

DISS. ETH Nr. 18516

# **Charting interaction proteomes using affinity purification and mass spectrometry**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree

Doctor of Sciences

presented by

**Timo Glatter**

Dipl. Biotechnologist, University Bielefeld  
born November 24, 1974  
German citizen

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ruedi Aebersold, examiner  
Prof. Dr. Ernst Hafen, co-examiner  
Dr. Matthias Gstaiger, co-examiner  
Dr. Anne-Claude Gavin, co-examiner

2009

---

## Zusammenfassung

Proteine sind an allen essentiellen biologischen Prozessen massgeblich beteiligt und führen ihre Funktion oft im Rahmen von Multiproteinkomplexen aus. Diese Proteinkomplexe sind häufig in übergeordnete Proteinnetzwerkstrukturen eingebettet, welche ihre Konfiguration entsprechend der zellulären Umgebungsbedingungen dynamisch anpassen und ändern. Komplexe zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, etc. werden stark von der Struktur und der Dynamik dieser Netzwerke bestimmt. Deshalb ist die systematische und robuste Analyse der molekularen Topologie und Dynamik dieser Netzwerkstrukturen von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis von zellulären Prozessen auf einer übergeordneten, globalen Ebene.

Affinitätsaufreinigung in Kombination mit Massenspektrometrie (AP-MS) ist die Methode der Wahl für die Analyse von Protein-Protein Interaktionen unter nahezu physiologischen Bedingungen. Allerdings haben bisherige AP-MS basierende Studien von höheren eukaryotischen Zellen nur geringfügigen Aufschluss über die dynamischen Eigenschaften von Proteinnetzwerkstrukturen geliefert. Weiterhin sind AP-MS-Studien in höheren Zellsystemen mit erheblichen experimentellen Limitationen verbunden, vor allem in Hinblick auf Durchsatz und Datenrobustheit.

Diese beiden essentiellen Limitationen wurden in den beiden Hauptstudien dieser Doktorarbeit überwunden, die zur Zeit im Bereich der Proteininteraktionsforschung existieren. In der ersten Studie präsentieren wir die systematische Analyse des Proteininteraktionsnetzwerks des „Insulin Receptor/Target of rapamycin“ (InR/TOR)-Signaltransduktionswegs, einem zentralen und evolutionär konserviertem Signalsystem, welches Zellwachstum und Proliferation kontrolliert. Mittels AP-MS und quantitativer Massenspektrometrie wurden Insulin stimulierte sowie unbehandelte *Drosophila melanogaster* Zellen analysiert und die dynamischen Eigenschaften des InR/TOR-Proteininteraktionsnetzwerks charakterisiert. Weiterhin waren wir in der Lage die Topologie von Proteinsubkomplexen mit hoher Sensitivität zu bestimmen. Diese Strategie hat die Identifizierung einer neuartigen Subkomplexarchitektur der TOR-Kinase ermöglicht. Unsere Resultate bestätigen einerseits bereits bestehende Informationen über diesen Signalweg und deuten andererseits auf neue, unerwartete Aspekte bezüglich der InR/TOR-Netzwerks hin.

Im zweiten Projekt dieser Doktorarbeit wurde eine integrierte experimentelle Prozedur entwickelt, welche die globale Analyse von Proteinnetzwerken mittels AP-MS in humanen Zellen ermöglicht und die Parameter Durchsatz, Sensitivität und Robustheit verbessert. Damit adressiert diese Studie die grössten experimentellen Probleme, welche globale AP-MS Studien in Säugerzellen bisher erschwerten. Die Qualität dieser Prozedur wurde anhand des Phosphatase-Systems PP2A überprüft. Insgesamt wurden 197 spezifische Protein-Protein-Interaktionen reproduzierbar identifiziert. Die Gesamtheit aller Interaktionen

---

zeigte die Koexistenz verschiedener Klassen von Phosphatase-komplexen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen auf.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit sowohl experimentelle Methoden entwickelt, als auch grundsätzliche Informationen zur Organisation von Proteinnetzwerken geliefert, die die systematische Analyse zur Entschlüsselung der Organisation und Dynamik des gesamten Proteininteraktoms eines Organismus erleichtern und somit durch weiterführende Studien in greifbare Nähe rücken lassen.

---

## Summary

Proteins are involved in essentially all biological processes and exert their function in the context of macromolecular assemblies. These protein complexes are often part of higher order network structures that can change in configuration specific to the environmental conditions. Therefore, complex cellular processes such as cell growth, proliferation, apoptosis, etc. are largely dependent on the constitution and dynamic behavior of these networks. Hence, the systematic and robust analysis of the molecular topology and dynamics of protein networks is becoming increasingly important for a systems level understanding of biological processes.

Affinity purification in combination with mass spectrometry (AP-MS) has become the method of choice to study protein-protein interactions under near physiological conditions. However, AP-MS based studies in higher eukaryotic cells that have been performed to date, failed to provide detailed insights into the dynamic properties of networks structures. In addition, limitations in current AP-MS workflows with respect to throughput and robustness largely hampered the systematic analysis of protein interaction networks on a large scale basis in mammalian cells.

In the two main studies that were performed within this PhD thesis we addressed these essential limitations currently existing in the field of interactome research. In the first study, we present the systematic analysis of the protein-protein interaction network linked to the Insulin Receptor/Target of rapamycin (InR/TOR) pathway, a central and highly conserved signaling system that controls cell growth and proliferation. By using AP-MS and label-free quantification on insulin treated and untreated *Drosophila melanogaster* cells we characterized the dynamic properties of the InR/TOR network. Based on this analysis we obtained that around 20% of the identified interactions within the obtained network undergo insulin induced remodeling. In addition, we used a novel approach to sensitively detect protein subcomplex architectures, which allowed us to identify new types of TOR kinase assemblies. The results that were obtained from our in-depth analysis of the InR/TOR network recapitulated on one hand well established knowledge about this signaling system, but on the other hand provide several novel and unexpected aspects of the organization of the InR/TOR network.

Global AP-MS analysis in mammalian cells is hampered by the low throughput, sensitivity and data robustness of existing procedures, which limit its application for systems biology research. In the second project performed in this PhD thesis we established a novel integrated workflow to increase the throughput and data robustness in human AP-MS studies. We benchmarked our strategy for the Serine/Threonine Phosphatase PP2A and identified a total of 197 protein interactions with high reproducibility, revealing the coexistence of distinct classes of phosphatase complexes that are linked to proteins implicated in mitosis, cell signaling, DNA damage control and more.

---

In conclusion, this PhD thesis provides experimental frameworks for efficient analysis of protein interactomes and reveals insights into organization of protein interaction networks that mark a significant step forward towards the systematic elucidation of topological and dynamic aspects of whole organism interactomes.