

DISS. ETH NO. 27409

Solid-State NMR with ever faster Magic-Angle Spinning: Proton Linewidth, Protein Dynamics and Biomolecular Applications

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

ALEXANDER A. MALÄR

MSc Interdisciplinary Sciences, ETH Zuerich

born on 20.07.1993

Citizen of Switzerland and Austria

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Beat H. Meier

Prof. Dr. Roland Riek

Dr. Anja Böckmann

2021

Abstract

Over the last decades solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) has emerged as a powerful tool for structural, functional and dynamic studies of biomolecules and materials. In this context protons may provide particularly valuable information due to their potential of forming hydrogen bonds, contributing to thermodynamic stability, supramolecular assembling or molecular recognition (*e.g.* protein-DNA/RNA interactions). The incomplete averaging of large $^1\text{H} - ^1\text{H}$ dipolar couplings under magic-angle spinning (MAS) typically leads to broad spectral lines in proton-detected spectra. However, significant advances in spinning technology and access to spinning frequencies exceeding 100 kHz provide nowadays sufficient spectral resolution even in molecular systems with dense proton dipolar networks like fully protonated proteins, enabling practical applications. In this thesis we investigate both methodological and application aspects of proton-detected solid-state NMR in a spinning regime ranging from 60-170 kHz. Thereby, we will discuss the challenges and possibilities of this technique, whose constant evolution is driven by the access to ever faster spinning frequencies.

In the first part of this work we focus on the factors influencing resolution in proton-detected spectra and how it can be improved by going to faster MAS frequencies and higher magnetic field strengths. We report remarkable proton linewidth narrowing in the spectra of a series of fully protonated proteins when pushing with an 0.5 mm probe-head prototype the sample rotation frequency to 150 kHz compared to the more routinely used 100 kHz. Furthermore, we find an improvement in mass sensitivity by comparison with spectra recorded in an 0.7 mm rotor operating at 100 kHz, despite the reduction in sample volume by a factor of 0.52 (from 0.59 μL to 0.31 μL). We attribute this observation to higher coil efficiency, linewidth narrowing and improvements in polarization-transfer efficiency. Systematic experimental studies monitoring the homogeneous linewidths in fully protonated molecules over the MAS range 60-170 kHz reveal that the CH_2 resonances in the small drug molecule Meldonium and in two phosphorylated amino acids profit the most from an increase in spinning fre-

quency. To rationalize these findings we developed an alternative simulation method based on second-moment calculations to estimate the portion of the experimental linewidth that originates from the homonuclear dipolar network. Compared to conventional Liouville-von Neumann-based simulation programs, this second-moment approach is much less expensive and allows for performing calculations until convergence is reached also in large multi-spin systems. We established it on the model protein Ubiquitin and used it to prove that the Meldonium linewidth is indeed dominated by coherent dipolar effects and can thereby be improved significantly by faster spinning. Using this simulation approach we also illustrate how the proximity to CH_2 groups can be particularly detrimental, due to the typically small spatial and spectral distances between the ethyl protons generating large residual linewidth contributions. In light of these results we also understand the experimental linewidth differences observed for two H_2 -splitting products of Frustrated Lewis Pairs that we present as an example to illustrate the great potential of proton-detected solid-state NMR for structural studies of functionalized catalytic materials. Our linewidth simulations predict an additional coherent linewidth narrowing effect, when increasing the external magnetic field strength. We verify this prediction experimentally by comparing homogeneous proton linewidths in spectra of proteins and phosphorylated amino acids recorded at 20.0T (850 MHz) and 28.2T (1.2 GHz). Finally, we show how it is possible to obtain unprecedented resolution and almost baseline separation for the CH_2 resonances in *o*-phospho-L-serine, using a combination of 160 kHz MAS and 28.2T.

In the second part of this thesis we use the strength of solid-state NMR to experimentally investigate protein dynamics. Measuring longitudinal and rotating-frame relaxation rate constants and using a detectors approach for data analysis, we obtain information on residue-specific amplitudes of motion over the nanosecond, hundreds of nanoseconds and microsecond timescales. In a first study we characterize the dynamics of the hepatitis B virus capsid. In particular we find that it shows larger amplitudes of microsecond motion within the capsid spike. Thanks to the detectors approach we were able to extract similar information from a recently published 1 μs molecular dynamics (MD) trajectory. A comparison between NMR and MD data reveals overall good agreement for the faster nanosecond motions thereby experimentally validating the MD results, but larger discrepancies for the slower motions on the timescales approaching the end of the trajectory. For these timescales it is therefore advisable to mostly rely on the NMR results.

We also investigated the temperature dependence of the dynamics of the archaeal RNA poly-

merase subunit complex Rpo4-7 over the temperature range from 17°C to 60°. In addition to proving the stability of the molecule under these conditions we observed in particular rather small differences for the nanosecond motions but a large thermal activation of the slower microsecond motions with increasing temperature.

In a third part we explore different possibilities of using proton-detected solid-state NMR to study hydrogen bonding. We characterize asparagine ladder formation in HET-s(218-289) fibrils by using different spectral and relaxation properties of the NH₂ proton sidechain resonances. We use a ¹H – ³¹P correlation experiment to generate protein-nucleotide correlation signals, proving spatial proximity and describing on a local level the nucleotide binding modes of the ATP-hydrolysis transition state in the bacterial DnaB helicase in complex with DNA. Finally, we use the temperature dependence of the proton chemical shifts as a direct proof for hydrogen bond formation. We extend this approach known from solution-state NMR to the solid-state using o-phospho-L-serine and ubiquitin as model compounds and apply it to further elucidate the protein-nucleotide interactions of the DnaB helicase.

In the remaining chapters we characterize the performance of basic polarization transfer steps like spin-diffusion, INEPT and cross polarization and comment on the feasibility and potential of five-dimensional SO-APSY in the fast MAS regime. We show how a specific arginine labeling scheme can be used in combination with spin diffusion and non-refocused INEPT transfers to investigate the highly flexible C-terminal domain of the full-length HBV capsid, which has so far always escaped detection in conventional carbon and proton-detected NMR. Finally, we show some additional biomolecular applications of state-of-the-art proton-detected NMR. In particular we show techniques that can be used to probe protein side-chain-DNA contacts in the archaeal primase pRN1 and discuss preliminary fingerprint spectra of the prion sup35 and the hepatitis D virus antigen proteins.

Sommario

Nel corso degli ultimi decenni la risonanza magnetica nucleare (RMN) allo stato solido è emersa come un potente strumento per studi strutturali, funzionali e dinamici di biomolecole e materiali. In questo contesto, protoni forniscono informazioni particolarmente preziose, grazie al loro potenziale di formare legami idrogeno, contribuendo alla stabilità termodinamica, all'assemblaggio supramolecolare o al riconoscimento molecolare (*e.g.* interazioni proteina-DNA/RNA). L'incompleta eliminazione dell'anisotropia delle interazioni dipolari $^1\text{H} - ^1\text{H}$ sotto rotazione all'angolo magico (MAS) conduce a delle larghe righe spettrali in spettri basati su deteazione protonica. Tuttavia, progressi significativi nella tecnologia di rotazione e l'accesso a frequenze di rotazione superiori ai 100 kHz forniscono oggi una sufficiente risoluzione spettrale persino in sistemi molecolari con dense reti d'interazioni dipolari protoniche come per esempio proteine completamente protonate, aprendo così la via per applicazioni pratiche. In questa tesi investigheremo sia aspetti metodologici che d'applicazione legati alla deteazione protonica nella RMN allo stato solido per frequenze di rotazione comprese nell'intervallo da 60 a 170 kHz. Quindi discuteremo le sfide e opportunità di questa tecnica, la cui costante evoluzione è guidata dall'accesso a frequenze di rotazione sempre più elevate.

Nella prima parte di questo lavoro ci concentriamo sui fattori influenzanti la risoluzione in spettri ottenuti con deteazione protonica e come quest'ultima può essere migliorata utilizzando frequenze di rotazione più rapide e intensità di campi magnetici più alte. Riportiamo un notevole restringimento della larghezza delle righe protoniche in spettri di una serie di proteine completamente protonate ottenuto spingendo con un prototipo di sonda 0.5 mm la frequenza di rotazione del campione dagli abitualmente utilizzati 100 kHz a 150 kHz. Inoltre, rileviamo mediante una comparazione con spettri registrati in una sonda 0.7 mm operante a 100 kHz un miglioramento della sensitività di massa, nonostante un fattore di riduzione del volume di campione del 0.52 (da 0.59 μL a 0.31 μL). Attribuiamo questa osservazione a una più elevata efficienza di bobina, al restringimento delle righe spettrali e a un miglioramento

delle efficienze di trasferimento di polarizzazione. Studi sistematici monitoranti la larghezza di risonanza omogenea in funzione delle frequenza MAS nell'intervallo 60-170 kHz rivelano che le risonanze CH_2 nella piccola molecola farmacologica Meldonio e in due aminoacidi fosforilati traggono maggior profitto da un aumento della frequenza di rotazione. Per razionalizzare questi risultati abbiamo sviluppato un metodo di simulazione alternativo basato sul calcolo di secondi momenti per stimare la porzione della larghezza di riga sperimentale che proviene dalla rete dipolare omonucleare. Questo approccio basato sui secondi momenti è molto meno costoso computazionalmente se comparato a tradizionali programmi di simulazione basati sulla soluzione numerica dell'equazione di Liouville-von Neumann e permette di effettuare calcoli fino al raggiungimento della convergenza anche in grandi sistemi multi spin. Abbiamo validato il metodo sulla proteina modello Ubiquitina e in seguito lo abbiamo utilizzato per dimostrare che le larghezze di riga in Meldonio sono di fatti dominate da effetti dipolari coerenti e che di conseguenza possono essere migliorati significativamente ruotando più velocemente. Usando questo approccio di simulazione illustriamo inoltre come la vicinanza a gruppi CH_2 può essere particolarmente dannosa a causa delle piccole distanze spaziali e spettrali tra i protoni etilici generanti grandi contributi residuali alla larghezza di riga. Alla luce di questi risultati comprendiamo anche la differenza tra le larghezze di riga sperimentali osservati per due prodotti di scissione H_2 di copie di Lewis frustrate che presentiamo come esempio per illustrare il grande potenziale della detezione protonica in RMN allo stato solido per studi strutturali e funzionali di materiali catalitici. Le nostre simulazioni di larghezza di riga predicono un ulteriore effetto di restringimento per il contributo coerente, ottenuto aumentando la forza del campo magnetico esterno. Verifichiamo sperimentalmente questa predizione comparando le larghezze di riga protonica omogenee in spettri di proteine e aminoacidi fosforilati registrati a 20.0 T (850 MHz) e 28.2 T (1.2 GHz). Infine mostriamo com'è possibile ottenere un'inedita risoluzione e pressoché separazione al livello della linea di base per le risonanze CH_2 in o-phospho-L-serina usando una combinazione di 160 kHz MAS e 28.2 T.

Nella seconda parte di questa tesi utilizziamo la forza della RMN allo stato solido per investigare sperimentalmente la dinamica proteica. Misurando costanti di velocità di rilassamento longitudinali e nel sistema di riferimento rotante e utilizzando un approccio basato su rilevatori dinamici per l'analisi dati, otteniamo informazioni su ampiezze di movimento al livello di singoli residui amminoacidici sulle scale temporali di nanosecondi, centinaia di nanosecondi e microsecondi. In un primo studio caratterizziamo le dinamiche del capsido

del virus dell'epatite B. In particolare rileviamo grandi ampiezze di movimenti microsecondi all'interno delle punte del capsido. Grazie all'approccio dei rilevatori abbiamo potuto estrarre informazioni simili da una traiettoria di dinamica molecolare (MD) pubblicata recentemente. Una comparazione tra dati RMN e MD rileva in generale un buon accordo per i più veloci movimenti sulla scala di nanosecondi, validando in questo modo sperimentalmente i risultati di MD, ma più grandi discrepanze per i movimenti più lenti sulle scale temporali vicino alla fine della traiettoria. Per queste scale temporali è dunque conveniente riferirsi soprattutto ai risultati RMN. Abbiamo inoltre investigato la dipendenza termica delle dinamiche di Rpo4-7, un complesso di due sottounità di una RNA polimerasi archaea, in un intervallo di temperature da 17°C a 60°C. Oltre a dimostrare la stabilità della proteina sotto queste condizioni, osserviamo in particolare piccole differenze per i movimenti sulla scala dei nanosecondi ma una grande attivazione termica con l'aumento della temperature dei movimenti più lenti sulla scala dei microsecondi.

In una terza parte esploriamo le differenti possibilità di utilizzare detezione protonica in RMN allo stato solido per studiare legami idrogeno. Caratterizziamo la formazione di scale di asparagine in fibrille di HET-s(218-289) usando differenti proprietà spettrali e di rilassamento delle risonanze dei protoni delle catene laterali NH₂. Usiamo un esperimento di correlazione ¹H – ³¹P per generare segnali correlanti proteina e nucleotidi, provando prossimità spaziali e descrivendo su un livello locale le modalità di legame dei nucleotidi nello stato di transizione dell'idrolisi di ATP nell'elicasi batterica DnaB in complesso con DNA. Infine, utilizziamo la dipendenza termica degli spostamenti chimici protonici come una diretta prova per la formazione di legami idrogeno. Estendiamo questo approccio conosciuto dalla RMN allo stato liquido alla RMN allo stato solido, usando o-phospho-L-serina e Ubiquitina come sostanze modello e lo utilizziamo per delucidare ulteriormente le interazioni proteina-nucleotidi nell'elicasi DnaB.

Nei rimanenti capitoli caratterizziamo la prestazione di step di trasferimento di polarizzazione basilari come la diffusione di spin, INEPT e cross polarizzazione e commentiamo la fattibilità e potenziale di esperimenti SO-APSY cinque dimensionali nel regime di MAS rapido. Mostriamo come uno schema di marcatura isotopica specifica delle arginine può essere utilizzato in combinazione con diffusione spin e trasferimenti INEPT non rifocalizzati per investigare l'altamente flessibile dominio C-terminale della capsido integrale del virus dell'epatite B, che finora è sempre sfuggito alla rivelazione con convenzionali metodi

RMN di detezione carbonica e protonica. Infine, presentiamo alcune ulteriori applicazioni biomolecolari utilizzando detezione RMN protonica all'avanguardia. In particolare mostriamo tecniche che possono essere utilizzate per provare contatti tra catene laterali proteiche e DNA nella primasi archaea pRN1 e discutiamo spettri d'impronta digitale preliminari del prione sup35 e delle proteine antigeniche del virus dell'epatite D.

Zusammenfassung

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich die Festkörper Kernmagnetresonanzspektroskopie (NMR) zu einem starkem Werkzeug für strukturelle, funktionale und dynamische Untersuchungen von Biomolekülen und Materialien entwickelt. In diesem Kontext können Protonen besonders wertvolle Informationen liefern, insbesondere aufgrund ihres Potentials Wasserstoffbrücken zu bilden, welche zur thermodynamischen Stabilität, zu supramolekularen Verbindungen oder zu molekularen Erkennungsprozessen beitragen (*e.g.* protein-DNA/RNA Interaktionen). Die inkomplette Ausmittlung der grossen $^1\text{H} - ^1\text{H}$ dipolaren Wechselwirkungen unter Drehung im Magischen Winkel (MAS) führt typischerweise zu sehr breiten spektralen Linien in protonen-detektierten Spektren. Bedeutende Fortschritte in der Drehtechnologie und Zugang zu Drehfrequenzen jenseits von 100 kHz liefern heutzutage jedoch sogar für molekulare Systeme mit dichten Protonennetzwerken wie zum Beispiel voll-protonierte Proteine genügend spektrale Auflösung und ermöglichen dadurch praktische Anwendungen. In dieser Dissertation untersuchen wir sowohl methodologische als auch Anwendungsaspekte von proton-detektierter Festkörper NMR in einem Drehfrequenzintervall zwischen 60-170 kHz. Dabei werden wir die Herausforderungen und Möglichkeiten dieser Technik diskutieren, deren konstante Entwicklung vom Zugang zu immer schneller werdenden Drehfrequenzen angetrieben wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit konzentrieren wir uns auf die Faktoren, welche die Auflösung in protonen-detektierten Spektren beeinflussen und wie diese verbessert werden kann, indem man zu schnelleren MAS Frequenzen und höheren Magnetfeldstärken geht. Wir berichten über eine bemerkenswerte Verringerung der Protonenlinienbreiten in einer Serie von Spektren von voll-protonierten Proteinen, die wir erhalten, indem wir mit einem Prototyp eines 0.5 mm Probenkopfs die Probendrehgeschwindigkeit von den routinemässig benutzten 100 kHz auf 150 kHz erhöhen. Ausserdem finden wir mittels eines Vergleichs mit Spektren, welche in einem 0.7 mm Rotor bei 100 kHz gemessen wurden, eine Verbesserung der Massensensitivität, trotz einer Verringerung des Probevolumens um einen Faktor von

0.52 (von 0.59 μL zu 0.31 μL). Wir führen diese Beobachtung auf eine erhöhte Spuleneffizienz, Linienbreitenverschmälerung und eine Verbesserung der Polarisationsstransfereffizienzen zurück. Systematische experimentelle Studien, welche die homogenen Linienbreiten in voll-protonierten Molekülen über einen MAS Bereich von 60-170 kHz überwachen, offenbaren, dass die CH_2 Resonanzen im kleinen Arzneimolekül Meldonium und in zwei phosphorylierten Aminosäuren am meisten von einer Erhöhung der Drehfrequenz profitieren. Um diese Ergebnisse zu rationalisieren haben wir eine alternative Simulationsmethode entwickelt, welche auf der Berechnung von zweiten Momenten basiert, um den Anteil der experimentellen Linienbreiten abzuschätzen, welcher vom homonuklearen dipolaren Netzwerk stammt. Verglichen mit konventionellen Liouville-von Neumann-basierten Simulationsprogrammen, weist dieser zweite-Momente Ansatz einen erheblich geringeren Rechenaufwand auf und erlaubt sogar in grossen Multi-Spinsystemen Berechnungen bis zum Erreichen der Konvergenz durchzuführen. Wir haben die Methode am Modellprotein Ubiquitin etabliert und benutzen sie, um zu zeigen, dass in der Tat die Linienbreiten in Meldonium durch kohärente dipolare Effekte dominiert sind und dadurch signifikant durch schnelleres Drehen verbessert werden können. Mittels dieses Simulationsansatzes illustrieren wir, wie die Nähe zu CH_2 Gruppen besonders nachteilig sein kann, da die typischerweise kleinen räumlichen und spektralen Abstände zwischen den Ethylprotonen grosse restliche Linienbreitenbeiträge generieren können. Angesichts dieser Ergebnisse verstehen wir ebenfalls die experimentellen Linienbreitenunterschiede, die wir für zwei H_2 -Spaltprodukte von frustrierten Lewis Paaren beobachtet haben, welche wir als Beispiel präsentieren, um das grosse Potential von protonen-detektierter Festkörper NMR für strukturelle Studien von funktionalisierten katalytischen Materialien zu illustrieren. Unsere Lineinbreitensimulationen sagen ebenfalls einen zusätzlichen kohärenten Linienbreitenverschmälerungseffekt voraus, welcher eintritt, wenn die externe Magnetfeldstärke erhöht wird. Wir belegen experimentell diese Vorhersage, indem wir die homogenen Linienbreiten in Spektren von Proteinen und phosphorylierten Aminosäuren, welche bei 20.0 T (850 MHz) und 28.2 T (1.2 GHz) aufgenommen wurden, vergleichen. Schliesslich zeigen wir, wie es möglich ist eine bisher beispiellose Auflösung und beinahe Basislinienseparation für die CH_2 Resonanzen in O-phospho-L-serin durch eine Kombination von 160 kHz MAS und 28.2 T, zu erreichen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit benutzen wir die Stärke von Festkörper NMR, um experimentell Proteindynamik zu untersuchen. Durch Messung von longitudinalen Relaxation-

sraten und Relaxationsraten im rotierenden Koordinatensystem in Verbindung mit einem Detektoransatz für die Datenanalyse, bekommen wir restspezifische Informationen über Bewegungsamplituden auf den Nanosekunden, hunderte von Nanosekunden und Mikrosekunden Zeitskalen. In einer ersten Studie charakterisieren wir die Dynamik vom Hepatitis B Viruskapsid. Insbesondere beobachten wir besonders grosse Bewegungsamplituden auf der Mikrosekundenskala innerhalb der Kapsidspitzen. Dank des Detektoransatzes konnten wir ähnliche Informationen aus einer kürzlich publizierten Molekulardynamik (MD)-Trajektorie extrahieren. Ein Vergleich zwischen den NMR und MD Daten offenbart eine gute Übereinstimmung für die schnelleren Nanosekundenbewegungen, was dadurch experimentell die MD Resultate validiert. Wir beobachten hingegen grössere Diskrepanzen für die langsameren Bewegungen auf den Zeitskalen, welche sich dem Ende der Trajektorie nähern. Für diese Zeitskalen ist es deswegen ratsam sich hauptsächlich auf die NMR Resultate zu verlassen. Wir haben ebenfalls die Temperaturabhängigkeit der Dynamik im archaealen RNA Polymerase Untereinheitenkomplex Rpo4-7 über einen Temperaturbereich von 17°C bis 60°C untersucht. Zusätzlich zum Nachweis der Molekülstabilität unter diesen Bedingungen, beobachten wir mit steigender Temperatur insbesondere kleinere Unterschiede in den Nanosekundenbewegungen aber eine grosse thermale Aktivierung der langsameren Mikrosekundenbewegungen.

In einem dritten Teil erforschen wir verschiedene Möglichkeiten, um protonen-detektierte Festkörper NMR zu benutzen, um Wasserstoffbrückenbindungen zu untersuchen. Wir charakterisieren die Bildung von Asparaginleitern in HET-s(218-289) Fibrillen, indem wir verschiedene Spektrale- und Relaxationseigenschaften der NH_2 Protonenseitenkettenresonanzen benutzen. Wir verwenden ein $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ Korrelationsexperiment, um Protein-Nukleotid-korrelationssignale zu generieren, welche räumliche Nähe nachweisen und auf einem lokalen Niveau die Nukleotidbindungsmoden im ATP-Hydrolyse Übergangszustand der bakteriellen Helikase DnaB im Komplex mit DNA beschreiben. Schliesslich benutzen wir die Temperaturabhängigkeit der Protonen chemischen Verschiebungen als direkter Nachweis für Wasserstoffbrückenbildung. Wir erweitern diesen Ansatz der Flüssig NMR auf den festen Zustand, indem wir O-phospho-L-serin und Ubiquitin als Modellsubstanzen benutzen und wenden ihn an, um weiter die Protein-Nukleotidinteraktionen in der DnaB Helikase aufzuklären.

In den verbleibenden Kapiteln charakterisieren wir die Leistung von grundlegenden Polar-

isationstransferschritten wie zum Beispiel Spin-Diffusion, INEPT und Kreuzpolarisation und wir kommentieren die Möglichkeiten und das Potential von fünf-dimensionalem SO-APSY im schnellen MAS Regime. Wir zeigen wie eine spezifische Isotopenmarkierung der Arginine in Kombination mit Spin-Diffusion und nicht-refokussierten INEPT Transfers benutzt werden kann, um die höchstflexible C-terminale Domäne des gesamten Hepatitis B Viruskapsid zu untersuchen, welche bisher noch nie mit konventioneller Kohlenstoff- und protonen-detektierter NMR nachgewiesen werden konnte. Schlussendlich präsentieren wir ein paar zusätzliche biomolekulare Anwendungen von moderner protonen-detektierter NMR. Insbesondere zeigen wir Techniken mittels denen man Protein-Seitenketten-DNA Kontakte in der archaealen pRN1 Primase untersuchen kann und wir diskutieren erste Fingerabdruckspektren des Prions sup35 und der Antigen-Proteine des Hepatitis D Virus.

Résumé

Au cours des dernières décennies la résonance magnétique nucléaire (RMN) du solide a émergé comme un puissant instrument pour l'étude structurale, fonctionnel et dynamique de biomolécules et de matériaux. Dans ce contexte les protons fournissent des informations particulièrement précieuses, grâce à leur capacité à former des liaisons hydrogène, contribuant à la stabilité thermodynamique, à l'assemblage supramoléculaire et à la reconnaissance moléculaire (ex: interactions protéine-ADN/ANR). L'élimination incomplète de l'anisotropie des interactions dipolaires $^1\text{H} - ^1\text{H}$ sous la rotation à l'angle magique (MAS) conduit à de larges raies spectrales dans les spectres basés sur la détection proton. Toutefois, des progrès significatifs dans la technologie de la rotation et l'accès à des fréquences de rotation au-dessus des 100 kHz fournissent aujourd'hui une résolution spectrale suffisante même dans systèmes moléculaires avec des denses réseaux d'interactions dipolaires proton comme par exemple les protéines complètement protonées, ouvrant ainsi la voie aux applications pratiques. Dans cette thèse nous examinerons les aspects méthodologiques ainsi que les applications liées à la détection proton en RMN du solide pour des fréquences de rotation comprises entre 60 et 170 kHz. Ainsi nous discuterons des défis et des opportunités de cette technique, dont la constante évolution est dirigée par l'accès à des fréquences de rotations toujours plus élevées.

Dans la première partie de ce travail nous nous sommes concentrés sur les facteurs qui influencent la résolution des spectres obtenus avec une détection proton et comment cette dernière peut être améliorée en utilisant des fréquences de rotation plus rapides et des intensités des champs magnétiques plus hautes. Nous observons un impressionnant rétrécissement de la largeur des raies proton dans les spectres d'une série des protéines complètement protonées obtenus en poussant la fréquence de rotation de l'échantillon avec un prototype de sonde 0.5 mm de 100 kHz à 150 kHz. En outre, nous constatons par comparaison avec des spectres enregistré avec une sonde 0.7 mm à 100 kHz une amélioration de la sensibilité de masse malgré un facteur de réduction du volume de l'échantillon

de 0.52 (de 0.59 μL à 0.31 μL). Nous attribuons cette observation à une efficacité plus élevée de la bobine, au rétrécissement des raies spectrales et à une amélioration de l'efficacité des transferts de polarisation. L'étude systématique de la largeur de résonance homogène en fonction de la fréquence MAS dans l'intervalle 60-170 kHz révèlent que les résonances CH_2 dans la petite molécule pharmacologique Meldonium et dans deux acides aminés phosphorylés profitent le plus d'une augmentation de la fréquence de rotation. Pour rationaliser ces résultats nous avons développé une méthode de simulation alternative basée sur le calcul des deuxièmes moments pour estimer la portion de la largeur de raie expérimentale qui provient du réseau dipolaire homonucléaire. Cette approche basée sur les deuxièmes moments est beaucoup moins coûteuse computationnellement comparé aux traditionnels programmes de simulation basés sur la simulation numérique de l'équation de Liouville-von Neumann et permet d'effectuer les calculs jusqu'à atteindre la convergence même dans de grands systèmes multi spin. Nous avons validé la méthode sur la protéine modèle de l'Ubiquitine par la suite nous l'avons utilisé pour démontrer que les largeurs de raie du Meldonium sont en fait dominées par les effets dipolaires cohérents et par conséquent peuvent être améliorées significativement en tournant plus rapidement. En utilisant cette approche de simulation nous illustrons aussi comment la proximité des groupes CH_2 peut être particulièrement dommageable à cause des petites distances spatiales et spectrales entre les protons éthyliques créant de grandes contributions résiduelles à la largeur de raie. À la lumière de ces résultats nous comprenons aussi les différences entre les largeurs de raie expérimentales observées pour deux produits de scission H_2 de paires de Lewis frustrées que nous présentons à titre d'exemple pour illustrer le grand potentiel de la détection proton en RMN du solide dans l'étude structurale et fonctionnel de matériaux catalytiques. Nos simulations de largeur de raie prédisent un effet supplémentaire de rétrécissement pour la contribution cohérente, obtenue en augmentant la force du champ magnétique extérieur. Nous vérifions expérimentalement cette prédiction en comparant les largeurs de raie proton homogènes dans des spectres de protéines et d'acides aminés phosphorylés enregistrés à 20.0 T (850 MHz) et à 28.2 T (1.2 GHz). Enfin nous montrons comment il est possible d'obtenir une résolution inédite et presque une séparation au niveau de la ligne de base pour les résonances CH_2 dans o-phospho-L-serine en utilisant la combinaison de 160 kHz MAS et 28.2 T.

Dans la deuxième partie de cette thèse nous utilisons la puissance de la RMN du solide pour étudier expérimentalement la dynamique des protéines. En enregistrant les constantes de

relaxation longitudinale ainsi que les constantes de relaxation dans le repère tournant et en utilisant une approche basée sur des détecteurs dynamiques pour l'analyse des données, nous obtenons des informations sur les amplitudes de mouvement au niveau de résidus d'acide aminé individuels sur l'échelle de temps des nanosecondes, centaines des nanosecondes et microsecondes. Dans une première étude nous caractérisons la dynamique de la capsidite du virus de l'hépatite B. En particulier nous constatons de grandes amplitudes de mouvement à l'échelle des microsecondes dans les pointes de la capsidite. Grâce à l'approche des détecteurs nous avons pu extraire des informations similaires d'une trajectoire de dynamique moléculaire (DM) publiée récemment. Une comparaison des données de RMN et DM révèle en générale un bon accord pour les mouvements plus rapides sur l'échelle des nanosecondes, validant de cette façon expérimentalement les résultats de DM. Mais de plus grands écarts sont observés pour les mouvements plus lents sur l'échelle temporelle proches de la fin de la trajectoire. Pour ces échelles temporelles c'est donc convenable de s'appuyer surtout sur les résultats RMN. Nous avons aussi étudié la dépendance thermique de la dynamique de Rpo4-7, un complexe de deux sous-unités d'une ANR polymérase d'archaea, dans un intervalle de température entre 17°C et 60°C. En plus de démontrer la stabilité de la protéine sous ces conditions, nous observons en particulier de petites différences pour les mouvements à l'échelle des nanosecondes mais une grande activation thermique avec l'augmentation de la température des mouvements plus lents sur l'échelle des microsecondes.

Dans une troisième partie nous explorons les différentes possibilités de l'utilisation de la détection proton en RMN du solide pour étudier les liaisons hydrogène. Nous caractérisons la formation des échelles d'asparagines dans les fibrilles de HET-s(218-289) en utilisant diverses propriétés spectrales ainsi que la relaxation de résonance des protons NH_2 dans les chaînes latérales. Nous utilisons une expérience de corrélation $^1\text{H} - ^{31}\text{P}$ pour créer des signaux corrélant protéine et nucléotides, prouvant une proximité spatiale et décrivant à un niveau locale les modalités de liaison des nucléotides dans l'état de transition de l'hydrolyse de ATP dans l'hélicase bactérienne DnaB en complexe avec l'ADN. Enfin, nous utilisons la dépendance thermique des déplacements chimiques proton comme preuve directe de la formation des liaisons hydrogène. Nous étendons cette approche connue de la RMN du liquide à la RMN du solide en utilisant o-phospho-L-serine et l'Ubiquitine comme substances modèle, nous l'utilisons aussi pour éclaircir ultérieurement les interactions protéine-nucléotide dans l'hélicase DnaB.

Dans les derniers chapitres nous caractérisons l'efficacité des étapes basilaire de transfert de polarisation comme la diffusion de spin, l'INEPT et la polarisation croisée et nous discutons de la faisabilité et du potentiel des expériences SO-APSY en cinq dimensions dans le régime de MAS rapide. Nous montrons comment un système de marquage isotopique spécifique aux arginines peut être utilisé pour étudier le domaine C-terminal hautement flexible de la capsid complète du virus de l'hépatite B, laquelle a jusqu'à maintenant échappé à la détection par des méthodes conventionnels de détection carbon et proton. Enfin, nous présentons d'autres applications biomoléculaires utilisant la RMN du solide et la détection proton à la pointe de la technologie. En particulier nous montrons des techniques qui peuvent être utilisées pour sonder les contacts entre les chaînes latérales de la protéine et l'ADN dans la primase d'archaea pRN1 et nous discutons des spectres préliminaires d'empreinte digitale du prion sup35 et des protéines antigéniques du virus de l'hépatite D.