

Abstract

Investigation of Molecular Processes Inside Cells by the Help of Crosslinking Mass Spectrometry

by Fabian SCHILDHAUER
ORCID: 0000-0003-2498-7324

A fundamental understanding of the relationship between protein structure and function is essential for gaining a deeper understanding of complex biological systems. The principle that structure essentially dictates function has driven the development of numerous techniques aimed at determining the three-dimensional structures of proteins and protein complexes outside and inside cells. One particularly promising method is crosslinking mass spectrometry (CLMS), which enables the investigation of protein-protein interactions and structures.

In this study, the combination of CLMS and proximity labeling techniques were employed to examine the structural landscape and interactome within the lumen of human mitochondria from intact cells. Selective enrichment of mitochondrial proteins and distance information from intact cells using this innovative method surpasses traditional biochemical methods, such as the isolation of mitochondria from cells. This technique provided valuable insights into the mitochondrial protein interactome and facilitated the identification and validation of known and unknown protein interactions. Furthermore, in this study, the technology was advanced to facilitate the native elution of captured material, rendering it suitable for single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM).

In the second part of the study, the previous unknown interaction between two mitochondrial proteins, apoptosis-inducing factor 1 (AIFM1) and adenylate kinase 2 (AK2), was subjected to biochemical characterization. The structure of the AIFM1 / AK2 complex was elucidated with a resolution of 4.6 Ångströms, highlighting the crucial role played by the C-terminus of AK2 in the interaction. This structural insight provided valuable information on the molecular dynamics and stabilization of the complex. By describing the biochemical characterization of the AIFM1-AK2 complex and its interaction networks, this work supports the theory of an ATP-catalysome, which serves as the foundation for the regulation of cellular nucleotide homeostasis.

This study represents a significant breakthrough in the field of CLMS by enabling the extraction of distance information from native cellular environments. Moreover, the captured sub-cellular proteomes obtained through this method hold immense potential for their application in cryo-EM studies. Together, these advancements offer valuable insights into protein structures and their functional dynamics within the intricate cellular context.

Zusammenfassung

Investigation of Molecular Processes Inside Cells by the Help of Crosslinking Mass Spectrometry

von Fabian SCHILDHAUER
ORCID: 0000-0003-2498-7324

Ein grundlegendes Verständnis der Beziehung zwischen Proteinstruktur und Funktion ist entscheidend, um ein tieferes Verständnis komplexer biologischer Systeme zu erlangen. Die Prämisse, dass die Struktur im Wesentlichen die Funktion bestimmt, hat die Entwicklung zahlreicher Techniken vorangetrieben, die darauf abzielen, die dreidimensionalen Strukturen von Proteinen und Protein-Komplexen sowohl außerhalb als auch innerhalb von Zellen zu bestimmen. Eine besonders vielversprechende Methode ist die Crosslinking-Massenspektrometrie (CLMS), die die Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und Strukturen ermöglicht.

In dieser Studie wurden CLMS und Markierungstechniken kombiniert, um Strukturinformationen und das Interaktom im Lumen der menschlichen Mitochondrien aus intakten Zellen zu untersuchen. Die selektive Anreicherung mitochondrialer Proteine und Strukturinformationen aus intakten Zellen mithilfe dieser innovativen Methode übertrifft traditionelle biochemische Methoden, wie die Isolierung von Mitochondrien aus Zellen. Diese Technik lieferte wertvolle Einblicke in das mitochondriale Proteininteraktom und erleichterte die Identifikation und Validierung bekannter und neuer Proteininteraktionen. Darüber hinaus wurde in dieser Studie die Technologie weiterentwickelt, um die native Elution des erfassten Materials zu ermöglichen, was sie für die Einzelpartikel-Kryo-Elektronenmikroskopie (cryo-EM) zugänglich macht.

Im zweiten Teil der Studie wurde die zuvor unbekannte Wechselwirkung zwischen zwei mitochondrialen Proteinen, Apoptose-induzierender Faktor 1 (AIFM1) und Adenylatkinase 2 (AK2), einer biochemischen Charakterisierung unterzogen. Die Struktur des AIFM1 / AK2-Komplexes wurde mit einer Auflösung von 4,6 Ångström aufgeklärt und betonte die entscheidende Rolle des C-Terminus von AK2 in der Wechselwirkung. Dieser strukturelle Einblick lieferte wertvolle Informationen über die molekulare Dynamik und Stabilisierung des Komplexes. Durch die Beschreibung der biochemischen Charakterisierung des AIFM1-AK2-Komplexes und seiner Interaktionsnetzwerke unterstützt diese Arbeit die Theorie eines ATP-Katalysoms, das als Grundlage für die Regulation der zellulären Nukleotidhomöostase dient. Diese Studie stellt einen bedeutenden Durchbruch im Bereich der CLMS dar, indem sie die Extraktion von Strukturinformationen aus lebenden zellulären Umgebungen ermöglicht. Darüber hinaus bieten die durch diese Methode gewonnenen subzellulären Proteome ein enormes Potenzial für ihre Anwendung in cryo-EM-Studien. Zusammenfassend bieten diese Fortschritte wertvolle Einblicke in Proteinstrukturen und ihre funktionelle Dynamik innerhalb des komplexen zellulären Kontexts.