



Doctoral Thesis

Native mass spectrometry: A powerful tool to study protein-ligand complexes in drug discovery

Author(s):

Cubrilovic, Dragana

Publication Date:

2014

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010171697> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21827

**NATIVE MASS SPECTROMETRY: A POWERFUL
TOOL TO STUDY PROTEIN-LIGAND COMPLEXES
IN DRUG DISCOVERY**

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

presented by
DRAGANA CUBRILOVIC

M.Sc. in Chemistry, Goethe University, Germany

born on 16.11.1985
citizen of Germany

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Renato Zenobi, examiner
Prof. Dr. Dario Neri, co-examiner

2014

VII. Abstract

Noncovalent interactions are critical in maintaining the three-dimensional structure of large biomolecules and play a fundamental role in molecular recognition in all biological processes. The discovery and characterization of protein-ligand interactions (e.g. with other proteins, carbohydrates, lipids, DNA or small molecules) is crucial for understanding biochemical reactions and pathways as well as for a subsequent development of new therapeutics for treatment of different human diseases. The quantitative determination of binding strengths of protein-ligand complexes is of high importance for the design of novel therapeutics in drug discovery processes.

Mass spectrometry (MS) was used for a long time as a tool for the “fingerprint” to identify different compounds. Many researchers believed that detection of noncovalent interactions is impossible, because large intact biomolecule should not survive the transfer into the gas phase. The advent of soft ionization techniques, such as electrospray ionization (ESI) as well as matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) in combination with the availability of modern mass spectrometers achieving sufficient accuracy and sensitivity, revolutionized the field. The evidence in the early 1990ies that ESI could maintain noncovalent interactions preserving their solution structure was even more surprising. Since then native ESI-MS has been developed into a powerful and widely utilized tool in drug discovery, via detection and analysis of the protein-ligand interactions. This method can be used for determining composition, stoichiometry, subunit interactions, and architectural organization of noncovalent complexes.

In the last years more research groups have become active in the field of the ESI-MS based drug discovery for the investigation of protein-ligand interactions and determination of binding affinities. In recent years, binding affinities have been successfully determined by ESI-MS for a variety of noncovalent protein-ligand complexes, and by and large were found to be in agreement with results from other biophysical methods. However in the case of some other investigated complexes no correlations with standard methods have been observed. Even if the complexes are preserved, it is not fully understood to which extent ESI mass spectra represent a

snapshot of solution-phase equilibrium. In particular, it is not clear what happens to protein-ligand complexes when weak interactions, e.g., hydrophobic interactions dominate the subunit. Therefore, one of the aims of this thesis was to investigate the protein-ligand complexes driven by hydrophobic interactions and to study how the complex stability is affected in the gas phase. Changes in the length of the hydrophobic side chain should lead to systematic differences in binding affinities accommodating the hydrophobic cavity of the enzyme. The question of this study was whether one could observe the expected trend in the binding affinity when using ESI-MS as a read-out for the solution phase equilibrium. Also we wanted to establish mass spectrometric measurements for drug discovery screening on several relevant and more complex biological systems, important for, both academia and the pharmaceutical industry. Such measurements need to be put on a solid basis to be widely accepted.

Therefore, the allosteric mechanism in the binding of the new inhibitors to a tetrameric enzyme using nanoESI-MS was studied. The system investigated was the homotetrameric enzyme fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), a potential therapeutic target for glucose control in type-2 diabetes. The nanoESI based K_D values determined were in good agreement with validation measurements. In addition to the determination of K_D values of the cooperatively regulated enzyme, our results also allowed for a better understanding of the mechanism of enzymatic cooperativity and for getting information about stoichiometry, mechanism of binding and Hill coefficient. Recently, we also investigated the possible effects of DMSO on protein-ligand complexes during the screening process, which have received little attention in the literature. As a part of this thesis, we studied the inhibition of protein-protein interactions (PPI). A large number of PPIs are involved in signalling pathways related to cancer and many other human diseases. NanoESI-MS was applied to monitor the extent of the protein-protein inhibition as well as the mechanism of binding.

Considering that native ESI-MS is beginning to be recognized as a viable tool for early drug discovery, we expect that in the near future the usage of this analytical technique will be further accelerated.

VIII. Zusammenfassung

Nichtkovalente Wechselwirkungen sind wesentlich für die Erhaltung von dreidimensionalen Strukturen großer Biomoleküle und spielen eine fundamentale Rolle bei der Erkennung aller biologischen Prozesse. Die Entdeckung und Charakterisierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen (z.B. mit anderen Proteinen, Carbohydraten, Lipiden, DNS oder kleinen Molekülen) ist essenziell für das Verständnis von biochemischen Reaktionen sowie für die daraus folgende Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten unterschiedlicher Krankheiten. Die quantitative Bestimmung von Bindungsstärken nichtkovalenter Protein-Ligand Komplexe ist von hoher Bedeutung für die Entwicklung neuer Wirkstoffe in der pharmazeutischen Forschung.

Die Massenspektrometrie (MS) wurde lange Zeit dazu verwendet, den "Fingerabdruck" unterschiedlicher Verbindungen zu erkennen. Lange wurde von der Forschungsgemeinschaft vermutet, dass die Detektion von nichtkovalenten Wechselwirkungen unmöglich sei, da große intakte Biomoleküle den Transfer in die Gasphase nicht überstehen könnten. Erst die Entwicklung von sog. "sanften Ionisierungs-Techniken" wie „Elektrospray Ionisation“ (ESI) und "Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation“ (MALDI) sowie die Verfügbarkeit moderner Massenspektrometer, mit denen die nötige Genauigkeit und Empfindlichkeit erreicht wird, revolutionierten die Forschung auf diesem Gebiet. Noch überraschender war der Beweis in den frühen 90er Jahren, als man mit „native“ ESI-MS nachweisen konnte, dass nichtkovalente Komplexe intakt bleiben. Seither wurde die ESI-MS zur Erkennung und Analyse von Protein-Ligand-Wechselwirkungen verwendet und damit zu einem wirkungsvollen und häufig genutzten Werkzeug in der pharmazeutischen Forschung. Diese Methode kann verwendet werden um die Zusammensetzung, Stöchiometrie, untergeordnete Wechselwirkungen und die strukturelle Anordnung zu bestimmen. In den vergangenen Jahren sind Forschungsgruppen zunehmend im Bereich der ESI-MS basierten pharmazeutischen Forschung aktiv geworden um Protein-Ligand-Wechselwirkungen zu erforschen und Bindungsaffinitäten zu bestimmen. So konnten durch andere biophysikalische Methoden bekannte Bindungsaffinitäten ebenso erfolgreich mittels ESI-MS für eine Reihe nichtkovalenter

Protein-Ligand-Komplexe bestimmt werden. Jedoch wurden für manch andere Komplexe keine mit anderen etablierten Methoden korrelierende Ergebnisse erzielt. Insbesondere ist derzeit nicht aufgeklärt, was mit Protein-Ligand-Komplexen geschieht, wenn schwache Wechselwirkungen, z.B. hydrophobe Wechselwirkungen, die Interaktionen dominieren. Daher war eines der Ziele dieser Dissertation, Protein-Ligand-Komplexe, stabilisiert unter anderem durch hydrophobe Wechselwirkungen, sowie wie die Stabilität solcher Komplexe in der Gasphase zu untersuchen. Veränderungen in der Länge der hydrophoben Seitenkette führen zu systematischen Abweichungen in den Bindungsaffinitäten durch Anpassungen an die hydrophoben Bindungstaschen der Enzyme. Die Frage dieser Forschungsarbeit bestand darin, ob man ESI-MS zum Auslesen des Gleichgewichts in der Lösung nutzen kann um den erwarteten Trend der Bindungsaffinitäten zu messen. Für die akademische Forschung als auch die pharmazeutische Industrie wollten wir weitere MS-basierte Messverfahren zur Wirkstoffentwicklung mehrerer bedeutender als auch komplexerer biologischer Systeme etablieren. Um allgemein akzeptiert zu werden, müssen solche Messverfahren auf einer breiten Grundlage gestellt werden. Daher wurde mittels nanoESI-MS die Bindung neuer Inhibitoren an ein tetrameres Enzym und der damit verbundene allosterische Mechanismus untersucht. Das verwendete System war das homotetramere Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), welches ein potenzielles therapeutisches Ziel zur Glukose-Regulierung in der Typ-2 Diabetes ist. Die ermittelten nanoESI-MS basierten K_D -Werte entsprachen dabei den Vergleichsmessungen. Neben der Ermittlung der K_D -Werte des kooperativ regulierten Enzyms konnten wir den Mechanismus der enzymatischen Kooperativität besser verstehen und erhielten Informationen über die Stöchiometrie, den Bindungsmechanismus und den Hill-Koeffizienten. Zudem wurden auch die bislang wenig in der Literatur beachteten Auswirkungen von DMSO auf Protein-Ligand-Komplexe während des Screening-Prozesses untersucht. Ebenso wurde die Inhibition von Protein-Protein-Interaktionen untersucht. Eine große Zahl von Protein-Protein-Interaktionen spielen bei den Signalwegen eine Rolle, die bei Krebserkrankungen und vielen anderen menschlichen Krankheiten involviert sind. NanoESI-MS wurde verwendet um das Ausmaß der Protein-Protein-Inhibition zu verfolgen als auch den

Bindungsmechanismus zu studieren. Nachdem ESI-MS als nützliches Instrument für die frühe Wirkstoffforschung erkannt wurde, erwarten wir eine beschleunigte Verwendung dieser analytischen Verfahrensweise in naher Zukunft.