

Diss. ETH N° 19898

# **Shedding Light on Chemical Cross- linking with Mass Spectrometry**

**DISSERTATION**

submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
**DOCTOR OF SCIENCES**

by

**STEFANIE MÄDLER**

Dipl.-Chem., Technische Universität Dresden, Germany

born January, 4<sup>th</sup>, 1983

German citizen

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Renato Zenobi, examiner  
Prof. Dr. Rudolf Aebersold, co-examiner

2011

---

## V. Abstract

Chemical cross-linking, i.e. the covalent stabilization of noncovalent intra- or intermolecular interactions, has been extensively used to probe biomolecular communication. In combination with mass spectrometry (MS), it allows for the determination of low-resolution three-dimensional tertiary or quaternary structures of proteins, which includes complex stoichiometries and interaction sites. The high sensitivity, low sample consumption, high specificity and the enormous information content provided by mass spectrometric methods exhibit significant advantages over other analytical methods. Despite the wide-spread application of chemical cross-linking in combination with mass spectrometry, the details of the stabilization step are not yet fully understood. This work intends to shed light on the reaction mechanism, the specificity, and the application range of chemical cross-linking to probe noncovalent interactions with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) MS. As cross-linkers, amine-reactive N-hydroxysuccinimide (NHS) esters were chosen due to their widespread application to stabilize noncovalent interactions involving proteins. Using model peptides with a limited number of reactive sites, the presence of side reactions involving hydroxyl side chains, such as threonine, serine and tyrosine, were uncovered, in addition to the primary reaction with the  $\alpha$ - and the  $\epsilon$ -amino group of the N-terminus and lysine, respectively. Catalytic mechanisms encompassing the side chains of histidine and arginine explained the elevated reactivity of hydroxyl groups in a large number of cases. Besides the reaction mechanism, possibilities of extending the application range of chemical cross-linking and MALDI-MS were studied. In order to test the suitability of this approach for quantitative investigations, cross-linking experiments with polypeptide complexes covering a wide range of binding affinities were carried out. For high- to mid-affinity interactions, high specificity and a surprisingly good correlation with the solution-phase composition was observed in the MALDI mass spectra after chemical cross-linking. In the case of low-affinity complexes with dissociation constants in the  $10^{-4}$  M range, the need for elevated concentrations to obtain a detectable amount of cross-linked complex can lead to unspecific encounters of reaction partners. The data suggest that chemical cross-

linking and MALDI-MS could be a useful tool to rank binding affinities, provided that interaction partner concentrations below 30  $\mu\text{M}$  yield a significant amount of stabilized specific complex and comparable cross-linking and detection efficiencies are available. The extension of the described analytical method to homomeric protein complexes, i.e. large assemblies containing multimers of the same subunit, has been hampered by the potential overlap of subunit signals with peaks related to multiply charged ions of higher-order assemblies. The use of negative, instead of positive ion mode detection revealed a lower fraction of multiply charged ions and a lower dependence of the spectral relative intensities on sample preparation and instrumental parameters. For these reasons, chemical cross-linking with negative ion mode MALDI-MS seems to be a more reliable tool than positive ion mode analysis for the determination of cross-linking yields and subunit compositions of homomeric protein complexes. In summary, this work gives detailed insights into the reaction mechanism of NHS esters and paves the way for quantitative applications of chemical cross-linking and MALDI-MS.

---

## VI. Zusammenfassung

Chemische Quervernetzung, d.h. die kovalente Stabilisierung nichtkovalenter intra- oder intermolekularer Wechselwirkungen, findet breite Anwendung in der Erforschung biomolekularer Kommunikation. In Verbindung mit Massenspektrometrie (MS) erlaubt es die Untersuchung dreidimensionaler tertiärer oder quaternärer Strukturen von Proteinen mit niedriger Auflösung. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität, des niedrigen Verbrauchs an Probenmaterial, der hohen Spezifität und dem grossen Informationsgehalt der Daten haben massenspektrometrische Untersuchungsmethoden bedeutende Vorteile gegenüber alternativen analytischen Techniken. Obwohl chemische Quervernetzung verknüpft mit massenspektrometrischer Detektion weit verbreitet ist, sind die Details des Stabilisierungsschrittes nur unvollständig bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Reaktionsmechanismus, die Spezifität und den möglichen Anwendungsbereich chemischer Quervernetzung mit Matrix-unterstützter Laser-Desorptions-/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) zu beleuchten. Als Vernetzer wurden hierfür N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester), welche eine hohe Reaktivität gegenüber der  $\alpha$ -Aminogruppe des N-Terminus und der  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenketten von Proteinen zeigen, aufgrund ihrer weiten Verbreitung zur Stabilisierung nichtkovalenter Wechselwirkungen eingesetzt. Mit Hilfe von Modellpeptiden, welche nur eine stark begrenzte Anzahl an nukleophilen Seitenketten aufwiesen, konnten Nebenreaktionen mit Hydroxylseitenketten von Threoninen, Serinen und Tyrosinen nachgewiesen werden. Katalysemechanismen, welche die Seitenketten von Histidinen und Argininen involvieren, konnten die erhöhten Reaktivitäten einzelner Aminosäuren zum grossen Teil erklären. Zusätzlich zum Reaktionsmechanismus wurde untersucht, inwiefern der Anwendungsbereich von chemischer Quervernetzung erweitert werden kann. Um die bisherige Beschränkung auf qualitative Anwendungen aufzuheben, wurden Vernetzungsexperimente mit Polypeptidkomplexen bekannter Affinität durchgeführt. Die jeweiligen Bindungspartner wurden so ausgewählt, dass ein breiter Bereich an Bindungskonstanten abgedeckt wurde. Für Komplexe mit mittlerer bis hoher Affinität wurden nach dem

Vernetzungsschritt MALDI-Massenspektren aufgenommen, die die erwarteten Verhältnisse zwischen Komplexen und ungebundenen Komplexpartnern sehr gut widerspiegeln. Im Falle von Komplexen mit niedriger Affinität und Dissoziationskonstanten im  $10^{-4}$ -molaren Bereich wurden unspezifische Reaktionen durch die hohen Probenkonzentrationen, die nötig waren, um eine ausreichende Menge an Komplex detektieren zu können, verursacht. Dies äusserte sich vor allem in unverhältnismässig hohen Intensitäten der stabilisierten Komplexe. Die erhaltenen Daten sprechen dafür, dass chemische Quervernetzung verknüpft mit MALDI-MS als wirksame analytische Technik eingesetzt werden kann, um Komplexe nach ihrer Bindungsaffinität zu ordnen. Dies setzt voraus, dass Probenkonzentrationen von weniger als  $30 \mu\text{M}$  eine ausreichende Menge an Komplex liefern. Die Ausweitung dieser Methode zur Analyse von homomeren Proteinkomplexen, d.h. auf Multimere einer einzelnen Untereinheit, war bislang durch die Überlappung von einfach- mit mehrfachgeladenen Ionen verschiedener Oligomere erschwert. Die Verwendung von negativem, anstatt positivem Detektionsmodus könnte dieses Problem beseitigen, da deutlich weniger mehrfachgeladene Ionen auftreten und der Einfluss von Probenvorbereitungsparametern weniger stark ausgeprägt ist. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der negative Detektionsmodus in vielen Fällen bessere Resultate bietet als der positive Modus. Zusammenfassend liefert diese Dissertation detaillierte Einblicke in den Reaktionsmechanismus von NHS-Estern mit Proteinen und ebnet den Weg für quantitative Untersuchungen mithilfe von chemischer Quervernetzung und MALDI-MS.