ETH zürich

ETH Library

Light-Mediated Identification of Dynamic Surfaceome Interactions

Doctoral Thesis

Author(s):
Müller, Maik

Publication date:
2019

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-b-000404391

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. 26491

LIGHT-MEDIATED IDENTIFICATION OF DYNAMIC SURFACEOME INTERACTIONS

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

MAIK ORELL MÜLLER

MSc ETH

born on December 29th, 1989

citizen of Zürich ZH and Boswil AG, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Bernd Wollscheid, examiner

Prof. Dr. Rudolf Aebersold, co-examiner

Prof. Dr. Annette Oxenius, co-examiner

Prof. Dr. Jason Mercer, co-examiner

2019

Summary

The observable appearance of the human body (the phenotype) is essentially determined by the molecular make-up and dynamic interplay of genes, transcripts and proteins, whose quantitative assessment is a prerequisite for systems biology and medicine to understand and predict molecular health and deviations thereof. However, current approaches in whole genome sequencing, transcriptomics and mass spectrometry-based proteomics are limited to the generation of static inventory lists and to the detection of highly stable intracellular interactions in genetically engineered systems. Therefore, the many transient and often surface-localized molecular interactions that play crucial roles in cell signaling and function remain unknown - essential information for accurate understanding and prediction of phenotypes. This thesis describes the development and application of novel light-controlled chemoproteomic technologies for the understanding of dynamic molecular interconnectivity and a strategy to analyze transient protein signaling interactions with spatiotemporal specificity. The LUX-MS technology thereby enables the identification of dynamic cell surface proteome (surfaceome) interactions with spatial context on living cells without the need for genetic manipulations and is applicable to ligands of every description across diverse organisms.

First, the molecular stage of the surfaceome was set by the development of a miniaturized and automated Cell Surface Capture (autoCSC) technology for the generation of unprecedented quantitative surfaceome snapshots from limited numbers of cells with high sensitivity, reproducibility and throughput, ultimately enabling time-resolved surfaceome profiling (Mueller et al, Nature Communications 2019, accepted; preprint at bioRxiv.org). The application of autoCSC revealed dynamic surfaceome modulations during B-cell development in mice uncovering new functional subpopulations (described in chapter two) and laid the foundation for several ongoing studies in the context of neuronal development (submitted to Nature Comm.; under peer review; preprint at bioRxiv.org, chapter five) and host pathogen interactions (manuscript in preparation & PhD thesis Fabian Wendt, Wollscheid laboratory).

Having the global surfaceome composition delineated in time and space, the light-controlled proximity detection technology LUX-MS was developed to decipher the molecular surfaceome interconnectivity in signaling with spatiotemporal resolution (chapter three). LUX-MS relies on light-controlled Singlet Oxygen Generators (SOGs) which have the ability to tag proteins in nanometer vicinity for mass spectrometry-based identification as demonstrated previously for the detection of ligand-receptor interactions (Glasgow et al., 2016). Within the LUX-MS strategy, high performance SOGs are coupled to (signaling) probes, such as antibodies or small molecules, that redirect the light-induced proximity labeling reaction to target receptors and their microenvironment

on the surface of living cells. By using robot-assisted protein capture and tailored quantitative mass spectrometry, combined with advanced statistical analysis, LUX-MS enables the generation of molecular proximity information in a discovery-driven, time- and spatially resolved fashion. Therefore, LUX-MS provides the technological basis for the elucidation of functional molecular signaling relationships in native biological systems. To demonstrate the broad applicability of the technology, LUX-MS experiments were performed with ligands ranging from peptide hormones and secreted glycoproteins to therapeutic antibodies (chapter three and four). These proof-of-principle applications demonstrated the high sensitivity and specificity of the technology to readily detect binding targets and associated lateral interaction networks implicated in early signaling events and the molecular mode of drug action. Multi-target LUX-MS technology provided evidence for acute receptor-specific neighborhoods that co-exist on cancer cells comprising signaling modulating protein interactions. Bioinformatic integration resulted in the first surfaceome proximity map to date, that demonstrates the molecular nanoscale organization and modular interconnectivity of cellular surfaceome at the time of illumination.

In collaborative, discovery-driven approaches, LUX-MS technology was applied to reveal dynamic surfaceome signaling networks employed by small molecule drugs, antibiotics, intact pathogens and entire immune cells (chapter four). These experiments led to the identification of functional surfaceome interactions that mediate the mechanism of anticancer and antimicrobial drug action, bacteriophage attachment and contact-dependent immune activation in humans, bacteria and mice, respectively. In collaboration with academic and industrial partners, potential antibiotic-targeted interaction networks were validated by establishing and applying an orthogonal photo-affinity mapping technology (chapter five) and led to the discovery of a novel antibiotic mechanism of action that circumvents all current resistance mechanisms (published in Nature 2019 and Science Advances 2018).

In summary, we developed and applied novel light-controlled chemoproteomic technologies for the spatiotemporal elucidation of cell surface interaction networks targeted by ligands of every description on living cells without genetic manipulation. The applications of the technologies demonstrate their broad applicability to reveal the dynamic and modular interconnectivity of the surfaceome and shed new light on the mode of action of small molecule drugs, peptide hormones, intact viral particles, antibiotics and immune cell-cell communication. Therefore, LUX-MS uncovers signaling interaction networks that provide valuable insights into biomedical processes of interest for basic and industrial research and as such is expected to become a general tool for interaction studies in the broader field of life sciences. The thereby accumulating knowledge of molecular interconnectivity will fill essential gaps of a system-wide interaction network ultimately enabling the accurate understanding, prediction and manipulation of phenotypes in health and disease.

Zusammenfassung

Das beobachtbare Erscheinungsbild des menschlichen Körpers (der Phänotyp) wird im Wesentlichen durch den molekularen Aufbau und das dynamische Zusammenspiel von Genen, Transkripten und Proteinen bestimmt. Deren quantitative Bestimmung ist eine Voraussetzung für das systembiologische und medizinische Verständnis und die Vorhersage der molekularen Gesundheit und ihrer Abweichungen. Derzeitige Ansätze zur Analyse des Genoms, des Transkriptoms und des Proteoms mithilfe der Massenspektrometrie beschränken sich jedoch auf die Erstellung statischer Bestandslisten und den Nachweis hochstabiler intrazellulärer Wechselwirkungen in meist gentechnisch veränderten Systemen. Daher sind die vielen vorübergehenden und häufig oberflächenlokalisierten molekularen Wechselwirkungen, die für die Signalübertragung und Funktion von Zellen von entscheidender Bedeutung sind, unbekannt - eine wichtige Information für das genaue Verständnis und die Vorhersage von Phänotypen. Diese Dissertation beschreibt die Entwicklung und Anwendung neuartiger lichtgesteuerter chemoproteomischer Technologien zum Verständnis der dynamischen molekularen Interkonnektivität und vermitteln eine Strategie zur Analyse transienter Protein-Signalwechselwirkungen mit räumlich-zeitlicher Spezifität. Die LUX-MS-Technologie ermöglicht dabei die Identifizierung dynamischer Interaktionen des Zelloberflächen-Proteoms (Surfaceome) mit räumlichem Kontext und in lebenden Zellen. Die Technologie ist auf Liganden aller Art über verschiedene Organismen hinweg und ohne die Notwendigkeit von genetischen Manipulationen anwendbar.

Zuerst wurde die molekulare Zusammensetzung des Surfaceoms durch die Entwicklung einer miniaturisierten und automatisierten Cell Surface Capture (autoCSC) Technologie bestimmt mit der beispiellose quantitative Surfaceome-Schnappschüsse aus einer begrenzten Anzahl von Zellen mit hoher Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Durchsatzrate erstellt werden können (Mueller et al., Nature Communications 2019, akzeptiert; Preprint bei bioRxiv.org). Die Anwendung von autoCSC zeigte dynamische Oberflächenmodulationen während der B-Zell-Entwicklung bei Mäusen, die die Identifizierung neuer funktioneller Subpopulationen ermöglichte (siehe Kapitel 2), und legte den Grundstein für mehrere laufende Studien im Zusammenhang mit der neuronalen Entwicklung (eingereicht bei Nature Comm .; unter Peer Review, Preprint bei bioRxiv.org, Kapitel 5) und Pathogen-Wirt-Interaktionen (Manuskript in Vorbereitung & Dissertation Fabian Wendt, Wollscheid Lab).

Nach der Bestimmung der Surfaceom-Zusammensetzung in Raum und Zeit wurde die lichtgesteuerte chemoproteomische Technologie LUX-MS entwickelt, welche die Signal-relevante Interkonnektivität des Surfaceom mit räumlicher und zeitlicher Auflösung entschlüsselt (Kapitel 3). LUX-MS stützt sich auf lichtgesteuerte Singulett-Sauerstoffgeneratoren (SOGs), mit denen Proteine in Nanometernähe markiert werden

können, um sie massenspektrometrisch identifizieren zu können, wie bereits für den Nachweis von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen gezeigt wurde (Glasgow et al., 2016). Im Rahmen der LUX-MS-Strategie werden Hochleistungs-SOGs an (signal-relevante) Liganden wie Antikörper oder kleine Moleküle gekoppelt, die die lichtinduzierte Annäherungsmarkierungsreaktion auf Zielrezeptoren und deren Mikroumgebung auf der Oberfläche lebender Zellen umleiten. Mithilfe der robotergestützten Protein Aufreinigung und maßgeschneiderten quantitativen Massenspektrometrie in Kombination mit fortschrittlichen statistischen Analysen ermöglicht LUX-MS molekulare Nachbarschaften auf der Zelloberfläche zu erfassen. LUX-MS liefert daher die technologische Grundlage für die Aufklärung funktionaler molekularer Signalbeziehungen in natürlichen biologischen Systemen. Um die breite Anwendbarkeit der Technologie zu demonstrieren, wurden LUX-MS-Experimente mit verschiedenen Liganden durchgeführt, die von Peptidhormonen und sekretierten Glykoproteinen bis zu therapeutischen Antikörpern reichten (Kapitel drei und vier). Diese Proof-of-Principle-Anwendungen zeigten die hohe Sensitivität und Spezifität der Technologie zum Nachweis von Bindungszielen und zugehörigen lateralen Interaktionsnetzwerken, die an frühen Signalereignissen und der molekularen Wirkungsweise von Arzneimitteln beteiligt sind. Die LUX-MS-Technologie in Kombination mit verschiedenen Antikörpern lieferte Hinweise auf akute rezeptorspezifische Nachbarschaften, die gleichzeitig auf Krebszellen existieren und die signalmodulierende Proteinwechselwirkungen umfassen. Die bioinformatische Integration führte zu der ersten Surfaceom Nachbarschaftskarte, die die molekulare Nanoorganization und die modulare Interkonnektivität des zellulären Surfaceoms zum Zeitpunkt der Beleuchtung demonstriert.

In kollaborativen, entdeckungsgetriebenen Experimenten wurde die LUX-MS-Technologie eingesetzt, um dynamische oberflächenaktive Signalnetzwerke aufzudecken, die von niedermolekularen Wirkstoffen, Antibiotika, intakten Krankheitserregern und ganzen Immunzellen etabliert werden (Kapitel 4). Diese Experimente führten zur Identifizierung funktioneller Oberflächenwechselwirkungen, die den Mechanismus der antikrebs und der antimikrobiellen Arzneimittelwirkung, der Bindung von Bakteriophagen und der kontaktabhängigen Immunaktivierung bei Menschen, Bakterien bzw. Mäusen vermitteln. In Zusammenarbeit mit akademischen und industriellen Partnern wurden potenzielle auf Antibiotika ausgerichtete Interaktionsnetzwerke validiert, indem eine orthogonale Photoaffinitätskartierungstechnologie entwickelt und angewendet wurde (Kapitel 5). Dies führte zur Entdeckung eines neuartigen Wirkmechanismus für Antibiotika, der alle aktuellen Resistenzmechanismen umgeht (veröffentlicht in Nature 2019 und in Science Advances 2018).

Zusammenfassend haben wir neuartige lichtgesteuerte chemoproteomische Technologien entwickelt und angewendet, um die räumlich-zeitliche Aufklärung von Zelloberflächen-Interaktionsnetzwerken zu ermöglichen, auf die Liganden aller Art auf lebenden Zellen ohne genetische Manipulation abzielen. Die Anwendungen der Technologien zeigen ihre breite Anwendbarkeit, um die dynamische und modulare

Interkonnektivität des Surfaceoms aufzuzeigen und um die Wirkungsweise von niedermolekularen Wirkstoffen, Peptidhormonen, intakten Viruspartikeln, Antibiotika und die Kommunikation zwischen Immunzellen neu zu beleuchten. LUX-MS deckt daher Signal-vermittelnde Interaktionsnetzwerke auf, die wertvolle Einblicke in biomedizinische Prozesse liefern, die für die Grundlagen- und Industrieforschung von hohem Interesse sind, und wird voraussichtlich ein allgemeines Werkzeug für Interaktionsstudien im breiteren Bereich der Biowissenschaften werden. Das dabei akkumulierte Wissen über molekulare Interkonnektivität wird wesentliche Lücken eines systemweiten Interaktionsnetzwerks füllen und letztendlich das genaue Verständnis, die Vorhersage und die Manipulation von Phänotypen in Bezug auf Gesundheit und Krankheit ermöglichen.