



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Application of fragment-based drug discovery to membrane proteins Früh, V.

Citation

Früh, V. (2009, October 7). *Application of fragment-based drug discovery to membrane proteins*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/14047>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/14047>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Summary
Sammenvatting
Résumé

Summary

This thesis describes how the Target Immobilized NMR Screening (TINS) method can be applied to identify small molecule hits on membrane proteins.

Screening small molecules, or fragments (< 300 Da), by fragment-based drug discovery (FBDD) has recently been shown to be an advantageous alternative to screening larger molecules, yet the concept is limited to soluble proteins. **Chapter 1** introduces the notion of FBDD and why it would be useful to find ways of applying this drug discovery approach to membrane proteins. In brief, FBDD has evolved with biophysical methods such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR) because of the possibility of detecting weak binding of fragments on proteins. However, biophysical methods are demanding in terms of amount and purity of protein samples and, unfortunately, are currently limited to soluble proteins. 60 % of the drugs on the market however target membrane proteins which are involved in a variety of crucial cellular processes ranging from cell signaling to transport of ions and solutes in and out of the cell. As the name indicates, membrane proteins are present within the cellular membrane and require a hydrophobic environment to maintain their structure and functionality. **Chapter 2** reviews the extensive work carried out on immobilizing membrane proteins in a variety of membrane mimics, and shows that none of them are applicable to studying weak fragment binding on membrane proteins. It is precisely this hydrophobic nature which limits the study of such proteins by FBDD due to the low protein yield and stability, and the problem of non-specific binding of fragments to the membrane mimics used, such as detergents or lipids.

TINS is a reference system where the simultaneous screening of a reference protein (with minimal small molecule binding properties), solubilized in the same detergent as the target, can account for non-specific binding of fragments to the hydrophobic environment. Identification of fragments which bind specifically to the target can be done immediately without any deconvolution, by simple comparison of the 1D ^1H signal intensities of the fragments in the presence of the reference or target. This has the advantage over other NMR methods because no

structural information on the target is required, low amounts of protein are needed, and binders can be identified within cocktails of fragments, speeding up the process.

In **Chapter 3**, we showed that important pharmaceutical targets such as G protein coupled receptors (GPCRs) could in principle be studied by TINS due to their functional immobilization on a resin in a variety of biologically relevant agonist and antagonist conformations. This was possible because native membrane fragments of the cells overexpressing these proteins were immobilized, without further purification. This enabled the co-immobilization of other important players of the signaling cascade, such as G proteins. The low population of functionally immobilized proteins could be increased by increasing the linker length between the protein and the surface, yet the intrinsically low overexpression of these proteins was the limiting factor which prevented us from applying TINS to this class of proteins.

In **Chapter 4**, we proved the principle that membrane proteins in general could be applied to TINS. We used the bacterial potassium ion channel (KcsA) and the bacterial membrane enzyme Disulphide bond forming protein B (DsbB) as targets, which were immobilized and screened with the bacterial reference protein Outer membrane protein A (OmpA), all solubilized in dodecylphosphocholine detergent. The immobilization efficiency of all three membrane proteins was calculated by detecting the amount of protein in the supernatant before and after immobilization, with a constant yield of 50 % for all three proteins. The functionality of KcsA and DsbB was tested by using a known binder at various points of the screen. DsbB was further tested for functionality by a robust enzymatic assay which detects oxidation of the electron donor DsbA, a soluble partner protein, or the reduction of the electron acceptor, the synthetic cofactor ubiquinone-5, also named coenzyme Q1 (UQ1). The fragment mixtures were void of detergent, in order to limit hydrophobic interactions between fragments and detergent micelles. However, detergent was required at a concentration equivalent to 5 x the critical micelle concentration, below which the detergent micelles would dissociate into monomers and eventually cause loss of protein conformation and hence, functionality. These optimal conditions allowed us to carry out a small test screen of 100 fragments on KcsA and a full screen of 1000 fragments on DsbB, both leading to a 7 % hit rate.

TINS is an NMR method which enables to identify fragment hits on a target protein, but these hits should be further characterized for their potency and mode of action, as was carried out for DsbB in **Chapter 5**. Enzymatic assays were used to determine the potency range of the fragments, along with their mode of action. Bidimensional NMR experiments were used to identify which residues of the protein were affected upon titration of the fragments, such as those in proximity of DsbA or UQ1 binding sites on DsbB. Wildtype DsbB was too unstable to be studied by NMR, but a stabilized mutant from a physiologically relevant intermediate state of DsbB was used and resulted in the confirmation of the binding modes established by enzymatic assays. This suggested that the results found were not artefacts and that the fragments were binding specifically to DsbB. The final 8 fragments, with potencies ranging between 10 to 200 μM (IC_{50} values), were thus classified into two groups. The first group, containing 3 fragments, consisted of competitive inhibitors for the endogenous ubiquinone binding site of the enzyme. These fragments therefore inhibited UQ1 binding and subsequent electron transfer from DsbA to the respiratory chain. The second group, containing 5 fragments, represented mixed model inhibitors which inhibited both UQ1 and DsbA binding by binding in an alternative site to the first class of fragments. The existence of two binding modes provides exciting perspectives in chemically linking or elaborating these diverse fragment scaffolds from these two different groups into more potent and more selective DsbB inhibitors.

Chapter 6 demonstrates how an alternative solubilization technique enabled TINS in aqueous buffers, completely void of detergents. The proteins were encapsulated into a bilayer stabilized by an amphiphilic membrane scaffold protein in a complex called the nanodisc which was entirely soluble in aqueous buffers. We demonstrated here that nanodisc embedded DsbB, as opposed to detergent solubilized DsbB, was more active in enzymatic assays, was immobilized at a higher efficiency, and was stable throughout the test screen of 180 fragments. Furthermore, 18 of the 19 fragments which showed high DsbB inhibition in **Chapter 5** were also identified as hits in the nanodisc embedded DsbB screen, suggesting that TINS is a repeatable method. Empty nanodiscs were used as a reference system to account for the non-specific binding of fragments to the nanodisc environment. The advantages of using nanodiscs in TINS are numerous, as they

alleviate the need to produce, solubilize, and immobilize a reference protein, they are more stable, and make it easier to handle membrane proteins in the absence of detergents.

Finally, **Chapter 7** describes the conclusions and perspectives of this thesis. The results of this thesis show that TINS can be applied to a variety of membrane proteins, such as ion channels and membrane enzymes. The fragment hits identified for DsbB were characterized as inhibitors in the micromolar range and could be identified with different solubilized states of the enzyme. The use of nanodisc embedded targets enables one to screen a target in aqueous buffers with empty nanodiscs as a good standardized reference. These results, combined with the new methods for overexpression and thermostable mutagenesis should provide exciting new possibilities which may extend beyond the identification of fragments binding to membrane proteins. These include the identification of protein-protein or drug-drug interactions, depending on what one chooses to immobilize or inject in the place of proteins and fragments.

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft hoe de Target Immobilized NMR Screening (TINS) technologie kan worden gebruikt om kleine moleculen als binder aan membraaneiwitten te identificeren.

Recentelijk is aangetoond dat het screenen van kleine moleculen, of fragmenten (< 300 Da) door middel van fragment-based drug discovery (FBDD) een goed alternatief is voor screening van grotere moleculen, hoewel de techniek is beperkt tot oplosbare eiwitten. **Hoofdstuk 1** introduceert het begrip FBDD en waarom het nuttig zou zijn manieren te vinden om deze drug discovery benadering toe te passen op membraaneiwitten. In het kort, FBDD heeft zich met behulp van biofysische technieken als Kern Spin Resonantie (NMR) ontwikkeld vanwege de mogelijkheid om zwakke binding van fragmenten aan eiwitten te detecteren. Biofysische technieken zijn echter veeleisend met betrekking tot de hoeveelheid en zuiverheid van het benodigde eiwit en, helaas, tot nu toe alleen toepasbaar op oplosbare eiwitten. Van de geneesmiddelen op de markt richt 60 % zich echter op membraaneiwitten die te maken hebben met een reeks van cruciale cellulaire processen, van het signaleren van cellen tot transport van ionen en andere opgeloste stoffen de cel in en uit. Zoals de naam al aangeeft bevinden membraaneiwitten zich binnen in de celmembraan en hebben een hydrofobische omgeving nodig om structuur en functie te behouden. **Hoofdstuk 2** behandelt het uitgebreide werk dat is uitgevoerd op het gebied van immobilisatie van membraaneiwitten in verschillende systemen die membranen nabootsen en laat zien dat geen van alle toepasbaar zijn om zwakke bindingen van fragmenten aan membraaneiwitten te bestuderen. Het is juist de hydrofobe aard die het onderzoek aan deze eiwitten met FBDD limiteert door de lage eiwitopbrengst en stabiliteit en het niet-specifieke karakter van fragment binding aan de pseudomembranen, zoals oppervlakteactieve stoffen of lipiden.

TINS is een vergelijkende methode waarin de simultane screening van een referentie eiwit (met minimale binding eigenschappen aan kleine moleculen), opgelost in aanwezigheid van dezelfde oppervlakteactieve stof als het target eiwit, kan compenseren voor non-specifieke binding van fragmenten aan de hydrofobe omgeving. Identificatie van fragmenten die specifiek aan de target

binden kan direct worden uitgevoerd zonder enige deconvolutie, door eenvoudige vergelijking van de 1D ^1H NMR signaal intensiteiten van de fragmenten in aanwezigheid van het referentie en target eiwit. Dit heeft als voordelen boven andere NMR technieken dat geen structurele informatie van de target vereist is, kleine hoeveelheden eiwit nodig zijn en bindende moleculen kunnen worden opgespoord in mengsels van fragmenten, wat het proces versnelt.

In **Hoofdstuk 3**, lieten we zien dat belangrijke farmaceutische targets als G protein coupled receptors (GPCRs) in principe bestudeerd kunnen worden met behulp van TINS dankzij hun functionele immobilisatie op een resin in een serie van biologisch relevante agonist en antagonist conformaties. Dit was mogelijk omdat natieve membraan fragmenten van de cellen die deze eiwitten tot over-expressie brengen werden geïmmobiliseerd, zonder verdere zuivering. Dit maakte de neven-immobilisatie mogelijk van andere targets die een belangrijke rol spelen in de signalerings cascade, zoals G proteïnen. De lage populatie van functionele geïmmobiliseerde eiwitten kon worden verhoogd door toename van de linker lengte tussen het eiwit en het oppervlak, maar de intrinsieke lage overexpressie van deze eiwitten was de beperkende factor die ons verhinderde om TINS toe te passen op deze klasse van eiwitten.

In **Hoofdstuk 4**, bewijzen we het principe dat TINS in het algemeen kan worden toegepast op membraaneiwitten. We gebruiken het bacteriele potassium ion channel (KcsA) en het bacteriele membraan enzym Disulphide bond forming protein B (DsbB) als targets, beiden geïmmobiliseerd en gescreend met het bacteriele referentie eiwit Outer membrane protein A (OmpA), en allen opgelost in dodecylphosphocholine detergent. De immobilisatie efficiëntie van alle drie de membraaneiwitten werd uitgerekend door het meten van de hoeveelheid eiwit in het supernatant voor en na de immobilisatie, met een stabiele opbrengst van 50 % voor alle drie de eiwitten. De functionaliteit van KcsA en DsbB werd getest door TINS metingen aan een bekende binder op verschillende tijdstippen tijdens de screen. Bovendien werd DsbB getest op functionaliteit met behulp van een robuust enzymatisch assay dat oxidatie waarneemt van de electron donor DsbA, een oplosbaar partner eiwit, of reductie van de electron acceptor, de synthetische cofactor ubiquinone-5, ook genaamd coenzym Q1 (UQ1). De fragmenten mixen bevatten geen detergent, om de hydrofobe interacties tussen fragmenten en detergent micellen te beperken. Het membraaneiwit, aan de andere kant, had detergent nodig bij een concentratie gelijk aan 5 x de

kritische micel concentratie. Bij lagere concentratie zouden de detergent micellen dissocieren tot monomeren en uiteindelijk verlies van eiwit conformatie, en dus functionaliteit, veroorzaken. Deze optimale condities maakten het mogelijk om een kleine test screen van 100 fragmenten uit te voeren op KcsA en een volledige screen van 1000 fragmenten op DsbB, beide resulterend in een hit rate van 7 %.

De NMR techniek TINS maakt het mogelijk om fragmenten hits van een target eiwit te identificeren, maar deze hits moeten verder nog gekarakteriseerd worden op hun potentie en manier van werken, zoals uitgevoerd voor DsbB in **Hoofdstuk 5**. Enzymatische essays werden gebruikt om het potentie gebied van de fragmenten, naast hun manier van werking, te bepalen. Tweedimensionale NMR experimenten werden gebruikt om aan te tonen welke eiwitresiduen, zoals die in de nabijheid van de DsbA of UQ1 binding sites bij DsbB, werden beïnvloed door titratie van de fragmenten. Wildtype DsbB was te instabiel om met NMR te bestuderen, maar een gestabiliseerde mutant van een fysiologisch relevante intermediaire toestand van DsbB werd gebruikt en resulteerde in de bevestiging van de binding karakteristieken die door enzymatische essays waren aangetoond. Dit leidde tot de veronderstelling dat de verkregen resultaten geen artefacten waren en dat de fragmenten specifiek aan DsbB binden. De uiteindelijke 8 fragmenten, met potenties variërend van 10 tot 200 μM (IC_{50} waarden), werden nu geordend in twee groepen. De eerste groep, bestaande uit 3 fragmenten, waren competitieve inhibitors voor de endogene ubiquinone binding site van het enzym. Deze fragmenten verhinderden op die manier UQ1 binding en achtereenvolgende electronen overdracht van DsbA naar de ademhalingsketen. De tweede groep bevatte 5 fragmenten en vertegenwoordigde gemengde model inhibitors die zowel UQ1 als DsbA binding verhinderden door binding in een andere site dan de eerste reeks fragmenten. Het bestaan van twee binding modes levert opwindende vooruitzichten op het gebied van chemisch linken of het nader onderzoeken van de fragmenten structuren van deze twee verschillende groepen tot meer potente en meer selectieve DsbB inhibitors.

Hoofdstuk 6 laat zien hoe het op een alternatieve manier in oplossing brengen van membraaneiwwitten TINS mogelijk maakte in waterige buffers, totaal zonder toevoeging van detergent. De eiwwitten werden ingekapseld in een bilaag gestabiliseerd door een amfifiele membraan structuur eiwit in een complex, nanodisc genoemd, dat volledig oplosbaar was in

waterige buffers. We toonden hier aan dat in nanodisc ingebedde DsbB, in tegenstelling tot in detergent opgelost DsbB, actiever was in enzymatische essays, met grotere efficiëntie werd geïmmobiliseerd, en stabiel was gedurende de test screen van 180 fragmenten. Bovendien, 18 van de 19 fragmenten die hoge DsbB inhibitie vertoonden in **Hoofdstuk 5** werden ook geïdentificeerd als hits in de in nanodisc ingebedde DsbB screen, suggererend dat TINS een reproduceerbare techniek is. Lege nanodiscs werden gebruikt als referentie systeem om te compenseren voor de non-specifieke binding van fragmenten aan de nanodisc omgeving. Er zijn veel voordelen aan het gebruik van nanodiscs in TINS, zoals het overbodig maken om een referentie eiwit te produceren, op te lossen en te immobiliseren. Ze zijn ook stabiel, en ze vereenvoudigen het werken met membraaneiwitten door de afwezigheid van detergent.

Ten slotte beschrijft **Hoofdstuk 7** de conclusies en vooruitzichten van dit proefschrift. De resultaten van dit proefschrift laten zien dat TINS kan worden toegepast op een verscheidenheid aan membraaneiwitten, zoals ion channels en membraan enzymen. De gevonden fragmenten hits voor DsbB werden gekarakteriseerd als inhibitors in het micromolaire gebied en konden worden geïdentificeerd met verschillende opgeloste toestanden van het enzym. Het gebruik van in nanodisc ingebedde targets maakt het mogelijk om een target te screenen in waterige buffers met lege nanodiscs als een goed gestandaardiseerd referentie eiwit. Deze resultaten, gecombineerd met de nieuwe methoden van overexpressie en thermostabiele mutagenesis zouden prikkelende nieuwe mogelijkheden moeten opleveren die verder strekken dan de identificatie van aan membraaneiwitten bindende fragmenten. Daarbij horen het opsporen van eiwit-eiwit of geneesmiddel-geneesmiddel interacties, afhankelijk van wat men kiest om te immobiliseren of NMR aan te meten in de plaats van achtereenvolgens eiwitten en fragmenten.

Résumé

Cette thèse décrit la méthode de « Target Immobilized NMR Screening (TINS) », qui peut être appliquée aux protéines membranaires afin d'identifier de nouveaux ligands de petite taille.

La méthode de criblage de petites molécules, ou fragments (<300 Da), par « fragment-based drug discovery (FBDD) » a été récemment identifiée comme une bonne alternative au criblage de molécules plus larges, mais le concept est restreint aux protéines solubles. Le **1^{er} Chapitre** présente la notion de FBDD ainsi que les raisons pour lesquelles il est intéressant de pouvoir appliquer ce genre de découverte médicinale aux protéines membranaires. En gros, le FBDD a évolué avec les méthodes biophysiques telles que la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) grâce à la possibilité de détecter les liaisons faibles entre fragments et protéines. De telles méthodes biophysiques sont exigeantes en ce qui concerne la quantité et le niveau de pureté d'une protéine. 60 % des drogues sur le marché pharmaceutique, cependant, ciblent les protéines membranaires qui sont beaucoup plus difficiles à produire et à purifier que les protéines solubles. Ces protéines sont à la base de multiples processus cellulaires vitaux au bon fonctionnement du corps, tels que la signalisation et le transport d'ions et de solutés intra et extra cellulaires. Comme le nom l'indique, ces protéines sont localisées dans la membrane cellulaire et requièrent un environnement hydrophobe pour maintenir leurs conformations et par conséquent, leur bon fonctionnement.

Le **2^{ème} Chapitre** est une revue de différentes méthodes ingénieuses qui existent pour immobiliser les protéines membranaires dans une variété d'imitations de membranes cellulaires dont les propriétés ne sont pas évidentes à préserver. Ce chapitre démontre qu'aucune de ces méthodes d'immobilisation n'est applicable à l'étude des interactions faibles entre fragments et protéines membranaires. C'est précisément cette nature hydrophobe qui limite l'application de FBDD aux protéines membranaires, car les imitations synthétiques de membranes cellulaires, tels que les détergents ou les lipides, ont tendance à créer des liaisons non-spécifiques avec les fragments, ce qui engendre souvent de fausses lectures de résultats.

TINS est un système de référence qui permet le criblage simultané d'une protéine de référence (avec peu d'affinités pour les fragments), solubilisée dans le même détergent que la cible, pour permettre l'identification des liaisons non-spécifiques au niveau des protéines ainsi qu'au niveau de l'environnement hydrophobe présent autour des deux protéines. Il en découle la possibilité d'identifier les fragments qui se lient spécifiquement à la cible. Ceci peut être fait instantanément, sans déconvolution, en comparant simplement l'intensité des signaux 1D ^1H des fragments en présence de la cible et de la référence. Ceci a certains avantages par rapport aux autres méthodes par RMN car il n'y a *a priori* aucun besoin d'avoir résolu les structures protéiques, de petites concentrations de protéine sont requises, et les fragments peuvent être identifiés parmi des cocktails de plusieurs fragments à la fois, afin de rendre le processus plus rapide.

Dans le **3^{ème} Chapitre**, nous avons démontré que les cibles pharmaceutiques importantes telles que les récepteurs couplés aux protéines G: les « G protein coupled receptors (GPCRs) », peuvent, en principe, être criblés par la méthode TINS. Leur immobilisation dans les conformations d'importance physiologiques, tels que sous formes agonistes ou antagonistes sur résine était possible. Ces différentes conformations pouvaient être présentes sur la résine car nous avons immobilisé des vésicules de membranes cellulaires natives, co-immobilisant d'autres protéines importantes à la cascade de signalisation et la fonctionnalité des GPCRs, tels que les protéines G. La quantité de GPCRs fonctionnels sur résine pouvait être améliorée en augmentant la distance entre les vésicules et la résine, mais le faible niveau d'expression intrinsèque des cellules mères était le facteur qui nous a empêchés de pouvoir appliquer la méthode TINS à cette classe de protéines.

Dans le **4^{ème} Chapitre**, nous avons établi que les protéines membranaires en général pouvaient être criblées par la méthode TINS. Nous avons utilisé le canal ionique de potassium bactérien (KcsA) ainsi que l'enzyme membranaire bactérien Disulphide bond forming protein B (DsbB) comme cibles, immobilisées et criblées en présence de la protéine Outer Membrane protein A bactérienne. Toutes trois protéines étaient solubilisées dans le même détergent dodecylphosphocholine (DPC). L'efficacité d'immobilisation des toutes les trois protéines était constamment de 50 %. Le fonctionnement de KcsA et DsbB pouvait être testé par l'identification

de l'interaction avec un ligand connu par la méthode TINS. L'activité de DsbB pouvait être d'avantage confirmée par un essai enzymatique qui permettait de suivre l'oxydation de la protéine partenaire DsbA, ainsi que la réduction du cofacteur de DsbB: le coenzyme Q1 synthétique (UQ1). Pour le criblage, afin de minimaliser les interactions entre fragments et détergents, les solutions de fragments ne contenaient aucun détergent. Cependant, le détergent était requis à une concentration équivalente à 5 x celle de la concentration de micelle critique dans le tampon de lavage, en dessous duquel les micelles de détergents se dissocieraient en monomères, éventuellement causant la perte de conformation protéinique et ainsi, leur bon fonctionnement. Ces conditions optimales nous ont permis de compléter un petit criblage de 100 fragments sur KcsA ainsi qu'un criblage complet de 1000 fragments sur DsbB.

TINS est une méthode par RMN qui permet d'identifier les fragments qui se lient par faible affinité aux cibles protéiniques immobilisées, sans donner d'informations quantitatives ou qualitatives en ce qui concerne leur constante d'inhibition enzymatique ni leur mode d'action (site de liaison). Nous avons donc poursuivi l'étude de ces caractéristiques pour les ligands identifiés par TINS sur DsbB dans le **5^{ème} Chapitre**. Les fragments démontrant plus de 70 % d'inhibition dans les essais enzymatiques ont démontré une rangée de constante d'inhibition entre 10 et 200 μ M (IC50s). Les essais compétitifs enzymatiques ont aussi démontrés que parmi ces 8 fragments finaux, il existait trois fragments compétitifs pour le site de liaison du cofacteur UQ1, ainsi que cinq fragments présentant le mode mixte, à savoir, un effet inhibiteur sur le cofacteur UQ1 ainsi que sur la liaison de DsbA avec DsbB (inhibition d'interaction entre protéines). Ces résultats ont été confirmés par des expériences parallèles par RMN sur des échantillons de DsbB mutants. Le mutant est la seule forme de DsbB suffisamment stable pour ces expérimentations, et représente une conformation physiologiquement importante qui représente une conformation intermédiaire de cette protéine dans le processus d'échange d'électrons. Ces expériences nous ont permis ainsi d'identifier les zones d'acides aminés qui participaient dans les liaisons avec les fragments. L'existence des deux sites de liaison nous permettra dans l'avenir de lier chimiquement des fragments des deux groupes distincts afin d'obtenir des composés inhibiteurs de DsbB avec d'avantage de spécificité et d'efficacité.

Le 6^{ème} **Chapitre** nous démontre la possibilité d'utiliser une technique de solubilisation alternative qui permet de répéter le criblage TINS sur DsbB en l'absence de détergents. Les protéines DsbB et OmpA étaient encapsulées dans une couche lipidique stabilisées par une ceinture de protéine amphiphile (membrane scaffold protein MSP) dans un complexe nommé le nanodisque. Ce nanodisque est complètement soluble dans l'eau grâce aux propriétés de l'MSP. Nous avons démontré que DsbB, une fois encapsulée dans le nanodisque (DsbB/ND) est plus active, peut être immobilisée avec d'avantage d'efficacité, et peut être criblée en l'absence totale de détergents en gardant sa fonctionnalité intacte. De plus, sur les 19 fragments à haute efficacité inhibitrice, 18 ont été identifiés dans le criblage en utilisant les nanodisques vides (sans DsbB mais avec une couche lipidique) démontrant que les résultats d'une telle méthode sont répétables et qu'il est possible d'éviter la nécessité de produire, purifier, et solubiliser une protéine de référence.

Le 7^{ème} **chapitre** décrit les conclusions et les perspectives de cette thèse. Les résultats de cette thèse prouvent que TINS est une méthode que l'on peut appliquer de façon générale aux protéines membranaires, telles que les canaux ioniques et les enzymes. Les fragments identifiés comme ligands pour DsbB ont été caractérisés comme des inhibiteurs dans la gamme micromolaire et pouvaient être identifiés par TINS malgré les différents états solubilisés de l'enzyme. L'utilisation des cibles solubilisées dans les nanodiscs permet d'examiner une cible dans un environnement aqueux avec les nanodiscs vides comme bonne référence standardisée. Ces résultats, combinés avec les nouvelles méthodes pour la surexpression et la mutagenèse thermostabilisante devraient fournir de nouvelles possibilités passionnantes qui peuvent se prolonger au delà de l'identification des fragments ligands aux protéines membranaires. Ces expériences incluent l'identification des interactions entre protéines ou entre drogues, selon ce qu'on choisit d'immobiliser ou d'injecter au lieu des protéines et des fragments.