

DISS. ETH NO. 18739

Quantitative Interaction Proteomics by Affinity Purification and Mass Spectrometry

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

ALEXANDER FELIX WEPF

Master of Science ETH

born 14 January 1981

citizen of Dübendorf ZH

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ruedi Aebersold, examiner

Dr. Matthias Gstaiger, co-examiner

Prof. Dr. Christian von Mering, co-examiner

Dr. Pascal Meier, co-examiner

2009

I. Zusammenfassung

Proteine sind die Bausteine des Lebens da sie an fast allen biologischen Prozessen beteiligt sind. Sie üben ihre Funktion oft im Rahmen von makromolekularen Proteinkomplexen aus, welche wichtige Aufgaben wie das Pumpen von Ionen, die Katalyse von chemischen Reaktionen und das Senden, Empfangen und Integrieren von molekularen Signalen ausführen. Diese Aufgaben sind wiederum wichtig für komplexe zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Apoptose etc. Die Komplexbildung ist ein dynamischer Vorgang. Proteine binden einander und dissoziieren wieder um jederzeit die spezifischen Bedürfnisse der Zelle zu erfüllen. Die Zusammensetzung eines Proteinkomplexes bestimmt seine Funktion in Raum und Zeit und die Bindung eines einzigen Proteins kann die Funktion wesentlich beeinflussen. Es ist daher wichtig, die Proteininteraktionen und Proteinkomplexe systematisch und quantitativ zu studieren, um ein besseres globales Verständnis der biologischen Prozesse zu erhalten.

Die Methode der Wahl für die Untersuchung von Proteininteraktionen und Proteinkomplexen ist Affinitätsaufreinigung in Kombination mit Massenspektrometrie (AP-MS). In AP-MS Experimenten werden die Proteinkomplexe durch Affinitätschromatographie physisch vom Zelllysate getrennt und danach die Proteinuntereinheiten der Komplexe mit Massenspektrometrie identifiziert. Während AP-MS erfolgreich für die Studie ganzer Interaktionsproteome in Hefe (*S. cerevisiae*) angewandt wurde, hat die gängige Technologie in Säugerzellen bezüglich Durchsatz, Sensitivität und Robustheit bisher nicht zufriedenstellende Resultate geliefert.

Das erste Projekt dieser Doktorarbeit war die Entwicklung eines neuen integrierten Arbeitsablaufs um AP-MS für globale Studien in Säugerzellen nutzbar zu machen. Wir vereinfachten den Arbeitsablauf von der Klonierung, über die Generierung der Zelllinien, die Affinitätsaufreinigung bis zur Analyse mit Massenspektrometrie. Dabei entwickelten wir eine Strategie mit überlegener Effizienz und Robustheit. Wir testeten unsere Strategie an einem kleinen Interaktionsnetzwerk um die Serin Threonin Phosphatase PP2A. Wir fanden dabei 197 Proteininteraktionen mit hoher Reproduzierbarkeit und enthüllten die gleichzeitige Existenz verschiedener Phosphatasekomplexe.

Das Modellieren der dynamischen Organisation von zellulären Proteomen benötigt absolut quantitative Interaktionsdaten. Darum war das zweite Ziel dieser Doktorarbeit eine neue AP-MS Methode zu entwickeln und anzuwenden, die es erlaubt Proteininteraktionen quantitativ

zu messen um Interaktionsstoichiometrien und die Verteilung der Proteine in gleichzeitig existierende Komplexe abzuleiten. Unsere neue quantitative AP-MS Methode kombiniert die Stärken von isotope-markierten Peptiden zur absoluten Quantifizierung mit den Vorteilen von 'markierungsfreien Quantifizierungsansätzen'. Sie erlaubt eine genaue Messung der Komplexhäufigkeit und die Detektion von Veränderungen in den Komplexzusammensetzungen, wie wir anhand des humanen PP2A Systems aufzeigen konnten.

Zusammenfassend werden in dieser Doktorarbeit experimentelle und analytische Fortschritte für die Untersuchung von Proteininteraktionen und Proteinkomplexen präsentiert. Die neuen Möglichkeiten werden eine systematische Ausleuchtung der Proteininteraktionen von Säugern erlauben und eine quantitative Darstellung der Interaktionsproteome fördern. Dies wiederum eröffnet neue Möglichkeiten zur Modellbildung von biologischen Prozessen.

II. Summary

Proteins are the building blocks of life as they are involved in virtually all biological processes. They frequently exert their function in the context of macromolecular assemblies or protein complexes, which perform important tasks such as the pumping of ions, the catalysis of chemical reactions or the molecular signalling. In turn these tasks are absolutely vital for complex cellular processes as for example cell growth, proliferation, apoptosis and more. The assembly of protein complexes is dynamic. Proteins associate and dissociate to fit at any time the specific needs of a cell. The composition of a protein complex determines its function in time and space and the association or dissociation of a single protein can modulate the function. Therefore, the systematic and quantitative study of protein interactions and protein complexes is important to obtain a systems level understanding of biological processes.

The method of choice for the study of protein-protein interactions and the investigation of protein complexes is affinity purification and mass spectrometry (AP-MS). In AP-MS experiments protein complexes are physically isolated from cell lysates by affinity purification and subsequently the components of the complexes are identified by mass spectrometry. While AP-MS workflows have been successfully applied to study the whole interaction proteome of *S. cerevisiae*, previous workflows performed poorly in mammalian cells in respect to throughput, sensitivity and robustness.

In the first project of this PhD thesis we developed a novel integrated workflow to make AP-MS amenable for the use in high throughput studies in human cells. We facilitated the overall procedure from cloning, cell line generation, affinity purification to mass spectrometry analysis. Thereby we developed a strategy with superior efficiency and robustness. We benchmarked this strategy on a small interaction network around the serine threonine phosphatase PP2A, where we could find 197 protein interactions with high reproducibility, revealing the concurrent existence of distinct phosphatase complexes.

Modelling of the dynamic organization of cellular proteomes requires absolutely quantitative interaction data. Therefore the goal of the second project in this PhD thesis was to develop and apply a novel AP-MS method to analyse protein interactions in a quantitative manner to measure interaction stoichiometries and predict the partitioning of proteins into concurrently existing complexes in the human protein phosphatase 2A network. Our novel quantitative AP-MS method combines the strength of isotope-labelled peptides for absolute quantification

with the advantages of label-free quantification. It allows accurate measurements of protein complex abundances and detection of changes in protein complex assemblies.

In summary this PhD thesis presents experimental and analytical advances for the investigation of protein interactions and protein complexes. The novel possibilities will facilitate a systematic elucidation of mammalian protein interactions and promote a quantitative representation of the interaction proteomes with unprecedented opportunities for the modelling of biological processes.