

DISS. ETH NO. 29063

**Starting Solid-State NMR where X-Ray
Crystallography Ends: Opportunities for Studying
Complex Biomolecules**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES

(Dr. sc. ETH Zürich)

presented by

MARCO E. WEBER

MSc ETH in Biology, ETH Zürich

born on 14.08.1996

Citizen of Niederhelfenschwil SG

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Beat H. Meier

Prof. Dr. Stefanie Jonas

Prof. Dr. Thomas Wiegand

2023

Abstract

In the last ten to 15 years, several developments have made solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy a valuable technique in the field of structural biology. Stronger magnets (up to 28.2 T) have improved both sensitivity and resolution of the experiments, allowing the investigation of increasingly large and complex biomolecules. Fast magic-angle spinning (MAS) at frequencies exceeding 100 kHz is now capable of averaging the strong dipolar coupling between protons and other nuclei to an extent that enables the recording of well-resolved ^1H -detected spectra. The combination of sample rotation and simultaneous radio-frequency (rf) irradiation in solid-state NMR opens up the possibility of generating different effective Hamiltonians at different parts of an experiment, thus creating a huge and constantly growing variety of customised pulse sequences that are able to selectively correlate the nuclei of interest. Finally, the establishment of sedimentation as a sample preparation technique has made many soluble and non-crystallisable proteins accessible to solid-state NMR.

In chapter 1, the theoretical foundations for solid-state NMR experiments are summarised. A particular focus is put on recent developments as well as aspects that are relevant for the ensuing parts of this work.

The following chapters provide a biological background and summarise the available literature on the various biomolecular systems that were investigated in the projects presented in this work. These include the bacterial RNA helicase and acetyltransferase TmcA (chapter 2), the non-structural protein 5A of the hepatitis C virus (chapter 3), membrane proteins of the SARS coronavirus 2 (chapter 4) and reversible lysozyme fibrils (chapter 5).

Chapter 6 encompasses the characterisation of the apo-state of TmcA. It starts with the work that had been done to establish this protein system for solid-state NMR studies, including

cloning of the construct, the purification of the protein and sedimentation. An important aspect in this regards was also the resonance assignment, which was however limited by the size of the protein and accordingly spectral overlap. Still, it was possible to obtain heavy atom resonance assignments for 84 out of 671 residues, corresponding to about 13%. While the resonance assignment was done on ADP-bound TmcA, which yielded well-resolved ^{13}C -detected spectra, sedimentation also allowed to analyse the non-crystallisable apo-state. Besides chemical-shift perturbations, which were located in the helicase portion of the protein, the resonances in spectra of apo-TmcA were considerably broader. Bulk relaxation measurements enabled to pinpoint this difference to a larger inhomogeneous linewidth, suggesting more structural heterogeneity in the absence of the nucleotide. This can also serve as an explanation why crystallisation attempts failed.

Chapter 7 builds upon the work on sedimented TmcA presented in the preceding chapter to study the effect of the binding of various types of ligands to TmcA. First, the diamagnetic Mg^{2+} in the ATPase active site was substituted with paramagnetic Mn^{2+} and Co^{2+} to localise it within the protein, since the metal ion was absent in the model from X-ray crystallography. Paramagnetic relaxation enhancements (PRE) were used as distance restraints to triangulate the position of the metal ion, which was then confirmed by pseudo-contact shifts. The metal ion was found to be coordinated by conserved Walker motif residues and the β -phosphate of the nucleotide, which is in agreement to structures of similar proteins. The PREs also allowed an estimation of the Mn^{2+} electron relaxation time. Secondly, TmcA was co-sedimented with various ATP analogues. This enabled to follow the ATP hydrolysis cycle from the perspective of the protein by ^{13}C -detected experiments and from the perspective of the nucleotide by ^{31}P -detected experiments. Finally, the binding of RNA and acetyl-coenzyme A was analysed, which were previously known to stimulate ATP hydrolysis. Interestingly, chemical-shift perturbations (CSPs) were not only observed close to the expected binding site, but also in the ATPase active site.

While the solid-state NMR measurements on the bacterially expressed TmcA were carried out in 3.2 mm rotors, the next two chapters deal with proteins that were produced by cell-free synthesis using wheat-germ extract. The comparably low yields of this expression technique are better compatible with proton-detection in 0.7 mm rotors at fast MAS of 100 kHz. In chapter 8, continuing work on NS5A of the hepatitis C virus is presented. Our group has previously established a membrane-anchored NS5A construct reconstituted in liposomes

for solid-state NMR. This was the basis for investigation of Daclatasvir binding, which is an approved drug against hepatitis C that targets NS5A. Spectra recorded at the highest available field of 28.2 T revealed that already in the absence of Daclatasvir, NS5A exists in two forms, with a major and minor species, potentially a dynamic equilibrium between monomer and dimer. Upon Daclatasvir binding, the previously minor form is stabilised to make up almost 100%. The distribution of chemical-shift changes on the crystal structure of a monomer suggests that the dimer is asymmetric in nature.

Chapter 9 continues on the discussion of viral membrane proteins, this time of the SARS-CoV-2. These proteins proved to be challenging targets, with short T_2' relaxation times and broad, unresolved spectra. Further analyses showed that the broadening predominantly occurs in the proton dimension, while carbon and nitrogen dimensions are better resolved.

Broad spectra were also observed in the case of the reversible lysozyme fibrils, which are presented in chapter 10. Bulk relaxation measurements again shed light on the different contributions to the linewidth. It turned out that both the homogeneous and the inhomogeneous linewidths are exceptionally large. This suggests that the fibrils are characterised by extensive polymorphism, and the individual polymorphs are additionally highly dynamic.

The different projects presented in this work constitute examples for the application of solid-state NMR spectroscopy to the study of complex biomolecules. In the conclusions, the opportunities and limitations of solid-state NMR as a tool in structural biology are discussed and it is contrasted with other techniques, in particular X-ray crystallography, but also cryo-electron microscopy and *in-silico* structure prediction.

Zämefassig

I de letschte zäh bis 15 Jahr hend Entwicklige i verschiedene Aspekt d Festkörper-NMR-Spektroskopie zunere wertvolle Technik im Bereich vo de Strukturbiologie gmacht. Stärcheri Magnet (bis 28.2 T) hend sowohl d Empfindlichkeit vo de Experiment als au di spektral Uflösig gesteigeret, was d Undersuechig vo immer grössere und komplexere Biomolekül ermöglicht. Schnellers Druülle vo de Prob um de magisch Winkel (*magic-angle spinning*, churz: MAS) mit Frequenze über 100 kHz cha mittlerwile au di starche Dipolarkopplige zwüsched Protone und andere Cherne zumene Grad usmiddle, wo s Ufnäh vo guet ufglöste Protonespektre erlaubt. Di glichzeitig Kombination vo Proberotation und Radioweilestrahlig i de Festkörper-NMR eröffnet d Möglichkeit, verschidene effektivi Hamilton-Operatore i verschidene Teil vomene Experiment z erzüge, was e grossi und stetig wachsendi Bandbreiti a massgschniderete Pulssequenze kreiert, wo i de Lag sind, selektiv Cherne mitenand z korreliere. Und schlussendlich het d Etablierig vo de Sedimentierig als Probevorbereitigstechnik e Vielzahl vo lösliche und nöd kristallisierbare Protein für d Festkörper-NMR zuegänglich gmacht.

Im Kapitel 1 werded di theoretische Grundlage für Festkörper-NMR-Experiment zämefasst. Dodebi wird en bsundere Schwerpunkt uf neuere Entwicklige und Aspekt, wo für die druffolgende Teil vo dere Arbet relevant sind, gleit.

I de abschliessende Kapitel werded di biologische Hindergründ über die biomolekulare System, wo i de beschriebene Projekt undersuecht worde sind, dargleit und di verfüegbar Literatur zämefasst. D System umfasst di bakteriell RNA-Helikase und Acetyltransferase TmCA (Kapitel 2), s nödstrukturelle Protein 5A vom Hepatitis-C-Virus (Kapitel 3), Membranprotein vom SARS-CoV-2 (Kapitel 4) und reversibli Lysozymfibrille (Kapitel 5).

Kapitel 6 umfasst d Charakterisierig vom Apo-Zuestand vo TmcA. S Kapitel fangt mit de Arbete a, wo notwendig gsi sind, zum TmcA als System für d Festkörper-NMR z etabliere; das sind s Klönierig vom Konstrukt, d Ufreinigung vom Protein und d Sedimentierig. En wichtige Aspekt i dere Hisicht isch au d Resonanzzuewiisig gsi, wo allerdings dur d Grössi vom Protein und em dodemit verbundene spektrale Überlapp limitiert gsi isch. Trotzdem het mer 84 vo 671 Aminosürene chöne Schweratomresonanze zueordne, was öppe 13% entspricht. Während d Resonanzzuewiisig am ADP-bundene TmcA vorgnoh worde isch, wel das guet ufglösti ^{13}C -detektierte Spektre gliederet het, het d Sedimentierig au d Analyse vom nöd-kristallisierbare Apo-Zuestand erlaubt. Nebed Änderige i de chemische Verschiebige, wo im Helikaseteil vom Protein ufrätte sind, sind d Resonanze i de Spektre vo Apo-TmcA au dütlich breiter. Relaxationsmessige hend zeigt, das de Unterschied uf e grösseri inhomogeni Liniebreiti zruggzfuehre isch, was uf en erhöhti strukturelli Heterogenität in Abweseheit vom bundene Nukleotid hiwiist. Das chönnt au en Erklärig sii, wieso Kristallisierigsversuech fehlgschlage sind.

S Kapitel 7 baut uf de Arbete am sedimentierte TmcA, wo im vorherige Kapitel beschriebe worde sind, uf, zum d Bindig vo verschiedene Arte vo Ligande z studiere. Als Ersts isch s diamagnetisch Mg^{2+} i de aktive Tasche vo de ATPase dur es paramagnetischs Mn^{2+} und Co^{2+} ersetzt worde, zum s im Protein lokalisierig, wel s Metallion im Strukturmodell us de Kristallographie nöd vorhande isch. Paramagnetischi Relaxationsbeschleunigung (paramagnetic relaxation enhancement, churz: PRE) sind als Distanzbeschränktige gnutzt worde, zum d Position vom Metallion z trianguliere, wo nocher mit Pseudokontaktverschiebige bestätigt worde isch. S Metallion wird vo konservierte Walkermotiv-Aminosürene und em β -Phosphat vom Nukleotid koordiniert, was in Übereinstimmig mit Strukture vo ähnliche Protein isch. D PREs hend au e Abschätzig vo de Mn^{2+} -Elektronerelaxationsziit erlaubt. Wüters isch TmcA zäme mit unterschiedliche ATP-Analoga sedimentiert worde. Das hets ermöglicht, de ATP-Hydrolysezyklus sowohl us de Perspektive vom Protein mit ^{13}C -detektierte, als au us dere vom Nukleotid mit ^{31}P -detektierte Experiment z verfolge. D Bindig vo RNA und Acetyl-Coenzym A isch ebefalls analysiert worde. Vo dene het mer us biochemische Experiment gwüsst, das sie d ATP-Hydrolyse stimuliered. Tatächlich sind i de NMR-Spektre nöd nur a de erwartete Bindigsstell Änderige i de chemische Verschiebige beobachtet worde, sondern au i de aktive Tasche vo de ATPase.

Während d Festkörper-NMR-Messige a bakteriell exprimiertem Tmca i 3.2-mm-Rotore duregeführt worde sind, behandelte di nögschte zwei Kapitel Protein, wo dur zellfrei Synthese mit Weizekeimextrakt hergestelt worde sind. D Usbütene bi dere Technik sind im Vergleich chliner und drum besser kompatibel mit Protonendetektion i 0.7-mm-Rotore bi schnellem MAS vo 100 kHz. Im Kapitel 8 werded witerführendi Arbete a NS5A vom Hepatitis-C-Virus vorgstellt. Üsi Gruppe het bereits vorane es membranverankerets NS5A-Konstrukt, wo in Liposome rekonstituiert worde isch, für d Festkörper-NMR etabliert. Das het d Basis für d Undersuechige vo de Daclatasvir-Bindig dargstellt. Daclatasvir isch es zueglasses Medika-ment geg Hepatitis C, wo uf NS5A abrichtet isch. Spektre, wo am strärchste verfügbare Magnetfeld von 28.2 T ufgnoh worde sind, hend zeigt, das NS5A bereits in Abweseheit vo Daclatasvir als Gmisch vo zwei Zustand vorliggt, mitere Haupt- und ere Nebedspezies. Das chönnti es dynamischs Gleichwicht zwüsched eme Monomer und eme Dimer sii. Wenn Da-clatasvir bindet, verschiebt sich s Gleichwicht in Richtig vo de ursprüngliche Nebedspezies, wo denn geg di 100% usmacht. D Verteilig vo Änderige vo de chemische Verschiebige uf de Kristallstruktur vomene Monomer spricht defür, das s Dimer asymmetrisch isch.

S Kapitel 9 führt d Diskussion über virali Membranprotein witer, dasmol am Beispiel vo SARS-CoV-2. Die Protein hend sich als useforderendi System mit churze T_2' -Relaxationsziite und breite, chuum ufglöste Spektre erwiese. Witergehendi Analyse hend zeigt, das d Ver-breiterig hauptsächlich i de Protonedimension stattfindet, während d Cholestoff- und Stickstoffdimensione besser ufglöst sind.

Breiti Spektre sind au im Fall vo de reversible Lysozymfibrille beobachtet worde, wo im Kapitel 10 präsentiert werded. Relaxationsmessige hend wiederum Ufschluss über di ver-schiedene Biträg zu de Liniebreiti chöne geh. Es het sich zeigt, das sowohl di homogen als au di inhomogen Liniebreiti ungewöhnlich gross sind. Das dütet druf hii, das d Fibrille dur extensive Polymorphismus charakterisiert sind, wo di einzelne Polymorph zuesätzlich hoch dynamisch sind.

Di verschiedene Projekt, wo i dere Arbet präsentiert werded, steled Beispiel dar, wie d Festkörper-NMR-Spektroskopie cha bruucht werde, zum komplexi Biomolekül undersueche. Im letschte Abschnitt werded d Chance und Limitierige vo de Festkörper-NMR als struk-turbiologische Technik diskutiert und sie wird andere Technike gegenübergestellt, speziell

de Röntgekristallographie, aber au de Kryoelektronemikroskopie und de computergstüzte Strukturvorhersag.

Zusammenfassung

In den letzten zehn bis 15 Jahren haben Entwicklungen in verschiedenen Aspekten die Festkörper-NMR-Spektroskopie zu einer wertvollen Technik im Bereich der Strukturbiologie gemacht. Stärkere Magneten (bis zu 28.2 T) haben sowohl die Empfindlichkeit der Experimente als auch die spektrale Auflösung gesteigert, was die Untersuchung immer grösserer und komplexerer Biomoleküle ermöglicht. Schnelles Drehen der Probe um den magischen Winkel (*magic-angle spinning*, kurz: MAS) mit Frequenzen über 100 kHz kann mittlerweile auch die starken Dipolarkopplungen zwischen Protonen und anderen Kernen zu einem Grad ausmitteln, der das Aufnehmen gut aufgelöster Protonenspektren erlaubt. Die gleichzeitige Kombination von Probenrotation und Radiowelleneinstrahlungen in der Festkörper-NMR eröffnet die Möglichkeit, verschiedene effektive Hamilton-Operatoren in verschiedenen Teilen eines Experimentes zu erzeugen, womit eine grosse und stetig wachsende Bandbreite an massgeschneiderten Pulssequenzen kreiert wird, welche in der Lage sind, selektiv Kerne miteinander zu korrelieren. Zu guter Letzt hat die Etablierung von Sedimentierung als Probenvorbereitungstechnik eine Vielzahl löslicher und nicht kristallisierbarer Proteine für die Festkörper-NMR zugänglich gemacht.

In Kapitel 1 werden die theoretischen Grundlagen für Festkörper-NMR-Experimente zusammengefasst. Dabei wird ein besonderer Schwerpunkt auf neuere Entwicklungen sowie Aspekte, die für die darauffolgenden Teile dieser Arbeit relevant sind, gelegt.

In den anschliessenden Kapiteln werden die biologischen Hintergründe über die biomolekularen Systeme, welche in den in dieser Arbeit präsentierten Projekte untersucht wurden, dargelegt sowie die verfügbare Literatur zusammengefasst. Die Systeme umfassen die bakterielle RNA-Helikase und Acetyltransferase TmcA (Kapitel 2), das nichtstrukturelle Protein 5A des Hepatitis-C-Virus (Kapitel 3), Membranproteine des SARS-CoV-2 (Kapitel 4) und

reversible Lysozymfibrillen (Kapitel 5).

Kapitel 6 umfasst die Charakterisierung des Apo-Zustandes von TmcA. Das Kapitel beginnt mit den Arbeiten, die notwendig waren, um TmcA als System für die Festkörper-NMR zu etablieren; dies sind das Klonieren des Konstrukts, die Aufreinigung des Proteins sowie die Sedimentierung. Ein wichtiger Aspekt in dieser Hinsicht war auch die Resonanzzuweisung, welche allerdings durch die Grösse des Proteins und damit verbundenen spektralen Überlapp limitiert war. Trotzdem konnten 84 von 671 Aminosäuren Schweratomresonanzen zugeordnet werden, was etwa 13% entspricht. Während die Resonanzzuweisung an ADP-gebundenem TmcA durchgeführt wurde, welches gut aufgelöste ^{13}C -detektierte Spektren lieferte, erlaubte die Sedimentierung auch die Analyse des nicht-kristallisierbaren Apo-Zustandes. Neben Änderungen in den chemischen Verschiebungen, welche im Helikaseteil des Proteins auftraten, waren die Resonanzen in den Spektren von Apo-TmcA auch deutlich breiter. Relaxationsmessungen zeigten, dass dieser Unterschied auf eine grössere inhomogenen Linienbreite zurückzuführen ist, was auf eine erhöhte strukturelle Heterogenität in Abwesenheit des gebundenen Nukleotids hinweist. Das könnte auch eine Erklärung sein, weshalb Kristallisierungsversuche fehlschlagen.

Kapitel 7 baut auf den Arbeiten an sedimentiertem TmcA, welche im vorherigen Kapitel beschrieben wurden, auf, um die Bindung verschiedener Arten von Liganden an TmcA zu studieren. Als Erstes wurde das diamagnetische Mg^{2+} in der aktiven Tasche der ATPase durch paramagnetisches Mn^{2+} und Co^{2+} ersetzt, um es im Protein zu lokalisieren, da das Metallion im Strukturmodell aus der Kristallographie nicht vorhanden ist. Paramagnetische Relaxationsbeschleunigungen (*paramagnetic relaxation enhancement*, kurz: PRE) wurden als Distanzbeschränkungen genutzt, um die Position des Metallions zu triangulieren, welche dann mittels Pseudokontaktverschiebungen bestätigt wurde. Das Metallion wird von konservierten Walkermotiv-Aminosäuren und dem β -Phosphat des Nukleotids koordiniert, was in Übereinstimmung mit Strukturen ähnlicher Proteine ist. Die PREs erlauben auch eine Abschätzung der Mn^{2+} -Elektronenrelaxationszeit. Des Weiteren wurde TmcA zusammen mit unterschiedlichen ATP-Analoga sedimentiert. Dies ermöglichte es, den ATP-Hydrolysezyklus sowohl aus der Perspektive des Proteins mit ^{13}C -detektierten, als auch aus jener des Nukleotids mit ^{31}P -detektierten Experimenten zu verfolgen. Zudem wurde auch die Bindung von RNA und Acetyl-Coenzym A an TmcA analysiert, von welchen man aus biochemischen Experimenten wusste, dass sie die ATP-Hydrolyse stimulieren. Tatsächlich wurden in den

NMR-Spektren nicht nur in der erwarteten Bindungsstelle Änderungen in den chemischen Verschiebungen beobachtet, sondern auch in der aktiven Tasche der ATPase.

Während die Festkörper-NMR-Messungen an bakteriell exprimiertem Tmca in 3.2-mm-Rotor durchgeführt wurden, behandeln die nächsten zwei Kapitel Proteine, welche durch zellfreie Synthese mit Weizenkeimextrakt hergestellt wurden. Die im Vergleich geringeren Ausbeuten sind besser kompatibel mit Protonendetektion in 0.7-mm-Rotoren bei schnellem MAS von 100 kHz. In Kapitel 8 werden weiterführende Arbeiten an NS5A des Hepatitis-C-Virus vorgestellt. Unsere Gruppe hatte bereits zuvor ein membranverankertes NS5A-Konstrukt, welches in Liposomen rekonstituiert wurde, für die Festkörper-NMR etabliert. Dies stellte die Basis für die Untersuchung der Daclatasvir-Bindung dar. Daclatasvir ist ein zugelassenes Medikament gegen Hepatitis C, welches auf NS5A abgerichtet ist. Spektren, die am stärksten verfügbaren Magnetfeld von 28.2 T aufgenommen wurden, zeigten, dass NS5A bereits in Abwesenheit von Daclatasvir als Gemisch zweier Zustände vorliegt, mit einer Haupt- und Nebenspezies. Dies könnte ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer sein. Wenn Daclatasvir bindet, verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der vormaligen Nebenspezies, welche dann annähernd 100% ausmacht. Die Verteilung von Änderungen der chemischen Verschiebungen auf der Kristallstruktur eines Monomers spricht dafür, dass das Dimer von asymmetrischer Natur ist.

Kapitel 9 führt die Diskussion viraler Membranproteine weiter, diesmal am Beispiel von SARS-CoV-2. Diese Proteine erwiesen sich als herausfordernde Systeme mit kurzen T_2' -Relaxationszeiten und breiten, kaum aufgelösten Spektren. Weitergehende Analysen zeigten, dass die Verbreiterung hauptsächlich in der Protonendimension stattfindet, während die Kohlenstoff- und Stickstoffdimensionen besser aufgelöst sind.

Breite Spektren wurden auch im Falle der reversiblen Lysozymfibrillen beobachtet, welche in Kapitel 10 präsentiert werden. Relaxationsmessungen konnten wiederum Aufschluss über die verschiedenen Beiträge zur Linienbreite geben. Es zeigte sich, dass sowohl die homogene als auch die inhomogene Linienbreite ungewöhnlich gross sind. Das deutet darauf hin, dass die Fibrillen durch extensiven Polymorphismus charakterisiert sind, wobei die einzelnen Polymorphe zudem hoch dynamisch sind.

Die verschiedenen Projekte, welche in dieser Arbeit präsentiert werden, stellen Beispiele dar, wie die Festkörper-NMR-Spektroskopie verwendet werden kann, um komplexe Biomoleküle zu untersuchen. Im letzten Abschnitt werden die Chancen und Limitationen der Festkörper-NMR als strukturelle biologische Technik diskutiert und sie wird anderen Methoden gegenübergestellt, insbesondere der Röntgenkristallographie, aber auch der Kryoelektronenmikroskopie und der computergestützten Strukturvorhersage.

Resumaziun

Ilis ultims diesch fin 15 onns, svilups en differents aspects han fatg la spectroscopia da resonanza magnetica nucleara (RMN) da corp solid ina tecnica preziosa en il sector da la biologia structurala. Magnets pli fermes (fin a 28.2 T) han augmentads tant la sensibilitad dals experiments sco la resoluziun dals spectrums quai che renda pussaivel l'examinaziun da moleculs pli gronds e complex. Rotaziun rapida enturn il angul magic (*magic-angle spinning*, curt e bun: MAS) cun frequenzas pli che 100 kHz è en cas d'eliminar las collaziuns dipolaras fermas tranter protons e auters nuschepls quai che permetta la mesiraziun da spectrums da protons bain resolvidas. La cumbinaziun da rotaziun da la prova ed irradiaziun simultana cun undas radioelectricas dat la pussaivladad da generar differents operators da Hamiltonian effectivs en differentas parts d'in experiment ch'èn capabels da correlar nuschepls en moda selectiva. A la fin finala, la stabilisaziun da la sedimentaziun sco tecnica da preparaziun per provas ha fatga accessibel l'RMN da corp solid per numerus proteins solvabels e betg cristallisabels.

En il chapitel 1, las basas teoreticas per experiments d'RMN da corp solid vegnan resumadas. In accent spezial vegn mess sin svilups pli novs ed aspects ch'èn relevants per las parts suandantas da questa lavur.

En ils chapitels suandants, ils funds biologics dals systems biomoleculars ch'èn vegnids examinads en projects preschentads en questa lavur, vegnids explitgads e la litteratura disponibla vegn resumada. Ils systems cumpiglian la helicasa d'acida ribonucleara bacteriala TmCA (chapitel 2), il protein nunstructural 5A dal virus da hepatitis C (chapitel 3), proteins da membrana dal coronavirus (chapitel 4) e fibrillas reversiblas da lisocim (chapitel 5).

Il chapitel 6 cumpiglia la characterisaziun dal stadi apo da TmCA. Il chapitel cumenza cun las lavurs ch'èn stadas necessariaras per etablir TmCA sco sistem per l'RMN da corp solid; quai è la clonaziun dal construct, la purificaziun dal protein e la sedimentaziun. In aspect impurtant en quel regard è stà er l'attribuziun da resonanzas ch'era limitada però tras la grondezza dal protein e la surposiziun spectrala che resultava da quai. Igl è tuttina stà pussaivel da chattar resonanzas dad 84 da 671 acids aminus, quai che correspunda a circa 13%. Entant che l'attribuziun da resonanzas è vegnida fatga en TmCA cun ADP, characterisà da spectrums cun auta resoluziun, la sedimentaziun permetta er d'analisar il stadi apo. Ultra da miadas da dischlocaziun chemica (*chemical-shift perturbation*, curt e bun: CSP) en la part helicasa dal protein, las resonanzas en ils spectrums dal stadi apo eran considerabla-main pli vastas. Mesiraziuns da relaxaziun han pussibilità da localisar questa differenza sin ina vastadad da lingia omogena pli gronda. Quai demussa ina eterogenitad structurala pli gronda en l'absenza dal nucleotid e po explitgar pertge ch'emprovas da cristallisaziun n'èn betg reussidas.

Il chapitel 7 sa basa sin las lavurs davart il protein sedimentà ch'è vegnì preschentà en il chapitel precedent per examinar ils effects dal liom da differents ligands. Sco emprim, il Mg^{2+} diamagnetic en il lieu d'activitad da l'ATPasa è vegnì remplazzà cun in Mn^{2+} ed in Co^{2+} paramagnetic per localisar la posiziun dadens il protein. Quest ion da metal ha mancà en il model da structura da la cristallografia. Rinforzaments paramagnetics da la relaxaziun (*paramagnetic relaxation enhancement*, curt e bun: PRE) èn vegnids duvrads sco restricziuns da distanza per triangular la posiziun dal ion da metal, quai ch'è vegnì confermada tras dischlocaziuns pseudocontacts. Il ion da metal è coordinà tras acids aminus conservads dal motiv Walker A ed il β -fosfat dal nucleotid, che correspunda a estructuras da proteïns sumegliants. Ils PREs han er permess da stimar il temp da relaxaziun dals electrons dal Mn^{2+} . Segunda, il protein è vegnì co-sedimentà cun differents analogs d'ATP. Quai ha pussibilità d'observar il ciclus d'idrolisa da la perspectiva dal protein cun experiments che detectan ils carbons e da la perspectiva dal nucleotid cun experiments che detectan ils fosfors. La finala, il liom d'acida ribonucleara e d'acetyl coencim A vegnì analisà, dal quals igl è enconuscent ch'els stimuleschan l'idrolisa. Interessantamain, las CSPs n'èn betg vegnidas observadas en la vischnanza d'il leu da liom spetgà, ma era en il leu d'activitad da l'ATPasa.

Entant che las mesiraziuns dal TmCA exprimì en bacterias èn vegnidas fatgas en roturs cun in diameter da 3.2 mm, ils proxims dus chapitels s'occupan cun proteïns ch'èn veg-

nids producids tras sintesa senza cellas cun extract da scherm da furment. Las racoltas pli pitschnas da questa tecnica èn pli cumpatiblas cun la detecziun da protons en roturs cun in diameter da 0.7 mm e MAS rapida cun in frequenza da 100 kHz. En il chapitel 8, lavurs cuntinuantas sur NS5A dal virus da hepatitis C vegnan preschentadas. Nossa gruppa ha gia etablì in construct d'NS5A ch'è ancra en la membrana. Quai è stà la basa per l'examinaziun dal liom da Daclatasvir, ch'è in medicament admiss cunter hepatitis C e che ha NS5A en mira. Spectras ch'èn vegnidas registradas sin il champ disponibel il pli ferm han mussà che gia en absenza da Daclatasvir, NS5A exista en duas stadis. I dat ina species principala ed ina species accessoria, forsa in equiliber dinamic enter in monomer ed in dimer. Il liom da Daclatasvir stabilisescha la species accessoria anteriura. La distribuziun da CSPs sin la structure da la cristallografia fa attent ad in dimer asimmetric.

Il chapitel 9 cuntinuescha la discussiun sin proteins da membrana virals, questa giada dal coronavirus. Quels proteins èn sa mussadas sco objects d'examinaziun pretensius, cun temps da relaxaziun T_2' curts e spectras cun mala resoluziun. Ulteriuras analisas han mussà ch'il schargiament ha lieu en emprima lingia en la dimensiun dals protons, entant ils dimensiuns dals carbons ed ils nitrogens èn megliers resolvads.

In vast spectrum han ins observà er en cas da fibrillas reversiblas da lisocim, che vegnan preschentadas en il chapitel 10. Mesiraziuns da relaxaziun sclereschan puspè las differentas contribuziuns a la vastadad da las lignias. Igl è sa mussà che tant la vastadad da las lignias omogena sco er la vastadad da las lignias inomogena èn ordvartamain grondas. Quai vul dir che las fibrillas èn characterisadas tras in polimorfissem extensiv e ch'ils individuals polimorfs èn en pli fermamain dinamics.

Ils different projects che vegnan preschentads en questa lavur èn exempels per l'applicaziun da l'RMN en corp solid per la retschertga da moleculs biologics complex. En las conclusiuns, las pussaivladas ed ils cunfins da questa tecnica sco instrument en la biologia structurala vegnan discutadas ed ella vegn contrastada cun auters metodos, surtut la cristallografia, ma era la microscopia crioelectronica e la predicziun da structuradas sustegnida dal computer.