

Chemical cross-linking, mass spectrometry, and noncovalent macromolecular complexes

Doctoral Thesis

Author(s):

Bich, Claudia

Publication date:

2009

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006032806>

Rights / license:

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

Diss. ETH No. 18722

Chemical cross-linking, Mass spectrometry, and Noncovalent Macromolecular complexes

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

Claudia BICH

Master of Sciences, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, France

Born September 19th, 1980

Citizen of France

Accepted on the recommendation

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

Prof. Dr. Andrea Vasella, ETH Zürich (co-examiner)

Zürich, 2009

Abstract

Proteins often formed complexes with other molecular species as baggage carriers or in some cases, to fulfill their principal objective in life. Non-covalent protein-protein interactions become then important to be characterized. Several applications and improvements of chemical cross-linking applied prior matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry (MS) analysis were described for non-covalent interactions. The use of cross-linking combined with high-mass MALDI-MS for antibody-antigen interaction was first described. The prion protein with one monoclonal antibody system was studied by cross-linking-MALDI-MS on diverse parameters, such as binding and epitope mapping. Results were found to be as good, or in some cases better than those obtained in the case of the Surface Plasmon Resonance (SPR) method.

Before MALDI measurements, the common protocol of cross-linking was tested on the protein-DNA system, nuclear receptors bound to a special DNA sequence. Spectra obtained in the case of MALDI-MS were compared to electrospray mass spectrometry (ESI-MS) in native conditions, and the two methods were found to be complementary. However, it was demonstrated that the cross-linking was partially efficient on the protein-DNA system, most probably due to high local concentration of cross-linkers on proteins. The investigation of the behavior of DNA vis-à-vis cross-linkers shows a characteristic reaction in the case of water-soluble cross-linker, which does not occur in the case of DSS, soluble in organic solvent. Unfortunately, this atypical reaction could not be totally explained by the experiments performed, and did not help in understanding the reaction between cross-linkers and protein-DNA complexes.

An investigation of more efficient and faster cross-linkers was performed by synthesizing new types of cross-linker. They were then tested on well-known protein systems and found to stabilize more protein complexes in a shorter incubation time, as in the case of hydroxyazabenzotriazole as reactive group.

Finally, this new, most efficient cross-linker, 1,1'-(Suberoyldioxy)Bis azabenzotriazole (SBAT) was used on different kind of protein complexes.

Comparison between native nanoESI-MS and cross-linking combined with MALDI-MS was performed on different types of interactions such as polar interactions, hydrogen bonds or hydrophobic effect. The combination of the newly synthesized cross-linker with MALDI-MS showed regular results in all cases and the possibility to detect complexes, regardless of the nature of the interactions. Conversely, nanoESI-MS does not allow one to detect complexes based on the hydrophobic effect.

All these projects investigated tend to show the efficiency of the use of chemical cross-linking combined with high mass MALDI-MS and show the importance of the role of this new method.

Résumé

Très souvent, les protéines forment des complexes non-covalents avec d'autres espèces moléculaires afin de jouer le rôle de transporteur ou de remplir la fonction pour laquelle elles existent. Pour cela, il est très important de développer des méthodes analytiques adéquates pour analyser les interactions non-covalentes entre protéines. Ces développements en terme de chimie de stabilisation des complexes avant analyse par spectrométrie de masse basée sur la desorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-MS) et diverses applications biologiques sont décrites dans cette thèse. L'utilisation d'un protocole de stabilisation chimique standard combiné à de la détection MALDI-MS haute masse grâce au nouveau détecteur HM de la société CovalX pour l'étude d'un système anticorps-antigène a été le premier exemple rapporté. Différents paramètres, tels que la stoïchiométrie ou la cartographie épitopique, du système associant la protéine prion à un anticorps monoclonal spécifique ont été étudiés par cette technique. Les résultats ainsi obtenus se sont révélés aussi bons, voire meilleurs, que ceux obtenus dans le cas de la méthode de référence choisie, la résonance plasmonique de surface (SPR).

Par la suite, le protocole de stabilisation chimique a été testé sur un système d'interactions entre une protéine et une séquence spécifique d'ADN avant les analyses par MALDI-MS. Les spectres obtenus dans le cas du MALDI-MS ont été comparés à ceux obtenus dans le cas de l'ionisation par electrospray (ESI-MS) dans des conditions non-dénaturantes. Les deux méthodes se sont révélées complémentaires. En effet, la stabilisation chimique n'a été que partiellement efficace et, très probablement, uniquement due à la forte concentration locale du cross-linker sur les protéines. L'observation du comportement de l'ADN, seul, face à la stabilisation chimique a montré une réaction singulière dans le cas du cross-linker soluble dans l'eau, qui n'apparaît pas dans le cas du cross-linker soluble dans un solvant organique. Ces résultats, difficile à rationaliser, restent en cours d'étude.

Par le biais de synthèse de nouveaux types de cross-linkers, un autre aspect de la stabilisation chimique a été étudié dans ces travaux. L'efficacité et la rapidité de réaction entre le cross-linker et la protéine ont été optimisées en changeant le groupement chimique activateur. Ces nouveaux cross-linkers ont ensuite été testés sur des complexes de protéines connus. Il a été démontré que l'un d'entre eux, celui ayant le groupement chimique hydroxyazabenzotriazole comme activateur, est plus efficace (environ 20% de complexe en plus) et cela dans un temps plus court.

Enfin, ce nouveau cross-linker a été employé sur différents types de complexes présentant différents types d'interactions, i.e. polaires ou hydrophobes. Les résultats ont été comparés entre le nanoESI-MS en conditions non-dénaturantes et la stabilisation chimique couplée au MALDI-MS. La stabilisation chimique associée au MALDI-MS s'est révélée être apte à détecter les complexes, quelque soient les interactions à l'origine de ces complexes. Au contraire, le nanoESI-MS n'a pas été capable de détecter les complexes qui sont, partiellement ou totalement, dus aux interactions hydrophobes.

Tous les résultats de ces projets tendent à démontrer l'utilité de la stabilisation chimique combiné au MALDI-MS « haute masse », pour l'étude d'interactions non-covalentes et l'importance du rôle de cette méthode.