

Diss. ETH No. 18661

Probing Protein-Protein Interactions by Mass Spectrometry

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Tatiana Pimenova

M.Sc. Chem. Tech. Biotech., MIFCT Moscow

born November 16, 1980

citizen of Russia

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Renato Zenobi, ETH Zurich (examiner)

Prof. Dr. Ruedi Aebersold, ETH Zurich (co-examiner)

2009

Summary

Protein-protein interactions are a key to most biological processes. Knowledge about these interactions facilitates the discovery of new relationships between cellular processes, improves understanding of diseases and provides the basis for new therapeutic approaches and diagnostics. Structural characterization of protein-protein interactions involves determination of binding motifs, three-dimensional structures of interacting proteins, characterization of protein complexes with their specific partners, stoichiometry and subunit association. Mass spectrometry (MS) is a powerful analytical method to obtain most of this information.

In this thesis, two novel MS-based approaches for the determination of specific amino acid sequences on an antigen (epitope) recognized by a monoclonal antibody were developed. Chemical cross-linking combined with mass spectrometry was shown to be efficient for characterization of the epitope on bovine prion protein (bPrP), the protein associated with neurological diseases. Upon binding of the antibody, some parts of bPrP were protected from chemical modifications. Another analytical approach for epitope identification of a prion-antibody complex based on proteolytic excision-mass spectrometry was significantly improved. Amino-modified polystyrene beads with aldehyde functionality were shown to be a better alternative as a support material for an antibody immobilization compared to the standard sepharose matrix.

High molecular weight multimeric states and stoichiometries of several protein complexes including human plasma protein haptoglobin (Hp), higher order structures of hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs) and their interactions were characterized by a novel high-mass matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) MS method. These investigations are of clinical importance and contribute to the overall understanding of HBOCs' toxicity and clearance.

Also, structural changes in human hemoglobin (Hb) caused by oxidative damage and their influence on interaction efficiency with haptoglobin, which is a physiological Hb scavenger, were researched. It was shown that the reaction of hydrogen peroxide with hemoglobin induces extensive alpha-globin crosslinking and impairs the interaction of Hb with Hp. This might lead to Hb-toxicity and various diseases associated with oxidative stress. A combination of MS and isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) was used for the first time to identify and to quantify oxidative modifications in Hb and to evaluate the protective effect of Hp in an oxidizing environment.

Zusammenfassung

Protein-Protein-Wechselwirkungen bilden die Grundlage zahlreicher biologischer Prozesse. Detailliertes Wissen über diese Wechselwirkungen erlaubt es, neue Beziehungen zwischen zellulären Prozessen zu entdecken, Krankheiten zu verstehen und neue Ansätze für Therapie und Diagnostik zu entwickeln. Die Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beinhaltet die Identifikation von spezifischen Bindungspartnern, Komplexstöchiometrien, Bindungsmotiven, und dreidimensionalen Strukturen der wechselwirkenden Proteine.

Massenspektrometrie (MS) stellt eine effektive analytische Methode dar, mit der ein Grossteil dieser Informationen erhalten werden kann. In der vorliegenden Dissertation wurden zwei neue MS-basierte Ansätze zur Bestimmung von Aminosäuresequenzen eines Antigens (Epitop), welche die spezifische Erkennung durch einen monoklonalen Antikörper erlauben, entwickelt. Mit Hilfe von chemischem Cross-linking und Massenspektrometrie konnte das Epitop des bovinen Prion-Proteins (bPrP), welches als Auslöser für neurologische Krankheiten gilt, charakterisiert werden. Dabei wurde das Epitop als Sequenzbereich identifiziert, der durch Bindung an den Antikörper vor chemischer Modifizierung geschützt ist. Ein weiterer Ansatz zur Bestimmung eines Prion-Epitops basierend auf proteolytischer Ausschluss-Massenspektrometrie wurde signifikant verbessert. Anstelle der standardmässig verwendeten Sepharose-Matrix wurden amino-modifizierte Polystyrol-Beads mit Aldehyd-Funktionalität als Substrat zur Immobilisierung des Antikörpers verwendet.

Die Stöchiometrie verschiedener Protein-Komplexe und Multimere des menschlichen Blutes bestehend aus Haptoglobin (Hp) oder Hämoglobin-basierten Sauerstoffträgern (HBOC) wurde mit Hilfe einer neuartigen High Mass Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (HM-MALDI)-MS-Methode bestimmt. Genannte Untersuchungen sind von hoher klinischer Bedeutung und tragen zum Gesamtverständnis von Toxizität und Clearance bei. Zudem konnten durch oxidative Schäden verursachte strukturelle Änderungen an humanem Hämoglobin (Hb) und deren Einfluss auf die Wechselwirkung mit dem physiologischen Hb-Scavenger Haptoglobin untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Hb eine umfangreiche Vernetzung des alpha-Globins induziert und die Wechselwirkung zwischen Hb und Hp beeinträchtigt. Mit Hilfe von iTRAQTM-Reagenzien (isobaric tags for relative and absolute quantitation) und MALDI-MS konnten erstmalig oxidative Modifizierungen an Hb quantifiziert und der schützende Effekt von Hp in oxidierender Umgebung evaluiert werden.