utilisation de la RMN pour l'observation des PTMs, de l'activité des GTPases, ou de repliements des protéines.⁵² Les parties concernant les PTMs étaient focalisées sur les PTMs d'IDPs et les méthodes que nous avons développées au cours des années précédentes.

2.2.4.d. Les IDPs et la séparation de phase, une évolution récente

Le champ scientifique lié à la séparation de phase et aux organelles sans membranes est assez récent. Les premières études dédiées à l'étude de cet aspect datent de la fin des années 2000, avec notamment les études de Brangwynne et Hyman sur les Granules P des cellules germinales de *Caenorhabditis elegans* et les nucléoles d'ovocyte de *X. laevis*.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ L'implication des régions désordonnées de protéine dans la formation de séparation de phase est progressivement devenue claire à partir de 2012,¹⁵²⁻¹⁵⁴ puis rationalisée à partir de 2015.^{155,156} Cette évolution a été immédiatement ressentie comme une étape importante pour la biologie, qui mettait éventuellement au centre l'étude des IDPs, un domaine qui peinait à convaincre de son intérêt après ~10 ans d'existence, à mon sens. J'avais pu m'en rendre compte à la Gordon Conference IDPs de l'été 2016 : l'excitation autour de la séparation de phase était très grande. Il apparaissait cependant déjà que la RMN ne pourrait contribuer que marginalement à l'étude de ce phénomène et de ses implications biologiques, avec les premières contributions de N. Fawzi.¹⁶⁰ Il ne s'agit en aucun cas de dénigrer le travail de RMN sur la séparation de phase, mais de constater que la microscopie est naturellement plus adaptée pour fournir de l'information dans ce domaine : il s'agit après tout d'étudier un phénomène spatial, d'établissement de concentrations localisées de protéines à l'échelle nano-microscopique, à laquelle la RMN ne peut actuellement pas contribuer efficacement. Quelques premières caractérisations RMN sur les aspects dynamiques à l'échelle atomique ont été obtenues récemment sur des condensats purs (sédimentés en tube), qui apportent des éléments uniques de compréhension cependant.¹⁶¹

Mon post-doctorat s'était appliqué à l'étude des IDPs dans un registre plus classique de biophysique et de biochimie « conventionnelles », considérant des populations de molécules vues comme des entités distinctes, avec des concentrations, des affinités et des cinétiques interprétées dans le cadre habituel des corps dilués homogènes. La fin de mon post-doctorat a ainsi coïncidé avec l'essor très rapide de l'étude de la séparation de phase, qui trouve désormais des rôles dans quasiment tous les domaines de la vie cellulaire.¹⁶²⁻¹⁶⁷

4. Travaux actuels : 2017-2022

Après avoir le bonheur de me voir attribuer un financement ANR « Hosting of High-Level Researchers » puis le poste de CR1 proposé par la section 16 du CNRS en 2015, j'ai achevé les révisions nécessaires aux études soumises et terminé les dernières expériences pour la résolution de structure par PCSs en cellule (Cf. 2.2.3.d.).

J'ai également écrit à l'automne 2015 un projet ERC Starting Grant (panel LS1), qui proposait d'étudier par RMN in-cell la protéine TDP-43, dont les agrégats sont associés à la maladie de Charcot et aux démences fronto-temporales. Ce choix de protéine d'étude était sans doute très-trop risqué ; mes données préliminaires ne montraient que l'observabilité des régions isolées de TDP-43 en milieu dense (BSA à 200 g/L) par RMN, ce qui a été souligné par les évaluateurs. Le projet était en grande partie dévolu à l'établissement de nouvelles méthodes de marquage $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ d'acides aminés incorporés dans le milieu de culture de cellules stables exprimant TDP-43 de manière inductible. J'expliquais explicitement vouloir éviter l'électroporation utilisée précédemment avec l' α -synucléine (cf. 2.2.3.c.). Trois référés furent très positifs, et le dernier assura que l'électroporation de protéines était une très mauvaise méthode, ce qui disqualifiait mon projet. L'avait-il simplement lu ? J'échouais et terminais l'année 2016 en grande fatigue après 6 années de travail intenses à l'excès.

J'échouais aussi au dernier tour à la 3-4^e place de l'appel de l'Institut Pasteur pour fonder un groupe début 2017 (2 groupes recrutés, ~150 participants). Le projet proposé était sans doute trop dispersé et pas assez appliqué pour le conseil scientifique qui prenait la décision. Je proposais en effet d'étudier les IDPs, et notamment leur rôle dans la signalisation cellulaire chez les facteurs de transcription et leur agrégation par RMN in-cell. Je m'appuyais sur l'expertise et les travaux de mon post-doctorat. Mon sentiment est que mes propositions ont été perçues comme trop générales, sans orientations simples et claires ; je n'avais pas choisi quelle était la question et le sujet biologique à étudier sur les 10-20 prochaines années, ce qui correspond à la culture de l'Institut Pasteur, mais moins à celle de spectroscopiste et de biologiste structural qui est la mienne. Ai-je bien saisi la leçon ?

Je commençais donc à travailler plus sérieusement à mes nouveaux projets début 2017. J'avais été recruté par le CNRS avec un projet proposant d'étudier les mécanismes de signalisation cellulaire régulés par les protéines désordonnées et leurs PTMs : je devais focaliser mes travaux sur les facteurs de transcription de pluripotence, et sur la protéine Mdm2 qui était l'objet d'étude central du projet financé par l'ANR.

Ce financement permettait le recrutement d'ingénieur(e)s en CDD, les recrutements de doctorant(e)s étant plus contraint par les règles liées à l'HDR. J'étais coordinateur et seul partenaire de ce financement de 500 ke, entre 2015 et 2020. Le projet avait pour intitulé « Signalisation des dommages de l'ADN étudiée par RMN in cellulo: Régulation structurale et fonctionnelle de Mdm2 par ses phosphorylations. » et pour acronyme « Mdm2-StructReg ». Ce contrat m'a notamment permis de recruter des ingénieurs d'étude en début de carrière (1 IE pendant 3 ans et 2 IE pendant 1.5 an, total ~240 keuros de salaire), et d'acheter de l'équipement pour le laboratoire (~150 keuros).

N'ayant pas la pression à la publication pour les étudiant(e)s, je décidais donc d'explorer et d'établir les techniques nécessaires sur le long terme : production de kinases actives au laboratoire, amélioration des protocoles et des séquences RMN pour l'observation des IDPs, techniques de pull-down pour les IDPs modifiées, tests de nouveaux marquages isotopiques, purification d'organelles, manipulation de diverses lignées cellulaires (insecte ou mammifères), établissement de lignées cellulaires stables. Je présente ces travaux ci-dessous avec les objectifs de long terme qui les sous-tendent et les relient.

4.1. Protéines intrinsèquement désordonnées et signalisation cellulaire

4.1.1. Etat des lieux en 2015 : Les IDPs et leur étude par RMN

4.1.1.a. Les IDPs, leur fonction, leurs modifications et leur caractérisation structurale

Les régions désordonnées de protéines (IDRs) représentent un tiers des protéomes eucaryotes.⁶¹ Les premières études biophysiques sont apparues dans les années 1990,⁶⁶ qui montraient l'absence de repliement natif de certaines protéines isolées, et éventuellement l'adoption de structures plus ordonnées lors de l'interaction avec un partenaire. Les premières caractéristiques de ces protéines dites intrinsèquement non-repliées ou non-structurées, et bientôt protéines ou régions de protéines intrinsèquement désordonnées (IDPs/IDRs) furent décrites au début des années 2000, et progressivement connues et acceptées par les biologistes,⁶⁶⁻⁷⁰ bien que l'époque aient été marquée par les approches de génomique structurale.^{168,169} La communauté travaillant sur les IDPs/IDRs s'est structurée dans les années 2010 et des banques de données intéressantes ont été mises en place,^{64,65} qui témoignent de l'implication des régions désordonnées de protéines dans toutes sortes d'évènements biologiques.^{63,170,171} Les IDPs/IDRs participent notamment à une part importante des mécanismes de signalisation cellulaire, liés aux cancers, diabète, maladies neurodégénératives ou cardiovasculaires.¹⁷¹⁻¹⁷³

Dans leurs caractéristiques canoniques, les IDPs/IDRs ne forment pas de structure repliée compacte, et leurs segments flexibles et exposés leur permettent de s'engager dans de nombreuses interactions. Elles sont les cibles privilégiées d'enzymes qui leur apportent des modifications post-traductionnelles (PTMs), régulant ainsi leurs interactions intra- et intermoléculaires et donc leur activité,^{49,62,171,172} même si la fonctionnalité des sites de PTMs détectés est plus souvent questionnable au sein des IDPs.^{86,174,175}

Ainsi, pour mener une étude structurale et fonctionnelle exhaustive d'une IDP/IDR, il est nécessaire d'utiliser des techniques d'analyse en solution et souvent d'effectuer des modifications post-traductionnelles. La cristallographie peut contribuer très efficacement à la description des complexes IDR:protéine repliée, mais seules les techniques en solution (dichroïsme circulaire, du SAXS, de la RMN, des spectroscopies/microscopies de fluorescence FCS ou smFRET, et des diverses méthodes d'études de biophysique des interactions) permettent une compréhension du comportement structural de l'IDP/IDR. Un autre challenge provient du fait que les IDRs sont intégrées dans de longues protéines intégrant des domaines repliés et désordonnés qui sont souvent difficiles à produire entières de manière recombinante. Ainsi, jusqu'à aujourd'hui, la très grande majorité des études d'IDRs/IDPs sont réalisées sur des fragments de protéines non-modifiées. Les possibles interactions intramoléculaires et la fonctionnalité des PTMs sont donc trop rarement l'objet d'études structurales. Enfin, l'influence de l'environnement cellulaire sur ces objets très flexibles n'a été que très peu renseignée jusqu'à présent.

4.1.1.b. Apports et limites des caractérisations structurales des IDPs par RMN

La spectroscopie RMN a la capacité unique de permettre la caractérisation structurale des IDPs résidu par résidu, à l'échelle atomique. L'application de la RMN à ces protéines s'est donc développée depuis la fin des années 2000, et des avancées importantes avaient été réalisées pour la description physique des IDPs.¹⁷⁶ Elle semblait plafonner à mon avis au mi-temps des années 2010, ne suscitant qu'un intérêt trop limité auprès de nos collègues biologistes : les protéines étudiées étaient peu diversifiées, et les subtilités sur leurs dynamiques conformationnelles n'étaient que peu reprises et citées dans la littérature en dehors de la communauté les étudiant (je force un peu le trait peut-être au goût de certains de mes collègues).

Si l'on accepte mes exagérations, la plupart de ces études d'IDPs par RMN avaient plusieurs handicaps, dont les suivants : i) elles n'apportaient que peu d'informations mécanistiques au sens où les biologistes l'entendent, puisqu'elles étudiaient des interactions déjà identifiées, sur des segments déjà délimités (à l'opposé, les quelques exemples apportant des éléments mécanistiques sur les interactions d'IDPs ont été publiés et cités avantageusement, e.g. ¹⁷⁷⁻¹⁸²); ii) elles ne fournissaient que peu de cibles thérapeutiques classiques, permettant la recherche de petites molécules inhibitrices qui se lieraient difficilement aux IDPs si flexibles, ou à la surface d'interaction souvent très plate de leurs partenaires repliés; iii) elles étudiaient les formes non-modifiées des IDPs, qui sont pourtant la cible privilégiée des PTMs qui régulent souvent les interactions avec leurs partenaires. Il est ainsi commun de rencontrer des études de biologistes employant la « force brute » pour délimiter les zones d'interaction entre des partenaires identifiés contenant une ou des régions désordonnées : des mutants sont exprimés qui sont des formes tronquées sur des longueurs variables des segments désordonnés et les interactions sont testées par pull-down ; une description par RMN pourrait être avantageusement et rapidement mise en place, mais est rarement associée.

J'avais alors à l'idée que la RMN nous permettrait d'intégrer des éléments complémentaires pour l'étude des IDPs : la caractérisation de leurs PTMs et la délimitation rapide des régions d'interactions. Il semblait ainsi possible de produire des formes modifiées et capables d'interagir, bien caractérisées par RMN, puis de les utiliser pour isoler des partenaires par pull-downs analysés en protéomique. La RMN serait enfin réutilisée pour délimiter les régions d'interactions de l'IDP et éventuellement concevoir un peptide plus court permettant des criblages d'inhibiteurs.

Cette stratégie était pensée dans le cadre classique d'interactions protéine:protéine diluées de manière homogène. Nous verrons que la physique de la séparation de phase liquide:liquide a contrecarré ces idées.

4.1.1.c. Caractériser les IDPS en conditions physiologiques ?

Un autre élément me contrariait depuis toujours dans l'étude des IDPs par RMN : elle nécessitait d'utiliser des conditions très peu physiologiques de température et de pH. Pour obtenir de l'information au niveau du résidu, les chaînes latérales sont peu utiles car les signaux sont très superposés en raison d'environnement chimiques très similaires. Il est donc nécessaire d'utiliser des techniques de corrélation entre les ¹H et les ¹⁵N du squelette peptidique. Or les protons amides des IDPs sont très accessibles au solvant et donc en échange avec les protons de l'eau, avec des cinétiques souvent supérieures à des dizaines de Hz à température et pH physiologiques. Ils sont ainsi rendus inobservables par RMN, puisque la cohérence de magnétisation est perdue avant d'avoir pu acquérir un signal. Les études d'IDPs par RMN sont donc réalisées à pH~6.5 et à ~283K le plus souvent. Cela est problématique à plusieurs titres : i) un polymère flexible ne se comporte pas de la même manière à 283K et à 310K ; ii) les charges électriques ne sont pas les bonnes à pH6.5, notamment pour les histidines ou les résidus phosphorylés (pKa compris entre 6 et 7)¹⁸³ ; iii) les suivis enzymatiques requièrent des températures supérieures à 293K et parfois des pH supérieurs à 7 ; iv) les interactions d'IDPs peuvent être très dépendantes de la température, notamment avec les membranes lipidiques ; v) les cellules humaines sont idéalement étudiées à 310K, y compris pour la RMN in-cell.

Au cours de mon post-doctorat, j'avais tenté de mettre en œuvre les séquences d'impulsion à détection directe du ¹³C, mises au point par W. Bermel et I. Felli.^{184,185} J'en avais constaté les avantages mais aussi le manque de sensibilité, malgré les avancées à cet égard. Je n'avais d'autre part pas à proximité de spectromètre équipé de sonde dédiée à l'acquisition ¹³C directe. J'avais donc mis quelques idées en attente, ayant en tête que certaines améliorations pourraient être portées, qui permettraient d'atteindre une sensibilité proche du micromolaire, plus compatible avec nos études. Je présente les travaux correspondants ci-dessous.

4.1.2. Les facteurs de transcription de pluripotence Oct4, Sox2, Nanog, Esrrb

4.1.2.a. Contexte, questions

Les facteurs de transcription (TFs) sont au cœur de la signalisation de la différenciation, de la prolifération ou de l'arrêt du cycle cellulaires, en permettant l'activation ou la répression de la transcription des gènes.^{186,187} Environ 90% des ~1600 facteurs de transcription humains contiennent de longs segments désordonnés (>30 aa), et cette corrélation entre TFs et IDRs existe dans tous les domaines du vivants.^{188,189} Deux articles précoces de 2006 et 2012 sur le sujet avaient attiré mon attention, montrant le haut contenu en IDR des TFs et notamment des TFs de pluripotence.^{190,191} Ils ont visiblement aussi attiré l'attention de quelques collègues de la communauté des IDPs depuis.^{188,192,193}

Les IDRs des TFs ont pour rôle de recruter des co-facteurs de transcription (Activateurs ou répresseurs), ou la machine de transcription, et d'améliorer la spécificité de reconnaissance de leurs séquences d'ADN cibles, ce qui est un peu mieux compris grâce à des études parues dans les 4 dernières années.^{188,194-202} Le lien est connu depuis longtemps entre activation de facteurs de transcription et activation de signalisations cellulaires médiées par des enzymes exécutant des PTMs ; des exemples épars de mécanismes de régulation par PTMs étaient connus en 2015,²⁰³ dont le nombre s'est étoffé depuis. Ainsi, les sites de PTMs sont très nombreux sur leurs IDRs,^{187,204,205} ici encore la fonctionnalité des PTMs correspondantes n'est pas toujours assurée, ou difficile à cerner car issue de la combinaison avec d'autres PTMs.

Les caractéristiques des TFs les rendent abordables pour la RMN: entre 300 et 500 résidus avec des régions désordonnées de ~100 résidus séparant des domaines repliés de moins de 100 résidus.^{188,191} Leur description structurale permettrait la compréhension des mécanismes de signalisation cellulaire à l'échelle atomique et la définition de cibles thérapeutiques nouvelles, même si cette classe de protéine est notoirement difficile à inhiber.²⁰⁵⁻²⁰⁷ Il me semblait donc que cette classe de protéines était adaptée aux études par RMN complétée par la biochimie des PTMs, expertise qui étaient les miennes.

Parmi les TFs, ceux impliqués dans l'acquisition de la pluripotence étaient particulièrement attractifs. La possibilité de reprogrammer des cellules somatiques vers un état induit de pluripotence s'est révélée au cours des années 2000, portant de grandes espérances pour la médecine future.^{208,209} L'activation d'un réseau de pluripotence dont le cœur comprend les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog (OSN) induit cette pluripotence, en se fixant sur des séquences amplificatrices, et en activant ou réprimant ainsi de nombreux gènes liés à la pluripotence ou à la différenciation cellulaires.²¹⁰⁻²¹³ Les combinaisons de TFs capables d'induire la pluripotence sont nombreuses et différentes entre les espèces.²¹⁴ Leur mauvaise régulation est impliquée dans de nombreux cancers, et des PTMs de plus en plus nombreuses avaient été décrites sur les facteurs OSN ces dernières années,^{210,211,215-221} sans description structurale à notre connaissance.

Les domaines de liaison à l'ADN (DNA-BD) des facteurs OSN ont été décrits structuralement en complexe avec leurs séquences cibles (**Figure 9**).^{222,223} Oct4 présente un domaine POU, qui peut s'assembler en homodimère ou hétérodimère en fonction de la séquence d'ADN à laquelle il se lie.²¹⁶ L'hétérodimérisation de Oct4 peut se créer avec des facteurs de transcription de la famille Sox, qui présentent un domaine de liaison à l'ADN HMG.^{224,225} Un grand nombre de combinaisons homodimères ou hétérodimères sont possibles en fonction des concentrations relatives des facteurs de transcription Oct et Sox.²²⁵ Nanog assure la liaison à l'ADN via un homéodomaine dont les séquences cibles sont incertaines, mais dont la nature serait influencé par des interactions coopératives avec Sox2 -seules des modélisations de l'interaction de leurs domaines de liaison à l'ADN

existent, et l'interaction détectée entre leurs domaines désordonnés est sans doute liée à de la séparation de phase et coacervation.²²⁶⁻²²⁸ Grâce aux avancées en cryo-EM, de remarquables études récentes ont déterminé les structures des DNA-BDs de Oct4 et Sox2 en interaction avec de l'ADN nucléosomal, décryptant ainsi leurs capacités de « pioneer factors ».²²⁹⁻²³⁶ Une structure du complexe Sox2 liant l'importine Imp α 3 a également été récemment publiée, permettant de comprendre l'engagement des deux NLSs encadrant le DNA-BD de Sox2 pour son importation au noyau.²³⁷

Les autres régions des facteurs OSN sont prédites comme intrinsèquement désordonnées.¹⁹¹ Aucune caractérisation structurale n'en a été publiée à notre connaissance, bien que ces régions semblent être importantes pour des interactions avec des partenaires impliqués dans la reprogrammation épigénétique, la réorganisation de la chromatine et le recrutement des machineries de transcription ou de répression.^{210,211,216,225,227} Ces rôles sont mal compris et peu étudiés ; des études récentes montrent que les régions désordonnées C-terminales de Oct4 et Sox2 sont essentielles pour leur capacité de reprogrammation,^{214,238} notamment en s'engageant dans des condensats moléculaires avec le complexe Mediator.¹⁹⁶ Comme évoqué plus haut, les caractéristiques propres aux IDRs de TFs impliqués dans les fonctions activatrices ou répressives ont été un peu détaillées ces dernières années : schématiquement, des segments sont composés de patches hydrophobes entourés d'acides aminés acides, qui peuvent favoriser la séparation de phase ou s'engager de manière peu spécifique dans des interactions notamment avec la sous-unité du Mediator Med15. Ces descriptions diminuent quelque peu l'intérêt a priori des études structurales des IDRs de TFs.^{188,194-202}

J'avais contacté Pablo Navarro Gil, un des seuls spécialistes des TFs de pluripotence en France, à l'Institut Pasteur, pour initier une collaboration permettant la discussion entre biologie cellulaire et biologie structurale. Il travaille notamment sur Esrrb, un facteur de pluripotence important, cible de Nanog, et sur Nr5a2, un autre TF de pluripotence. J'ai donc également entrepris des études sur Esrrb et Nr5a2. Ses travaux l'ont amené aussi à considérer le rôle de Sox2 et des mécanismes de colocalisation avec Esrrb, pour lesquels il avait engagé une post-doctorante ayant travaillé sur la séparation de phase (A. Molliex). Ces travaux ont été handicapés et interrompus par le Covid et sont désormais en attente après le départ de cette post-doctorante ; P. Navarro Gil s'est recentré sur le projet pour lequel il a obtenu un financement ERC.

J'ai engagé l'étude des IDRs de ces TFs dans le but de caractériser leur structure, leurs phosphorylations sur les sites consensus S/T-P correspondant aux MAP-kinases et aux Cyclin-dependent kinases (Cdk), et les interactomes des formes non-modifiées et phosphorylées. J'espérais ainsi révéler l'existence d'interactions nouvelles impliquées par ces TFs, qui seraient éventuellement régulée par des phosphorylations très courantes.

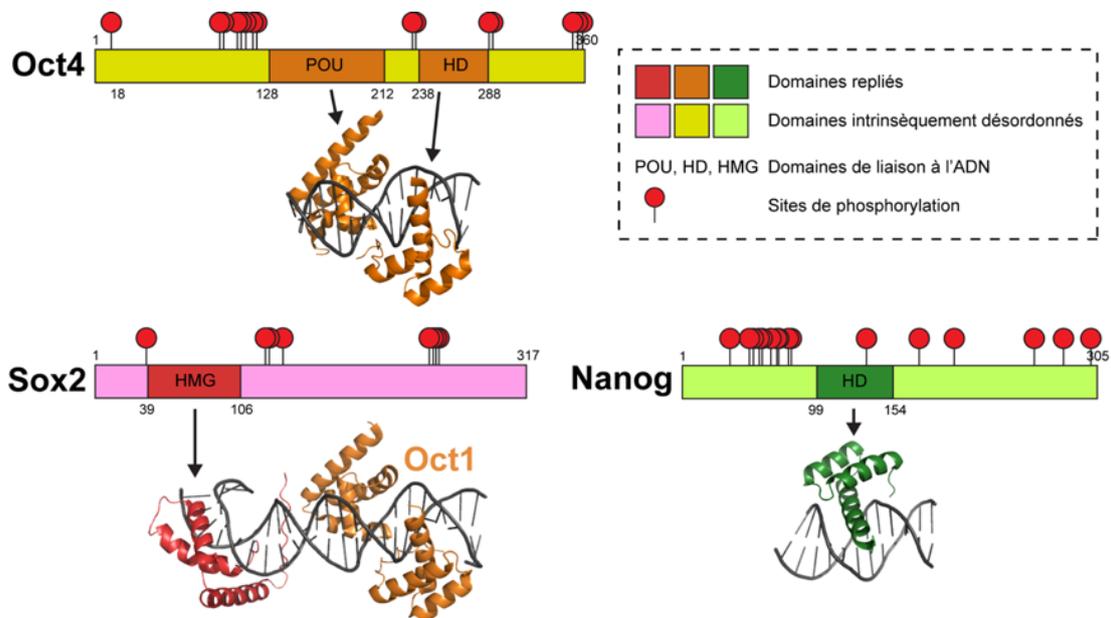


Figure 9 : Domaines des facteurs OSN et positions des sites de phosphorylation. Les structures des domaines repliés sont représentées (complexes avec séquences ADN cibles : PDB 1GT0, 3L1P, 4RBO, le domaine HMG de Sox2 est en complexe avec les domaines POU et HD de Oct1).

4.1.2.b. Production et attribution des spectres

J'ai entrepris de produire les IDRs de Oct4, Sox2, Nanog et Esrrb humaines (puis Sox2 et Esrrb de souris pour être en cohérence avec les cellules souches embryonnaires utilisées par P. Navarro Gil) de manière recombinante. De nombreux étudiant(e)s de Master ont travaillé avec moi dans ce but dans les années 2016-2017. Tous ces segments ont pu être produits en *E. coli* BL21(DE3)Star transformées par des plasmides pET intégrant des séquences codantes synthétisées par Genscript (Cf. Annexe). Les constructions correspondantes contenaient une séquence de coupure pour la protéase Tev (produite au laboratoire), permettant d'éliminer les étiquettes de purification. Les cystéines ont été le plus souvent mutées en alanine pour simplifier les manipulations biochimiques ; l'impact de ces mutations a souvent été vérifié sur une version « sauvage » par RMN, qui montre le plus souvent une augmentation du contenu hélicale local de l'ordre de 20%. Les purifications ont été effectuées par une combinaison classique de chromatographies His-Trap et SEC (éventuellement complétée par une chromatographie sur HiTrap héparine pour les constructions contenant un DNA-BD). La lyse et la première His-trap sont effectuées en présence de DTT à 10 mM, puis 2 mM de DTT sont ajoutés aux fractions d'intérêt après chaque étape de purification avant concentration pour l'étape suivante. Des inhibiteurs de protéase (cOmplete, EDTA-free, Roche) et éventuellement de l'EDTA à 0.5 mM sont ajoutés de manière similaire pour la lyse et entre chaque étape de purification.

Seule l'IDR C-terminale de Nanog s'est révélée impossible à purifier, et même insoluble dans un tampon contenant de l'urée à 8 mol/L (les constructions GST-His6-Tev-Nanog-Cter sont solubles dans l'urée à 8 mol/L, peuvent être dialysées en tampon sans urée pour la coupure Tev, mais précipitent après). Sa composition en acides aminés (9 Trp, 21 Asn, 17 Gln, 4 Cys, 6 Tyr parmi 150 acides aminés) est sans doute adaptée à des interactions ou à de la séparation de phase en cellule et ne permet pas de l'isoler en solution. Une autre exception est rencontrée avec l'IDR C-terminale de Sox2, qui nécessite de réaliser les HisTrap en urée à 8 mol/L, et la SEC finale en urée à 2 mol/L ; les analyses RMN de ces constructions de Sox2 sont effectuées à 0.5 mol/L après une dilution du stock.

Toutes ces constructions peptidiques sont conservées à -20 °C ou -80 °C sans problème d'agrégation à la décongélation (Sox2 C-ter est conservée en urée à 2 mol/L). Les marquages

isotopiques ont été effectués par expression dans un milieu minimum M9 ne contenant que du ^{13}C -glucose et du ^{15}N -ammonium comme sources de carbone et azote.

Les signaux RMN du squelette peptidique ont été attribués par une approche classique combinant l'enregistrement et l'analyse de spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (et éventuellement 2D ^{13}C -CO), et de spectres 3D ^1H - ^{13}C - ^{15}N HNCO, HN(CA)CO, HNCACB, et (H)N(CA)NH (et éventuellement HNCA avec une très haute résolution). Ces spectres ont été obtenus dans des tampons aqueux contenant de l'Hepes à 10-20 mM et du NaCl à 50-100 mM, à pH 6.8 et à 283 K, avec des peptides ^1H - ^{13}C - ^{15}N concentrés entre 100 et 600 μM , à 600 ou 700 MHz (et 950 MHz à Gif-sur-Yvette pour l'IDR C-terminale de Sox2, qui a requis l'attribution de plusieurs sous-fragments pour aider l'attribution finale).

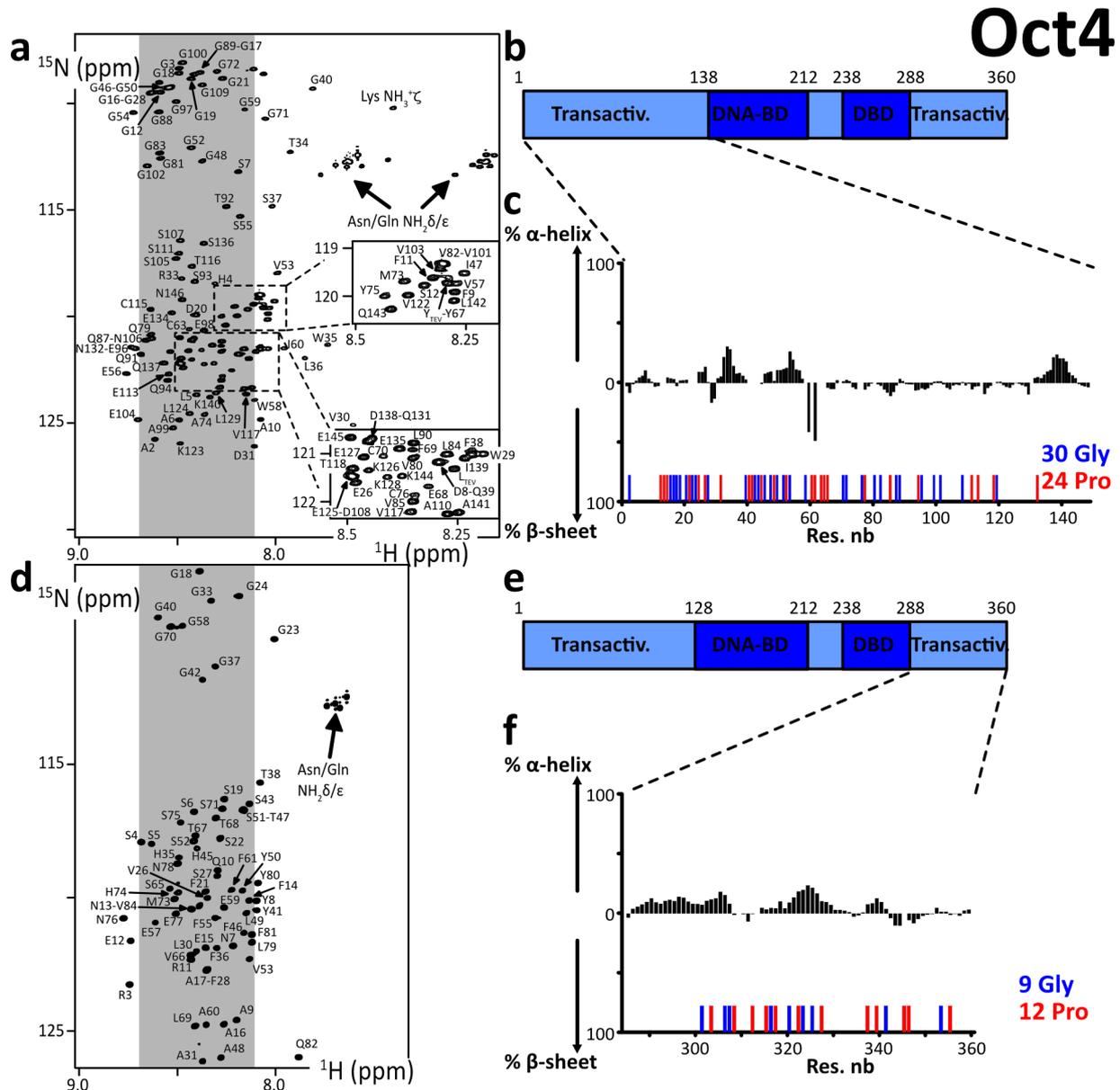


Figure 10 : a. d. Spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC des IDRs N-terminale et C-terminale de Oct4 humain, avec les attributions des signaux ; les zones grisées sont celles où se trouvent habituellement les résonances d'acides aminés adoptant un comportement structural random coil. **c. e.** Propensions aux structures secondaires calculées à partir des déplacements chimiques $C\alpha$ et $C\beta$ du squelette peptidique, en utilisant l'algorithme ncSPC.²³⁹

Sox2

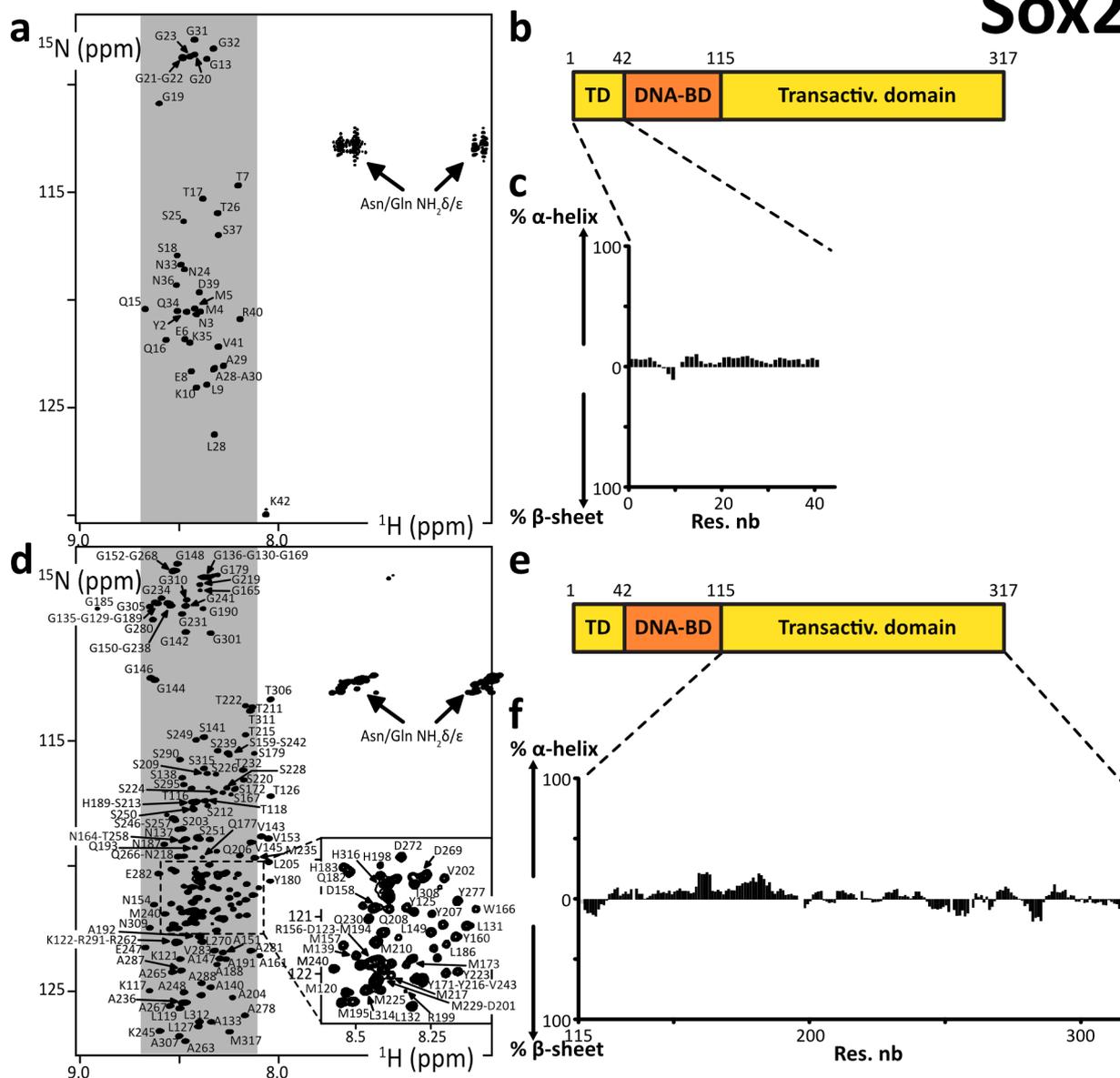


Figure 11 : **a. d.** Spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC des IDRs N-terminale et C-terminale de Sox2 humain, avec les attributions des signaux ; les zones grisées sont celles où se trouvent habituellement les résonances d'acides aminés adoptant un comportement structural random coil. **c. e.** Propensions aux structures secondaires calculées à partir des déplacements chimiques $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ du squelette peptidique, en utilisant l'algorithme ncSPC.²³⁹ (Sox2 Nter : BMRB 51534).

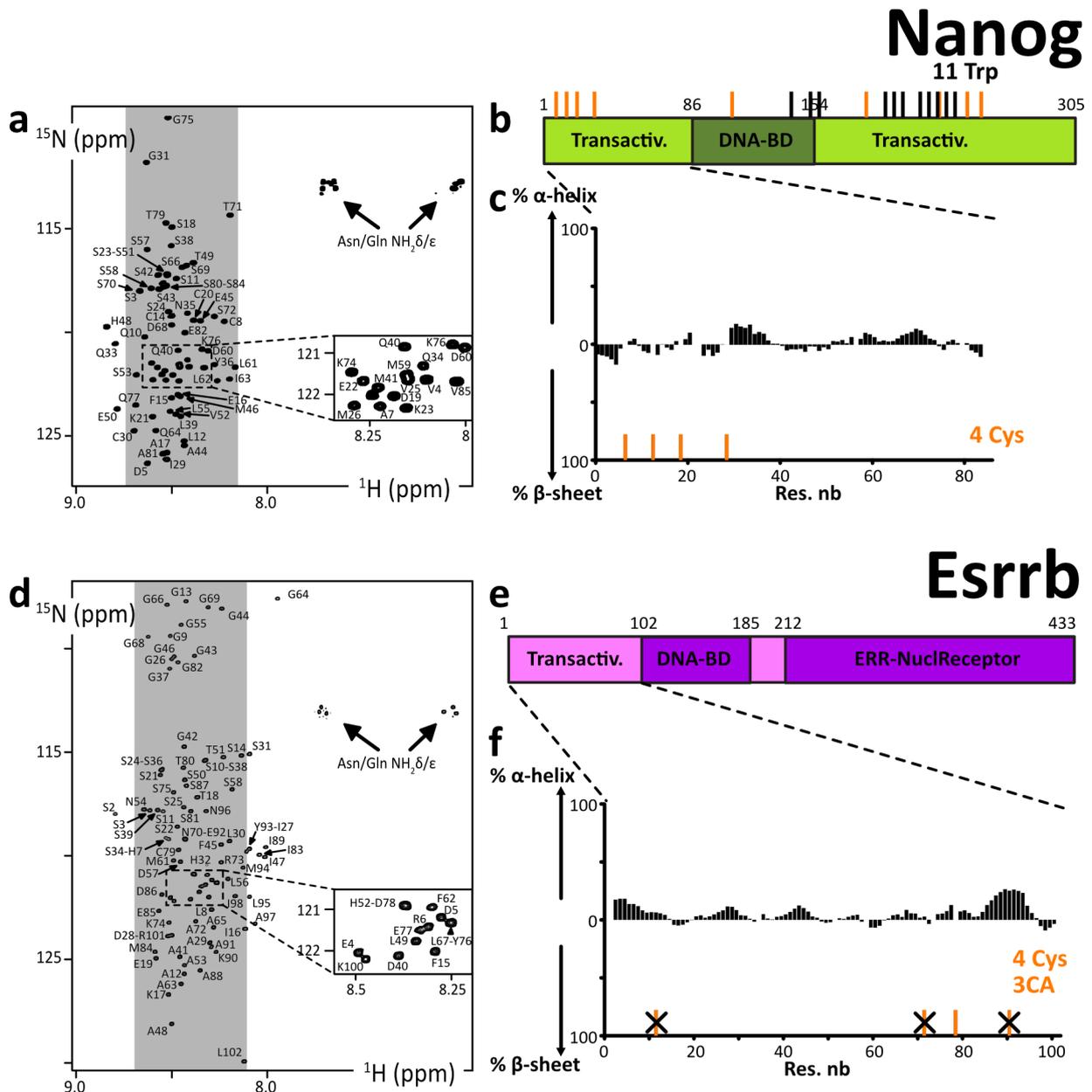


Figure 12 : a. d. Spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC des IDRs N-terminales de Nanog et Esrrb humains, avec les attributions des signaux ; les zones grisées sont celles où se trouvent habituellement les résonances d'acides aminés adoptant un comportement structural random coil ; Les tirets orange représentent les positionnements des cystéines, les tirets noirs ceux des tryptophanes dans Nanog. **c. e.** Propensités aux structures secondaires calculées à partir des déplacements chimiques $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ du squelette peptidique, en utilisant l'algorithme ncSPC.²³⁹

Toutes ces régions de TFs de pluripotence étaient prédites comme IDRs, ce que confirme sans ambiguïté l'analyse par RMN. Les propensités de structures secondaires sont faibles dans tous les cas. Les T1, T2 et HN-noes ont été mesurés pour la plupart des constructions. Les attributions n'ont pas toutes été soumises à la BMRB, il faut que je me force à trouver le temps de le faire.

Nos collègues de l'Institut Pasteur ont observé des colocalisations qui leur semblaient intéressantes sur la chromatine entre Esrrb et Nr5a2. Des hypothèses d'interactions ou de co-séparation de phase ont été imaginées, possiblement en conjonction avec Med1.¹⁹⁶ Ces deux facteurs de transcription sont importants pour la maintenance de la pluripotence ; ils intègrent tous les deux un domaine prédit comme IDR en N-terminal, un DNA-BD et un Ligand-binding domain (LBD) C-terminal. Nous avons conçu diverses constructions de Esrrb, Nr5a2 et Med1 pour tester les possibles

interactions intra- ou inter-moléculaires, séparation de phase et également pour effectuer la caractérisation structurale du LBD de Esrrb, qui n'était pas connue. J'ai entrepris des travaux de production/purification, la turbidité des constructions Esrrb-aa1-188 et Esrrb-aa1-211 en présence d'ADN était prometteuse, ces travaux devaient être prolongés avec une étudiante en stage. Le covid-19 a tout interrompu, et la post-doc de l'Institut Pasteur a ensuite arrêté de travailler à ce sujet et n'a pas prolongé son contrat. Des structures cristallographiques du LBD d'Esrrb ont été publiées à l'été 2020.²⁴⁰ De plus, la corrélation entre Esrrb et Nr5a2 était due à la reconnaissance de séquences cibles d'ADN très similaires.²⁴¹ Il n'y a donc pas de regrets à avoir. Des projets structuraux sur les protéines entières, et pas seulement sur les domaines repliés, seraient sûrement intéressants à mener. Ils sont en dehors des préoccupations de nos collègues biologistes, et des financements seront donc difficiles à obtenir sur ce sujet dans le proche avenir.

4.1.2.c. Phosphorylation, biotinylation, pull-downs de mESCs et protéomique

J'ai engagé l'étude des IDRs de ces TFs dans le but de caractériser leur structure, leurs phosphorylations sur les sites consensus S/T-P correspondant aux MAP-kinases et aux Cyclin-dependent kinases (Cdk), et les interactomes des formes non-modifiées et phosphorylées. J'espérais ainsi révéler l'existence d'interactions nouvelles impliquées par ces TFs, qui seraient éventuellement régulée par des phosphorylations très courantes. Il fallait donc établir les conditions de phosphorylation de nos IDRs, et concevoir des constructions peptidiques permettant d'effectuer des pull-downs pour l'analyse « interactomique ».

Initialement, j'avais pensé utiliser des constructions GST-peptide, que nous aurions attachées à des billes sepharose-glutathion. Cependant, j'ai noté que l'IDR d'intérêt rendait la liaison GST-glutathion assez peu efficace, et donc peu reproductible dans de nombreux cas. L'IDR formée peut-être un « nuage » moléculaire qui handicape la bonne liaison de la GST au glutathion. Un test d'analyse protéomique (PF Sicaps de l'I2BC) de pull-downs utilisant une construction GST-Sox2 sur des extraits cellulaires (HeLa) a été tenté donnant des résultats peu satisfaisants, tous nos protocoles n'étant pas très au point. Le manque de reproductibilité de l'attachement de nos constructions était de toutes façons un point à résoudre.

J'ai donc ensuite conçu des constructions intégrant un motif peptidique « AviTag » (GLN-DIFEAQKIEWHE),²⁴² permettant d'attacher une biotine par réaction catalysée par l'enzyme BirA (<https://www.addgene.org/20857/>), que nous avons produite au laboratoire. La caractérisation structurale par RMN de ces constructions montre que l'AviTag est lui-même désordonné et n'a pas d'influence sur le comportement conformationnel du peptide d'intérêt (**Figure 13a**, observations identiques sur AviTag-Sox2_aa137-240, AviTag-Sox2_aa234-317, AviTag-Esrrb_aa1-102 et Esrrb_aa1-102-AviTag). Nous avons également utilisé la RMN pour analyser l'avancement réactionnel et la spécificité de la biotinylation par BirA (**Figure 13b**). Nous avons constaté la grande spécificité et rapidité de cette réaction. Nous avons donc établi des conditions optimales permettant une réaction stœchiométrique rapide, qui évite la protéolyse progressive de nos IDRs d'intérêt. Ces peptides sont naturellement très sensibles à la protéolyse non-spécifique des contaminants toujours présents après purification, et le sont souvent encore plus dans leur état phosphorylé (constatation empirique, malgré le fait que la poly-phosphorylation d'IDRs n'engendre le plus souvent qu'une décompaction modérée²⁴³⁻²⁴⁷).

Nous avons testé l'attachement de nos constructions AviTag biotinylées à des billes fonctionnalisées à la streptavidine. Nous avons choisi d'utiliser des billes magnétiques pas trop onéreuses (Magbeads, Genscript) qui donnaient satisfaction (**Figure 14**).

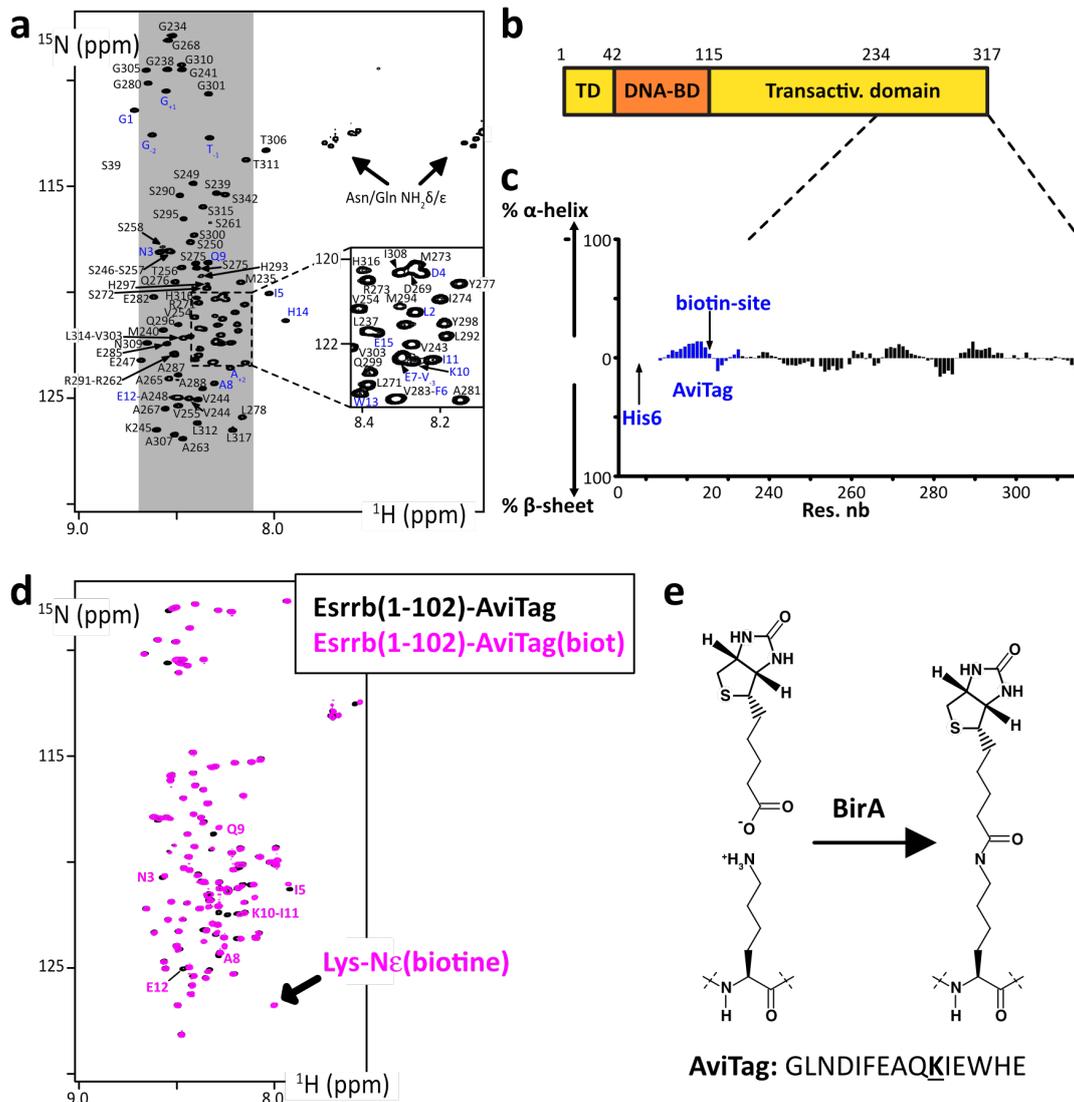


Figure 13 : **a.** Spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -His6-AviTag-Sox2_aa234-317 indiquant l'attribution des signaux du peptide AviTag en bleu ; **b.c.** Propensions aux structures secondaires calculées à partir des déplacements chimiques $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ du squelette peptidique, en utilisant l'algorithme ncSPC;²³⁹ **d.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC de la construction Esrrb_aa1-102_C12A-C72A-C91A_AviTag-His6 avant (noir) et après (magenta) biotinylation par BirA ; les signaux des acides aminés de l'AviTag à proximité du site de biotinylation sont indiqués, qui permettent de quantifier la biotinylation ; **e.** Schéma de la réaction de biotinylation ATP-dépendante par BirA sur l'Avi-Tag.

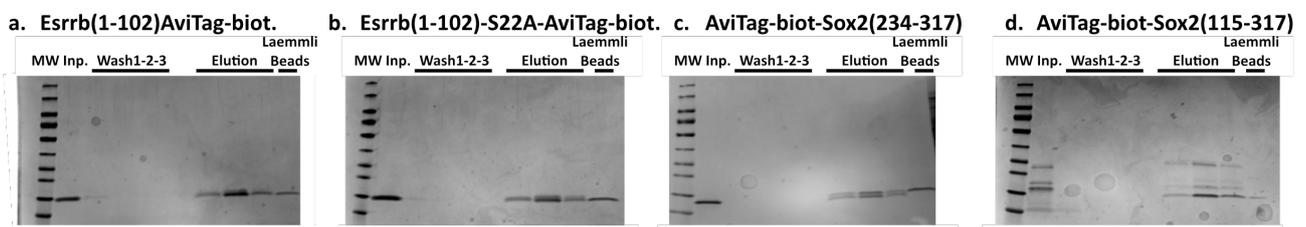


Figure 14 : Analyse SDS-PAGE de tests d'attachement de 1 nmol de constructions peptidiques AviTag-biotinylés (Inp.=input) sur 25 μL de billes magnétiques fonctionnalisées à la streptavidine (Magbeads, Genscript ; le manuel d'utilisation indique une capacité de charge de ~ 1.5 nmol de protéine biotinyllée pour 25 μL de billes) ; les lavages montrent la stabilité de l'attachement de nos constructions, les éluions à la biotine montrent que les billes relarguent également de la streptavidine ; la bande correspondant à la streptavidine est observable dans le dernier puit, issu de la dénaturation des Magbeads dans un tampon de Laemmli. **d.** Un de nos tests

avec Sox2_aa115-317 a été réalisé sur un peptide partiellement protéolysé (à notre grand dam), qui permet de constater qu'un des peptides résultant ne contenant pas l'AviTag est élué lors du premier lavage.

Dans le même temps, nous avons testé les capacités de différentes kinases sur nos IDRs de TFs. Ces phosphorylations ont été effectuées avec des kinases recombinantes produites au laboratoire ou commerciales. Des spectres enregistrés avec des pH et température croissants ont été acquis pour attribuer les spectres dans les conditions de phosphorylation. Celles-ci ont été suivies par l'enregistrement de spectres 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC, beaucoup plus efficaces en S/N pour les IDPs.^{40,48} Ceci nous a permis de caractériser les sites de phosphorylation, notamment par p38 α (que nous produisons localement à faible coût) et les déplacements chimiques de ces sites phosphorylés. Les trois sites Ser/Thr-Pro de l'IDR N-terminale de Esrrb sont bien phosphorylés par les MAPK et CDK testées. De manière intéressante, p38 α phosphoryle les 3 sites Ser/Thr-Pro de l'IDR C-terminale de Sox2 (S220, T232, S251), mais phosphoryle aussi 2 sites non-canoniques (S209, motif YNSM, et T306, motif PGTA).^{248,249}

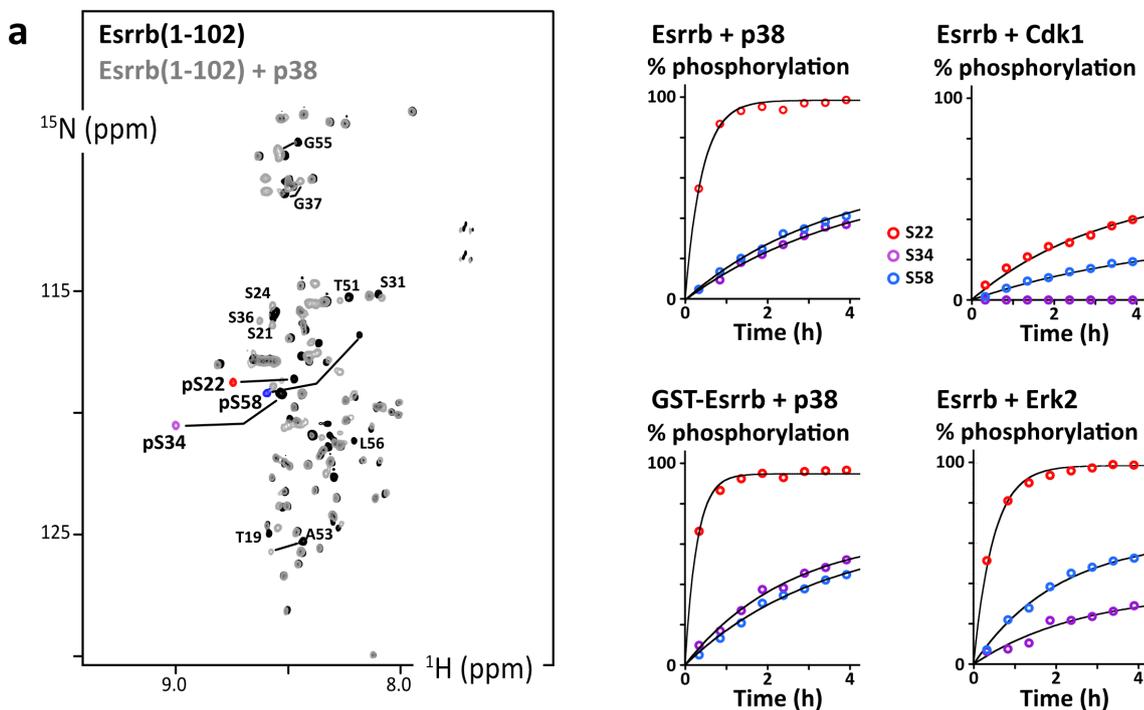


Figure 15 : a. Superposition de spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -Esrrb_aa1-102_C12A-C72A-C92A enregistrés à 283K (noir) et après (gris et phospho-pics en couleurs) phosphorylation par p38 α ; **b.** Cinétiques de phosphorylation à 298K obtenues par RMN (séries de spectres 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC) de Esrrb_aa1-102_C12A-C72A-C92A (pSer22 en rouge, pSer34 en violet, pSer58 en bleu) en présence de p38 α , Cdk1-cyclinA2 ou Erk2 ; la présence de la GST en N-terminal n'a pas d'impact sur les préférences de phosphorylation par p38 α .

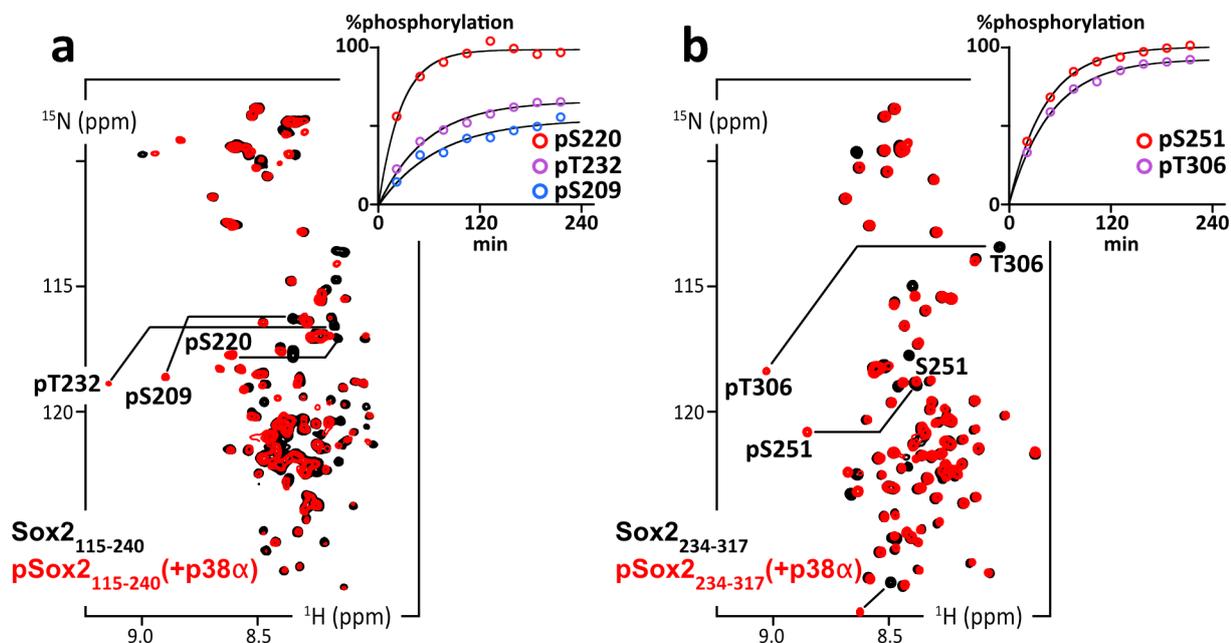


Figure 16 : **a.** Superposition de spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -Sox2_aa115-240 enregistrés à 283K avant (noir) et après (rouge) phosphorylation par p38 α ; les cinétiques de chaque site ont été analysées par RMN (séries de spectres 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC) ; **b.** Superposition de spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -Sox2_aa234-317 enregistrés à 283K avant (noir) et après (rouge) phosphorylation par p38 α ; les cinétiques de chaque site ont été analysées par RMN (séries de spectres 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC).

Nous avons pu ainsi ensuite établir des protocoles permettant la phosphorylation stœchiométrique des IDRs au sein de constructions AviTag-IDR ou IDR-AviTag. Nous avons ensuite utilisé des échantillons AviTag-Sox2_aa115-240 et AviTag-Sox2_aa234-317 phosphorylés ou non par p38 α , pour effectuer des pull-downs sur des extraits nucléaires de cellules souches embryonnaires murines (mESCs, cellules cultivées par nos collaborateurs de l'Institut Pasteur, équipe Epigénomique, Prolifération et Identité Cellulaire dirigée par P. Navarro). Nous avons choisi d'utiliser les capacités de protéomique semi-quantitatives proposées par la plate-forme de protéomique de l'Institut Curie. Cette approche permet de comparer quantitativement les éluats obtenus à l'issue d'expériences de pull-downs. Nous avons décidé de comparer les interactomes de deux fragments de l'IDR C-terminale de Sox2, qui comportaient chacune une région riche en résidus hydrophobes, habituellement associés à des motifs d'interactions chez les IDRs.

Les résultats (**Figure 17**) montrèrent un enrichissement modéré de certains facteurs de transcription dans l'éluat de Sox2(aa115-240), cet enrichissement disparaissant après phosphorylation de Sox2(aa115-240). Les enrichissements les plus remarquables concernent les kinases CK1 α,δ,ϵ et la prolyl-isomérase Pin1, que l'on retrouve enrichis seulement dans les éluats de phospho-Sox2_aa115-240, et plus encore de phospho-Sox2_aa240-317. Nous n'avons par contre par observé d'enrichissement en sous-unités du complexe Mediator, alors que des interactions Sox2-Mediator ont été décrites.^{196,250}

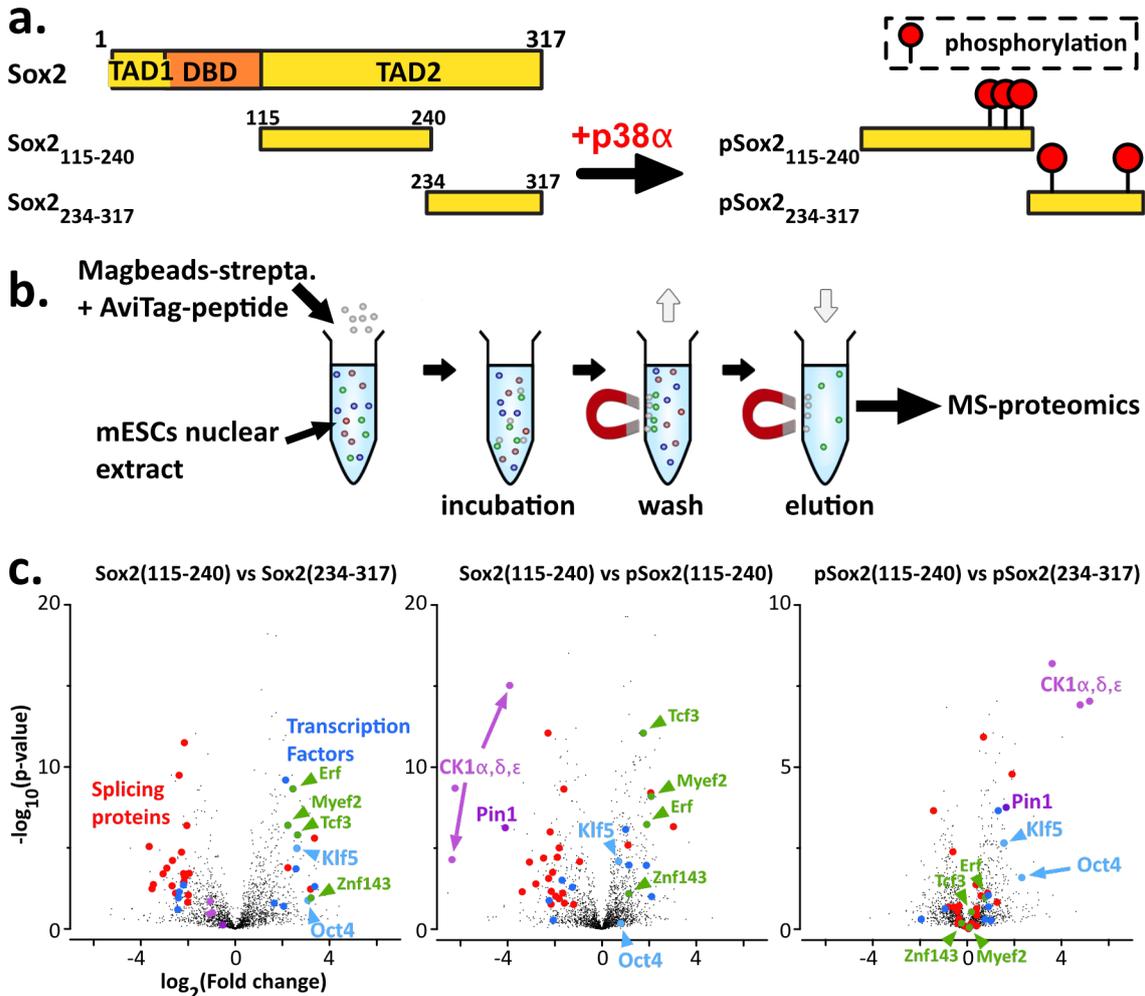


Figure 17 : **a.** Schéma des structures primaires d'IDRs de Sox2 utilisées pour les pull-downs visant à identifier des partenaires de Sox2 ; **b.** Etapes de l'expérience de pull-down ; **c.** Volcano plots de l'analyse en protéomique semi-quantitative des éluats obtenus à l'issue de l'expérience de pull-down ; quelques familles de protéines sont mises en valeur par des couleurs : bleu: facteurs de transcriptions associés à Sox2(aa115-240) peu ou non affectés par la phosphorylation ; vert : facteurs de transcriptions associés à Sox2(aa115-240) mais pas à sa version phosphorylée; magenta: partenaires phospho-dépendants de Sox2(aa115-240); violet: partenaires phospho-dépendants de of Sox2(aa115-240) et Sox2(aa234-317). Les pull-downs ont été effectués uniquement en duplicat, en utilisant 15 millions de cellules par échantillon (concentration de l'extrait cellulaire : 5 mg/mL) et 1 nmol de protéine appât.

Nous avons vérifié par RMN que phospho-Sox2(aa115-240) and la prolyl-cis/trans isomérase Pin1 interagissaient directement (Figure 18): Pin1 reconnaît le motif consensus pSer-Pro de Sox2, mais aussi un motif pSer-Ala inconnu jusqu'alors. Des interactions entre Pin1 et Oct4 ou Nanog avaient été publiées antérieurement,^{251,252} dont l'impact sur la stabilité des facteurs de transcription, et pour la pluripotence et le cancer avait été décrit.²⁵³ Les interactions entre phospho-Sox2(aa115-240) et les isoformes de CK1 étaient également très intéressantes. Il avait été montré récemment que l'inhibition de CK1 stimulait l'induction de Oct4, Nanog et Esrrb, et menait à une conversion vers des ESCs naïves efficace.¹⁸⁸ Il semblait ici que nous avions identifié une affinité de CK1 pour des substrats déjà phosphorylés, ce qui était intéressant. Nous avons presque défini les conditions de production de CK1ε au laboratoire, et je pensais peut-être essayer de décrire l'interaction entre CK1δ et phosho-Sox2. Cependant, j'apprenais qu'un collègue allemand (Pr. V. Dötsch) allait publier la première description de l'interaction de CK1ε avec des fragments préphosphorylés de p63 (très belle publication ²⁵⁴).

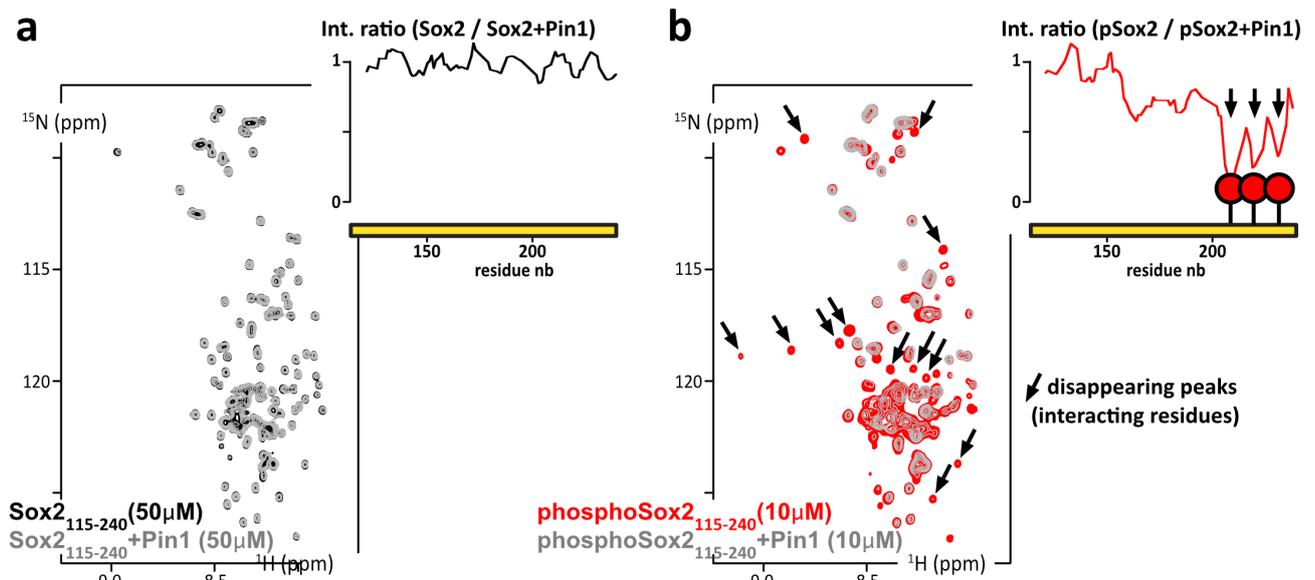


Figure 18 : **a.** Superposition de spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -Sox2_{aa115-240} seule (noir) ou en présence de Pin1 (non marquée isotopiquement) (gris); en haut à droite : rapports d'intensités pour chaque résidu dans les spectres de Sox2_{aa115-240} seule et en présence de Pin1. **b.** Superposition de spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC de ^{15}N -phospho-Sox2_{aa115-240} seule (rouge) ou en présence de Pin1 (gris) ; en haut à droite : rapports d'intensités pour chaque résidu dans les spectres de phospho-Sox2_{aa115-240} seule et en présence de Pin1.

J'ai incorporé ces résultats préliminaires à des demandes de financement ANR et INCA à la fin 2017, qui proposait de caractériser structurellement les interactions déjà publiées entre OSN et leurs partenaires, de financer les recherches interactomiques avec plus de réplicats sur les autres IDRs de TFs de pluripotence, et de vérifier les interactions identifiées en mESCs par mutations de fragments d'IDRs (collab. PF protéomique Institut Curie, et P. Navarro de l'Institut Pasteur). Le projet n'a pas été retenu (échec au 2^e tour), l'aspect exploratoire de recherches interactomiques n'ayant pas été bien perçu notamment. Ces études de recherche de partenaires directs sont en pause depuis : les expériences de protéomique coûtent cher, je pensais avoir plus de chances de financements sur d'autres sujets pour l'instant, et nos observations expérimentales ainsi que des publications montrant de la séparation de phase associées aux IDRs de TFs de pluripotence en 2018 changeaient beaucoup la situation.

4.1.2.d. La séparation de phase et les limites de nos approches

Nous avons en effet reconnu la capacité des IDRs de Sox2 de provoquer la séparation de phase *in vitro*. Cela avait rendu l'attribution RMN de Sox2_{aa115-317} très difficile, car cela s'associait à une concentration limite maximale d'environ 100 μM et à l'agrégation progressive de ce peptide. Je ne détaillerai pas les résultats, suivant le souhait de mes collaborateurs. Je peux tout de même en parler, puisque des observations similaires ont été publiées par le groupe de R. Young.¹⁹⁶ Les quelques récentes années ont vu la publication d'études très éclairantes sur le sujet, dont j'ai déjà parlé en introduction (cf. 3.1.2.a.)^{188,194-202} Il est possible que l'enrichissement en TFs observé à l'issue de nos pull-downs utilisant l'IDR C-terminale de Sox2 soit lié à ce genre de phénomène. J'ai en tout cas le sentiment qu'il sera difficile de faire financer des études structurales dans ce champ scientifique dans un proche avenir : il semble que les TFs puissent interagir de manière multivalente, faible et peu spécifique avec la machinerie de transcription et avec d'autres TFs ; ceci rend l'engagement dans de telles études risqué, et peu attractif pour les agences de financement françaises, dont je perçois une préférence pour les recherches liées à des événements biologiques avec lesquels on peut interférer (e.g. inhibition ou activation à des fins thérapeutiques). Il serait très difficile

d'obtenir et de publier suffisamment de caractérisations structurales en séparation de phase sur ces TFs avec nos moyens, qui pourraient pour motiver une agence de recherche à poursuivre dans cette voie. J'ai donc mis cette partie de mes travaux en pause depuis 2018. Je publierai certainement les résultats présentés dans un article invité en 2023 (Comptes rendus de l'Académie des Sciences).

4.1.3. Caractériser les IDPs par RMN en conditions physiologiques : la détection ^{13}C directe

Mes travaux sur les IDRs/IDPs et leur caractérisation par RMN ont toujours eu un aspect que je trouvais frustrant : nous étions dans l'obligation de les observer à faible pH <7 et faible température < 298K. Cela est dû au fait que nous les analysons en utilisant des expériences bidimensionnelles de corrélation ^1H - ^{15}N des fonctions amides du squelette peptidique : ces expériences génèrent des spectres dont les signaux sont suffisamment distincts, et dont la sensibilité est maximale... mais diminue lorsque l'échange de protons entre l'eau et les fonctions amides s'accélère à pH et température croissantes. J'avais travaillé à trouver des parades à cela en post-doctorat, améliorant l'utilisation de ces expériences ^1H - ^{15}N pour les IDPs. J'avais également testé des expériences utilisant la détection directe ^{13}C , proposées par I. Felli et W. Bermel.^{184,185} Malheureusement, ces expériences souffrent d'une sensibilité plus faible, notamment celle établissant une corrélation ^{13}CO - ^{15}N qui génèrent des pics distincts pour chaque résidu (~1h d'acquisition à ~200 μM). J'avais gardé à l'esprit que certaines améliorations pouvaient être portées et j'ai donc travaillé à ce sujet en 2018-2019.

Une autre expérience en détection ^{13}C directe attirait mon attention : la corrélation ^{13}Ca - ^{13}CO permettait a priori une meilleure sensibilité que la corrélation ^{13}CO - ^{15}N , mais les signaux étaient intrinsèquement plus superposés dans les spectres. Cependant, mes collègues I. Felli et W. Bermel n'avaient pas conçu leurs expériences pour observer de longues FID des ^{13}Ca , synonyme d'amélioration de la résolution, ce qui était pourtant possible étant donnée les caractéristiques de relaxation favorables des ^{13}Ca . J'ai donc reconçu des expériences de corrélation ^{13}Ca - ^{13}CO utilisant une évolution « constant-time » dans la dimension indirecte d'évolution du ^{13}Ca , pour éliminer les couplages scalaires avec les carbones voisins ; j'ai également optimisé les temps de transferts de magnétisation, utilisé de nouveaux pulses plus efficaces que ceux des expériences précédentes, et remplacé le découplage ^{13}C - ^{13}C virtuel IPAP par un homodécouplage pendant l'acquisition. Toutes ces améliorations ont permis d'améliorer la sensibilité d'un facteur 3, auquel on peut ajouter une augmentation de signal grâce à des composés paramagnétique accélérant les T1. Nous pouvons désormais obtenir des spectres d'IDPs exploitables pour l'analyse résidu par résidu en 1 heure à ~10 μM (signal sur bruit par heure et par micromolaire $S/N/h/\mu\text{M} \sim 1$ à $2 \text{ h}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ dans un tube « shigemi advanced » 5 mm contenant 320 μL d'échantillon utile), en utilisant la cryosonde TXO installée sur un 700 MHz de l'ICSN (Gif-sur-Yvette).

Ces développements ont été publiés en 2020 dans le journal *Angewandte Chemie*.²⁵⁵ L'article correspondant montrait la capacité de cette nouvelle approche ^{13}Ca - ^{13}CO à générer des spectres de haute qualité sur de nombreuses IDRs (**Figure 19**). Il montrait également l'utilité de cette approche à haute sensibilité pour l'analyse des cinétiques de phosphorylation d'IDPs en toutes conditions de pH et de températures (**Figure 20**), ce que les approches ^1H - ^{15}N ou ^{13}C - ^{15}N ne permettent pas à cause de l'échange de protons entre eau et fonctions amides.

alpha-synucléin
pH7/283K

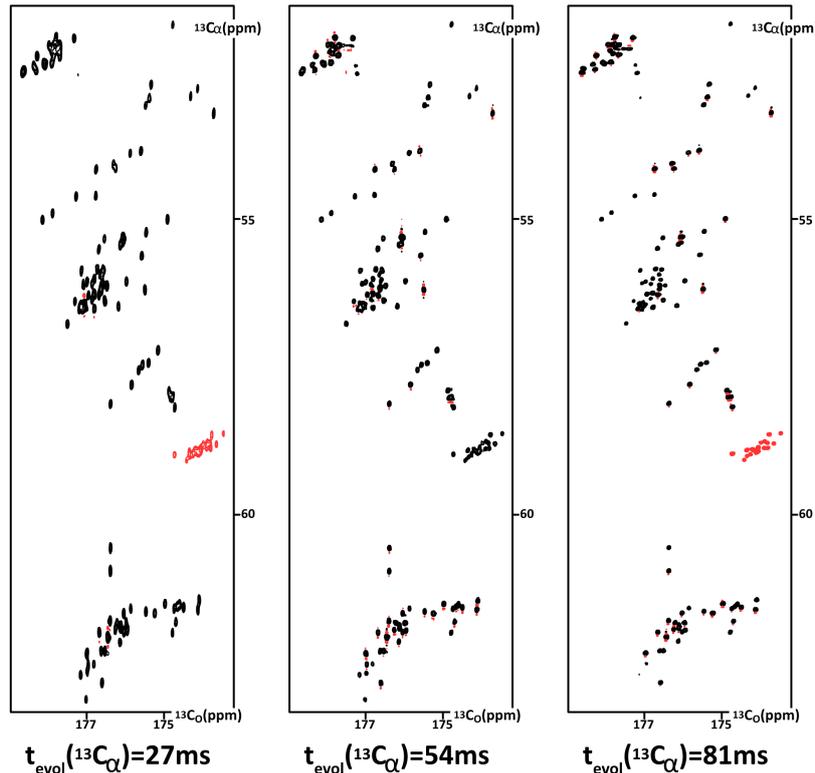


Figure 19 : Spectres $(^1\text{H-flip}^*)\text{-}^{13}\text{Ca}^{13}\text{CO-LB}$ de l' α -synucléine obtenus à 700 MHz, en utilisant des temps d'évolution « constant-time » dans la dimension indirecte croissants (multiples de $1/J(\text{CaCb})$).

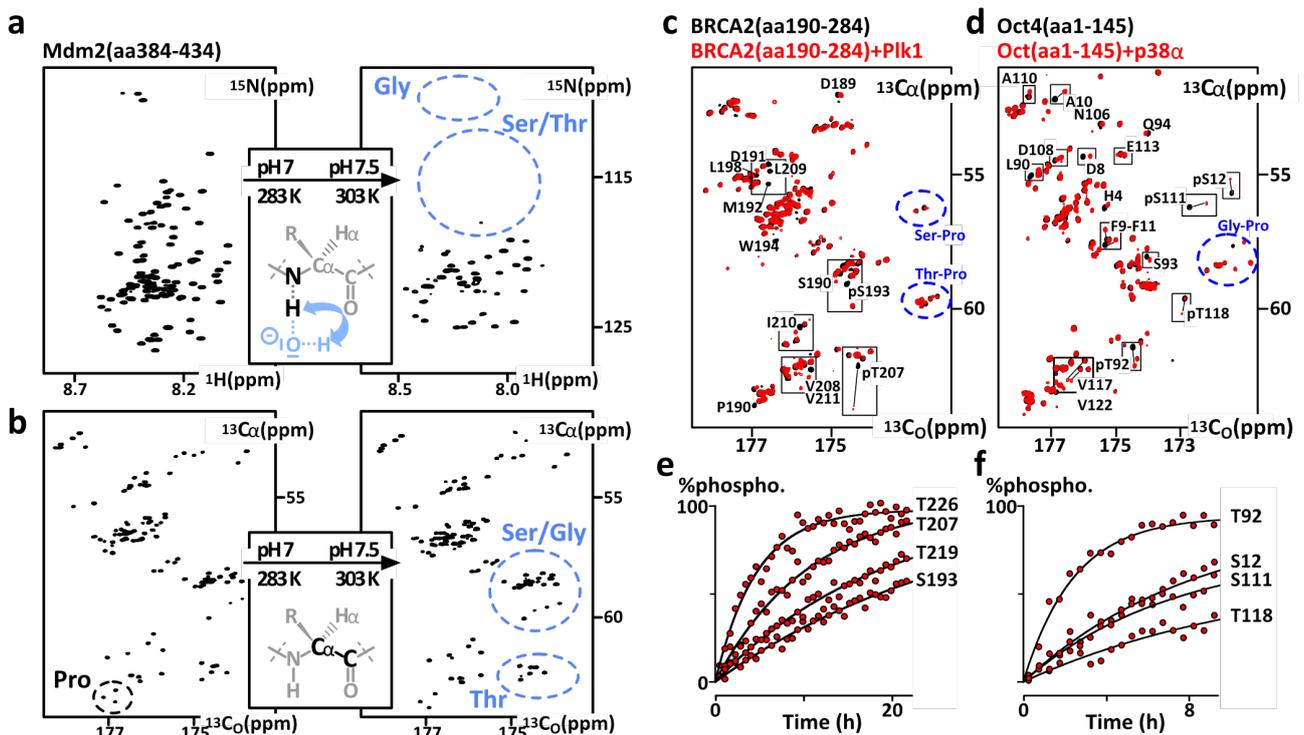


Figure 20 : **a.** Spectres 2D $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ HSQC et **b.** $(^1\text{H-flip}^*)\text{-CaCO-LB}$ du fragment IDR de Mdm2 humaine (aa284-434) à pH7/7.5 et $T=283\text{K}/303\text{K}$; **c.** Spectres 2D $(^1\text{H-flip}^*)\text{-CaCO-LB}$ du fragment IDR de BRCA2(aa190-284) avant (noir) et après (rouge) phosphorylation par Plk1 ; **d.** Spectres 2D $(^1\text{H-flip}^*)\text{-CaCO-LB}$ du fragment IDR de Oct4(aa1-145) avant (noir) et après (rouge) phosphorylation par p38 α ; **e.f.** Cinétiques de phosphorylation de BRCA2(aa190-284) et Oct4(aa1-145) par Plk1 et p38 α telles qu'observés par l'acquisition de séries de spectres 2D $(^1\text{H-flip}^*)\text{-CaCO-LB}$ au cours des réactions.

Nous avons commencé à utiliser cette approche pour explorer les interactions entre l' α -synucléine et les membranes lipidiques.

L' α -synucléine joue en effet un rôle dans le recyclage des vésicules synaptiques (~40 nm de diamètre).²⁵⁶ Cette capacité d'interaction avec les membranes semble avoir des effets délétères en cas de surexpression de l' α -synucléine, avec l'accumulation de gouttelettes lipidiques et la perte de physiologie normale et d'activité mitochondriale.^{135,136,257} L'affinité pour les membranes lipidiques a été beaucoup étudiée, elle est fortement modulée par la charge des têtes polaires lipidiques, par la courbure de la membrane, et par la fluidité de la membrane, mais ces deux derniers aspects ne sont pas bien documentés à mon avis, notamment du point de vue structural.^{112,258-262} Grâce aux expériences ^{13}Ca - ^{13}CO , nous avons montré que ces interactions α -synucléine/larges vésicules (>100-200nm) sont très dépendants de la température (**Figure 21**). Nous avons notamment observé l'interaction entre α -synucléine et des mitochondries purifiées de cellules HeLa à 310K, mais pas à 283K. Cette étude nécessiterait quelques expériences supplémentaires pour être publiable, elle n'est pas dans nos priorités immédiates.

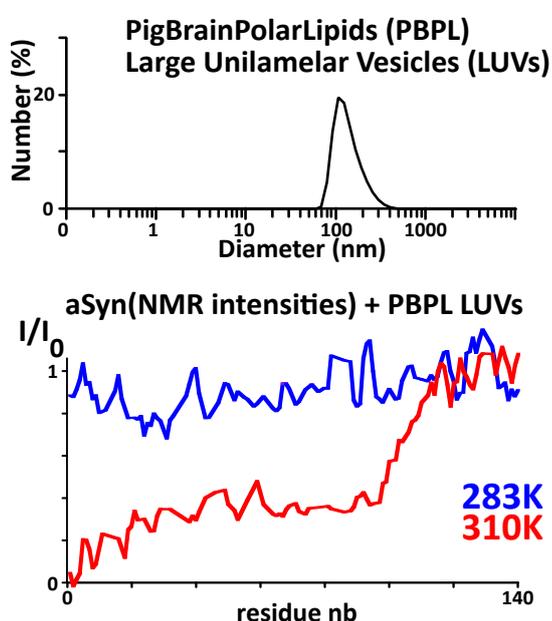


Figure 21 : Caractérisation de l'interaction entre l' α Syn, à 30 μM et des vésicules larges unilamellaires (LUVs) d'extraits de lipides polaires de cerveaux de porc (4g/L). Les vésicules ont un diamètre moyen de ~100 nm (DLS). Cette taille est suffisamment large pour empêcher l'interaction avec l' α Syn à 283K, en accord avec la littérature : les différences d'intensités, résidu par résidu, des signaux RMN de l' α Syn seule (I_0) et en présence de LUVs (I) sont très faibles, indiquant un environnement chimique similaire de l' α Syn observé dans les 2 situations, i.e. un monomère en solution. Cependant, grâce à l'utilisation de nouvelles séquences permettant la détection RMN ^{13}C , nous avons pu mesurer de larges différences d'intensité à 310K, température à laquelle l'interaction est observable par les différences d'intensités. Nous pouvons ainsi cartographier cette interaction faisant intervenir les 100 premiers résidus de l' α Syn.

Une autre application plus excitante, celle que j'avais en tête depuis 7-8 ans, vient enfin d'être mise en œuvre. Nous avons récemment utilisé l'approche ^{13}Ca - ^{13}CO à la RMN in-cell. Ceci nous a permis d'obtenir les premiers spectres au monde d'IDPs en conditions physiologiques de pH, température et en cellule (cf. chapitre 3.3.). Nous allons essayer de publier ces résultats au plus vite.

Un problème demeure pour les approches utilisant la détection ^{13}C -directe: le prix élevé du ^{13}C -glucose utilisé pour la production recombinante de protéine marquées ^{13}C . Un gramme coûte en ce moment ~200-300 euros, quasiment le prix d'exploitation d'un spectromètre pendant un jour. Il faut 2 grammes de glucose par litre de culture. Ces coûts deviennent difficiles à assumer.

Nous avons également exploré les possibilités d'utilisation de la corrélation ^1Ha - ^{13}Ca , qui permet une meilleure sensibilité à tout pH et toute température, en collaboration avec un collègue hongrois (A. Bodor).²⁶³ L'expérience RMN qui a été conçue est cependant moins applicable pour la RMN in-cell. L.E. Kay lui-même a récemment publié une séquence permettant d'évaluer la relaxation transverse des ^1Ha pour caractériser des IDPs en conditions physiologiques, en lien avec les investigations sur l'état des IDPs en séparation de phase.²⁶⁴ Le problème des conditions utilisées pour la caractérisation des IDPs commence donc à être considéré par la communauté.

4.1.4. Amélioration des protocoles de suivi de phosphorylation par RMN

En continuant à travailler sur les phosphorylations d'IDRs par des kinases, et leur analyse par RMN, j'ai rencontré plus de situations parmi celles possibles et amélioré les protocoles liés à cette analyse, de la préparation des échantillons à l'analyse des cinétiques. Ces améliorations aux protocoles élaborés pendant mon post-doctorat ont été publiés en 2020 dans un numéro spécial de *Methods in Molecular Biology* dédié aux IDPs ; l'étudiante en thèse que je co-encadrais, M. Julien, a assuré l'écriture et la réalisation des aspects expérimentaux de l'exemple utilisé pour décrire ces nouveaux protocoles.²⁶⁵ Les détails et les astuces qui sont fournis dans cette publication sont nombreux et précis, trop pour être énumérés ici. Il me semble normal de renvoyer les lectrices et lecteurs à la lecture de celle-ci, le manuscrit est disponible via orcid et HAL.

4.1.5. Le facteur de transcription Elk1

Mes travaux de post-doctorat sur le TF Elk1 avaient permis de révéler une régulation très particulière de l'interaction entre l'IDR de Elk1 et le complexe Mediator : les premières phosphorylations de Elk1 par Erk2 augmentaient l'affinité pour le Mediator, tandis que des phosphorylations plus tardives l'abolissaient (cf. chapitre 2.2.2.c. et **Figure 3**).⁵⁸ La description structurale de ces événements n'est toujours pas résolue cependant. Les difficultés liées à la production des formes de Elk1 phosphorylées en sont sans doute en partie responsables. Elk1 induit la transcription de nombreux gènes liés à la prolifération cellulaire, et il est logiquement impliqué dans de nombreux cancers.²⁶⁶⁻²⁷³ La caractérisation structurale de l'interaction entre Elk1 et le complexe Mediator serait donc très intéressante. Il a été montré que cette interaction dépend de la présence de la sous-unité Med23. Cette sous-unité a longtemps résisté aux tentatives d'études biochimiques, mais avait été produite en cellule d'insecte, purifiée et stabilisée par des collègues à Lille, notamment grâce à l'ajout d'un nanobody qui avait permis la cristallisation de Med23.²⁷⁴ Nous avons repris ces protocoles pour étudier les interactions des formes phosphorylées de l'IDR de Elk1 avec Med23 par RMN.

J'ai tenté de cartographier la région d'interaction de l'IDR N-terminale de Elk1, en enregistrant des spectres de ¹⁵N-Elk1 en présence/absence de Med23 : les résidus en interaction voient leur intensité RMN diminuer (Med23 est une protéine repliée de 200 kDa). Nous avons produit diverses versions de Elk1, dont des sites de phosphorylation ont été mutés en alanine, pour quantifier l'impact de ceux-ci sur l'interaction avec Med23.

Cette étude est rendue difficile par le fait que Med23 est très sujet à l'agrégation, et ne supporte pas les pH neutres ou acides. Travailler à pH 8 rend l'observation classique d'IDRs par RMN ¹H-¹⁵N très difficile, en raison de l'échange rapide entre protons de l'eau et des fonctions amides (cf. chapitre 3.1.3.). L'utilisation des nouvelles séquences d'impulsion décrites en 4.1.3. nous a permis d'obtenir des résultats préliminaires intéressants. Nous avons observé la disparition de certains pics de phospho-¹⁵N-Elk1(Δ slow) (5 sites phosphorylés, 3 phosphosites lents mutés pour affinité maximale, cf. chapitre 2.2.c.) en présence de Med23, qui correspondraient à la région d'interaction entre le facteur de transcription Elk1 phosphorylé et la sous-unité Med23 du complexe Mediator (**Figure 22**). Certains de ces pics perdent aussi en intensité dans Elk1 non-phosphorylée en présence de Med23.

Nous avons aussi produit des constructions biotine-AviTag-Elk1(Δ slow) phosphorylées ou non pour effectuer des pull-downs d'extraits nucléaires de cellules HeLa. Nous espérions observer des différences d'intensités pour Med23 révélée en western-blot, mais les bandes obtenues étaient très faibles, trop pour être vraiment analysées.

Nous avons soumis un projet pour financement par l'ANR à la fin 2018 pour finaliser cette étude, qui n'a pas été financée (échec au 2^e tour). La principale critique portait sur la possibilité de compléter la RMN par de la microscopie électronique du complexe Mediator (task optionnel proposé en fin de projet), qui a été fortement mise en doute par un(e) référé(e). C'était un mois avant la publication des premières structures cryo-EM de ce Mediator. Les avancées dans la description structurale du Mediator et de son interaction avec la RNA polymérase II par cryo-EM ont été d'ailleurs phénoménales au cours des 3-4 dernières années.^{275,276}

Ce projet n'est pas réalisable sans ce financement et je ne l'ai pas priorisé. (L'année suivante, j'ai en effet préféré soumettre à l'ANR un projet lié au réseau p53-Mdm2-Chk2, en collaboration avec A. Loewer, Univ. Darmstadt). Une étude récente a montré l'intérêt thérapeutique potentiel fort de l'inhibition entre Med23 et un autre facteur de transcription, Elf3 qui induit la production de Her2.²⁷⁷ Il semble que Elk1 et Elf3 n'interagissent pas de la même manière avec Med23 selon cette étude. Pour finir, je n'ai pas pris le temps de tenter des prédictions structurales d'un complexe Elk1-Med23 en utilisant AlphaFold. Il est possible cependant que l'interaction soit peu spécifique ou s'effectue à travers des mécanismes de séparation de phase, suivant de nombreux autres exemples récents.^{188,194-202}

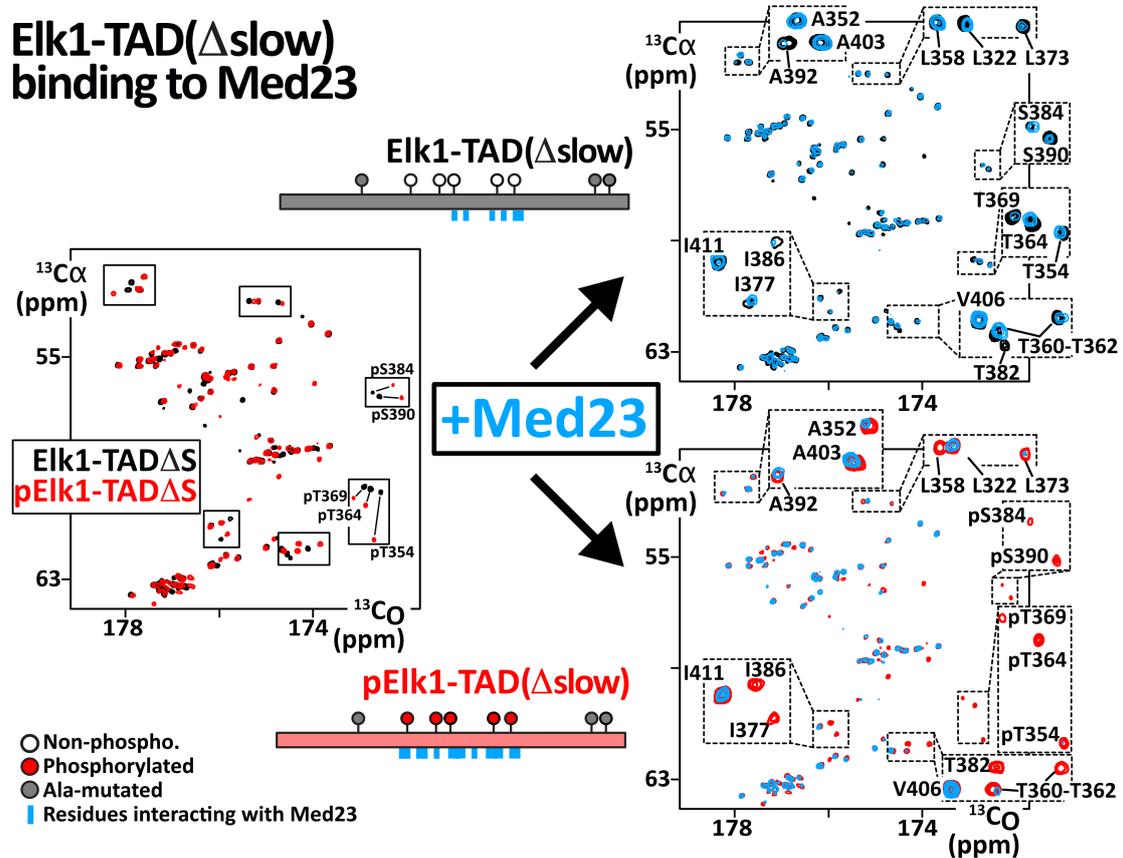


Figure 22 : Superposition des spectres 2D Ca-CO du domaine désordonné de transactivation Elk1-TAD(Δ slow), i.e. Elk1(aa309-429)-(T337A-T418A-S423A) muté sur les sites de phosphorylation lents, dont nous avons montré l'impact négatif sur l'interaction avec le complexe Mediator (Mylona et al. 2016 Science).⁵⁸ **A gauche** : superposition de Elk1-TAD(Δ slow) non phosphorylé (noir) et phosphorylé (rouge) par Erk. **En haut à droite** : superposition de Elk1-TAD(Δ slow) non phosphorylé seul (noir) et en présence de Med23 (bleu), tous les deux à 10 μ M. Nous observons des intensités de pics décroissantes dans la région entre T369 et A392, qui suggèrent une interaction faible entre Elk1-TAD(Δ slow) et Med23. **En bas à droite** : superposition de Elk1-TAD(Δ slow) phosphorylé seul (rouge) et en présence de Med23 (bleu) tous les deux à 10 μ M. Nous observons des disparitions de pics dans la région entre A352 et A392, qui suggèrent une interaction plus forte entre phospho-Elk1-TAD(Δ slow) et Med23. Tous les spectres ont été enregistrés en PBS, à pH8 et à 283K (700 MHz TCI cryosonde, 12h d'acquisition).

4.1.6. Mdm2, l'ubiquitine-ligase de p53

4.1.6.a. Contexte, questions

J'avais mené des travaux sur l'interaction entre p53 et Mdm2 au cours de mon post-doctorat. La très étudiée protéine p53 est un TF « suppresseur de tumeur », mutée dans environ 50% des cancers, dont les gènes cibles sont très nombreux, certains déclenchant arrêt du cycle cellulaire, sénescence.²⁷⁸ Mdm2 est sa principale E3-ubiquitine ligase qui promeut la dégradation régulière de p53 (**Figure 23**). Cette activité régule la quantité intracellulaire de p53, permettant le déroulement normal de la vie cellulaire.^{279,280} Inhiber la liaison de Mdm2 à p53 et l'ubiquitination de p53 est depuis longtemps une stratégie anticancer attractive.

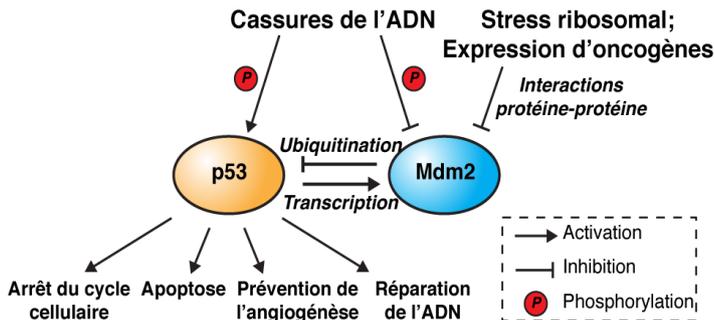


Figure 23 : Schéma bref de l'activation et régulation de p53 et Mdm2.

Nous nous intéressions pendant mon post-doc à l'influence des propensités en structure secondaire de l'IDR N-terminal de p53 sur son affinité pour son ubiquitine-ligase Mdm2, et à ses conséquences sur la signalisation cellulaire de p53 (cf. chapitre 2.2.4.b.).⁵¹ Ces travaux se basaient sur des caractérisations *in vitro* utilisant des fragments courts N-terminaux de p53 et Mdm2, complétées par de la microscopie de fluorescence en cellule vivante pour détailler l'évolution dynamique des concentrations de p53 et Mdm2. Cette interaction entre l'IDR N-terminale de p53 et le domaine N-terminal p53-BD (aa1-112) de Mdm2 était celle qui occupait toute la communauté, pour plusieurs raisons : entre autres, d'abord parce qu'on savait produire et purifier ces peptides, mais aussi notamment parce que l'inhibition de cette interaction était vue comme une stratégie anti-cancer prometteuse. De nombreux composés liant Mdm2 et inhibant l'interaction avec p53 ont été développés et même testés en clinique,^{281,282} mais ces applications thérapeutiques ne sont toujours pas satisfaisantes (pas assez toxiques envers les cellules cancéreuses, trop toxiques envers les tissus sains, et mutations d'échappement de p53 créant des clones cancéreux graves).^{283,284} Des dérivés de ces inhibiteurs sont actuellement développés, qui induisent la protéolyse de Mdm2 (PROTACs).²⁸⁵

Cette interaction entre les domaines N-terminaux de p53 et Mdm2 a été décrite structurellement depuis 1996.²⁸⁶ Les structures des autres domaines repliés de ces deux protéines ont également été décrites (**Figure 24**). Le doigt de zinc (aa290-334) lie certaines protéines ribosomales lorsqu'une instabilité ribosomale se présente.²⁸⁷⁻²⁸⁹ Le domaine dimérique C-terminal RING E3-ubiquitine ligase est responsable de l'ubiquitination de p53 (en homodimère ou en hétérodimère avec le domaine RING de MdmX). Récemment, des structures ont été publiées qui détaillent les complexes intégrant le dimère du domaine RING de Mdm2 (ou l'hétérodimères des domaines RING de Mdm2 et de son homologue MdmX) et son E2-ubiquitine ligase.^{290,291}

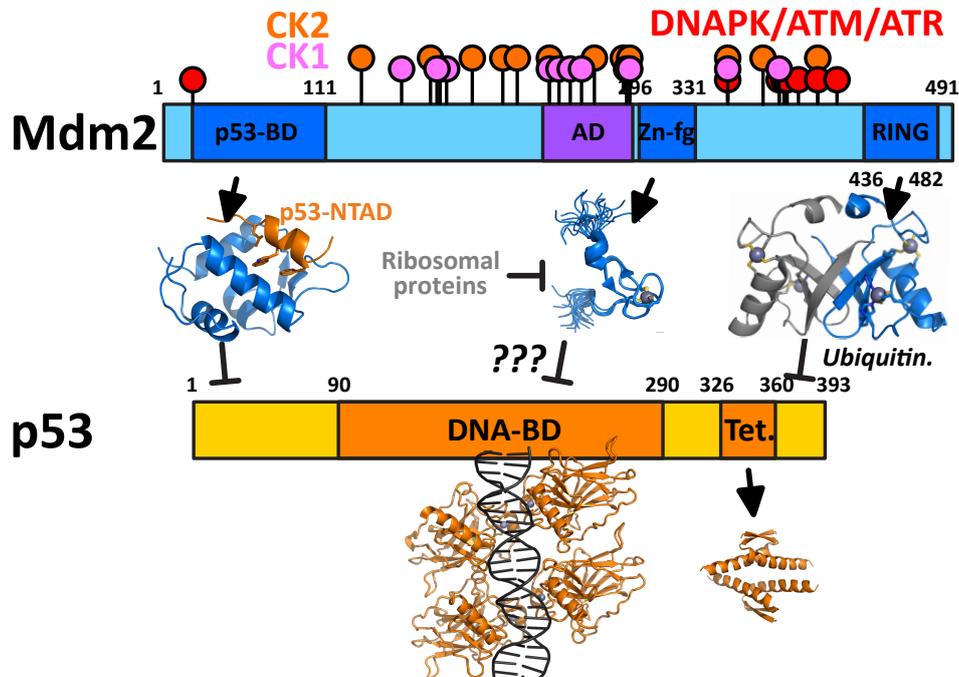


Figure 24 : Structures primaires de Mdm2 et p53, les régions repliées sont en bleu foncé et orange, les régions désordonnées en bleu ciel et jaune; la région en violet de Mdm2 correspond à un segment désordonné très chargé négativement (Asp/Glu). Les structures présentées proviennent de la PDB. Les sites de phosphorylation des kinases CK1, CK2 et DNAPK sont indiqués par des pastilles de couleur. Plusieurs publications ont montré que la région centrale de Mdm2 contenant les segments désordonnés et le ZF inhibe la reconnaissance de l'ADN par le DNA-Binding Domain de p53.

Ces structures laissent cependant de nombreuses questions sans réponses. Nous pouvons en lister quelques-unes, qui pourraient être éclairées par des travaux de biochimie et de biologie structurale.

- Est-ce que l'interaction des deux domaines N-terminaux de p53:Mdm2 est la seule importante et utilisable pour des interventions thérapeutiques ?
- Quelle structure adopte le complexe des protéines entières p53:Mdm2 ?
- Comment les nombreuses modifications post-traductionnelles (PTMs) de p53 ou Mdm2 influencent-elles leurs structures isolées et en complexe, ou l'activité ubiquitine-ligase de Mdm2 ?
- Avec quelles conséquences sur la reconnaissance des gènes cibles de p53 ? ²⁹⁰
- Comment les PTMs influencent-elles les interactions de Mdm2 avec les protéines ribosomales, et comment ces interactions influencent-elles peuvent-elles influencer son activité ? ^{287-289,292-294}

D'autres questions existent sur les activités p53-indépendantes de Mdm2, ou indépendantes de ses capacités d'E3-ubiquitine ligase. ^{280,295}

- Comment Mdm2 ubiquitine-t-elle ses autres cibles ? ²⁹⁶⁻²⁹⁹
- Quels sont les détails structuraux des interactions rapportées entre Mdm2 les mRNAs de p53, RB, MYCN, XIAP, VEGF ou Slug, et comment ces PTMs les influencent-elles ? ³⁰⁰⁻³⁰⁸ Et comment les inhibiteurs de ces interactions fonctionnent-ils ? ³⁰⁹⁻³¹²
- Comment Mdm2 interagit-elle avec des partenaires coactivateurs ou répresseurs sur la chromatine ? ^{297,313-317}

Toutes ces questions nécessitent de prendre en compte les IDRs de Mdm2 et p53. p53 a focalisé la plupart des efforts de la communauté pendant les années 1990-2000-2010, si l'on excepte les recherches de composés liant le domaine p53-BD N-terminal de Mdm2. De nombreuses études ont caractérisé les IDRs de p53, dont les conclusions sont mitigées : de nombreuses PTMs

ont été identifiées comme ayant un rôle important dans la régulation de l'activité ou la stabilité de p53 en cellules, mais leurs conséquences sont moins claires chez l'animal (à part celles affectant l'ubiquitination en C-terminal, bien sûr) ;^{283,318-321} nous pouvons noter que les résultats sur ces PTMs variaient en fonction des lignées cellulaires utilisées, et que de nombreuses expériences menées dans les années 2000 étaient peu adaptées au fait que les niveaux de p53 ou Mdm2 oscillent rapidement dans le temps après les dommages de l'ADN.³²²

Ainsi, travailler sur le « suppresseur de tumeur » était une évidence. Mais Mdm2 a des capacités oncogènes qui en font une cible plus logique dans la recherche d'inhibiteurs.^{280,295} Certaines PTMs des IDR de Mdm2 semblent être les cibles de voies de signalisations qui régulent *in fine* l'activité de p53,^{279,323-329} mais qui ont également des conséquences indépendantes de l'activité de p53. Des contacts intramoléculaires avaient notamment été suggérés entre le domaine acide et le domaine RING, contacts modulés par des phosphorylations qui réguleraient ainsi l'activité de Mdm2 et son interaction avec p53.^{151,323,330-332} Ces contacts avaient été détectés par des expériences de pull-down, mais ils n'ont pas été caractérisés plus précisément.

Il était donc urgent de travailler sur les IDR de Mdm2, et sur des fragments longs intégrant les domaines repliés et les IDR, voire sur la protéine entière. Ces IDR de Mdm2 n'avaient et n'ont toujours quasiment pas été caractérisés dans la littérature.³³³

4.1.6.b. Produire les fragments de Mdm2 et Mdm2 entière, attributions des spectres RMN

Nous avons conçu et produit une longue liste de constructions peptidiques intégrant au fur et à mesure les différents domaines de Mdm2 (**Figure 25**). Nous avons décidé d'utiliser préférentiellement la production recombinante en bactérie pour deux raisons : i) elle permet des marquages isotopiques uniformes pour l'analyse RMN ; ii) elle génère des peptides non modifiés, contrairement à la production recombinante en cellules d'insecte.³³⁴ Nous avons tout de même effectué des tests de production en cellules d'insectes, qui ont montré la faisabilité de cette approche ; elle n'apparaît pas indispensable si l'on considère la balance entre les rendements et une certaine lourdeur de l'utilisation des baculovirus/cellules d'insecte.

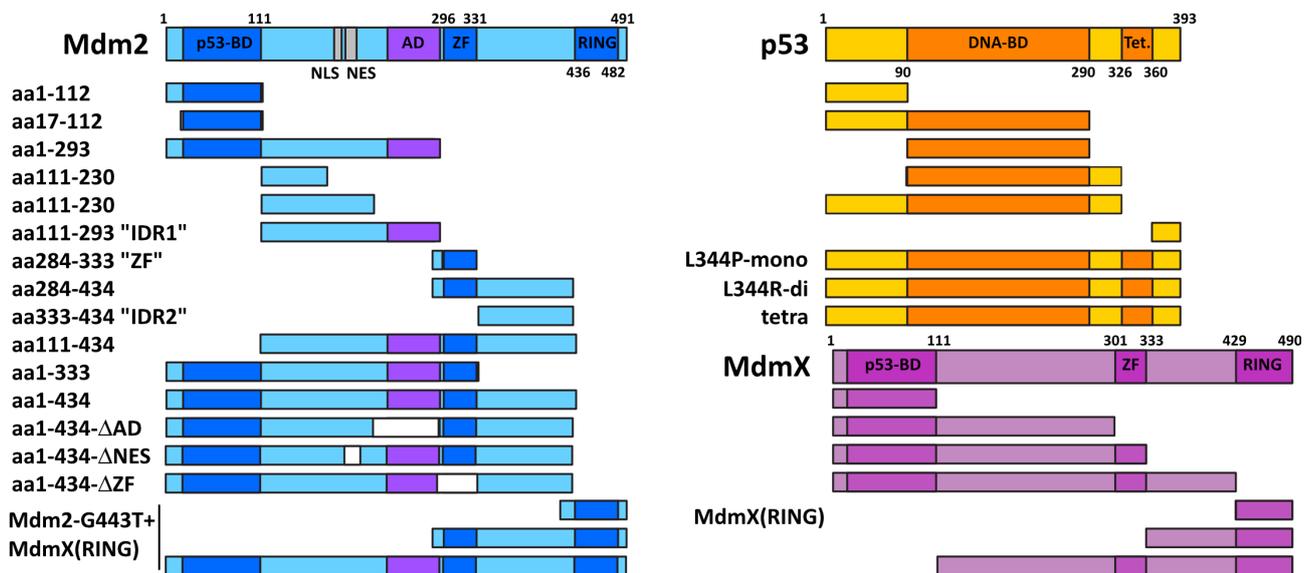


Figure 25 : Constructions peptidiques de Mdm2, p53 et MdmX que nous avons réussi à produire/purifier au laboratoire. Nous avons privilégié la production recombinante en bactérie pour permettre un marquage isotopique à coût abordable. Nous avons également produit des constructions de Mdm2 en cellules d'insecte et en cellules mammifères.

Les constructions peptidiques de Mdm2 sont très sensibles à la protéolyse, notamment car nous devons travailler en absence d'EDTA, un inhibiteur de protéase simple mais utile, pour éviter de déstabiliser le ZF et le RING, et pour éviter les interférences avec le Mg^{2+} nécessaire à l'activité des kinases.

La production des IDRs n'a pas posé beaucoup de problèmes, mais j'ai conçu des constructions contenant des segments tronqués de ces IDRs notamment pour l'attribution des signaux RMN. Cette attribution a permis de confirmer expérimentalement l'absence de repliement stable de ces IDRs (**Figures 26-27-28**). La mutation des cystéines en alanines n'a qu'un faible impact sur le comportement conformationnel (**Figure 26**). Produire et maintenir soluble des IDRs contenant plus d'une ou deux cystéines est très pénible, nous avons donc utilisé les mutants alanine par la suite.

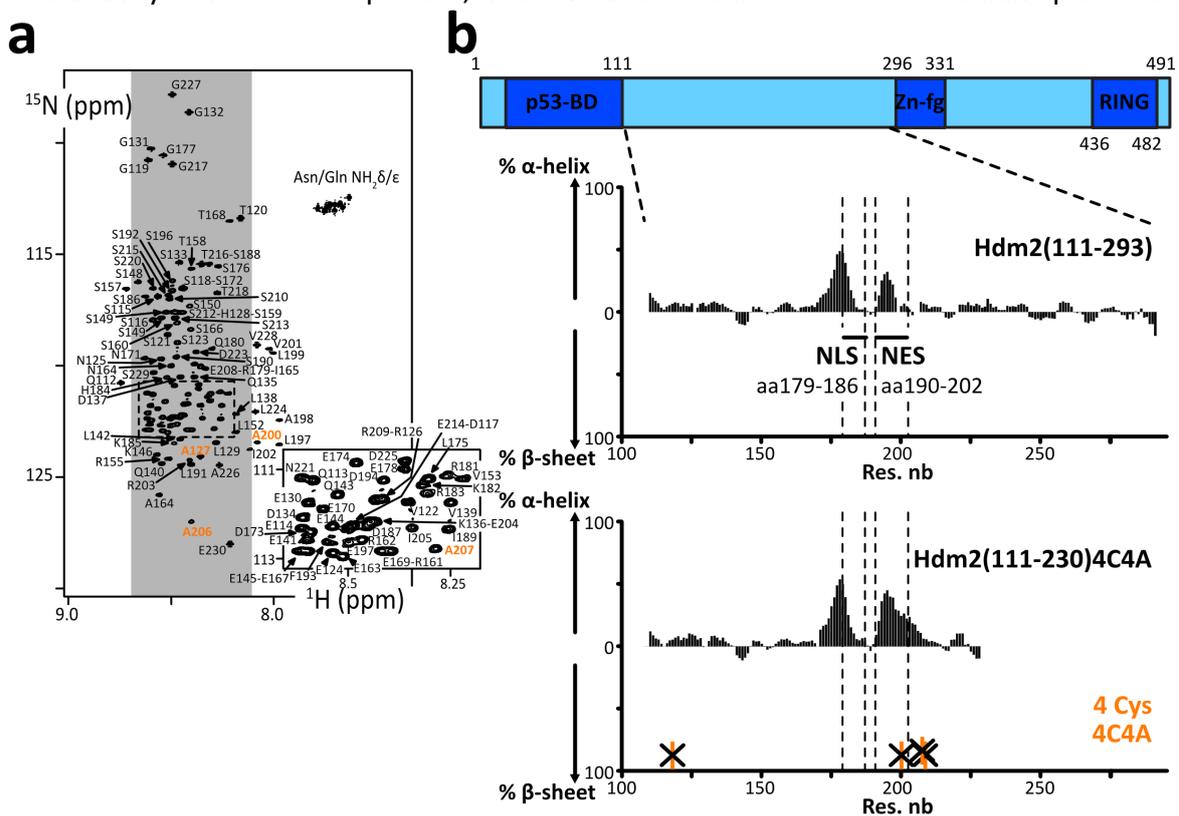


Figure 26 : **a.** Spectre 2D 1H - ^{15}N HSQC à 283K de l'IDR Mdm2(aa111-230) avec l'attribution des signaux ; la zone grisée est celle où se trouvent habituellement les résonances d'acides aminés adoptant un comportement structural random-coil ; **b.** Schéma de la structure primaire de Mdm2 humaine et propensions aux structures secondaires calculées à partir des déplacements chimiques $C\alpha$ et $C\beta$ du squelette peptidique, en utilisant l'algorithme ncSPC.²³⁹ Les tirets orange représentent les positionnements des cystéines.

L'intégration du doigt de zinc (ZF pour zinc-finger) n'a pas eu d'influence sur les déplacements chimiques des deux IDRs, ni sur les intensités des pics correspondants (**Figure 28**). Les intensités du ZF, un petit domaine mais replié, sont plus faibles que celles des IDRs, comme prédit par la théorie de la RMN ; ces intensités du ZF sont encore plus atténuées dans les constructions longues, en comparaison à celles observées sur le ZF seul, ce qui est sans doute simplement lié à un temps de corrélation plus long (Figure 26). De manière intéressante, le ZF a bel et bien deux conformations associées à l'adoption de conformations cis ou trans de 3 prolines, comme cela avait été rapporté par une étude structurale antérieure.³³⁵ On peut noter que les constructions contenant le ZF ont tendance à retenir des acides nucléiques, qui obligent à ajouter une chromatographie échangeuse d'anions ou héparine entre les étapes His-trap et SEC. Ces différentes étapes et constructions ont confirmé le bien-fondé d'une approche de segmentation des fragments IDRs pour leur étude structurale et l'attribution des signaux RMN.

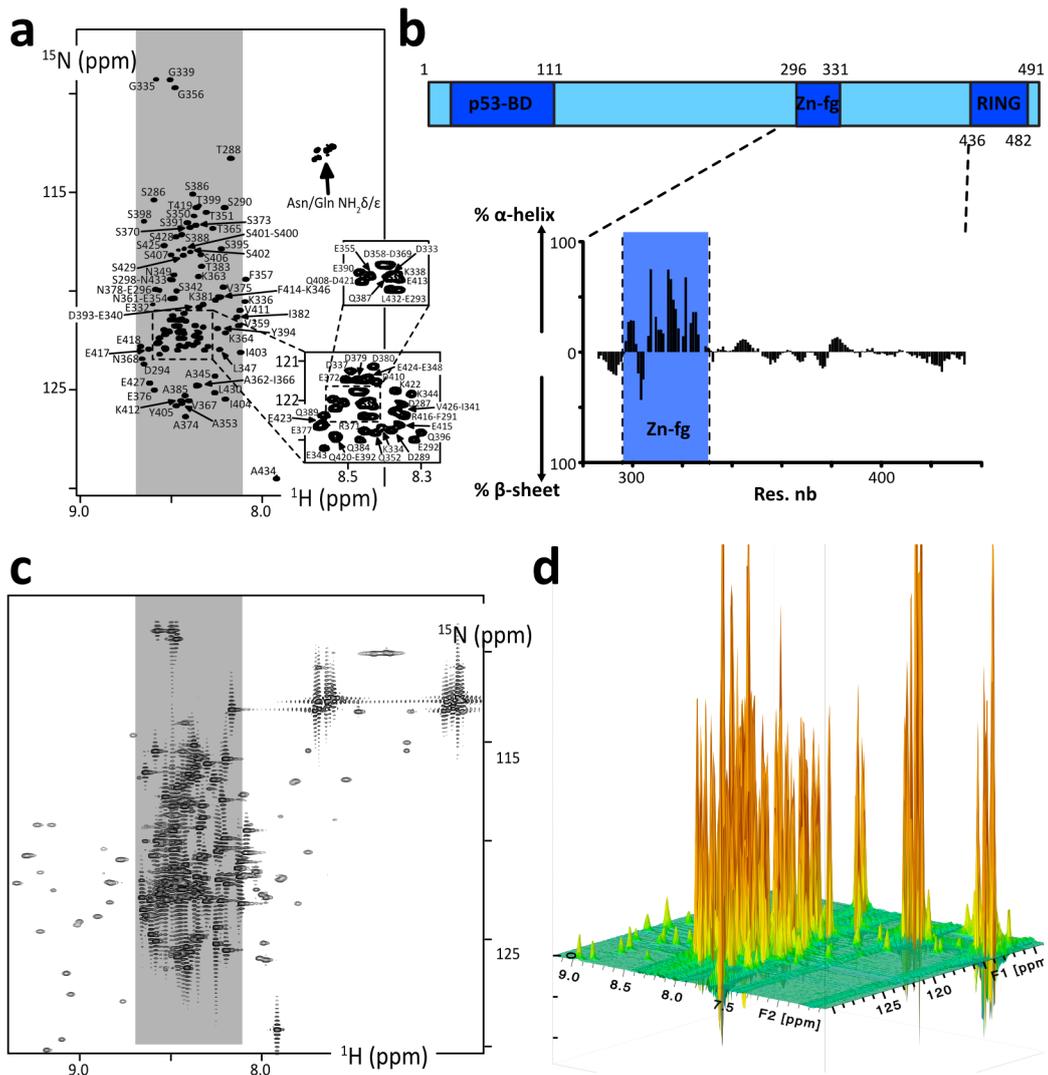


Figure 27 : **a.** Spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC à 283K de Mdm2(aa284-434) avec l'attribution des signaux ; la zone grisée est celle où se trouvent habituellement les résonances d'acides aminés adoptant un comportement structural random coil ; **b.** Schéma de la structure primaire de Mdm2 humaine et propensions aux structures secondaires calculées à partir des déplacements chimiques $\text{C}\alpha$ et $\text{C}\beta$ du squelette peptidique, en utilisant l'algorithme ncSPC.²³⁹ **c.** Même spectre qu'au-dessus, mais à un niveau de contours inférieur, qui permet de visualiser les pics du ZF ; **d.** Vue en 3D isométrique du même spectre.

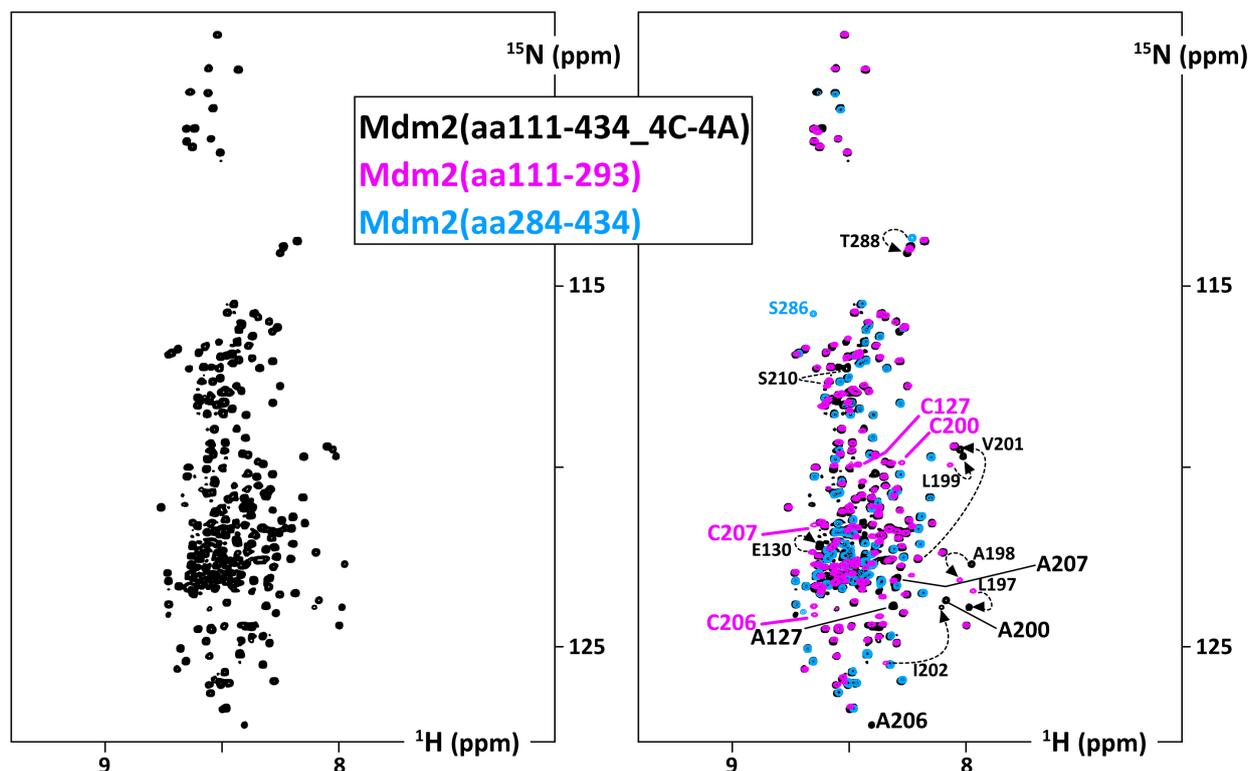


Figure 28 : Gauche. Spectre 2D ^1H - ^{15}N HSQC à 283K de Mdm2(aa111-434_4C-4A) avec l'attribution des signaux ; la zone grisée est celle où se trouvent habituellement les résonances d'acides aminés adoptant un comportement structural random coil ; **Droite.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC à 283K de Mdm2(aa111-434) (noir), Mdm2(aa111-293) (bleu) et Mdm2(aa284-434) (bleu) ; les résidus dont les déplacements chimiques sont affectés par les mutations Cys->Ala et par les troncatures sont indiqués, des flèches montrent les changements de déplacements chimiques.

L'intégration du domaine N-terminal de liaison à p53-Nter, dit p53-BD, a été un peu plus difficile. Ce domaine est très bien connu, il a été utilisé pour des dizaines, peut-être des centaines, d'études sur des inhibiteurs de l'interaction p53:Mdm2. Sa production s'effectue à basse température, ce qui correspond à sa faible stabilité et sa tendance à agréger en l'absence de ligand pour sa poche d'interaction avec p53-Nter. Son intégration au sein de nos constructions peptidiques diminue substantiellement les rendements de production en bactérie, qui s'effectue à 293 K sur la nuit. Les spectres RMN des constructions intégrant le domaine N-terminal p53-BD ne permettent pas d'observer ce domaine : comme pour le ZF, les intensités du p53-BD sont très faibles dans les constructions longues, à tel point qu'elles ne sont pas observables. Une surprise est apparue : les pics de certains acides aminés de l'IDR-aa112-292 ont des intensités plus faibles dans Mdm2(aa1-434) que dans Mdm2(aa112-434) (idem pour aa1-333 vs aa112-333) (**Figure 29**). Cela signifie qu'une interaction faible et transitoire existe entre le p53-BD et l'IDR-aa112-292. Nous avons testé son impact sur l'interaction avec p53 par la suite grâce à des mutants dont certains fragments de l'IDR-aa112-292 avaient été retirés (cf. 4.1.6.f.).

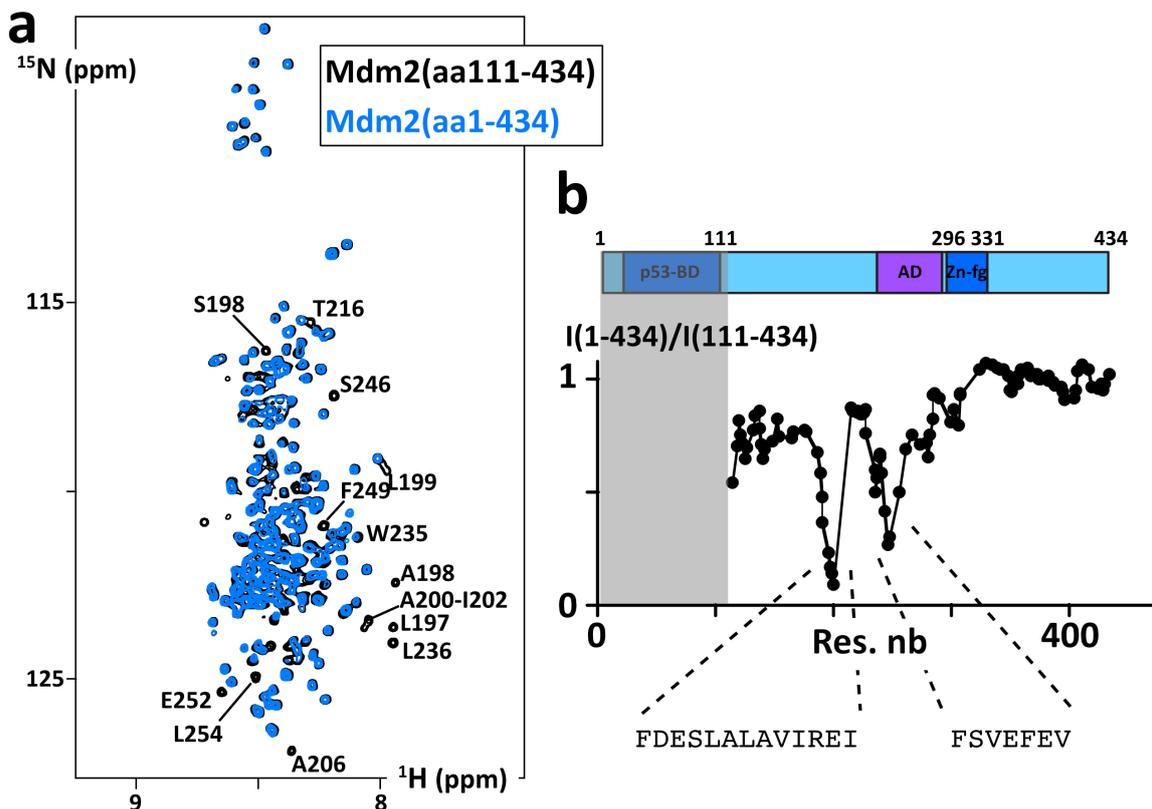


Figure 29 : **a.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC à 283K de Mdm2(aa1-434_4C4A) (bleu) et Mdm2(aa111-434_4C4A) (noir) à 20 μM avec l'attribution des signaux dont les intensités sont les plus affectées ; **b.** Schéma de Mdm2(aa1-434_4C4A) et rapport d'intensités des signaux ^1H - ^{15}N HSQC dans la construction Mdm2(aa1-434_4C4A) par rapport à la construction Mdm2(aa111-434_4C4A) ; les motifs peptidiques concernés sont mentionnés en dessous : aa194-206=FDESLALAVIREI (correspond au NES) et aa246-252=FSVEFEV.

L'intégration du domaine RING dans nos constructions a requis plusieurs années de travail. Une structure RMN avait été publiée de l'homodimère de Mdm2-RING humain en 2006,³³⁶ et une structure cristallographique de l'hétérodimère Mdm2-RING:MdmX-RING en 2008.³³⁷ Les rendements de production étaient faibles, l'homodimère avait été purifié depuis la fraction non-soluble de l'extrait bactérien, produisant ~ 1 mg/L de culture selon ses auteurs. Nous avons essayé de reproduire le protocole correspondant, sans grand succès. J'ai discuté en 2016 avec P.E. Wright, l'auteur correspondant de la structure RMN, qui m'avait simplement confirmé la difficulté sans plus de souvenirs concrets. Dans une publication de 2017 rapportant une structure de l'homodimère de RING-Mdm2 (en complexe avec son E2-ubiquitine ligase), d'autres auteurs confiaient avoir utilisé 36 L de culture pour la production recombinante bactérienne.²⁹⁰ Le domaine RING se replie en dimère autour de quatre ions Zn^{2+} qu'il chélate par 6 cystéines et 2 histidines. Il n'est pas très stable et agrège progressivement *in vitro*. Nous avons conçu de nombreuses constructions peptidiques intégrant le domaine RING humain, dans plusieurs souches bactériennes (BL21-DE3star avec et sans surexpression de DnaK-DnaJ ou GroEL-GroES, bactéries Vmax, Vmax2³³⁸, SoluBL21, à 310-303-298-293-288K) (cf. <https://www1.biocat.com/products/CL1300-05-GVO-SGI>, et <https://www1.biocat.com/products/C700200-GL>). Rien n'a vraiment aidé. Pour toutes les constructions intégrant l'IDR-aa333-429 ou plus, nous avons obtenu des quantités raisonnables de protéine soluble, mais qui éluaient à $\sim 99\%$ dans le volume mort des colonnes SEC Superdex200. Les spectres RMN enregistrés montraient un massif de signaux larges et indéfinis. Ces échantillons correspondaient donc vraisemblablement à des agrégats solubles, issus de la solubilisation de domaines RING mal repliés par les IDRs. Les tentatives de dénaturation en urée suivie de renaturation par dialyse n'ont pas été concluantes. Je

ne voulais pas travailler avec des échantillons aussi peu sûrs. Je note que les études biochimiques sur Mdm2 entière produite en bactérie dans la littérature ne procèdent pas à cette étape de SEC avant les analyses fonctionnelles.^{306,308}

Une étude récente a montré que l'intégration d'une mutation G443T (présente chez *Xenopus tropicalis*) diminue considérablement l'agrégation de Mdm2-RING, sans affecter ses capacités de E3-ubiquitine ligase; cette mutation permet une multiplication par ~10 des rendements de production.³³⁹ Nous avons intégré cette mutation dans des constructions TrxA-Mdm2 (pET32) ou GST-Mdm2 (pET41), seules les constructions GST-Mdm2 ont fourni des résultats satisfaisants en BL21-DE3star à faible température. Pour autant, les rendements étaient faibles en LB, et inexistantes en milieu minimum M9. Nous avons ensuite utilisé une souche commerciale dérivée de BL21-DE3star, i.e. Arctic-Express-(DE3) qui permet l'expression de deux chaperones Cpn10 and Cpn60 de *Oleispira antarctica*, une bactérie psychrophile, qui sont homologues à GroEL/GroES mais maintiennent leur activité en dessous de 293K.³⁴⁰ Nous utilisons ces bactéries pour la production à 288 K sur le week-end. Nous avons enfin co-transfecté les plasmides codant pour Mdm2 avec un plasmide codant pour MdmX-RING (soit MdmX-aa334-490, soit MdmX-aa425-490 pour Mdm2-FL). Les rendements sont désormais satisfaisants pour les constructions Mdm2(aa417-491), Mdm2(aa333-491), et plus faibles mais acceptables pour Mdm2(aa1-491). Toutes ces constructions subissent des chromatographies HisTrap, échangeuse d'anions et SEC, et sortent de la SEC après le volume mort. Les volumes d'élu-tion correspondent par contre à ceux de protéines repliées bien plus grosses (équivalent à des poids moléculaires ~3-4 fois supérieurs), ce qui est cohérent avec le contenu en IDRs de Mdm2.

Ces efforts pour produire la forme entière de Mdm2 me semblaient nécessaires pour donner tout leur sens aux expériences effectuées avec les constructions plus courtes. J'espère valoriser ce travail au plus vite. L'angle de valorisation le plus immédiat semble être la comparaison des affinités des différentes constructions Mdm2:p53 et phospho-Mdm2:p53, telles que mesurées par ITC, avec des compléments de RMN. La caractérisation structurale plus fine de Mdm2 entière, seule ou en complexe avec p53 entière, demandera au moins une analyse en SAXS et des expériences de RMN supplémentaires (FRET et RPE seraient appréciables,³⁴¹ mais seront-ils faisables dans des délais acceptables ?). Une caractérisation de l'impact de Mdm2 et de ses phosphorylations sur la reconnaissance des séquences d'ADN par p53 serait aussi intéressante.

4.1.6.c. Les phosphorylations de Mdm2 : le contexte

Dès sa découverte en 1992 comme partenaire et régulateur de p53, Mdm2 avait été détectée en tant que protéine fortement phosphorylée.³⁴² (L'analyse SDS-PAGE la montrait d'ailleurs migrant comme une protéine de 90 kDa, alors qu'elle ne fait que 55 kDa ; nous savons depuis que cela est relativement indépendant de ses phosphorylations, les forts biais de composition en acides aminés rendent sa migration lente avec beaucoup d'acides aminés chargés négativement et peu d'hydrophobes pour fixer le SDS.) A la fin des années 1990 et dans les années 2000, des études ont progressivement montré que Mdm2 était nativement poly-phosphorylée en absence de stress, les sites correspondant se situant notamment dans la région acide (~aa230-290).^{330,343,344} Après irradiation γ , ces phosphorylations disparaissaient et d'autres phosphorylations sur l'IDR2(aa333-423) apparaissaient. Ces dernières étaient établies notamment sur des sites Ser/Thr-Gln nombreux sur cette IDR2, qui correspondent aux sites consensus des kinases de signalisation de dommages de l'ADN ATM/ATR/DNA-PK. Un troisième cluster de phosphorylations existe autour des sites de signal d'export et d'import nucléaires (NES et NLS), qui sont régulées notamment par la kinase Akt.

Si le mécanisme de régulation d'import/export au noyau par les intégrines et leur inhibition/activation par des phosphorylations peut être aisément compris, le rôle et le fonctionnement des autres clusters de phosphorylation est moins clair. Les phosphorylations du domaine acide ne sont pas nécessaires pour l'ubiquitination de p53 mais le sont pour sa dégradation,^{330,343,345} et elles

augmentent l'affinité de Mdm2 pour p53.³⁴⁶ Des études ont rapportées que les phosphorylations sur l'IDR2 augmentent l'activité ubiquitine-ligase de Mdm2 sur elle-même, mais la diminue sur p53,^{291,326} il a notamment été montré que S394-murine (S395-humaine) était nécessaire (mais pas suffisante) à la stabilisation de p53 en souris,^{325,326} tandis que phospho-S429 accélère un peu l'auto-ubiquitination de Mdm2 *in vitro*, et augmente un peu le niveau de p53 en cellule.²⁹¹ Toutes ces phosphorylations ont en effet un impact sur l'activité ubiquitine-ligase de Mdm2 sur p53 et sur elle-même.³⁴⁴ (Une exception : la sérine 17, possiblement phosphorylée par ATM/ATR/DNA-PK, semble n'avoir pas de conséquences sur la reconnaissance de p53³⁴⁷).

Plusieurs kinases semblent participer à la poly-phosphorylation du cluster du domaine acide de Mdm2, dont les kinases constitutivement actives CK1, CK2 et GSK-3 β , mais aussi Plk1.^{345,348-350} GSK-3 β peut être inactivée par Akt, elle-même activée par DNA-PK en présence de dommages à l'ADN. Cela donnerait un début d'explication pour la perte de phosphorylation en cas de dommages de l'ADN, mais quelles sont les conséquences sur les autres kinases, et quelle phosphatase(s) sont nécessaires pour déphosphoryler le domaine acide ? Du côté de l'IDR2, les kinases ATM/ATR/DNA-PK sont naturellement celles qui phosphorylent Mdm2 lorsqu'elles sont activées par des dommages de l'ADN, et il est admis que Wip1 est la phosphatase qui permet le retour à l'équilibre, et la déphosphorylation de Mdm2. Mais la question de savoir quels sont les phosphosites les plus importants et comment ils régulent l'activité ubiquitine-ligase de Mdm2 n'est pas élucidée.

Cependant, les phénotypes observés en souris mutée sur la Ser294 étaient importants, au contraire de ce qui avait été vu pour les nombreux mutants non-phosphorylables de p53. Les études correspondantes du début des années 2010 m'avaient amené à penser qu'il vaudrait mieux étudier les phosphorylations de Mdm2 pour comprendre la régulation du réseau p53/Mdm2, ce que j'ai donc proposé.

Les études sur la phosphorylation de Mdm2 ont été finalement peu nombreuses dans les années 2010. Des schémas ont été proposés, à partir d'expériences de biologie cellulaire et de pull-downs. Les phosphorylations de l'IDR2 par ATM/ATR/DNA-PK défavoriseraient la dimérisation du domaine RING,^{331,351} et défavoriseraient les contacts activateurs entre le domaine acide et le domaine RING,³³² ce qui rendraient Mdm2 active. Quelles sont les schémas de phosphorylation exact avant et après dommages de l'ADN ? Sont-ils les mêmes en fonction du type de cellules et du type de stress ? Quelles kinases modifient quels sites exactement ? Quelles sont les conséquences structurales intra- et intermoléculaires des différents schémas de phosphorylation ? Pourraient-ils expliquer les changements d'activité de Mdm2 ?

4.1.6.d. Les phosphorylations de Mdm2 : notre travail

Ces questions étaient en suspens en 2015 et le restent aujourd'hui. Nous avons entrepris d'étudier Mdm2 dans ses formes phosphorylées seule et en interaction avec p53. La littérature ne donne pas une description exacte des états de phosphorylation de Mdm2, car les sites sont nombreux et proches les uns des autres, si bien qu'ils sont difficiles à caractériser en western-blots ou en spectrométrie de masse, encore plus en termes de stœchiométries. Cependant, les régions de phosphorylation sont connues, et il semble qu'un basculement de phosphorylation s'effectue depuis le domaine acide AD, en absence de stress, vers l'IDR2, en présence de dommages de l'ADN. Nous avons choisi de produire ces deux situations, certainement caricaturales, comme modèles d'étude : Mdm2-phosphoAD (phospho-acid domain) pour Mdm2 en absence de stress et Mdm2-phosphoIDR2, pour Mdm2 en présence de dommages de l'ADN.

Pour produire Mdm2-phosphoAD, nous avons utilisé CK1 δ , que nous exprimons et purifions au laboratoire. Pour produire Mdm2-phosphoIDR2, nous avons utilisé DNA-PK commercial (très onéreuse) ou des extraits cellulaires de cellules HeLa soniqués qui présentent une haute activité ATM/ATR/DNA-PK. Nous savions que CK1 δ (qui a un site le même site consensus que CK1 α et CK1 ϵ)

ne phosphorylerait peut-être pas tous les phosphosites natifs de Mdm2 : CK2 et GSK-3 β permettent certainement quelques phosphorylations supplémentaires. Mais CK1 δ était disponible et capable de produire un mime intéressant de Mdm2-phosphoAD, au moins en termes d'électrostatique.

Chronologiquement, nous avons commencé à travailler sur la phosphorylation de l'IDR2. Nous avons utilisé notamment la constructions Mdm2(aa284-434) qui se produisait bien et n'était pas trop instable. Nous avons commencé par étudier sa phosphorylation par DNA-PK commerciale, puis par des extraits nucléaires activés pour l'activité ATM/ATR/DNA-PK par sonication. Cette étude a été un peu ralentie par le fait que DNA-PK requiert un motif de cassure d'ADN pour être active, que nous fournissons avec de l'ADN de thymus de veau le plus souvent; or nous avons compris, après quelques péripéties, que notre construction Mdm2(aa284-434) interagit avec l'ADN, diminuant ainsi l'activation de DNA-PK. Nos mesures de cinétiques à différentes concentrations de Mdm2 pour déterminer un Km ont été maintes fois surprenantes. Le prochain problème était le suivi de réaction par RMN, qui ne permettait pas de bien suivre et normaliser les intensités de tous les phospho-pics dans les spectres 2D ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC. Nous avons alors appliqué une méthode complémentaire que nous développons pour la détection ^{13}C -directe de la corrélation ^{13}Ca - ^{13}CO (cf. chapitre 4.1.3.). La complémentarité de ces deux méthodes RMN nous a permis de déterminer les sites de phosphorylation par ATM/ATR/DNA-PK de Mdm2 (**Figure 30**) et leurs vitesses respectives (**Figure 31**). Nous avons révélé quatre nouveaux sites de phosphorylation ATM/ATR/DNA-PK, dont certains ne correspondent pas au site consensus Ser/Thr-Gln de ces kinases. Des expériences menées sur d'autres peptides au laboratoire tendent à montrer que cela n'est pas si rare. Le site Ser395, dont la littérature a montré l'importance pour la régulation de l'activité de Mdm2, n'est que le 5^e par ordre de vitesse (**Figure 31**). L'équivalent Ser394 chez la souris n'est pas lui non-plus le phosphosite préférentiel. Si ce site est vraiment le site fonctionnel régulation l'activité de mdm2, nous aurions là un exemple de « tampon de phosphorylation » : plusieurs sites non fonctionnels servent à ralentir la phosphorylation régulatrice de sorte qu'une activité de signalisation kinase robuste et prolongée soit nécessaire pour avoir des conséquences.

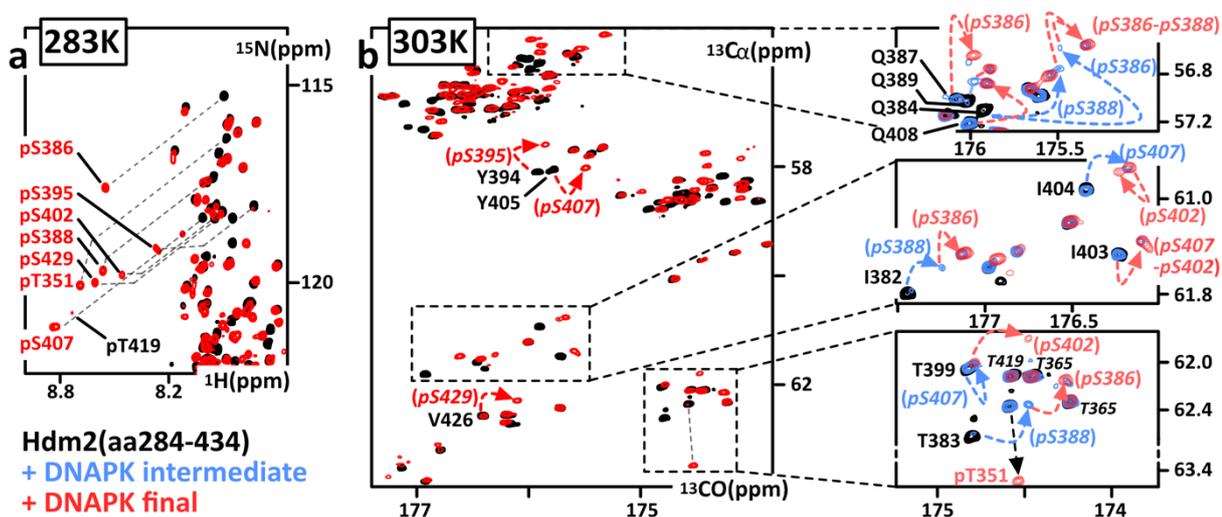


Figure 30 : Phosphorylation de Mdm2(aa284–434) par DNA-PK observée par RMN. **a**) Superposition de spectres 2D HSQC ^1H - ^{15}N à 283 K avant (noir) et après (rouge) la phosphorylation. **b**) Superposition de spectres 2D (^1H -flip*) ^{13}Ca ^{13}CO -LB à 303 K avant (noir), au cours (bleu clair), and à la fin (rouge) de la réaction de phosphorylation. **A droite** : vues élargies des régions spectrales des Gln, Ile, and Thr. Les flèches indiquent les déplacements de pics dues aux phosphorylations de 2 acides aminés voisins : certains ensembles de pics sont des reporters des 4 états de phosphorylation Q384(S386–Ser388)/Q384(pS386–S388)/Q384(S386–pS388)/Q384(pS386–pS388); à l'inverse, I382(pS388) and T383(pS388) rapportent l'apparition de Mdm2(S386–pS388), tandis que I382(pS386) et Thr383(pS386) rapportent la présence de Mdm2(pS386–Ser388) + Mdm2(pS386–pS388). pS = phosphosérine.

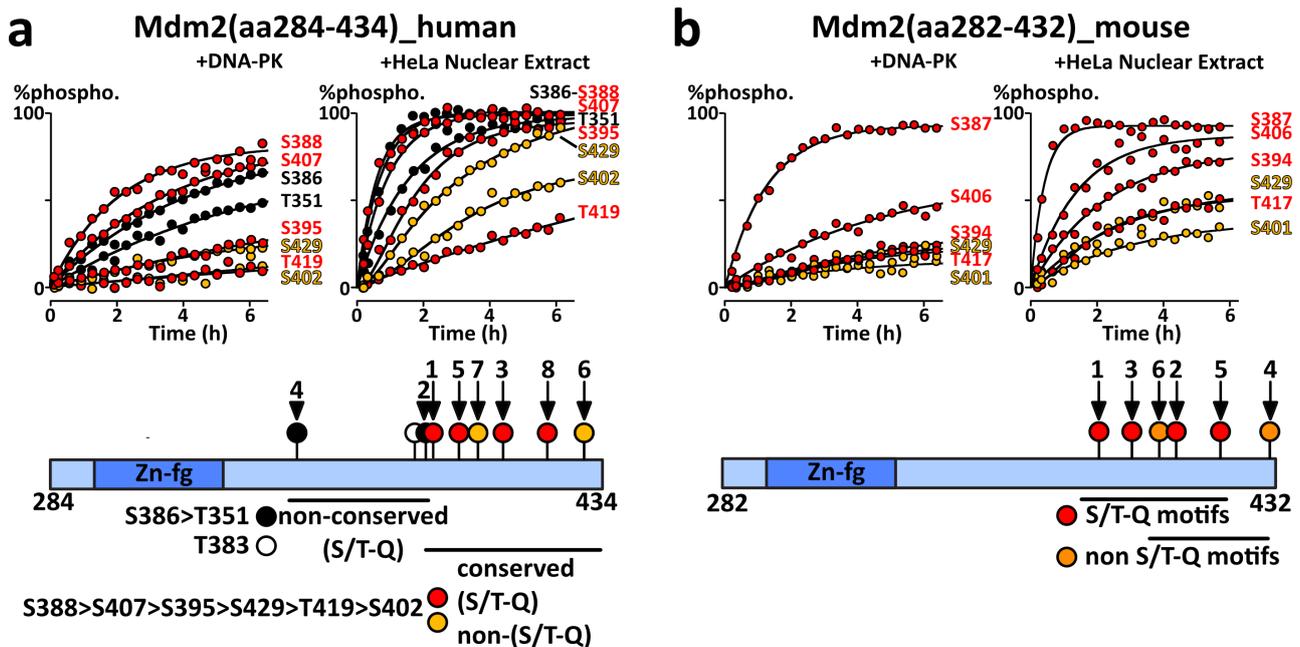


Figure 31 : Cinétiques de phosphorylation telles qu'observées par RMN de **a.** Mdm2(aa284–434)_humaine et **b.** Mdm2(aa282-432)_souris par DNA-PK et un extrait nucléaire de cellules HeLa observée par RMN. **En bas** : schémas de structure primaires des constructions, et du placement des sites de phosphorylation ; le site S395humain/S394souris est le 5^e et le 3^e plus rapidement phosphorylé.

L'étude sur la phosphorylation par CK1 δ est un peu moins aboutie. Je n'ai pas eu le temps d'attribuer les signaux RMN des spectres phosphorylés. Il semble y avoir une dizaine de phosphosites, proches les uns des autres et dont les déplacements chimiques évoluent de manière corrélées et compliquées car ces phosphorylations ne sont pas purement séquentielles. Nous savons en tout cas qu'une dizaine de site est phosphorylable, et que ces sites se trouvent sur le segment aa200-290 (nous avons effectué les mêmes expériences sur des constructions plus courtes, où nous retrouvons les mêmes phosphopics ou pas en fonction des fragments) le protocole est établi et reproductible, pour obtenir rapidement 5-6 phosphorylations à 100% et 4-5 autres à 50-80%. L'expérience n'est pas facile, car Mdm2-phosphoAD devient très sensible à la protéolyse. De plus, la purification post-phosphorylation nécessite deux étapes, car CK1 δ reste attachée à Mdm2-phosphoAD au cours des chromatographies d'exclusion de taille ; nous effectuons donc une chromatographie échangeuse d'anions pour les séparer auparavant. Cette interaction avec CK1 δ est facilement observable en RMN (**Figure 32b**). Il est intéressant de constater que les résidus engagés dans l'interaction avec CK1d ne sont pas les mêmes qu'avec RPL11, qui semble interagir avec les acides aminés de Mdm2 autour des résidus 220 et 270 (**Figure 32c**).

Les protocoles de phosphorylation pour obtenir les deux versions Mdm2_phosphoAD et Mdm2_phosphoADR2 sont donc assez fastidieux : après phosphorylation et re-purification, on n'obtient souvent qu'un tiers de la protéine engagée dans la modification.

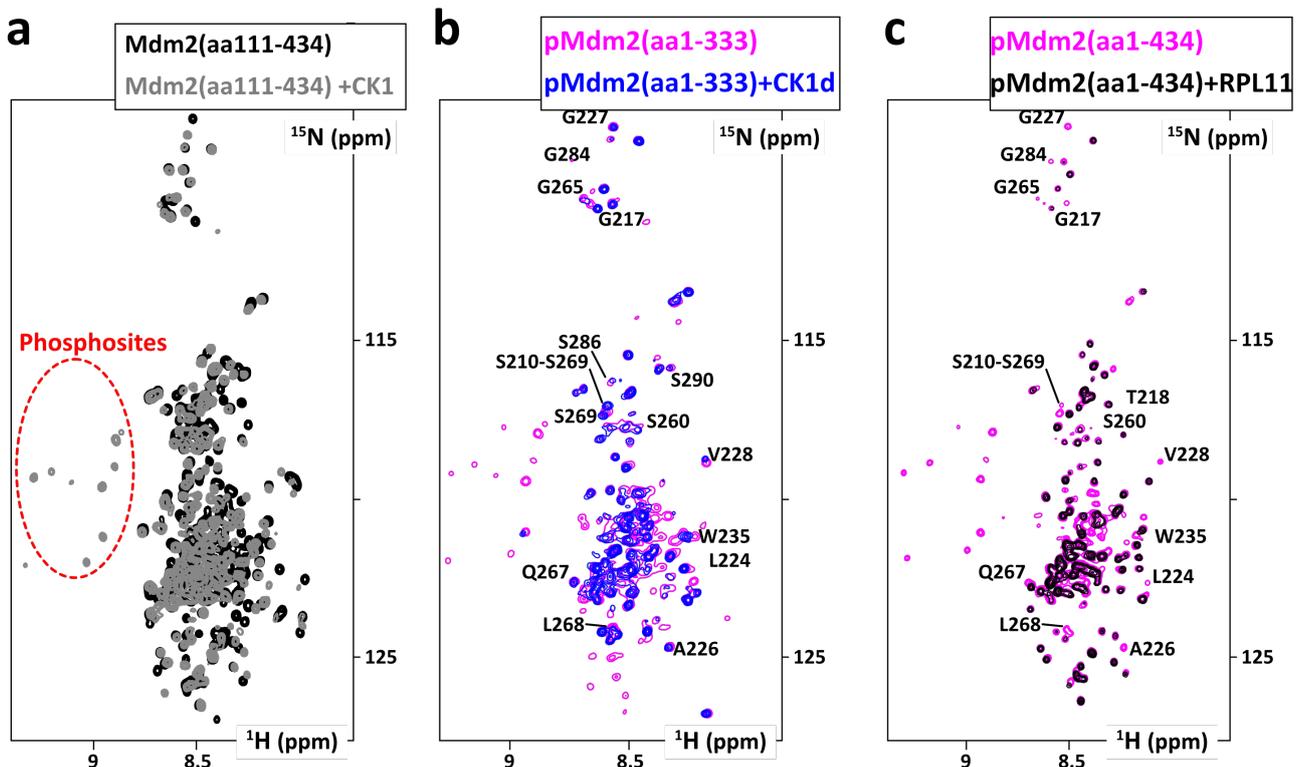


Figure 32 : **a.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 283K en PBS, pH7.2, à 20 μM) de Mdm2(aa111-434) avant (noir) et après phosphorylation par CK1 δ (Mdm2 repurifié après phosphorylation); **b.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 283K en PBS, pH7.2, à 20 μM) de Mdm2(aa111-333) phosphorylée par CK1 δ et repurifiée, seule (rose), et mise en présence de CK1 δ à 20 μM (bleu) sans ATP:Mg $^{2+}$; **c.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 283K en PBS, pH7.2, à 20 μM) de Mdm2(aa111-333) phosphorylée par CK1 δ et repurifiée, seule (rose), et mise en présence de RPL11 à 20 μM .

4.1.6.e. L'interaction Mdm2:RPL11, phosphoMdm2:RPL11

De nombreuses protéines ribosomales ont été décrites comment interagissant avec Mdm2, notamment son domaine IDR acide.²⁸⁷⁻²⁸⁹ Parmi ces interactions, celle entre RPL11 a été particulièrement scrutée.^{287-289,292-294,352} RPL11 est normalement intégrée dans la particule ribonucléoprotéique 5S-RNP (RPL5:RPL11:5S-rRNA), assemblage intermédiaire de la sous-unité ribosomique 50S, particulièrement sensible au stress ribosomal. Elle a été très tôt décrite comme capable d'inhiber l'activité d'ubiquitine-ligase de Mdm2 sur p53.

Nous avons donc proposé dans le projet d'ANR sur Mdm2 de caractériser cette interaction RPL11-Mdm2 ou RPL5-RPL11-Mdm2. Une équipe chinoise a cependant publié la structure cristallographique du complexe RPL11:Mdm2 mi-2015 (**Figure 33**).²⁹³ Cette structure montrait que le ZF central de Mdm2 s'insérait dans la partie concave de RPL11 qui accepte le 28S-rRNA dans le ribosome; le ZF de Mdm2 et le 28S-rRNA avait d'ailleurs des affinités similaires pour RPL11 (~1 μM). Cette étude n'a cependant pas permis de comprendre comment cette interaction inhibe Mdm2. RPL11 seule n'a pas cette capacité *in vitro*, ce qui laisse penser que le 5S-RNP entier serait peut-être nécessaire.^{293,294} L'engagement du ZF de Mdm2 dans ces interactions ne donne en tout cas pas la clé de compréhension pour la perte d'efficacité du domaine RING de Mdm2 envers p53.

Nous avons donc pensé utiliser nos constructions allongées de Mdm2 pour comprendre comment la liaison à RPL11 ou RPL5-RPL11 pourrait affecter l'activité du domaine RING. J'ai conçu des constructions RPL5, RPL11 et une chimère RPL5-RPL11; nous n'avons réussi à produire correctement que RPL11 dans de bonnes quantités. Cette protéine agrège à la décongélation, ce qui impose de la purifier peu de temps avant les expériences d'interaction. L'analyse par RMN montre que

l'interaction entre RPL11 et Mdm2 ne se limite pas au ZF, mais que l'IDR le précédent est également impliqué (**Figure 33**).

Nous voulions comparer les affinités de RPL11 pour Mdm2(aa293-333) et Mdm2(aa1-434) ou Mdm2(aa1-333). Nous avons effectué des titrations ITC, qui se sont révélées difficiles à mener : dans nos conditions, nous avons souvent observé la présence d'agrégats dans la cuve à la fin de la titration, qui se manifestent par une discontinuité et du bruit dans le signal mesuré après avoir franchi la stœchiométrie 1:1. Ces titrations ne peuvent s'effectuer qu'avec RPL11 dans la cuve ; les titrations avec Mdm2 dans la cuve génèrent des agrégats systématiquement. Les seules courbes d'aspect correct que nous avons obtenues entre RPL11 et Mdm2(aa293-333) ont l'air peu reproductibles : $K_d \sim 140$ nM pour RPL11 ~ 20 μ M dans la cuve, $K_d \sim 18$ nM pour RPL11 ~ 10 μ M (**Figure 34**); ceci pourrait être dû à l'agrégation à stœchiométrie 1:1 évoquée plus haut. L'ITC est une technique qui produit facilement de faux résultats donnant tous les atours d'une titration... Nous pourrions tenter d'effectuer ces titrations ITC en homogénéisant à plus faible vitesse. Devant la difficulté de ces expériences, nous avons décidé de réussir d'abord celles concernant Mdm2 et p53.

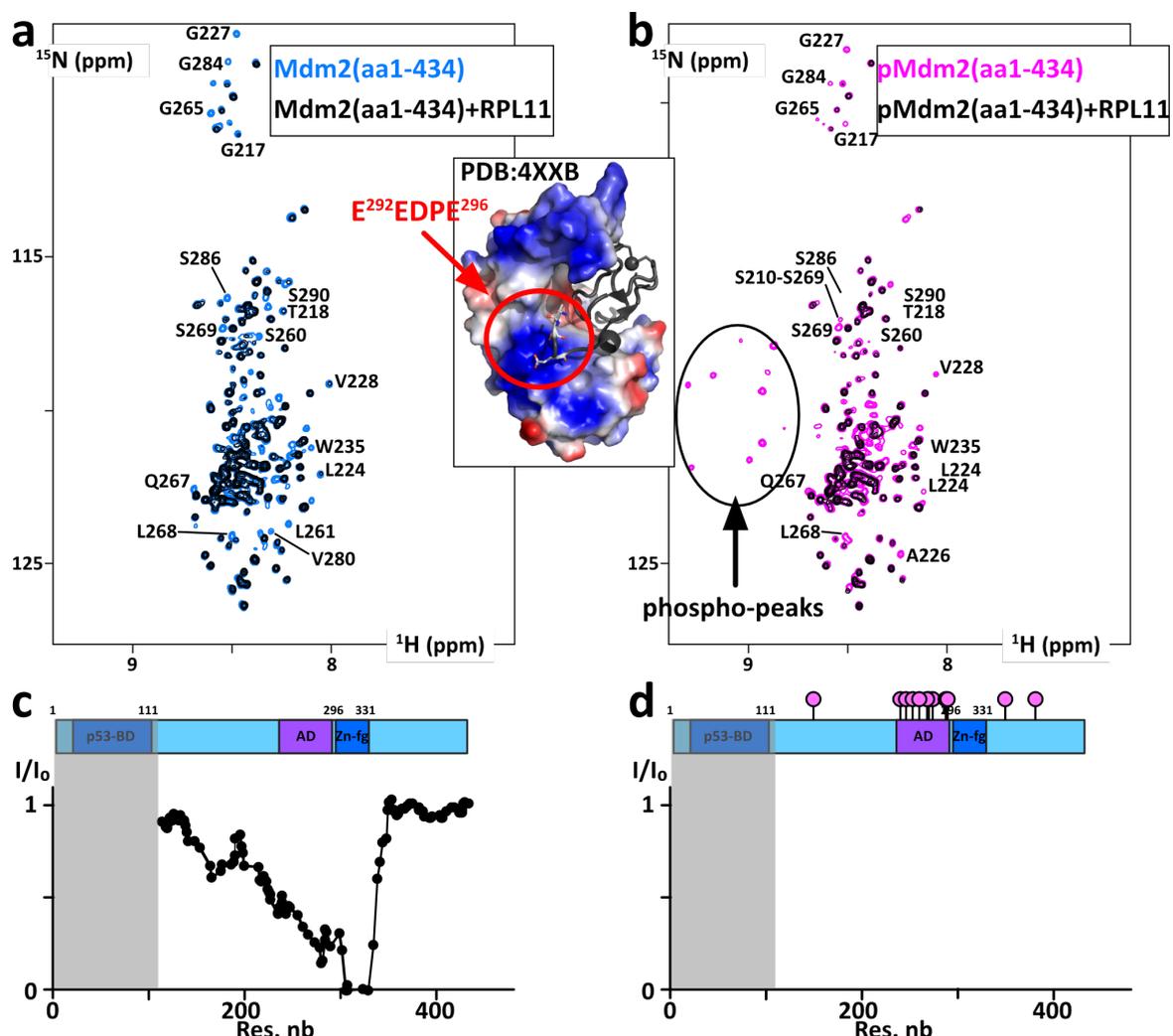


Figure 33 : **a.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 283K en PBS, pH7.2, à 20 μ M) de ^{15}N -Mdm2(aa1-434) seule (bleu) et en présence de ^{14}N -RPL11 à 20 μ M (noir) ; **b.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 283K en PBS, pH7.2, à 20 μ M) de ^{15}N -Mdm2(aa1-434)-phosphoAD seule (rose) et en présence de ^{14}N -RPL11 à 20 μ M (noir) ; **c.** Ratio d'intensités des signaux RMN en fonction des résidus ; les pics du domaine N-terminal p53-BD ne sont pas observables à cette concentration dans cette construction.

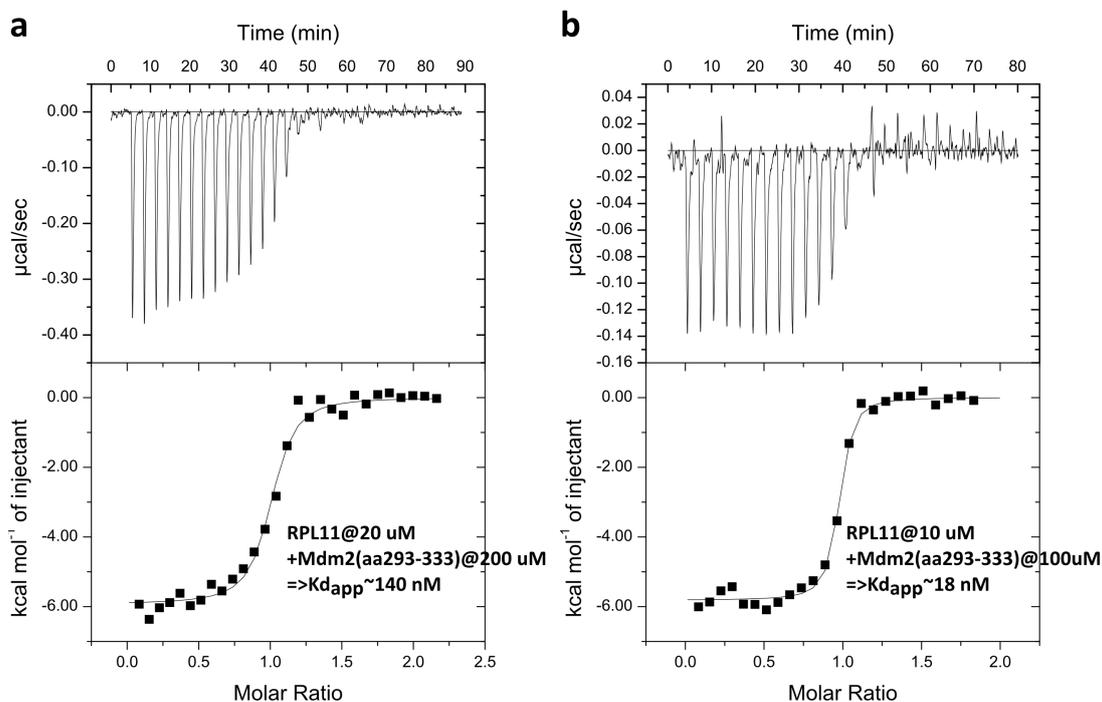


Figure 34 : Courbes de titration par calorimétrie isotherme de RPL11 par Mdm2(aa293-333). Des agrégats se forment dans la cuve en présence d'agitation aux alentours de la stœchiométrie 1 :1, qui peuvent produire des courbes visuellement satisfaisantes, mais dont l'analyse montre qu'elles correspondent à des résultats très peu reproductibles.

4.1.6.f. Produire les fragments de p53 et p53 entière

La protéine p53 a fait l'objet de très nombreuses études structurales, qui ont permis de décrire et comprendre la reconnaissance de l'ADN par son domaine central DNA-BD (plusieurs dizaines de structures cristallographiques et RMN depuis 1994),³⁵³⁻³⁵⁸ sa tétramérisation opérée grâce à un petit domaine vers le C-terminal, et le comportement structural désordonné de domaine N-terminal et C-terminal. Les interactions avec de multiples partenaires ont également été décrites, dont l'interaction entre les deux domaines N-terminaux de Mdm2 et p53 évoquée plus haut. Des interactions intramoléculaires entre l'IDR N-terminal et le DNA-BD ont été révélées récemment.³⁵⁹⁻³⁶¹ Toutes ces études sont un peu handicapées par la faible stabilité du DNA-BD sauvage.³⁶² Des mutations stabilisatrices ont été introduites par différents groupes.³⁶³⁻³⁶⁶ Nous avons combiné certaines de ces mutations, d'acides aminés non-accessibles au solvant, pour obtenir un DNA-BD très stable ($T_m \sim 55^\circ\text{C}$ par rapport à $\sim 42^\circ\text{C}$ pour le WT). Ceci nous a permis d'avoir de très bons rendements de production pour toutes nos constructions, et de pouvoir travailler sereinement sans agrégation, tout en préservant les surfaces d'interaction avec l'ADN ou avec Mdm2 que nous voulions étudier. Nous avons obtenu une structure cristallographique de ce DNA-BD stabilisé qui montre son bon repliement et l'absence de changements structuraux par rapport à la version sauvage. Nous avons également utilisé des résultats de la littérature antérieure pour concevoir des mutants monomériques (L344P) et dimériques (L344R).³⁶⁷

Nous avons conçu notamment des constructions peptidiques intégrant l'IDR N-terminale, et/ou le DNA-BD, et/ou le C-terminal. Ces constructions nous servent à caractériser les interactions avec Mdm2 phosphorylée ou non. Nous menons cette étude en utilisant principalement la RMN et l'ITC de manière complémentaire. La RMN nous sert à détecter les zones d'interaction et à cartographier/quantifier les phosphorylations, et l'ITC à mesurer l'impact de la présence des différents fragments et des phosphorylations sur l'affinité entre les partenaires.

4.1.6.g. L'interaction Mdm2:p53, phosphoMdm2:p53, des fragments et des surprises

Commençons par la caractérisation par RMN. Nous avons cartographié les interactions grâce au changement de déplacements chimiques ou aux atténuations d'intensités que provoquent les interactions protéine:protéine étudiées ; la protéine observée est marquée en ^{15}N , l'autre est produite en abondance naturelle, i.e. ^{14}N à 99.6% et donc « invisible » dans les spectres de corrélation ^1H - ^{15}N . Du côté de p53, nous pouvons aisément détecter les IDR au sein de la protéine entière. Nous avons ainsi pu observer que l'interaction principale entre le p53-BD de Mdm2 (aa1-112) et l'IDR N-terminale de p53 n'était pas affectée par la présence des deux IDRs de Mdm2, ni que celles-ci n'apportaient d'interaction supplémentaires avec l'IDR de p53 (**Figure 35**).

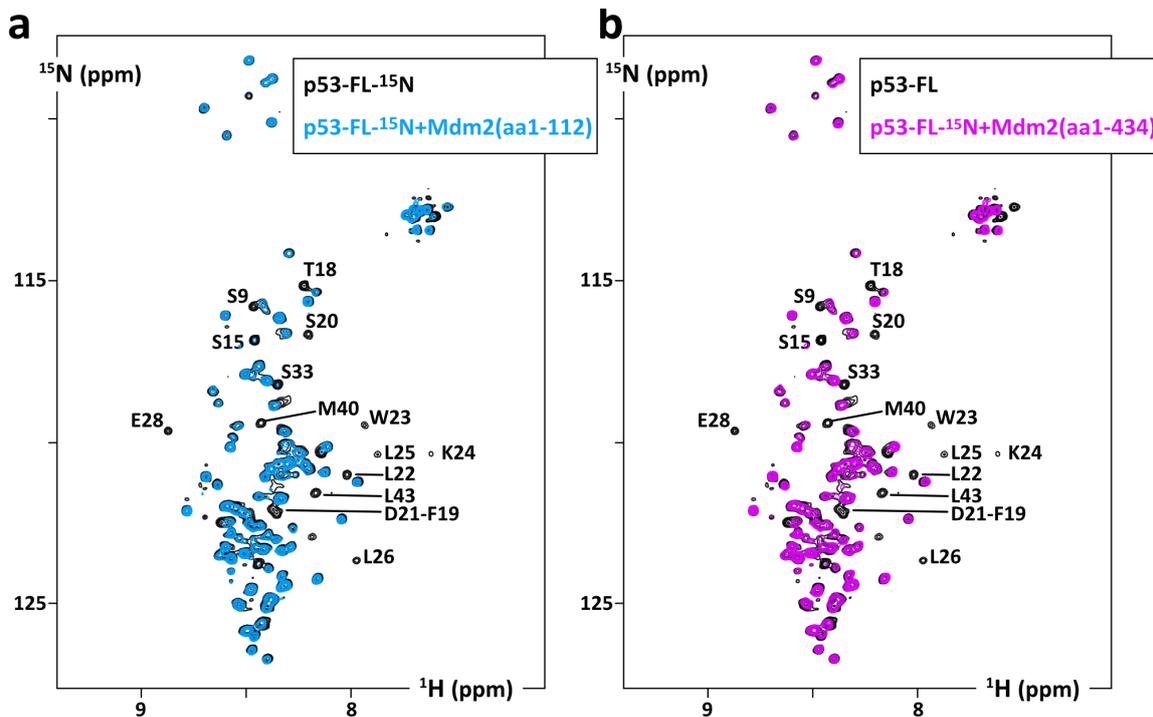


Figure 35 : **a**. Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 283K en PBS, pH7.2, à 40 μM) de ^{15}N -p53(aa1-393-L344P)-mono seule (noir) et en présence de ^{14}N -Mdm2(aa1-112) à 20 μM (bleu) ; Les signaux les plus atténués sont indiqués et attribués ; **b**. Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 283K en PBS, pH7.2, à 40 μM) de ^{15}N -p53(aa1-393-L344P)-mono seule (noir) et en présence de ^{14}N -Mdm2(aa1-434) à 20 μM (bleu) ; Les signaux les plus atténués sont indiqués et attribués ; on peut constater que seuls les acides aminés des IDRs de p53 sont visibles dans ces conditions (faible température donc temps de corrélation longs pour les domaines repliés associés à relaxation rapide et faibles intensités).

Nous avons ensuite observé que le p53-BD de Mdm2 n'établissait d'interactions substantielles qu'avec l'IDR N-terminale de p53, et pas avec les autres domaines de p53 (**Figure 36**). Nous avons ensuite tenté d'observer les interactions entre les IDRs de Mdm2 et p53. En cohérence avec la littérature, nous avons mis en évidence l'interaction du domaine acide et le ZF de Mdm2 avec le DNA-BD de p53 (**Figure 37**). Cette interaction est conservée dans la construction intégrant le p53-BD et les IDRs de Mdm2, et semble encore renforcée après phosphorylation du domaine acide de Mdm2, si l'on se fie aux pertes d'intensités plus importantes (**Figure 36**). Une information intrigante est à signaler : l'interaction entre le p53-BD et p53-FL provoque un gain de signal entre les acides aminés ~190-200 et 245-250 de Mdm2, i.e. ceux dont les intensités diminuaient à cause d'une interaction faible avec le p53-BD. Ainsi, cette interaction est-elle relâchée lorsque le p53-BD interagit avec p53-Nter. Nous avons quantifié les conséquences de cet événement en ITC. Il nous reste à réaliser des expériences similaires en présence du domaine RING, l'impatience est grande.

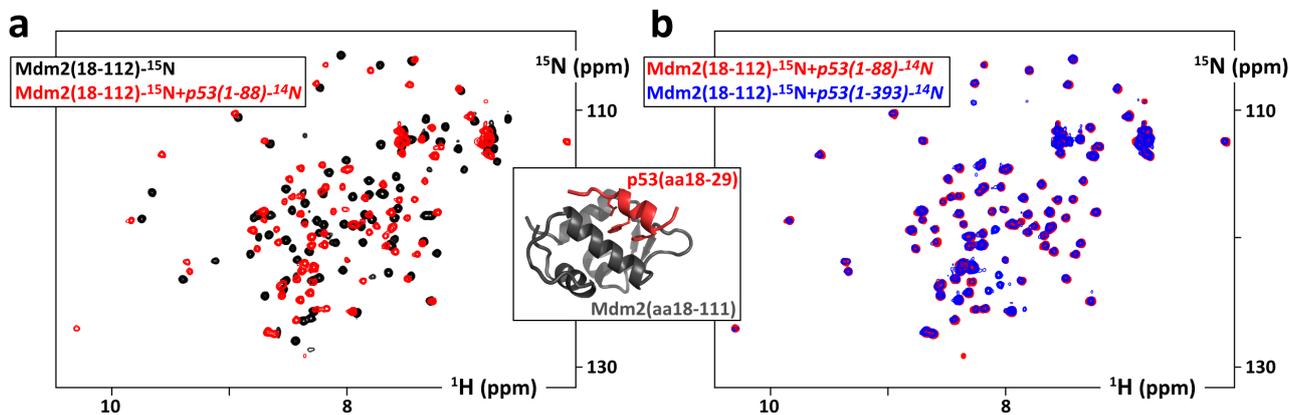


Figure 36 : **a.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 298K en PBS, pH7.4, à 50 μM) de ^{15}N - Mdm2(aa18-112) seule (noir) et en présence de ^{14}N -p53(aa1-88) à 50 μM (rouge) ; ces spectres ont déjà étudiés et attribués dans le passé, les déplacements chimiques observés ici sont cohérents avec la littérature ; **b.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 298K en PBS, pH7.4, à 50 μM) de ^{15}N - Mdm2(aa18-112) seule (bleu) et en présence de ^{14}N -p53(aa1-393-L344P) monomérique à 35 μM (rouge) ; ces deux spectres sont superposables, mais les intensités du spectre avec p53-mono sont plus faibles, sans doute en raison de l'engagement de Mdm2 dans un complexe plus large ; **L'insert au centre** montre la structure du complexe Mdm2(aa25-109):p53(aa17-29) est représentée dans la fenêtre centrale (PDB : 1YCR).

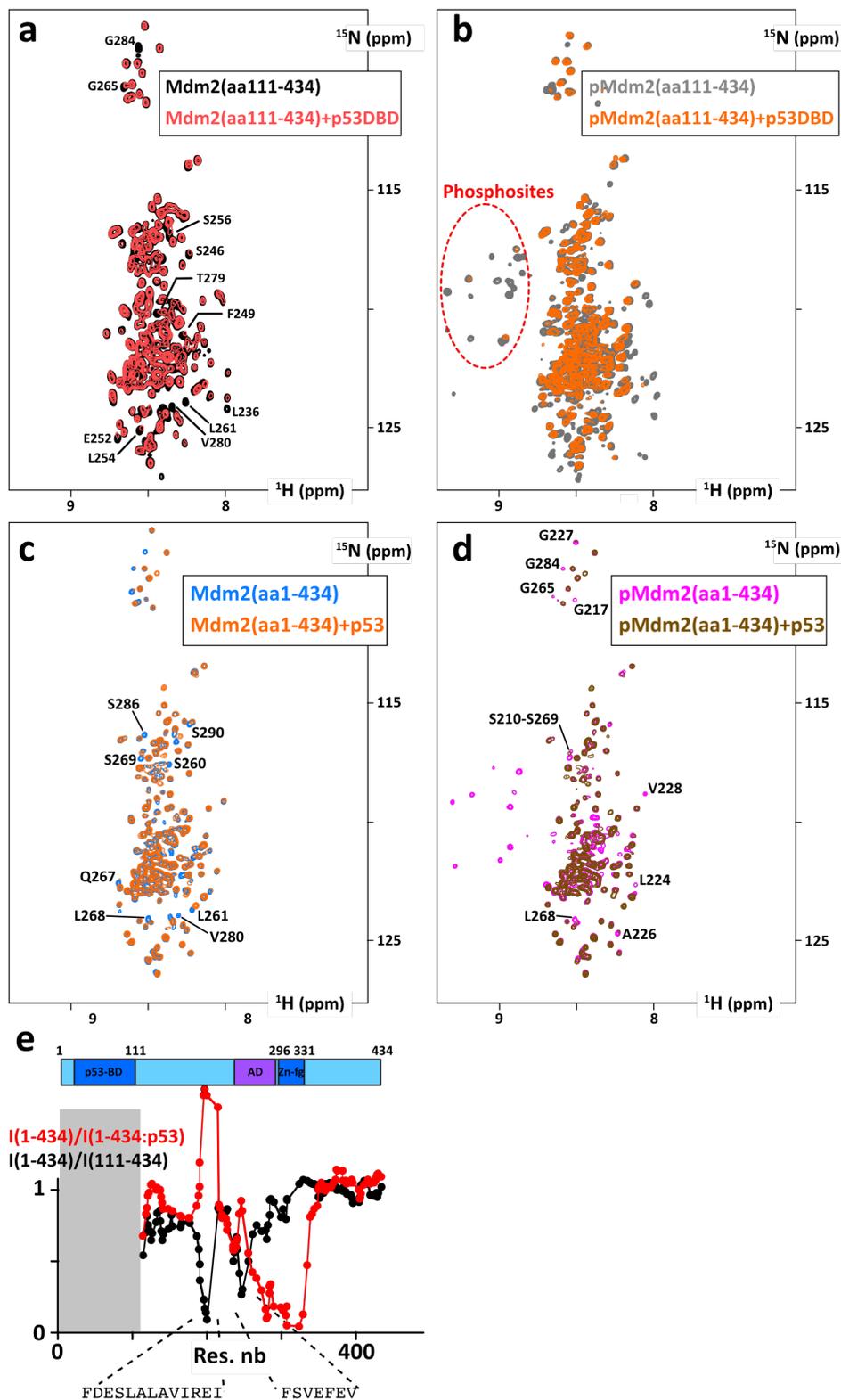


Figure 37 : **a.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 298K en hepes à 20 mM, NaCl à 150 mM, pH7.05, à 20 μM) de ^{15}N -Mdm2(aa18-112) seule (noir) et en présence de ^{14}N -p53-FL-L344P-mono à 20 μM (rouge) ; **b.** Idem avec ^{15}N -Mdm2(aa18-112)-phosphoAD seule (bleu) et en présence de ^{14}N -p53-FL-L344P-mono à 20 μM (orange) ; **c.** Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC (à 298K en hepes à 20 mM, NaCl à 150 mM, pH7.05, à 20 μM) de ^{15}N -Mdm2(aa1-434) seule (noir) et en présence de ^{14}N -p53-FL-L344P-mono à 40 μM (rouge) ; **d.** Idem avec ^{15}N -Mdm2(aa111-434)-phosphoAD seule (bleu) et en présence de ^{14}N -p53-FL-L344P-mono à 40 μM (orange) ; **e.** ratios d'intensités des signaux de ^{15}N -Mdm2(aa1-434) en présence et absence de ^{14}N -p53-FL-L344P-mono (rouge) et comparaison avec le ratio entre ^{15}N -Mdm2(aa1-434) et ^{15}N -Mdm2(aa111-434) (noir).

Nous avons réalisé un grand nombre de titrations ITC entre Mdm2 et p53, la plupart en duplicats utilisant des échantillons indépendants. Je ne montrerai ici pas toutes les courbes obtenues (**Figure 38**), mais je signale que nous nous sommes toujours placés en concentration au moins ~ 5 - 10 x supérieurs au K_d mesuré. Nous avons tout d'abord constaté que l'interaction p53-BD:p53-Nter était nécessaire pour détecter du signal en ITC. Les interactions entre domaine acide de Mdm2 et DNA-BD de p53 sont donc de faibles affinité ($>50 \mu\text{M}$). Nous avons ensuite observé que l'ajout de domaines de p53 ne diminuait que très faiblement l'affinité générée par la liaison Mdm2(p53-BD):p53-Nter, mais que l'ajout d'IDRs de Mdm2 avait un effet négatif, diminuant l'affinité d'un facteur ~ 3 - 5 (**Figure 39**). De manière intéressante, la délétion de fragments de l'IDR1 de Mdm2 n'altère pas l'affinité pour l'IDR p53-Nter, bien que nous ayons observé une interaction potentiellement compétitrice entre le p53-BD et l'IDR1 de Mdm2. A l'inverse, les interactions observées par RMN entre le Mdm2-AD et p53-DNA-BD permettent d'améliorer l'affinité d'un facteur ~ 3 - 4 , et même d'un facteur ~ 10 en présence de phosphorylation sur Mdm2-AD. Les phosphorylations de Mdm2-IDR2 par ATM/ATR/DNA-PK n'ont pas d'effet. Cette rationalisation pourrait être remise en cause par les expériences à venir intégrant le domaine RING, l'impatience est très grande.

Notre analyse par SEC des constructions de Mdm2 et de p53 ne semble indiquer aucune compaction lorsque des complexes sont formés (**Figure 40**).

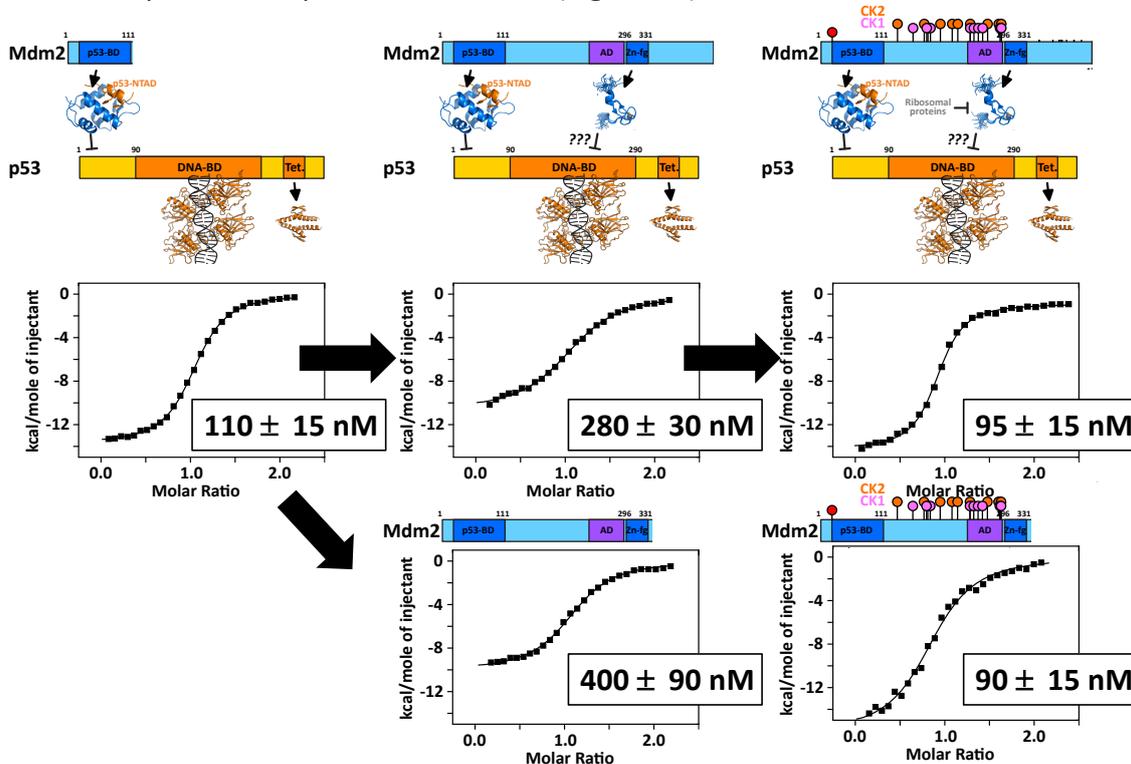


Figure 38 : Courbes expérimentales représentatives de titrations ITC de Mdm2(aa1-112), Mdm2(aa1-434), Mdm2(aa1-434)-phosphoAD, Mdm2(aa1-333) ou Mdm2(aa1-333)-phosphoAD par p53FL(L344P)mono.

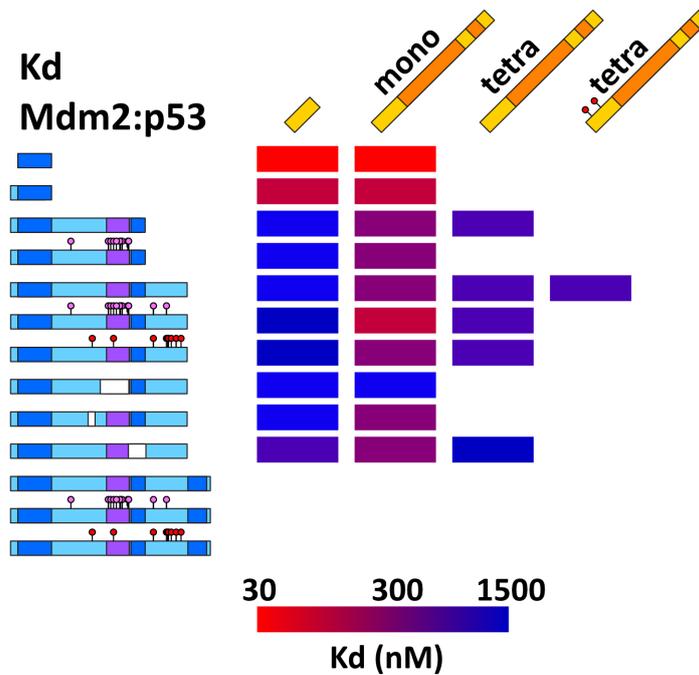


Figure 39 : Affinités mesurées par ITC (en duplicats sur des échantillons indépendants) de constructions de Mdm2, phosphorylée ou non, pour diverses constructions de p53, phosphorylée ou non. Les pastilles roses et rouges indiquent les phosphorylations identifiées par RMN sur Mdm2 effectuées par CK1 (absence de dommages de l'ADN) ou par DNA-PK (présence de dommages de l'ADN), respectivement. L'allongement de Mdm2 a un effet négatif sur la capacité du domaine p53-BD N-terminal de Mdm2 à interagir avec l'IDR N-terminale de p53. Cet effet négatif est compensé par l'interaction électrostatique du domaine acide de Mdm2 avec le DNA-BD de p53, qui est renforcée par les phosphorylations de ce domaine acide. Les phosphorylations sur l'IDR2 de Mdm2 par ATM/ATR/DNA-PK n'ont apparemment pas d'effets sur les affinités pour les constructions de Mdm2 de contenant pas le domaine RING.

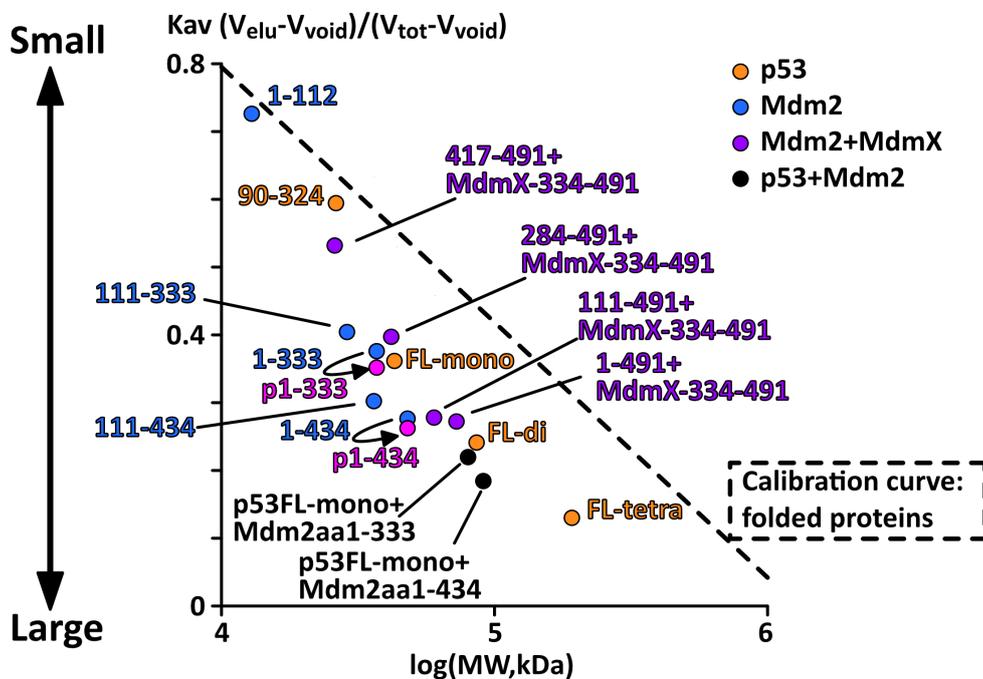


Figure 40 : Coefficients de partage K_{av} (mesurés sur Superdex 200pg 16-600, i.e. 120 mL) en fonction du poids moléculaire de différences constructions de Mdm2 et p53. La droite de calibration a été obtenue avec 7 protéines globulaires. Nous pouvons remarquer que les constructions contenant de longs segments désordonnés sont peu compactes, que leur phosphorylation a peu d'impact sur cette compacité, et que les complexes Mdm2+p53 sont aussi peu compacts que les constructions isolées.

L'image mentale de l'interaction de Mdm2 et p53 entière commence à se former, et les interactions entre domaines trouvent des confirmations expérimentales fortes. Au-delà de cet exemple, nous avons mis en évidence des phénomènes intéressants concernant l'impact des IDRs sur les interactions protéine:protéine en utilisant des techniques bien établies. Les expériences avec le domaine RING sont indispensables à mes yeux pour valoriser au mieux ces résultats. Elles vont demander beaucoup de travail de production, les rendements de Mdm2-FL étant faibles. L'étudiante en thèse sur ce projet (Y. Luo) a le courage nécessaire. Un peu de SAXS aiderait à mieux comprendre, et un peu de modélisation pour générer des citations... Nous aurons ensuite à caractériser les conséquences de ces interactions sur la capacité de p53 à reconnaître ses cibles ADN, c'est à mon avis une question importante. Nous avons réalisé de nombreux tests de titrations p53:ADN en utilisant la technologie switchSense (disponible au laboratoire) sans succès probant (les conditions expérimentales, notamment l'absence de $MgCl_2$, sont problématiques). Nous essaierons certainement la technologie BLI (disponible à l'I2BC). Des mesures d'anisotropie de fluorescence (fluorophore attaché à des oligonucléotides) pourraient être aussi utiles.

4.1.6.h. Production de Mdm2 en cellule eucaryote et analyse

Les états de phosphorylation de Mdm2 en absence ou présence de dommages de l'ADN ont été étudiés dans les années 2000. Comme je l'ai expliqué au chapitre 4.1.6., les sites phosphorylés, et la stœchiométrie de chacun d'entre eux ne sont pas vraiment bien déterminés. Ces sites sont très proches les uns des autres, regroupés en clusters de 8-12 sites, et il n'existe certainement pas d'états de phosphorylation clairs avec tous les sites phosphorylés à 100% à un moment donné. La difficulté d'analyse est donc grande. Il est à peu près clair que le cluster de phosphorylation sur le domaine acide de Mdm2 est phosphorylé en absence de dommages de l'ADN, puis que le cluster de l'IDR2 de Mdm2 est phosphorylé après dommages de l'ADN. J'ai conçu des constructions de Mdm2 contenant une GFP et un site His6 pour caractériser cela, certainement par spectrométrie de masse, mais peut-être par RMN in-cell un jour. Ces constructions ont été utilisées pour générer des lignées stables inductibles (HEK293 Flp-In T-Rrex). Les délétions de sites NLS ou NES de Mdm2 ont les conséquences souhaitées. J'ai aussi conçu des constructions mVenus-StrepTag-His6-Mdm2, qui permettront peut-être des immunoprécipitations plus efficaces que celles avec l'étiquette His6 seule. Il reste à effectuer l'analyse par spectrométrie de masse de ces constructions, en espérant que nous aurons des informations suffisamment nettes sur les quantités de phosphorylations présentes dans différentes conditions.

4.1.6.i. MdmX

Nous avons initié des travaux en collaboration avec le Pr. Alexander Loewer (Univ. Darmstadt, Allemagne), qui s'intéresse à la dynamique d'accumulation et d'élimination cellulaire des composants du réseau de signalisation p53 (Mdm2, MdmX, Chk2, Wip1) et à ses conséquences sur l'expression de gènes cibles de p53 exprimés, et sur le destin cellulaire.

Une étudiante de son laboratoire travaillait sur MdmX, et j'ai conçu des gènes pour produire des constructions peptidiques, dans la même logique que ce qui a été fait pour Mdm2 précédemment (**Figure 25**). Nous avons observé que l'expression recombinante en bactérie produisait des quantités de protéine soluble qui semblent prometteuses pour toutes les constructions. Nous avons décidé avec A. Loewer de concentrer nos travaux sur Mdm2 et Chk2 pour l'instant.

4.1.7. Chk2 et les clusters de phosphorylation ATM/ATR/DNA-PK

4.1.7.a. Contexte, questions

Je participe en tant que coordinateur à un financement ANR PRCE, en collaboration avec Pr. Alexander Loewer (Univ Darmstadt, Allemagne, co-coordinateur), qui s'intitule « Régulation de la réponse aux dommages de l'ADN par les clusters de phosphorylation du réseau de signalisation de p53 » et a pour acronyme « DDRPhosphoclus ». Ce projet a commencé en avril 2021 et se terminera à l'automne 2024, il est doté à hauteur de 230 keuros pour notre équipe (420 keuros au total). Il a permis notamment de recruter une étudiante en thèse sous ma direction à partir d'octobre 2021. Il s'agit d'étudier les cinétiques de phosphorylation de clusters de sites présents sur les protéines p53, Mdm2, MdmX, Chk2 et Wip1 à l'issue de dommages de l'ADN, et leur impact sur la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire. Cette étude intègre des informations de biochimie *in vitro* et de microscopie de fluorescence en cellules vivantes. La compréhension des mécanismes de rétrocontrôle, du rythme et des niveaux de déclenchements de la signalisation cellulaire de ce réseau permettrait de proposer des stratégies thérapeutiques anticancer.

Le facteur de transcription p53 coordonne la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. Le niveau protéique de la protéine p53 et son activité sont contrôlés par un réseau de signalisation comprenant entre autres les kinases de réponses de dommages à l'ADN (DDR) ATM/ATR/DNA-PK (PIKKs), la E3-ubiquitine ligase Mdm2, la phosphatase Wip1 et la kinase Chk2. L'activité des kinases/phosphatases et les boucles de rétrocontrôle génèrent des pulses d'accumulation de p53, dont la durée et le nombre déterminent les réponses transcriptionnelles médiées par p53 et le destin cellulaire (**Figure 41**).^{321,368,369}

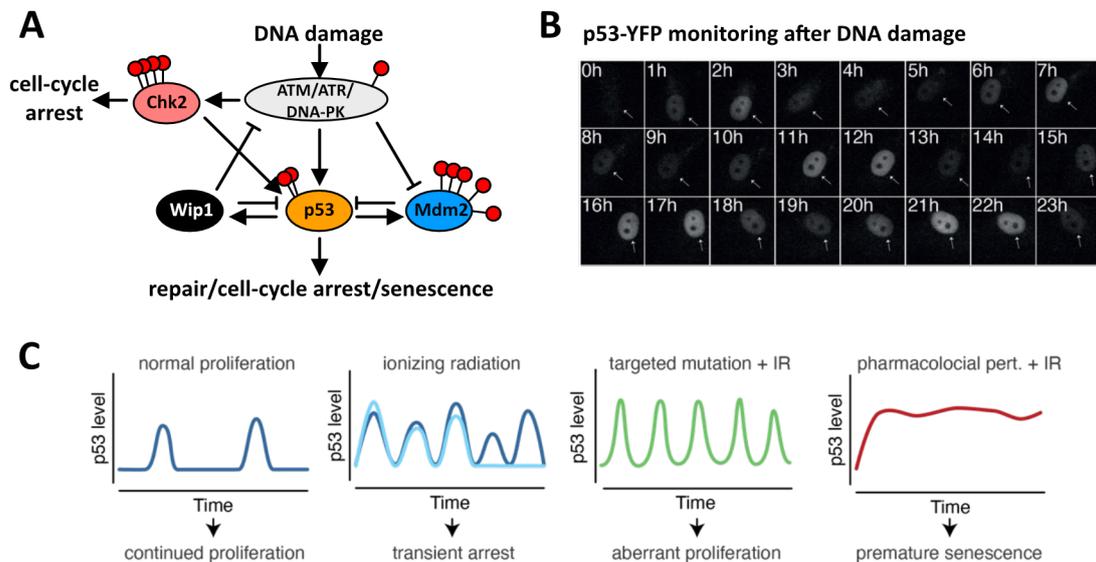


Figure 41 : Le réseau de régulation de p53 et sa dynamique contrôle le destin cellulaire. **A**. Schéma du réseau de p53, les cercles rouges indiquent les phosphorylations par ATM/ATR/DNA-PK ; **B**. Suivi par microscopie de fluorescence sur une cellule de l'accumulation de p53 après irradiation ionisante aux rayons γ ; **C**. Le régime d'oscillations, provoquées notamment par la régulation croisée entre p53 et Mdm2 (p53 induit la production de Mdm2, qui elle-même provoque la dégradation de p53), dépend du type et de la gravité des dommages sur l'ADN ; il peut induire un arrêt temporaire ou prolongé du cycle cellulaire.

La compréhension actuelle du système est la suivante : i) l'expression constitutive de p53 et la régulation de rétrocontrôle de sa E3-ubiquitine ligase Mdm2 maintiennent des niveaux protéiques basaux faibles ; ii) les PIKKs activent p53 et Chk2, et inhibent Mdm2 tant que les dommages de l'ADN ne sont pas réparés ; iii) l'accumulation de p53 déclenche l'expression de Mdm2 et Wip1 ; iv) Wip1 efface les modifications effectuées par les PIKKs. Bien que ces activités expliquent en

grande partie les dynamiques observées de p53, des résultats récents, obtenus par des perturbations pharmacologiques ou des expériences de biochimie, ont mis en évidence l'existence de mécanismes de régulation supplémentaires.

Nos groupes se sont intéressés à des mécanismes de phosphorylation du réseau de réponse aux dommages de l'ADN par p53 (p53-DDR) encore non-explorés : i) les protéines de ce réseau présentent des sites de (dé)phosphorylation par les PIKKs, Chk2 et Wip1 abondants et groupés (**Figure 42**); ii) les pulses répétés de p53 dépendent finalement plus de l'activité de Chk2 plutôt que de celle des PIKKs^{370,371} (**Figure 43**). A partir de ces découvertes, nous formulons les hypothèses suivantes : i) les sites de modifications groupés agissent comme des tampons qui établissent des niveaux de seuil et des horloges moléculaires après les dommages de l'ADN ; ii) ATM déclenche les pulses de p53 en réponse aux dommages sévères, tandis que Chk2 est responsable du maintien de l'activité de p53 et permet les réponses cellulaires aux dommages prolongés.

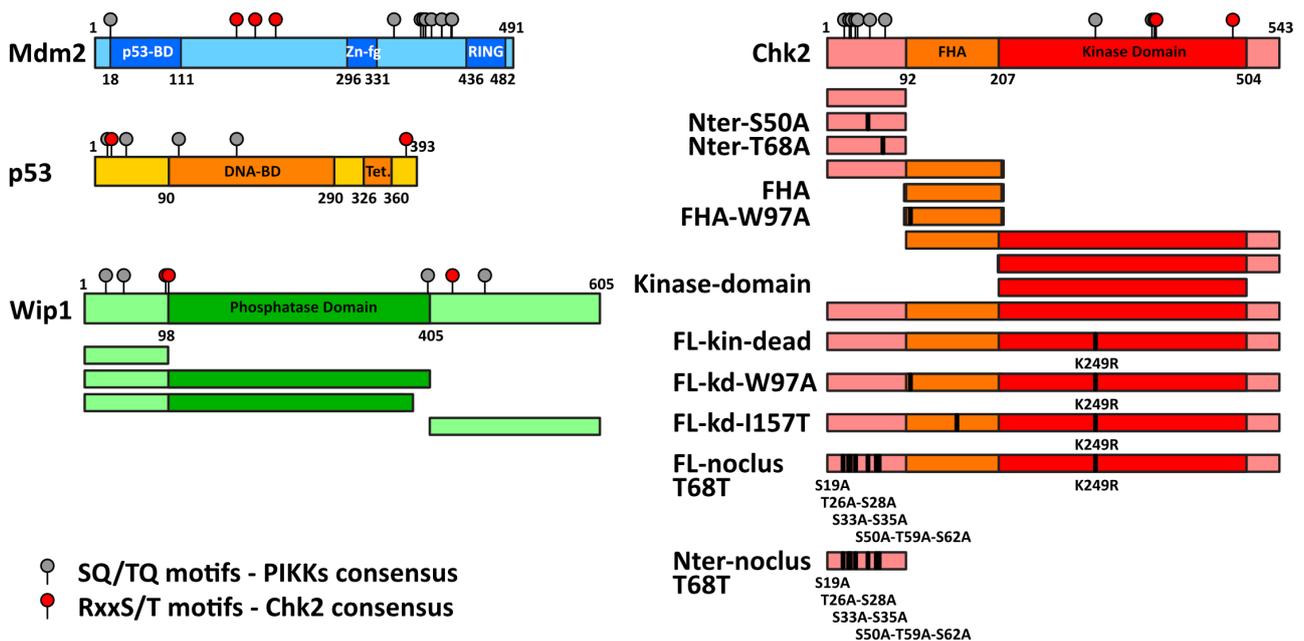


Figure 42 : Schémas des structures primaires de Mdm2, p53, la phosphatase Wip1 et la kinase Chk2 ; les IDRs sont en couleurs claires, les domaines globulaires en couleurs foncées ; les sites de phosphorylations correspondant à des motifs consensus pour ATM/ATR/DNA-PK ou Chk2 sont indiqués par des cercles gris ou rouges, respectivement. Nous avons également indiqué les constructions peptidiques de Wip1 et Chk2 que nous avons produites et purifiées jusqu'à présent au laboratoire.

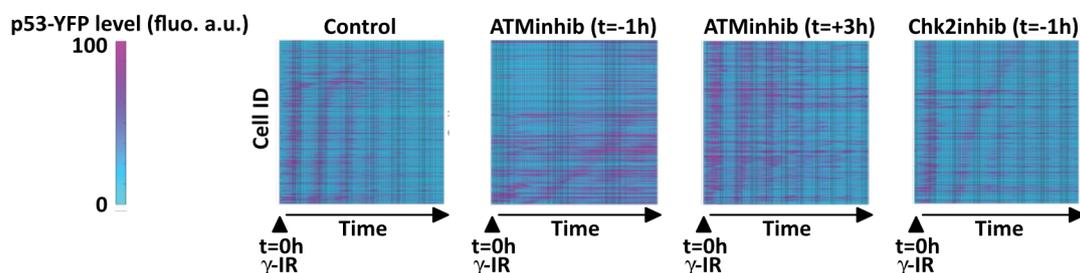


Figure 43 : Suivi du niveau de p53-TFP par cellule individuelle, observé par microscopie de fluorescence de cellule vivante au cours du temps. Les séquences codantes pour l'étiquette de fluorescence ont été insérées au niveau du locus endogène du gène de p53 par édition CRISPR du génome. La synchronicité et l'amplitude des oscillations de p53 au sein de la population cellulaire est observée après irradiation ionisante (control), tandis que l'exposition antérieure à des inhibiteurs de la kinase ATM altère l'accumulation de p53 après dommages de l'ADN (ATMinhib à t=-1h) ; de manière surprenante, l'exposition à des inhibiteurs d'ATM après

irradiation influence peu les oscillations de p53, tandis que l'exposition antérieure à des inhibiteurs de Chk2 permet uniquement l'émergence du premier pulse d'accumulation de p53.

Nous proposons de valider ce modèle par des expériences combinées aux niveaux biochimique et cellulaire. Nous évaluerons comment la présence de phosphosites groupés module les cinétiques des DDR sévères et prolongées. A cette fin, nous nous concentrons sur les modifications de Mdm2, Chk2 et Wip1 et comment elles affectent leurs activités. Concrètement: i) nous tentons de détailler les activités compétitives des PIKKs, Chk2 et Wip1 sur p53, Mdm2, Chk2 et Wip1 site par site et quantitativement grâce à la spectroscopie RMN ; ii) nous menons des études structurales pour comprendre les mécanismes d'inhibition/déstabilisation de Mdm2, Chk2 et Wip1 par leurs phosphorylations ; iii) nous examinons les rôles fonctionnels des sites de phosphorylation par ingénierie génomique utilisant le système CRISPR/Cas9 et en observant des cellules uniques par microscopie de fluorescence de cellules vivantes ; iv) nous évaluons comment la balance entre les activités des PIKKs, Chk2 et Wip1 module la DDR dans les cellules.

Ceci nous permettrait de construire des modèles mathématiques rendant compte des niveaux de seuil de dommages de l'ADN et prédisant les dynamiques de long-terme de la p53-DDR. Ainsi, en intégrant des informations biochimiques et structurales, des données de signalisation cellulaire en temps réel et une approche de biologie des systèmes, nous aurions accès à une meilleure compréhension de la réponse aux dommages de l'ADN par p53 et nous pourrions ainsi mieux la manipuler dans le contexte des thérapies anti-cancer.

Des combinaisons d'irradiation et d'inhibiteurs ont été proposées, qui ont démontré leur effet sur les oscillations de p53 et sur la capacité à mieux déclencher l'arrêt du cycle cellulaire.^{368,372,373}

4.1.7.b. Premiers résultats

A. Loewer et ses collaborateurs/trices ont obtenu des résultats intéressants dans ce cadre : les mutations-Ala ponctuelles des Ser/Thr (motifs S/T-Q, S19A, T26A-S28A, S50A ; les lignées S33A/S35A et T68A sont non-viables) de l'IDR N-terminale de Chk2 provoquent une plus grande excitabilité du réseau p53 en cellule, avec des pulses d'accumulation plus prompts et plus intenses par rapport aux cellules Chk2-WT. Ces résultats préliminaires ont été observés sur des cellules dont un seul allèle de Chk2 a été muté. En nous appuyant sur ces résultats préliminaires, nous avons initié une étude biochimique visant à caractériser finement i) les vitesses de (dé)phosphorylation de l'IDR de Chk2 et ii) l'influence de ces phosphorylations sur l'interaction avec les domaines globulaires.

Pour bien comprendre cette approche, il faut présenter les connaissances structurales sur Chk2 dans la littérature. Il est généralement accepté que Thr68 de Chk2 est phosphorylée par ATM ou DNA-PK, provoquant la dimérisation de Chk2 via son domaine FHA (domaine de reconnaissance des Thr phosphorylées³⁷⁴) et l'autophosphorylation activatrice en *trans* de son domaine enzymatique kinase KD (un mécanisme assez commun chez les kinases³⁷⁵).³⁷⁶ Une première structure cristalline du complexe entre le domaine FHA et un peptide fragment phosphorylé de BRCA1 (RHFDpTY-LIRR) a été publiée en 2002 (PDB : 1GXC).³⁷⁷ L'affinité correspondante avait été mesurée à $K_d \sim 1 \mu\text{M}$, tandis que l'affinité pour un peptide fragment de Chk2 comprenant pT68 (contexte ETVSpTQELY) n'était que de 25-30 μM . Une deuxième publication avait dévoilé la structure cristalline d'un dimère d'une construction FHA-KD(K249R-dead-kinase) de Chk2 (PDB : 3I6U), qui permettait d'imaginer le rôle de pT68 dans la formation de ce dimère provoquant l'autophosphorylation de boucles activatrices (**Figure 44**).³⁷⁸ (Cette pré-phosphorylation de pT68 permet une bonne autophosphorylation sur les sites appropriés pour l'autoactivation chez Rad53, l'orthologue de Chk2 chez la levure.³⁷⁹) La mutation W97A à l'interface des deux domaines FHA réduisait la dimérisation, la mutation I157A à l'interface entre le domaine FHA et le domaine KD l'abolissait quasiment (SEC chromatography). Une trentaine de structures cristallines de Chk2-KD en complexe avec des candidats inhibiteurs ont été publiées (stats : www.klifs.net), mais une caractérisation plus poussée des mécanismes d'activation

est encore à effectuer. Il semble que Chk2-FHA-KD se monomériser après autophosphorylation *in vitro* ; on sait que Wip1 déphosphoryle pT68, mais on ne sait pas si pT68 est déphosphorylée avant ou après la monomérisation de Chk2 pour diminuer la dimérisation ; on sait que 6 sites de phosphorylation ATM/ATR/DNA-PK, en plus de T68, peuvent être phosphorylés sur l'IDR N-terminale (semble-t-il de manière variable en fonction du type de dommages de l'ADN), mais on ne sait pas quels rôles ils jouent.^{380,381} La question des rôles respectifs des sites d'autophosphorylation au sein du KD (S260-T383-T387-T432-S516) n'a pas de réponse claire, à notre connaissance ;³⁷⁶ des mutations en position E46, T168, L174, 265-282, G306, Y327, R346, K373, E394, V395, Y424, P425, R474 sont délétères.^{382,383}

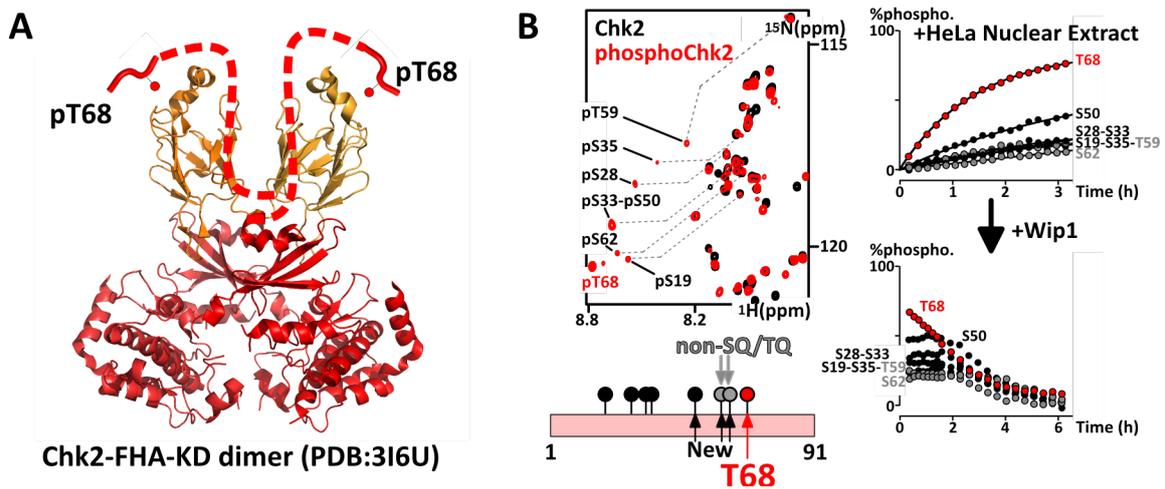


Figure 44 : **A**. Structure du dimère de Chk2-FHA-KD, sur laquelle nous avons schématisé l'IDR Nterminale avec pT68 placée sur la zone de reconnaissance par le FHA ; **B**. Superposition de spectres 2D 1H-15N HSQC de l'IDR N-terminale de Chk2 avant et après phosphorylation par un extrait nucléaire soniqué de cellule HeLa présentant une forte activité ATM/ATR/DNA-PK ; à droite : suivi des phosphorylations site par site tel qu'observé par RMN, puis des déphosphorylations par Wip1 ; T68 est le site privilégié de phosphorylation et de déphosphorylation ; en bas : schéma de la structure primaire de l'IDR N-terminale de Chk2 avec les sites de phosphorylation révélés par l'analyse RMN ; nous avons détecté 3 nouveaux sites, dont deux ne correspondent pas à des motifs S/T-Q consensus des kinases ATM/ATR/DNA-PK.

Nous avons produit en *E. coli* et purifié des constructions peptidiques de Chk2 intégrant les différents domaines N-ter (aa1-91), FHA (aa92-207) et domaine catalytique kinase (KD, aa208-504) (**Figure 42**). Nous avons constaté la polyphosphorylation de Chk2 lorsque le KD est contenu dans les peptides exprimés. Nous utilisons la mutation K249R désormais, qui rend le KD inactif, pour travailler avec un matériel bien défini, non-phosphorylé. Ces constructions peptidiques doivent nous servir à comprendre l'influence des nombreux sites S/T-Q i) sur la phosphorylation de T68 par ATM/ATR/DNAPK, ii) sur sa déphosphorylation par Wip1, iii) sur l'interaction avec le FHA et la dimérisation de Chk2.

Nous avons comparé les versions du FHA-WT ou W97A : nous n'avons pas observé de différences dans les volumes d'éluion en SEC pour les constructions Chk2(aa1-209) et Chk2(aa91-209) WT ou W97A en PBS. Nous avons constaté l'absence de contact entre l'IDR N-terminale et le domaine FHA avant phosphorylation (mêmes intensités des pics de l'IDR N-terminale seule ou dans une construction IDR-FHA). Nos titrations par ITC et RMN indiquent des Kd d'environ 15 μ M.

Nous avons effectué des phosphorylations de l'IDR N-terminale par ATM/ATR/DNA-PK et observé que T68 est le site le plus rapidement phosphorylé, mais aussi déphosphorylé par Wip1 (**Figure 44B**). Nous avons constaté que ce peptide poly-phosphorylé semble interagir avec le domaine FHA de manière similaire à un peptide synthétique court ne contenant que pT68 (mêmes changements de déplacement chimiques pour ¹⁵N-FHA). Nous avons également exprimé des versions de Chk2

contenant une IDR N-terminale dont tous les sites potentiels de phosphorylation par ATM/ATR/DNAPK ont été mutés en Ala, sauf T68 ; leurs volumes d'élutions en SEC sont identiques au WT.

Ces premiers résultats ne révèlent donc pas trop de surprises pour l'instant. Un élément intéressant apparaît tout de même : des changements de déplacement chimiques se produisent sur le FHA à l'opposé du site d'interaction avec pT68, là où le FHA entre en contact avec le domaine KD dans la structure cristalline ; ceci pourrait indiquer une régulation allostérique de la dimérisation, mais ne nous emballons pas trop vite !

Plusieurs complications sont apparues. Tout d'abord, le domaine FHA a tendance à s'agréger, et nécessite à tout le moins d'être manipulé à 293K ou moins (attention à l'agrégation pendant les titrations ITC...). Mais l'ennui le plus important s'impose à nos collaborateurs : les lignées cellulaires générées, dont un allèle de Chk2 est muté pour exprimer une IDR N-terminale mutée Ser/Thr->Ala, montrent une plus grande excitabilité des niveaux de p53 lors de dommages de l'ADN, mais ce phénotype disparaît au bout de quelques générations ; sans doute les niveaux de certaines protéines s'adaptent pour retrouver une excitabilité normale de p53. Nos collaborateurs travaillent donc à établir des lignées mutantes conditionnelles, pour induire l'expression de Chk2 mutante de manière ponctuelle, tout en éliminant Chk2 endogène au même moment. Nous attendons de voir reproduites leurs observations de dynamique de p53 dans ces nouvelles lignées cellulaires pour orienter notre étude biochimique.

4.1.8. Contributions diverses au laboratoire et dans la communauté

4.1.8.a. Les IDPs et leurs phosphorylations

J'ai aidé au développement de travaux au sein de mon laboratoire, qui étaient liés à la caractérisation d'IDRs. J'ai notamment aidé à la formation d'étudiants pour la biochimie et pour la RMN, et transmis mon expertise sur les IDPs et leur phosphorylation. J'ai ainsi été associé aux études de la kinase Tlk1 (Groupe F. Ochsenbein) ou de l'émerine, la lamine, BAF, ou BRCA2 (Groupe S. Zinn-Justin). Ces projets ont déjà donné lieu à de nombreuses publications, et continuent à se développer.³⁸⁴⁻³⁸⁹

Nous avons également travaillé avec Antoine Loquet (CBMN, Bordeaux, coordinateur du projet) sur la protéine TDP-43, dont les agrégats sont retrouvés chez 95% des patients atteints de sclérose amyotrophique latérale (maladie de Charcot). Nous avons établi des protocoles de production de fragments impliqués dans l'agrégation de cette protéine et établi une première caractérisation structurale des agrégats formés par ces fragments publiée en 2019.³⁹⁰ Plusieurs demandes de financements de projets visant à pousser la caractérisation structurale de ces agrégats ont échoué. Nous n'avons donc pas pu travailler dans cette direction depuis.

Je participe à des travaux concernant la régulation de l'activité de l'enzyme SAMHD1, en collaboration avec Alessandra Zamborlini depuis 2021. Cette enzyme convertit les dNTPs en simples deoxyribonucléosides, et a notamment une activité de blocage de l'infection par le HIV. Les travaux récents de A. Zamborlini ont montré que la régulation de SAMHD1 s'effectuait par une sumoylation de K595 elle-même régulée par la phosphorylation de T592 par Cdk1.³⁹¹ Nous voudrions comprendre comment SAMHD1 est désactivée au sein des cellules cyclantes et échafauder des stratégies visant à la réactiver. Nous avons produit de nombreuses constructions de SAMHD1 de manière recombinante, avec et sans marquage isotopique, pour caractériser les changements structuraux provoqués par ces modifications post-traductionnelles. Nous avons donc montré la faisabilité d'une étude par RMN complémentaires de travaux en biologie cellulaire. Ces résultats préliminaires pourraient permettre d'obtenir un financement, sans lequel cette étude ne pourra pas se développer.

J'ai initié une collaboration en 2019 avec C. Zipfel (ETH Zürich), spécialiste de l'immunité innée chez les plantes, qui voulait déterminer les sites d'autophosphorylation de la kinase BAK1 sur son IDR C-terminale.³⁹² Nous avons obtenu des échantillons solubles de constructions domaine-kinase+IDR marqués ¹⁵N, les spectres 2D ¹H-¹⁵N ont confirmé le caractère désordonné de l'IDR (en présence d'aMP-PNP), et nous avons pu suivre les autophosphorylations par RMN (en présence d'ATP). C'était en décembre 2019. Il nous fallait produire des échantillons marqués ¹³C pour procéder à l'attribution des signaux. Mes collaborateurs montraient leur volonté de le faire, après reprises de contact après les confinements en 2020 et 2021. Le projet n'a pas évolué depuis ; ces collaborateurs ont publié un article lié à cette thématique en 2021.³⁹³

J'ai également initié une collaboration avec V. Aucagne (CBM Orléans), spécialiste de synthèse peptidique, qui a mis au point des techniques de synthèse de peptides longs assistées par « Native Chemical Ligation » très efficaces.³⁹⁴ J'avais dans l'idée de concaténer un peptide phosphorylé fragment de BRCA2 avec un peptide recombinant marqué ¹⁵N, pour évaluer l'influence de cette préphosphorylation (reconnue par le domaine PBD de Plk1) sur la phosphorylation ultérieure par Plk1. Nous avons effectué quelques tests concluants depuis mi-2019, M. Julien (étudiante en thèse co-encadrée) a produit et envoyé quelques dizaines de milligrammes de peptide recombinant avant et après le confinement. Des problèmes de personnel du CBM ont empêché la finalisation de la synthèse jusqu'à présent.

4.1.8.b. Caractériser la déamidation et les iso-aspartates par RMN

Une étape pratique pour la purification des IDPs consiste à les chauffer à 90-95 °C pendant quelques minutes. Les protéines globulaires précipitent, tandis que l'IDP reste soluble. L'analyse SDS-PAGE avant/après chauffage peut confirmer l'innocuité apparente de cette méthode. Je ne pratique cette approche que très rarement ; certains la pratique souvent. Les protocoles utilisés au laboratoire pour la purification des IDRs de BRCA2 utilisait ce chauffage. Nous avons envoyé des peptides ainsi traités à nos collaborateurs chimistes du CBM, qui ont effectué des analyses en spectrométrie de masse montrant l'altération de nos peptides, malgré l'absence de problèmes apparents en SDS-PAGE. Nous avons pensé à des problèmes de déamidation. Une discussion à l'été 2019 avec B. Kragelund (Univ. Copenhagen) nous avait amenés à organiser une étude conjointe des signatures spectroscopiques de cette déamidation. J'ai acheté quelques hexapeptides contenant des Asp/Asn/isoAsp un peu plus tard. La liste de ces peptides s'est un peu étoffée lors du confinement : j'anticipais que leur analyse occuperait du temps de spectromètre de manière utile/pratique au cours des mois étranges qui ont suivi, alternant demi-présence et demi-confinements.

Nous avons établi l'impact de la déamidation au sein de nombreux hexapeptides modèles sur les déplacements chimiques (**Figure 45**), les couplages scalaires, les intensités en fonction du pH, de la température ou de la concentration en urée. Cette caractérisation nous a permis de choisir des conditions et des séquences de pulses adéquates pour déterminer avec une grande sensibilité (~1 nmol) la présence d'isoAsp au sein d'un peptide ; nous l'avons démontré sur du lysozyme, de l'insuline et de l'ocytocine et diverses IDPs produites au laboratoire. Il apparaît que la déamidation est le plus souvent lente à pH neutre, y compris au sein des IDPs : on a observé des populations de 10-20% d'Asn déamidés après 1h de chauffage à 95 °C chez plusieurs IDPs. Le manuscrit est presque fini, j'en livre quelques figures ci-dessous, et une version est disponible dans le dossier MyCore de cette HDR.

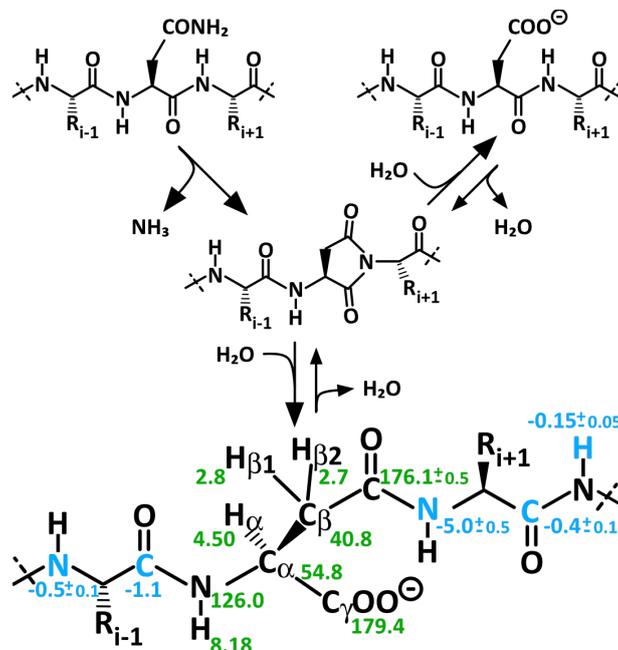


Figure 45 : Schéma des réactions chimiques menant à l'établissement de l'iso-aspartate au sein d'un peptide ; l'analyse d'hexapeptides synthétiques et d'IDPs contenant un isoAsp nous a permis de déterminer les déplacements chimiques de l'isoAsp (vert) et les changements de déplacements chimiques pour les acides aminés voisins à l'issue de la conversion Asn->isoAsp ou Asp->isoAsp (bleu) sont indiqués pour un peptide en « random coil ». Ces déplacements chimiques sont légèrement différents dans le cas d'une glycine en position -1.

4.2. Production de Ser/Thr/Tyr kinases

4.2.1. Établir une banque de kinases/phosphatases recombinantes actives

J'ai eu la chance de travailler avec des kinases purifiées commerciales pour étudier leur activité sur des substrats IDPs, mais les désavantages de cette approche sont nombreux. Le coût des aliquots est élevé (~400-800 euros) pour des quantités d'activité faibles, permettant dans les meilleurs cas une petite dizaine d'expérience RMN, une ou deux seulement parfois. Les kinases commerciales ont le plus souvent une durée d'activité de ~3-4 heures. Elles sont souvent lestées d'une étiquette GST utilisée pour la purification depuis des cellules HEK transfectées, ce qui permet sans doute une bonne industrialisation du procédé. Leur activation, i.e. la phosphorylation sur leur boucle d'activation, est rarement renseignée. La reproductibilité est donc souvent mauvaise d'un lot à l'autre. Mauvaise reproductibilité, délais de livraison parfois de plusieurs mois, coût élevé des échantillons : la capacité à reproduire des expériences avant publication est donc très régulièrement remise en cause dans ces conditions...

J'avais à l'esprit d'essayer de m'affranchir de ces embûches et de gagner en autonomie en produisant les kinases les plus utiles/courantes au laboratoire. Les chapitres ci-dessous donnent un rapide état des lieux de cette quête. J'ai eu quelques discussions depuis 2019 avec plusieurs collègues RMNistes qui ont eux aussi entrepris de travailler avec des kinases. Nos études par RMN nécessitent des quantités de matériel importantes, inadaptées au prix des kinases commerciales. Nous étions d'accord pour dire qu'il faudrait organiser une banque de kinases, ou à tout le moins de plasmides et de protocoles de purification. Qui trouvera le temps de le faire ?

Nous nous sommes concentrés notamment sur les kinases qui ont le plus grand nombre de substrats suspectés, i.e. les MAPkinases, Cdk1/2, CK1, CK2, Plk1, ATM/ATR/DNA-PK (il manquerait notamment GSK3β et PKA/PKB).

4.2.1.a. Productions de kinases en *E. coli* : la moitié des structures dans la PDB, mais pas si simples dans beaucoup de cas

Une bonne partie des kinases peuvent être produites de manière recombinante en bactérie. La moitié des kinases dont la structure est connue a été produite en bactérie. Cette approche est privilégiée par les RMNistes, qui y voient la possibilité d'enrichir isotopiquement les protéines à des coûts abordables. La production en bactérie est surtout rapide, pratique et requiert des installations et des équipements assez ordinaires.

Nous avons contacté de nombreux collègues à travers le monde qui ont produit et utilisé des kinases. Nous avons reçu de nombreux plasmides qui n'ont la plupart du temps que suscité des déceptions (rendements très faibles, ou des activités insuffisantes ne permettant que la phosphorylation non-stœchiométrique par co-expression avec une protéine d'intérêt, ou des mutations rendant la kinase constitutivement active mais provoquant la phosphorylation de sites non-natifs nombreux, etc...). Nous avons sans doute perdu du temps dans cette approche de récupération de plasmides. Nous pouvons par exemple mentionner une construction de Erk2 où toutes les cystéines avaient été mutées, utilisée de multiples fois pour des études par RMN publiées : cette construction précipitait à basse température et nous n'avons jamais pu l'utiliser ; les auteurs de ces publications préparent sans doute un échantillon frais pour chaque spectre.

Nous avons opté pour la commande de gènes optimisés pour les kinases qui nous intéressaient. Nous avons ainsi établi des protocoles robustes permettant la production recombinante chez *E. coli* des MAP-kinases p38 α p38 γ ou Erk2 (l'expression recombinante dans 1 L de culture *E. coli* fournit après purification environ autant d'activité kinase que 200 k€ d'aliquots achetés chez Si_ma par exemple). Nous les avons activées par double phosphorylation de leur boucle d'activation en les incubant après purification avec des constructions recombinantes des MAPKK MKK6 et MEK1 mutantes constitutivement actives (stage S. Eissa, 2020). Malgré le fait que les structures cristallines de p38 α ou Erk2 activées, i.e. double-phosphorylées pTpY sur leur boucle d'activation, aient été publiées depuis longtemps en utilisant des coexpressions MAPK+MAPKK,^{395,396} nous avons observé que cette approche produisait des formes « sur-phosphorylées » (**Figure 46B**, en accord avec la littérature³⁹⁷); l'impact des phosphorylations hétérogènes supplémentaires sur l'activité enzymatique et la sélectivité des substrats est difficile à prédire. Pour analyser les états de phosphorylation de ces kinases, nous utilisons un retardateur de migration sur SDS-PAGE, Phos-Tag acrylamide.^{398,399} Celui-ci permet de distinguer et quantifier les formes phosphorylées, mais dans le cas des kinases p38 α et Erk2, il est difficile de séparer les formes phosphorylées de la boucle d'activation pT et pT-pY.³⁹⁹⁻⁴⁰¹ Idéalement, la double phosphorylation est préférable, mais trouver les meilleures conditions et les temps d'incubation en présence des MKKs est difficile, notamment lorsqu'on observe la progressive déphosphorylation de p38 α ou Erk2 à des temps d'incubation trop importants (**Figure 46C**). Cela peut-être un élément problématique, car la perte de la phosphorylation sur la tyrosine activatrice diminue l'activité enzymatique d'un facteur 10.⁴⁰² Nous avons fait de notre mieux pour établir des protocoles permettant une double phosphorylation homogène, mais nous ne pouvons certainement pas garantir mieux que ~80-90% de double phosphorylation.

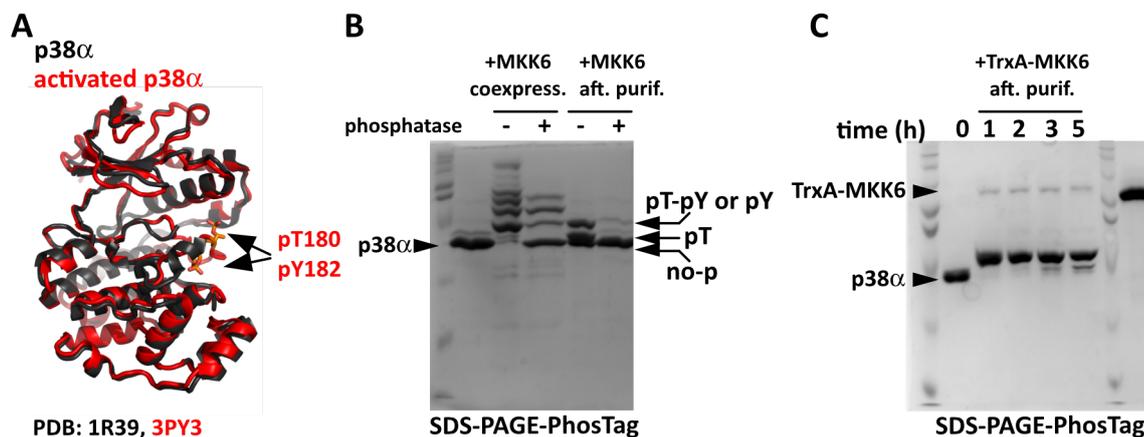


Figure 46 : **A.** Structures cristallines de $p38\alpha$ non-phosphorylée (noir) ou doublement phosphorylée (rouge), la boucle d'activation ne fournit pas de densité électronique en absence de phosphorylation, les deux sites phosphorylés sont représentés en bâtonnets ; **B.** Analyse SDS-PAGE PhosTag de $p38\alpha$ produite en *E. coli* BL21(DE3)* seule, ou coexprimée avec MKK6-S407E-T211E « constitutivement active », ou phosphorylée après purification par MKK6-S407E-T211E ; l'attribution des bandes de migration a été publiée par Tokunaga et al.⁴⁰¹ ; **C.** Suivi de l'état de phosphorylation de $p38\alpha$ purifiée par MKK6-S407E-T211E ; des bandes montrant la déphosphorylation apparaissent et sont confirmées par analyse ESI-MS.

Après de nombreux tests dans différentes souches bactériennes et à différentes températures, nous avons réussi à produire de bonnes quantités de CK1 δ , par co-surexpression de chaperones bactériennes (plasmide pGro7, exprimant GroEL/GroES) (**Figure 47B**). Cette méthode avait été utilisée dans une étude publiée en 2017.⁴⁰³ Des protocoles alternatifs ont été publiés, notamment par le groupe de V. Dötsch, qui utilisent simplement une expression à 16-18°C en BL21(DE3) ou Rosetta2 sans nécessité d'étiquette de solubilité, pour CK1 α , CK1 δ et CK1 ϵ .^{254,404-406} Nous n'avons obtenu que des résultats médiocres avec cette approche simple (**Figure 47B**). Le timing d'induction des chaperones et de la protéine d'intérêt doit être bien choisi pour une production efficace. Comme cela a été montré il y a 15 ans pour les kinases coexprimées avec des chaperones bactériennes, il est nécessaire de vérifier que les chaperones ne sont pas co-purifiées avec la protéine d'intérêt -notamment en présence de DnaK (HSP70)- et d'effectuer des étapes de purification par SEC pour éviter l'obtention d'agrégats solubles.^{407,408} Nous avons produit préférentiellement CK1 δ , dont nous obtenons les meilleurs rendements (**Figure 47C,D**), et sans son IDR C-terminale autophosphorylée et inhibitrice. L'autophosphorylation lors de l'expression recombinante des CK1 en bactérie est connue et a des effets délétères sur son activité.^{405,406,409-411} Une phosphorylation sur le domaine globulaire kinase a même été mise en évidence, qui diminue son activité enzymatique d'un facteur ~ 2 . Des groupes traitent CK1 par des phosphatases après purification, mais il a été montré que la coexpression avec une phosphatase est une approche efficace.⁴⁰⁵ Les isoformes de CK1 sont censées avoir des spécificités de phosphorylation assez similaires, et nous avons décidé de travailler avec CK1 δ pour nos études d'IDPs phosphorylées. Nous n'avons pas poursuivi nos efforts pour la production de CK1 α et CK1 ϵ , par manque de temps disponible.

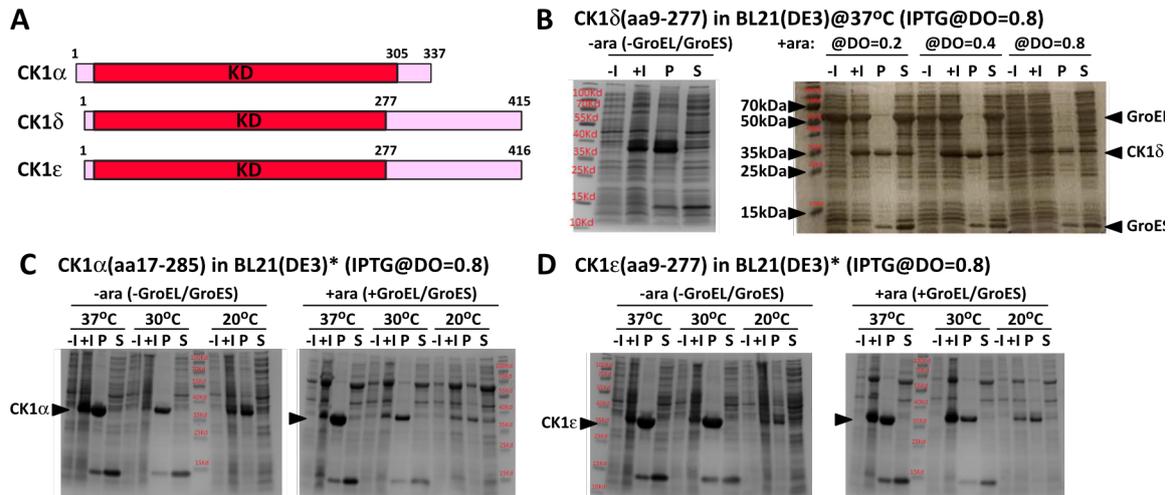


Figure 47 : **A**. Schéma des structures primaires des CK1 humaines : rouge : les domaines globulaires enzymatiques kinases ; rose : les IDRs ; **B**. Analyse SDS-PAGE de l'expression de CK1δ en *E. coli* BL21(DE3)*, avec et sans induction par l'arabinose de la surexpression des chaperons bactériens GroEL/GroES (plasmide pGro7, Takara) à différents moments de la croissance exponentielle ; d'autres chaperons ont été testés sans succès ; **C**. **D**. Tests d'expression de CK1α/ε en absence/présence de coexpression des chaperons GroEL/GroES à différentes températures. -/+ I : avant/après induction à l'IPTG de la protéine d'intérêt ; P : pellet, fraction insoluble après lyse ; S : surnageant, fraction soluble après lyse des bactéries.

AuroraA est sensée être une kinase activatrice de Plk1, qui nous intéresse beaucoup. Nous avons auparavant exprimé AuroraA et TPX2 séparément, mais nous n'avons pas observé de phosphorylation de Plk1. Nous avons donc adapté une chimère, telle que publiée en 2019,⁴¹² AuroraA-TPX2. Celle-ci est autophosphorylée sur de nombreux sites (analyse ESI-MS, **Figure 48**), sa capacité à phosphoryler Plk1 n'est toujours pas vérifiée. Nous n'avons pas eu le temps d'essayer de produire AuroraA en présence de phosphatase coexprimée, qui semble donner des résultats concluants selon l'article rapportant l'utilisation de cette chimère.⁴¹²

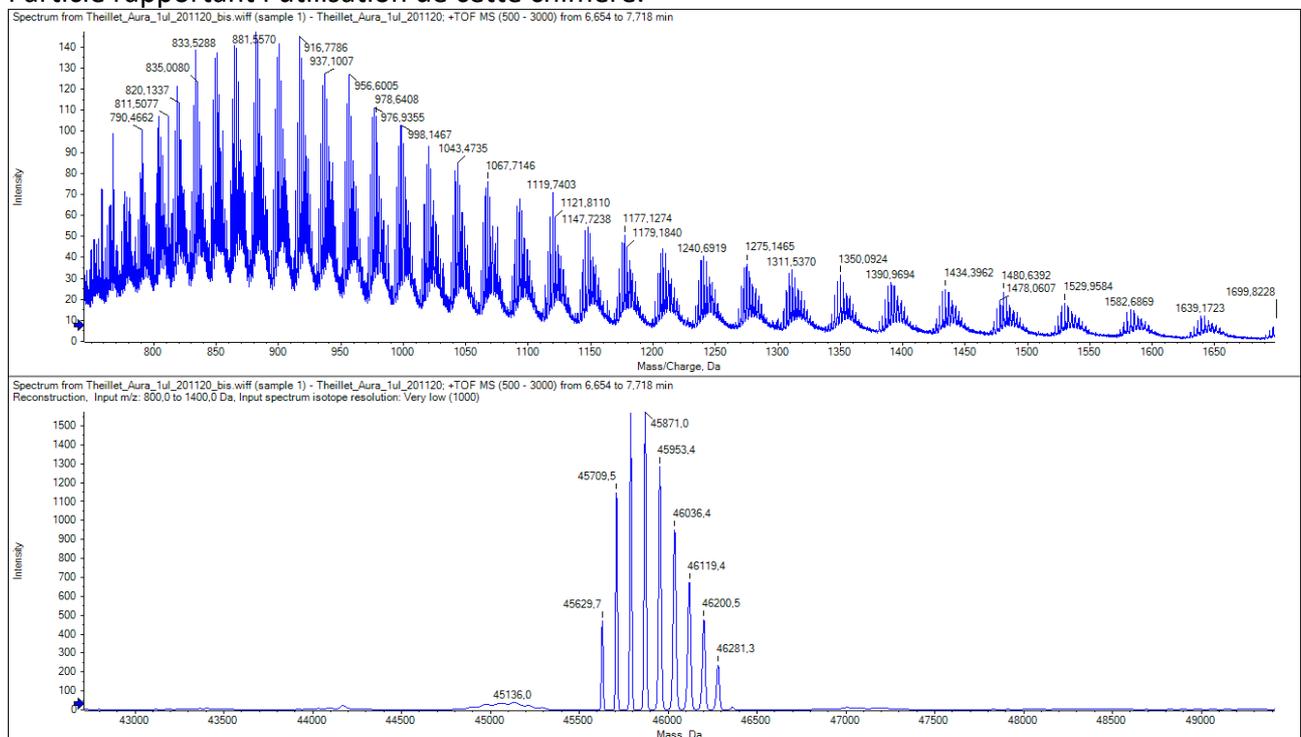


Figure 48 : Analyse ESI-MS (PF Sicaps, I2BC) de AuroraA exprimée en *E. coli* BL21(DE3)*. Poids moléculaire attendu : 44800 Da. Les différences de 80 Da entre chaque pic correspondent à des autophosphorylations

multiples, jusqu'à 8 phosphorylations par molécule, qui génèrent une population hétérogène et dont l'activité peut en être altérée.

Nous avons également produit CK2 α et VRK1 (qui ne nécessitent pas d'activation). VRK1 a été utilisée avec profit dans une publication du laboratoire.³⁸⁹ Le plasmide correspondant était contenu dans une librairie Addgene de 96 plasmides conçus pour l'expression en bactérie des domaines enzymatiques de kinases humaines.⁴¹³ Nous avons obtenu de bonnes quantités de Src par coexpression d'une tyrosine phosphatase YopH ; la production en absence de YopH est désespérément faible, en accord avec la littérature (stage B. Bayanaa, 2019) ;⁴¹⁴ la co-expression de chaperons bactérien n'a pas aidé à améliorer les rendements.

Nous avons établi les protocoles de production pour le couple et Cdk2/CyclinA2 et CyclinB1 (Cdk1/CyclinB1 : Cdk1 en cellules d'insecte) (stage C. Varela-Moreira, 2019). Nous avons purifié séparément Cdk2 et CyclinA2, puis nous les avons mélangés avec succès : ils forment un complexe qui élue en un seul pic en SEC. Nous avons également produit CKS1 et 2 (Cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 et 2), qui permettront des études biochimiques de spécificité de phosphorylation des complexes Cdk2-cyclinA2/CKS et Cdk1-cyclinB1-CKS lorsque nous aurons réussi à les phosphoryler avec Cdk7 (cf. chap. 4.2.1.b.).

Nous avons également exprimé des constructions des phosphatases Wip1 et calcineurineA/B.

Nos tentatives d'expression en bactérie du domaine enzymatique de ATR ont échoué, malgré une publication à ce sujet qui semblait prometteuse (non citée depuis 2018).⁴¹⁵

Comme nous l'avons présenté ci-dessus, nous avons exprimé Chk2 et notamment son domaine catalytique. Cependant, l'autophosphorylation hétérogène pendant l'expression est peut-être gênante si l'on veut caractériser précisément son activité sur des cibles précises. Nous n'avons pas essayé de progresser dans ce domaine, la tâche semble difficile.

Nous avons enfin tenté de produire Plk1. Cette kinase comprend un domaine catalytique activable notamment par une phosphorylation sur Thr210, et un domaine PBD qui reconnaît les motifs Ser-pThr-Pro. Une étude de 2008 avait montré que la phosphorylation de Plk1 par Slk (assez inefficace : Plk1 à 4 μ M + Slk à 40 μ M) améliorait son Km d'un facteur et son kcat d'un facteur 100, tandis que l'interaction du PBD avec un phosphopeptide MQSpTPL améliorait le kcat d'un facteur 10.⁴¹⁶ Une interaction entre le domaine kinase (KD) et le PBD, qui atténuerait la capacité catalytique du KD, semble être confirmée par une structure d'un assemblage KD+PBD et d'autres études subséquentes.^{417,418} Dans le cadre d'une collaboration avec A. Careira (Institut Curie), nous avons reçu des aliquots de Plk1 exprimées en cellule d'insecte (PF d'expression de protéine de l'Institut Curie), mais dont l'analyse SDS-PAGE montrait de nombreuses bandes de protéolyse ; l'analyse des bandes avait révélé la présence des domaines séparés de Plk1 dans l'échantillon, ce qui rendait l'analyse de son activité problématique, rendant compte d'un mélange entre protéine entière et domaine kinase seul. Nous avons tenté plusieurs approches de production recombinante pour produire Plk1 au laboratoire en cellules d'insecte ou en bactérie. J'ai conçu de nombreuses constructions qui ont révélé de nombreuses surprises. Les premières constructions intégraient la mutation de plusieurs cystéines exposées au solvant (et le rajout d'une Cys en position 162 pour permettre la fonctionnalisation ultérieure par des cages lanthanides pour une analyse structurale). L'une d'entre elles, Cys212, est proche de la Thr210 activatrice et s'est révélée indispensable à la bonne capacité enzymatique de Plk1. J'avais commis cette grossière erreur de muter la Cys212. J'ai donc « démuté » toutes nos constructions pour réintégrer une Cys212. Puis nous nous sommes rendus compte que Plk1 produisait des formes autophosphorylées hétérogènes. Une analyse de spectrométrie de masse suggérait quelques positions possibles d'autophosphorylation (Stage H. Chérot). J'ai initié une seconde série de constructions, dont les positions S103, S269 et T317 sont mutées en alanine. Malgré cela, nos analyses par SDS-PAGE-PhosTag montrait toujours au moins 3 sites d'autophosphorylation. Nous

avons finalement co-exprimé Plk1 avec la lambda-phosphatase, et nous avons obtenu une forme non- ou peu-phosphorylée de Plk1. Les tests enzymatiques sur un peptide cible fragment de BRCA2, BRCAaa186-200, ont produit des résultats cohérents (Stage N. Texier, **Figure 49**). Les constructions intégrant le KD et l'IDR de liaison avec le PBD sont très sensibles à la protéolyse. Nos dernières constructions intégrant les acides aminés 38-325 génèrent encore une sous-bande de protéolyse faible en SDS-PAGE ; les produits de dégradation des constructions 1-366, 37-366 ou 1-328 étaient bien plus intenses.

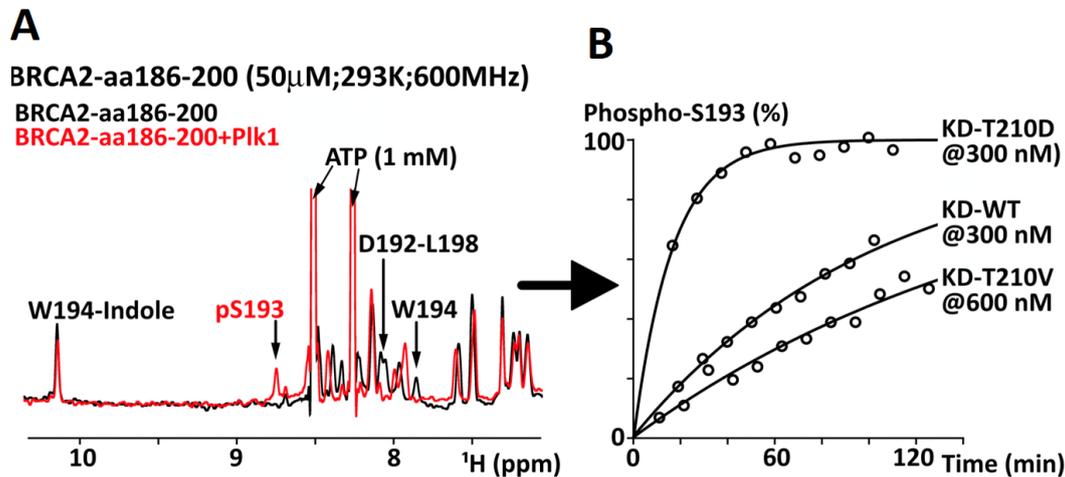


Figure 49 : Cinétique de phosphorylation de BRCA2aa186-200 par les trois constructions du KD de Plk1aa8-325_S103A-C255S-S269A-T317A. (A) Superposition des spectres ^1H 1D (600 MHz) de BRCA2aa186-200 50 μM seul (noir) et après 2h30 d'incubation avec 300 nM de KD (rouge). (B) Cinétiques de phosphorylation du résidu S193 de BRCA2aa186-200 par KD-WT, KD-T210V et KD-T210D obtenues par analyse des spectres RMN ^1H (600 MHz).

La co-expression de phosphatase est donc très régulièrement nécessaire pour obtenir une population homogène de Ser/Thr-kinase recombinante en bactérie ; cette co-expression est apparemment indispensable pour les Tyr-kinases, pour des raisons que j'ignore et à propos desquelles je n'ai rien trouvé dans la littérature. L'activation par phosphorylation d'une autre kinase est à effectuer après purification, selon notre expérience, car la co-expression engendre des multiphosphorylations hétérogènes peu contrôlées, et dont les conséquences sur l'activité et la spécificité sont au moins incertaines.

Nous pouvons donc produire des milligrammes de kinase par litre de culture en bactérie pour : p38 α activée, Erk2 activée, MKK6-2E constitutivement active, MEK1-mutée constitutivement active, CK1d, CK2a, VRK1, Src-KD, Plk1-KD, Cdk2/cyclinA2, cyclinB1, CKS1/2, Wip1, calcineurinA/B (l'activité de AuroraA et Slk n'a pas été constatée pour l'instant).

4.2.1.b. Productions en cellules d'insecte : tests, améliorations de rendements

Tandis que ~ 10000 structures PDB ($\sim 5\%$ de la PDB) ont été obtenues à partir de production en cellules d'insecte, une moitié des domaines kinases dont une structure est disponible dans la PDB a été exprimée grâce à cette approche (et $\sim 85\%$ des GPCRs).^{419,420} Ce système eucaryote permet le bon repliement de nombreuses protéines, et son utilisation a été donc au cœur de grandes avancées en biochimie et biologie structurale des 20 dernières années.⁴²¹ Cette méthode nous intéressait, car elle était nécessaire pour la production de protéines que nous étudions comme Med23 ou Cdk1 et Cdk7, mais aussi pour en tant que mode de production permettant des marquages spécifiques par

acides aminés. Nous avons testé la production de plusieurs protéines, dont Med23, Mdm2, p38 α (notre protéine modèle), Plk1, Cdk1 et Cdk7.

Le laboratoire et son plateau technique de production en cellules d'insecte (P. Drevet, puis V. Ropars, qui nous a beaucoup aidé !) utilisait en routine des cellules Sf21 (cultivées en SF900 II SFM, Gibco) et un vecteur à double entrée pKL pour la génération de bacmides, via les systèmes Multibac/EMBacY mis au point par Imre Berger dans les années 1900-2000.⁴²¹⁻⁴²³ Ces systèmes continuent à être examinés et améliorés.^{424,425} Une amélioration possible de rendements à partir de modifications simples du pKL semblait possible : quelques recherches bibliographiques suggéraient l'utilisation de séquences promotrices ou terminatrices alternatives pour l'amélioration de l'expression des protéines d'intérêt en cellules d'insecte. Parmi celles-ci, une séquence riche en AT en amont immédiat du RBS (site de liaison du ribosome, en 5' de la méthionine initiatrice) semblait accessible et prometteuse : « Syn21 », une séquence de 21 paires de bases « translation enhancer ». ⁴²⁶⁻⁴²⁸ La séquence terminatrice du gène de la polyhédrine polH semblait être aussi plus favorable que la séquence SV40 présente dans pKL. Nous avons donc testé des combinaisons 5'Syn21-3'polH, 5'empty-3'polH et 5'Syn21-3'SV40 pour plusieurs gènes (p38 α , Cdk1, Plk1). La séquence Syn21 génère une amélioration de rendement d'un facteur ~3-4, tandis que la séquence terminatrice polH semble être équivalente ou même réduire un peu les rendements par rapport à SV40.

J'ai préféré utiliser des cellules Tni, dont la production est sensée être régulièrement plus importante que celle des Sf21, et, surtout, pour lesquelles des milieux commerciaux existent qui sont déplétés en acide aminé et contenant des extraits de levure dialysés (Esf921 deltaseries, ExpressionSystem), dont l'utilisation permet l'expression et le marquage de protéines pour la RMN ⁴²⁹⁻⁴³². Ceci devrait nous permettre d'effectuer des marquages isotopiques d'acides aminés. Nous avons effectué quelques tests avec un milieu contenant une faible quantité d'extrait de levure dialysé (« modified Low Polished Yeast Extract ») complété par un mix d'acides aminés, dans lequel les cellules ne poussent pas. Nous avons commandé à l'automne 2021 un milieu contenant de l'extrait de levure dialysé en quantités normales (« Low Polished Yeast Extract », utilisé dans la littérature ^{430,431}) qui est arrivé 6 mois plus tard, et que nous n'avons pas eu le temps de tester.

Concernant l'ensemble minimal de kinases que nous voulions produire au laboratoire, Cdk1 est, jusqu'à présent, impossible à produire en bactérie. Nous avons réussi à la produire en cellules d'insecte dès la première tentative (~12 mg/L), de manière cohérente avec des travaux publiés en 2015 qui avaient aussi bénéficié de l'expression en cellule d'insecte.⁴³³ Pour être actives, Cdk1 et Cdk2 doivent être phosphorylées sur leur boucle d'activation (T161 et T160, respectivement), et en complexe avec des cyclines dédiées. Nous avons produit les cyclines A2 et B1 sans problème en bactérie (cf. 4.2.1.a.). Malheureusement, nous avons congelé Cdk1 seule à l'issue de sa purification, en absence de glycérol ; la protéine a précipité à la décongélation sans que nous ayons pu tester son association avec les cyclines. Nous n'avons pas eu le temps de répéter cette production de Cdk1.

La phosphorylation de Cdk1 et Cdk2 est effectuée par Cdk7, qui est stable uniquement en complexe avec la Cycline H et MAT1 chez les métazoaires. Des structures remarquables ont été publiées récemment de ce complexe obtenu en cryo-EM.^{434,435} Ce complexe a un équivalent monomérique chez la levure, CAK1 (pour Cdk Activating Kinase) qui a été utilisé plusieurs fois dans la littérature pour phosphoryler Cdk1/2 ; nous n'avons jamais réussi à produire en bactérie des quantités suffisantes de CAK1, en utilisant plusieurs plasmides de plusieurs laboratoires. Le groupe d'A. Musacchio a reporté récemment l'utilisation de ce CAK1 pour produire des quantités importantes de Cdk1/CyclinB1/Cks1 phosphorylé, soit en coexpression, soit après purification, mais la phosphorylation n'est pas homogène.⁴³⁶ Nous essayons de produire le complexe Cdk7/CyclinH/MAT1 tel que décrit par le groupe de E. Nogales, qui nous assurerait sans doute la possibilité de générer Cdk1 phosphorylé de manière stœchiométrique (ou presque). H. Chérot (en thèse) vient juste de produire et purifier ce trimère Cdk7/CyclinH/MAT1, dont l'activité reste à tester.

Nous avons réussi à produire des quantités intéressantes de p38 α et de Plk1. Pour autant, l'expression en cellules d'insecte via baculovirus n'est pas sans défaut. Elle reste une méthode relativement peu flexible et lente : en respectant les horaires d'ouverture et les week-ends, il faut ~1 mois depuis la réception du plasmide jusqu'à la production de protéine. On a donc aisément ~2 mois de délai entre chaque amélioration ou mutation de gène. D'autre part, les cellules d'insecte sont gourmandes en acides aminés, ~10 g/L (sans compter le glucose et l'ammonium ; les cellules sont non-viables en présence de glucose deutéré nécessaire à la deutération totale) un point problématique pour la RMN et l'enrichissement isotopique.

4.2.1.c. Productions en cellules mammifères : tests, améliorations de rendements

En laboratoire de recherche, l'expression en cellules mammifères met en œuvre habituellement en des transfections transitoires qui réduisent considérablement le temps de production, i.e. une petite semaine après réception des plasmides. Sans surprise, en temps d'urgence, de très nombreuses structures importantes de SARS-coV2 ont été obtenues grâce à l'expression en cellules mammifères.⁴³⁷⁻⁴⁴⁰ Les cellules mammifères peuvent produire des protéines portant des glycosylations natives,⁴⁴¹⁻⁴⁴³ et les systèmes d'expression récents utilisant des cellules en suspension peuvent régulièrement produire 1-10 mg de protéine recombinante dans les 48-96 h après transfection.^{441,444-448} L'industrie utilise aussi des cultures de cellules CHO monoclonales pour produire des grammes de protéine par litre au cours de cultures qui peuvent durer plusieurs mois.⁴⁴⁹⁻⁴⁵²

Nous avons effectué quelques tests utilisant des cellules HEK en suspension, soit des 293T adaptées (fournies par M. Modesti) en milieu de culture HyCell TransfX (~80-100 €/L), soit des cellules commerciales Expi293 dans le milieu commercial dédié Expi293 (~400 €/L) ou dans le milieu plus économique TranfX (p38 α , CK1 α , Mdm2, α -synucléine). Bien que relativement chers, le milieu Expi293 et les agents de transfections et boosters de Gibco fournissent des niveaux d'expression bien supérieurs, qui compensent la différence de coût avec le milieu plus économique (**Figure 50**). L'expression n'est pas tout, nous avons constaté qu'une bonne partie de la protéine produite pouvait être agrégée parfois... Nous avons également comparé les expressions de plusieurs chimères contenant soit une EGFP, soit une mVenus comme étiquette de fluorescence. Une publication récente a montré en effet que mVenus permettait des taux d'expression 2 à 5 fois plus importants.⁴⁵³ Nous n'avons pas constaté de grandes différences pour l'instant sur nos constructions. Nos protocoles de purification utilisant des His-trap peuvent être suffisamment efficaces pour des protéines bien exprimées (~2-5 mg par litre de culture ou plus). Nous améliorons actuellement notre savoir-faire dans l'utilisation de Strep-tag/Strep-tactin pour les cas plus difficiles.

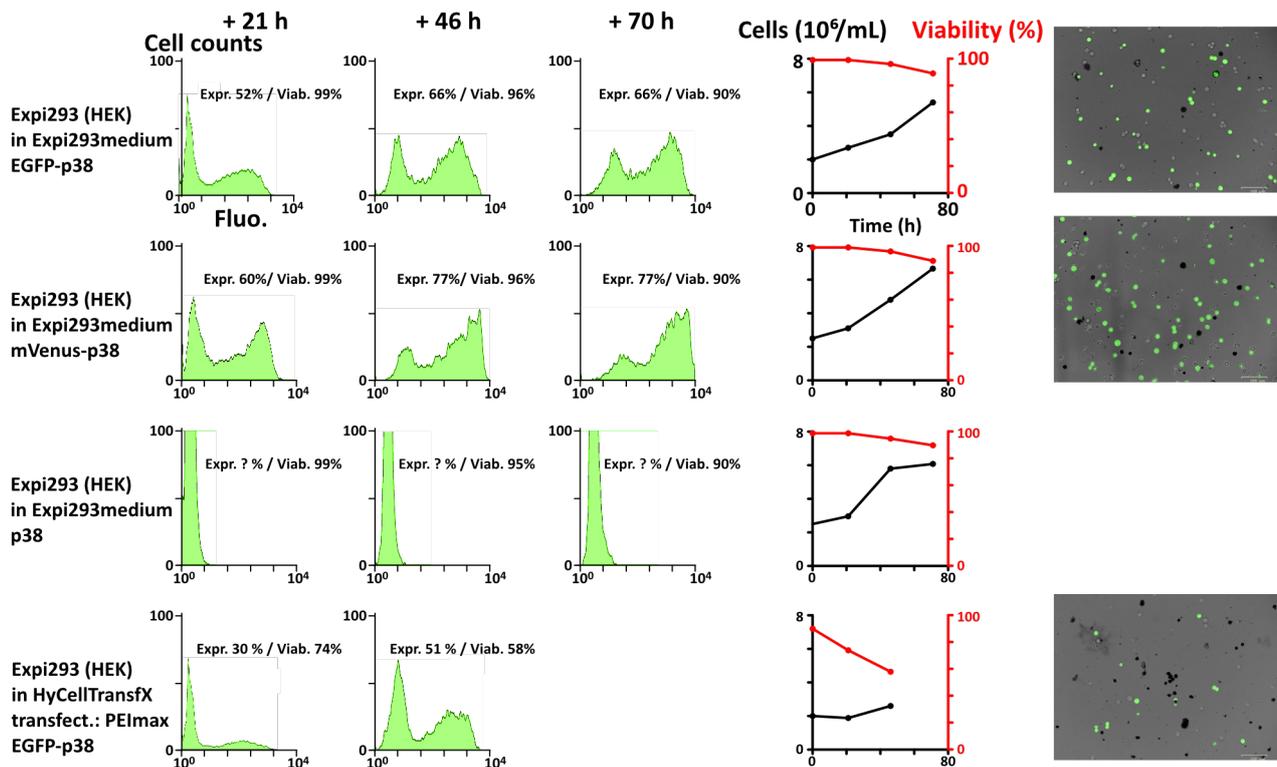


Figure 50 : Suivi de l'expression de p38 α (plasmide pcDNA5-FRT-TO à promoteur CMV) en cellule Expi293, pour des chimères EGFP-p38 α , mVenus-p38 α , p38 α , en milieu de culture Expi293 utilisant les agents de transfection commerciaux Gibco/Thermo ou en milieu Hycell TransfX avec une transfection utilisant PEIMax; la fluorescence a été suivie en cytométrie (Guava, canal YFP), mVenus et EGFP n'ont pas les mêmes spectres d'absorption donc les quantités de fluorescence ne sont pas comparables entre mVenus et EGFP; la viabilité des cellules a été suivie par bleu de trypan; l'expression en milieu HyCell TransfX a été interrompu au pout de 48h car ~50% des cellules n'étaient plus viables; la purification de EGFP-p38 α et mVenus-p38 α aboutit à un rendement de ~10 mg/L de culture (après His-trap, coupure Tev sur la nuit, 2^e His-trap puis SEC, purification effectuée par A. Bourand-Plantefol).

4.2.1.d. Quel système eucaryote utiliser pour la production recombinante ?

Je n'ai pas d'expérience dans le domaine de l'expression en levure, et je ne l'évoquerai donc pas ici. Les rendements en mg de protéine par litre de culture peuvent être similaires (mais très variable en fonction des protéines, entre 1 et 100 mg/L) en cellules d'insecte+baculovirus ou en cellules mammifères en suspension avec transfection transitoire, en utilisant les technologies et les lignées les plus récentes. Le coût par mg de protéine produite en cellule mammifère est donc plus élevé que celui en cellules d'insecte (très approximativement : ~600-700 €/L vs ~100-150 €/L en comptant les agents de transfection, les préparations de plasmide, la verrerie/consommable plastique). Les délais de production sont bien plus longs pour les productions baculovirus/cellules d'insecte, et la quantité de travail nécessaire pour produire les baculovirus est aussi importante.

Le choix du système eucaryote à utiliser dépend donc des habitudes et capacités des laboratoires. Il me semble que l'expression en cellules mammifères offre plus de perspectives, étant toujours préférée par nos amis biologistes et faisant l'objet de plus de développements technologiques, soutenus notamment par l'industrie pharmaceutique. La production en cellules mammifères semble aussi un peu plus reproductible et un moins intensive en main d'œuvre que celle en cellules d'insecte. Des lignées commerciales permettant une glycosylation homogène existent (GnTI-, que nous mettons en œuvre avec succès laboratoire d'ailleurs). En ayant les marquages isotopiques à l'esprit, les milieux de culture les plus récents semblent contenir des quantités d'acides similaires pour les deux systèmes eucaryotes.

La différence de coût entre les deux systèmes est donc en bonne partie compensé par le coût de main d'œuvre supplémentaire de l'expression en cellules d'insecte. L'expression en cellules mammifères serait donc plus en accord avec une utilisation efficace des salaires, à mon avis. Mon expérience de long terme m'incite à penser que le système français de recherche en biochimie a plutôt tendance à dépenser en salaires ce qu'elle ne finance pas en consommables. L'industrie pharmaceutique semble avoir fait le choix de l'utilisation importante de l'expression en cellules mammifères au cours des dernières années ; elle a peut-être pris de l'avance sur les laboratoires publics français dans ce domaine, qui sont pour la plupart liés à leur expertise de long terme de production recombinante en bactérie, levure ou en cellules d'insecte. Il faut bien ajouter que le choix du système de production dépend bien sûr de l'expertise locale, mais qu'il est à la fois dirigé par la question scientifique explorée, et à la fois qu'il détermine les questions explorables. S'il n'existe donc pas de système de production recombinante universellement plus efficace, il est intéressant d'avoir la capacité de les utiliser tous, pour ne pas limiter notre champ d'investigation au long terme.

4.2.2. Biologie structurale des kinases par RMN

4.2.2.a. Contexte, état de l'art

Les kinases sont des cibles de choix pour des traitements anticancer, anti-inflammatoire ou -autoimmunitaire ; 71 composés inhibiteurs de kinases étaient approuvés par la FDA en 2021, la moitié dans les 5-6 dernières années (15% de tous les composés « FDA-approved » sur cette période), et des centaines d'essais cliniques sont en cours dans ce domaine.⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁷ De manière intéressante, la famille des kinases est l'une des 3 plus étudiées pour la recherche d'inhibiteurs, mais elle reste encore sous-explorée en rapport à sa « druggability » (comment traduire cette notion ?).⁴⁵⁸

Ayant désormais notre disposition des plasmides et des protocoles permettant la production de ces kinases, nous sommes tentés –déformation professionnelle du spectroscopiste obsessionnel- d'en obtenir des spectres RMN. Certains se révèlent être de très bonne qualité pour des protéines de ~40 kDa et laissent imaginer des études de caractérisation des conformations et des interactions avec des inhibiteurs. Comment la RMN peut-elle contribuer à la compréhension du fonctionnement des kinases, *in vitro* ou in cell ? La résolution de leur structure par RMN semble être peu pertinente de premier abord en 2022. Le « kinase-fold » est connu et décrit depuis 1991, 5700 structures de Ser/Thr/Tyr kinases humaines sont présentes dans la PDB, et 315 kinases sur 518 ont une structure dans la PDB (**Figure 51**) ; AlphaFold peut sans doute nous renseigner sur celles qui restent.

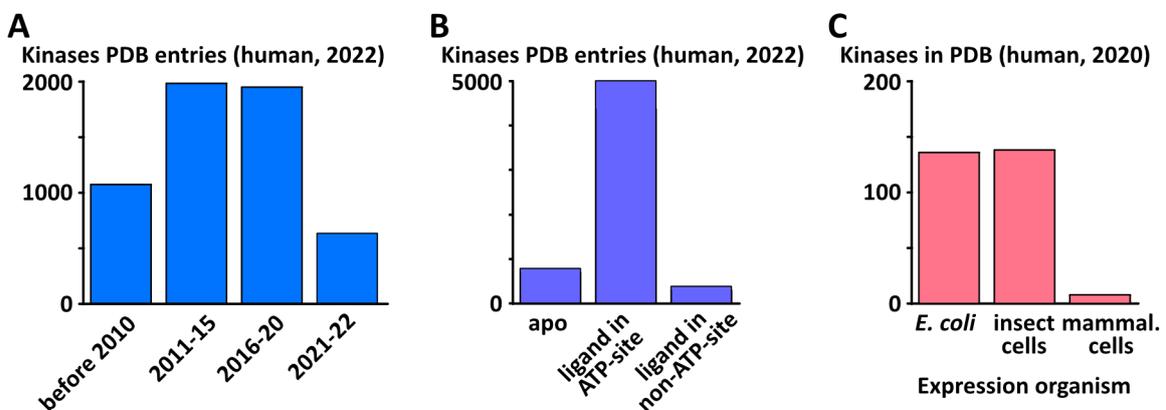


Figure 51 : **A.** Nombre de structures de domaines enzymatiques de Ser/Thr/Tyr kinases humaines enregistrées dans la PDB au cours du temps ; **B.** Nombre de structures de ces domaines enzymatiques sans ou avec ligand, et site d'occupation des ligands ; **C.** Organismes utilisés pour produire les kinases dont les structures ont été décrites. Sources : PDB et www.klifs.net⁴¹⁹

Tout n'est pas dit avec une structure pourtant, nous le savons. La plupart de ces structures ont été obtenues dans le cadre de recherches d'inhibiteurs, qui sont en très grande majorité des compétiteurs de l'ATP – là où la spécificité est la plus difficile à obtenir (**Figure 51B**). Il n'est donc pas surprenant d'observer une faible spécificité pour la plupart des inhibiteurs commerciaux, y compris pour ceux utilisés en médecine (« FDA approved ») (**Figure 52**).^{87,459–461} À propos des derniers, ils n'ont été validés que contre 45 kinases, principalement des Tyr-kinases, 90% visant le site ATP (**Figure 53B**);⁴⁵⁷ cela est sans cohérent avec leur positionnement initial dans la cascade de signalisation des kinases (**Figure 53C**). Les essais cliniques montrent une réorientation des recherches vers les kinases situées plus en aval (**Figure 53D**).⁴⁵⁷

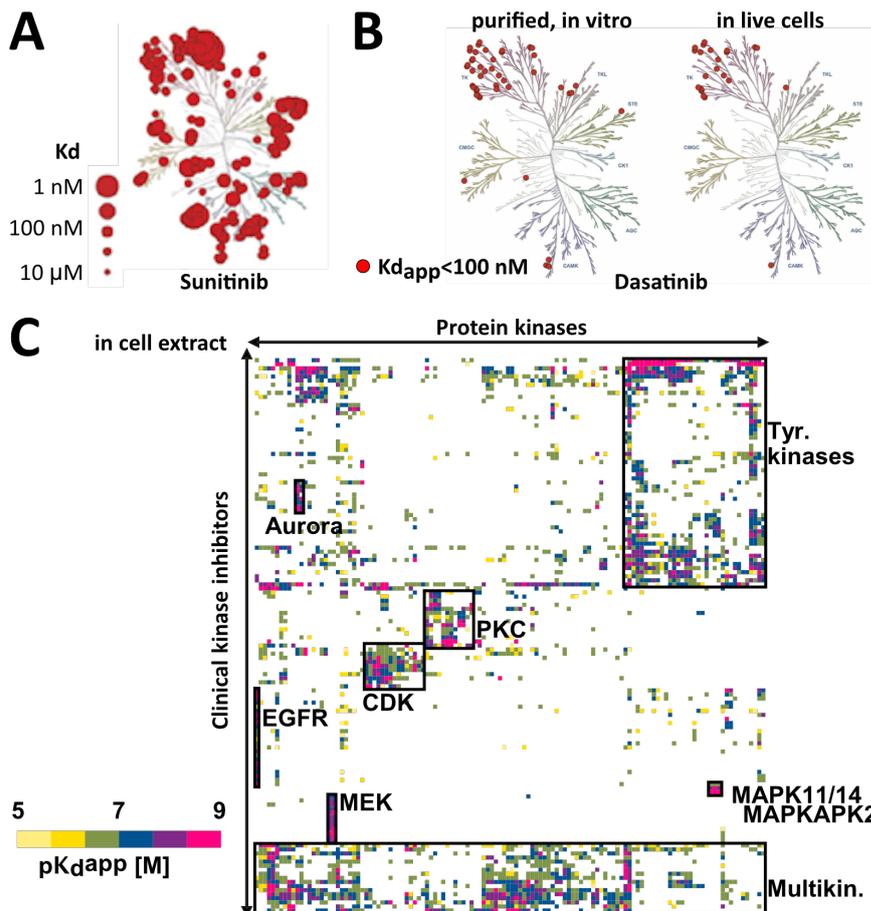


Figure 52 : **A**. Arbre phylogénétique des kinases et affinités du Sunitinib (ventes : 1.5 milliard de \$ par an) pour ces kinases (source : Karaman et al. 2009⁴⁵⁹); **B**. Idem pour le Dasatinib (ventes : 2 milliards de \$ par an) montrant que les affinités mesurées sur des kinases purifiées sont meilleurs qu'en cellule, notamment à cause de la compétition avec l'ATP/ADP cellulaire (source : Vasta et al. 2018⁴⁶¹); **C**. Mesures de K_{dapp} (analyse protéomique quantitative d'extraits cellulaires à l'issue de compétition avec des inhibiteurs fixés sur des billes) de 243 inhibiteurs de kinases évalués cliniquement pour 253 kinases identifiées/quantifiées (source : Klaeger et al. 2017⁸⁷).

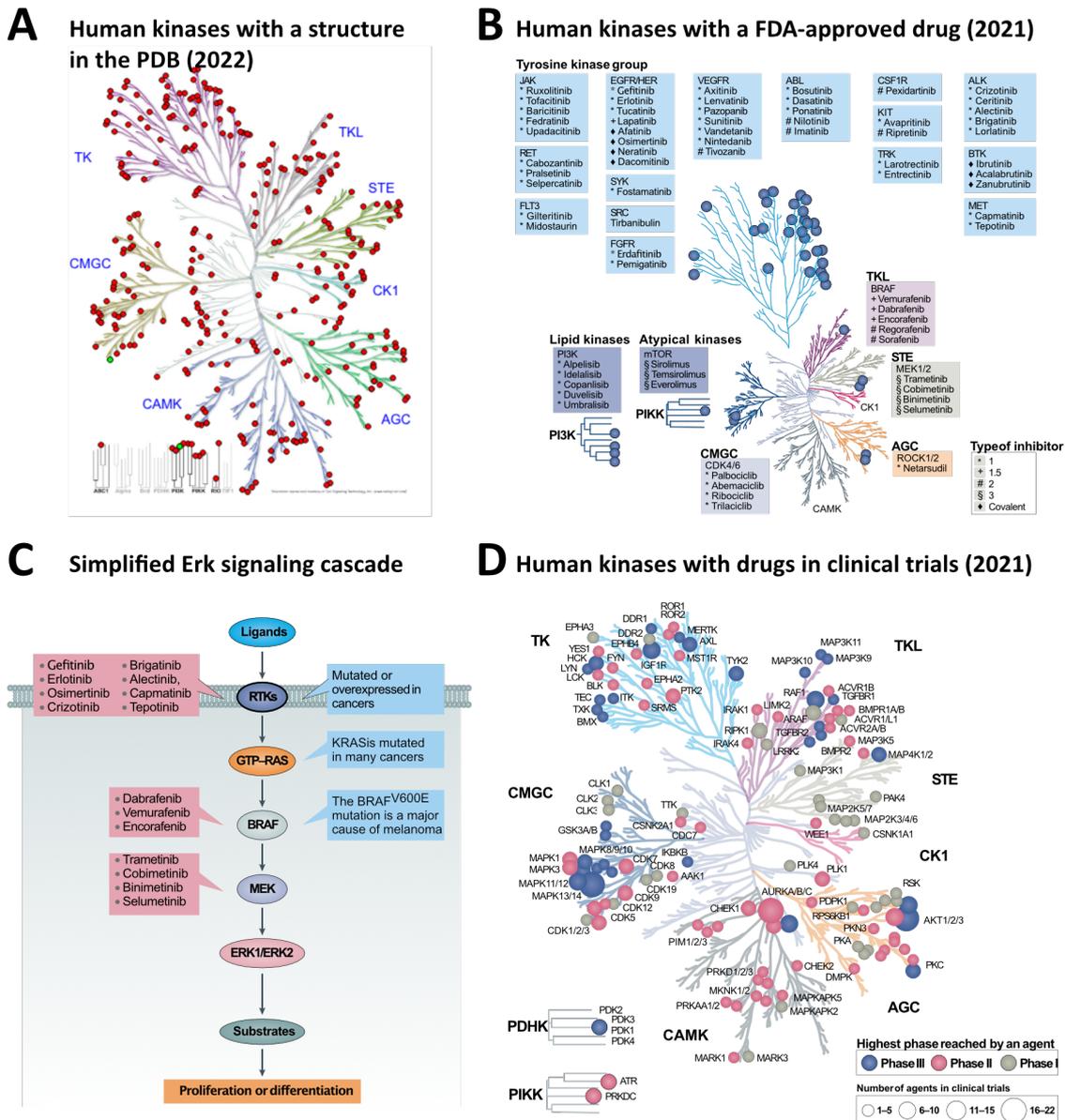


Figure 53 : **A.** Arbre phylogénétique des Ser/Thr/Tyr kinases humaines, les points rouges indiquent celles dont une structure existe dans la PDB ; presque toutes les familles ont au moins une représentante décrite structurellement (www.klifs.net⁴¹⁹) ; **B.** idem, les points bleus indiquent celles pour lesquelles un inhibiteur au moins est utilisé en médecine, approuvée par la FDA ; les Tyr-kinases sont les plus ciblées⁴⁵⁷ ; **C.** Schéma simplifié de la cascade de signalisation par les kinases de la voie Erk⁴⁶² ; **D.** Ser/Thr/Tyr kinases humaines pour lesquelles des inhibiteurs sont actuellement testés cliniquement.⁴⁵⁷

Cependant, les kinases sont des protéines présentant une grande flexibilité conformationnelle au sein du domaine kinase ; celui-ci est d'ailleurs souvent intégré dans une protéine plus large contenant d'autres domaines globulaires, dont les interactions interdomaines régulent l'activité enzymatique et/ou la localisation cellulaire (des inhibiteurs d'Akt existent qui stabilisent des interactions intramoléculaires/interdomaines par exemple⁴⁶³). Ainsi, les mécanismes allostériques sont nombreux chez les domaines kinases, et des inhibiteurs allostériques ont été développés qui sont généralement bien plus sélectifs que les compétiteurs de l'ATP.^{457,463,464} L'analyse RMN a typiquement un apport intéressant dans ce domaine, et de très belles études sur la dynamique conformationnelle et les mécanismes d'allostérie ont été publiées ces dernières années notamment par les groupes de Seeliger, Ahn, Shimada, Peti, Grzesiek, Kalodimos.^{401,465-470} Dans un très bel article, ce dernier a notamment mis en évidence l'existence de 2 états minoritaires du domaine catalytique de Abl en

solution, la conformation active représentant 90% de la population pour la kinase WT, mais cet équilibre fluctuant beaucoup avec les mutations oncogènes (**Figure 54**). Cependant les travaux de RMN ont porté essentiellement sur des kinases stables et qui s'expriment bien en bactérie (Abl, Erk2, p38, JNK, BTK), notamment parce qu'elles mettent le plus souvent en œuvre la deutération complète pour obtenir de meilleurs spectres.

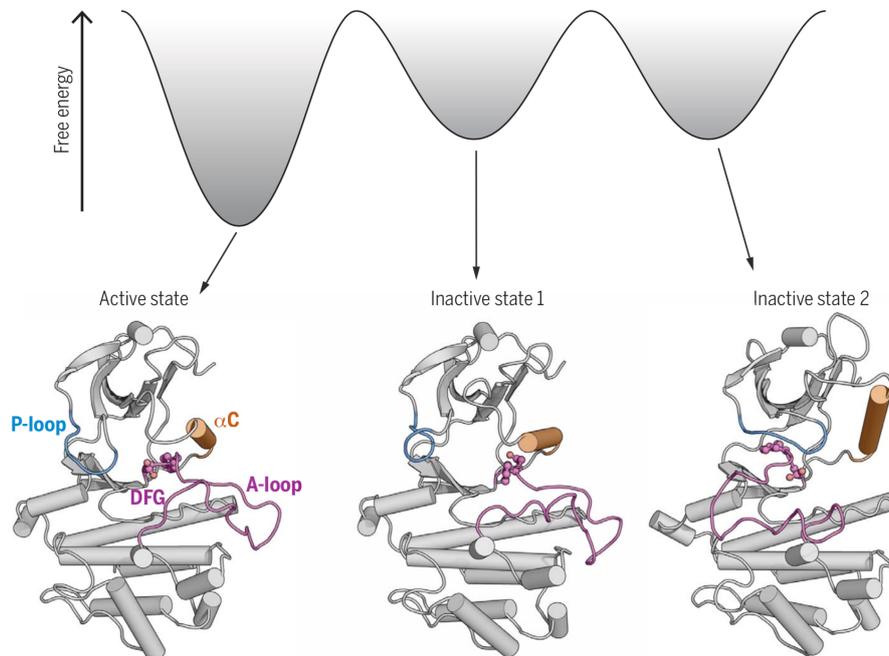


Figure 54 : Illustration de l'équilibre conformationnel mis en évidence par RMN, les équilibres et des cinétiques de transition entre conformations ont été quantifiés par 1H-13C-methyl-CEST (source : Xie et al. 2020 Science ⁴⁶⁷) ; la conformation active (« boucle DFG-in ») représente 90% de la population totale pour le domaine catalytique de Abl isolé en solution ; cette conformation est celle observé dans 90% des structures de la PDB (www.klifs.net).

J'insiste sur le fait que la plupart des travaux réalisés sur les kinases et leurs conformations ou leurs interactions avec des inhibiteurs l'ont été sur des protéines non-modifiées. Nous aurions sans doute des choses à apprendre si nous avions de meilleures capacités à produire des kinases phosphorylées. Dans le cas de Erk2 et p38, des études de RMN ont montré combien leur phosphorylation altérait leur dynamique conformationnelle et leurs interactions avec des ligands.^{401,466,470}

Ainsi, comme le plus souvent à mon avis, la RMN a plus à apporter dans la compréhension fondamentale et la quantification des changements conformationnels, et moins dans la description de structure exacte ou dans la détermination de la spécificité des ligands. De grandes avancées ont été réalisées dans ce domaine, avec l'analyse protéomique en cellule et en tissu de l'interaction de ligands (« cellular thermal shift assay » CETSA et dérivés analysé par protéomique-MS ⁴⁷¹⁻⁴⁷⁶), ou avec la quantification de l'interaction en cellule ligand:kinase utilisant le BRET (« bioluminescence energy transfer » entre une chimère kinase-nanoLuciferase et un ligand compétiteur couplé à une sonde fluorescente ^{461,477}, qui peut être couplée au CETSA ⁴⁷⁸). Ces méthodes ne sont pas sans défaut : parmi d'autres, elles ne fournissent que des indications indirectes des interactions étudiées, elles ne donnent pas d'indication sur les états de phosphorylation des protéines qui lient les ligands, la protéomique par MS peut fournir des faux-positifs ou ne pas détecter les cibles d'intérêt et est une technique destructive ne permettant pas de suivi longitudinal d'un même échantillon, les techniques CETSA peuvent être sujettes à controverse (quelle est la valeur de la quantification de la stabilité thermique « en cellule » lorsque celle-ci est évaluée après 3 minutes à 50 ou 60 °C ?), les

techniques BRET fonctionnant sur des tests en compétition peuvent aussi engendrer des difficultés pour le suivi longitudinal (quenching de fluorescence, échappement des sondes, luminomètres non adaptés au maintien des cellules en culture), et ces techniques fournissent des points finaux mais pas la cinétique de liaison. Ces techniques sont beaucoup plus sensibles et permettent un multiplexage ou une vue au niveau protéomique inimaginable pour la RMN. Cependant, leurs défauts évoqués montrent une certaine complémentarité possible avec la RMN in-cell. Celle-ci pourrait donner de l'information directe sur la cible d'intérêt, et pas sur des sondes ou la stabilité thermique, sur les conformations et les états de phosphorylation, les cinétiques d'engagement cible:ligand par suivi longitudinal dans un bioréacteur intra-spectromètre, y compris dans des organoïdes.

Je profite du libre espace de ce manuscrit pour évoquer une possibilité qu'il serait intéressant de développer au long cours. Un des problèmes majeurs de la RMN pour la recherche d'inhibiteur est son incapacité à bien distinguer les affinités protéine:ligand fortes, sous les ~ 100 nM,⁴⁷⁹ tandis que les ligands « FDA-approved » de kinases ou de GPCRs par exemple ont des affinités nanomolaires.^{480,481} En utilisant des titrations par compétition avec un ligand connu d'affinité ~ 100 nM, l'observation de la cible protéique par RMN permet des mesures d'affinité vers les ~ 10 nM, y compris en cellule vivante^{482 483}. On pense bien sûr à la faible sensibilité de la RMN qui requiert de hautes concentrations de protéine ou de ligand pour les rendre observables. Mais les ligands « FDA-approved » représentent une difficulté pour la plupart des méthodes : leur k_{off} est compris entre 10^{-1} et 10^{-5} s^{-1} .^{480,481} La RMN pourrait s'en accommoder, y compris à bas champ, y compris en cellule, en utilisant des chimères protéiques contenant des domaines de liaison aux lanthanides⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁶ : ces étiquettes paramagnétiques annuleraient les résonances de ligands de référence pré-liés au domaine enzymatique étudié, et l'exposition à un deuxième ligand fort permettrait de progressivement déplacer ces ligands de référence de leur cible; l'observation longitudinale de l'échantillon sur des heures ou des jours n'est pas problématique pour la RMN, et permettrait de voir grandir le signal du ligand de référence, et d'évaluer des $k_{\text{off}} > 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Cette idée n'existe que sur le papier pour l'instant, mais je tenterai de la réaliser un jour.

4.2.2.b. Nos cibles privilégiées

Plk1 semble être une cible de choix pour une étude RMN, maintenant que nous avons progressé et établi des protocoles de production en bactérie. Ses deux domaines KD et PBD sont en contact dans la seule structure cristalline les réunissant, et le domaine PBD semble bien inhiber le KD tant qu'un peptide phosphorylé ne vient pas interagir avec ce PBD. Le comportement en solution de la protéine entière n'est pas bien déterminé et une étude structurale pourrait permettre la conception de molécules (dé)stabilisant l'interaction entre les deux domaines.

Il serait également intéressant de comprendre comment les cibles IDPs des MAPKinases p38, Erk2, ou Cdk1/2 se comportent. Nous avons observé que Elk1, qui comporte 2 sites d'amarrage à deux sites différents de Erk2, était phosphorylée de manière très différente par Erk2 si l'on éliminait ou interchangeait les sites d'amarrage. Des informations structurales nous manquent pour bien comprendre comment ces interactions créent de la processivité et/ou de la spécificité entre les MAPKinases ou les Cdkinases et leurs substrats. Malene Ringkjøbing-Jensen travaille sur des questions très similaires avec la 3^e MAPKinase JNK. Mart Loog a mis en évidence de nombreux mécanismes de spécificité et processivité de Cdk1 en levure.⁴⁸⁷⁻⁴⁹⁰ Nous avons convenu avec lui de travailler sur ces questions sur les Cdkinases humaines.

4.3. Développements pour la RMN in-cell

4.3.1. RMN in-cell, les limites peuvent-elles être repoussées ?

Observer les protéines à l'échelle atomique dans les cellules est un objectif attrayant. La « RMN in-cell » vise à rendre cela possible, en mettant notamment en œuvre un filtre isotopique ^{15}N ou ^{13}C (Figure 55) : une espèce enrichie isotopiquement peut être observée sélectivement par RMN, y compris dans des cellules cultivées en milieu de composition isotopique d'abondance naturelle, i.e. contenant des espèces ^{14}N à 99.4% et ^{12}C à 98.9% « invisibilisées » par des séquences RMN adéquates (abondance naturelle : 0.6 % de ^{15}N , 1.1 % de ^{13}C).

J'ai publié deux revues exhaustives sur ce sujet cette année : i) la première dans *Chemical Reviews* sur les protocoles et applications pour la biologie structurale in-cell (et un panorama des techniques complémentaires)¹⁰⁵ ; la deuxième dans *Progress in NMR Spectroscopy*³⁷ évoquant toutes les études RMN sur des cellules ou tissus depuis 1950, et les informations sur l'eau, les ions, les métabolites, les parois membranaires, les acides nucléiques, les protéines, le métabolisme, la recherche/conception d'inhibiteur etc... J'ai essayé de rendre ces revues didactiques, de donner de nombreux éléments historiques, j'y explique sans équation de très nombreux principes qui font les forces et les difficultés de la RMN, particulièrement en milieu complexes. Je ne vais pas répéter ces centaines de pages ici, je redirige les lecteurs-trices vers ces deux revues.

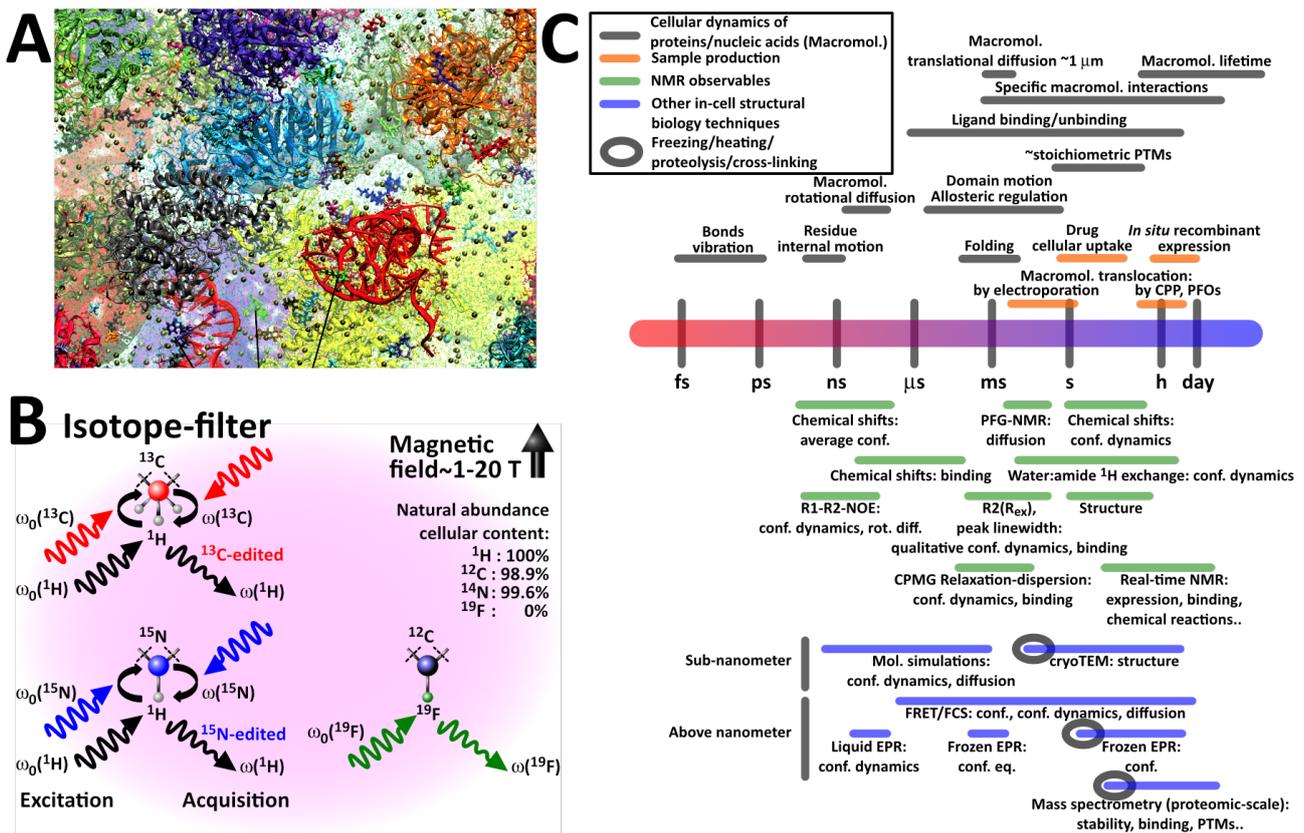


Figure 55 : **A**. Représentation du cytosol bactérien (source Yu et al. 2016 eLife⁴⁹¹ ; **B**. Schéma de principe du filtre isotopique mis en œuvre pour la RMN in-cell ; **C**. Échelle de temps des événements moléculaires en cellule (gris), des événements et techniques de translocation de molécules (orange) et observables RMN (vert) ou d'autres techniques capables de générer de l'information structurale en cellule (bleu) ; le type d'information structurale (conf. : conformation, rot. diff. : rotational diffusion, i.e. temps d'autocorrélation, etc...) renseignée par chaque observable est mentionné.

Je ne rappellerai que les points importants suivant :

- i) la taille des protéines est encore plus problématique pour la RMN en cellule, car le temps de corrélation γ est encore ralenti ; on a réussi à étudier in-cell des protéines de ~25 kDa pour l'instant (les limites ont été bien repoussées pour la RMN *in vitro*, jusqu'à 1 Mda grâce à la deutération et aux marquages ^{13}C -méthyls principalement ^{492,493}) ; les interactions non-spécifiques peuvent rendre toute une population invisible par relaxation d'échange et ralentissement du temps de corrélation ⁴⁹⁴⁻⁴⁹⁶;
- ii) les concentrations intracellulaires utilisées pour les études de RMN in-cell publiées jusqu'ici sont de l'ordre de 100 μM ou plus;
- iii) les protéines interagissant avec des assemblages macromoléculaires comme les membranes sont invisibles pour la RMN in-cell en solution ;
- iv) la RMN in-cell détecte des signaux qui peuvent provenir de plusieurs populations différentes dans la cellule ; aucune résolution sub-micrométrique n'est possible avec les techniques actuelles. C'est le plus gros défaut de cette approche, de mon point de vue ;
- v) la RMN in-cell est la seule technique capable de fournir de l'information au niveau atomique, pour toute sorte de molécule ; cette information provient directement de la molécule d'intérêt (et pas de reporters fluorescents ou de peptide fragments identifiés en masse, etc...).

Les deux premiers points appellent le développement de nouvelles idées, notamment de nouveaux marquages, pour améliorer la sensibilité de la RMN in-cell.

Au retour de mon post-doctorat, j'avais soumis un projet à l'ERC de RMN in-cell. Celui-ci proposait notamment d'utiliser l'expression de la protéine d'intérêt *in situ*, en utilisant des lignées de cellules mammifères stables inductibles exposées à des acides aminés marqués. Le projet avait été refusé, et je n'avais pas trop les moyens de mener de front les projets sur les IDPs et un projet de RMN in-cell. L'utilisation des protocoles d'électroporation des protéines marquées en cellule mammifère, développé au cours de mon post-doc, n'était en outre pas envisageable de mon point de vue : trop chers, trop chronophages, trop épuisants, ces protocoles nécessitent siestes et nuits au laboratoire, et leur efficacité est très variable d'une protéine à l'autre ; la production exogène et le stress cellulaire dû à l'électroporation prêt en outre le flan à de nombreuses critiques légitimes.

J'ai gardé cependant cette idée d'expression et marquage *in situ* à l'esprit pour le long terme, et travaillé à des développements méthodologiques duals, ayant un intérêt pour la RMN *in vitro* et in-cell. J'ai présenté les développements pour la détection ^{13}C -directe des IDPS au chapitre 4.1.3. J'explique ci-dessous un autre développement de marquage isotopique spécifique qui aurait un intérêt pour l'étude protéine globulaire en améliorant le S/N à un coût abordable (4.3.3.). Je présenterai ensuite l'approche utilisée pour générer des lignées de cellules mammifères stables inductibles (4.3.4.), et les premiers spectres in-cell obtenus avec l'approche de production et marquage *in situ* (4.3.5.).

4.3.2. Utilisation du système d'expression cell-free pour un marquage spécifique précis

Nous avons imaginé effectuer des marquages isotopiques spécifiques qui seraient compatibles avec la production et l'analyse d'échantillon de RMN in-cell, et permettraient des gains importants de sensibilité pour des protéines globulaires. J'ai notamment voulu tester l'intérêt de la deutération en position α/β d'acides aminés, qui, théoriquement, produiraient de forts gains de sensibilité (~2 à 6) pour des protéines de ~40 kDa comme les kinases.

Pour produire des échantillons de protéine purifiée et évaluer l'impact réel de ces deutérations sur le S/N de nos expériences RMN, nous avons besoin de produire des échantillons intégrant très précisément ces marquages sans dilution isotopique. Nous ne pouvons pas utiliser la production recombinante en bactérie standard : celles-ci réintègrent la plupart des acides aminés dans leurs chaînes métaboliques, produisant une dilution isotopique, ou contiennent des enzymes qui reprotonent les positions α de la plupart des acides aminés. Les productions tests en cellule d'insecte ou mammifères n'étaient pas dans nos cordes à l'époque, et auraient été onéreuses. Nous nous sommes donc orientés vers la production en système d'expression en extraits cellulaires, dits « cell-free », qui permet l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes dégradant les acides aminés, inhibiteurs qui sont toxiques pour des bactéries vivantes.

L'entreprise de distribution de consommables pour la RMN Cortecnet cherchait justement, à la fin 2017, à établir les capacités d'un kit « cell-free » produit par la compagnie Nippon Taiyo Senso avant de les commercialiser/redistribuer. Ce système a été utilisé pour la production des ~1500 protéines dont la structure a été résolue par RMN par le consortium de génomique structurale de Rikken. Il permet l'intégration d'acides aminés présentant des marquages isotopiques très précis, et très chers, mais ajoutés en très faibles quantités, ce qui permet de contrebalancer le coût de base important de ces kits.⁴⁹⁷⁻⁴⁹⁹ Nous avons convenu avec Cortecnet et Nippon Taiyo Senso que j'effectuerais des tests sur plusieurs protéines, qui permettraient à Cortecnet un retour d'expérience pour la commercialisation, et qui me donnerait accès gratuitement à ces kits. Nous avons ainsi pu tester l'efficacité de ce système, fait varier de nombreux paramètres pour comprendre comment obtenir les meilleurs rendements de production ; nous avons enfin effectué des marquages spécifiques intégrant des acides aminés marqués isotopiquement, mais aussi des acides aminés fluorés non-naturels avec succès.

Nous avons constaté que l'élément déterminant de bons rendements en expression cell-free réside dans l'élimination des structures secondaires d'ARN, notamment à proximité du RBS (ribosome binding site), qui peuvent facilement diviser par 5 la production totale. Ces structures secondaires ont des conséquences similaires en expression cell-free et en cellules vivantes,⁵⁰⁰⁻⁵⁰⁴ mais la faible concentration de macromolécules dans les extraits cellulaires clarifiés, dont d'éventuelles protéines déstabilisatrices de structures d'ARN, est sans doute responsable d'une sensibilité accrue à ce phénomène. Nos discussions avec nos collègues japonais ont amené à penser l'ajout d'éléments déstabilisateurs de structures secondaires d'ARN. Ils ont depuis montré les bénéfices de l'utilisation de cold-shock proteins ajoutées aux extraits cellulaires, qui déstabilisent les structures secondaires d'ARN et permettent d'augmenter considérablement les rendements de production, notamment à basse température.⁵⁰⁵ Cette amélioration est remarquable. Il est malgré tout indispensable de limiter le contenu en paire de base GC et les structures secondaires d'ARN à proximité de la méthionine initiateur (en utilisant par exemple des prédictors comme <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>).

Le système cell-free souffre toujours de faibles rendements pour son prix (~0.5 à 3 mg de protéine dans les meilleurs cas, pour un kit à ~400 euros), rendements décroissants avec la taille de la protéine. Son utilisation peut être rentabilisée pour des marquages à ~500 euros ou plus ; le marquage uniforme $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ est par exemple d'une facilité déconcertante avec ce système (**Figure 56A**), utilisant des mix d'acides aminés marqués en faible quantité. Des discussions récentes m'ont appris que nos collègues japonais travaillent en ce moment à réduire le coût de production des extraits cellulaires, élément essentiel dans la construction du prix des kits cell-free. En attendant, la plupart des laboratoires qui veulent utiliser cette technique génèrent eux-mêmes les extraits cellulaires bactériens S30, et ajoutent eux-mêmes des inhibiteurs du métabolisme bactérien pour éviter la dilution isotopique. Cela coûte en salaires, mais ceux-ci ne sont pas pris en compte avec la même rationalité dans le monde académique qui est souvent mieux doté en salaire qu'en fonctionnement.

4.3.3. Évaluation de l'intérêt de la deutération partielle pour le S/N en RMN ^1H - ^{15}N

La deutération uniforme est efficace pour réduire la relaxation dipôle-dipôle (DD) R_2 -DD($^1\text{H}_\text{N}$ - H_alkyl) (car $\gamma_{2\text{D}} \sim \gamma_{1\text{H}}/6.5$), et donc améliorer la finesse des pics et surtout leur intensité. Elle n'est cependant pas possible en cellules eucaryotes qui ne survivent pas en D_2O +glucose deutéré. La deutération partielle par intégration d'acides aminés deutérés est aussi envisageable, mais très chère en cellules eucaryotes. D'autre part, une deutération poussée peut générer des relaxations T1 plus lentes, et donc des durées interscans longues et de faibles rapports signal/bruit par unité de temps expérimental (i.e. utilisation coûteuse du temps de spectromètre). La deutération sélective des protons α/β , responsable de la plus grande part de la relaxation DD pourrait être attractive en termes de coût et d'efficacité, dans le cas d'une production en cellules eucaryotes ou pour la RMN in-cell.

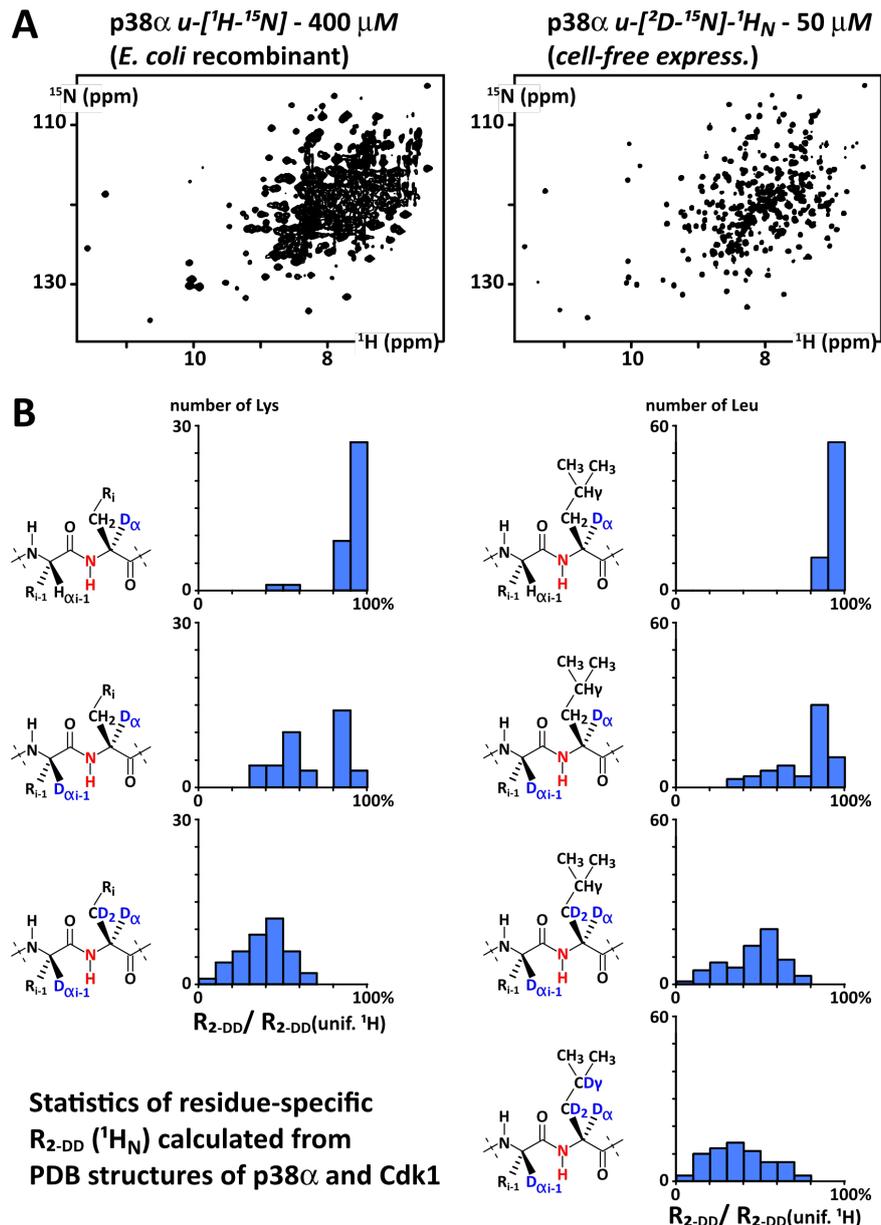


Figure 56 : **A.** Spectres 2D ^1H - ^{15}N TROSY de $p38\alpha$ enregistrés en 2h30 à 700 MHz, 298K, uniformément ^1H - ^{15}N à gauche (production recombinante en *E. coli* classique), et uniformément deutéré ^2H - ^{15}N sauf sur les $^1\text{H}_\text{N}$ amides (production opérée par expression cell-free en H_2O et utilisant des acides aminés ^2H - ^{15}N), une plus forte concentration est nécessaire pour obtenir un spectre de la protéine non-deutérée ; **B.** Statistiques et ratios des relaxations R_2 dipôle-dipôle des $^1\text{H}_\text{N}$ amides en présence

de deutération croissante, par rapport à la référence R2 en protéine uniformément ^1H - ^{15}N , calculées pour toutes les lysines et leucines présentes dans les structures cristallographiques de Cdk1 et p38 (rassemblées) en utilisant un modèle simple ou tous ces résidus auraient les mêmes dynamiques conformationnelles dans une protéine sphérique.

Nous avons en effet la capacité d'effectuer une telle deutération, soit par voie chimique, soit par voie enzymatique. Nos collègues du CEA et les chimistes de Cortecnet savent en effet deutérer les positions α et souvent β d'acides aminés libres par catalyse en présence de nanoparticules de Ru.^{506,507} Nous avons d'autre part établi notre capacité à effectuer cette deutération sur 10 acides aminés (surtout les hydrophiles) grâce à la cystathionine gamma synthase de *E. coli* et à un mutant que nous avons conçu.⁵⁰⁸ Une autre enzyme, DsaD/DsaE,⁵⁰⁹ semble capable de catalyser l'échange H/D de manière plus efficace sur les acides aminés hydrophobes ; nous sommes en train de tester ces capacités au laboratoire en ce moment.

Grâce aux échantillons produits par expression cell-free, nous avons exploré les bénéfices potentiels de la deutération en α/β des acides aminés. Les protons alpha et beta sont en effet responsables en moyenne de $\sim 66\%$ de la relaxation R2-DD($^1\text{H}_\text{N}$ - $^1\text{H}_{\text{alkyl}}$) des protons amides $^1\text{H}_\text{N}$ (**Figure 56B**), qui représente elle-même $> 2/3$ de R2 (en absence de relaxation due à l'échange conformationnel ou d'interaction à la μs -ms). Ce chiffre peut monter à 90% pour les $^1\text{H}_\text{N}$ de certains acides aminés. La relaxation DD est la composante majoritaire de R2 jusqu'à ~ 1000 MHz, la relaxation CSA peut devenir ensuite plus importante, avec des variations en fonction de la taille de la protéine. Ainsi, approximativement, réduire R2-DD($^1\text{H}_\text{N}$ - $^1\text{H}_{\text{alkyl}}$) de moitié à 600 MHz, c'est donc réduire la relaxation totale (hors échange μs -ms) d'un tiers, et doubler l'intensité des pics en ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC.

Nous avons produit des échantillons de p38 α marquées sélectivement, en utilisant des acides aminés ^{15}N - $^2\text{D}\alpha/\beta$ (Ala ou Lys ou Leu) et ^{14}N - $^2\text{D}\alpha/\beta$ (Asp/Glu/Gly/Lys) et le système d'expression cell-free (contenant des inhibiteurs pour les transaminases). Nous avons enregistré des spectres ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC exploitables avec des sensibilités inégales (**Figure 57**). Nous avons caractérisé les gains en T2 et en S/N sur p38 α pour divers marquages intégrant des niveaux progressifs de deutérations (^{15}N - $^2\text{D}\alpha$, ^{15}N - $^2\text{D}\alpha-\beta$, ^{15}N - $^2\text{D}\alpha-\beta+\text{aa}$ voisins ^{14}N - $^2\text{D}\alpha-\beta$, ou deutération homogène à 97%) : les gains expérimentaux sont très similaires à ceux prédits à partir des relaxations DD calculées depuis les distances $^1\text{H}_\text{N}$ - $^1\text{H}_{\text{alkyl}}$ des structures PDB.

La re-protonation en position α par les enzymes transaminases aurait été un problème majeur en *E. coli*, mais nombre de ces transaminases ne sont pas exprimées par les cellules eucaryotes. Il reste donc à vérifier l'intégration correcte des acides aminés marqués dans ces cellules, et le maintien de leur deutération.

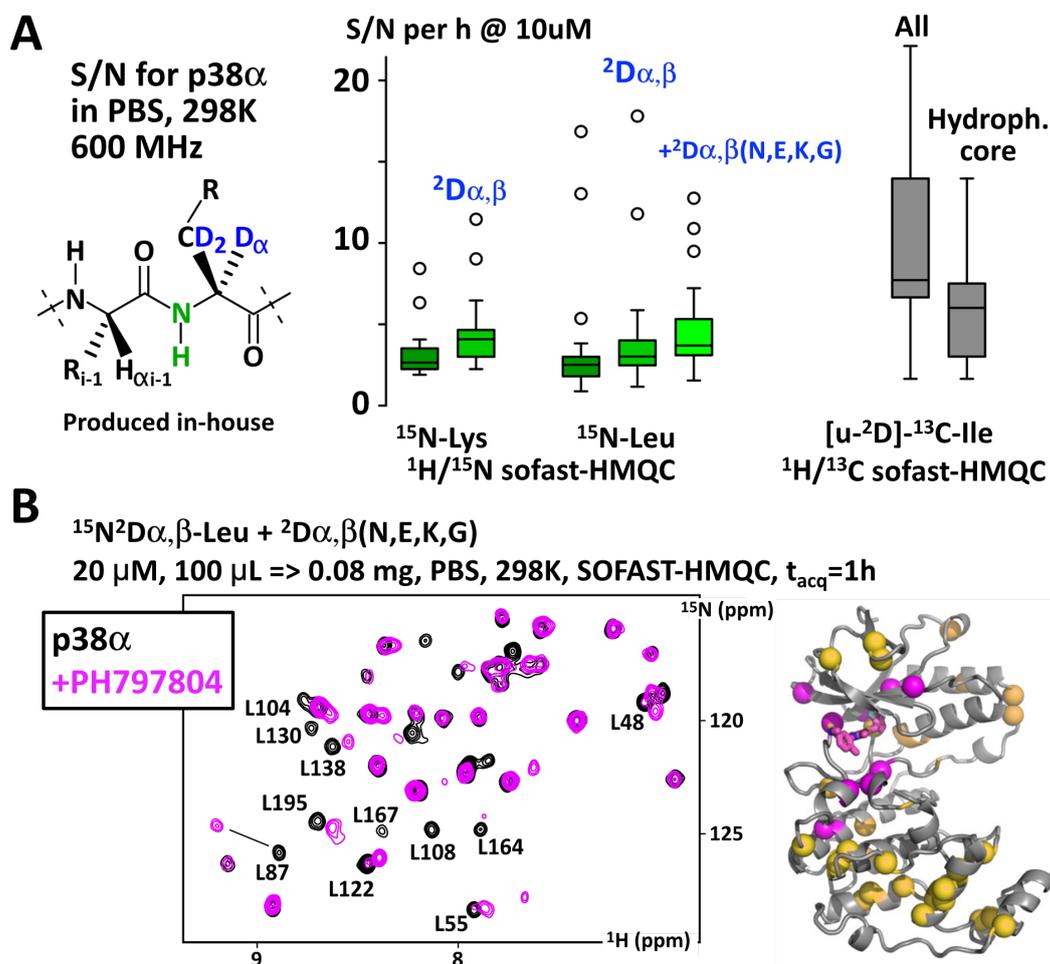


Figure 57 : **A.** Évaluation expérimentale du S/N par heure obtenu pour p38 α intégrant les acides aminés ^{15}N -Lys ou ^{15}N -Leu deutérés ou non, et en présence d'acides aminés supplémentaires ^{14}N -Asn/Glu/Lys/Gly (invisible dans les spectres, et souvent présents en $i-1$ de Leu dans p38 α) ; à gauche, nous montrons es résultats obtenus pour l'acquisition par ^1H - ^{13}C -sofast-HMQC-methyl-TROSY de p38 α uniformément deutérée sauf sur les positions $\delta 1$ des Ile, qui représente l'expérience bidimensionnelle la plus sensible dans le port-folio actuel de la RMN des protéines, les résidus exposés au solvant fournissent bien plus de signal que ceux dans le cœur hydrophobe, i.e. ceux qui renseignent sur les interactions avec des ligands ; **B.** 2D SOFAST-HMQC de 80 μg de la kinase p38 α (20 μM -100 μL) intégrant un marquage spécifique Leu- ^{15}N - $^2\text{D}\alpha$ -b+(Asp/Glu/Gly/Lys- ^{14}N - $^2\text{D}\alpha$ - β) (produite par expression cell-free), que nous avons obtenu en 20 minutes (700 MHz, cryosonde TCI, 293K), seule (rouge) ou en présence de l'inhibiteur PH-797804 (magenta). Seuls les signaux ^{15}N -Leu sont visibles, ce qui est suffisant pour obtenir une cartographie de l'interaction de l'inhibiteur sur la structure cristalline (PDB:3HLL): les sphères magenta représentent les Leu affectées par l'inhibiteur (dont les déplacements chimiques révèlent un changement d'environnement chimique). Ce marquage permet d'augmenter le signal d'un facteur de 2 à 5. Nous avons testé des marquages intermédiaires $^2\text{D}\alpha$, $^2\text{D}\alpha$ - β et $^2\text{D}\alpha$ - β +(Asp/Glu/Gly/Lys- ^{14}N - $^2\text{D}\alpha$ - β) pour les Ala, Lys et Leu qui nous permettent d'avoir une bonne quantification expérimentale des gains en S/N pour chaque état de deutération.

4.3.4. Établissement de lignées cellules stables inducibles

Nous avons testé plusieurs types de cellules (adhérentes ou en suspension) et plusieurs techniques d'expression (transfections transitoires ou stables). Il est apparu très clairement que seules les transfections stables de lignées HEK Flp-In T-Rex permettait d'obtenir des populations de cellules qui expriment des niveaux de protéine d'intérêt homogènes (**Figure 58**). Ces cellules sont

commercialisées par Invitrogen/Thermo, elles permettent d'insérer le gène d'intérêt sur un locus transcriptionnellement actif bien déterminé, dans le contexte d'un promoteur CMV fort et sous contrôle d'un répresseur de l'opérateur tétracycline TetO₂ (système Tet-on/off). Une population clonale est obtenue après double transfection d'un plasmide codant pour une recombinase (pOg44) et du gène d'intérêt inséré dans un plasmide adéquat ; la triple exposition blastidicine/zeocine/hygromycine permet de sélectionner une population clonale ayant intégré le gène d'intérêt. L'expression de la protéine d'intérêt peut être induite par l'exposition à la tétracycline ou la doxycycline (plus stable).

Des stratégies utilisant des lentivirus permettraient de générer de telles lignées sur une plus grande variété de types cellulaires, mais en intégrant les gènes d'intérêt de manière moins précise dans leur génome.

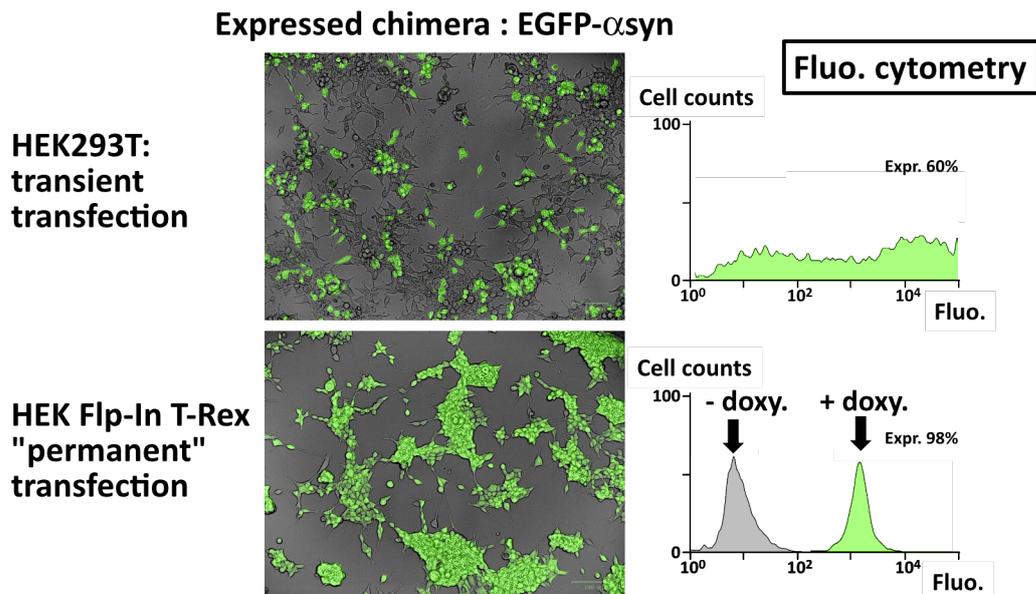


Figure 58 : Clichés de microscopie de fluorescence de cellules HEK dont l'expression d'une chimère GDP- α syn a été induite pendant 48h, et cytométrie présentant les intensités de fluorescence par cellule au sein des populations analysées ; on observe aisément l'homogénéité de la population HEK Flp-In T-rsx.

Hélène Chérot (en thèse depuis 2021) et moi-même avons généré de nombreuses lignées stables inductibles pour exprimer EGFP-TDP43, EGFP- α syn, α syn, α syn(aa1-103), His-p38 α , p38 α , EGFP-Mdm2, Mdm2, CK1a... Nous tentons actuellement d'établir des lignées pour Tau, α syn-A30P, CA2, CA3. Nous aurons sans doute à établir des lignées intégrant des répétitions de cDNA de p38 α pour atteindre des niveaux d'expression vers $\sim 10 \mu\text{M}$.

Nous avons constaté avec plaisir que nous pouvions cultiver ces lignées cellulaires indifféremment dans un milieu DMEM commercial standard, ou dans des milieux déplétés en Lys/Arg ou Lys/Arg/Leu commerciaux (adaptés pour protéomique quantitative SILAC) et complétés par nos soins, ou même dans des milieux DMEM que nous avons produits et qui contiennent les acides aminés ¹³C/¹⁵N de notre choix. Nous avons également constaté que nous pouvions cultiver ces cellules en utilisant du sérum dialysé, qui évite l'intégration d'acides aminés contenus dans le sérum standard non-dialysé (la réduction à 2% FBS ralentit la croissance des cellules d'un facteur ~ 2). Dans tous ces cas, des niveaux équivalents d'expression de la protéine d'intérêt ont été obtenus après induction de l'expression par la doxycycline, quel que soit le milieu de culture utilisé.

4.3.5. Marquages spécifiques par acides aminés ^{13}C et/ou ^{15}N ou $^2\text{D}\alpha\text{-}\beta\text{-}^{15}\text{N}$

Enfin, nous voici arrivés au terme d'une longue attente. J'attends de voir les spectres présentés ci-dessous depuis 8 ans. J'ai toujours été frustré de travailler sur des IDPs en cellule, mais à 283K. J'ai toujours été insatisfait de devoir transloquer des protéines purifiées dans les cellules, et pas de les exprimer *in situ*.

Nous avons testé avec H. Chérot plusieurs marquages spécifiques d'acides aminés ^{13}C ou ^{15}N avec nos cellules HEK Flp-In T-rex. Nous nous contentons pour l'instant de la lignée exprimant l' α -synucléine, qui produit cette protéine à une concentration intracellulaire de 10 μM après 48h d'induction par la doxycycline, et qui produit des spectres de qualité très suffisante pour évaluer la qualité et l'intérêt du marquage.

Il faut préciser que nous devons toujours enregistrer un spectre de cellules sans induction de la protéine, cultivées dans le même milieu contenant le/les même(s) acides aminés marqués ; ce spectre nous sert de référence pour le signal de fond cellulaire ayant intégré un peu d'acide aminé marqué au cours des 48 h d'incubation. Nous soustrayons ensuite ce spectre à celui enregistré avec les cellules induites, pour obtenir le spectre de la protéine d'intérêt en cellule.

Nous avons obtenu des spectres très satisfaisants pour des marquages ^{15}N -Lys, ^{15}N -Phe/ ^{15}N -Tyr, et, de manière très intéressante, de ^{15}N -Asn (**Figure 59**). Le marquage ^{15}N -Leu est moins prometteur, puisque nous avons observé que le ^{15}N était échangé et redistribué avec le reste de la cellule. Cela est cohérent avec les connaissances concernant les enzymes du métabolisme des acides aminés chez les humains (cf. <https://www.genome.jp/pathway/hsa01230>).

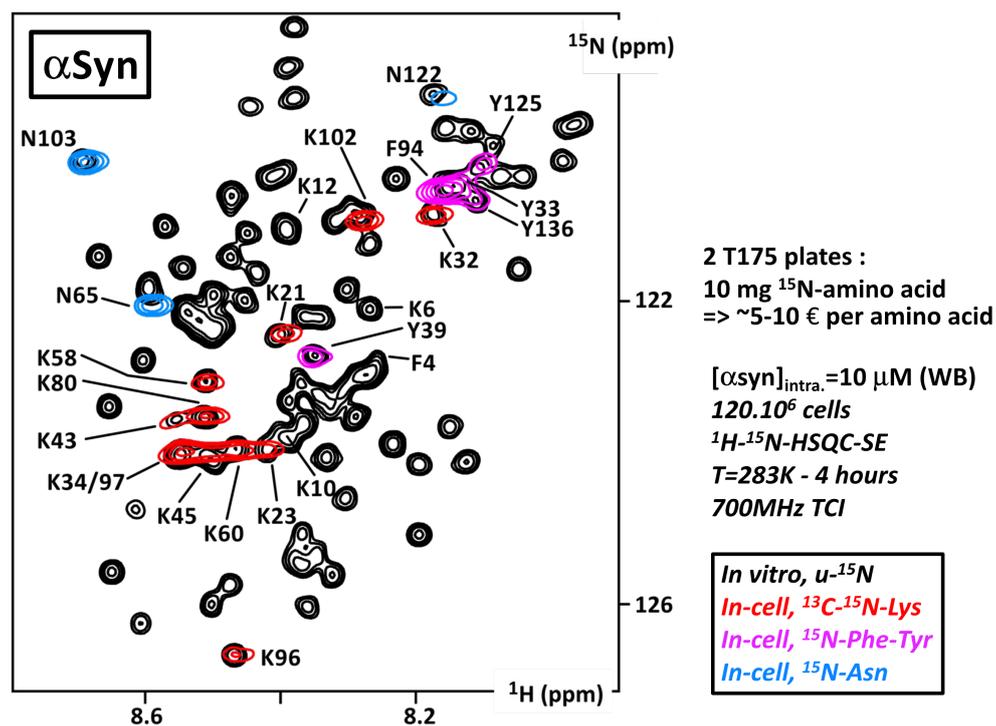


Figure 59 : Superposition des spectres 2D ^1H - ^{15}N HSQC de l' α -synucléine uniformément marquée ^{15}N *in vitro* (noir) et sélectivement marquée en cellule HEK293 Flp-In T-rex après 48h d'induction à la doxycycline en présence de ^{15}N -Asn (bleu), ^{15}N -Phe+ ^{15}N -Tyr (magenta) et ^{13}C - ^{15}N -Lys (rouge). Ces spectres sont issus de la soustraction des spectres de cellules non-induites sur ceux de cellules induites, pour éliminer le fond de signal cellulaire. Nous avons également pu enregistrer des spectres 3D ^1H - ^{13}C - ^{15}N HNCA et HNCO (un pic de la Lys101 précédée de la Lys100) avec l'échantillon ^{13}C - ^{15}N -Lys. Nous pouvons certainement augmenter le S/N d'un facteur 2 en utilisant des séquences L-HSQC. Les séquences ^1H - ^{15}N SOFAST-HMQC, plus sensibles notamment pour les IDPs,⁴⁰ donnent des résultats moins probants jusqu'à présent, en raison d'une moins bonne annulation des signaux du fonds cellulaire par soustraction avec un spectre de référence de cellules non-induites.

Puis nous avons tenté d'intégrer des acides aminés ^{13}C . Sans trop de surprise, la Met- $^{13}\text{C}\epsilon$ est intégrée, mais produit un spectre in-cell de l' α -synucléine peu informatif : les pics des chaînes latérales d'un IDP ont tous le même déplacement chimique que l'acide aminé libre, qui produit un pic très intense. Nous avons ensuite intégré de la $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Lys avec succès, ce qui nous a permis d'enregistrer des spectres $^{13}\text{Ca}^{13}\text{CO}$ à 310K d'une IDP en cellule mammifère, une première mondiale ☺ (merci à l'ICSN et à la sonde TXO pour la détection directe ^{13}C !).

Ces spectres confirment nos observations antérieures à 283K ⁵⁶ (corroborées par nos collègues suisse en 2019.¹¹⁶) : les résidus autour de la Phe4 et de la Tyr39 interagissent avec des chaperons cellulaires, de même que les 30 résidus en C-terminal.

Nous avons opté ensuite pour l'intégration des précurseurs ^{13}C de Leu et Val, i.e. keto-isocaproate et keto-isovalérate, respectivement. Ces précurseurs sont beaucoup moins chers que les acides aminés d'intérêt, et nous avons observé l'échange du ^{15}N de la Leu précédemment (cf. précédent paragraphe), ce qui nous laissait penser que les précurseurs immédiats seraient métabolisés en acides aminés par les cellules. Cette approche a fonctionné et nous avons enregistré à nouveau des spectres $^{13}\text{Ca}^{13}\text{CO}$ à 310K qui confirme encore les interactions de l' α -synucléine avec les acteurs cellulaires.

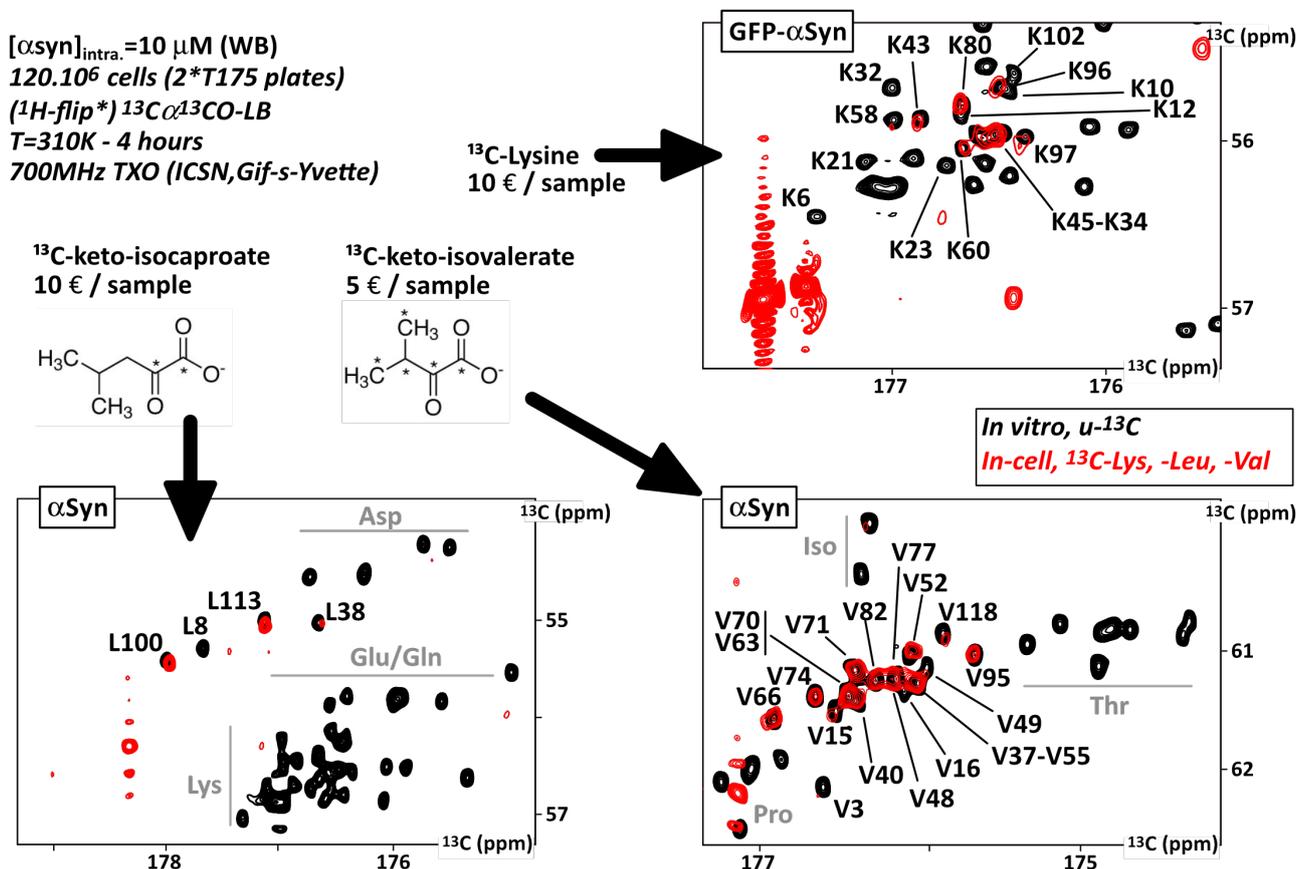


Figure 60 : Superposition des spectres 2D $^{13}\text{Ca}^{13}\text{CO}$ à 310K de l' α -synucléine uniformément marquée ^{13}C in vitro (noir) et sélectivement marquée en cellule HEK293 Flp-In T-rex après 48h d'induction à la doxycycline en présence de $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -Lys, ou $^{13}\text{C}(1,2)$ -keto-isocaproate, ou ^{13}C -keto-isovalérate (rouge). Ces spectres sont issus de la soustraction des spectres de cellules non-induites sur ceux de cellules induites, pour éliminer le fond de signal cellulaire. Les pics de faibles intensités sont ceux d'acides aminés connus pour interagir avec des chaperons cellulaires.

Nous avons aussi testé l'intégration de ^{13}C -Gly, qui semble s'échanger avec la Ser. La dilution isotopique avec la ^{13}C -Ser du milieu a produit des pics d'intensités faibles. Nous devons répéter ce

marquage en absence de Ser dans le milieu, ou en ajoutant un inhibiteur de l'enzyme catalysant l'échange Gly-Ser. Nous allons compléter cet ensemble de marquages ^{13}C par des ^{13}C -Phe, ^{13}C -Tyr qui devraient fonctionner, et nous testerons l'intégration de ^{13}C - ^{15}N -Asp. Nous publierons ensuite les résultats de cette nouvelle approche qui permet de sonder les conformations et les interactions des IDPs dans les cellules à 310K. Nous devons cependant enregistrer nos spectres dans un bioréacteur qui renouvelle le milieu nutritif, pour assurer l'homéostasie cellulaire au long terme. Nous pouvons imaginer utiliser cette méthode pour le suivi au long terme de l'agrégation d'IDPs en présence de divers stress ; des protocoles pour former des sphéroïdes/organoïdes sont accessibles qui permettront de se rapprocher encore de conditions physiologiques.

Il sera très intéressant d'appliquer la même approche pour des protéines globulaires. Nous essayons actuellement d'établir des lignées tables exprimant la Carbonic Anhydrase II, qui produit des spectres in-cell très bons,^{482,510} et de kinases. Nous allons notamment mettre en œuvre les marquages $^2\text{D}\alpha\beta^{15}\text{N}$ pour améliorer le S/N ; nous aurons peut-être à dupliquer/multiplier les gènes intégrés dans le génome des Flp-In T-rex, car les niveaux d'expression peuvent être plus faibles (p38 α pourrait être produite à ~ 2 mM avec un seul cDNA intégré).

Petit exercice prospectif, j'ai recensé les prix des acides aminés marqués dans le **tableau 1**, et le coût correspondant aux quantités nécessaires pour produire deux flasques T175 de cellules adhérentes HEK, en utilisant les quantités présentes dans le milieu DMEM classique. Certains acides aminés seront dispersés (en gris) par le métabolisme des cellules humaines, mais de nombreux peuvent être intégrés sans problème (en vert, selon nos résultats récents, ou selon la littérature). Les marquages ^{15}N sont moins chers et peut-être plus utiles pour les protéines repliées (cf. l'échange proton eau/amide à 310K chez les IDPs). Les marquages ^{13}C sur le squelette peptidique peuvent être intéressants pour les IDPs, mais aussi pour la détection directe $^{13}\text{C}\alpha$ pour les protéines globulaires (notamment pour les acides aminés $^2\text{D}\alpha$ - $^{13}\text{C}\alpha$ - ^{15}N dont la relaxation $^{13}\text{C}\alpha$ est très lente) si l'on considère les nouvelles possibilités offertes par les méthodes de deep-learning pour éliminer les couplages ^{13}C - ^{13}C dans les spectres RMN.⁵¹¹ Les marquages ^{13}C -methyls sont possibles (ils sont en ce moment testés par nos collègues de Grenoble, IBS et NMR-Bio en collaboration avec Sanofi pour le marquage d'anticorps), et pourraient être intéressants pour la RMN in-cell.

Ces prix sont appelés à fluctuer. Les fournisseurs fonctionnent sur leurs stocks pour le moment. Le prix des molécules enrichies simples (glucose etc..) a beaucoup augmenté récemment. En ce moment, il devient presque plus intéressant d'acheter des acides aminés que du ^{13}C -glucose. Les augmentations se répercuteront certainement sur les acides aminés à terme.

Acide aminé	¹⁵ N		¹³ C		¹³ C/ ¹⁵ N	
	€/mg	€/sample	€/mg	€/sample	€/mg	€/sample
Bioexpress-6000/uniforme		431.4			quote	
Ala	0.596		4.224		5.4	
Arg	12.3	30.996	11.67	29.4084	14.05	35.406
Arg silantes	1.6	4.032	3	7.56	2.6	6.552
Asn*	2.258	4.7418	14.56	30.576	17.94	37.674
Asp	0.701	1.4721	5.604	11.7684	3.2388	6.80148
Asp silantes	0.28	0.588	2.5	5.25	1.5	3.15
Cys	5.3	11.13	16.62	34.902	12.07	25.347
Glu	0.4736		5.464		2.492	
Glu silantes	1.5		2.2			
Gln	3.584		15.55		14.23	
Gly	0.239	0.45171	0.67	1.2663	2.908	5.49612
His	5.052	6.36552	14.33	18.0558	15.88	20.0088
His silantes					6	7.56
Ile	1.152	3.6288	11.6	36.54	10.8	34.02
Leu*	0.542	1.7073	10.9	34.335	10	31.5
Isocaproic*			6.49	20.4435		
isocaproic ¹³ C1- ¹³ C2			3.61	11.3715		
Lys	6.5	28.47	7.648	33.49824	6.03	26.4114
Lys silantes	2.5	10.95	5	21.9	4	17.52
Lys 2D-α/β		~15				
Met	1.534	1.3806	13.65	12.285	13.25	11.925
Phe*	0.658	1.30284	6.18	12.2364	4.752	9.40896
Phe silantes	0.42	0.8316			5.5	10.89
Pro	2.1		11.17		7.94	
Ser	1.364	1.71864	12.49	15.7374	7.328	9.23328
Thr	2.764	7.8774	11.36	32.376	8.73	24.8805
Trp	4.64	2.2272	17.8	8.544	24.64	11.8272
Tyr*	0.98	2.94	11.36	34.08	5.52	16.56
Tyr silantes					2.8	8.4
Val	0.604	1.70328	5.94	16.7508	3.592	10.12944
Isovaleric*			1.788	5.04216		
Isovaleric (¹³ C-methyls)			3.492	9.84744		
¹³ Ca ¹³ CO KLVGS				35.19996		
¹³ Ca ¹³ CO KLVGSRDNHCFY				104.42796		
¹⁵ N KCFYW		36.11004				
¹⁵ N KRDNHCFYW		47.5206				

Tableau 1 : Évaluation de la faisabilité des expériences « in-cell » utilisant les marquages sélectifs en cellule mammifère : Coût par acide aminé, calculé à partir d'achats de 100-250 mg (Eurisotop, ou Silantes si mentionné, des achats par gramme divisent les prix par deux le plus souvent) et d'échantillons obtenus à partir de deux boîtes T175 (30 mL de culture). Cases Vertes/Grises : marquages isotopiques non-susceptibles/susceptibles à la dilution isotopique (scrambling) en cellules HEK, respectivement. Cases blanches : à tester. * : récemment démontré pour la RMN au laboratoire.

5. Perspectives – Motivations

5.1. Si peu de temps : abandonner sélectivement ou persévérer systématiquement ?

Qui trop embrasse, mal étroit. Il apparaît clairement que j'ai initié trop de projets pour pouvoir les mener tous à bien : outre des efforts de bibliographie et des quantités de travail intenable, cela engendre des difficultés à finaliser des projets dans des délais raisonnables ; nous pourrions ajouter que les financements que l'on nous attribue permettent peu la dispersion des moyens.

Cet état de fait tient sans doute à plusieurs causes : i) par caractère ou par habitude, j'ai exploré plusieurs pistes pour déterminer les plus prometteuses ; ii) j'ai été recruté sur la proposition conjointe de travailler sur Mdm2, sur les facteurs de pluripotences, et sur la RMN in-cell ; iii) j'ai cherché à obtenir des financements chaque année sur des sujets pas encore soutenus, pour ne pas avoir de période vide entre deux, afin de maintenir l'expertise établie progressivement au sein du laboratoire. Je remarque que le troisième élément peut être évité lorsque l'on est bien installé dans la communauté française, et que l'on est invité régulièrement en tant que collaborateur sur des projets de financements par des collègues. Je discuterai cela plus avant dans le prochain chapitre.

Réfléchissons pratique.

Aurais-je dû persévérer autant dans l'étude des facteurs de transcription ? Je n'avais de comptes à rendre qu'à la section 16 qui m'avait admis sur ce projet, et qui aurait sans doute compris que je me consacre pleinement à Mdm2. Les questions liées au recrutement de la machinerie de transcription par les TFs me semblaient très importantes, et m'intriguaient beaucoup. Cette question semble se transformer en études sur la co-séparation de phase TFs:Mediator ; cette perspective me semble moins attrayante, à cause de notre grand retard dans le domaine (cf. USA et Allemagne) et car mon expertise centrée sur la RMN y a un apport peu convaincant selon moi. J'ai appris beaucoup de choses, j'ai dépensé beaucoup d'argent et de temps, mais peu d'opportunités se dessinent dans l'immédiat. Dois-je m'y consacrer plus avant ?

Aurais-je dû persévérer autant dans l'étude de Mdm2 ? Il me semble que oui. Nous avons passé énormément de temps à concevoir et tenter de produire de nombreuses constructions peptidiques pour caractériser Mdm2 et p53 entières, seules ou en interaction, avec et sans marquage isotopique. En chemin, nous avons commencé à décrire plus précisément les schémas de phosphorylation de Mdm2 ; nous avons intégré à cette étude la production de kinases qui servent désormais à d'autres sujets/labs ; nous avons également intégré cette étude dans nos développement méthodologiques de RMN, en synergie avec les études sur les autres IDPs et la RMN in-cell. Enfin, il semble que nous soyons proches de la description des ces protéines entières, ce qui aurait un intérêt fondamental certain de mon point de vue : comment nous représentons-nous aujourd'hui cette interaction, avant et après phosphorylation du AD ou de l'IDR2 par ATM/ATR/DNA-PK ? Nous ne le faisons tout simplement pas, car nous n'avons pas d'information structurale, et donc pas d'idées nouvelles pour interférer, tentant de manière interminable des ligands du domaine N-terminal p53-BD de Mdm2. Jusqu'où aller dans cette caractérisation et à quel moment soumettre un manuscrit ? Cela dépendra du rythme auquel nous allons, mais je pense qu'il nous faudra écrire un compte-rendu dans les 6 mois à venir, dans l'intérêt du laboratoire et des étudiant(e)s. Des travaux récents de concurrents montrent que nous devons nous dépêcher.⁵¹²

Aurais-je dû participer à ces nombreuses collaborations sollicitées par des collègues (une dizaine, je ne les ai pas toutes mentionnées...) ? Cela fait partie de mon travail, à mon avis. Elles m'ont coûté un peu, mais ne m'ont pas porté d'énormes préjudices en termes de temps et d'argent,

prise une par une. Bien sûr les petits délais accumulés font les grands retards. Dans la plupart des cas, j'avais peu d'espoir sur l'intérêt que je pourrais trouver dans ces collaborations, mais le bilan est plus mince encore. Les quelques collaborations sollicitées par des collègues étrangers étaient portées par des étudiants/post-docs qui se sont concentrés sur un projet différent ou sont partis sans vrais résultats. Le peu de collaborateurs français qui m'ont contacté pour des ANR ont échoué, et n'avaient sans doute que peu d'intérêt réel pour les aspects structuraux. Les aides au sein de mon laboratoire prennent du temps et font partie de ma fonction.

Aurais-je dû tenter de produire toutes ces kinases ? Je n'ai pas trop de regrets à ce sujet. L'investissement en plasmides, en stages d'étudiants et en temps d'ingénieur est déjà très utile et sera valorisé avec les années, à mon avis. De nombreux groupes commencent à me contacter à ce propos. Cela me procure surtout désormais une certaine indépendance dans l'étude des IDPs.

Aurais-je dû collaborer avec Cortecnet pour l'évaluation des kits cell-free ? Cette étude m'a pris pas mal de temps, et m'a finalement coûté plus cher qu'elle n'a rapporté à la plate-forme RMN. Elle a cependant permis i) de recruter une ingénieure pendant un an (R. Ghoul, aujourd'hui en fin de thèse avec S. Zinn-Justin, une belle histoire donc), ii) de me familiariser avec ce mode de production et les questions de biologie moléculaire afférentes, iii) de rencontrer des collègues japonais très compétents dans le domaine auprès desquels j'ai beaucoup appris, iv) d'expérimenter et de caractériser de nouveaux marquages isotopiques, qui m'ont aidé à explorer de nouvelles applications RMN que je trouve prometteuses. Je pense notamment que ces marquages rendront la RMN in-cell de protéines globulaires plus faisable. Le travail utilisant ces kits cell-free n'a pas encore été valorisé en publication, mais le sera dans les mois qui viennent dans *Journal of Magnetic Resonance* (contribution invitée), un journal à réputation forte et sérieuse dans la communauté.

Aurais-je dû me relancer dans des études de RMN in-cell ? J'avais initialement délaissé ce champ scientifique, pensant que les protocoles actuels étaient trop difficiles à mener à bien dans les conditions de nos laboratoires (trop cher, trop de travail de nuit, etc..). Je voyais mal quelles questions poser avec ces méthodes. Je m'y suis remis après le confinement, i.e. après avoir eu le temps d'écrire des revues à ce sujet et de réfléchir à de nouvelles approches. Celles-ci ont séduit le comité du CEA déterminant l'attribution de bourses de thèse, et a permis de recruter une étudiante (H. Chérot) avec qui nous accumulons de nombreux succès depuis une petite année. Je pense que les méthodes que nous mettons en ce moment au point seront très utiles au long terme ; elles rendent sans doute la RMN in-cell tout simplement faisable en routine. Les retours des collègues en conférence sont très positifs. Il va nous falloir valoriser nos résultats rapidement en publications, étape par étape, pour éviter d'être malmenés par la concurrence.

Spontanément, des projets se closent (cell-free notamment), d'autres sont en pause qui va certainement durer (facteurs de transcription), d'autres sont en développement régulier (Mdm2, p53, Chk2) ou plus soudain (RMN in-cell). La caractérisation de Mdm2/p53/Chk2 prendra encore au moins 2-3 ans. J'ai envie de porter les études de RMN in-cell pendant plusieurs années. De telles études sont clairement faisables sur les IDPs, qui pourraient être menées avec intérêt notamment dans les cas liés aux agrégats amyloïdes. Cependant, les lignées cellulaires modèles au sein desquelles nous pouvons effectuer ces études seront insatisfaisants pour les spécialistes de la question. Je ne suis pas encore certain de pouvoir les mener sur de nombreuses enzymes, mais celles-ci seraient peut-être plus attrayantes que les IDPs pour la communauté environnante : il est simple d'expliquer l'intérêt d'observer une enzyme en cellule, ses interactions avec des ligands ou ses changements de conformation.

D'une manière plus générale, au long terme, je me pose la question de savoir si l'étude des IDPs est à privilégier, ou s'il ne vaudrait pas mieux se consacrer aux kinases. Les IDPs ont l'avantage de coûter moins cher pour les marquages isotopiques et l'attribution. Cependant, il m'a été difficile de trouver des collaborations dans la communauté française des biologistes, sans lesquelles peu de financements sont accessibles. Je trouve toujours que la question de la régulation des TFs par leur

phosphorylation est un sujet intéressant, mais je vois mal comment progresser dans ce domaine, sauf à rencontrer des collaborateurs introuvables jusqu'ici. Ne vaudrait-il pas mieux alors travailler sur les kinases ? Les travaux préparatoires sur la régulation de Plk1 sont notamment prometteurs à mon avis. J'ai notamment le sentiment qu'il serait plus aisé (pour moi) de développer une argumentation adaptée à l'esprit des financements ANR dans le cadre de l'étude d'une kinase que d'une IDP : structure, inhibition, allostérie... bref des concepts habituels et permettant la conception d'interventions thérapeutiques.

Je m'étais mis en position d'explorer différentes voies de recherche pour le long terme au cours de ces dernières années. Je vais évacuer les résultats non-publiés dans les mois qui viennent pour me consacrer aux directions qui me paraissent les plus évidentes : Mdm2-p53, les kinases, la RMN in-cell.

5.2. Directions futures – Une époque scientifique exaltante, et comment y contribuer ? A quoi sommes-nous bons ?

5.2.1. Mon panorama de la biochimie actuelle et de ses grandes avancées

Nous avons la chance de vivre une époque de production prolifique de biochimie et de biologie structurale, dont les résultats remplissent les pages des journaux de plus haute réputation depuis plus de vingt ans. Plus de 7000 structures de protéines/acides nucléiques sont publiées chaque année depuis 20 ans, des multitudes de protéomes et leurs téraoctets de peptides sont publiées pour toutes les cellules et tous leurs états, des kilogrammes de protéines recombinantes sont produites par l'industrie pharmaceutique en cellules mammifères, des vaccins ARN sont produits à l'échelle industrielle en quelques mois... Nous avons obtenu énormément d'information sur les structures et sur la dynamique des GPCRs,^{513,514} celles des agrégats amyloïdes prélevés chez des patients,⁵¹⁵⁻⁵²⁰ sur l'organisation de la chromatine et des gigantesques complexes de la machinerie de transcription,^{275,276,521,522} pour ne donner que quelques exemples saillants. De plus, nous réalisons l'importance des domaines désordonnés de protéines et des phénomènes de séparation de phase liquide:liquide et de condensats,^{164,165,167,171,523-526} qui engendrent des conditions radicalement différentes de la biochimie classique des espèces diluées homogènes.⁵²⁷⁻⁵³⁰

Nous vivons l'avènement de la cryo-EM à résolution atomique^{531,532} et des outils de prédiction de structure assisté par deep-learning comme techniques dominantes.⁵³³⁻⁵³⁵ Les outils de protéomiques continuent de faire des avancées technologiques et épistémiques majeures, permettant la détermination des interactions d'un ligand avec des protéomes entiers ou l'évolution de ces protéomes,^{475,536} la cartographie sans doute quasi-exhaustive des réseaux de proximités et d'interaction protéine:protéine/ADN/ARN cellulaires^{537,538} -aussi réalisée par double-hybride⁵³⁹-, la résolution de protéomes ou de transcriptomes unicellulaires dans des tissus,^{540,541} etc... Nous devons prendre en compte et utiliser toutes ces avancées dans nos recherches, et adapter ou réorienter nos questions, en essayant de contribuer au mieux avec nos moyens.

5.2.2. Quelles questions aborder pour que notre expertise soit la plus utile ?

Époque passionnante donc, et aussi parfois frustrante : on aimerait participer plus à toutes ces avancées. Comme toujours, la RMN est sensible à tout, permet d'étudier de très nombreux et divers phénomènes, mais elle est rarement la meilleure méthode pour le faire, à cause de sa faible sensibilité. Elle a des atouts majeurs bien connus dans l'étude des macromolécules, la capacité à

donner de l'information résidu par résidu et à quantifier les phénomènes de dynamique conformationnelle et les populations associées ; ^{467,493,542} les contributions de la RMN se maintiennent dans leur qualité et quantité ces 20 dernières années, et soutiennent la comparaison de manière avantageuse par rapport aux autres techniques, au regard de la taille des communautés et du temps d'apprentissage très long que la RMN avancée requiert.

Ici, je pourrais formuler un vœu : celui d'avoir un outil de prédiction des déplacements chimiques pour les protéines globulaires. Ceci permettrait d'éviter les étapes très ardues d'attribution de ces protéines, notamment de nos jours pour des protéines de haut poids moléculaires étudiés par RMN des méthyles. Pour les protéines globulaires (les IDPs sont beaucoup plus facilement traitées), ces étapes consomment beaucoup de temps et d'argent, et laissent de nombreux étudiants exsangues, finissant leur thèse avec une attribution mais n'ayant pas le temps de l'utiliser. Avec une prédiction structurale Alphafold, quelques génies devraient bien réussir à établir un tel outil pour nous alléger du poids de ces attributions (qui se combine aux coûts devenant exorbitant de marquage et de temps de spectromètre). Nous pourrions nous dévouer alors aux analyses de conformations, de dynamiques et d'interactions de manière bien plus productive pour la communauté scientifique.

5.2.2.a. Que faire avec les IDPs ? Identifier des partenaires et des états de PTMs natifs est nécessaire.

Les IDRs représentent 1/3 du protéome humain. La RMN est la seule technique à pouvoir donner cette information résidu par résidu. Il semble presque évident de travailler sur les protéines à IDRs, qui ont de plus le bon goût de générer des signaux RMN intenses. Il est remarquable à mon avis que nous ne soyons toujours pas très avancés dans la compréhension de l'organisation tridimensionnelle de ces protéines multidomaines. Peu d'information précise existe, sans doute à cause de la difficulté de produire et purifier ces objets.

Un appâté sur quelques cas spécifiques : dans le cas des très longues protéines contenant plus de 5-6 domaines, faut-il d'ailleurs analyser purifiées et isolées ? Quel le sens aurait la description de protéines nucléaires purifiées (e.g. BRCA1/2, 53BP1, CBP/p300) qui contiennent des milliers d'acides aminés désordonnés présentant des dizaines de sites d'interaction, et qui sont donc perpétuellement engagées dans des complexes multiples et hétérogènes en cellule ?

Dans le cas plus général de l'analyse de segments IDRs, un des grands problèmes auquel la communauté qui étudie les IDPs a fait face, c'est la difficulté de trouver des partenaires pour décrire leurs interactions fonctionnelles. Une grande proportion de publications a concerné une petite liste de protéine bien connues, dont les partenaires étaient bien connues. Puis on a étudié les IDRs de virus, ou de facteurs de transcription, sans souvent pouvoir faire beaucoup plus que confirmer leur état d'IDR. Un problème était celui de l'état de modifications post-traductionnelles, qui régulent très souvent les interactions des IDRs avec leurs partenaires ; or nous produisons ces protéines le plus souvent en bactérie, et les capacités à produire des échantillons modifiés sont faibles. D'autre part, les méthodes manquent pour détecter les interactions de faibles affinités (mais de forte spécificité) que les IDRs permettent d'établir. Cette intuition m'avait amené à imaginer l'utilisation de pull-downs utilisant des IDRs phosphorylées ou non, pour établir des « interactomes » phosphodépendants après analyse protéomique par spectrométrie de masse des partenaires piégés (cf. chapitre 4.1.2.c.). Cette approche, que les spécialistes de protéomique intègrent dans la famille des « AP-MS » (Affinity Purification coupled to Mass Spectrometry) était chère pour nos moyens, et peut-être pas la plus adéquate ; nous ne le saurons pas tout de suite, car il semble bien que j'aie sélectionné la mauvaise protéine pour établir une preuve de concept, i.e. Sox2 qui génère de la séparation de phase.

Les méthodes AP-MS sont de plus considérées comme ne permettant pas la détection d'interactions transitoires de faibles affinités. Des méthodes développées au cours des 10 dernières années utilisent le marquage en cellule par biotine, établi par la protéine d'intérêt concaténée à une enzyme permettant la biotinylation des voisins ou partenaires cellulaires. Ces méthodes dites de « proximity-labeling » couplée à une analyse de spectrométrie de masse (utilisant les méthodes dites BioID ou APEX et leurs dérivés) ont l'air finalement plus adaptées aux interactions transitoires ; elles permettent de dériver des interactomes avec peu de recouvrement par rapport aux AP-MS et sont considérées comme complémentaires (ce qui est partiellement dû à la détection de partenaires non-directs ou voisins cellulaires non-partenaires).^{537,543–545} Je n'étais pas très enclin à l'utiliser, car j'avais l'intuition que les IDRs produiraient de très nombreux faux-positifs en étant marquées trop facilement, car très flexibles, occupant beaucoup de volume et établissant des interactions transitoires faibles avec tout leur environnement. Une étude récente a un peu confirmé cela, mais il semble que ce biais ne génère pas de si graves problèmes.⁵⁴⁶ Des IDRs partenaires de la calcineurine ont été détectés récemment par BioID.⁵⁴⁷ Les interactomes de 109 facteurs de transcription ont également été publiés au début 2022 par BioID et AP-MS.⁵⁴⁸

D'autres méthodes d'identification d'interactions IDRs:protéine existent. N. Davey et Y. Ivarsson ont récemment mis au point l'utilisation du phage-display sélectionnant une grande banque de peptides d'IDRs humains (~10⁶ peptides de 10 résidus ou moins) par un domaine globulaire d'intérêt.^{547,549–551} Il est également possible d'utiliser le profilage de thermodénaturation du protéome d'extraits cellulaires (thermal profiling analysé par MS) en présence/absence de peptides d'intérêts.⁵⁵² Les expériences de double hybride en levure pourraient être utilisées pour identifier des interactions IDRs:protéine car elles peuvent détecter des interactions de faibles affinités (~20 µM), mais elles sont souvent limitées et peuvent produire faux-positifs ou négatifs, par exemple par la nécessité pour les protéines étudiées d'être transloquées au noyau, et de ne pas être toxiques pour la levure.⁵⁵⁰

Les techniques de BioID et AP-MS ont également été utilisées pour identifier les substrats de kinases en cellule.^{553–555} Utilisant des souches de levure exprimant chacune une kinase humaine parmi 266, le double-hybride a permis de déterminer les kinases responsables de la régulation d'interactions IDR:protéine.⁵⁵⁶ Les gigantesques listes de sites phosphorylés sont souvent compliquées à interpréter, la fonctionnalité et la stœchiométrie de chacun de ces sites étant difficiles à connaître.¹⁷⁴ Les approches évoquées au-dessus vont peut-être permettre de démêler enfin ces questions.

Tous ces développements à haut débit sont extrêmement récents ; ils sont produits par des experts des méthodes évoquées, et notre rôle sera d'utiliser au mieux les informations publiées. Celles-ci changent radicalement la situation pour le biochimiste/structuraliste des IDPs. Les structuralistes ont aussi l'expérience régulièrement répétée des déceptions d'interactions publiées qui ne produisent aucun symptôme d'interaction en RMN/ITC/... Nous devons donc fouiller ces listes d'interactome, les croiser avec des analyses de co-évolution etc... (attention aux nombreux motifs courts d'interactions dégénérées au sein des IDPs, qui ne seront sans doute pas les plus intéressants à caractériser).

5.2.2.b. Produire des protéines phosphorylées

Produire des IDPs phosphorylées pour caractériser leur comportement structural sera certainement intéressant. Beaucoup de travaux ont produit beaucoup de connaissances sur le comportement structural des IDPs, mais peu de choses sont décrites sur l'impact des phosphorylations. De plus, la forme phosphorylée est souvent celle capable d'interagir avec ses partenaires. Ces phosphorylations peuvent être obtenues par voie enzymatique, en présence de kinases. Cette approche produit toujours des échantillons assez hétérogènes : pour phosphoryler à 100% un site favorable,

on est le plus souvent obligé d'accepter quelques pourcents de phosphorylation sur d'autres sites ; où se situe la limite entre site fonctionnel ou non ? (La cellule fait le ménage en permanence sur les sites de phosphorylation peu favorables grâce aux phosphatases.) Les approches chimiques par production de peptides phosphorylés, éventuellement allongés par ligation, peuvent être envisagées. L'utilisation du réencodage du codon amber est aussi possible pour intégrer des Ser/Thr phosphorylées,⁵⁵⁷⁻⁵⁶⁰ mais les rendements pour une IDP contenant de nombreux sites de phosphorylation seront forcément faibles. Nous avons essayé de mettre en œuvre ces méthodes sans grand succès (mais nous ne nous décourageons). La voie enzymatique est donc pour l'instant la plus fructueuse.

L'étude structurale des kinases phosphorylées serait également intéressante. La plupart des structures et des inhibiteurs ont été obtenus avec des kinases non-phosphorylées, i.e. non-activées. Ces phosphorylations provoquent des changements structuraux importants au sein des kinases. De plus, des travaux ont montré sur p38 ou Erk2 que la phosphorylation de la boucle d'activation pouvait radicalement changer leur dynamique conformationnelle (cf. 4.2.2.). Nous sommes en situation de produire Cdk1/2, Plk1 phosphorylées par leur kinase en amont que nous produisons aussi ; leur étude par RMN serait certainement riche d'informations. De plus, des exemples existent qui montrent que les kinases peuvent avoir des motifs préférés de phosphorylation qui dépendent de leur propre état de phosphorylation.^{406,561}

En plus des aspects fondamentaux, la phosphorylation des kinases pourrait avoir des avantages dans la recherche d'inhibiteurs plus spécifiques.

5.2.2.c. La biologie structurale in-cell

Je me suis beaucoup exprimé à ce sujet dans mes deux revues sur la RMN in-cell.^{37,105} Je ne vais donc pas m'étendre trop à nouveau sur cette question. Il me semble que la biologie structurale en cellule est un champ scientifique important à explorer dans les années à venir : i) d'un point de vue fondamental pour savoir à quel point les comportements conformationnels observés *in vitro* sont affectés (ou pas) en cellule, ii) pour toutes les applications possibles, depuis le suivi de l'agrégation de protéines amyloïdes, jusqu'aux cinétiques de liaison de ligands à leur cible, en cellule ou en organoïdes. J'ai expliqué les ressources spécifiques de la RMN et sa complémentarité avec les autres méthodes (RPE, FRET, spectrométrie de masse, cryo-ET) dans l'exploration de ces questions dans les revues évoquées plus haut.

Cela passera nécessairement par l'utilisation de marquages isotopiques et de séquences d'impulsion produisant le signal le plus intense possible. Je pense sérieusement que nous pourrions appliquer nos méthodes à des organoïdes (nous nous sommes réparti la tâche avec un collègue qui a des résultats extrêmement prometteurs à ce sujet ; je m'occupe des marquages). Nous avons donc un rôle à jouer, le rôle habituel d'une spectroscopie extraordinaire, i.e. produire de l'information singulière sur la structure, la dynamique et les interactions des macromolécules, et désormais dans des conditions très proches de leur milieu physiologique. Cela est signifiant, je le crois, mais surtout ça m'amuse. Je vais donc travailler dans cette direction.

6. Après-propos

6.1. Réflexions brèves sur le paysage – Quels contrats pour les nouveaux entrants, quel avenir pour la biochimie et la RMN françaises ?

Au risque de la trivialité : la science est faite par des humains, dans un environnement et en utilisant les ressources allouées par la société. Pour bien décider et gérer nos orientations scientifiques générales et nos projets plus ponctuels, pour bien encadrer et conseiller les étudiants, il faut réfléchir aux conditions d'exercice et de productions dans lesquelles nous évoluons.

Il me semble être du devoir de celles/ceux qui dirigent les recherches d'expliquer clairement que l'évolution des conditions d'exécution de la recherche est problématique. J'évoque ici quelques questions au contenu peut-être polémique à ce sujet, c'est une postface, on ne parle plus de science, cela n'engage que moi.

Je peux commencer par un sujet malheureusement consensuel, celui de l'emploi scientifique en France, particulièrement celui de la recherche en biologie/biochimie: on demande aux ingénieur(e)s et docteur(e)s de signer des CDDs pendant de nombreuses années, qui ne permettent pas d'avoir de poste avant ~32 ans dans la plupart des cas; on peut ajouter l'invention récente des « chaires d'excellence » qui promettent un CDI après 40 ans ; et l'on s'étonnera de la désaffection des femmes pour les carrières de chercheuses/PI. Considérant les limites d'âges plus contraignantes dans la vie des femmes, il me semble illusoire de rétablir la parité souhaitée pour les recrutements dans ces conditions. Cela n'empêche pas les exceptions, heureusement. Mais la période de contrats instables pour les jeunes chercheurs/euses continue de s'allonger et elle n'est utile ni bénéfique à personne.

Si elle se répand dans toute la société, cette CDDisation de la jeunesse est mise en œuvre dans le domaine de la recherche par la systématisation du financement par projet, qui permet le plus souvent le recrutement d'un(e) technicien(ne)/ingénieur(e)/doctorant(e)/post-doctorant(e), opérateur pratique et matériel du projet lauréat. Cette approche a ses vertus, elle porte en elle aussi beaucoup de contradictions et d'inefficacité : programmer la recherche fondamentale à 3 ans n'est pas réaliste, c'est globalement accepté ; ces 3 ans passés, succès ou pas du programme de recherche, l'opérateur(trice) partira. Le renouvellement/turnover a ses avantages dans un laboratoire, mais ce principe est poussé à l'extrême aujourd'hui, conduisant les individus qui établissent l'expertise pratique dans les laboratoires à toujours les quitter rapidement. Cette organisation mène-t-elle à plus ou moins d'efficacité ? plus ou moins d'applications et de brevets ? La réponse n'est sans doute pas la même pour les technologies et les idées matures ou en phase d'exploration, sans doute pas la même en fonction des disciplines et de leurs spécificités. La biochimie/biologie structurale est une activité assez intensive en « main d'œuvre » et demande un savoir-faire assez fin dans la production d'échantillon ; elle s'accommode assez mal de la perte régulièrement répétée de ce savoir-faire pratique, à mon avis. Nous assurons un travail important de formation des ingénieur(e)s en début de carrière, mais dès que leur expertise se confirme, nous les voyons partir (pour un autre emploi en CDD). Notre progression en est handicapée.

Abordant le sujet de la biochimie en France, essayons d'évaluer son évolution comparée au reste du monde. La biochimie et la biologie structurale ont été historiquement bien plus implantées et développées en Grande-Bretagne, aux USA, en Allemagne qu'en France. Environ cent ans de développements et de spécialisations scientifiques diversifiées n'ont pas fait de la France une contributrice de 1^{er} rang dans ce domaine. Il me semble tout de même que la pente est négative. Plusieurs éléments récents me chagrinent, l'un d'entre eux, symbolique, est facile à présenter : à

ma connaissance, nous n'avons installé que 1 ou 2 microscopes électroniques 300 keV en 10 ans, quand les allemands ou les anglais en installaient ~25, une cinquantaine aux USA (j'imagine que les chiffres chinois sont au moins les mêmes). Cela fait du temps de mesure accessible chez nos voisins, entendais-je. Mais comment développer une expertise, des savoirs-faires spécifiques pour une technique aussi empirique dans la génération d'échantillon, lorsque l'on peut mesurer 1 fois par mois (et que les collègues anglais/allemands testent 3 fois par jour leurs productions au sous-sol de leur bâtiment) ? En chiffre, j'avais une heure à perdre : en 2020-2021-2022, ~70-75 publications par an utilisant la cryoEM comme outil principal étaient publiées dans *Nature* ; ~15 utilisant la cristallographie, la moitié en support de la cryoEM ; ~6-9 utilisant la RMN, la moitié en support de la cryoEM ou la cristallographie ; ~1-2 publications par an utilisant la cryoEM provenait de France ; ~<5 provenaient de France dans les domaines de biochimie-biologie structurale (les synchrotrons et les spectromètres RMN tournent encore). *Nature*, ce n'est pas tout ; mais mon sentiment est que nous laissons passer une génération de découvertes en biologie structurale, les conséquences économiques existeront. Nous économisons des millions et dépenserons des milliards ? Cela rappelle la situation rencontrée avec un vaccin récent.

Nous avons dans le même temps observé la plate-formisation systématique de très nombreuses techniques. On entend la hiérarchie « Si ça ne coûte rien, les gens font comme si ça n'avait pas de valeur et utilisent mal les instruments » (on aimait donc faire n'importe quoi avant 2005-2010 sans doute...). Imaginons que cette logique soit valide : les analyses payantes de plate-forme ne sont visiblement pas suffisamment financées, puisque les instruments sont très souvent sous-utilisés. On en déduit qu'il est plus efficace de laisser les instruments vides que de les laisser en accès gratuit ? Sur ce point, je prête le flanc aux critiques : je n'ai pas accès aux chiffres d'occupation et aux bilans comptables, mais je sais discuter et observer. Ainsi, j'entends que soit nos parcs de plate-forme sont surdimensionnés, soit le financement par projet pousse à négliger des analyses utiles par soucis d'économies, soit l'enveloppe globale de financement est sous-dimensionnée.

Où alors certaines activités sont plate-formisées sans tenir compte de leur inadaptation à ce modèle ; j'en viens à mon avis sur la question : la RMN des macromolécules n'est pas bien adaptée au modèle plate-forme selon moi. Une technologie est adaptée au modèle plate-forme i) lorsqu'elle est opérable par des technicien(ne)s ou ingénieur(e)s, ou même ponctuellement par des utilisateurs externes formés sur un temps court, ii) lorsqu'elle répond à des questions à l'intérêt immédiat et pour des champs scientifiques variés, iii) lorsque ses analyses sont produites dans des délais courts, iv) lorsque le coût de ses analyses correspond aux financements accessibles. La RMN des petites molécules coche ces cases, la RMN des macromolécules correspond très mal à ces descriptions. L'expérience pourrait être faite : rendons les synchrotrons payants pour les académiques, nous verrons si les taux d'occupation se maintiennent, si des équipes de non-structuralistes envoient leurs protéines à cristalliser sur les robots, et si la production de biologie structurale s'améliore.

Des spectromètres à haut-champ sont installés, des chercheurs ont été recrutés pour y faire de la RMN structurale, les questions de ce champ scientifique sont spécifiquement pensées par ces chercheurs, qui connaissent les capacités de cette technique, et qui produisent leurs idées spécifiques d'exploration fondamentale de la matière. Les mettre en lien avec la communauté des biologistes est indispensable, mais croire que cette communauté peut ou veut les mettre à son service est inopérant : les biologistes ont des idées de biologistes, donnez-leur 300 euros, ils n'achèteront pas un jour de RMN.

Concrètement : les prix d'utilisation des spectromètres 600-700 MHz sont évalués aujourd'hui ~200-300e par jour. Au long terme, il profite à tous de bien se représenter les protéines : savoir que les protéines sont des molécules flexibles, avec des équilibres de conformations, des domaines repliés ou non, voilà un ensemble de représentations mentales qui permet de mieux réfléchir, que la RMN a très largement contribué à installer. C'est notre travail de recherche

fondamentale, qui se poursuit en appliquée parfois. Au court terme, je ne connais pas de biologiste cellulaire, pas de biologiste des plantes, pas de microbiologiste etc... qui soit demandeurs-euses de description fine de dynamique conformationnelle des protéines dont il cherche à établir les fonctions et leur régulation. Et encore moins qui serait prêt à payer 300e par jour l'utilisation d'un spectromètre RMN pour explorer la question. Si cela peut faire bien pour une collaboration ANR-compatible, pourquoi pas. Un(e) RMNiste sera intégré(e) au projet et financera l'étude des questions structurales pour lesquelles il/elle a été recruté((e) naguère. Un financement type ANR pourra bien assurer 50 jours de spectromètres ? mais combien reste-t-il pour les isotopes et les colonnes de purification ? de quoi produire les 10-20 beaux échantillons deutérés à 2000 e comme nos collègues américains qui font de beaux articles ? Eux aussi payent à l'activité, au temps d'acquisition, mais on leur donne de quoi payer. Une plate-forme RMN des macromolécules payante, c'est donc une communauté d'utilisateurs avancés, et des financements ou des subventions tenant compte de la spécificité et du coût de cette activité. Nos instituts sont confrontés aujourd'hui aux difficultés de coûts de fonctionnement des spectromètres RMN. Les chercheurs adossés à ces spectromètres n'ont pas les fonds pour le faire non plus, nos financements suffisent à peine à produire nos échantillons.

Les coûts croissants de l'énergie et de l'hélium liquide m'angoissent assez. Les parcs de spectromètres ont été pensé et dimensionné à une époque où l'on produisait des structures par RMN, qui consommait beaucoup de temps de spectromètre. Aujourd'hui, les analyses de dynamiques conformationnelles qui se publient bien concernent des protéines de larges poids moléculaires (>40-50 kDa) ; elles aussi nécessitent de longues acquisitions, mais surtout des marquages isotopiques onéreux couplés à une deutération poussée des échantillons. Ces productions sont le plus souvent trop chères pour les laboratoires de RMN français. Nos spectromètres sont ainsi sous-utilisés de mon point de vue.

Dans les conditions de financements actuels, il est impossible d'en faire assumer les coûts par les utilisateurs, qui sont déjà bien en peine de financer la production d'échantillons. Rajoutons le marquage isotopique en ^{13}C actuellement prohibitif, (1g glucose atteint 250e) qui nous limite considérablement (selon mes sources, la production de ^{13}CO , base de l'industrie du ^{13}C , est effectuée principalement en Russie ; une grande partie du ^{13}C est désormais utilisée pour la production de ^{13}C -urée pour des diagnostics d'infection par *Helicobacter pilori*).

De nature, je suis un peu peureux envers l'avenir, j'ai maintes fois argumenté pour la sobriété en termes de spectros, je n'aime pas beaucoup la course au plus-grand-plus-gros-beaucoup-plus-cher (cf. le 1.2 GHz). Je constate avoir tort dans la manière dont nos sociétés fonctionnent : avoir les meilleurs instruments, même 2x plus chers pour 10% meilleurs, c'est attirer les meilleurs et produire le meilleur à terme. Mais, pour la RMN que je connais, produire le bon échantillon avec le bon marquage, cela coûte quelques milliers d'euros en plus, pas quelques millions. Et cela rapporte beaucoup plus. Si l'on répartissait les millions des gros spectromètres en milliers pour les échantillons des équipes française, je suis certain que le solde serait positif. Nos sociétés ont besoin de symboles, c'est une des sources récurrentes de mauvaises décisions, mais aussi de motivation. Je néglige peut-être cet aspect.

Je répète pour finir que la situation de nos financements ne nous permet pas du tout de soutenir le rythme des innovations en biochimie des pays les plus importants. Et je comprends aussi que les choix budgétaires sont nécessaires.

« Avoir le pessimisme de l'intelligence, et l'optimisme de la volonté » Antonio Gramsci.
« Concilier une pensée pessimiste et une action optimiste. C'est là le travail des philosophes. »
Albert Camus

Dans cet esprit, je travaille au mieux.

6.2. Remerciements

Il faut tant d'aide pour rendre un peu de science possible. Et tant d'aide pour rendre la vie autour aussi possible. Je ne vais pas faire de liste exhaustive, il me faudrait 100 pages de plus.

Bien sûr je remercie mes plus fervents supporters, ma mère et mon père ; merci à mes chefs d'équipe Muriel Delepierre, Philipp Selenko, Jean-Baptiste Charbonnier et Sophie Zinn-Justin de m'avoir permis tant de choses ; Catherine Simenel qui m'a appris patiemment à utiliser le spectro avec patience, je lui dois beaucoup ; je remercie mes collègues de post-doc Akis Liokatis, Andres Binolfi et Honor May Rose qui m'ont beaucoup appris et beaucoup aidé ; Virginie Ropars avec qui nous avons maintenu le labo fonctionnel ces dernières années, et qui m'a beaucoup aidé tout court ; je remercie tous mes collègues de labo, qui m'ont supporté vaillamment toutes ces années ; et je remercie mes collocs PierreGui, PE, Huguette et Léa pour les mêmes raisons au carré. Le nombre de personnes qui m'ont aidé est infini, tou(te)s celles et ceux qui ne sont jamais cité(e)s dans les publications, les veilleurs de nuit du FMP-Berlin qui ont tellement essayé de m'apprendre l'allemand, les prépeateurs-trices et les lab-managers-euses qui ont passé sous silence toutes mes bêtises, les responsables sécurité et les flics qui n'ont jamais compris pourquoi j'étais si bête sans mes gants, sans mes lumières, et qui m'ont laissé vivre ; tous mes collègues qui ont compris que je parlais trop si on me demandait et qui préfèrent me laisser tranquille ; et FranceCulture qui m'a accompagné, écoutez France Culture si vous êtes arrivés là. Et je remercie tous les cyclistes du monde.

Je sens ici le besoin de m'excuser auprès de ma famille et de mes amis, que je néglige trop souvent pour quelques minutes et heures de travail en plus. Je veux trop faire sans doute, sans savoir faire vite et simple. Je réussis surtout à être dans l'urgence et le tourment depuis 15 ans de vie de chercheur. Je me répète qu'il faut changer de mode de vie, mais il tient à un mode de pensée de ma manière de faire un peu de science, de mon acharnement à trouver quelque chose d'utile et de la charge de travail qui y correspond. Si la pression des financements se relâchait, si les efforts antérieurs n'étaient pas menacés d'inutilité par l'attrition des moyens... Faire plus simple pour vivre mieux ? J'ai la volonté d'y arriver dans les temps qui viennent.

Références

- (1) Theillet, F.-X.; Saul, F. A.; Vulliez-Le Normand, B.; Hoos, S.; Felici, F.; Weintraub, A.; Mulard, L. A.; Phalipon, A.; Delepierre, M.; Bentley, G. A. Structural Mimicry of O-Antigen by a Peptide Revealed in a Complex with an Antibody Raised against Shigella Flexneri Serotype 2a. *J. Mol. Biol.* **2009**, *388* (4), 839–850. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.057>.
- (2) Theillet, F.-X.; Simenel, C.; Guerreiro, C.; Phalipon, A.; Mulard, L. A.; Delepierre, M. Effects of Backbone Substitutions on the Conformational Behavior of Shigella Flexneri O-Antigens: Implications for Vaccine Strategy. *Glycobiology* **2011**, *21* (1), 109–121. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq136>.
- (3) Theillet, F.-X.; Frank, M.; Normand, B. V.-L.; Simenel, C.; Hoos, S.; Chaffotte, A.; Belot, F.; Guerreiro, C.; Nato, F.; Phalipon, A.; Mulard, L. A.; Delepierre, M. Dynamic Aspects of Antibody:Oligosaccharide Complexes Characterized by Molecular Dynamics Simulations and Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance. *Glycobiology* **2011**, *21* (12), 1570–1579. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr059>.
- (4) Theillet, F.-X.; Chassagne, P.; Delepierre, M.; Phalipon, A.; Mulard, L. S. Multidisciplinary Approaches to Study O-Antigen: Antibody Recognition in Support of the Development of Synthetic Carbohydrate-Based Enteric Vaccines. In *Anticarbhydrate Antibodies : From Molecular Basis to Clinical Application*; Kosma, P., Müller-Loennies, S., Eds.; Springer-Verlag, 2012; pp 1–36. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0870-3_1.
- (5) Gauthier, C.; Chassagne, P.; Theillet, F.-X.; Guerreiro, C.; Thouron, F.; Nato, F.; Delepierre, M.; Sansonetti, P. J.; Phalipon, A.; Mulard, L. A. Non-Stoichiometric O-Acetylation of Shigella Flexneri 2a O-Specific Polysaccharide: Synthesis and Antigenicity. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (24), 4218–4232. <https://doi.org/10.1039/c3ob42586j>.
- (6) Khalil, I. A.; Troeger, C.; Blacker, B. F.; Rao, P. C.; Brown, A.; Atherly, D. E.; Brewer, T. G.; Engmann, C. M.; Houghton, E. R.; Kang, G.; Kotloff, K. L.; Levine, M. M.; Luby, S. P.; MacLennan, C. A.; Pan, W. K.; Pavlinac, P. B.; Platts-Mills, J. A.; Qadri, F.; Riddle, M. S.; Ryan, E. T.; Shultz, D. A.; Steele, A. D.; Walson, J. L.; Sanders, J. W.; Mokdad, A. H.; Murray, C. J. L.; Hay, S. I.; Reiner, R. C. Morbidity and Mortality Due to Shigella and Enterotoxigenic Escherichia Coli Diarrhoea: The Global Burden of Disease Study 1990–2016. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18* (11), 1229–1240. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30475-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30475-4).
- (7) Zhu, H.; Rollier, C. S.; Pollard, A. J. Recent Advances in Lipopolysaccharide-Based Glycoconjugate Vaccines. *Expert Rev.*

Vaccines **2021**, *20* (12), 1515–1538. <https://doi.org/10.1080/14760584.2021.1984889>.

- (8) Phalipon, A.; Mulard, L. A. Toward a Multivalent Synthetic Oligosaccharide-Based Conjugate Vaccine against *Shigella*: State-of-the-Art for a Monovalent Prototype and Challenges. *Vaccines* **2022**, *10* (3), 403. <https://doi.org/10.3390/vaccines10030403>.
- (9) van der Put, R. M. F.; Smitsman, C.; de Haan, A.; Hamzink, M.; Timmermans, H.; Uittenbogaard, J.; Westdijk, J.; Stork, M.; Ophorst, O.; Thouron, F.; Guerreiro, C.; Sansonetti, P. J.; Phalipon, A.; Mulard, L. A. The First-in-Human Synthetic Glycan-Based Conjugate Vaccine Candidate against *Shigella*. *ACS Cent. Sci.* **2022**, *8* (4), 449–460. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c01479>.
- (10) Monzavi-Karbassi, B.; Cunto-Amesty, G.; Luo, P.; Kieber-Emmons, T. Peptide Mimotopes as Surrogate Antigens of Carbohydrates in Vaccine Discovery. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20* (5), 207–214. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01940-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01940-6).
- (11) Simmons, D. A. R.; Romanowska, E. 1987. Structure and Biology of *Shigella Flexneri* O Antigens. *J. Med. Microbiol.* **1987**, *23* (4), 289–302. <https://doi.org/10.1099/00222615-23-4-289>.
- (12) Citiulo, F.; Necchi, F.; Mancini, F.; Rossi, O.; Aruta, M. G.; Gasperini, G.; Alfini, R.; Rondini, S.; Micoli, F.; Rappuoli, R.; Saul, A.; Martin, L. B. Rationalizing the Design of a Broad Coverage *Shigella* Vaccine Based on Evaluation of Immunological Cross-Reactivity among *S. Flexneri* Serotypes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15* (10), e0009826. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009826>.
- (13) Livio, S.; Strockbine, N. A.; Panchalingam, S.; Tennant, S. M.; Barry, E. M.; Marohn, M. E.; Antonio, M.; Hossain, A.; Mandomando, I.; Ochieng, J. B.; Oundo, J. O.; Qureshi, S.; Ramamurthy, T.; Tamboura, B.; Adegbola, R. A.; Hossain, M. J.; Saha, D.; Sen, S.; Faruque, A. S. G.; Alonso, P. L.; Breiman, R. F.; Zaidi, A. K. M.; Sur, D.; Sow, S. O.; Berkeley, L. Y.; O'Reilly, C. E.; Mintz, E. D.; Biswas, K.; Cohen, D.; Farag, T. H.; Nasrin, D.; Wu, Y.; Blackwelder, W. C.; Kotloff, K. L.; Nataro, J. P.; Levine, M. M. *Shigella* Isolates From the Global Enteric Multicenter Study Inform Vaccine Development. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59* (7), 933–941. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu468>.
- (14) Kim, M. J.; Moon, Y.; Kim, H.; Rho, S.; Shin, Y. K.; Song, M.; Walker, R.; Czerkinsky, C.; Kim, D. W.; Kim, J.-O. Cross-Protective *Shigella* Whole-Cell Vaccine With a Truncated O-Polysaccharide Chain. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2609. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02609>.
- (15) Odundo, E. A.; Weerts, H. P.; Musila, L.; Ogonda, L.; Dreyer, A. M.; Schneider, J.; Carranza, P.; Kaminski, R. W. Immunization of Rabbits with a Quadrivalent *Shigella* Bioconjugate Vaccine Induces Functional Antibodies Reactive with *Shigella* Isolates from Kenya. *mSphere* **2022**, *7* (3), e01020-21. <https://doi.org/10.1128/msphere.01020-21>.
- (16) Anderson, M.; Sansonetti, P. J.; Marteyn, B. S. *Shigella* Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00045>.
- (17) Gasperini, G.; Raso, M. M.; Schiavo, F.; Aruta, M. G.; Ravenscroft, N.; Bellich, B.; Cescutti, P.; Necchi, F.; Rappuoli, R.; Micoli, F. Rapid Generation of *Shigella Flexneri* GMMA Displaying Natural or New and Cross-Reactive O-Antigens. *Npj Vaccines* **2022**, *7* (1), 69. <https://doi.org/10.1038/s41541-022-00497-7>.
- (18) Bengtsson, R. J.; Simpkin, A. J.; Pulford, C. V.; Low, R.; Rasko, D. A.; Rigden, D. J.; Hall, N.; Barry, E. M.; Tennant, S. M.; Baker, K. S. Pathogenomic Analyses of *Shigella* Isolates Inform Factors Limiting Shigellosis Prevention and Control across LMICs. *Nat. Microbiol.* **2022**, *7* (2), 251–261. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-01054-z>.
- (19) Sorieul, C.; Papi, F.; Carboni, F.; Pecetta, S.; Phogat, S.; Adamo, R. Recent Advances and Future Perspectives on Carbohydrate-Based Cancer Vaccines and Therapeutics. *Pharmacol. Ther.* **2022**, *235*, 108158. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108158>.
- (20) Anderluh, M.; Berti, F.; Bzducha-Wróbel, A.; Chiodo, F.; Colombo, C.; Compostella, F.; Durlik, K.; Ferhati, X.; Holmdahl, R.; Jovanovic, D.; Kaca, W.; Lay, L.; Marinovic-Cincovic, M.; Marradi, M.; Ozil, M.; Polito, L.; Reina, J. J.; Reis, C. A.; Sackstein, R.; Silipo, A.; Švajger, U.; Vaněk, O.; Yamamoto, F.; Richichi, B.; van Vliet, S. J. Recent Advances on Smart Glycoconjugate Vaccines in Infections and Cancer. *FEBS J.* **2022**, *289* (14), 4251–4303. <https://doi.org/10.1111/febs.15909>.
- (21) Seeberger, P. H. Discovery of Semi- and Fully-Synthetic Carbohydrate Vaccines Against Bacterial Infections Using a Medicinal Chemistry Approach: Focus Review. *Chem. Rev.* **2021**, *121* (7), 3598–3626. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01210>.
- (22) Del Bino, L.; Østerlid, K. E.; Wu, D.-Y.; Nonne, F.; Romano, M. R.; Codée, J.; Adamo, R. Synthetic Glycans to Improve Current Glycoconjugate Vaccines and Fight Antimicrobial Resistance. *Chem. Rev.* **2022**, *acs.chemrev.2c00021*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00021>.
- (23) Hargreaves, J. M.; Le Guen, Y.; Guerreiro, C.; Descroix, K.; Mulard, L. A. Linear Synthesis of the Branched Pentasaccharide Repeats of O-Antigens from *Shigella Flexneri* 1a and 1b Demonstrating the Major Steric Hindrance Associated with Type-Specific Glucosylation. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (39), 7728–7749. <https://doi.org/10.1039/C4OB01200C>.
- (24) Boutet, J.; Blasco, P.; Guerreiro, C.; Thouron, F.; Darteville, S.; Nato, F.; Cañada, F. J.; Ardá, A.; Phalipon, A.; Jiménez-Barbero, J.; Mulard, L. A. Detailed Investigation of the Immunodominant Role of O-Antigen Stoichiometric O-Acetylation as Revealed by Chemical Synthesis, Immunochemistry, Solution Conformation and STD-NMR Spectroscopy for *Shigella Flexneri* 3a. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (31), 10892–10911. <https://doi.org/10.1002/chem.201600567>.
- (25) Hložek, J.; Ravenscroft, N.; Kuttel, M. M. Effects of Glucosylation and O-Acetylation on the Conformation of *Shigella Flexneri* Serogroup 2 O-Antigen Vaccine Targets. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124* (14), 2806–2814. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c01595>.
- (26) Hložek, J.; Owen, S.; Ravenscroft, N.; Kuttel, M. M. Molecular Modeling of the *Shigella Flexneri* Serogroup 3 and 5 O-Antigens and Conformational Relationships for a Vaccine Containing Serotypes 2a and 3a. *Vaccines* **2020**, *8* (4), 643. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040643>.
- (27) Marino, C.; Bordoni, A. V. Deoxy Sugars. General Methods for Carbohydrate Deoxygenation and Glycosidation. *Org. Biomol. Chem.* **2022**, *20* (5), 934–962. <https://doi.org/10.1039/D1OB02001C>.
- (28) Yu, Y.; Delbianco, M. Conformational Studies of Oligosaccharides. *Chem. - Eur. J.* **2020**, *26* (44), 9814–9825. <https://doi.org/10.1002/chem.202001370>.
- (29) Gimeno, A.; Valverde, P.; Ardá, A.; Jiménez-Barbero, J. Glycan Structures and Their Interactions with Proteins. A NMR View. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2020**, *62*, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.11.004>.

- (30) Gómez-Redondo, M.; Ardá, A.; Gimeno, A.; Jiménez-Barbero, J. Bacterial Polysaccharides: Conformation, Dynamics and Molecular Recognition by Antibodies. *Drug Discov. Today Technol.* **2020**, *35–36*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2020.08.002>.
- (31) Geissner, A.; Seeberger, P. H. Glycan Arrays: From Basic Biochemical Research to Bioanalytical and Biomedical Applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *9* (1), 223–247. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041641>.
- (32) Haab, B. B.; Klamer, Z. Advances in Tools to Determine the Glycan-Binding Specificities of Lectins and Antibodies. *Mol. Cell. Proteomics* **2020**, *19* (2), 224–232. <https://doi.org/10.1074/mcp.R119.001836>.
- (33) Van Damme, E. J. M. 35 Years in Plant Lectin Research: A Journey from Basic Science to Applications in Agriculture and Medicine. *Glycoconj. J.* **2022**, *39* (1), 83–97. <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10015-x>.
- (34) Shukla, R.; Medeiros-Silva, J.; Parmar, A.; Vermeulen, B. J. A.; Das, S.; Paioni, A. L.; Jekhmane, S.; Lorent, J.; Bonvin, A. M. J. J.; Baldus, M.; Lelli, M.; Veldhuizen, E. J. A.; Breukink, E.; Singh, I.; Weingarh, M. Mode of Action of Teixobactins in Cellular Membranes. *Nat. Commun.* **2020**, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16600-2>.
- (35) Kang, X.; Zhao, W.; Widanage, M. C. D.; Kirui, A.; Ozdenvar, U.; Wang, T. CCMRD: A Solid-State NMR Database for Complex Carbohydrates. *J. Biomol. NMR* **2020**, *74* (4), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s10858-020-00304-2>.
- (36) Ghassemi, N.; Poulhazan, A.; Deligey, F.; Mentink-Vigier, F.; Marcotte, I.; Wang, T. Solid-State NMR Investigations of Extracellular Matrixes and Cell Walls of Algae, Bacteria, Fungi, and Plants. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (10), 10036–10086. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00669>.
- (37) Theillet, F.-X.; Luchinat, E. In-Cell NMR: Why and How? *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2022**, *132–133*, 1–112. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2022.04.002>.
- (38) Sun, X.; Stefanetti, G.; Berti, F.; Kasper, D. L. Polysaccharide Structure Dictates Mechanism of Adaptive Immune Response to Glycoconjugate Vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (1), 193–198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816401115>.
- (39) Dose, A.; Liokatis, S.; Theillet, F.-X.; Selenko, P.; Schwarzer, D. NMR Profiling of Histone Deacetylase and Acetyl-Transferase Activities in Real Time. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (5), 419–424. <https://doi.org/10.1021/cb1003866>.
- (40) Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Liokatis, S.; Verzini, S.; Selenko, P. Paramagnetic Relaxation Enhancement to Improve Sensitivity of Fast NMR Methods: Application to Intrinsically Disordered Proteins. *J. Biomol. NMR* **2011**, *51* (4), 487–495. <https://doi.org/10.1007/s10858-011-9577-2>.
- (41) Theillet, F.-X.; Liokatis, S.; Jost, J. O.; Bekei, B.; Rose, H. M.; Binolfi, A.; Schwarzer, D.; Selenko, P. Site-Specific Mapping and Time-Resolved Monitoring of Lysine Methylation by High-Resolution NMR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (18), 7616–7619. <https://doi.org/10.1021/ja301895f>.
- (42) Liokatis, S.; Stützer, A.; Elsässer, S. J.; Theillet, F.-X.; Klingberg, R.; van Rossum, B.; Schwarzer, D.; Allis, C. D.; Fischle, W.; Selenko, P. Phosphorylation of Histone H3 Ser10 Establishes a Hierarchy for Subsequent Intramolecular Modification Events. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19* (8), 819–823. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2310>.
- (43) Binolfi, A.; Theillet, F.-X.; Selenko, P. Bacterial In-Cell NMR of Human α -Synuclein: A Disordered Monomer by Nature? *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40* (5), 950–954. <https://doi.org/10.1042/BST20120096>.
- (44) Theillet, F.-X.; Smet-Nocca, C.; Liokatis, S.; Thongwichian, R.; Kosten, J.; Yoon, M.-K.; Kriwacki, R. W.; Landrieu, I.; Lippens, G.; Selenko, P. Cell Signaling, Post-Translational Protein Modifications and NMR Spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **2012**, *54* (3), 217–236. <https://doi.org/10.1007/s10858-012-9674-x>.
- (45) Cordier, F.; Chaffotte, A.; Terrien, E.; Prehaud, C.; Theillet, F.-X.; Delepierre, M.; Lafon, M.; Buc, H.; Wolff, N. Ordered Phosphorylation Events in Two Independent Cascades of the PTEN C-Tail Revealed by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (50), 20533–20543. <https://doi.org/10.1021/ja310214g>.
- (46) Rose, H. M.; Stuijver, M.; Thongwichian, R.; Theillet, F.-X.; Feller, S. M.; Selenko, P. Quantitative NMR Analysis of Erk Activity and Inhibition by U0126 in a Panel of Patient-Derived Colorectal Cancer Cell Lines. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834* (7), 1396–1401. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.023>.
- (47) Theillet, F.-X.; Kalmar, L.; Tompa, P.; Han, K.-H.; Selenko, P.; Dunker, A. K.; Daughdrill, G. W.; Uversky, V. N. The Alphabet of Intrinsic Disorder: I. Act like a Pro: On the Abundance and Roles of Proline Residues in Intrinsically Disordered Proteins. *Intrinsically Disord. Proteins* **2013**, *1* (1), e24360. <https://doi.org/10.4161/idp.24360>.
- (48) Theillet, F.-X.; Rose, H. M.; Liokatis, S.; Binolfi, A.; Thongwichian, R.; Stuijver, M.; Selenko, P. Site-Specific NMR Mapping and Time-Resolved Monitoring of Serine and Threonine Phosphorylation in Reconstituted Kinase Reactions and Mammalian Cell Extracts. *Nat. Protoc.* **2013**, *8* (7), 1416–1432. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.083>.
- (49) Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Frembgen-Kesner, T.; Hingorani, K.; Sarkar, M.; Kyne, C.; Li, C.; Crowley, P. B.; Gierasch, L.; Pielak, G. J.; Elcock, A. H.; Gershenson, A.; Selenko, P. Physicochemical Properties of Cells and Their Effects on Intrinsically Disordered Proteins (IDPs). *Chem. Rev.* **2014**, *114* (13), 6661–6714. <https://doi.org/10.1021/cr400695p>.
- (50) Kosten, J.; Binolfi, A.; Stuijver, M.; Verzini, S.; Theillet, F.-X.; Bekei, B.; van Rossum, M.; Selenko, P. Efficient Modification of Alpha-Synuclein Serine 129 by Protein Kinase CK1 Requires Phosphorylation of Tyrosine 125 as a Priming Event. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5* (12), 1203–1208. <https://doi.org/10.1021/cn5002254>.
- (51) Borchers, W.; Theillet, F.-X.; Katzer, A.; Finzel, A.; Mishall, K. M.; Powell, A. T.; Wu, H.; Manieri, W.; Dieterich, C.; Selenko, P.; Loewer, A.; Daughdrill, G. W. Disorder and Residual Helicity Alter P53-Mdm2 Binding Affinity and Signaling in Cells. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 1–5. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1668>.
- (52) Smith, M. J.; Marshall, C. B.; Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Selenko, P.; Ikura, M. Real-Time NMR Monitoring of Biological Activities in Complex Physiological Environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2015**, *32*, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.003>.
- (53) Thongwichian, R.; Kosten, J.; Benary, U.; Rose, H. M.; Stuijver, M.; Theillet, F.-X.; Dose, A.; Koch, B.; Yokoyama, H.; Schwarzer, D.; Wolf, J.; Selenko, P. A Multiplexed NMR-Reporter Approach to Measure Cellular Kinase and Phosphatase Activities in Real-Time. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (20), 6468–6471. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b02987>.
- (54) Danielsson, J.; Mu, X.; Lang, L.; Wang, H.; Binolfi, A.; Theillet, F.-X.; Bekei, B.; Logan, D. T.; Selenko, P.; Wennerstrom, H.; Oliveberg, M. Thermodynamics of Protein Destabilization in Live Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (40), 12402–12407.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1511308112>.

- (55) Binolfi, A.; Limatola, A.; Verzini, S.; Kosten, J.; Theillet, F.-X.; May Rose, H.; Bekei, B.; Stuver, M.; van Rossum, M.; Selenko, P. Intracellular Repair of Oxidation-Damaged α -Synuclein Fails to Target C-Terminal Modification Sites. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10251. <https://doi.org/10.1038/ncomms10251>.
- (56) Theillet, F.-X.; Binolfi, A.; Bekei, B.; Martorana, A.; Rose, H. M.; Stuver, M.; Verzini, S.; Lorenz, D.; van Rossum, M.; Goldfarb, D.; Selenko, P. Structural Disorder of Monomeric α -Synuclein Persists in Mammalian Cells. *Nature* **2016**, *530* (7588), 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature16531>.
- (57) Müntener, T.; Häussinger, D.; Selenko, P.; Theillet, F.-X. In-Cell Protein Structures from 2D NMR Experiments. *J. Phys. Chem. Lett.* **2016**, *7* (14), 2821–2825. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.6b01074>.
- (58) Mylona, A.; Theillet, F.-X.; Foster, C.; Cheng, T. M.; Miralles, F.; Bates, P. A.; Selenko, P.; Treisman, R. Opposing Effects of Elk-1 Multisite Phosphorylation Shape Its Response to ERK Activation. *Science* **2016**, *354* (6309), 233–237. <https://doi.org/10.1126/science.aad1872>.
- (59) Verzini, S.; Shah, M.; Theillet, F.-X.; Belsom, A.; Bieschke, J.; Wanker, E. E.; Rappsilber, J.; Binolfi, A.; Selenko, P. Megadalton-Sized Dityrosine Aggregates of α -Synuclein Retain High Degrees of Structural Disorder and Internal Dynamics. *J. Mol. Biol.* **2020**, *432* (24), 166689. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.10.023>.
- (60) Selenko, P.; Frueh, D. P.; Elsaesser, S. J.; Haas, W.; Gygi, S. P.; Wagner, G. In Situ Observation of Protein Phosphorylation by High-Resolution NMR Spectroscopy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (3), 321–329. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1395>.
- (61) Kulkarni, P.; Bhattacharya, S.; Achuthan, S.; Behal, A.; Jolly, M. K.; Kotnala, S.; Mohanty, A.; Rangarajan, G.; Salgia, R.; Uversky, V. Intrinsically Disordered Proteins: Critical Components of the Wetware. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (6), 6614–6633. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00848>.
- (62) Davey, N. E. The Functional Importance of Structure in Unstructured Protein Regions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, *56*, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.009>.
- (63) Zarin, T.; Strome, B.; Nguyen Ba, A. N.; Alberti, S.; Forman-Kay, J. D.; Moses, A. M. Proteome-Wide Signatures of Function in Highly Diverged Intrinsically Disordered Regions. *eLife* **2019**, *8*, 1727. <https://doi.org/10.7554/eLife.46883>.
- (64) Hatos, A.; Hajdu-Soltész, B.; Monzon, A. M.; Palopoli, N.; Álvarez, L.; Aykac-Fas, B.; Bassot, C.; Benítez, G. I.; Bevilacqua, M.; Chasapi, A.; Chemes, L.; Davey, N. E.; Davidović, R.; Dunker, A. K.; Elofsson, A.; Gobeill, J.; Foutel, N. S. G.; Sudha, G.; Guharoy, M.; Horvath, T.; Iglesias, V.; Kajava, A. V.; Kovacs, O. P.; Lamb, J.; Lambrugh, M.; Lazar, T.; Leclercq, J. Y.; Leonardi, E.; Macedo-Ribeiro, S.; Macossay-Castillo, M.; Maiani, E.; Manso, J. A.; Marino-Buslje, C.; Martínez-Pérez, E.; Mészáros, B.; Mičetić, I.; Minervini, G.; Murvai, N.; Necci, M.; Ouzounis, C. A.; Pajkos, M.; Paladin, L.; Pancsa, R.; Papaleo, E.; Parisi, G.; Pasche, E.; Barbosa Pereira, P. J.; Promponas, V. J.; Pujols, J.; Quaglia, F.; Ruch, P.; Salvatore, M.; Schad, E.; Szabo, B.; Szaniszló, T.; Tamana, S.; Tantos, A.; Veljkovic, N.; Ventura, S.; Vranken, W.; Dosztányi, Z.; Tompa, P.; Tosatto, S. C. E.; Piovesan, D. DisProt: Intrinsic Protein Disorder Annotation in 2020. *Nucleic Acids Res.* **2019**, gkz975. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz975>.
- (65) Piovesan, D.; Necci, M.; Escobedo, N.; Monzon, A. M.; Hatos, A.; Mičetić, I.; Quaglia, F.; Paladin, L.; Ramasamy, P.; Dosztányi, Z.; Vranken, W. F.; Davey, N. E.; Parisi, G.; Fuxreiter, M.; Tosatto, S. C. E. MobiDB: Intrinsically Disordered Proteins in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (D1), D361–D367. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1058>.
- (66) Wright, P. E.; Dyson, H. J. Intrinsically Unstructured Proteins: Re-Assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *J. Mol. Biol.* **1999**, *293* (2), 321–331. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3110>.
- (67) Keith Dunker, A.; Brown, C. J.; Obradovic, Z. Identification and Functions of Usefully Disordered Proteins. In *Advances in Protein Chemistry*; Elsevier, 2002; Vol. 62, pp 25–49. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(02\)62004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(02)62004-2).
- (68) Tompa, P. Intrinsically Unstructured Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27* (10), 527–533.
- (69) Uversky, V. N. What Does It Mean to Be Natively Unfolded?: Natively Unfolded Proteins. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269* (1), 2–12. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02649.x>.
- (70) Dyson, H. J.; Wright, P. E. Intrinsically Unstructured Proteins and Their Functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (3), 197–208. <https://doi.org/10.1038/nrm1589>.
- (71) Prabakaran, S.; Everley, R. A.; Landrieu, I.; Wieruszkeski, J.-M.; Lippens, G.; Steen, H.; Gunawardena, J. Comparative Analysis of Erk Phosphorylation Suggests a Mixed Strategy for Measuring Phospho-Form Distributions. *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.15>.
- (72) Conibear, A. C.; Rosengren, K. J.; Becker, C. F. W.; Kaehlig, H. Random Coil Shifts of Posttranslationally Modified Amino Acids. *J. Biomol. NMR* **2019**, *73* (10), 587–599. <https://doi.org/10.1007/s10858-019-00270-4>.
- (73) Hinterholzer, A.; Stanojlovic, V.; Regl, C.; Huber, C. G.; Cabrele, C.; Schubert, M. Detecting Aspartate Isomerization and Backbone Cleavage after Aspartate in Intact Proteins by NMR Spectroscopy. *J. Biomol. NMR* **2021**, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10858-020-00356-4>.
- (74) Hinterholzer, A.; Stanojlovic, V.; Cabrele, C.; Schubert, M. Unambiguous Identification of Pyroglutamate in Full-Length Biopharmaceutical Monoclonal Antibodies by NMR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (22), 14299–14305. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02513>.
- (75) Hinterholzer, A.; Stanojlovic, V.; Regl, C.; Huber, C. G.; Cabrele, C.; Schubert, M. Identification and Quantification of Oxidation Products in Full-Length Biotherapeutic Antibodies by NMR Spectroscopy. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (14), 9666–9673. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00965>.
- (76) Altincekic, N.; Lohr, F.; Meier-Credo, J.; Langer, J. D.; Hengesbach, M.; Richter, C.; Schwalbe, H. Site-Specific Detection of Arginine Methylation in Highly Repetitive Protein Motifs of Low Sequence Complexity by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (16), 7647–7654. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c02308>.
- (77) Mallagaray, Á.; Creutzmacher, R.; Dülfer, J.; Mayer, P. H. O.; Grimm, L. L.; Orduña, J. M.; Trabjerg, E.; Stehle, T.; Rand, K. D.; Blaum, B. S.; Uetrecht, C.; Peters, T. A Post-Translational Modification of Human Norovirus Capsid Protein Attenuates Glycan Binding. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 1320–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09251-5>.
- (78) Hendus-Altenburger, R.; Fernandes, C. B.; Bugge, K.; Kunze, M. B. A.; Boomsma, W.; Kragelund, B. B. Random Coil

- Chemical Shifts for Serine, Threonine and Tyrosine Phosphorylation over a Broad PH Range. *J. Biomol. NMR* **2019**, 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10858-019-00283-z>.
- (79) Kumar, A.; Narayanan, V.; Sekhar, A. Characterizing Post-Translational Modifications and Their Effects on Protein Conformation Using NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **2019**, *59* (1), 57–73. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00827>.
- (80) Kubota, K.; Anjum, R.; Yu, Y.; Kunz, R. C.; Andersen, J. N.; Kraus, M.; Keilhack, H.; Nagashima, K.; Krauss, S.; Paweletz, C.; Hendrickson, R. C.; Feldman, A. S.; Wu, C.-L.; Rush, J.; Villén, J.; Gygi, S. P. Sensitive Multiplexed Analysis of Kinase Activities and Activity-Based Kinase Identification. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27* (10), 933–940. <https://doi.org/10.1038/nbt.1566>.
- (81) Yu, Y.; Anjum, R.; Kubota, K.; Rush, J.; Villén, J.; Gygi, S. P. A Site-Specific, Multiplexed Kinase Activity Assay Using Stable-Isotope Dilution and High-Resolution Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (28), 11606–11611. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905165106>.
- (82) Kunz, R. C.; McAllister, F. E.; Rush, J.; Gygi, S. P. A High-Throughput, Multiplexed Kinase Assay Using a Benchtop Orbitrap Mass Spectrometer To Investigate the Effect of Kinase Inhibitors on Kinase Signaling Pathways. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (14), 6233–6239. <https://doi.org/10.1021/ac301116z>.
- (83) Muñoz, J.; Heck, A. J. R. Snapshots of Kinase Activities. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27* (10), 912–913. <https://doi.org/10.1038/nbt1009-912>.
- (84) Humphrey, S. J.; Karayel, O.; James, D. E.; Mann, M. High-Throughput and High-Sensitivity Phosphoproteomics with the EasyPhos Platform. *Nat. Protoc.* **2018**, *13* (9), 1897–1916. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0014-9>.
- (85) Urban, J. A Review on Recent Trends in the Phosphoproteomics Workflow. From Sample Preparation to Data Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2022**, *1199*, 338857. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338857>.
- (86) Needham, E. J.; Hingst, J. R.; Parker, B. L.; Morrison, K. R.; Yang, G.; Onslev, J.; Kristensen, J. M.; Højlund, K.; Ling, N. X. Y.; Oakhill, J. S.; Richter, E. A.; Kiens, B.; Petersen, J.; Pehmøller, C.; James, D. E.; Wojtaszewski, J. F. P.; Humphrey, S. J. Personalized Phosphoproteomics Identifies Functional Signaling. *Nat. Biotechnol.* **2022**, *40* (4), 576–584. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01099-9>.
- (87) Klaeger, S.; Heinzlmeir, S.; Wilhelm, M.; Polzer, H.; Vick, B.; Koenig, P.-A.; Reinecke, M.; Ruprecht, B.; Petzoldt, S.; Meng, C.; Zecha, J.; Reiter, K.; Qiao, H.; Helm, D.; Koch, H.; Schoof, M.; Canevari, G.; Casale, E.; Depaolini, S. R.; Feuchtinger, A.; Wu, Z.; Schmidt, T.; Rueckert, L.; Becker, W.; Huenges, J.; Garz, A.-K.; Gohlke, B.-O.; Zolg, D. P.; Kayser, G.; Vooder, T.; Preissner, R.; Hahne, H.; Tönisson, N.; Kramer, K.; Götze, K.; Bassermann, F.; Schlegl, J.; Ehrlich, H.-C.; Aiche, S.; Walch, A.; Greif, P. A.; Schneider, S.; Felder, E. R.; Ruland, J.; Médard, G.; Jeremias, I.; Spiekermann, K.; Kuster, B. The Target Landscape of Clinical Kinase Drugs. *Science* **2017**, *358* (6367), eaan4368. <https://doi.org/10.1126/science.aan4368>.
- (88) Lim Kam Sian, T. C. C.; Chüh, A. C.; Daly, R. J. Proteomics-based Interrogation of the Kinome and Its Implications for Precision Oncology. *PROTEOMICS* **2021**, *21* (17–18), 2000161. <https://doi.org/10.1002/pmic.202000161>.
- (89) Greenwald, E. C.; Mehta, S.; Zhang, J. Genetically Encoded Fluorescent Biosensors Illuminate the Spatiotemporal Regulation of Signaling Networks. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (24), 11707–11794. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00333>.
- (90) Zhou, X.; Mehta, S.; Zhang, J. Genetically Encodable Fluorescent and Bioluminescent Biosensors Light Up Signaling Networks. *Trends Biochem. Sci.* **2020**, *45* (10), 889–905. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.06.001>.
- (91) Varedi, K. S. M.; Ventura, A. C.; Merajver, S. D.; Lin, X. N. Multisite Phosphorylation Provides an Effective and Flexible Mechanism for Switch-like Protein Degradation. *PLoS ONE* **2010**, *5* (12), e14029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014029>.
- (92) Schweiger, R.; Linial, M. Cooperativity within Proximal Phosphorylation Sites Is Revealed from Large-Scale Proteomics Data. *Biol. Direct* **2010**, *5* (1), 6. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-5-6>.
- (93) Williams, S. P.; Haggie, P. M.; Brindle, K. M. 19F NMR Measurements of the Rotational Mobility of Proteins in Vivo. *Bio-phys. J.* **1997**, *72* (1), 490–498. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78690-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78690-9).
- (94) Haggie, P. M.; Brindle, K. M. Mitochondrial Citrate Synthase Is Immobilized in Vivo. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (7), 3941–3945. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.7.3941>.
- (95) Serber, Z.; Keatinge-Clay, A. T.; Ledwidge, R.; Kelly, A. E.; Miller, S. M.; Dötsch, V. High-Resolution Macromolecular NMR Spectroscopy inside Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (10), 2446–2447. <https://doi.org/10.1021/ja0057528>.
- (96) Serber, Z.; Dötsch, V. In-Cell NMR Spectroscopy. *Biochemistry* **2001**, *40* (48), 14317–14323. <https://doi.org/10.1021/bi011751w>.
- (97) Burz, D. S.; Dutta, K.; Cowburn, D.; Shekhtman, A. In-Cell NMR for Protein-Protein Interactions (STINT-NMR). *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (1), 146–152. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.23>.
- (98) Dedmon, M. M.; Patel, C. N.; Young, G. B.; Pielak, G. J. FlgM Gains Structure in Living Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (20), 12681–12684. <https://doi.org/10.1073/pnas.202331299>.
- (99) Serber, Z.; Selenko, P.; Hänsel, R.; Reckel, S.; Lohr, F.; Ferrell, J. E.; Wagner, G.; Dötsch, V. Investigating Macromolecules inside Cultured and Injected Cells by In-Cell NMR Spectroscopy. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (6), 2701–2709. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.181>.
- (100) Bodart, J.-F.; Wieruszkeski, J.-M.; Amniai, L.; Leroy, A.; Landrieu, I.; Rousseau-Lescuyer, A.; Vilain, J.-P.; Lippens, G. NMR Observation of Tau in *Xenopus* Oocytes. *J. Magn. Reson.* **2008**, *192* (2), 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2008.03.006>.
- (101) Selenko, P.; Serber, Z.; Gadea, B.; Ruderman, J.; Wagner, G. Quantitative NMR Analysis of the Protein G B1 Domain in *Xenopus* Laevis Egg Extracts and Intact Oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103* (32), 11904–11909. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604667103>.
- (102) Selenko, P.; Wagner, G. Looking into Live Cells with In-Cell NMR Spectroscopy. *J. Struct. Biol.* **2007**, *158* (2), 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.04.001>.
- (103) Sakai, T.; Tochio, H.; Tenno, T.; Ito, Y.; Kokubo, T.; Hiroaki, H.; Shirakawa, M. In-Cell NMR Spectroscopy of Proteins inside *Xenopus* Laevis Oocytes. *J. Biomol. NMR* **2006**, *36* (3), 179–188. <https://doi.org/10.1007/s10858-006-9079-9>.
- (104) Wang, Q.; Zhuravleva, A.; Gierasch, L. M. Exploring Weak, Transient Protein-Protein Interactions in Crowded in Vivo Environments by in-Cell Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* **2011**, *50* (43), 9225–9236.

<https://doi.org/10.1021/bi201287e>.

- (105) Theillet, F.-X. In-Cell Structural Biology by NMR: The Benefits of the Atomic Scale. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (10), 9497–9570. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00937>.
- (106) Theillet, F.-X. In-Cell Structural Biology by NMR: The Benefits of the Atomic-Scale. *Chem. Rev.* **2022**, in press. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00937>.
- (107) Wong, Y. C.; Krainc, D. α -Synuclein Toxicity in Neurodegeneration: Mechanism and Therapeutic Strategies. *Nat. Med.* **2017**, *23* (2), 1–13. <https://doi.org/10.1038/nm.4269>.
- (108) Bartels, T.; Choi, J. G.; Selkoe, D. J. α -Synuclein Occurs Physiologically as a Helically Folded Tetramer That Resists Aggregation. *Nature* **2011**, *477* (7362), 107–110. <https://doi.org/10.1038/nature10324>.
- (109) Dettmer, U.; Newman, A. J.; Luth, E. S.; Bartels, T.; Selkoe, D. In Vivo Cross-Linking Reveals Principally Oligomeric Forms of α -Synuclein and β -Synuclein in Neurons and Non-Neural Cells. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (9), 6371–6385. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.403311>.
- (110) Trexler, A. J.; Rhoades, E. N-terminal Acetylation Is Critical for Forming A-helical Oligomer of A-synuclein. *Protein Sci.* **2012**, *21* (5), 601–605. <https://doi.org/10.1002/pro.2056>.
- (111) Runwal, G.; Edwards, R. H. The Membrane Interactions of Synuclein: Physiology and Pathology. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2021**, *16* (1), 465–485. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-031920-092547>.
- (112) Das, T.; Eliezer, D. Membrane Interactions of Intrinsically Disordered Proteins: The Example of Alpha-Synuclein. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **2019**, *1867* (10), 879–889. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.05.001>.
- (113) Fauvet, B.; Mbefo, M. K.; Fares, M.-B.; Desobry, C.; Michael, S.; Ardah, M. T.; Tsika, E.; Coune, P.; Prudent, M.; Lion, N.; Eliezer, D.; Moore, D. J.; Schneider, B.; Aebischer, P.; El-Agnaf, O. M.; Masliah, E.; Lashuel, H. A. α -Synuclein in Central Nervous System and from Erythrocytes, Mammalian Cells, and Escherichia Coli Exists Predominantly as Disordered Monomer. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (19), 15345–15364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318949>.
- (114) Burré, J.; Vivona, S.; Diao, J.; Sharma, M.; Brunger, A. T.; Südhof, T. C. Properties of Native Brain α -Synuclein. *Nature* **2013**, *498* (7453), E4–E6. <https://doi.org/10.1038/nature12125>.
- (115) Wang, W.; Perovic, I.; Chittuluru, J.; Kaganovich, A.; Nguyen, L. T. T.; Liao, J.; Auclair, J. R.; Johnson, D.; Landru, A.; Simorellis, A. K.; Ju, S.; Cookson, M. R.; Asturias, F. J.; Agar, J. N.; Webb, B. N.; Kang, C.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Pochapsky, T. C.; Hoang, Q. Q. A Soluble α -Synuclein Construct Forms a Dynamic Tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (43), 17797–17802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113260108>.
- (116) Burmann, B. M.; Gerez, J. A.; Matečko-Burmann, I.; Campioni, S.; Kumari, P.; Ghosh, D.; Mazur, A.; Aspholm, E. E.; Šulskis, D.; Wawrzyniuk, M.; Bock, T.; Schmidt, A.; Rüdiger, S. G. D.; Riek, R.; Hiller, S. Regulation of α -Synuclein by Chaperones in Mammalian Cells. *Nature* **2019**, 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1808-9>.
- (117) Leuenberger, P.; Ganschä, S.; Kahraman, A.; Cappelletti, V.; Boersema, P. J.; von Mering, C.; Claassen, M.; Picotti, P. Cell-Wide Analysis of Protein Thermal Unfolding Reveals Determinants of Thermostability. *Science* **2017**, *355* (6327). <https://doi.org/10.1126/science.aai7825>.
- (118) Luth, E. S.; Bartels, T.; Dettmer, U.; Kim, N. C.; Selkoe, D. J. Purification of α -Synuclein from Human Brain Reveals an Instability of Endogenous Multimers as the Protein Approaches Purity. *Biochemistry* **2015**, *54* (2), 279–292. <https://doi.org/10.1021/bi501188a>.
- (119) Dettmer, U.; Newman, A. J.; Soldner, F.; Luth, E. S.; Kim, N. C.; Saucke, V. E. von; Sanderson, J. B.; Jaenisch, R.; Bartels, T.; Selkoe, D. Parkinson-Causing α -Synuclein Missense Mutations Shift Native Tetramers to Monomers as a Mechanism for Disease Initiation. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1), 839–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms8314>.
- (120) Dettmer, U.; Newman, A. J.; Saucke, V. E. von; Bartels, T.; Selkoe, D. KTEGV Repeat Motifs Are Key Mediators of Normal α -Synuclein Tetramerization: Their Mutation Causes Excess Monomers and Neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (31), 9596–9601. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505953112>.
- (121) Smaldone, G.; Diana, D.; Pollegioni, L.; Gaetano, S. D.; Fattorusso, R.; Pedone, E. Insight into Conformational Modification of Alpha-synuclein in the Presence of Neuronal Whole Cells and of Their Isolated Membranes. *FEBS Lett.* **2015**, *589* (7), 798–804. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.02.012>.
- (122) Burré, J.; Sharma, M.; Südhof, T. C. α -Synuclein Assembles into Higher-Order Multimers upon Membrane Binding to Promote SNARE Complex Formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111* (40). <https://doi.org/10.1073/pnas.1416598111>.
- (123) Iljina, M.; Tosatto, L.; Choi, M. L.; Sang, J. C.; Ye, Y.; Hughes, C. D.; Bryant, C. E.; Gandhi, S.; Klenerman, D. Arachidonic Acid Mediates the Formation of Abundant Alpha-Helical Multimers of Alpha-Synuclein. *Sci. Rep.* **2016**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep33928>.
- (124) Kim, S.; Yun, S. P.; Lee, S.; Umanah, G. E.; Bandaru, V. V. R.; Yin, X.; Rhee, P.; Karuppagounder, S. S.; Kwon, S.-H.; Lee, H.; Mao, X.; Kim, D.; Pandey, A.; Lee, G.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; Ko, H. S. GBA1 Deficiency Negatively Affects Physiological α -Synuclein Tetramers and Related Multimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115* (4), 798–803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1700465115>.
- (125) Dettmer, U.; Ramalingam, N.; Saucke, V. E. von; Kim, T.-E.; Newman, A. J.; Terry-Kantor, E.; Nuber, S.; Ericsson, M.; Fanning, S.; Bartels, T.; Lindquist, S.; Levy, O. A.; Selkoe, D. Loss of Native α -Synuclein Multimerization by Strategically Mutating Its Amphipathic Helix Causes Abnormal Vesicle Interactions in Neuronal Cells. *Hum. Mol. Genet.* **2017**, *26* (18), 3466–3481. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx227>.
- (126) Rovere, M.; Powers, A. E.; Jiang, H.; Pitino, J. C.; Fonseca-Ornelas, L.; Patel, D. S.; Achille, A.; Langen, R.; Varkey, J.; Bartels, T. E46K-like α -Synuclein Mutants Increase Lipid Interactions and Disrupt Membrane Selectivity. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (25), 9799–9812. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.006551>.
- (127) Ericsson, M.; Saucke, V. von; Newman, A. J.; Doehr, L.; Hoesch, C.; Kim, T.-E.; Dettmer, U. Crowded Organelles, Lipid Accumulation, and Abnormal Membrane Tubulation in Cellular Models of Enhanced α -Synuclein Membrane Interaction. *Brain Res.* **2021**, *1758*, 147349. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147349>.

- (128) Nuber, S.; Rajsombath, M.; Minakaki, G.; Winkler, J.; Müller, C. P.; Ericsson, M.; Caldarone, B.; Dettmer, U.; Selkoe, D. J. Abrogating Native α -Synuclein Tetramers in Mice Causes a L-DOPA-Responsive Motor Syndrome Closely Resembling Parkinson's Disease. *Neuron* **2018**, *100* (1), 75-90.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.014>.
- (129) Fonseca-Ornelas, L.; Viennet, T.; Rovere, M.; Jiang, H.; Liu, L.; Nuber, S.; Ericsson, M.; Arthanari, H.; Selkoe, D. J. Altered Conformation of α -Synuclein Drives Dysfunction of Synaptic Vesicles in a Synaptosomal Model of Parkinson's Disease. *Cell Rep.* **2021**, *36* (1), 109333. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109333>.
- (130) Shahmoradian, S. H.; Lewis, A. J.; Genoud, C.; Hench, J.; Moors, T. E.; Navarro, P. P.; Castaño-Díez, D.; Schweighauser, G.; Graff-Meyer, A.; Goldie, K. N.; Sütterlin, R.; Huisman, E.; Ingrassia, A.; Gier, Y. de; Rozemuller, A. J. M.; Wang, J.; Paepe, A. D.; Erny, J.; Staempfli, A.; Hoernschemeyer, J.; Großerüschkamp, F.; Niedieker, D.; El-Mashtoly, S. F.; Quadri, M.; Van Ijcken, W. F. J.; Bonifati, V.; Gerwert, K.; Bohrmann, B.; Frank, S.; Britschgi, M.; Stahlberg, H.; Van de Berg, W. D. J.; Lauer, M. E. Lewy Pathology in Parkinson's Disease Consists of Crowded Organelles and Lipid Membranes. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22* (7), 1099–1109. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0423-2>.
- (131) Vincent, B. M.; Tardiff, D. F.; Piotrowski, J. S.; Aron, R.; Lucas, M. C.; Chung, C. Y.; Bacherman, H.; Chen, Y.; Pires, M.; Subramaniam, R.; Doshi, D. B.; Sadlish, H.; Raja, W. K.; Solís, E. J.; Khurana, V.; Le Bourdonnec, B.; Scannevin, R. H.; Rhodes, K. J. Inhibiting Stearoyl-CoA Desaturase Ameliorates α -Synuclein Cytotoxicity. *Cell Rep.* **2018**, *25* (10), 2742-2754.e31. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.028>.
- (132) Imberdis, T.; Negri, J.; Ramalingam, N.; Terry-Kantor, E.; Ho, G. P. H.; Fanning, S.; Stirtz, G.; Kim, T.-E.; Levy, O. A.; Young-Pearse, T. L.; Selkoe, D.; Dettmer, U. Cell Models of Lipid-Rich α -Synuclein Aggregation Validate Known Modifiers of α -Synuclein Biology and Identify Stearoyl-CoA Desaturase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (41), 20760–20769. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903216116>.
- (133) Nuber, S.; Nam, A. Y.; Rajsombath, M. M.; Cirka, H.; Hronowski, X.; Wang, J.; Hodgetts, K.; Kalinichenko, L. S.; Müller, C. P.; Lambrecht, V.; Winkler, J.; Weihofen, A.; Imberdis, T.; Dettmer, U.; Fanning, S.; Selkoe, D. J. A Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Inhibitor Prevents Multiple Parkinson Disease Phenotypes in α -Synuclein Mice. *Ann. Neurol.* **2021**, *89* (1), 74–90. <https://doi.org/10.1002/ana.25920>.
- (134) Nuber, S.; Chung, C. Y.; Tardiff, D. F.; Bechade, P. A.; McCaffery, T. D.; Shimanaka, K.; Choi, J.; Chang, B.; Raja, W.; Neves, E.; Burke, C.; Jiang, X.; Xu, P.; Khurana, V.; Dettmer, U.; Fanning, S.; Rhodes, K. J.; Selkoe, D. J.; Scannevin, R. H. A Brain-Penetrant Stearoyl-CoA Desaturase Inhibitor Reverses α -Synuclein Toxicity. *Neurotherapeutics* **2022**, *19* (3), 1018–1036. <https://doi.org/10.1007/s13311-022-01199-7>.
- (135) Fanning, S.; Cirka, H.; Thies, J. L.; Jeong, J.; Niemi, S. M.; Yoon, J.; Ho, G. P. H.; Pacheco, J. A.; Dettmer, U.; Liu, L.; Clish, C. B.; Hodgetts, K. J.; Hutchinson, J. N.; Muratore, C. R.; Caldwell, G. A.; Caldwell, K. A.; Selkoe, D. Lipase Regulation of Cellular Fatty Acid Homeostasis as a Parkinson's Disease Therapeutic Strategy. *Npj Park. Dis.* **2022**, *8* (1), 74. <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00335-6>.
- (136) Burre, J.; Sharma, M.; Sudhof, T. C. Definition of a Molecular Pathway Mediating α -Synuclein Neurotoxicity. *J. Neurosci.* **2015**, *35* (13), 5221–5232. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4650-14.2015>.
- (137) Bulawa, C. E.; Connelly, S.; DeVit, M.; Wang, L.; Weigel, C.; Fleming, J. A.; Packman, J.; Powers, E. T.; Wiseman, R. L.; Foss, T. R.; Wilson, I. A.; Kelly, J. W.; Labaudinière, R. Tafamidis, a Potent and Selective Transthyretin Kinetic Stabilizer That Inhibits the Amyloid Cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (24), 9629–9634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121005109>.
- (138) Gertz, M. A.; Mauermann, M. L.; Grogan, M.; Coelho, T. Advances in the Treatment of Hereditary Transthyretin Amyloidosis: A Review. *Brain Behav.* **2019**, *9* (9). <https://doi.org/10.1002/brb3.1371>.
- (139) Hallacli, E.; Kayatekin, C.; Nazeen, S.; Wang, X. H.; Sheinkopf, Z.; Sathyakumar, S.; Sarkar, S.; Jiang, X.; Dong, X.; Di Maio, R.; Wang, W.; Keeney, M. T.; Felsky, D.; Sandoe, J.; Vahdatshoar, A.; Udeshi, N. D.; Mani, D. R.; Carr, S. A.; Lindquist, S.; De Jager, P. L.; Bartel, D. P.; Myers, C. L.; Greenamyre, J. T.; Feany, M. B.; Sunyaev, S. R.; Chung, C. Y.; Khurana, V. The Parkinson's Disease Protein Alpha-Synuclein Is a Modulator of Processing Bodies and mRNA Stability. *Cell* **2022**, *185* (12), 2035-2056.e33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.008>.
- (140) Ray, S.; Singh, N.; Kumar, R.; Patel, K.; Pandey, S.; Datta, D.; Mahato, J.; Panigrahi, R.; Navalkar, A.; Mehra, S.; Gadhe, L.; Chatterjee, D.; Sawner, A. S.; Maiti, S.; Bhatia, S.; Gerez, J. A.; Chowdhury, A.; Kumar, A.; Padinhateeri, R.; Riek, R.; Krishnamoorthy, G.; Maji, S. K. α -Synuclein Aggregation Nucleates through Liquid-Liquid Phase Separation. *Nat. Chem.* **2020**, *12* (8), 705–716. <https://doi.org/10.1038/s41557-020-0465-9>.
- (141) Siegert, A.; Rankovic, M.; Favretto, F.; Ukmar-Godec, T.; Strohäker, T.; Becker, S.; Zweckstetter, M. Interplay between Tau and α -Synuclein Liquid-Liquid Phase Separation. *Protein Sci.* **2021**, *30* (7), 1326–1336. <https://doi.org/10.1002/pro.4025>.
- (142) Gracia, P.; Polanco, D.; Tarancón-Díez, J.; Serra, I.; Bracci, M.; Oroz, J.; Laurents, D. V.; García, I.; Cremades, N. Molecular Mechanism for the Synchronized Electrostatic Coacervation and Co-Aggregation of Alpha-Synuclein and Tau. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 4586. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32350-9>.
- (143) Miao, Q.; Nitsche, C.; Orton, H.; Overhand, M.; Otting, G.; Ubbink, M. Paramagnetic Chemical Probes for Studying Biological Macromolecules. *Chem. Rev.* **2022**, *acs.chemrev.1c00708*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00708>.
- (144) Müntener, T.; Joss, D.; Häussinger, D.; Hiller, S. Pseudocontact Shifts in Biomolecular NMR Spectroscopy. *Chem. Rev.* **2022**, *acs.chemrev.1c00796*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00796>.
- (145) Sakakibara, D.; Sasaki, A.; Ikeya, T.; Hamatsu, J.; Hanashima, T.; Mishima, M.; Yoshimasu, M.; Hayashi, N.; Mikawa, T.; Wälchli, M.; Smith, B. O.; Shirakawa, M.; Güntert, P.; Ito, Y. Protein Structure Determination in Living Cells by In-Cell NMR Spectroscopy. *Nature* **2009**, *458* (7234), 102–105. <https://doi.org/10.1038/nature07814>.
- (146) Ikeya, T.; Sasaki, A.; Sakakibara, D.; Shigemitsu, Y.; Hamatsu, J.; Hanashima, T.; Mishima, M.; Yoshimasu, M.; Hayashi, N.; Mikawa, T.; Nietlispach, D.; Wälchli, M.; Smith, B. O.; Shirakawa, M.; Güntert, P.; Ito, Y. NMR Protein Structure Determination in Living E. Coli Cells Using Nonlinear Sampling. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (6), 1051–1060. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.69>.
- (147) Tanaka, T.; Ikeya, T.; Kamoshida, H.; Suemoto, Y.; Mishima, M.; Shirakawa, M.; Güntert, P.; Ito, Y. High-Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells. *Angew. Chem.* **2019**, *58* (22), 7284–7288.

<https://doi.org/10.1002/anie.201900840>.

- (148) Ikeya, T.; Güntert, P.; Ito, Y. Protein Structure Determination in Living Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (10), 2442. <https://doi.org/10.3390/ijms20102442>.
- (149) Pan, B.-B.; Yang, F.; Ye, Y.; Wu, Q.; Li, C.; Huber, T.; Su, X.-C. 3D Structure Determination of a Protein in Living Cells Using Paramagnetic NMR Spectroscopy. *Chem Commun* **2016**, *52* (67), 10237–10240. <https://doi.org/10.1039/C6CC05490K>.
- (150) Hikone, Y.; Hirai, G.; Mishima, M.; Inomata, K.; Ikeya, T.; Arai, S.; Shirakawa, M.; Sodeoka, M.; Ito, Y. A New Carbamidemethyl-Linked Lanthanoid Chelating Tag for PCS NMR Spectroscopy of Proteins in Living HeLa Cells. *J. Biomol. NMR* **2016**, *66* (2), 99–110. <https://doi.org/10.1007/s10858-016-0059-4>.
- (151) Wade, M.; Li, Y.-C.; Wahl, G. M. MDM2, MDMX and P53 in Oncogenesis and Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13* (2), 83–96. <https://doi.org/10.1038/nrc3430>.
- (152) Han, T. W.; Kato, M.; Xie, S.; Wu, L. C.; Mirzaei, H.; Pei, J.; Chen, M.; Xie, Y.; Allen, J.; Xiao, G.; McKnight, S. L. Cell-Free Formation of RNA Granules: Bound RNAs Identify Features and Components of Cellular Assemblies. *Cell* **2012**, *149* (4), 768–779. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.016>.
- (153) Kato, M.; Han, T. W.; Xie, S.; Shi, K.; Du, X.; Wu, L. C.; Mirzaei, H.; Goldsmith, E. J.; Longgood, J.; Pei, J.; Grishin, N. V.; Frantz, D. E.; Schneider, J. W.; Chen, S.; Li, L.; Sawaya, M. R.; Eisenberg, D.; Tycko, R.; McKnight, S. L. Cell-Free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell* **2012**, *149* (4), 753–767. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.017>.
- (154) Kwon, I.; Kato, M.; Xiang, S.; Wu, L.; Theodoropoulos, P.; Mirzaei, H.; Han, T.; Xie, S.; Corden, J. L.; McKnight, S. L. Phosphorylation-Regulated Binding of RNA Polymerase II to Fibrous Polymers of Low-Complexity Domains. *Cell* **2013**, *155* (5), 1049–1060. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.033>.
- (155) Brangwynne, C. P.; Tompa, P.; Pappu, R. V. Polymer Physics of Intracellular Phase Transitions. *Nat. Phys.* **2015**, *11* (11), 899–904. <https://doi.org/10.1038/nphys3532>.
- (156) Uversky, V. N.; Kuznetsova, I. M.; Turoverov, K. K.; Zaslavsky, B. Intrinsically Disordered Proteins as Crucial Constituents of Cellular Aqueous Two Phase Systems and Coacervates. *FEBS Lett.* **2015**, *589* (1), 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.028>.
- (157) Brangwynne, C. P.; Eckmann, C. R.; Courson, D. S.; Rybarska, A.; Hoegge, C.; Gharakhani, J.; Jülicher, F.; Hyman, A. A. Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation. *Science* **2009**, *324* (5935), 1729–1732. <https://doi.org/10.1126/science.1172046>.
- (158) Brangwynne, C. P.; Mitchison, T. J.; Hyman, A. A. Active Liquid-like Behavior of Nucleoli Determines Their Size and Shape in *Xenopus Laevis* Oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108* (11), 4334–4339. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017150108>.
- (159) Brangwynne, C. P. Soft Active Aggregates: Mechanics, Dynamics and Self-Assembly of Liquid-like Intracellular Protein Bodies. *Soft Matter* **2011**, *7* (7), 3052. <https://doi.org/10.1039/c0sm00981d>.
- (160) Burke, K. A.; Janke, A. M.; Rhine, C. L.; Fawzi, N. L. Residue-by-Residue View of In Vitro FUS Granules That Bind the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Mol. Cell* **2015**, *60* (2), 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.006>.
- (161) Abyzov, A.; Blackledge, M.; Zweckstetter, M. Conformational Dynamics of Intrinsically Disordered Proteins Regulate Biomolecular Condensate Chemistry. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (6), 6719–6748. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00774>.
- (162) Banani, S. F.; Lee, H. O.; Hyman, A. A.; Rosen, M. K. Biomolecular Condensates: Organizers of Cellular Biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>.
- (163) Klosin, A.; Oltsch, F.; Harmon, T.; Honigmann, A.; Jülicher, F.; Hyman, A. A.; Zechner, C. Phase Separation Provides a Mechanism to Reduce Noise in Cells. *Science* **2020**, *367* (6476), 464–468. <https://doi.org/10.1126/science.aav6691>.
- (164) Alberti, S.; Hyman, A. A. Biomolecular Condensates at the Nexus of Cellular Stress, Protein Aggregation Disease and Ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22* (3), 196–213. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00326-6>.
- (165) Lyon, A. S.; Peeples, W. B.; Rosen, M. K. A Framework for Understanding the Functions of Biomolecular Condensates across Scales. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22* (3), 215–235. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00303-z>.
- (166) Li, H.; Ernst, C.; Kolonko-Adamska, M.; Greb-Markiewicz, B.; Man, J.; Parisi, V.; Ng, B. W.-L. Phase Separation in Viral Infections. *Trends Microbiol.* **2022**, S0966842X22001615. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.06.005>.
- (167) Mehta, S.; Zhang, J. Liquid-Liquid Phase Separation Drives Cellular Function and Dysfunction in Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2022**, *22* (4), 239–252. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00444-7>.
- (168) Blundell, T. L.; Mizuguchi, K. Structural Genomics: An Overview. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, *73* (5), 289–295. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(00\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(00)00008-0).
- (169) Brenner, S. E. A Tour of Structural Genomics. *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2* (10), 801–809. <https://doi.org/10.1038/35093574>.
- (170) van der Lee, R.; Buljan, M.; Lang, B.; Weatheritt, R. J.; Daughdrill, G. W.; Dunker, A. K.; Fuxreiter, M.; Gough, J.; Gsponer, J.; Jones, D. T.; Kim, P. M.; Kriwacki, R. W.; Oldfield, C. J.; Pappu, R. V.; Tompa, P.; Uversky, V. N.; Wright, P. E.; Babu, M. M. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (13), 6589–6631. <https://doi.org/10.1021/cr400525m>.
- (171) Babu, M. M. The Contribution of Intrinsically Disordered Regions to Protein Function, Cellular Complexity, and Human Disease. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44* (5), 1185–1200. <https://doi.org/10.1042/BST20160172>.
- (172) Wright, P. E.; Dyson, H. J. Intrinsically Disordered Proteins in Cellular Signalling and Regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *16* (1), 18–29. <https://doi.org/10.1038/nrm3920>.
- (173) Bondos, S. E.; Dunker, A. K.; Uversky, V. N. Intrinsically Disordered Proteins Play Diverse Roles in Cell Signaling. *Cell Commun. Signal.* **2022**, *20* (1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00821-7>.
- (174) Ochoa, D.; Jarnuczak, A. F.; Itez, C. V. x000E9; Gehre, M.; Soucheray, M.; Mateus, A. x000E9; Kleefeldt, A. A.; Hill, A.; Garcia-Alonso, L.; Stein, F.; Krogan, N. J.; Savitski, M. M.; Swaney, D. L.; no, J. A. V. x000ED; Noh, K.-M.; Beltrao, P. The Functional Landscape of the Human Phosphoproteome. *Nat. Biotechnol.* **2019**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0344-3>.
- (175) Kalyuzhnyy, A.; Evers, P. A.; Evers, C. E.; Bowler-Barnett, E.; Martin, M. J.; Sun, Z.; Deutsch, E. W.; Jones, A. R. Profiling the Human Phosphoproteome to Estimate the True Extent of Protein Phosphorylation. *J. Proteome Res.* **2022**, *21* (6), 1510–1524.

- <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00131>.
- (176) Camacho-Zarco, A. R.; Schnapka, V.; Guseva, S.; Abyzov, A.; Adamski, W.; Milles, S.; Jensen, M. R.; Zidek, L.; Salvi, N.; Blackledge, M. NMR Provides Unique Insight into the Functional Dynamics and Interactions of Intrinsically Disordered Proteins. *Chem. Rev.* **2022**, *122* (10), 9331–9356. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c01023>.
- (177) Bah, A.; Vernon, R. M.; Siddiqui, Z.; Krzeminski, M.; Muhandiram, R.; Zhao, C.; Sonenberg, N.; Kay, L. E.; Forman-Kay, J. D. Folding of an Intrinsically Disordered Protein by Phosphorylation as a Regulatory Switch. *Nature* **2015**, *519* (7541), 106–109. <https://doi.org/10.1038/nature13999>.
- (178) Milles, S.; Mercadante, D.; Aramburu, I. V.; Jensen, M. R.; Banterle, N.; Koehler, C.; Tyagi, S.; Clarke, J.; Shammas, S. L.; Blackledge, M.; Gräter, F.; Lemke, E. A. Plasticity of an Ultrafast Interaction between Nucleoporins and Nuclear Transport Receptors. *Cell* **2015**, *163* (3), 734–745. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.047>.
- (179) Nishikawa, J. L.; Boeszoermyeni, A.; Vale-Silva, L. A.; Torelli, R.; Posteraro, B.; Sohn, Y.-J.; Ji, F.; Gelev, V.; Sanglard, D.; Sanguinetti, M.; Sadreyev, R. I.; Mukherjee, G.; Bhyravahotla, J.; Buhrlage, S. J.; Gray, N. S.; Wagner, G.; Nääär, A. M.; Arthanari, H. Inhibiting Fungal Multidrug Resistance by Disrupting an Activator–Mediator Interaction. *Nature* **2016**, *530* (7591), 485–489. <https://doi.org/10.1038/nature16963>.
- (180) Berlow, R. B.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. Hypersensitive Termination of the Hypoxic Response by a Disordered Protein Switch. *Nature* **2017**, *543* (7645), 447–451. <https://doi.org/10.1038/nature21705>.
- (181) Milles, S.; Jensen, M. R.; Lazert, C.; Guseva, S.; Ivashchenko, S.; Communie, G.; Maurin, D.; Gerlier, D.; Ruigrok, R. W. H.; Blackledge, M. An Ultraweak Interaction in the Intrinsically Disordered Replication Machinery Is Essential for Measles Virus Function. *Sci. Adv.* **2018**, *4* (8), eaat7778. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat7778>.
- (182) Borgia, A.; Borgia, M. B.; Bugge, K.; Kissling, V. M.; Heidarsson, P. O.; Fernandes, C. B.; Sottini, A.; Soranno, A.; Buholzer, K. J.; Nettels, D.; Kragelund, B. B.; Best, R. B.; Schuler, B. Extreme Disorder in an Ultrahigh-Affinity Protein Complex. *Nature* **2018**, *555* (7694), 61–66. <https://doi.org/10.1038/nature25762>.
- (183) Platzer, G.; Okon, M.; McIntosh, L. P. PH-Dependent Random Coil ¹H, ¹³C, and ¹⁵N Chemical Shifts of the Ionizable Amino Acids: A Guide for Protein PK a Measurements. *J. Biomol. NMR* **2014**, *60* (2–3), 109–129. <https://doi.org/10.1007/s10858-014-9862-y>.
- (184) Bermel, W.; Bertini, I.; Cszimok, V.; Felli, I. C.; Pierattelli, R.; Tompa, P. H-Start for Exclusively Heteronuclear NMR Spectroscopy: The Case of Intrinsically Disordered Proteins. *J. Magn. Reson.* **2009**, *198* (2), 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.02.012>.
- (185) Felli, I. C.; Pierattelli, R. ¹³C Direct Detected NMR for Challenging Systems. *Chem. Rev.* **2022**, *acs.chemrev.1c00871*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00871>.
- (186) Lambert, S. A.; Jolma, A.; Campitelli, L. F.; Das, P. K.; Yin, Y.; Albu, M.; Chen, X.; Taipale, J.; Hughes, T. R.; Weirauch, M. T. The Human Transcription Factors. *Cell* **2018**, *172* (4), 650–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>.
- (187) Weidemüller, P.; Kholmatov, M.; Petsalaki, E.; Zaugg, J. B. Transcription Factors: Bridge between Cell Signaling and Gene Regulation. *PROTEOMICS* **2021**, *21* (23–24), 2000034. <https://doi.org/10.1002/pmic.202000034>.
- (188) Staby, L.; O’Shea, C.; Willemoës, M.; Theisen, F.; Kragelund, B. B.; Skriver, K. Eukaryotic Transcription Factors: Paradigms of Protein Intrinsic Disorder. *Biochem. J.* **2017**, *474* (15), 2509–2532. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160631>.
- (189) Yruela, I.; Oldfield, C. J.; Niklas, K. J.; Dunker, A. K. Evidence for a Strong Correlation Between Transcription Factor Protein Disorder and Organismic Complexity. *Genome Biol. Evol.* **2017**, *9* (5), 1248–1265. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx073>.
- (190) Liu, J.; Perumal, N. B.; Oldfield, C. J.; Su, E. W.; Uversky, V. N.; Dunker, A. K. Intrinsic Disorder in Transcription Factors †. *Biochemistry* **2006**, *45* (22), 6873–6888. <https://doi.org/10.1021/bi0602718>.
- (191) Xue, B.; Oldfield, C. J.; Van, Y.-Y.; Dunker, A. K.; Uversky, V. N. Protein Intrinsic Disorder and Induced Pluripotent Stem Cells. *Mol. BioSyst* **2012**, *8* (1), 134–150. <https://doi.org/10.1039/C1MB05163F>.
- (192) Bjarnason, S.; Ruidiaz, S. F.; Mclvor, J.; Mercadante, D.; Heidarsson, P. O. Protein Intrinsic Disorder on a Dynamic Nucleosomal Landscape. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier, 2021; Vol. 183, pp 295–354. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2021.06.006>.
- (193) Bourgeois, B.; Gui, T.; Hoogeboom, D.; Hocking, H. G.; Richter, G.; Spreitzer, E.; Viertler, M.; Richter, K.; Madl, T.; Burgering, B. M. T. Multiple Regulatory Intrinsically Disordered Motifs Control FOXO4 Transcription Factor Binding and Function. *Cell Rep.* **2021**, *36* (4), 109446. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109446>.
- (194) Ravarani, C. N.; Erkina, T. Y.; De Baets, G.; Dudman, D. C.; Erkin, A. M.; Babu, M. M. High-throughput Discovery of Functional Disordered Regions: Investigation of Transactivation Domains. *Mol. Syst. Biol.* **2018**, *14* (5), e8190-14. <https://doi.org/10.15252/msb.20188190>.
- (195) Brodsky, S.; Jana, T.; Mittelman, K.; Chapal, M.; Kumar, D. K.; Carmi, M.; Barkai, N. Intrinsically Disordered Regions Direct Transcription Factor In Vivo Binding Specificity. *Mol. Cell* **2020**, *79* (3), 459–471.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.032>.
- (196) Bojja, A.; Klein, I. A.; Sabari, B. R.; Dall’Agnese, A.; Coffey, E. L.; Zamudio, A. V.; Li, C. H.; Shrinivas, K.; Manteiga, J. C.; Hannett, N. M.; Abraham, B. J.; Afeyan, L. K.; Guo, Y. E.; Rimel, J. K.; Fant, C. B.; Schuijers, J.; Lee, T. I.; Taatjes, D. J.; Young, R. A. Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell* **2018**, 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.042>.
- (197) Erijman, A.; Kozlowski, L.; Sohrabi-Jahromi, S.; Fishburn, J.; Warfield, L.; Schreiber, J.; Noble, W. S.; Söding, J.; Hahn, S. A High-Throughput Screen for Transcription Activation Domains Reveals Their Sequence Features and Permits Prediction by Deep Learning. *Mol. Cell* **2020**, *78* (5), 890–902.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.020>.
- (198) Næs, G.; Storesund, J. O.; Udayakumar, P.; Ledsaak, M.; Gabrielsen, O. S. Dissecting the Transactivation Domain (TAD) of the Transcription Factor C-Myb to Assess Recent Models of TAD Function. *FEBS Open Bio* **2020**, *10* (11), 2329–2342. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12978>.
- (199) Sanborn, A. L.; Yeh, B. T.; Feigerle, J. T.; Hao, C. V.; Townshend, R. J.; Lieberman Aiden, E.; Dror, R. O.; Kornberg, R. D. Simple Biochemical Features Underlie Transcriptional Activation Domain Diversity and Dynamic, Fuzzy Binding to Mediator. *eLife* **2021**,

10, e68068. <https://doi.org/10.7554/eLife.68068>.

- (200) Tuttle, L. M.; Pacheco, D.; Warfield, L.; Wilburn, D. B.; Hahn, S.; Klevit, R. E. Mediator Subunit Med15 Dictates the Conserved “Fuzzy” Binding Mechanism of Yeast Transcription Activators Gal4 and Gcn4. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 2220. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22441-4>.
- (201) Soto, L. F.; Li, Z.; Santoso, C. S.; Berenson, A.; Ho, I.; Shen, V. X.; Yuan, S.; Fuxman Bass, J. I. Compendium of Human Transcription Factor Effector Domains. *Mol. Cell* **2022**, *82* (3), 514–526. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.007>.
- (202) Staller, M. V.; Ramirez, E.; Kotha, S. R.; Holehouse, A. S.; Pappu, R. V.; Cohen, B. A. Directed Mutational Scanning Reveals a Balance between Acidic and Hydrophobic Residues in Strong Human Activation Domains. *Cell Syst.* **2022**, *13* (4), 334–345.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2022.01.002>.
- (203) Filtz, T. M.; Vogel, W. K.; Leid, M. Regulation of Transcription Factor Activity by Interconnected Post-Translational Modifications. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35* (2), 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.11.005>.
- (204) Han, D.; Huang, M.; Wang, T.; Li, Z.; Chen, Y.; Liu, C.; Lei, Z.; Chu, X. Lysine Methylation of Transcription Factors in Cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10* (4), 290. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1524-2>.
- (205) Qian, M.; Yan, F.; Yuan, T.; Yang, B.; He, Q.; Zhu, H. Targeting Post-Translational Modification of Transcription Factors as Cancer Therapy. *Drug Discov. Today* **2020**, *25* (8), 1502–1512. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.06.005>.
- (206) Tsafo, K.; Tiwari, P. B.; Forman-Kay, J. D.; Metallo, S. J.; Toretsky, J. A. Targeting Intrinsically Disordered Transcription Factors: Changing the Paradigm. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430* (16), 2321–2341. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.008>.
- (207) Chen, A.; Koehler, A. N. Transcription Factor Inhibition: Lessons Learned and Emerging Targets. *Trends Mol. Med.* **2020**, *26* (5), 508–518. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.01.004>.
- (208) Inoue, H.; Nagata, N.; Kurokawa, H.; Yamanaka, S. IPS Cells: A Game Changer for Future Medicine. *EMBO J.* **2014**, *33* (5), 409–417. <https://doi.org/10.1002/emboj.201387098>.
- (209) Shi, Y.; Inoue, H.; Wu, J. C.; Yamanaka, S. Induced Pluripotent Stem Cell Technology: A Decade of Progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (2), 115–130. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>.
- (210) Buganim, Y.; Faddah, D. A.; Jaenisch, R. Mechanisms and Models of Somatic Cell Reprogramming. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *14* (6), 427–439. <https://doi.org/10.1038/nrg3473>.
- (211) Theunissen, T. W.; Jaenisch, R. Molecular Control of Induced Pluripotency. *Stem Cell* **2014**, *14* (6), 720–734. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.05.002>.
- (212) Velychko, S.; Adachi, K.; Kim, K.-P.; Hou, Y.; MacCarthy, C. M.; Wu, G.; Schöler, H. R. Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs. *Cell Stem Cell* **2019**, *25* (6), 737–753.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.10.002>.
- (213) Deng, W.; Jacobson, E. C.; Collier, A. J.; Plath, K. The Transcription Factor Code in iPSC Reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2021**, *70*, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2021.06.003>.
- (214) Kim, K.-P.; Wu, Y.; Yoon, J.; Adachi, K.; Wu, G.; Velychko, S.; MacCarthy, C. M.; Shin, B.; Röpke, A.; Arauzo-Bravo, M. J.; Stehling, M.; Han, D. W.; Gao, Y.; Kim, J.; Gao, S.; Schöler, H. R. Reprogramming Competence of OCT Factors Is Determined by Transactivation Domains. *Sci. Adv.* **2020**, *6* (36), eaa7364. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7364>.
- (215) Cai, N.; Li, M.; Qu, J.; Liu, G.-H.; Izpisua Belmonte, J. C. Post-Translational Modulation of Pluripotency. *J. Mol. Cell Biol.* **2012**, *4* (4), 262–265. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs031>.
- (216) Rizzino, A. Concise Review: The Sox2-Oct4 Connection: Critical Players in a Much Larger Interdependent Network Integrated at Multiple Levels. *Stem Cells* **2013**, *31* (6), 1033–1039. <https://doi.org/10.1002/stem.1352>.
- (217) Fang, L.; Zhang, L.; Wei, W.; Jin, X.; Wang, P.; Tong, Y.; Li, J.; Du, J. X.; Wong, J. A Methylation-Phosphorylation Switch Determines Sox2 Stability and Function in ESC Maintenance or Differentiation. *Mol. Cell* **2014**, *55* (4), 537–551. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.018>.
- (218) Jang, H.; Kim, T. W.; Yoon, S.; Choi, S.-Y.; Kang, T.-W.; Kim, S.-Y.; Kwon, Y.-W.; Cho, E.-J.; Youn, H.-D. O-GlcNAc Regulates Pluripotency and Reprogramming by Directly Acting on Core Components of the Pluripotency Network. *Stem Cell* **2012**, *11* (1), 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.001>.
- (219) Brumbaugh, J.; Hou, Z.; Russell, J. D.; Howden, S. E.; Yu, P.; Ledvina, A. R.; Coon, J. J.; Thomson, J. A. Phosphorylation Regulates Human OCT4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (19), 7162–7168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203874109>.
- (220) Cho, Y.; Kang, H. G.; Kim, S.-J.; Lee, S.; Jee, S.; Ahn, S. G.; Kang, M. J.; Song, J. S.; Chung, J.-Y.; Yi, E. C.; Chun, K.-H. Post-Translational Modification of OCT4 in Breast Cancer Tumorigenesis. *Cell Death Differ.* **2018**, 1781–1795. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0079-6>.
- (221) Williams, C. A. C.; Soufi, A.; Pollard, S. M. Post-Translational Modification of SOX Family Proteins: Key Biochemical Targets in Cancer? *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *67* (Pt 1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.09.009>.
- (222) Esch, D.; Vahokoski, J.; Groves, M. R.; Pogenberg, V.; Cojocaru, V.; vom Bruch, H.; Han, D.; Drexler, H. C. A.; Arauzo-Bravo, M. J.; Ng, C. K. L.; Jauch, R.; Wilmanns, M.; Schöler, H. R. A Unique Oct4 Interface Is Crucial for Reprogramming to Pluripotency. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15* (3), 295–301. <https://doi.org/10.1038/ncb2680>.
- (223) Reményi, A.; Lins, K.; Nissen, L. J.; Reinbold, R.; Schöler, H. R.; Wilmanns, M. Crystal Structure of a POU/HMG/DNA Ternary Complex Suggests Differential Assembly of Oct4 and Sox2 on Two Enhancers. *Genes Dev.* **2003**, *17* (16), 2048–2059. <https://doi.org/10.1101/gad.269303>.
- (224) Kamachi, Y.; Kondoh, H. Sox Proteins: Regulators of Cell Fate Specification and Differentiation. *Development* **2013**, *140* (20), 4129–4144. <https://doi.org/10.1242/dev.091793>.
- (225) Jerabek, S.; Merino, F.; Schöler, H. R.; Cojocaru, V. OCT4: Dynamic DNA Binding Pioneers Stem Cell Pluripotency. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* **2014**, *1839* (3), 138–154. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.10.001>.
- (226) Gagliardi, A.; Mullin, N. P.; Tan, Z. Y.; Colby, D.; Kousa, A. I.; Halbritter, F.; Weiss, J. T.; Felker, A.; Bezstarosti, K.; Favaro, R.; Demmers, J.; Nicolis, S. K.; Tomlinson, S. R.; Poot, R. A.; Chambers, I. A Direct Physical Interaction between Nanog and Sox2 Regulates Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *EMBO J.* **2013**, *32* (16), 2231–2247. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.161>.

- (227) Saunders, A.; Faiola, F.; Wang, J. Concise Review: Pursuing Self-Renewal and Pluripotency with the Stem Cell Factor Nanog. *STEM CELLS* **2013**, *31* (7), 1227–1236. <https://doi.org/10.1002/stem.1384>.
- (228) Yesudhas, D.; Anwar, M. A.; Choi, S. Structural Mechanism of DNA-Mediated Nanog–Sox2 Cooperative Interaction. *RSC Adv* **2019**, *9* (14), 8121–8130. <https://doi.org/10.1039/c8ra10085c>.
- (229) Dodonova, S. O.; Zhu, F.; Dienemann, C.; Taipale, J.; Cramer, P. Nucleosome-Bound SOX2 and SOX11 Structures Elucidate Pioneer Factor Function. *Nature* **2020**, *580* (7805), 669–672. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2195-y>.
- (230) Michael, A. K.; Grand, R. S.; Isbel, L.; Cavadini, S.; Kozicka, Z.; Kempf, G.; Bunker, R. D.; Schenk, A. D.; Graff-Meyer, A.; Pathare, G. R.; Weiss, J.; Matsumoto, S.; Burger, L.; Schübeler, D.; Thomä, N. H. Mechanisms of OCT4-SOX2 Motif Readout on Nucleosomes. *Science* **2020**, *368* (6498), 1460–1465. <https://doi.org/10.1126/science.abb0074>.
- (231) Echigoya, K.; Koyama, M.; Negishi, L.; Takizawa, Y.; Mizukami, Y.; Shimabayashi, H.; Kuroda, A.; Kurumizaka, H. Nucleosome Binding by the Pioneer Transcription Factor OCT4. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 11832. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68850-1>.
- (232) Roberts, G. A.; Ozkan, B.; Gachulinová, I.; O'Dwyer, M. R.; Hall-Ponsele, E.; Saxena, M.; Robinson, P. J.; Soufi, A. Dissecting OCT4 Defines the Role of Nucleosome Binding in Pluripotency. *Nat. Cell Biol.* **2021**, *23* (8), 834–845. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00727-5>.
- (233) Morgunova, E.; Taipale, J. Structural Insights into the Interaction between Transcription Factors and the Nucleosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, *71*, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.06.016>.
- (234) Kagawa, W.; Kurumizaka, H. Structural Basis for DNA Sequence Recognition by Pioneer Factors in Nucleosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, *71*, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.05.011>.
- (235) Luzete-Monteiro, E.; Zaret, K. S. Structures and Consequences of Pioneer Factor Binding to Nucleosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2022**, *75*, 102425. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102425>.
- (236) Sunkel, B. D.; Stanton, B. Z. Pioneer Factors in Development and Cancer. *iScience* **2021**, *24* (10), 103132. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103132>.
- (237) Jagga, B.; Edwards, M.; Pagin, M.; Wagstaff, K. M.; Aragão, D.; Roman, N.; Nanson, J. D.; Raidal, S. R.; Dominado, N.; Stewart, M.; Jans, D. A.; Hime, G. R.; Nicolis, S. K.; Basler, C. F.; Forwood, J. K. Structural Basis for Nuclear Import Selectivity of Pioneer Transcription Factor SOX2. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20194-0>.
- (238) Aksoy, I.; Jauch, R.; Eras, V.; Chng, W. A.; Chen, J.; Divakar, U.; Ng, C. K. L.; Kolatkar, P. R.; Stanton, L. W. Sox Transcription Factors Require Selective Interactions with Oct4 and Specific Transactivation Functions to Mediate Reprogramming. *Stem Cells* **2013**, *31* (12), 2632–2646. <https://doi.org/10.1002/stem.1522>.
- (239) Tamiola, K.; Mulder, F. A. A. Using NMR Chemical Shifts to Calculate the Propensity for Structural Order and Disorder in Proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40* (5), 1014–1020. <https://doi.org/10.1042/BST20120171>.
- (240) Yao, B.; Zhang, S.; Wei, Y.; Tian, S.; Lu, Z.; Jin, L.; He, Y.; Xie, W.; Li, Y. Structural Insights into the Specificity of Ligand Binding and Coactivator Assembly by Estrogen-Related Receptor β . *J. Mol. Biol.* **2020**, *432* (19), 5460–5472. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.007>.
- (241) Festuccia, N.; Owens, N.; Chervova, A.; Dubois, A.; Navarro, P. The Combined Action of Esrrb and Nr5a2 Is Essential for Murine Naïve Pluripotency. *Development* **2021**, *148* (17), dev199604. <https://doi.org/10.1242/dev.199604>.
- (242) Fairhead, M.; Howarth, M. Site-Specific Biotinylation of Purified Proteins Using BirA. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2015**, *1266*, 171–184. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2272-7_12.
- (243) Martin, E. W.; Holehouse, A. S.; Grace, C. R.; Hughes, A.; Pappu, R. V.; Mittag, T. Sequence Determinants of the Conformational Properties of an Intrinsically Disordered Protein Prior to and upon Multisite Phosphorylation. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (47), 15323–15335. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b10272>.
- (244) Gibbs, E. B.; Lu, F.; Portz, B.; Fisher, M. J.; Medellin, B. P.; Laremore, T. N.; Zhang, Y. J.; Gilmour, D. S.; Showalter, S. A. Phosphorylation Induces Sequence-Specific Conformational Switches in the RNA Polymerase II C-Terminal Domain. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 15233. <https://doi.org/10.1038/ncomms15233>.
- (245) Kulkarni, P.; Jolly, M. K.; Jia, D.; Mooney, S. M.; Bhargava, A.; Kagohara, L. T.; Chen, Y.; Hao, P.; He, Y.; Veltri, R. W.; Grishaev, A.; Weninger, K.; Levine, H.; Orban, J. Phosphorylation-Induced Conformational Dynamics in an Intrinsically Disordered Protein and Potential Role in Phenotypic Heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (13). <https://doi.org/10.1073/pnas.1700082114>.
- (246) Jin, F.; Gräter, F. How Multisite Phosphorylation Impacts the Conformations of Intrinsically Disordered Proteins. *PLoS Comput. Biol.* **2021**, *17* (5), e1008939. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008939>.
- (247) Mateos, B.; Holzinger, J.; Conrad-Billroth, C.; Platzer, G.; Žerko, S.; Sealey-Cardona, M.; Anrather, D.; Koźmiński, W.; Konrat, R. Hyperphosphorylation of Human Osteopontin and Its Impact on Structural Dynamics and Molecular Recognition. *Biochemistry* **2021**, *60* (17), 1347–1355. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00050>.
- (248) Trempolec, N.; Dave-Coll, N.; Nebreda, A. R. SnapShot: P38 MAPK Substrates. *Cell* **2013**, *152* (4), 924–924.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.047>.
- (249) Canovas, B.; Nebreda, A. R. Diversity and Versatility of P38 Kinase Signalling in Health and Disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00322-w>.
- (250) Quevedo, M.; Meert, L.; Dekker, M. R.; Dekkers, D. H. W.; Brandsma, J. H.; Berg, D. L. C.; Özgür, Z.; IJcken, W. F. J. V.; Demers, J.; Fornerod, M.; Poot, R. A. Mediator Complex Interaction Partners Organize the Transcriptional Network That Defines Neural Stem Cells. *Nat. Commun.* **2019**, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10502-8>.
- (251) Moretto-Zita, M.; Jin, H.; Shen, Z.; Zhao, T.; Briggs, S. P.; Xu, Y. Phosphorylation Stabilizes Nanog by Promoting Its Interaction with Pin1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107* (30), 13312–13317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005847107>.
- (252) Nishi, M.; Akutsu, H.; Masui, S.; Kondo, A.; Nagashima, Y.; Kimura, H.; Perrem, K.; Shigeri, Y.; Toyoda, M.; Okayama, A.; Hirano, H.; Umezawa, A.; Yamamoto, N.; Lee, S. W.; Ryo, A. A Distinct Role for Pin1 in the Induction and Maintenance of Pluripotency. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (13), 11593–11603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187989>.

- (253) Zhou, X. Z.; Lu, K. P. The Isomerase PIN1 Controls Numerous Cancer-Driving Pathways and Is a Unique Drug Target. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *16* (7), 463–478. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.49>.
- (254) Gebel, J.; Tuppi, M.; Chaikuad, A.; Hötte, K.; Schröder, M.; Schulz, L.; Lohr, F.; Gutfreund, N.; Finke, F.; Henrich, E.; Mezhyrova, J.; Lehnert, R.; Pampaloni, F.; Hummer, G.; Stelzer, E. H. K.; Knapp, S.; Dötsch, V. P63 Uses a Switch-like Mechanism to Set the Threshold for Induction of Apoptosis. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16* (10), 1078–1086. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0600-3>.
- (255) Alik, A.; Bouguechtouli, C.; Julien, M.; Bermel, W.; Ghoul, R.; Zinn-Justin, S.; Theillet, F.-X. Sensitivity-Enhanced ¹³C-NMR Spectroscopy for Monitoring Multisite Phosphorylation at Physiological Temperature and pH. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2020**. <https://doi.org/10.1002/anie.202002288>.
- (256) Burré, J. The Synaptic Function of α -Synuclein. *J. Park. Dis.* **2015**, *5* (4), 699–713. <https://doi.org/10.3233/jpd-150642>.
- (257) Nakamura, K.; Nemani, V. M.; Azarbal, F.; Skibinski, G.; Levy, J. M.; Egami, K.; Munishkina, L.; Zhang, J.; Gardner, B.; Wakabayashi, J.; Sesaki, H.; Cheng, Y.; Finkbeiner, S.; Nussbaum, R. L.; Masliah, E.; Edwards, R. H. Direct Membrane Association Drives Mitochondrial Fission by the Parkinson Disease-Associated Protein Alpha-Synuclein. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (23), 20710–20726. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.213538>.
- (258) Ulmer, T. S.; Bax, A.; Cole, N. B.; Nussbaum, R. L. Structure and Dynamics of Micelle-Bound Human Alpha-Synuclein. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (10), 9595–9603. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411805200>.
- (259) Fusco, G.; Pape, T.; Stephens, A. D.; Mahou, P.; Costa, A. R.; Kaminski, C. F.; Schierle, G. S. K.; Vendruscolo, M.; Veglia, G.; Dobson, C. M.; De Simone, A. Structural Basis of Synaptic Vesicle Assembly Promoted by α -Synuclein. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms12563>.
- (260) Galvagnion, C. The Role of Lipids Interacting with α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *J. Park. Dis.* **2017**, *7* (3), 433–450. <https://doi.org/10.3233/JPD-171103>.
- (261) Ramalingam, N.; Dettmer, U. Temperature Is a Key Determinant of Alpha- and Beta-Synuclein Membrane Interactions in Neurons. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100271. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100271>.
- (262) Kachappilly, N.; Srivastava, J.; Swain, B. P.; Thakur, P. Interaction of Alpha-Synuclein with Lipids. *Methods Cell Biol.* **2022**, *169*, 43–66. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2021.12.002>.
- (263) Bodor, A.; Haller, J. D.; Bouguechtouli, C.; Theillet, F.-X.; Nyitray, L.; Luy, B. Power of Pure Shift H α C α Correlations: A Way to Characterize Biomolecules under Physiological Conditions. *Anal. Chem.* **2020**, *92* (18), 12423–12428. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c02182>.
- (264) Toyama, Y.; Rangadurai, A. K.; Kay, L. E. Measurement of ¹H α Transverse Relaxation Rates in Proteins: Application to Solvent PREs. *J. Biomol. NMR* **2022**, *76* (4), 137–152. <https://doi.org/10.1007/s10858-022-00401-4>.
- (265) Julien, M.; Bouguechtouli, C.; Alik, A.; Ghoul, R.; Zinn-Justin, S.; Theillet, F.-X. Multiple Site-Specific Phosphorylation of IDPs Monitored by NMR. In *Intrinsically Disordered Proteins: Methods and Protocols*; Kragelund, B. B., Skriver, K., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer US: New York, NY, 2020; pp 793–817. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0524-0_41.
- (266) Boros, J.; Donaldson, I. J.; O'Donnell, A.; Odrowaz, Z. A.; Zeef, L.; Lupien, M.; Meyer, C. A.; Liu, X. S.; Brown, M.; Sharrocks, A. D. Elucidation of the ELK1 Target Gene Network Reveals a Role in the Coordinate Regulation of Core Components of the Gene Regulation Machinery. *Genome Res.* **2009**, *19* (11), 1963–1973. <https://doi.org/10.1101/gr.093047.109>.
- (267) Odrowaz, Z.; Sharrocks, A. D. ELK1 Uses Different DNA Binding Modes to Regulate Functionally Distinct Classes of Target Genes. *PLoS Genet.* **2012**, *8* (5), e1002694-16. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002694>.
- (268) Kawahara, T.; Shareef, H. K.; Aljarah, A. K.; Ide, H.; Li, Y.; Kashiwagi, E.; Netto, G. J.; Zheng, Y.; Miyamoto, H. ELK1 Is Up-Regulated by Androgen in Bladder Cancer Cells and Promotes Tumor Progression. *Oncotarget* **2015**, *6* (30), 29860–29876. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5007>.
- (269) Bahrami, S.; Drablos, F. Gene Regulation in the Immediate-Early Response Process. *Adv. Biol. Regul.* **2016**, *62* (C), 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.05.001>.
- (270) Ducker, C.; Chow, L. K. Y.; Saxton, J.; Handwerker, J.; McGregor, A.; Strahl, T.; Layfield, R.; Shaw, P. E. De-Ubiquitination of ELK-1 by USP17 Potentiates Mitogenic Gene Expression and Cell Proliferation. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (9), 4495–4508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz166>.
- (271) Pardy, L.; Rosati, R.; Soave, C.; Huang, Y.; Kim, S.; Ratnam, M. The Ternary Complex Factor Protein ELK1 Is an Independent Prognosticator of Disease Recurrence in Prostate Cancer. *The Prostate* **2020**, *80* (2), 198–208. <https://doi.org/10.1002/pros.23932>.
- (272) Yang, R.; Li, X.; Wu, Y.; Zhang, G.; Liu, X.; Li, Y.; Bao, Y.; Yang, W.; Cui, H. EGFR Activates GDH1 Transcription to Promote Glutamine Metabolism through MEK/ERK/ELK1 Pathway in Glioblastoma. *Oncogene* **2020**, *39* (14), 2975–2986. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1199-2>.
- (273) Thiel, G.; Backes, T. M.; Guethlein, L. A.; Rössler, O. G. Critical Protein–Protein Interactions Determine the Biological Activity of Elk-1, a Master Regulator of Stimulus-Induced Gene Transcription. *Molecules* **2021**, *26* (20), 6125. <https://doi.org/10.3390/molecules26206125>.
- (274) Monté, D.; Clantin, B.; Dewitte, F.; Lens, Z.; Rucktooa, P.; Pardon, E.; Steyaert, J.; Verger, A.; Villeret, V. Crystal Structure of Human Mediator Subunit MED23. *Nat. Commun.* **2018**, 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05967-y>.
- (275) Schier, A. C.; Taatjes, D. J. Everything at Once: Cryo-EM Yields Remarkable Insights into Human RNA Polymerase II Transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2021**, *28* (7), 540–543. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00613-6>.
- (276) Richter, W. F.; Nayak, S.; Iwasa, J.; Taatjes, D. J. The Mediator Complex as a Master Regulator of Transcription by RNA Polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2022**, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00498-3>.
- (277) Hwang, S.-Y.; Park, S.; Jo, H.; Seo, S. H.; Jeon, K.-H.; Kim, S.; Jung, A.-R.; Song, C.; Ahn, M.; Kwak, S. Y.; Lee, H.-J.; Uesugi, M.; Na, Y.; Kwon, Y. Interrupting Specific Hydrogen Bonds between ELF3 and MED23 as an Alternative Drug Resistance-Free Strategy for HER2-Overexpressing Cancers. *J. Adv. Res.* **2022**. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.08.003>.
- (278) Boutelle, A. M.; Attardi, L. D. P53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends Cell Biol.* **2021**, *31* (4), 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.12.011>.
- (279) Carr, M. I.; Jones, S. N. Regulation of the Mdm2-P53 Signaling Axis in the DNA Damage Response and Tumorigenesis.

- Transl. Cancer Res.* **2016**, *5* (6), 707–724. <https://doi.org/10.21037/tcr.2016.11.75>.
- (280) Karni-Schmidt, O.; Lokshin, M.; Prives, C. The Roles of MDM2 and MDMX in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2016**, *11* (1), 617–644. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040349>.
- (281) Tisato, V.; Voltan, R.; Gonelli, A.; Secchiero, P.; Zauli, G. MDM2/X Inhibitors under Clinical Evaluation: Perspectives for the Management of Hematological Malignancies and Pediatric Cancer. *J Hematol Oncol* **2017**, *10*, 133. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0500-5>.
- (282) Duffy, M. J.; Synnott, N. C.; O'Grady, S.; Crown, J. Targeting P53 for the Treatment of Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *79*, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.07.005>.
- (283) Dobbstein, M.; Levine, A. J. Mdm2: Open Questions. *Cancer Sci.* **2020**, *111* (7), 2203–2211. <https://doi.org/10.1111/cas.14433>.
- (284) Haronikova, L.; Bonczek, O.; Zatloukalova, P.; Kokas-Zavadil, F.; Kucerikova, M.; Coates, P. J.; Fahraeus, R.; Vojtesek, B. Resistance Mechanisms to Inhibitors of P53-MDM2 Interactions in Cancer Therapy: Can We Overcome Them? *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2021**, *26* (1), 53. <https://doi.org/10.1186/s11658-021-00293-6>.
- (285) Mullard, A. P53 Programmes Plough On. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 497–500. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00130-z>.
- (286) Kussie, P. H.; Gorina, S.; Marechal, V.; Elenbaas, B.; Moreau, J.; Levine, A. J.; Pavletich, N. P. Structure of the MDM2 Onco-protein Bound to the P53 Tumor Suppressor Transactivation Domain. *Science* **1996**, *274* (5289), 948–953. <https://doi.org/10.1126/science.274.5289.948>.
- (287) Liu, Y.; Deisenroth, C.; Zhang, Y. RP-MDM2-P53 Pathway: Linking Ribosomal Biogenesis and Tumor Surveillance. *Trends Cancer* **2016**, *2* (4), 191–204. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.03.002>.
- (288) Russo, A.; Russo, G. Ribosomal Proteins Control or Bypass P53 during Nucleolar Stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (1), 140. <https://doi.org/10.3390/ijms18010140>.
- (289) Oršolić, I.; Bursać, S.; Jurada, D.; Hofman, I. D.; Dembić, Z.; Bartek, J.; Mihalek, I.; Volarevic, S. Cancer-Associated Mutations in the Ribosomal Protein L5 Gene Dysregulate the HDM2/P53-Mediated Ribosome Biogenesis Checkpoint. *Oncogene* **2020**, *39*, 3443–3457. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1231-6>.
- (290) Nomura, K.; Klejnot, M.; Kowalczyk, D.; Hock, A. K.; Sibbet, G. J.; Vousden, K. H.; Huang, D. T. Structural Analysis of MDM2 RING Separates Degradation from Regulation of P53 Transcription Activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24* (7), 578–587. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3414>.
- (291) Magnussen, H. M.; Ahmed, S. F.; Sibbet, G. J.; Hristova, V. A.; Nomura, K.; Hock, A. K.; Archibald, L. J.; Jamieson, A. G.; Fushman, D.; Vousden, K. H.; Weissman, A. M.; Huang, D. T. Structural Basis for DNA Damage-Induced Phosphoregulation of MDM2 RING Domain. *Nat. Commun.* **2020**, *1–15*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15783-y>.
- (292) Lindström, M. S.; Jin, A.; Deisenroth, C.; White Wolf, G.; Zhang, Y. Cancer-Associated Mutations in the MDM2 Zinc Finger Domain Disrupt Ribosomal Protein Interaction and Attenuate MDM2-Induced P53 Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27* (3), 1056–1068. <https://doi.org/10.1128/MCB.01307-06>.
- (293) Zheng, J.; Lang, Y.; Zhang, Q.; Cui, D.; Sun, H.; Jiang, L.; Chen, Z.; Zhang, R.; Gao, Y.; Tian, W.; Wu, W.; Tang, J.; Chen, Z. Structure of Human MDM2 Complexed with RPL11 Reveals the Molecular Basis of P53 Activation. *Genes Dev.* **2015**, *29* (14), 1524–1534. <https://doi.org/10.1101/gad.261792.115>.
- (294) Pelava, A.; Schneider, C.; Watkins, N. J. The Importance of Ribosome Production, and the 5S RNP-MDM2 Pathway, in Health and Disease. *Biochem. Soc. Trans.* **2016**, *44* (4), 1086–1090. <https://doi.org/10.1042/BST20160106>.
- (295) Klein, A. M.; de Queiroz, R. M.; Venkatesh, D.; Prives, C. The Roles and Regulation of MDM2 and MDMX: It Is Not Just about P53. *Genes Dev.* **2021**, *35* (9–10), 575–601. <https://doi.org/10.1101/gad.347872.120>.
- (296) Pettersson, S.; Kelleher, M.; Pion, E.; Wallace, M.; Ball, K. L. Role of Mdm2 Acid Domain Interactions in Recognition and Ubiquitination of the Transcription Factor IRF-2. *Biochem. J.* **2009**, No. 418, 575–585.
- (297) Wienken, M.; Dickmanns, A.; Nemajerova, A.; Kramer, D.; Najafova, Z.; Weiss, M.; Karpiuk, O.; Kassem, M.; Zhang, Y.; Lozano, G.; Johnsen, S. A.; Moll, U. M.; Zhang, X.; Dobbstein, M. MDM2 Associates with Polycomb Repressor Complex 2 and Enhances Stemness-Promoting Chromatin Modifications Independent of P53. *Mol. Cell* **2016**, *61* (1), 68–83. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.008>.
- (298) Cao, Z.; Xue, J.; Cheng, Y.; Wang, J.; Liu, Y.; Li, H.; Jiang, W.; Li, G.; Gui, Y.; Zhang, X. MDM2 Promotes Genome Instability by Ubiquitinating the Transcription Factor HBP1. *Oncogene* **2019**, *38* (24), 4835–4855. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0761-2>.
- (299) Ying, M.; Zhang, L.; Zhou, Q.; Shao, X.; Cao, J.; Zhang, N.; Li, W.; Zhu, H.; Yang, B.; He, Q. The E3 Ubiquitin Protein Ligase MDM2 Dictates All-Trans Retinoic Acid-Induced Osteoblastic Differentiation of Osteosarcoma Cells by Modulating the Degradation of RAR α . *Oncogene* **2016**, *35* (33), 4358–4367. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.503>.
- (300) Liu, T.; Zhang, H.; Xiong, J.; Yi, S.; Gu, L.; Zhou, M. Inhibition of MDM2 Homodimerization by XIAP IRES Stabilizes MDM2, Influencing Cancer Cell Survival. *Mol. Cancer* **2015**, *14* (1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0334-0>.
- (301) Gu, L.; Zhu, N.; Zhang, H.; Durden, D. L.; Feng, Y.; Zhou, M. Regulation of XIAP Translation and Induction by MDM2 Following Irradiation. *Cancer Cell* **2009**, *15* (5), 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.002>.
- (302) Zhou, S.; Gu, L.; He, J.; Zhang, H.; Zhou, M. MDM2 Regulates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stabilization in Hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31* (24), 4928–4937. <https://doi.org/10.1128/MCB.06085-11>.
- (303) Gajjar, M.; Candeias, M. M.; Malbert-Colas, L.; Mazars, A.; Fujita, J.; Olivares-Illana, V.; Fahraeus, R. The P53 MRNA-Mdm2 Interaction Controls Mdm2 Nuclear Trafficking and Is Required for P53 Activation Following DNA Damage. *Cancer Cell* **2012**, *21* (1), 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.11.016>.
- (304) Gu, L.; Zhang, H.; He, J.; Li, J.; Huang, M.; Zhou, M. MDM2 Regulates MYCN mRNA Stabilization and Translation in Human Neuroblastoma Cells. *Oncogene* **2012**, *31* (11), 1342–1353. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.343>.
- (305) Jung, C.-H.; Kim, J.; Park, J. K.; Hwang, S.-G.; Moon, S.-K.; Kim, W.-J.; Um, H.-D. Mdm2 Increases Cellular Invasiveness by Binding to and Stabilizing the Slug MRNA. *Cancer Lett.* **2013**, *335* (2), 270–277. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.035>.

- (306) Uhrík, L.; Wang, L.; Haronikova, L.; Medina-Medina, I.; Reboloso-Gomez, Y.; Chen, S.; Vojtesek, B.; Fahraeus, R.; Herychova, L.; Olivares-Illana, V. Allosteric Changes in HDM2 by the ATM Phosphomimetic S395D Mutation: Implications on HDM2 Function. *Biochem. J.* **2019**, *476* (21), 3401–3411. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190687>.
- (307) Gnanasundram, S. V.; Malbert-Colas, L.; Chen, S.; Fusée, L.; Daskalogianni, C.; Muller, P.; Salomao, N.; Fähræus, R. MDM2's Dual MRNA Binding Domains Co-Ordinate Its Oncogenic and Tumour Suppressor Activities. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48* (12), 6775–6787. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa431>.
- (308) Hernandez-Monge, J.; Martínez-Sánchez, M.; Rousset-Roman, A.; Medina-Medina, I.; Olivares-Illana, V. MDM2 Regulates RB Levels during Genotoxic Stress. *EMBO Rep.* **2021**, *22* (1). <https://doi.org/10.15252/embr.202050615>.
- (309) Gu, L.; Zhang, H.; Liu, T.; Zhou, S.; Du, Y.; Xiong, J.; Yi, S.; Qu, C.-K.; Fu, H.; Zhou, M. Discovery of Dual Inhibitors of MDM2 and XIAP for Cancer Treatment. *Cancer Cell* **2016**, *30* (4), 623–636. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.08.015>.
- (310) Xiong, J.; Li, J.; Yang, Q.; Wang, J.; Su, T.; Zhou, S. Gossypol Has Anti-Cancer Effects by Dual-Targeting MDM2 and VEGF in Human Breast Cancer. *Breast Cancer Res.* **2017**, *19* (1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0818-5>.
- (311) Wang, W.; Qin, J.-J.; Voruganti, S.; Nijampatnam, B.; Velu, S. E.; Ruan, K.-H.; Hu, M.; Zhou, J.; Zhang, R. Discovery and Characterization of Dual Inhibitors of MDM2 and NFAT1 for Pancreatic Cancer Therapy. *Cancer Res.* **2018**, *78* (19), 5656–5667. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3939>.
- (312) Zhao, W.; Yang, J.; Xie, X.; Li, C.; Zhang, W.; Chen, E.; Guo, Y.; Yan, L.; Fang, F.; Yao, H.; Liu, X. A MDM2 Inhibitor MX69 Inhibits Adipocytes Adipogenesis and Differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *625*, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.115>.
- (313) Riscal, R.; Schrepfer, E.; Arena, G.; Cissé, M. Y.; Bellvert, F.; Heuillet, M.; Rambow, F.; Bonneil, E.; Sabourdy, F.; Vincent, C.; Ait-Arsa, I.; Levade, T.; Thibaut, P.; Marine, J.-C.; Portais, J.-C.; Sarry, J.-E.; Le Cam, L.; Linares, L. K. Chromatin-Bound MDM2 Regulates Serine Metabolism and Redox Homeostasis Independently of P53. *Mol. Cell* **2016**, *62* (6), 890–902. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.033>.
- (314) Klusmann, I.; Wohlberedt, K.; Magerhans, A.; Teloni, F.; Korbel, J. O.; Altmeyer, M.; Dobbstein, M. Chromatin Modifiers Mdm2 and RNF2 Prevent RNA:DNA Hybrids That Impair DNA Replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (48). <https://doi.org/10.1073/pnas.1809592115>.
- (315) Cissé, M. Y.; Pyrdziak, S.; Firmin, N.; Gayte, L.; Heuillet, M.; Bellvert, F.; Fuentes, M.; Delpech, H.; Riscal, R.; Arena, G.; Chibon, F.; Le Gellec, S.; Maran-Gonzalez, A.; Chateau, M.-C.; Theillet, C.; Carrere, S.; Portais, J.-C.; Le Cam, L.; Linares, L. K. Targeting MDM2-Dependent Serine Metabolism as a Therapeutic Strategy for Liposarcoma. *Sci. Transl. Med.* **2020**, *12* (547). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay2163>.
- (316) Wohlberedt, K.; Klusmann, I.; Derevyanko, P. K.; Henningsen, K.; Choo, J. A. M. Y.; Manzini, V.; Magerhans, A.; Giansanti, C.; Eischen, C. M.; Jochemsen, A. G.; Dobbstein, M. Mdm4 Supports DNA Replication in a P53-Independent Fashion. *Oncogene* **2020**, *39* (25), 4828–4843. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1325-1>.
- (317) Giansanti, C.; Manzini, V.; Dickmanns, A.; Dickmanns, A.; Palumbieri, M. D.; Sanchi, A.; Kienle, S. M.; Rieth, S.; Scheffner, M.; Lopes, M.; Dobbstein, M. MDM2 Binds and Ubiquitinates PARP1 to Enhance DNA Replication Fork Progression. *Cell Rep.* **2022**, *39* (9), 110879. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110879>.
- (318) Toledo, F.; Wahl, G. M. Regulating the P53 Pathway: In Vitro Hypotheses, in Vivo Veritas. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (12), 909–923. <https://doi.org/10.1038/nrc2012>.
- (319) Vousden, K. H.; Prives, C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of P53. *Cell* **2009**, *137* (3), 413–431. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037>.
- (320) Liu, Y.; Tavana, O.; Gu, W. P53 Modifications: Exquisite Decorations of the Powerful Guardian. *J. Mol. Cell Biol.* **2019**, *11* (7), 564–577. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz060>.
- (321) Hafner, A.; Bulyk, M. L.; Jambhekar, A.; Lahav, G. The Multiple Mechanisms That Regulate P53 Activity and Cell Fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20* (4), 199–210. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>.
- (322) Stewart-Ornstein, J.; Lahav, G. P53 Dynamics in Response to DNA Damage Vary across Cell Lines and Are Shaped by Efficiency of DNA Repair and Activity of the Kinase ATM. *Sci. Signal.* **2017**, *10* (476), eaah6671. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah6671>.
- (323) Chen, J. The Roles of MDM2 and MDMX Phosphorylation in Stress Signaling to P53. *Genes Cancer* **2012**, *3* (3–4), 274–282. <https://doi.org/10.1177/1947601912454733>.
- (324) Chen, J. Intra Molecular Interactions in the Regulation of P53 Pathway. *Transl. Cancer Res.* **2016**, *5* (6), 639–649. <https://doi.org/10.21037/tcr.2016.09.23>.
- (325) Gannon, H. S.; Woda, B. A.; Jones, S. N. ATM Phosphorylation of Mdm2 Ser394 Regulates the Amplitude and Duration of the DNA Damage Response in Mice. *Cancer Cell* **2012**, *21* (5), 668–679. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.011>.
- (326) Carr, M. I.; Roderick, J. E.; Gannon, H. S.; Kelliher, M. A.; Jones, S. N. Mdm2 Phosphorylation Regulates Its Stability and Has Contrasting Effects on Oncogene and Radiation-Induced Tumorigenesis. *Cell Rep.* **2016**, *16* (10), 2618–2629. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.014>.
- (327) Nihira, N. T.; Ogura, K.; Shimizu, K.; North, B. J.; Zhang, J.; Gao, D.; Inuzuka, H.; Wei, W. Acetylation-Dependent Regulation of MDM2 E3 Ligase Activity Dictates Its Oncogenic Function. *Sci. Signal.* **2017**, *10* (466), eaai8026. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aai8026>.
- (328) Chibaya, L.; Karim, B.; Zhang, H.; Jones, S. N. Mdm2 Phosphorylation by Akt Regulates the P53 Response to Oxidative Stress to Promote Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118* (4). <https://doi.org/10.1073/pnas.2003193118>.
- (329) Luo, Y.; Wang, X.; Niu, W.; Zhou, Y.; Li, M.; Ma, J.; Yang, J.; Fan, S.; Zeng, Z.; Xiong, W.; Li, X.; Li, G.; Xiao, J.; Zhou, M. BRD7 Stabilizes P53 via Dephosphorylation of MDM2 to Inhibit Tumor Growth in Breast Cancer Harboring Wild-Type P53. *J. Cancer* **2022**, *13* (5), 1436–1448. <https://doi.org/10.7150/jca.67447>.
- (330) Meek, D. W.; Hupp, T. R. The Regulation of MDM2 by Multisite Phosphorylation—Opportunities for Molecular-Based

- Intervention to Target Tumours? *Semin. Cancer Biol.* **2010**, *20* (1), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.10.005>.
- (331) Cheng, Q.; Cross, B.; Li, B.; Chen, L.; Li, Z.; Chen, J. Regulation of MDM2 E3 Ligase Activity by Phosphorylation after DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, *31* (24), 4951–4963. <https://doi.org/10.1128/MCB.05553-11>.
- (332) Cheng, Q.; Song, T.; Chen, L.; Chen, J. Autoactivation of the MDM2 E3 Ligase by Intramolecular Interaction. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34* (15), 2800–2810. <https://doi.org/10.1128/MCB.00246-14>.
- (333) Sivakolundu, S. G.; Nourse, A.; Moshiah, S.; Bothner, B.; Ashley, C.; Satumba, J.; Lahti, J.; Kriwacki, R. W. Intrinsically Unstructured Domains of Arf and Hdm2 Form Bimolecular Oligomeric Structures in Vitro and in Vivo. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384* (1), 240–254. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.019>.
- (334) Malbert-Colas, L.; Ponnuswamy, A.; Olivares-Illana, V.; Tournillon, A.-S.; Naski, N.; Fåhræus, R. HDMX Folds the Nascent P53 mRNA Following Activation by the ATM Kinase. *Mol. Cell* **2014**, *54* (3), 500–511. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.035>.
- (335) Yu, G. W.; Allen, M. D.; Andreeva, A.; Fersht, A. R.; Bycroft, M. Solution Structure of the C4 Zinc Finger Domain of HDM2. *Protein Sci.* **2006**, *15* (2), 384–389. <https://doi.org/10.1110/ps.051927306>.
- (336) Kostic, M.; Matt, T.; Martinez-Yamout, M. A.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. Solution Structure of the Hdm2 C2H2C4 RING, a Domain Critical for Ubiquitination of P53. *J. Mol. Biol.* **2006**, *363* (2), 433–450. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.08.027>.
- (337) Linke, K.; Mace, P. D.; Smith, C. A.; Vaux, D. L.; Silke, J.; Day, C. L. Structure of the MDM2/MDMX RING Domain Heterodimer Reveals Dimerization Is Required for Their Ubiquitylation in Trans. *Cell Death Differ.* **2008**, *15* (5), 841–848. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402309>.
- (338) González, S. S.; Ad, O.; Shah, B.; Zhang, Z.; Zhang, X.; Chatterjee, A.; Schepartz, A. Genetic Code Expansion in the Engineered Organism Vmax X2: High Yield and Exceptional Fidelity. *ACS Cent. Sci.* **2021**, *8*.
- (339) Magnussen, H. M.; Huang, D. T. Identification of a Catalytic Active but Non-Aggregating MDM2 RING Domain Variant. *J. Mol. Biol.* **2021**, *433* (5), 166807. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.166807>.
- (340) Ferrer, M.; Chernikova, T. N.; Yakimov, M. M.; Golyshin, P. N.; Timmis, K. N. Chaperonins Govern Growth of Escherichia Coli at Low Temperatures. *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21* (11), 1266–1267. <https://doi.org/10.1038/nbt1103-1266>.
- (341) Naudi-Fabra, S.; Tengo, M.; Jensen, M. R.; Blackledge, M.; Milles, S. Quantitative Description of Intrinsically Disordered Proteins Using Single-Molecule FRET, NMR, and SAXS. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143* (48), 20109–20121. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c06264>.
- (342) Momand, J.; Zambetti, P.; Olson, D. C.; George, D.; Levine, J. The Mdm-2 Oncogene Product Forms a Complex with the P53 Protein and Inhibits P53-Mediated Transactivation. *Cell* **1993**, *69* (7), 1237–1245. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90644-r](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90644-r).
- (343) Blattner, C.; Hay, T.; Meek, D. W.; Lane, D. P. Hypophosphorylation of Mdm2 Augments P53 Stability. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22* (17), 6170–6182. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.17.6170-6182.2002>.
- (344) Li, J.; Kurokawa, M. Regulation of MDM2 Stability After DNA Damage. *J. Cell. Physiol.* **2015**, *230* (10), 2318–2327. <https://doi.org/10.1002/jcp.24994>.
- (345) Kulikov, R.; Boehme, K. A.; Blattner, C. Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Phosphorylation of Mdm2 Regulates P53 Abundance. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25* (16), 7170–7180. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.16.7170-7180.2005>.
- (346) Kulikov, R.; Winter, M.; Blattner, C. Binding of P53 to the Central Domain of Mdm2 Is Regulated by Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (39), 28575–28583. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513311200>.
- (347) Zhan, C.; Varney, K.; Yuan, W.; Zhao, L.; Lu, W. Interrogation of MDM2 Phosphorylation in P53 Activation Using Native Chemical Ligation: The Functional Role of Ser17 Phosphorylation in MDM2 Reexamined. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (15), 6855–6864. <https://doi.org/10.1021/ja301255n>.
- (348) Winter, M.; Milne, D.; Dias, S.; Kulikov, R.; Knippschild, U.; Blattner, C.; Meek, D. Protein Kinase CK1δ Phosphorylates Key Sites in the Acidic Domain of Murine Double-Minute Clone 2 Protein (MDM2) That Regulate P53 Turnover †. *Biochemistry* **2004**, *43* (51), 16356–16364. <https://doi.org/10.1021/bi0489255>.
- (349) Allende-Vega, N.; Dias, S.; Milne, D.; Meek, D. Phosphorylation of the Acidic Domain of Mdm2 by Protein Kinase CK2. *Mol. Cell. Biochem.* **2005**, *274* (1–2), 85–90. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-3074-4>.
- (350) Dias, S. S.; Hogan, C.; Ochocka, A.-M.; Meek, D. W. Polo-like Kinase-1 Phosphorylates MDM2 at Ser260 and Stimulates MDM2-Mediated P53 Turnover. *FEBS Lett.* **2009**, *583* (22), 3543–3548. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.057>.
- (351) Cheng, Q.; Chen, L.; Li, Z.; Lane, W. S.; Chen, J. ATM Activates P53 by Regulating MDM2 Oligomerization and E3 Processivity. *EMBO J.* **2009**, *28* (24), 3857–3867. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.294>.
- (352) Lindström, M. S.; Bartek, J.; Maya-Mendoza, A. P53 at the Crossroad of DNA Replication and Ribosome Biogenesis Stress Pathways. *Cell Death Differ.* **2022**, *29* (5), 972–982. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00999-w>.
- (353) Cho, Y.; Gorina, S.; Jeffrey, P. D.; Pavletich, N. P. Crystal Structure of a P53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations. *Nature* **1994**, *265* (5170), 346–355. <https://doi.org/10.1126/science.8023157>.
- (354) Malecka, K. A.; Ho, W. C.; Marmorstein, R. Crystal Structure of a P53 Core Tetramer Bound to DNA. *Oncogene* **2009**, *28* (3), 325–333. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.400>.
- (355) Kitayner, M.; Rozenberg, H.; Rohs, R.; Suad, O.; Rabinovich, D.; Honig, B.; Shakked, Z. Diversity in DNA Recognition by P53 Revealed by Crystal Structures with Hoogsteen Base Pairs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17* (4), 423–429. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1800>.
- (356) Chen, Y.; Dey, R.; Chen, L. Crystal Structure of the P53 Core Domain Bound to a Full Consensus Site as a Self-Assembled Tetramer. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **2010**, *18* (2), 246–256. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.11.011>.
- (357) Emamzadah, S.; Tropia, L.; Vincenti, I.; Falquet, B.; Halazonetis, T. D. Reversal of the DNA-Binding-Induced Loop L1 Conformational Switch in an Engineered Human P53 Protein. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426* (4), 936–944. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.020>.
- (358) Chen, Y.; Zhang, X.; Dantas Machado, A. C.; Ding, Y.; Chen, Z.; Qin, P. Z.; Rohs, R.; Chen, L. Structure of P53 Binding to the BAX Response Element Reveals DNA Unwinding and Compression to Accommodate Base-Pair Insertion. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (17), 8368–8376. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt584>.

- (359) Krois, A. S.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. Long-Range Regulation of P53 DNA Binding by Its Intrinsically Disordered N-Terminal Transactivation Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (48), E11302–E11310. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814051115>.
- (360) Sun, X.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. A Phosphorylation-Dependent Switch in the Disordered P53 Transactivation Domain Regulates DNA Binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *118* (1), e2021456118-10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021456118>.
- (361) He, F.; Borchers, W.; Song, T.; Wei, X.; Das, M.; Chen, L.; Daughdrill, G. W.; Chen, J. Interaction between P53 N Terminus and Core Domain Regulates Specific and Nonspecific DNA Binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (18), 8859–8868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903077116>.
- (362) Bullock, A. N.; Henckel, J.; DeDecker, B. S.; Johnson, C. M.; Nikolova, P. V.; Proctor, M. R.; Lane, D. P.; Fersht, A. R. Thermodynamic Stability of Wild-Type and Mutant P53 Core Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94* (26), 14338–14342. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14338>.
- (363) Nikolova, P. V.; Henckel, J.; Lane, D. P.; Fersht, A. R. Semirational Design of Active Tumor Suppressor P53 DNA Binding Domain with Enhanced Stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95* (25), 14675–14680. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14675>.
- (364) Joerger, A. C.; Allen, M. D.; Fersht, A. R. Crystal Structure of a Superstable Mutant of Human P53 Core Domain. Insights into the Mechanism of Rescuing Oncogenic Mutations. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (2), 1291–1296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309732200>.
- (365) Natan, E.; Baloglu, C.; Pagel, K.; Freund, S. M. V.; Morgner, N.; Robinson, C. V.; Fersht, A. R.; Joerger, A. C. Interaction of the P53 DNA-Binding Domain with Its N-Terminal Extension Modulates the Stability of the P53 Tetramer. *J. Mol. Biol.* **2011**, *409* (3), 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.03.047>.
- (366) Petty, T. J.; Emamzadah, S.; Costantino, L.; Petkova, I.; Stavridi, E. S.; Saven, J. G.; Vauthey, E.; Halazonetis, T. D. An Induced Fit Mechanism Regulates P53 DNA Binding Kinetics to Confer Sequence Specificity. *EMBO J.* **2011**, *30* (11), 2167–2176. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.127>.
- (367) Kamada, R.; Nomura, T.; Anderson, C. W.; Sakaguchi, K. Cancer-Associated P53 Tetramerization Domain Mutants: Quantitative Analysis Reveals a Low Threshold for Tumor Suppressor Inactivation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (1), 252–258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.174698>.
- (368) Purvis, J. E.; Karhohs, K. W.; Mock, C.; Batchelor, E.; Loewer, A.; Lahav, G. P53 Dynamics Control Cell Fate. *Science* **2012**, *336* (6087), 1440–1444. <https://doi.org/10.1126/science.1218351>.
- (369) Hafner, A.; Stewart-Ornstein, J.; Purvis, J. E.; Forrester, W. C.; Bulyk, M. L.; Lahav, G. P53 Pulses Lead to Distinct Patterns of Gene Expression Albeit Similar DNA-Binding Dynamics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24* (10), 840–847. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3452>.
- (370) Friedrich, D.; Friedel, L.; Finzel, A.; Herrmann, A.; Preibisch, S.; Loewer, A. Stochastic Transcription in the P53-mediated Response to DNA Damage Is Modulated by Burst Frequency. *Mol. Syst. Biol.* **2019**, *15* (12), e9068. <https://doi.org/10.15252/msb.20199068>.
- (371) García-Santisteban, I.; Llopis, A.; Krenning, L.; Vallejo-Rodríguez, J.; van den Broek, B.; Zubiaga, A. M.; Medema, R. H. Sustained CHK2 Activity, but Not ATM Activity, Is Critical to Maintain a G1 Arrest after DNA Damage in Untransformed Cells. *BMC Biol.* **2021**, *19* (1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-00965-x>.
- (372) Tsabar, M.; Mock, C. S.; Venkatachalam, V.; Reyes, J.; Karhohs, K. W.; Oliver, T. G.; Regev, A.; Jambhekar, A.; Lahav, G. A Switch in P53 Dynamics Marks Cells That Escape from DSB-Induced Cell Cycle Arrest. *Cell Rep.* **2020**, *32* (5), 107995. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107995>.
- (373) Hanson, R. L.; Batchelor, E. Rucaparib Treatment Alters P53 Oscillations in Single Cells to Enhance DNA-Double-Strand-Break-Induced Cell Cycle Arrest. *Cell Rep.* **2020**, *33* (2), 108240. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108240>.
- (374) Almawi, A. W.; Matthews, L. A.; Guarné, A. FHA Domains: Phosphopeptide Binding and Beyond. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2017**, *127*, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2016.12.003>.
- (375) Beenstock, J.; Mooshayef, N.; Engelberg, D. How Do Protein Kinases Take a Selfie (Autophosphorylate)? *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41* (11), 938–953. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.08.006>.
- (376) Zannini, L.; Delia, D.; Buscemi, G. CHK2 Kinase in the DNA Damage Response and Beyond. *J. Mol. Cell Biol.* **2015**, *6* (6), 442–457. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju045>.
- (377) Li, J.; Williams, B. L.; Haire, L. F.; Goldberg, M.; Wilker, E.; Durocher, D.; Yaffe, M. B.; Jackson, S. P.; Smerdon, S. J. Structural and Functional Versatility of the FHA Domain in DNA-Damage Signaling by the Tumor Suppressor Kinase Chk2. *Mol. Cell* **2002**, *9* (5), 1045–1054. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00527-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00527-0).
- (378) Cai, Z.; Chehab, N. H.; Pavletich, N. P. Structure and Activation Mechanism of the CHK2 DNA Damage Checkpoint Kinase. *Mol. Cell* **2009**, *35* (6), 818–829. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.007>.
- (379) Chen, E. S.-W.; Weng, J.-H.; Chen, Y.-H.; Wang, S.-C.; Liu, X.-X.; Huang, W.-C.; Matsui, T.; Kawano, Y.; Liao, J.-H.; Lim, L.-H.; Bessho, Y.; Huang, K.-F.; Wu, W.-J.; Tsai, M.-D. Phospho-Priming Confers Functionally Relevant Specificities for Rad53 Kinase Autophosphorylation. *Biochemistry* **2017**, *56* (38), 5112–5124. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00689>.
- (380) Guo, X.; Ward, M. D.; Tiedebohl, J. B.; Oden, Y. M.; Nyalwidhe, J. O.; Semmes, O. J. Interdependent Phosphorylation within the Kinase Domain T-Loop Regulates CHK2 Activity. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (43), 33348–33357. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.149609>.
- (381) Ouchi, M.; Ouchi, T. Distinct DNA Damage Determines Differential Phosphorylation of Chk2. *Cancer Biol. Ther.* **2014**, *15* (12), 1700–1704. <https://doi.org/10.4161/15384047.2014.972823>.
- (382) Higashiguchi, M.; Nagatomo, I.; Kijima, T.; Morimura, O.; Miyake, K.; Minami, T.; Koyama, S.; Hirata, H.; Iwahori, K.; Takimoto, T.; Takeda, Y.; Kida, H.; Kumanogoh, A. Clarifying the Biological Significance of the CHK2 K373E Somatic Mutation Discovered in The Cancer Genome Atlas Database. *FEBS Lett.* **2016**, *590* (23), 4275–4286. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12449>.
- (383) Kleiblova, P.; Stolarova, L.; Krizova, K.; Lhota, F.; Hojny, J.; Zemankova, P.; Havranek, O.; Vocka, M.; Cerna, M.; Lhotova, K.; Borecka, M.; Janatova, M.; Soukupova, J.; Sevcik, J.; Zimovjanova, M.; Kotlas, J.; Panczak, A.; Vesela, K.; Cervenkova, J.; Schneiderova, M.; Burocziava, M.; Burdova, K.; Stranecky, V.; Foretova, L.; Machackova, E.; Tavandzis, S.; Kmoch, S.; Macurek, L.; Kleibl, Z.

- Identification of Deleterious Germline *CHEK2* Mutations and Their Association with Breast and Ovarian Cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, ijc.32385. <https://doi.org/10.1002/ijc.32385>.
- (384) Celli, F.; Pétalot, A.; Samson, C.; Theillet, F.-X.; Zinn-Justin, S. 1H, 13C and 15N Backbone Resonance Assignment of the Lamin C-Terminal Region Specific to Prelamin A. *Biomol. NMR Assign.* **2018**, *12* (2), 225–229. <https://doi.org/10.1007/s12104-018-9813-8>.
- (385) Samson, C.; Herrada, I.; Celli, F.; Theillet, F.-X.; Zinn-Justin, S. 1H, 13C and 15N Backbone Resonance Assignment of the Intrinsically Disordered Region of the Nuclear Envelope Protein Emerin. *Biomol. NMR Assign.* **2016**, *10* (1), 179–182. <https://doi.org/10.1007/s12104-015-9662-7>.
- (386) Samson, C.; Celli, F.; Hendriks, K.; Zinke, M.; Essawy, N.; Herrada, I.; Arteni, A.; Theillet, F.; Alpha-Bazin, B.; Armengaud, J.; Coirault, C.; Lange, A.; Zinn-Justin, S. Emerin Self-assembly Mechanism: Role of the LEM Domain. *FEBS J.* **2017**, *284* (2), 338–352. <https://doi.org/10.1111/febs.13983>.
- (387) Julien, M.; Miron, S.; Carreira, A.; Theillet, F.-X.; Zinn-Justin, S. 1H, 13C and 15N Backbone Resonance Assignment of the Human BRCA2 N-Terminal Region. *Biomol. NMR Assign.* **2020**, *14* (1), 79–85. <https://doi.org/10.1007/s12104-019-09924-8>.
- (388) Ehlén, Å.; Martin, C.; Miron, S.; Julien, M.; Theillet, F.-X.; Ropars, V.; Sessa, G.; Beaufere, R.; Boucherit, V.; Duchambon, P.; El Marjou, A.; Zinn-Justin, S.; Carreira, A. Proper Chromosome Alignment Depends on BRCA2 Phosphorylation by PLK1. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1819. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15689-9>.
- (389) Marcelot, A.; Pétalot, A.; Ropars, V.; Le Du, M.-H.; Samson, C.; Dubois, S.; Hoffmann, G.; Miron, S.; Cuniassé, P.; Marquez, J. A.; Thai, R.; Theillet, F.-X.; Zinn-Justin, S. Di-Phosphorylated BAF Shows Altered Structural Dynamics and Binding to DNA, but Interacts with Its Nuclear Envelope Partners. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (7), 3841–3855. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab184>.
- (390) Shenoy, J.; El Mammeri, N.; Dutour, A.; Berbon, M.; Saad, A.; Lends, A.; Morvan, E.; Grélard, A.; Lecomte, S.; Kauffmann, B.; Theillet, F.-X.; Habenstein, B.; Loquet, A. Structural Dissection of Amyloid Aggregates of TDP-43 and Its C-Terminal Fragments TDP-35 and TDP-16. *FEBS J.* **2019**. <https://doi.org/10.1111/febs.15159>.
- (391) Martinat, C.; Cormier, A.; Tobaly-Tapiero, J.; Palmic, N.; Casartelli, N.; Mahboubi, B.; Coggins, S. A.; Buchrieser, J.; Persaud, M.; Diaz-Griffero, F.; Espert, L.; Bossis, G.; Lesage, P.; Schwartz, O.; Kim, B.; Margottin-Goguet, F.; Saïb, A.; Zamborlini, A. SUMOylation of SAMHD1 at Lysine 595 Is Required for HIV-1 Restriction in Non-Cycling Cells. *Nat. Commun.* **2021**, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24802-5>.
- (392) Mühlenbeck, H.; Bender, K. W.; Zipfel, C. Importance of Tyrosine Phosphorylation for Transmembrane Signaling in Plants. *Biochem. J.* **2021**, *478* (14), 2759–2774. <https://doi.org/10.1042/BCJ20210202>.
- (393) Bender, K. W.; Couto, D.; Kadota, Y.; Macho, A. P.; Sklenar, J.; Derbyshire, P.; Bjornson, M.; DeFalco, T. A.; Petriello, A.; Font Farre, M.; Schwessinger, B.; Ntoukakis, V.; Stransfeld, L.; Jones, A. M. E.; Menke, F. L. H.; Zipfel, C. Activation Loop Phosphorylation of a Non-RD Receptor Kinase Initiates Plant Innate Immune Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2021**, *118* (38), e2108242118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2108242118>.
- (394) Terrier, V. P.; Adihou, H.; Arnould, M.; Delmas, A. F.; Aucagne, V. A Straightforward Method for Automated Fmoc-Based Synthesis of Bio-Inspired Peptide Crypto-Thioesters. *Chem Sci* **2016**, *7* (1), 339–345. <https://doi.org/10.1039/C5SC02630J>.
- (395) Canagarajah, B. J.; Khokhlatchev, A.; Cobb, M. H.; Goldsmith, E. J. Activation Mechanism of the MAP Kinase ERK2 by Dual Phosphorylation. *Cell* **1997**, *90* (5), 859–869.
- (396) Zhang, Y.-Y.; Wu, J.-W.; Wang, Z.-X. Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Phosphatase 3-Mediated Cross-Talk between MAPKs ERK2 and P38 α . *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (18), 16150–16162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.203786>.
- (397) Akella, R.; Min, X.; Wu, Q.; Gardner, K. H.; Goldsmith, E. J. The Third Conformation of P38 α MAP Kinase Observed in Phosphorylated P38 α and in Solution. *Structure* **2010**, *18* (12), 1571–1578. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.09.015>.
- (398) Kinoshita, E.; Kinoshita-Kikuta, E.; Koike, T. Separation and Detection of Large Phosphoproteins Using Phos-Tag SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **2009**, *4* (10), 1513–1521. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.154>.
- (399) Kinoshita, E.; Kinoshita-Kikuta, E.; Koike, T. Phos-Tag SDS-PAGE Systems for Phosphorylation Profiling of Proteins with a Wide Range of Molecular Masses under Neutral PH Conditions. *PROTEOMICS* **2012**, *12* (2), 192–202. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100524>.
- (400) Aoki, K.; Takahashi, K.; Kaizu, K.; Matsuda, M. A Quantitative Model of ERK MAP Kinase Phosphorylation in Crowded Media. *Sci. Rep.* **2013**, *3* (1), 1541. <https://doi.org/10.1038/srep01541>.
- (401) Tokunaga, Y.; Takeuchi, K.; Takahashi, H.; Shimada, I. Allosteric Enhancement of MAP Kinase P38 α 's Activity and Substrate Selectivity by Docking Interactions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2014**, *21* (8), 704–711. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2861>.
- (402) Chooi, K. P.; Galan, S. R. G.; Raj, R.; McCullagh, J.; Mohammed, S.; Jones, L. H.; Davis, B. G. Synthetic Phosphorylation of P38 α Recapitulates Protein Kinase Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (5), 1698–1701. <https://doi.org/10.1021/ja4095318>.
- (403) Halekotte, J.; Witt, L.; Ianes, C.; Krüger, M.; Bührmann, M.; Rauh, D.; Pichlo, C.; Brunstein, E.; Luxemburger, A.; Baumann, U.; Knippschild, U.; Bischof, J.; Peifer, C. Optimized 4,5-Diarylimidazoles as Potent/Selective Inhibitors of Protein Kinase CK1 δ and Their Structural Relation to P38 α MAPK. *Molecules* **2017**, *22* (4), 522–537. <https://doi.org/10.3390/molecules22040522>.
- (404) Zeringo, N. A.; Murphy, L.; McCloskey, E. A.; Rohal, L.; Bellizzi, J. J. A Monoclinic Crystal Form of Casein Kinase 1 δ . *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2013**, *69* (10), 1077–1083. <https://doi.org/10.1107/S1744309113023403>.
- (405) Akizuki, K.; Toyama, T.; Yamashita, M.; Sugiyama, Y.; Ishida, A.; Kameshita, I.; Sueyoshi, N. Facile Preparation of Highly Active Casein Kinase 1 Using Escherichia Coli Constitutively Expressing Lambda Phosphatase. *Anal. Biochem.* **2018**, *549*, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.03.015>.
- (406) Cullati, S. N.; Chaikuad, A.; Chen, J.-S.; Gebel, J.; Tesmer, L.; Zhubi, R.; Navarrete-Perea, J.; Guillen, R. X.; Gygi, S. P.; Hummer, G.; Dötsch, V.; Knapp, S.; Gould, K. L. Kinase Domain Autophosphorylation Rewires the Activity and Substrate Specificity of CK1 Enzymes. *Mol. Cell* **2022**, *82* (11), 2006–2020.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.03.005>.
- (407) Haacke, A.; Fendrich, G.; Ramage, P.; Geiser, M. Chaperone Over-Expression in Escherichia Coli: Apparent Increased Yields of Soluble Recombinant Protein Kinases Are Due Mainly to Soluble Aggregates. *Protein Expr. Purif.* **2009**, *64* (2), 185–193.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.10.022>.

- (408) Sunderhaus, A.; Imran, R.; Enoch, E.; Adedeji, A.; Obafemi, T.; Abdel Aziz, M. H. Comparative Expression of Soluble, Active Human Kinases in Specialized Bacterial Strains. *PLOS ONE* **2022**, *17* (4), e0267226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267226>.
- (409) Cegielska, A.; Gietzen, K. F.; Rivers, A.; Virshup, D. M. Autoinhibition of Casein Kinase I ϵ (CKI ϵ) Is Relieved by Protein Phosphatases and Limited Proteolysis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (3), 1357–1364. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.3.1357>.
- (410) Budini, M.; Jacob, G.; Jedlicki, A.; Pérez, C.; Allende, C. C.; Allende, J. E. Autophosphorylation of Carboxy-Terminal Residues Inhibits the Activity of Protein Kinase CK1 α . *J. Cell. Biochem.* **2009**, *106* (3), 399–408. <https://doi.org/10.1002/jcb.22019>.
- (411) Narasimamurthy, R.; Virshup, D. M. The Phosphorylation Switch That Regulates Ticking of the Circadian Clock. *Mol. Cell* **2021**, *81* (6), 1133–1146. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.006>.
- (412) Zorba, A.; Nguyen, V.; Koide, A.; Hoemberger, M.; Zheng, Y.; Kutter, S.; Kim, C.; Koide, S.; Kern, D. Allosteric Modulation of a Human Protein Kinase with Monobodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2019**, *116* (28), 13937–13942. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906024116>.
- (413) Albanese, S. K.; Parton, D. L.; Işık, M.; Rodríguez-Laureano, L.; Hanson, S. M.; Behr, J. M.; Gradia, S.; Jeans, C.; Levinson, N. M.; Seeliger, M. A.; Chodera, J. D. An Open Library of Human Kinase Domain Constructs for Automated Bacterial Expression. *Biochemistry* **2018**, *57* (31), 4675–4689. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01081>.
- (414) Díaz Galicia, M. E.; Aldehaiman, A.; Hong, S.; Arold, S. T.; Grünberg, R. Methods for the Recombinant Expression of Active Tyrosine Kinase Domains: Guidelines and Pitfalls. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2019; Vol. 621, pp 131–152. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.02.027>.
- (415) Bhakuni, R.; Shaik, A.; Kirubakaran, S. Evaluation of Maltose Binding Protein-Tagged HATR Kinase Domain Catalytic Activity with P53 Ser-15 Phosphorylation. *Biochemistry* **2018**, *57* (47), 6592–6603. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00845>.
- (416) Johnson, T. M.; Antrobus, R.; Johnson, L. N. Plk1 Activation by Ste20-like Kinase (Slk) Phosphorylation and Polo-Box Phosphopeptide Binding Assayed with the Substrate Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP). *Biochemistry* **2008**, *47* (12), 3688–3696. <https://doi.org/10.1021/bi702134c>.
- (417) Xu, J.; Shen, C.; Wang, T.; Quan, J. Structural Basis for the Inhibition of Polo-like Kinase 1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20* (9), 1047–1053. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2623>.
- (418) Raab, M.; Sanhaji, M.; Pietsch, L.; Béquignon, I.; Herbrand, A. K.; Süß, E.; Gande, S. L.; Caspar, B.; Kudlinzki, D.; Saxena, K.; Sreeramulu, S.; Schwalbe, H.; Strebhardt, K.; Biondi, R. M. Modulation of the Allosteric Communication between the Polo-Box Domain and the Catalytic Domain in Plk1 by Small Compounds. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (8), 1921–1931. <https://doi.org/10.1021/acschembio.7b01078>.
- (419) Kanev, G. K.; de Graaf, C.; Westerman, B. A.; de Esch, I. J. P.; Kooistra, A. J. KLIFS: An Overhaul after the First 5 Years of Supporting Kinase Research. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (D1), D562–D569. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa895>.
- (420) Errey, J. C.; Fiez-Vandal, C. Production of Membrane Proteins in Industry: The Example of GPCRs. *Protein Expr. Purif.* **2020**, *169*, 105569. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105569>.
- (421) Berger, I.; Tölzer, C.; Gupta, K. The MultiBac System: A Perspective. *Emerg. Top. Life Sci.* **2019**, *3* (5), 477–482. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190084>.
- (422) Fitzgerald, D. J.; Berger, P.; Schaffitzel, C.; Yamada, K.; Richmond, T. J.; Berger, I. Protein Complex Expression by Using Multigene Baculoviral Vectors. *Nat. Methods* **2006**, *3* (12), 1021–1032. <https://doi.org/10.1038/nmeth983>.
- (423) Trowitzsch, S.; Bieniossek, C.; Nie, Y.; Garzoni, F.; Berger, I. New Baculovirus Expression Tools for Recombinant Protein Complex Production. *J. Struct. Biol.* **2010**, *172* (1), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.02.010>.
- (424) Stolt-Bergner, P.; Benda, C.; Bergbrede, T.; Besir, H.; Celie, P. H. N.; Chang, C.; Drechsel, D.; Fischer, A.; Geerlof, A.; Giabai, B.; van den Heuvel, J.; Huber, G.; Knecht, W.; Lehner, A.; Lemaitre, R.; Nordén, K.; Pardee, G.; Racke, I.; Remans, K.; Sander, A.; Scholz, J.; Stadnik, M.; Storici, P.; Weinbruch, D.; Zaror, I.; Lua, L. H. L.; Suppmann, S. Baculovirus-Driven Protein Expression in Insect Cells: A Benchmarking Study. *J. Struct. Biol.* **2018**, *203* (2), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.03.004>.
- (425) Yee, C. M.; Zak, A. J.; Hill, B. D.; Wen, F. The Coming Age of Insect Cells for Manufacturing and Development of Protein Therapeutics. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2018**, *57* (31), 10061–10070. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b00985>.
- (426) Pfeiffer, B. D.; Truman, J. W.; Rubin, G. M. Using Translational Enhancers to Increase Transgene Expression in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109* (17), 6626–6631. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204520109>.
- (427) Liu, Y.; Zhang, Y.; Yao, L.; Hao, H.; Fu, X.; Yang, Z.; Du, E. Enhanced Production of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Virus-like Particles in Sf9 Cells by Translational Enhancers. *Biotechnol. Lett.* **2015**, *37* (9), 1765–1771. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1856-7>.
- (428) Martínez-Solís, M.; Herrero, S.; Targovnik, A. M. Engineering of the Baculovirus Expression System for Optimized Protein Production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103* (1), 113–123. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9474-7>.
- (429) Isogai, S.; Deupi, X.; Opitz, C.; Heydenreich, F. M.; Tsai, C.-J.; Brueckner, F.; Schertler, G. F. X.; Vepintsev, D. B.; Grzesiek, S. Backbone NMR Reveals Allosteric Signal Transduction Networks in the B1-Adrenergic Receptor. *Nature* **2016**, *530* (7589), 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature16577>.
- (430) Kofuku, Y. Deuteration and Selective Labeling of Alanine Methyl Groups of B2-Adrenergic Receptor Expressed in a Baculovirus-Insect Cell Expression System. *J. Biomol. NMR* **2018**, *0* (0), 0–0. <https://doi.org/10.1007/s10858-018-0174-5>.
- (431) Imai, S.; Yokomizo, T.; Kofuku, Y.; Shiraiishi, Y.; Ueda, T.; Shimada, I. Structural Equilibrium Underlying Ligand-Dependent Activation of B2-Adrenoreceptor. *Nat. Chem. Biol.* **2020**, *16* (4), 430–439. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0457-5>.
- (432) Kleist, A. B.; Peterson, F.; Tyler, R. C.; Gustavsson, M.; Handel, T. M.; Volkman, B. F. Solution NMR Spectroscopy of GPCRs: Residue-Specific Labeling Strategies with a Focus on ¹³C-Methyl Methionine Labeling of the Atypical Chemokine Receptor ACKR3. *Methods Cell Biol.* **2019**, *149*, 259–288. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.09.004>.
- (433) Brown, N. R.; Korolchuk, S.; Martin, M. P.; Stanley, W. A.; Moukhametzianov, R.; Noble, M. E. M.; Endicott, J. A. CDK1 Structures Reveal Conserved and Unique Features of the Essential Cell Cycle CDK. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (1), 6769. <https://doi.org/10.1038/ncomms7769>.

- (434) Greber, B. J.; Perez-Bertoldi, J. M.; Lim, K.; Iavarone, A. T.; Toso, D. B.; Nogales, E. The Cryoelectron Microscopy Structure of the Human CDK-Activating Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117* (37), 22849–22857. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009627117>.
- (435) Greber, B. J.; Remis, J.; Ali, S.; Nogales, E. 2.5 Å-Resolution Structure of Human CDK-Activating Kinase Bound to the Clinical Inhibitor ICEC0942. *Biophys. J.* **2021**, *120* (4), 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.12.030>.
- (436) Huis in 't Veld, P. J.; Wohlgemuth, S.; Koerner, C.; Müller, F.; Janning, P.; Musacchio, A. Reconstitution and Use of Highly Active Human CDK1 : Cyclin-B : CKS1 Complexes. *Protein Sci.* **2022**, *31* (2), 528–537. <https://doi.org/10.1002/pro.4233>.
- (437) Hsieh, C.-L.; Goldsmith, J. A.; Schaub, J. M.; DiVenere, A. M.; Kuo, H.-C.; Javanmardi, K.; Le, K. C.; Wrapp, D.; Lee, A. G.; Liu, Y.; Chou, C.-W.; Byrne, P. O.; Hjorth, C. K.; Johnson, N. V.; Ludes-Meyers, J.; Nguyen, A. W.; Park, J.; Wang, N.; Amengor, D.; Lavinder, J. J.; Ippolito, G. C.; Maynard, J. A.; Finkelstein, I. J.; McLellan, J. S. Structure-Based Design of Prefusion-Stabilized SARS-CoV-2 Spikes. *Science* **2020**, *369* (6510), 1501–1505. <https://doi.org/10.1126/science.abd0826>.
- (438) Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C.-L.; Abiona, O.; Graham, B. S.; McLellan, J. S. Cryo-EM Structure of the 2019-NCov Spike in the Prefusion Conformation. *Science* **2020**, *367* (6483), 1260–1263. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>.
- (439) Zhou, D.; Duyvesteyn, H. M. E.; Chen, C.-P.; Huang, C.-G.; Chen, T.-H.; Shih, S.-R.; Lin, Y.-C.; Cheng, C.-Y.; Cheng, S.-H.; Huang, Y.-C.; Lin, T.-Y.; Ma, C.; Huo, J.; Carrique, L.; Malinauskas, T.; Ruza, R. R.; Shah, P. N. M.; Tan, T. K.; Rijal, P.; Donat, R. F.; Godwin, K.; Buttigieg, K. R.; Tree, J. A.; Radecke, J.; Paterson, N. G.; Supasa, P.; Mongkolsapaya, J.; Screaton, G. R.; Carroll, M. W.; Gilbert-Jaramillo, J.; Knight, M. L.; James, W.; Owens, R. J.; Naismith, J. H.; Townsend, A. R.; Fry, E. E.; Zhao, Y.; Ren, J.; Stuart, D. I.; Huang, K.-Y. A. Structural Basis for the Neutralization of SARS-CoV-2 by an Antibody from a Convalescent Patient. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2020**, *27* (10), 950–958. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0480-y>.
- (440) Watanabe, Y.; Allen, J. D.; Wrapp, D.; McLellan, J. S.; Crispin, M. Site-Specific Glycan Analysis of the SARS-CoV-2 Spike. *Science* **2020**, *91* (6501), eabb9983-333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>.
- (441) Aricescu, A. R.; Owens, R. J. Expression of Recombinant Glycoproteins in Mammalian Cells: Towards an Integrative Approach to Structural Biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23* (3), 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.04.003>.
- (442) Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. HEK293 in Cell Biology and Cancer Research: Phenotype, Karyotype, Tumorigenicity, and Stress-Induced Genome-Phenotype Evolution. *Gene* **2015**, *569* (2), 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.05.065>.
- (443) Pulix, M.; Lukashchuk, V.; Smith, D. C.; Dickson, A. J. Molecular Characterization of HEK293 Cells as Emerging Versatile Cell Factories. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2021**, *71*, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.05.001>.
- (444) Aricescu, A. R.; Assenberg, R.; Bill, R. M.; Busso, D.; Chang, V. T.; Davis, S. J.; Dubrovsky, A.; Gustafsson, L.; Hedfalk, K.; Heinemann, U.; Jones, I. M.; Ksiazek, D.; Lang, C.; Maskos, K.; Messerschmidt, A.; Macieira, S.; Peleg, Y.; Perrakis, A.; Poterszman, A.; Schneider, G.; Sixma, T. K.; Sussman, J. L.; Sutton, G.; Tarboureich, N.; Zeev-Ben-Mordehai, T.; Jones, E. Y. Eukaryotic Expression: Developments for Structural Proteomics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62* (10), 1114–1124. <https://doi.org/10.1107/S0907444906029805>.
- (445) NettleSHIP, J. E.; Watson, P. J.; Rahman-Huq, N.; Fairall, L.; Posner, M. G.; Upadhyay, A.; Reddivari, Y.; Chamberlain, J. M. G.; Kolstoe, S. E.; Bagby, S.; Schwabe, J. W. R.; Owens, R. J. Transient Expression in HEK 293 Cells: An Alternative to E. Coli for the Production of Secreted and Intracellular Mammalian Proteins. In *Insoluble Proteins*; García-Fruitós, E., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2015; Vol. 1258, pp 209–222. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_11.
- (446) Nigi, I.; Fairall, L.; Schwabe, J. W. R. Expression and Purification of Protein Complexes Suitable for Structural Studies Using Mammalian HEK 293F Cells. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2017**, *90* (1). <https://doi.org/10.1002/cpps.44>.
- (447) Elegheert, J.; Behiels, E.; Bishop, B.; Scott, S.; Woolley, R. E.; Griffiths, S. C.; Byrne, E. F. X.; Chang, V. T.; Stuart, D. I.; Jones, E. Y.; Siebold, C.; Aricescu, A. R. Lentiviral Transduction of Mammalian Cells for Fast, Scalable and High-Level Production of Soluble and Membrane Proteins. *Nat. Protoc.* **2018**, *13* (12), 2991–3017. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0075-9>.
- (448) Abaandou, L.; Quan, D.; Shiloach, J. Affecting HEK293 Cell Growth and Production Performance by Modifying the Expression of Specific Genes. *Cells* **2021**, *10* (7), 1667. <https://doi.org/10.3390/cells10071667>.
- (449) Fischer, S.; Handrick, R.; Otte, K. The Art of CHO Cell Engineering: A Comprehensive Retrospect and Future Perspectives. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33* (8), 1878–1896. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.015>.
- (450) Hong, J. K.; Lakshmanan, M.; Goudar, C.; Lee, D.-Y. Towards next Generation CHO Cell Line Development and Engineering by Systems Approaches. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2018**, *22*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.08.002>.
- (451) Walsh, G. Biopharmaceutical Benchmarks 2018. *Nat. Biotechnol.* **2018**, *36* (12), 1136–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>.
- (452) Tihanyi, B.; Nyitray, L. Recent Advances in CHO Cell Line Development for Recombinant Protein Production. *Drug Discov. Today Technol.* **2021**, *S1740674921000068*. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>.
- (453) Rana, M. S.; Wang, X.; Banerjee, A. An Improved Strategy for Fluorescent Tagging of Membrane Proteins for Overexpression and Purification in Mammalian Cells. *Biochemistry* **2018**, *57* (49), 6741–6751. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01070>.
- (454) Sanchez-Vega, F.; Mina, M.; Armenia, J.; Chatila, W. K.; Luna, A.; La, K. C.; Dimitriadou, S.; Liu, D. L.; Kantheti, H. S.; Saghafinia, S.; Chakravarty, D.; Daian, F.; Gao, Q.; Bailey, M. H.; Liang, W.-W.; Foltz, S. M.; Shmulevich, I.; Ding, L.; Heins, Z.; Ochoa, A.; Gross, B.; Gao, J.; Zhang, H.; Kundra, R.; Kandoth, C.; Bahceci, I.; Dervishi, L.; Dogrusoz, U.; Zhou, W.; Shen, H.; Laird, P. W.; Way, G. P.; Greene, C. S.; Liang, H.; Xiao, Y.; Wang, C.; Iavarone, A.; Berger, A. H.; Bivona, T. G.; Lazar, A. J.; Hammer, G. D.; Giordano, T.; Kwong, L. N.; McArthur, G.; Huang, C.; Tward, A. D.; Frederick, M. J.; McCormick, F.; Meyerson, M.; Van Allen, E. M.; Cherniack, A. D.; Ciriello, G.; Sander, C.; Schultz, N.; Caesar-Johnson, S. J.; Demchok, J. A.; Felau, I.; Kasapi, M.; Ferguson, M. L.; Hutter, C. M.; Sofia, H. J.; Tarnuzzer, R.; Wang, Z.; Yang, L.; Zenklusen, J. C.; Zhang, J. (Julia); Chudamani, S.; Liu, J.; Lolla, L.; Naresh, R.; Pihl, T.; Sun, Q.; Wan, Y.; Wu, Y.; Cho, J.; DeFreitas, T.; Frazer, S.; Gehlenborg, N.; Getz, G.; Heiman, D. I.; Kim, J.; Lawrence, M. S.; Lin, P.; Meier, S.; Noble, M. S.; Saksena, G.; Voet, D.; Zhang, H.; Bernard, B.; Chambwe, N.; Dhankani, V.; Knijnenburg, T.; Kramer, R.; Leinonen, K.; Liu, Y.; Miller, M.; Reynolds, S.; Shmulevich, I.; Thorsson, V.; Zhang, W.; Akbani, R.; Broom, B. M.; Hegde, A. M.; Ju, Z.; Kanchi, R. S.; Korkut, A.; Li, J.; Liang, H.; Ling, S.; Liu, W.; Lu, Y.; Mills, G. B.; Ng, K.-S.; Rao, A.; Ryan, M.; Wang, J.; Weinstein, J. N.; Zhang, J.

Abeshouse, A.; Armenia, J.; Chakravarty, D.; Chatila, W. K.; de Bruijn, I.; Gao, J.; Gross, B. E.; Heins, Z. J.; Kundra, R.; La, K.; Ladanyi, M.; Luna, A.; Nissan, M. G.; Ochoa, A.; Phillips, S. M.; Reznik, E.; Sanchez-Vega, F.; Sander, C.; Schultz, N.; Sheridan, R.; Sumer, S. O.; Sun, Y.; Taylor, B. S.; Wang, J.; Zhang, H.; Anur, P.; Peto, M.; Spellman, P.; Benz, C.; Stuart, J. M.; Wong, C. K.; Yau, C.; Hayes, D. N.; Parker, J. S.; Wilkerson, M. D.; Ally, A.; Balasundaram, M.; Bowlby, R.; Brooks, D.; Carlsen, R.; Chuah, E.; Dhalla, N.; Holt, R.; Jones, S. J. M.; Kasaian, K.; Lee, D.; Ma, Y.; Marra, M. A.; Mayo, M.; Moore, R. A.; Mungall, A. J.; Mungall, K.; Robertson, A. G.; Sadeghi, S.; Schein, J. E.; Sipahimalani, P.; Tam, A.; Thiessen, N.; Tse, K.; Wong, T.; Berger, A. C.; Beroukhi, R.; Cherniack, A. D.; Cibulskis, C.; Gabriel, S. B.; Gao, G. F.; Ha, G.; Meyerson, M.; Schumacher, S. E.; Shih, J.; Kucherlapati, M. H.; Kucherlapati, R. S.; Baylin, S.; Cope, L.; Danilova, L.; Bootwalla, M. S.; Lai, P. H.; Maglinte, D. T.; Van Den Berg, D. J.; Weisenberger, D. J.; Auman, J. T.; Balu, S.; Bodenheimer, T.; Fan, C.; Hoadley, K. A.; Hoyle, A. P.; Jefferys, S. R.; Jones, C. D.; Meng, S.; Mieczkowski, P. A.; Mose, L. E.; Perou, A. H.; Perou, C. M.; Roach, J.; Shi, Y.; Simons, J. V.; Skelly, T.; Soloway, M. G.; Tan, D.; Veluvolu, U.; Fan, H.; Hinoue, T.; Laird, P. W.; Shen, H.; Zhou, W.; Bellair, M.; Chang, K.; Covington, K.; Creighton, C. J.; Dinh, H.; Doddapaneni, H.; Donehower, L. A.; Drummond, J.; Gibbs, R. A.; Glenn, R.; Hale, W.; Han, Y.; Hu, J.; Korchina, V.; Lee, S.; Lewis, L.; Li, W.; Liu, X.; Morgan, M.; Morton, D.; Muzny, D.; Santibanez, J.; Sheth, M.; Shinbrot, E.; Wang, L.; Wang, M.; Wheeler, D. A.; Xi, L.; Zhao, F.; Hess, J.; Appelbaum, E. L.; Bailey, M.; Cordes, M. G.; Ding, L.; Fronick, C. C.; Fulton, L. A.; Fulton, R. S.; Kandoth, C.; Mardis, E. R.; McLellan, M. D.; Miller, C. A.; Schmidt, H. K.; Wilson, R. K.; Crain, D.; Curley, E.; Gardner, J.; Lau, K.; Mallery, D.; Morris, S.; Paulauskis, J.; Penny, R.; Shelton, C.; Shelton, T.; Sherman, M.; Thompson, E.; Yena, P.; Bowen, J.; Gastier-Foster, J. M.; Gerken, M.; Leraas, K. M.; Lichtenberg, T. M.; Ramirez, N. C.; Wise, L.; Zmuda, E.; Corcoran, N.; Costello, T.; Hovens, C.; Carvalho, A. L.; de Carvalho, A. C.; Fregnani, J. H.; Longatto-Filho, A.; Reis, R. M.; Scapulatempo-Neto, C.; Silveira, H. C. S.; Vidal, D. O.; Burnette, A.; Eschbacher, J.; Hermes, B.; Noss, A.; Singh, R.; Anderson, M. L.; Castro, P. D.; Ittmann, M.; Huntsman, D.; Kohl, B.; Le, X.; Thorp, R.; Andry, C.; Duffy, E. R.; Lyadov, V.; Paklina, O.; Setdikova, G.; Shabunin, A.; Tavobilov, M.; McPherson, C.; Warnick, R.; Berkowitz, R.; Cramer, D.; Feltmate, C.; Horowitz, N.; Kibel, A.; Muto, M.; Raut, C. P.; Malykh, A.; Barnholtz-Sloan, J. S.; Barrett, W.; Devine, K.; Fulop, J.; Ostrom, Q. T.; Shimmel, K.; Wolinsky, Y.; Sloan, A. E.; De Rose, A.; Giulianti, F.; Goodman, M.; Karlan, B. Y.; Hagedorn, C. H.; Eckman, J.; Harr, J.; Myers, J.; Tucker, K.; Zach, L. A.; Deyarmin, B.; Hu, H.; Kvecher, L.; Larson, C.; Mural, R. J.; Somiari, S.; Vicha, A.; Zelinka, T.; Bennett, J.; Iacocca, M.; Rabeno, B.; Swanson, P.; Latour, M.; Lacombe, L.; Têtu, B.; Bergeron, A.; McGraw, M.; Staugaitis, S. M.; Chabot, J.; Hibshoosh, H.; Sepulveda, A.; Su, T.; Wang, T.; Potapova, O.; Voronina, O.; Desjardins, L.; Mariani, O.; Roman-Roman, S.; Sastre, X.; Stern, M.-H.; Cheng, F.; Signoretta, S.; Berchuck, A.; Bigner, D.; Lipp, E.; Marks, J.; McCall, S.; McLendon, R.; Secord, A.; Sharp, A.; Behera, M.; Brat, D. J.; Chen, A.; Delman, K.; Force, S.; Khuri, F.; Magliocca, K.; Maithel, S.; Olson, J. J.; Owonikoko, T.; Pickens, A.; Ramalingam, S.; Shin, D. M.; Sica, G.; Van Meir, E. G.; Zhang, H.; Eijckenboom, W.; Gillis, A.; Korpershoek, E.; Looijenga, L.; Oosterhuis, W.; Stoop, H.; van Kessel, K. E.; Zwarthoff, E. C.; Calatozzolo, C.; Cuppini, L.; Cuzzubbo, S.; DiMeco, F.; Finocchiaro, G.; Mattei, L.; Perin, A.; Pollo, B.; Chen, C.; Houck, J.; Lohavanichbutr, P.; Hartmann, A.; Stoehr, C.; Stoehr, R.; Taubert, H.; Wach, S.; Wullich, B.; Kycler, W.; Murawa, D.; Wiznerowicz, M.; Chung, K.; Edenfield, W. J.; Martin, J.; Baudin, E.; Buble, G.; Bueno, R.; De Rienzo, A.; Richards, W. G.; Kalkanis, S.; Mikkelsen, T.; Noushmehr, H.; Scarpacci, L.; Girard, N.; Aymerich, M.; Campo, E.; Giné, E.; Guillermo, A. L.; Van Bang, N.; Hanh, P. T.; Phu, B. D.; Tang, Y.; Colman, H.; Evason, K.; Dottino, P. R.; Martignetti, J. A.; Gabra, H.; Juhl, H.; Akeredolu, T.; Stepa, S.; Hoon, D.; Ahn, K.; Kang, K. J.; Beuschlein, F.; Breggia, A.; Birrer, M.; Bell, D.; Borad, M. B.; Bryce, A. H.; Castle, E.; Chandan, V.; Chevillet, J.; Copland, J. A.; Farnell, M.; Flotte, T.; Giama, N.; Ho, T.; Kendrick, M.; Kocher, J.-P.; Kopp, K.; Moser, C.; Nagorney, D.; O'Brien, D.; O'Neill, B. P.; Patel, T.; Petersen, G.; Que, F.; Rivera, M.; Roberts, L.; Smallridge, R.; Smyrk, T.; Stanton, M.; Thompson, R. H.; Torben-son, M.; Yang, J. D.; Zhang, L.; Brimo, F.; Ajani, J. A.; Gonzalez, A. M. A.; Behrens, C.; Bondaruk, J.; Broaddus, R.; Czerniak, B.; Esmaeli, B.; Fujimoto, J.; Gershenwald, J.; Guo, C.; Lazar, A. J.; Logothetis, C.; Meric-Bernstam, F.; Moran, C.; Ramondetta, L.; Rice, D.; Sood, A.; Tamboli, P.; Thompson, T.; Troncso, P.; Tsao, A.; Wistuba, I.; Carter, C.; Haydu, L.; Hersey, P.; Jakrot, V.; Kakavand, H.; Kefford, R.; Lee, K.; Long, G.; Mann, G.; Quinn, M.; Saw, R.; Scolyer, R.; Shannon, K.; Spillane, A.; Stretch, J.; Synott, M.; Thompson, J.; Wilmott, J.; Al-Ahmadie, H.; Chan, T. A.; Ghossein, R.; Gopalan, A.; Levine, D. A.; Reuter, V.; Singer, S.; Singh, B.; Tien, N. V.; Broudy, T.; Mirsaidi, C.; Nair, P.; Drwiega, P.; Miller, J.; Smith, J.; Zaren, H.; Park, J.-W.; Hung, N. P.; Kebebew, E.; Linehan, W. M.; Metwalli, A. R.; Pacak, K.; Pinto, P. A.; Schiffman, M.; Schmidt, L. S.; Vocke, C. D.; Wentzensen, N.; Worrell, R.; Yang, H.; Moncrieff, M.; Goparaju, C.; Melamed, J.; Pass, H.; Botnariuc, N.; Caraman, I.; Cernat, M.; Chemencedji, I.; Clipca, A.; Doruc, S.; Gorincioi, G.; Mura, S.; Pirtac, M.; Stancul, I.; Tcaciuc, D.; Albert, M.; Alexopoulou, I.; Arnaout, A.; Bartlett, J.; Engel, J.; Gilbert, S.; Parfitt, J.; Sekhon, H.; Thomas, G.; Rassi, D. M.; Rintoul, R. C.; Bifulco, C.; Tamakawa, R.; Urba, W.; Hayward, N.; Timmers, H.; Antenucci, A.; Facciolo, F.; Grazi, G.; Marino, M.; Merola, R.; de Krijger, R.; Gimenez-Roqueplo, A.-P.; Piché, A.; Chevalier, S.; McKercher, G.; Birsoy, K.; Barnett, G.; Brewer, C.; Farver, C.; Naska, T.; Pennell, N. A.; Raymond, D.; Schilero, C.; Smolenski, K.; Williams, F.; Morrison, C.; Borgia, J. A.; Liptay, M. J.; Pool, M.; Seder, C. W.; Junker, K.; Omberg, L.; Dinkin, M.; Manikhas, G.; Alvaro, D.; Bragazzi, M. C.; Cardinale, V.; Carpino, G.; Gaudio, E.; Chesla, D.; Cottingham, S.; Dubina, M.; Moiseenko, F.; Dhanasekaran, R.; Becker, K.-F.; Janssen, K.-P.; Slotta-Huspenina, J.; Abdel-Rahman, M. H.; Aziz, D.; Bell, S.; Cebulla, C. M.; Davis, A.; Duell, R.; Elder, J. B.; Hilty, J.; Kumar, B.; Lang, J.; Lehman, N. L.; Mandt, R.; Nguyen, P.; Pilarski, R.; Rai, K.; Schoenfeld, L.; Senecal, K.; Wakely, P.; Hansen, P.; Lechan, R.; Powers, J.; Tischler, A.; Grizzle, W. E.; Sexton, K. C.; Kastl, A.; Henderson, J.; Porten, S.; Waldmann, J.; Fassnacht, M.; Asa, S. L.; Schandorf, D.; Couce, M.; Graefen, M.; Huland, H.; Sauter, G.; Schlomm, T.; Simon, R.; Tennstedt, P.; Olabode, O.; Nelson, M.; Bathe, O.; Carroll, P. R.; Chan, J. M.; Disaia, P.; Glenn, P.; Kelley, R. K.; Landen, C. N.; Phillips, J.; Prados, M.; Simko, J.; Smith-McCune, K.; VandenBerg, S.; Roggin, K.; Fehrenbach, A.; Kendler, A.; Sifri, S.; Steele, R.; Jimeno, A.; Carey, F.; Forgie, I.; Mannelli, M.; Carney, M.; Hernandez, B.; Campos, B.; Herold-Mende, C.; Jungk, C.; Unterberg, A.; von Deimling, A.; Bossler, A.; Galbraith, J.; Jacobus, L.; Knudson, M.; Knutson, T.; Ma, D.; Milhem, M.; Sigmund, R.; Godwin, A. K.; Madan, R.; Rosenthal, H. G.; Adebamowo, C.; Adebamowo, S. N.; Boussioutas, A.; Beer, D.; Giordano, T.; Mes-Masson, A.-M.; Saad, F.; Bocklage, T.; Landrum, L.; Mannel, R.; Moore, K.; Moxley, K.; Postier, R.; Walker, J.; Zuna, R.; Feldman, M.; Valdivieso, F.; Dhir, R.; Luketich, J.; Pinero, E. M. M.; Quintero-Aguilo, M.; Carlotti, C. G.; Dos Santos, J. S.; Kemp, R.; Sankarankuty, A.; Tirapelli, D.; Catto, J.; Agnew, K.; Swisher, E.; Creaney, J.; Robinson, B.; Shelley, C. S.; Godwin, E. M.; Kendall, S.; Shipman, C.; Bradford, C.; Carey, T.; Haddad, A.; Moyer, J.; Peterson, L.; Prince, M.; Rozek, L.; Wolf, G.; Bowman, R.; Fong, K. M.; Yang, I.; Korst, R.; Rathmell, W. K.; Fantacone-Campbell, J. L.; Hooke, J. A.; Kovatich, A. J.; Shriver, C. D.; DiPersio, J.; Drake, B.; Govindan, R.; Heath, S.; Ley, T.; Van Tine, B.; Westervelt, P.; Rubin, M. A.; Lee, J. I.; Aredes, N. D.; Mariamidze, A. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* **2018**, *173* (2), 321-337.e10.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.035>.

(455) Ferguson, F. M.; Gray, N. S. Kinase Inhibitors: The Road Ahead. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17* (5), 353–377.

<https://doi.org/10.1038/nrd.2018.21>.

(456) Zarrin, A. A.; Bao, K.; Lupardus, P.; Vucic, D. Kinase Inhibition in Autoimmunity and Inflammation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, 1–25. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0082-8>.

(457) Attwood, M. M.; Fabbro, D.; Sokolov, A. V.; Knapp, S.; Schiöth, H. B. Trends in Kinase Drug Discovery: Targets, Indications and Inhibitor Design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (11), 839–861. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00252-y>.

(458) Wang, J.; Yazdani, S.; Han, A.; Schapira, M. Structure-Based View of the Druggable Genome. *Drug Discov. Today* **2020**, *25* (3), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.02.006>.

(459) Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E.; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M.; Zarrinkar, P. P. A Quantitative Analysis of Kinase Inhibitor Selectivity. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (1), 127–132. <https://doi.org/10.1038/nbt1358>.

(460) Elkins, J. M.; Fedele, V.; Szklarz, M.; Abdul Azeez, K. R.; Salah, E.; Mikolajczyk, J.; Romanov, S.; Sepetov, N.; Huang, X.-P.; Roth, B. L.; Al Haj Zen, A.; Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A.; Morris, J.; Teicher, B. A.; Kunkel, M.; Polley, E.; Lackey, K. E.; Atkinson, F. L.; Overington, J. P.; Bamborough, P.; Müller, S.; Price, D. J.; Willson, T. M.; Drewry, D. H.; Knapp, S.; Zuercher, W. J. Comprehensive Characterization of the Published Kinase Inhibitor Set. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34* (1), 95–103. <https://doi.org/10.1038/nbt.3374>.

(461) Vasta, J. D.; Corona, C. R.; Wilkinson, J.; Zimprich, C. A.; Hartnett, J. R.; Ingold, M. R.; Zimmerman, K.; Machleidt, T.; Kirkland, T. A.; Huwiler, K. G.; Ohana, R. F.; Slater, M.; Otto, P.; Cong, M.; Wells, C. I.; Berger, B.-T.; Hanke, T.; Glas, C.; Ding, K.; Drewry, D. H.; Huber, K. V. M.; Willson, T. M.; Knapp, S.; Müller, S.; Meisenheimer, P. L.; Fan, F.; Wood, K. V.; Robers, M. B. Quantitative, Wide-Spectrum Kinase Profiling in Live Cells for Assessing the Effect of Cellular ATP on Target Engagement. *Cell Chem. Biol.* **2018**, *25* (2), 206–214.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.10.010>.

(462) Cohen, P.; Cross, D.; Jänne, P. A. Kinase Drug Discovery 20 Years after Imatinib: Progress and Future Directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20* (7), 551–569. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00195-4>.

(463) Lu, X.; Smaill, J. B.; Ding, K. New Promise and Opportunities for Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew. Chem.* **2020**, *59* (33), 13764–13776. <https://doi.org/10.1002/anie.201914525>.

(464) Leroux, A. E.; Biondi, R. M. Renaissance of Allostery to Disrupt Protein Kinase Interactions. *Trends Biochem. Sci.* **2020**, *45* (1), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.09.007>.

(465) Sonti, R.; Hertel-Hering, I.; Lamontanara, A. J.; Hantschel, O.; Grzesiek, S. ATP Site Ligands Determine the Assembly State of the Abelson Kinase Regulatory Core via the Activation Loop Conformation. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (5), 1863–1869. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b12430>.

(466) Kumar, G. S.; Clarkson, M. W.; Kunze, M. B. A.; Granata, D.; Wand, A. J.; Lindorff-Larsen, K.; Page, R.; Peti, W. Dynamic Activation and Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase P38. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115* (18), 4655–4660. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721441115>.

(467) Xie, T.; Saleh, T.; Rossi, P.; Kalodimos, C. G. Conformational States Dynamically Populated by a Kinase Determine Its Function. *Science* **2020**, *62*, eabc2754-18. <https://doi.org/10.1126/science.abc2754>.

(468) Aoto, P. C.; Stanfield, R. L.; Wilson, I. A.; Dyson, H. J.; Wright, P. E. A Dynamic Switch in Inactive P38 γ Leads to an Excited State on the Pathway to an Active Kinase. *Biochemistry* **2019**, *58* (51), 5160–5172. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00932>.

(469) Lyczek, A.; Berger, B.-T.; Rangwala, A. M.; Paung, Y.; Tom, J.; Philipose, H.; Guo, J.; Albanese, S. K.; Robers, M. B.; Knapp, S.; Chodera, J. D.; Seeliger, M. A. Mutation in Abl Kinase with Altered Drug-Binding Kinetics Indicates a Novel Mechanism of Imatinib Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2021**, *118* (46), e2111451118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2111451118>.

(470) Pegram, L. M.; Anderson, J. W.; Ahn, N. G. Dynamic Equilibria in Protein Kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2021**, *71*, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.07.006>.

(471) Savitski, M. M.; Reinhard, F. B. M.; Franken, H.; Werner, T.; Savitski, M. F.; Eberhard, D.; Molina, D. M.; Jafari, R.; Dovega, R. B.; Klaeger, S.; Kuster, B.; Nordlund, P.; Bantscheff, M.; Drewes, G. Tracking Cancer Drugs in Living Cells by Thermal Profiling of the Proteome. *Science* **2014**, *346* (6205), 1255784–12. <https://doi.org/10.1126/science.1255784>.

(472) Jafari, R.; Almqvist, H.; Axelsson, H.; Ignatshchenko, M.; ck, T. L. auml; Nordlund, P. auml r; Molina, D. M. The Cellular Thermal Shift Assay for Evaluating Drug Target Interactions in Cells. *Nat. Protoc.* **2014**, *9* (9), 2100–2122. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.138>.

(473) Reinhard, F. B. M.; Eberhard, D.; Werner, T.; Franken, H.; Childs, D.; Doce, C.; Savitski, M. F.; Huber, W.; Bantscheff, M.; Savitski, M. M.; Drewes, G. Thermal Proteome Profiling Monitors Ligand Interactions with Cellular Membrane Proteins. *Nat. Methods* **2015**, *12* (12), 1129–1131. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3652>.

(474) Franken, H.; Mathieson, T.; Childs, D.; Sweetman, G. M. A.; Werner, T.; gel, I. T. ouml; Doce, C.; Gade, S.; Bantscheff, M.; Drewes, G.; Reinhard, F. B. M.; Huber, W.; Savitski, M. M. Thermal Proteome Profiling for Unbiased Identification of Direct and Indirect Drug Targets Using Multiplexed Quantitative Mass Spectrometry. *Nat. Protoc.* **2015**, *10* (10), 1567–1593. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.101>.

(475) Perrin, J.; Werner, T.; Kurzawa, N.; Rutkowska, A.; Childs, D. D.; Kalxdorf, M.; Poeckel, D.; Stonehouse, E.; Strohmmer, K.; Heller, B.; Thomson, D. W.; Krause, J.; Becher, I.; Eberl, H. C.; Vappiani, J.; Sevin, D. C.; Rau, C. E.; Franken, H.; Huber, W.; Faeltth-Savitski, M.; Savitski, M. M.; Bantscheff, M.; Bergamini, G. Identifying Drug Targets in Tissues and Whole Blood with Thermal-Shift Profiling. *Nat. Biotechnol.* **2020**, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0388-4>.

(476) Kurzawa, N.; Becher, I.; Sridharan, S.; Franken, H.; Mateus, A.; Anders, S.; Bantscheff, M.; Huber, W.; Savitski, M. M. A Computational Method for Detection of Ligand-Binding Proteins from Dose Range Thermal Proteome Profiles. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 5783. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19529-8>.

(477) Berger, B.-T.; Amaral, M.; Kokh, D. B.; Nunes-Alves, A.; Musil, D.; Heinrich, T.; Schröder, M.; Neil, R.; Wang, J.; Navratilova,

- I.; Bomke, J.; Elkins, J. M.; Müller, S.; Frech, M.; Wade, R. C.; Knapp, S. Structure-Kinetic Relationship Reveals the Mechanism of Selectivity of FAK Inhibitors over PYK2. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28* (5), 686–698.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.01.003>.
- (478) Sanchez, T. W.; Ronzetti, M. H.; Owens, A. E.; Antony, M.; Voss, T.; Wallgren, E.; Talley, D.; Balakrishnan, K.; Leyes Porello, S. E.; Rai, G.; Marugan, J. J.; Michael, S. G.; Baljinnam, B.; Southall, N.; Simeonov, A.; Henderson, M. J. Real-Time Cellular Thermal Shift Assay to Monitor Target Engagement. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17* (9), 2471–2482. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.2c00334>.
- (479) Gossert, A. D.; Jahnke, W. NMR in Drug Discovery: A Practical Guide to Identification and Validation of Ligands Interacting with Biological Macromolecules. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, *97* (C), 82–125. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2016.09.001>.
- (480) Strasser, A.; Wittmann, H.-J.; Seifert, R. Binding Kinetics and Pathways of Ligands to GPCRs. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38* (8), 717–732. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.05.005>.
- (481) Georgi, V.; Schiele, F.; Berger, B.-T.; Steffen, A.; Marin Zapata, P. A.; Briem, H.; Menz, S.; Preusse, C.; Vasta, J. D.; Robers, M. B.; Brands, M.; Knapp, S.; Fernández-Montalván, A. Binding Kinetics Survey of the Drugged Kinome. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (46), 15774–15782. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08048>.
- (482) Luchinat, E.; Barbieri, L.; Cremonini, M.; Pennestri, M.; Nocentini, A.; Supuran, C. T.; Banci, L. Determination of Intracellular Protein–Ligand Binding Affinity by Competition Binding in-Cell NMR. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **2021**, *77* (10), 1270–1281. <https://doi.org/10.1107/S2059798321009037>.
- (483) Luchinat, E.; Secci, E.; Cencetti, F.; Bruni, P. Sequential Protein Expression and Selective Labeling for In-Cell NMR in Human Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2016**, *1860* (3), 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.12.023>.
- (484) Cotruvo, J. A. The Chemistry of Lanthanides in Biology: Recent Discoveries, Emerging Principles, and Technological Applications. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5* (9), 1496–1506. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00642>.
- (485) Daumann, L. J. Essential and Ubiquitous: The Emergence of Lanthanide Metallobiochemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (37), 12795–12802. <https://doi.org/10.1002/anie.201904090>.
- (486) Webster, A. M.; Peacock, A. F. A. De Novo Designed Coiled Coils as Scaffolds for Lanthanides, Including Novel Imaging Agents with a Twist. *Chem. Commun.* **2021**, *57* (56), 6851–6862. <https://doi.org/10.1039/D1CC02013G>.
- (487) Örd, M.; Venta, R.; Möll, K.; Valk, E.; Loog, M. Cyclin-Specific Docking Mechanisms Reveal the Complexity of M-CDK Function in the Cell Cycle. *Mol. Cell* **2019**, *75* (1), 76–89.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.026>.
- (488) Faustova, I.; Bulatovic, L.; Matiyevskaya, F.; Valk, E.; Örd, M.; Loog, M. A New Linear Cyclin Docking Motif That Mediates Exclusively S-phase CDK-specific Signaling. *EMBO J.* **2020**, *30*, 169–16. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105839>.
- (489) Bandyopadhyay, S.; Bhaduri, S.; Örd, M.; Davey, N. E.; Loog, M.; Pryciak, P. M. Comprehensive Analysis of G1 Cyclin Docking Motif Sequences That Control CDK Regulatory Potency In Vivo. *Curr. Biol.* **2020**, *30* (22), 4454–4466.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.08.099>.
- (490) Örd, M.; Möll, K.; Agerova, A.; Kivi, R.; Faustova, I.; Venta, R.; Valk, E.; Loog, M. Multisite Phosphorylation Code of CDK. *Nat. Struct. Amp Mol. Biol.* **2019**, *26* (7), 649–658. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0256-4>.
- (491) Yu, I.; Mori, T.; Ando, T.; Harada, R.; Jung, J.; Sugita, Y.; Feig, M. Biomolecular Interactions Modulate Macromolecular Structure and Dynamics in Atomic Model of a Bacterial Cytoplasm. *eLife* **2016**, *5*, e19274. <https://doi.org/10.7554/eLife.19274>.
- (492) Schütz, S.; Sprangers, R. Methyl TROSY Spectroscopy: A Versatile NMR Approach to Study Challenging Biological Systems. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2020**, *116*, 56–84. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2019.09.004>.
- (493) Alderson, T. R.; Kay, L. E. NMR Spectroscopy Captures the Essential Role of Dynamics in Regulating Biomolecular Function. *Cell* **2021**, *184* (3), 577–595. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.034>.
- (494) Mu, X.; Choi, S.; Lang, L.; Mowray, D.; Dokholyan, N. V.; Danielsson, J.; Oliveberg, M. Physicochemical Code for Quinary Protein Interactions in Escherichia Coli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114* (23), E4556–E4563. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621227114>.
- (495) Leeb, S.; Yang, F.; Oliveberg, M.; Danielsson, J. Connecting Longitudinal and Transverse Relaxation Rates in Live-Cell NMR. *J. Phys. Chem. B* **2020**, *124* (47), 10698–10707. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c08274>.
- (496) Leeb, S.; Sörensen, T.; Yang, F.; Mu, X.; Oliveberg, M.; Danielsson, J. Diffusive Protein Interactions in Human versus Bacterial Cells. *Curr. Res. Struct. Biol.* **2020**, *2*, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2020.04.002>.
- (497) Yokoyama, J.; Matsuda, T.; Koshiha, S.; Kigawa, T. An Economical Method for Producing Stable-Isotope Labeled Proteins by the E. Coli Cell-Free System. *J. Biomol. NMR* **2010**, *48* (4), 193–201. <https://doi.org/10.1007/s10858-010-9455-3>.
- (498) Yokoyama, J.; Matsuda, T.; Koshiha, S.; Tochio, N.; Kigawa, T. A Practical Method for Cell-Free Protein Synthesis to Avoid Stable Isotope Scrambling and Dilution. *Anal. Biochem.* **2011**, *411* (2), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.017>.
- (499) Miyanoiri, Y.; Takeda, M.; Terauchi, T.; Kainosho, M. Recent Developments in Isotope-Aided NMR Methods for Supramolecular Protein Complexes -SAIL Aromatic TROSY. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2020**, *1864* (2), 129439. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.129439>.
- (500) Qing, G.; Xia, B.; Inouye, M. Enhancement of Translation Initiation by A/T-Rich Sequences Downstream of the Initiation Codon in Escherichia Coli. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *6* (3–4), 133–144. <https://doi.org/10.1159/000077244>.
- (501) Ahn, J.-H.; Hwang, M.-Y.; Lee, K.-H.; Choi, C.-Y.; Kim, D.-M. Use of Signal Sequences as an in Situ Removable Sequence Element to Stimulate Protein Synthesis in Cell-Free Extracts. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (4), e21–e21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl917>.
- (502) Haberstock, S.; Roos, C.; Hoevens, Y.; Dötsch, V.; Schnapp, G.; Pautsch, A.; Bernhard, F. A Systematic Approach to Increase the Efficiency of Membrane Protein Production in Cell-Free Expression Systems. *Protein Expr. Purif.* **2012**, *82* (2), 308–316. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.01.018>.
- (503) Kudla, G.; Murray, A. W.; Tollervey, D.; Plotkin, J. B. Coding-Sequence Determinants of Gene Expression in Escherichia Coli. *Science* **2009**, *324* (5924), 255–258. <https://doi.org/10.1126/science.1170160>.
- (504) Gu, W.; Zhou, T.; Wilke, C. O. A Universal Trend of Reduced mRNA Stability near the Translation-Initiation Site in Prokaryotes and Eukaryotes. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6* (2), e1000664–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000664>.

- (505) Higuchi, K.; Yabuki, T.; Ito, M.; Kigawa, T. Cold Shock Proteins Improve E. Coli Cell-Free Synthesis in Terms of Soluble Yields of Aggregation-Prone Proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **2020**. <https://doi.org/10.1002/bit.27326>.
- (506) Taglang, C.; Martínez-Prieto, L. M.; del Rosal, I.; Maron, L.; Poteau, R.; Philippot, K.; Chaudret, B.; Perato, S.; Lone, A. S.; Puente, C.; Dugave, C.; Rousseau, B.; Pieters, G. Enantiospecific C-H Activation Using Ruthenium Nanocatalysts. *Angew. Chem.* **2015**, *127* (36), 10620–10623. <https://doi.org/10.1002/ange.201504554>.
- (507) Michelotti, A.; Rodrigues, F.; Roche, M. Development and Scale-Up of Stereoretentive α -Deuteration of Amines. *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21* (11), 1741–1744. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.7b00227>.
- (508) Homer, R. J.; Kim, M. S.; LeMaster, D. M. The Use of Cystathionine Gamma-Synthase in the Production of Alpha and Chiral Beta Deuterated Amino Acids. *Anal. Biochem.* **1993**, *215* (2), 211–215. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1577>.
- (509) Doyon, T. J.; Buller, A. R. Site-Selective Deuteration of Amino Acids through Dual-Protein Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144* (16), 7327–7336. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c00608>.
- (510) Luchinat, E.; Barbieri, L.; Cremonini, M.; Nocentini, A.; Supuran, C. T.; Banci, L. Drug Screening in Human Cells by NMR Spectroscopy Allows the Early Assessment of Drug Potency. *Angew. Chem.* **2020**, *59* (16), 6535–6539. <https://doi.org/10.1002/anie.201913436>.
- (511) Karunanithy, G.; Mackenzie, H. W.; Hansen, D. F. Virtual Homonuclear Decoupling in Direct Detection Nuclear Magnetic Resonance Experiments Using Deep Neural Networks. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *jacs.1c04010*. <https://doi.org/10.1021/jacs.1c04010>.
- (512) Kowalczyk, D.; Nakasone, M. A.; Smith, B. O.; Huang, D. T. Bivalent Binding of P14ARF to MDM2 RING and Acidic Domains Inhibits E3 Ligase Function. *Life Sci. Alliance* **2022**, *5* (12), e202201472. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201472>.
- (513) Congreve, M.; de Graaf, C.; Swain, N. A.; Tate, C. G. Impact of GPCR Structures on Drug Discovery. *Cell* **2020**, *181* (1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.003>.
- (514) Shimada, I.; Ueda, T.; Kofuku, Y.; Eddy, M. T.; Wüthrich, K. GPCR Drug Discovery: Integrating Solution NMR Data with Crystal and Cryo-EM Structures. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 1–24. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.180>.
- (515) Schweighauser, M.; Shi, Y.; Tarutani, A.; Kametani, F.; Murzin, A. G.; Ghetti, B.; Matsubara, T.; Tomita, T.; Ando, T.; Hasegawa, K.; Murayama, S.; Yoshida, M.; Hasegawa, M.; Scheres, S. H. W.; Goedert, M. Structures of α -Synuclein Filaments from Multiple System Atrophy. *Nature* **2020**, *585* (7825), 464–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2317-6>.
- (516) Shi, Y.; Zhang, W.; Yang, Y.; Murzin, A. G.; Falcon, B.; Kotecha, A.; Beers, M. van; Tarutani, A.; Kametani, F.; Garringer, H. J.; Vidal, R.; Hallinan, G. I.; Lashley, T.; Saito, Y.; Murayama, S.; Yoshida, M.; Tanaka, H.; Kakita, A.; Ikeuchi, T.; Robinson, A. C.; Mann, D. M. A.; Kovacs, G. G.; Revesz, T.; Ghetti, B.; Hasegawa, M.; Goedert, M.; Scheres, S. H. W. Structure-Based Classification of Tauopathies. *Nature* **2021**, *598* (7880), 359–363. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03911-7>.
- (517) Schweighauser, M.; Arseni, D.; Bacioglu, M.; Huang, M.; Lövestam, S.; Shi, Y.; Yang, Y.; Zhang, W.; Kotecha, A.; Garringer, H. J.; Vidal, R.; Hallinan, G. I.; Newell, K. L.; Tarutani, A.; Murayama, S.; Miyazaki, M.; Saito, Y.; Yoshida, M.; Hasegawa, K.; Lashley, T.; Revesz, T.; Kovacs, G. G.; Swieten, J. van; Takao, M.; Hasegawa, M.; Ghetti, B.; Spillantini, M. G.; Ryskeldi-Falcon, B.; Murzin, A. G.; Goedert, M.; Scheres, S. H. W. Age-Dependent Formation of TMEM106B Amyloid Filaments in Human Brains. *Nature* **2022**, *605* (7909), 310–314. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04650-z>.
- (518) Yang, Y.; Shi, Y.; Schweighauser, M.; Zhang, X.; Kotecha, A.; Murzin, A. G.; Garringer, H. J.; Cullinane, P. W.; Saito, Y.; Foroud, T.; Warner, T. T.; Hasegawa, K.; Vidal, R.; Murayama, S.; Revesz, T.; Ghetti, B.; Hasegawa, M.; Lashley, T.; Scheres, S. H. W.; Goedert, M. Structures of α -Synuclein Filaments from Human Brains with Lewy Pathology. *Nature* **2022**. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05319-3>.
- (519) Arseni, D.; Hasegawa, M.; Murzin, A. G.; Kametani, F.; Arai, M.; Yoshida, M.; Ryskeldi-Falcon, B. Structure of Pathological TDP-43 Filaments from ALS with FTLD. *Nature* **2022**, *601* (7891), 139–143. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04199-3>.
- (520) Jiang, Y. X.; Cao, Q.; Sawaya, M. R.; Abskharon, R.; Ge, P.; DeTure, M.; Dickson, D. W.; Fu, J. Y.; Loo, R. R. O.; Loo, J. A.; Eisenberg, D. S. Amyloid Fibrils in FTLD-TDP Are Composed of TMEM106B and Not TDP-43. *Nature* **2022**, *605* (7909), 304–309. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04670-9>.
- (521) Osman, S.; Cramer, P. Structural Biology of RNA Polymerase II Transcription: 20 Years On. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2020**, *36* (1), 1–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-042020-021954>.
- (522) Rengachari, S.; Schilbach, S.; Aibara, S.; Dienemann, C.; Cramer, P. Structure of the Human Mediator–RNA Polymerase II Pre-Initiation Complex. *Nature* **2021**, *594* (7861), 129–133. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03555-7>.
- (523) Kumar, M.; Michael, S.; Alvarado-Valverde, J.; Mészáros, B.; Sámano-Sánchez, H.; Zeke, A.; Dobson, L.; Lazar, T.; Örd, M.; Nagpal, A.; Farahi, N.; Käser, M.; Kraleti, R.; Davey, N. E.; Panca, R.; Chemes, L. B.; Gibson, T. J. The Eukaryotic Linear Motif Resource: 2022 Release. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50* (D1), D497–D508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab975>.
- (524) Quaglia, F.; Mészáros, B.; Salladini, E.; Hatos, A.; Panca, R.; Chemes, L. B.; Pajkos, M.; Lazar, T.; Peña-Díaz, S.; Santos, J.; Ács, V.; Farahi, N.; Fichó, E.; Aspromonte, M. C.; Bassot, C.; Chasapi, A.; Davey, N. E.; Davidović, R.; Dobson, L.; Elofsson, A.; Erdős, G.; Gaudet, P.; Giglio, M.; Glavina, J.; Iserte, J.; Iglesias, V.; Kálmán, Z.; Lambrugh, M.; Leonardi, E.; Longhi, S.; Macedo-Ribeiro, S.; Maiani, E.; Marchetti, J.; Marino-Buslje, C.; Mészáros, A.; Monzon, A. M.; Minervini, G.; Nadendla, S.; Nilsson, J. F.; Novotný, M.; Ouzounis, C. A.; Palopoli, N.; Papaleo, E.; Pereira, P. J. B.; Pozzati, G.; Promponas, V. J.; Pujols, J.; Rocha, A. C. S.; Salas, M.; Sawicki, L. R.; Schad, E.; Shenoy, A.; Szaniszló, T.; Tsigirgos, K. D.; Veljkovic, N.; Parisi, G.; Ventura, S.; Dosztányi, Z.; Tompa, P.; Tosatto, S. C. E.; Piovesan, D. DisProt in 2022: Improved Quality and Accessibility of Protein Intrinsic Disorder Annotation. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50* (D1), D480–D487. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1082>.
- (525) Lang, B.; Babu, M. M. A Community Effort to Bring Structure to Disorder. *Nat. Methods* **2021**. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01123-5>.
- (526) Ravarani, C. N.; Erkina, T. Y.; De Baets, G.; Dudman, D. C.; Erkin, A. M.; Babu, M. M. High-throughput Discovery of Functional Disordered Regions: Investigation of Transactivation Domains. *Mol. Syst. Biol.* **2018**, *14* (5), e8190-14. <https://doi.org/10.15252/msb.20188190>.
- (527) Kim, T. H.; Tsang, B.; Vernon, R. M.; Sonenberg, N.; Kay, L. E.; Forman-Kay, J. D. Phospho-Dependent Phase Separation of FMRP and CAPRIN1 Recapitulates Regulation of Translation and Deadenylation. *Science* **2019**, *365* (6455), 825–829.

<https://doi.org/10.1126/science.aax4240>.

- (528) Sridharan, S.; Hernandez-Armendariz, A.; Kurzawa, N.; Potel, C. M.; Memon, D.; Beltrao, P.; Bantscheff, M.; Huber, W.; Cuylen-Haering, S.; Savitski, M. M. Systematic Discovery of Biomolecular Condensate-Specific Protein Phosphorylation. *Nat. Chem. Biol.* **2022**, *18* (10), 1104–1114. <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01062-y>.
- (529) Li, J.; Zhang, M.; Ma, W.; Yang, B.; Lu, H.; Zhou, F.; Zhang, L. Post-Translational Modifications in Liquid-Liquid Phase Separation: A Comprehensive Review. *Mol. Biomed.* **2022**, *3* (1), 13. <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00075-2>.
- (530) Choi, S.; Meyer, M. O.; Bevilacqua, P. C.; Keating, C. D. Phase-Specific RNA Accumulation and Duplex Thermodynamics in Multiphase Coacervate Models for Membraneless Organelles. *Nat. Chem.* **2022**, *14* (10), 1110–1117. <https://doi.org/10.1038/s41557-022-00980-7>.
- (531) Lawson, C. L.; Kryshchuk, A.; Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Baker, M. L.; Barad, B. A.; Bond, P.; Burnley, T.; Cao, R.; Cheng, J.; Chojnowski, G.; Cowtan, K.; Dill, K. A.; DiMaio, F.; Farrell, D. P.; Fraser, J. S.; Herzik, M. A.; Hoh, S. W.; Hou, J.; Hung, L.-W.; Igaev, M.; Joseph, A. P.; Kihara, D.; Kumar, D.; Mittal, S.; Monastyrskyy, B.; Olek, M.; Palmer, C. M.; Patwardhan, A.; Perez, A.; Pfab, J.; Pintilie, G. D.; Richardson, J. S.; Rosenthal, P. B.; Sarkar, D.; Schäfer, L. U.; Schmid, M. F.; Schröder, G. F.; Shekhar, M.; Si, D.; Singharoy, A.; Terashi, G.; Terwilliger, T. C.; Vaiana, A.; Wang, L.; Wang, Z.; Wankowicz, S. A.; Williams, C. J.; Winn, M.; Wu, T.; Yu, X.; Zhang, K.; Berman, H. M.; Chiu, W. Cryo-EM Model Validation Recommendations Based on Outcomes of the 2019 EMDataResource Challenge. *Nat. Methods* **2021**, *18* (2), 156–164. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01051-w>.
- (532) Robertson, M. J.; Meyerowitz, J. G.; Skiniotis, G. Drug Discovery in the Era of Cryo-Electron Microscopy. *Trends Biochem. Sci.* **2022**, *47* (2), 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.06.008>.
- (533) Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Židek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- (534) Baek, M.; DiMaio, F.; Anishchenko, I.; Dauparas, J.; Ovchinnikov, S.; Lee, G. R.; Wang, J.; Cong, Q.; Kinch, L. N.; Schaeffer, R. D.; Millán, C.; Park, H.; Adams, C.; Glassman, C. R.; DeGiovanni, A.; Pereira, J. H.; Rodrigues, A. V.; van Dijk, A. A.; Ebrecht, A. C.; Opperman, D. J.; Sagmeister, T.; Buhlheller, C.; Pavkov-Keller, T.; Rathinaswamy, M. K.; Dalwadi, U.; Yip, C. K.; Burke, J. E.; Garcia, K. C.; Grishin, N. V.; Adams, P. D.; Read, R. J.; Baker, D. Accurate Prediction of Protein Structures and Interactions Using a Three-Track Neural Network. *Science* **2021**, *373* (6557), 871–876. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>.
- (535) Townshend, R. J. L.; Eismann, S.; Watkins, A. M.; Rangan, R.; Karelina, M.; Das, R.; Dror, R. O. Geometric Deep Learning of RNA Structure. *Science* **2021**, *373* (6558), 1047–1051. <https://doi.org/10.1126/science.abe5650>.
- (536) Meissner, F.; Geddes-McAlister, J.; Mann, M.; Bantscheff, M. The Emerging Role of Mass Spectrometry-Based Proteomics in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2022**. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00409-3>.
- (537) Qin, W.; Cho, K. F.; Cavanagh, P. E.; Ting, A. Y. Deciphering Molecular Interactions by Proximity Labeling. *Nat. Methods* **2021**, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01010-5>.
- (538) Go, C. D.; Knight, J. D. R.; Rajasekharan, A.; Rathod, B.; Hesketh, G. G.; Abe, K. T.; Youn, J.-Y.; Samavarchi-Tehrani, P.; Zhang, H.; Zhu, L. Y.; Popiel, E.; Lambert, J.-P.; Coyaud, É.; Cheung, S. W. T.; Rajendran, D.; Wong, C. J.; Antonicka, H.; Pelletier, L.; Palazzo, A. F.; Shoubridge, E. A.; Raught, B.; Gingras, A.-C. A Proximity-Dependent Biotinylation Map of a Human Cell. *Nature* **2021**, *595* (7865), 120–124. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03592-2>.
- (539) Luck, K.; Kim, D.-K.; Lambourne, L.; Spirohn, K.; Begg, B. E.; Bian, W.; Brignall, R.; Cafarelli, T.; Campos-Laborie, F. J.; Charlotteaux, B.; Choi, D.; Coté, A. G.; Daley, M.; Deimling, S.; Desbuleux, A.; Dricot, A.; Gebbia, M.; Hardy, M. F.; Kishore, N.; Knapp, J. J.; Kovács, I. A.; Lemmens, I.; Mee, M. W.; Mellor, J. C.; Pollis, C.; Pons, C.; Richardson, A. D.; Schlabach, S.; Teeking, B.; Yadav, A.; Babor, M.; Balcha, D.; Basha, O.; Bowman-Colin, C.; Chin, S.-F.; Choi, S. G.; Colabella, C.; Coppin, G.; D’Amata, C.; De Ridder, D.; De Rouck, S.; Duran-Frigola, M.; Ennajaoui, H.; Goebels, F.; Goehring, L.; Gopal, A.; Haddad, G.; Hatchi, E.; Helmy, M.; Jacob, Y.; Kassa, Y.; Landini, S.; Li, R.; van Lieshout, N.; MacWilliams, A.; Markey, D.; Paulson, J. N.; Rangarajan, S.; Rasla, J.; Rayhan, A.; Rolland, T.; San-Miguel, A.; Shen, Y.; Sheykhkarimli, D.; Sheynkman, G. M.; Simonovsky, E.; Taşan, M.; Tejada, A.; Tropepe, V.; Twizere, J.-C.; Wang, Y.; Weatheritt, R. J.; Weile, J.; Xia, Y.; Yang, X.; Yeager-Lotem, E.; Zhong, Q.; Aloy, P.; Bader, G. D.; De Las Rivas, J.; Gaudet, S.; Hao, T.; Rak, J.; Tavernier, J.; Hill, D. E.; Vidal, M.; Roth, F. P.; Calderwood, M. A. A Reference Map of the Human Binary Protein Interactome. *Nature* **2020**, *580* (7803), 402–408. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2188-x>.
- (540) Mund, A.; Coscia, F.; Kriston, A.; Hollandi, R.; Kovács, F.; Brunner, A.-D.; Migh, E.; Schweizer, L.; Santos, A.; Bzorek, M.; Naimy, S.; Rahbek-Gjerdum, L. M.; Dyring-Andersen, B.; Bulkescher, J.; Lukas, C.; Eckert, M. A.; Lengyel, E.; Gnann, C.; Lundberg, E.; Horvath, P.; Mann, M. Deep Visual Proteomics Defines Single-Cell Identity and Heterogeneity. *Nat. Biotechnol.* **2022**, *40* (8), 1231–1240. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01302-5>.
- (541) The Tabula Sapiens Consortium; Quake, S. R. *The Tabula Sapiens: A Multiple Organ Single Cell Transcriptomic Atlas of Humans*; preprint; Cell Biology, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.07.19.452956>.
- (542) Mariño Pérez, L.; Ielasi, F. S.; Bessa, L. M.; Maurin, D.; Kragelj, J.; Blackledge, M.; Salvi, N.; Bouvignies, G.; Palencia, A.; Jensen, M. R. Visualizing Protein Breathing Motions Associated with Aromatic Ring Flipping. *Nature* **2022**, *602* (7898), 695–700. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04417-6>.
- (543) Lambert, J.-P.; Tucholska, M.; Go, C.; Knight, J. D. R.; Gingras, A.-C. Proximity Biotinylation and Affinity Purification Are Complementary Approaches for the Interactome Mapping of Chromatin-Associated Protein Complexes. *J. Proteomics* **2015**, *118*, 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.011>.
- (544) Gingras, A.-C.; Abe, K. T.; Raught, B. Getting to Know the Neighborhood: Using Proximity-Dependent Biotinylation to Characterize Protein Complexes and Map Organelles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *48*, 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.10.017>.
- (545) Liu, X.; Salokas, K.; Weldatsadik, R. G.; Gawryski, L.; Varjosalo, M. Combined Proximity Labeling and Affinity Purification–mass Spectrometry Workflow for Mapping and Visualizing Protein Interaction Networks. *Nat. Protoc.* **2020**, 1–32.

<https://doi.org/10.1038/s41596-020-0365-x>.

- (546) Minde, D.-P.; Ramakrishna, M.; Lilley, K. S. Biotin Proximity Tagging Favours Unfolded Proteins and Enables the Study of Intrinsically Disordered Regions. *Commun. Biol.* **2020**, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0758-y>.
- (547) Wigington, C. P.; Roy, J.; Damle, N. P.; Yadav, V. K.; Blikstad, C.; Resch, E.; Wong, C. J.; Mackay, D. R.; Wang, J. T.; Krystkowiak, I.; Bradburn, D. A.; Tsekitsidou, E.; Hong, S. H.; Kaderali, M. A.; Xu, S.-L.; Stearns, T.; Gingras, A.-C.; Ullman, K. S.; Ivarsson, Y.; Davey, N. E.; Cyert, M. S. Systematic Discovery of Short Linear Motifs Decodes Calcineurin Phosphatase Signaling. *Mol. Cell* **2020**, 79 (2), 342–358.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.029>.
- (548) Göös, H.; Kinnunen, M.; Salokas, K.; Tan, Z.; Liu, X.; Yadav, L.; Zhang, Q.; Wei, G.-H.; Varjosalo, M. Human Transcription Factor Protein Interaction Networks. *Nat. Commun.* **2022**, 13 (1), 766. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28341-5>.
- (549) Ueki, Y.; Kruse, T.; Weisser, M. B.; Sundell, G. N.; Larsen, M. S. Y.; Mendez, B. L.; Jenkins, N. P.; Garvanska, D. H.; Cressey, L.; Zhang, G.; Davey, N.; Montoya, G.; Ivarsson, Y.; Kettenbach, A. N.; Nilsson, J. A Consensus Binding Motif for the PP4 Protein Phosphatase. *Mol. Cell* **2019**, 76 (6), 953–964.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.029>.
- (550) Benz, C.; Ali, M.; Krystkowiak, I.; Simonetti, L.; Sayadi, A.; Mihalic, F.; Kliche, J.; Andersson, E.; Jemth, P.; Davey, N. E.; Ivarsson, Y. Proteome-scale Mapping of Binding Sites in the Unstructured Regions of the Human Proteome. *Mol. Syst. Biol.* **2022**, 18 (1). <https://doi.org/10.15252/msb.202110584>.
- (551) Davey, N. E.; Simonetti, L.; Ivarsson, Y. ProP-PD for Proteome-Wide Motif-Mediated Interaction Discovery. *Trends Biochem. Sci.* **2022**, 47 (6), 547–548. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.01.005>.
- (552) Zhao, T.; Tian, J.; Wang, X.; Hao, Y.; Xu, M.; Zhao, Y.; Liu, X.; Chen, Y.; Jia, C. PACTS-Assisted Thermal Proteome Profiling for Use in Identifying Peptide-Interacting Proteins. *Anal. Chem.* **2022**, 94 (18), 6809–6818. <https://doi.org/10.1021/acs.anal-chem.2c00581>.
- (553) Buljan, M.; Ciuffa, R.; van Drogen, A.; Vichalkovski, A.; Mehnert, M.; Rosenberger, G.; Lee, S.; Varjosalo, M.; Pernas, L. E.; Spegg, V.; Snijder, B.; Aebersold, R.; Gstaiger, M. Kinase Interaction Network Expands Functional and Disease Roles of Human Kinases. *Mol. Cell* **2020**, 79 (3), 504–520.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.07.001>.
- (554) Niinae, T.; Imami, K.; Sugiyama, N.; Ishihama, Y. Identification of Endogenous Kinase Substrates by Proximity Labeling Combined with Kinase Perturbation and Phosphorylation Motifs. *Mol. Cell. Proteomics* **2021**, 20, 100119. <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2021.100119>.
- (555) Zhang, T.; Fassel, A.; Vaites, L. P.; Fu, S.; Sicinski, P.; Paulo, J. A.; Gygi, S. P. Interrogating Kinase–Substrate Relationships with Proximity Labeling and Phosphorylation Enrichment. *J. Proteome Res.* **2022**, 21 (2), 494–506. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00865>.
- (556) Jehle, S.; Kunowska, N.; Benlasfer, N.; Woodsmith, J.; Weber, G.; Wahl, M. C.; Stelzl, U. A Human Kinase Yeast Array for the Identification of Kinases Modulating Phosphorylation-dependent Protein–Protein Interactions. *Mol. Syst. Biol.* **2022**, 18 (3). <https://doi.org/10.15252/msb.202110820>.
- (557) Rogerson, D. T.; Sachdeva, A.; Wang, K.; Haq, T.; Kazlauskaitė, A.; Hancock, S. M.; Huguenin-Dezot, N.; Muqit, M. M. K.; Fry, A. M.; Bayliss, R.; Chin, J. W. Efficient Genetic Encoding of Phosphoserine and Its Nonhydrolyzable Analog. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11 (7), 496–503. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1823>.
- (558) Zhang, M. S.; Brunner, S. F.; Huguenin-Dezot, N.; Liang, A. D.; Schmied, W. H.; Rogerson, D. T.; Chin, J. W. Biosynthesis and Genetic Encoding of Phosphothreonine through Parallel Selection and Deep Sequencing. *Nat. Methods* **2017**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4302>.
- (559) Amiram, M.; Haimovich, A. D.; Fan, C.; Wang, Y.-S.; Aerni, H.-R.; Ntai, I.; Moonan, D. W.; Ma, N. J.; Rovner, A. J.; Hong, S. H.; Kelleher, N. L.; Goodman, A. L.; Jewett, M. C.; Il, D. S. ouml; Rinehart, J.; Isaacs, F. J. Evolution of Translation Machinery in Recoded Bacteria Enables Multi-Site Incorporation of Nonstandard Amino Acids. *Nat. Biotechnol.* **2015**, 33 (12), 1272–1279. <https://doi.org/10.1038/nbt.3372>.
- (560) Pirman, N. L.; Barber, K. W.; Aerni, H. R.; Ma, N. J.; Haimovich, A. D.; Rogulina, S.; Isaacs, F. J.; Rinehart, J. A Flexible Codon in Genomically Recoded Escherichia Coli Permits Programmable Protein Phosphorylation. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 1–6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9130>.
- (561) Balasuriya, N.; Davey, N. E.; Johnson, J. L.; Liu, H.; Biggar, K. K.; Cantley, L. C.; Li, S. S.-C.; O’Donoghue, P. Phosphorylation-Dependent Substrate Selectivity of Protein Kinase B (AKT1). *J. Biol. Chem.* **2020**, 295 (24), 8120–8134. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.012425>.