



# Simultane Untersuchung kinetischer, ortsspezifischer und struktureller Aspekte enzymatischer Proteinphosphorylierungen\*\*

Michiel van de Waterbeemd, Philip Lössl, Violette Gautier, Fabio Marino, Masami Yamashita, Elena Conti, Arjen Scholten und Albert J. R. Heck\*

**Abstract:** Die Phosphorylierung von Proteinen ist ein weit verbreiteter Prozess, welcher die mechanistische Grundlage für zelluläre Signalübertragung bildet. Derzeit werden Aspekte wie Ortsspezifität, Reaktionskinetik, der Einfluss von Kofaktoren und Struktur-Funktions-Beziehungen meist mit mehreren, untereinander nicht kompatiblen Methoden untersucht. Die hier vorgestellte Strategie vervielfacht die aus Protein- und Proteinkomplexphosphorylierungen ableitbaren Informationen und verlangt nur minimale Probenvorbereitung. Mithilfe hochauflösender nativer Massenspektrometrie verfolgen wir den konsekutiven Einbau von Phosphatgruppen in intakte Proteinkomplexe und lokalisieren deren Sequenzposition mittels Peptid-LC-MS/MS. Anhand von zwei Modellsystemen, der Kofaktor-abhängigen Autophosphorylierung von Proteinkinase G sowie dem Zusammenwirken von Aurora-Kinase A und Bora, sowohl als Enzym-Substrat-Paar als auch als stabiler Proteinkomplex, demonstrieren wir, wie verschiedene Gesichtspunkte des Phosphorylierungsprozesses simultan untersucht werden können.

Phosphorylierungsreaktionen, in denen Phosphotransferasen (Kinasen) anorganisches Phosphat von Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) auf Substrat-Aminosäuren (hauptsächlich Threonin, Serin und Tyrosin) übertragen, stellen einen universellen Prozess in biologischen Systemen dar, durch den Aktivität, Konformation, Lokalisierung, Oligomerisierungszustand und/oder das Bindungsverhalten gegenüber Substratproteinen beeinflusst werden können. Zudem ist die

Phosphorylierung die Grundlage für eine Vielzahl zellulärer Signalprozesse.<sup>[1]</sup> Globale Hochdurchsatzanalysen dynamischer Proteinphosphorylierungsprozesse (Phosphoproteomik) sind heutzutage möglich, und Datensätze mit mehr als 10000 identifizierten Phosphorylierungsstellen pro Experiment wurden veröffentlicht.<sup>[2]</sup> Um die funktionellen Implikationen des Proteinphosphorylierungsprozesses vollständig zu erfassen, sind jedoch tiefergehende, breitgefächerte und mehrdimensionale Niedrigdurchsatzanalysen nötig. Gegenwärtig werden die verschiedenen Ebenen der Proteinphosphorylierung meist separat unter Verwendung fundamental verschiedener Methoden untersucht, die verschiedenartige Probenvorbereitungen oder sogar die Verwendung spezifisch konstruierter Proteinvarianten erfordern. Zunächst können auf Aminosäuresequenzebene Phosphorylierungsstellen-spezifische Antikörper<sup>[3]</sup> oder massenspektrometrische Proteomanalytik genutzt werden, um ortsspezifische Informationen, z.B. über Kinase-spezifische Erkennungssequenzen oder mögliche Interdependenz modifizierter Stellen, zu erlangen.<sup>[4]</sup> Zweitens können kinetische biochemische Analysen, z.B. radiometrische oder Fluoreszenz-/Lumineszenz-basierte Messungen, durchgeführt werden, um die Reaktionsgeschwindigkeiten jedes Enzym-Substrat-Paars sowie den Einfluss von Kofaktoren oder Umweltbedingungen auf die (De-)Aktivierung oder Inhibierung von Kinasen zu untersuchen.<sup>[5]</sup> Drittens lassen sich strukturelle Konsequenzen des Phosphorylierungereignisses, unter anderem Änderungen im Hinblick auf Proteinkonformation oder -oligomerisierungsstatus sowie Proteinkomplexbildung oder -dissoziation,<sup>[6]</sup> mithilfe strukturbiologischer Methoden wie kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR), Röntgenkristallographie und Elektronenmikroskopie aufklären.<sup>[7]</sup>

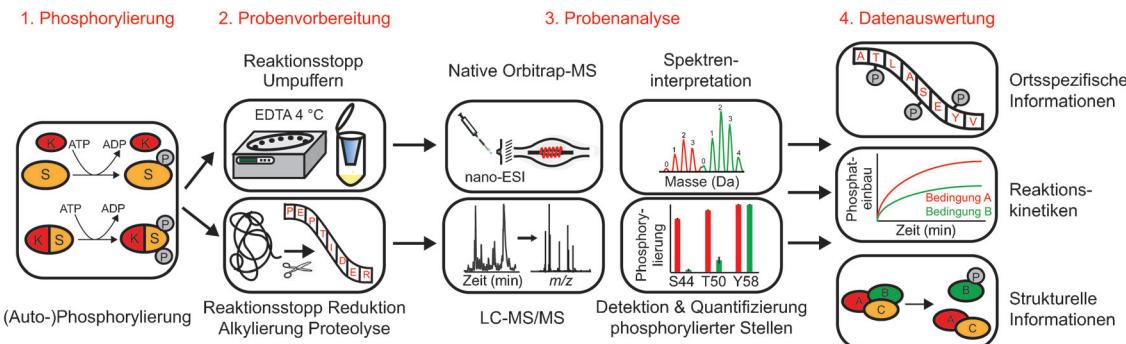
Idealerweise sollten diese drei Ebenen der Proteinphosphorylierung gleichzeitig unter Verwendung einer einzigen Methode zugänglich sein. Die massenspektrometrische Untersuchung von Proteinen und Proteinkomplexen unter nicht denaturierenden Bedingungen (native Massenspektrometrie)<sup>[8]</sup> kann potenziell Aufschlüsse über sowohl strukturelle als auch kinetische Gesichtspunkte geben, da der Einbau von Phosphat aufgrund einer charakteristischen Massenzunahme von nominell 80 Da identifiziert werden kann und die nicht denaturierenden Bedingungen zudem die Detektion von Veränderungen innerhalb nichtkovalent verbundener Proteinkomplexe ermöglichen. Da die Massenzunahme von Proteinen und Proteinkomplexen infolge von Phosphateinbau minimal ist (< 0.5 %), erfordert die detaillierte Aufzeichnung aufeinanderfolgender Phosphorylierungereignisse eine ausreichend hohe Massenauflösung. Wir haben im Jahr 2012 einen Orbitrap-Massenanalysator mit erweitertem Massen-

[\*] M. van de Waterbeemd,<sup>[+]</sup> P. Lössl,<sup>[+]</sup> Dr. V. Gautier, F. Marino, Dr. A. Scholten, Prof. Dr. A. J. R. Heck  
Biomolecular Mass Spectrometry and Proteomics  
Bijvoet Center for Biomolecular Research und  
Utrecht Institute for Pharmaceutical Sciences und  
Netherlands Proteomics Center, Utrecht University  
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht (Niederlande)  
E-Mail: a.j.r.heck@uu.nl  
Dr. M. Yamashita, Prof. Dr. E. Conti  
Forschungsgruppe Zelluläre Strukturbioologie  
Max-Planck-Institut für Biochemie  
Am Klopferspitz 18, 82152 Martinsried (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

[\*\*] Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Netherlands Proteomics Center und das FOM-Institut (Projekt 12PR3033-2), sowie durch die Projekte ManiFold (Förderungsnummer 317371) und PRIME-XS (Förderungsnummer 262067), die beide durch das 7. Rahmenprogramm der Europäischen Union finanziert werden.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201404637> zu finden.



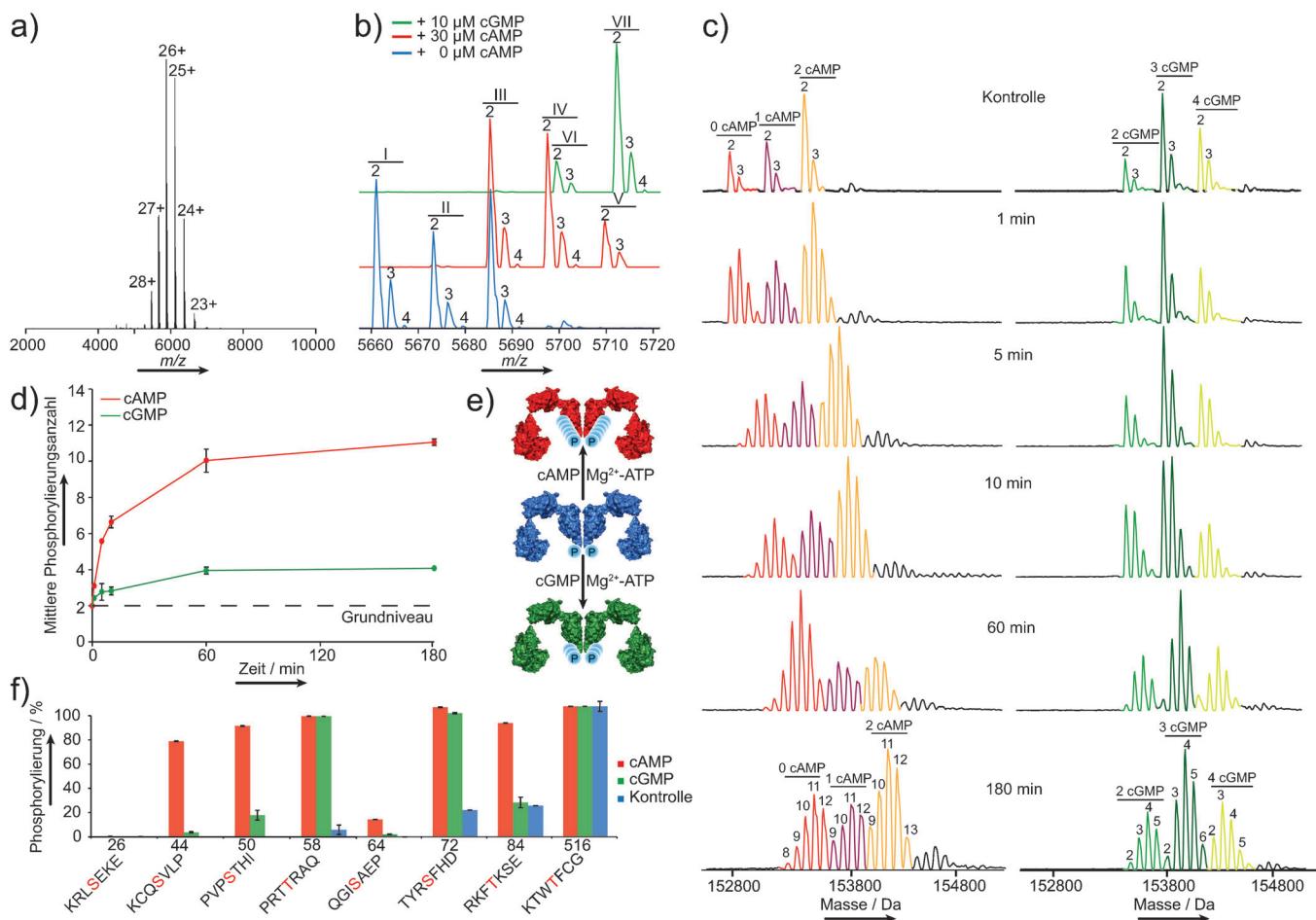
**Abbildung 1.** Übersicht der ganzheitlichen MS-basierten Strategie zur Untersuchung von Proteinphosphorylierung. 1) Eine Kinase (K) und ihr Substrat (S) werden mit  $Mg^{2+}$ , ATP und anderen essenziellen Kofaktoren inkubiert, um die (Auto-)Phosphorylierung zu initiieren. 2,3) Die Proben werden aufgeteilt und für die Analyse mittels hochauflösender nativer Orbitrap-MS (oben) oder „Bottom-up“-LC-MS/MS (unten) vorbereitet. 4) Die Auswertung der Daten liefert Informationen zu Aminosäuresequenz, Reaktionskinetik und Proteinstruktur.

bereich vorgestellt,<sup>[9]</sup> der eine sehr hohe Auflösung bietet und es z. B. ermöglicht, die komplexen Glykosylierungsprofile von Antikörpern aufzulösen.<sup>[10]</sup> Unter Verwendung dieses Messgeräts haben wir eine Strategie entwickelt, um die aus Proteinphosphorylierungen ableitbaren Informationen zu vervielfachen und gleichzeitig Probenvorbereitung, -verbrauch und Analysezeit zu minimieren. Die hochauflösende massenspektrometrische Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen ermöglicht eine Grundlinienauflösung unterschiedlich phosphorylierter Proteoformen, sodass die Anzahl nacheinander eingebauter Phosphatgruppen ermittelt, alle auftretenden Phosphoisoformen relativ quantifiziert und Änderungen auf der Ebene nichtkovalerter Proteinwechselwirkungen erfasst werden können. Um auch Erkenntnisse auf Aminosäuresequenzebene zu erlangen, haben wir diese Methode noch erweitert und dieselben phosphorylierten Proteine, die für die nativen MS-Experimente vorbereitet worden waren, zusätzlich mittels „Bottom-up“-Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert. Dies erbrachte umfangreiche sequenz- und ortsspezifische Informationen über das Phosphorylierungereignis. Der in Abbildung 1 dargestellte allgemeingültige Arbeitsablauf eröffnet somit die Möglichkeit, Daten zu allen beschriebenen Facetten der Proteinphosphorylierung zu erzeugen.

Wir wenden unsere Strategie auf zwei herausfordernde Systeme an: die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), die durch Bindung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) oder cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aktiviert wird und Aminosäuren ihres eigenen N-Terminus phosphoryliert,<sup>[11]</sup> und Aurora-Kinase A (AurA), die ihren Wechselwirkungspartner, das Protein Aurora Borealis (Bora), phosphoryliert.<sup>[12]</sup> PKG ist stark exprimiert in glatten Muskelzellen, Thrombozyten sowie bestimmten Bereichen des Gehirns und trägt wesentlich zur synaptischen Aktivität sowie zur Kontraktion der glatten Muskulatur bei.<sup>[13]</sup> Das Zusammenspiel von Aurora-Kinase A und Bora ist Voraussetzung für den Eintritt eukaryotischer Zellen in die Mitose, da beide Proteine einen Komplex bilden und gemeinsam die Polo-ähnliche Kinase 1 (Plk1) aktivieren.<sup>[12]</sup> Hier demonstrieren wir das Potenzial unseres ganzheitlichen massenspektrometrischen Ansatzes zur simultanen Charakterisie-

rung ortsspezifischer, kinetischer und struktureller Aspekte dieser enzymatischen Phosphorylierungsreaktionen.

Zunächst haben wir unbehandelte PKG mit nativer MS untersucht (Abbildung 2a). Das auf Grundlage des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses ( $m/z$ ) benachbarter Intensitätsmaxima innerhalb der Ladungszustandsverteilung<sup>[14]</sup> berechnete Molekulargewicht von 152817.6 Da stimmt mit der für PKG-Homodimere zu erwartenden Masse überein (Tabelle S1). Abbildung 2b zeigt, dass infolge des Proteinaufreinigungsverfahrens bis zu 2 cAMP-Moleküle immanent an PKG gebunden sind und dass, bei Inkubation mit 30  $\mu\text{M}$  cAMP, der Beladungszustand auf 4 cAMP-Moleküle ansteigt (Spezies I–V). In Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  cGMP werden 3–4 nicht kovalent an PKG gebundene cGMP-Moleküle detektiert (Spezies VI–VII). In Übereinstimmung mit der bekannteren höheren Affinität von PKG gegenüber cGMP<sup>[15]</sup> verdrängen diese alle anfänglich gebundenen cAMP-Moleküle, wie durch die experimentell bestimmte Masse belegt wird. Dank des hohen Auflösungsvermögens der Orbitrap können wir nicht nur die Anzahl der an PKG gebundenen cyclischen Nukleotide zählen, sondern auch zwischen unterschiedlich phosphorylierten Isoformen jedes Protein-Kofaktor-Komplexes unterscheiden. Es wird deutlich, dass die dominierende Proteoform des PKG-Dimers stets 2 Phosphate gebunden hat (Abbildung 2b). Um zu untersuchen, wie die Bindung cyclischer Nukleotide die PKG-Autophosphorylierung stimuliert, haben wir PKG und cAMP oder cGMP in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  und ATP inkubiert und den Zeitverlauf der Reaktion mit nativer MS verfolgt. Wir konnten PKG-Spektren mit einer Massenauflösung von ca. 6000 (gemäß Halbwertsbreite) messen, wodurch eine Grundlinienauflösung aller Phosphoisoformen ermöglicht wurde. Die zunehmende Bindung von Phosphatgruppen wird durch eine kontinuierliche Signalverschiebung zu höheren  $m/z$ -Werten veranschaulicht. In Gegenwart von cAMP oder cGMP detektieren wir bis zu 13 bzw. 6 Phosphorylierungen des PKG-Dimers (Abbildung 2c). Insgesamt identifizieren wir 56 Proteoformen der PKG/Nukleotid-Komplexe (siehe Tabellen S1 und S2). Durch Dekonvolution der Massenspektren zum Ladungszustand  $z=0$  konnten wir, auf Grundlage der relativen Signalintensitäten, die gewichtete mittlere Anzahl eingebauter Phosphate berechnen (Abbildung 2d). Wie in Abbildung 2e dargestellt, ist

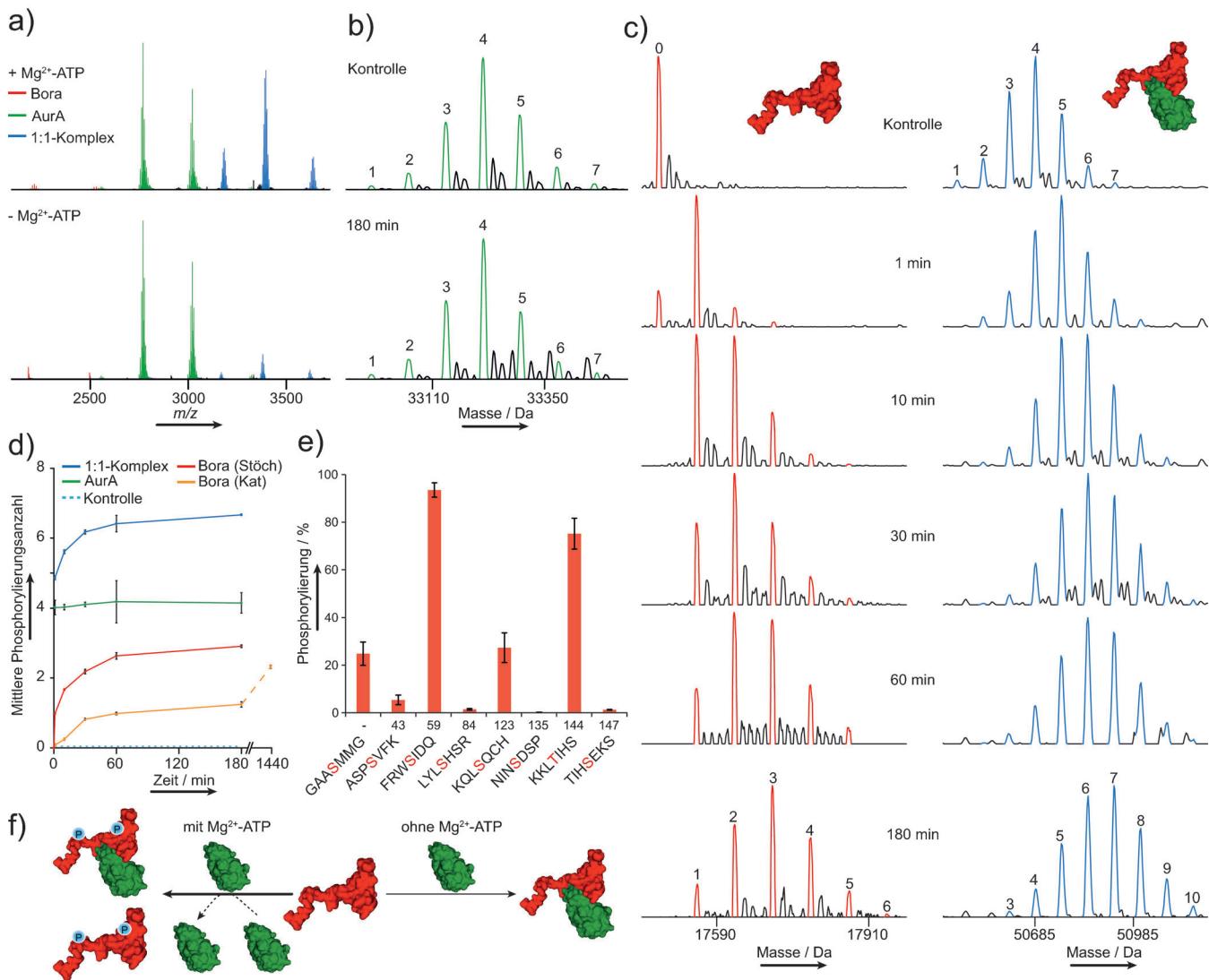


**Abbildung 2.** Umfassende Analyse der cAMP- und cGMP-vermittelten Autophosphorylierung von PKG mit nativer und „Bottom-up“-MS. a) Vollständiges natives Massenspektrum dimerer PKG. Die von dieser Ladungszustandsverteilung abgeleitete Masse beträgt 152817.6 Da. b) Vergrößerte  $[M+27H]^{27+}$ -Signale und der beobachteten Massenverschiebungen infolge der Zugabe von cAMP oder cGMP. Die arabischen Ziffern entsprechen der Anzahl gebundener Phosphatgruppen, während die römischen Zahlen verschiedene Nukleotid-Beladungszustände repräsentieren. c) Die nativen Massenspektren verdeutlichen die fortschreitende Autophosphorylierung von PKG nach Inkubation mit  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP und cAMP oder cGMP. d) Zeitabhängige Entwicklung der gewichteten mittleren Anzahl von PKG-Autophosphorylierungen in Gegenwart von cAMP oder cGMP. e) Schematische Darstellung der unterschiedlichen Autophosphorylierung von PKG in Gegenwart von cAMP oder cGMP. f) Identifizierung und Quantifizierung phosphorylierter PKG-Aminosäuren mittels „Bottom-up“-LC/MS-MS.

die maximale Zahl an Phosphorylierungen für PKG-cAMP-Komplexe deutlich höher als für PKG-cGMP-Komplexe. Diese Erkenntnis wird durch die quantitative „Bottom-up“-LC-MS/MS-Analyse der Proben, die den finalen Zeitmesspunkt repräsentieren, bestätigt (Abbildung 2 f). In Übereinstimmung mit den nativen MS-Daten identifizieren wir lediglich 3 stark phosphorylierte Aminosäuren pro PKG-Monomer in cGMP-gebundenem Zustand aber 6 stark phosphorylierte Aminosäuren für PKG-cAMP-Komplexe. Alle Phosphorylierungsstellen sind im Bereich des N-Terminus lokalisiert. Passend zur Identifizierung von 2 Phosphorylierungen des aufgereinigten PKG-Dimers, ist die in der Aktivierungsschleife gelegene Aminosäure Thr516 auch ohne Inkubation mit  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP vollständig phosphoryliert.

Im Folgenden wollten wir diesen Arbeitsablauf auf die Untersuchung der Interaktion der Kinase-Domäne von Aurora Kinase A (32.9 kDa) mit einem N-terminalen Fragment von Bora (17.5 kDa) anwenden. Die Analyse von AurA

und Bora (molares Verhältnis 1:2) mit nativer MS bestätigt die zuvor von Hutterer et al. beschriebene<sup>[12b]</sup> Bildung eines 1:1-Komplexes nach Inkubation mit  $\text{Mg}^{2+}$  und ATP (Abbildung 3a). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Koimmunfällungsstudien mit AurA und Volllängen-Bora<sup>[16]</sup> beobachten wir Komplexbildung auch in Abwesenheit von  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP, also mit nicht phosphoryliertem Bora. Nach Inkubation mit  $\text{Mg}^{2+}$ -ATP ist die Komplexbildung jedoch vollständiger, was auf eine höhere AurA-Bindungsaffinität von phosphoryliertem Bora hindeutet. Da wir mit unserem nativen MS-Ansatz Basislinienauflösung für alle Phosphoisoformen von AurA, Bora und dem 1:1-Komplex erreicht haben, war es uns möglich, die Enzym-Substrat-Beziehung von AurA und Bora zeitabhängig zu untersuchen. Humane AurA, nach Überexpression aufgereinigt aus *E. coli*, trägt bis zu 7 Phosphatgruppen. Quantitative „Bottom-up“-LC-MS/MS-Experimente belegen 100 % Phosphorylierung von Thr288, eine Modifizierung, die essenziell für die volle enzymatische Ak-



**Abbildung 3.** Umfassende Analyse des Zusammenspiels zwischen Bora und der Kinase Aurora A mittels nativer und „Bottom-up“-MS. a) Native MS-Analyse von AurA und Bora nach 180 min Inkubationszeit. Die Bildung des 1:1-Komplexes ist effizienter, wenn  $Mg^{2+}$ -ATP zugefügt wurde. b) Aufgereinigte AurA weist vor und nach Inkubation mit  $Mg^{2+}$ -ATP 7 Phosphoisoformen auf. c) Native MS belegt die fortschreitende Phosphorylierung von Bora und dem AurA-Bora-Komplex in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -ATP. d) Die gewichteten mittleren Phosphorylierungsanzahlen Boras und des Komplexes nehmen im Zeitverlauf simultan zu (AurA-Bora Verhältnis 1:2, „Stöch.“). Fortschreitende Bora-Phosphorylierung wird auch durch fast katalytische AurA-Mengen ermöglicht („Kat.“). e) Identifizierung und Quantifizierung phosphorylierter Bora-Aminosäuren mittels „Bottom-up“-LC/MS-MS. f) AurA bildet einen stabilen Komplex mit nichtphosphoryliertem Bora, und umgekehrt erfolgt die Bora-Phosphorylierung bereits in Gegenwart katalytischer AurA-Konzentrationen. Daher stellen Komplexbildung und Phosphorylierung wahrscheinlich 2 voneinander unabhängige Wechselwirkungsmodi dar.

tivität von AurA ist<sup>[17]</sup> (Abbildung S1). Inkubation mit  $Mg^{2+}$ - und ATP verändert den Phosphorylierungsstatus von AurA nicht (Abbildung 3b). Wie in Abbildung 3c dargestellt, ist AurA katalytisch aktiv: Bora ebenso wie der AurA-Bora-Komplex werden infolge der Inkubation mit  $Mg^{2+}$ -ATP in zunehmendem Maße phosphoryliert. Im Kontrollexperiment ohne  $Mg^{2+}$ -ATP wird nur nichtphosphoryliertes Bora detektiert und die Phosphoisoform-Verteilung des Komplexes gleicht jener von AurA. Nach 180 min Inkubationszeit können bis zu 6 Bora-Phosphorylierungen nachgewiesen werden und der Komplex weist maximal 10 Phosphateinbauten auf. Die Berechnung der gewichteten mittleren Anzahl eingebauter Phosphate bestätigt, dass der Komplex

und Bora gleichermaßen zu einem Sättigungspunkt hin fortschreitend phosphoryliert werden (Abbildung 3d). Der ermittelte Durchschnitt von 3 Phosphorylierungen an Bora zum letztgemessenen Zeitpunkt stimmt mit den ortsspezifischen Phosphorylierungsdaten überein, die aus quantitativen LC-MS/MS-Experimenten gewonnen werden konnten. In diesen konnten 2 stark und 2 mäßig phosphorylierte Aminosäuren identifiziert werden (Abbildung 3e), von denen Ser59 und Thr144 wahrscheinlich spezifische AurA-Substrate darstellen, da ihre Lage weitgehend mit der Substraterkennungssequenz von AurA übereinstimmt.<sup>[18]</sup> Nach unserem besten Wissen sind hier zum ersten Mal AurA-spezifische Phosphorylierungsstellen auf Bora beschrieben. Die ähnlichen Phos-

phorylierungszeitverläufe von Bora und dem AurA-Bora-Komplex deuten darauf hin, dass Bora keinen stabilen Komplex mit AurA bilden muss, um phosphoryliert zu werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese haben wir Bora außerdem mit fast katalytischen Mengen der Kinase (molares Verhältnis AurA/Bora = 1:100, Abbildung S2) inkubiert. Obwohl die Reaktionsgeschwindigkeit unter diesen Bedingungen reduziert ist, detektieren wir, wie für eine Michaelis-Menten-artige enzymatische Reaktion zu erwarten, nach wie vor eine fortschreitende Phosphorylierung von Bora bis hin zu einer durchschnittlichen Anzahl von ungefähr 2.5 eingebauten Phosphaten (Abbildung 3d). Wie zuvor bereits vermutet,<sup>[12b]</sup> scheint Bora demnach eine Doppelfunktion als transient gebundenes Substrat und stabiler Wechselwirkungspartner von Aurora-Kinase A zu erfüllen (Abbildung 3 f).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir, durch Kombination von hochauflösender nativer MS mit „Bottom-up“-LC-MS/MS in einem Arbeitsablauf, in der Lage sind, enzymatische Proteinphosphorylierung auf Ebene von Aminosäuremodifizierungen, relativen Reaktionskinetiken und strukturellen Veränderungen zu charakterisieren. Wir sind der Meinung, dass die hier präsentierte Strategie auf jedes Enzym-(Protein)Substrat-System angewendet werden kann und daher einen allgemeingültigen Ansatz zur Erlangung sequenzspezifischer, kinetischer und struktureller Informationen darstellt.

## Experimentelles

Die Kinaseraktionen wurden unter physiologischen pH-Bedingungen in Gegenwart von ATP und Magnesiumchlorid bei 30°C mit einem 1000-fachen molaren Überschuss an cAMP oder cGMP (PKG) oder bei Raumtemperatur mit einem zweifachen molaren Überschuss an Bora (AurA) durchgeführt. Die Reaktionen wurden auf Eis durch den Zusatz von EDTA gestoppt. Nachdem die Proben in Ammoniumacetat pH 6.8 gepuffert wurden, erfolgte die Analyse mithilfe eines modifizierten Orbitrap-Exactive-Plus-Massenspektrometers, dessen Einstellungen zum Erreichen hoher Massenauflösung und Empfindlichkeit optimiert und für die spezifischen Proteine konstant gehalten wurden. Für die LC-MS/MS-Analysen wurden die Reaktionsgemische denaturiert, reduziert, alkyliert und danach proteolytisch gespalten mit Trypsin und GluC (PKG) oder ausschließlich Trypsin (AurA/Bora). Nach Entsalzung der Proben erfolgte die Analyse mit einem LTQ-Orbitrap-Elite-Massenspektrometer, das an eine Proxeon EASY-nLC 1000 gekoppelt ist. Weitere experimentelle Details sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.

Eingegangen am 24. April 2014

Online veröffentlicht am 9. Juli 2014

**Stichwörter:** Analytische Methoden · Kinase-Assay · Massenspektrometrie · Proteinmodifizierungen · Protein-Protein-Wechselwirkungen

- [1] a) J. D. Scott, T. Pawson, *Science* **2009**, *326*, 1220–1224; b) T. Hunter, *Cell* **1995**, *80*, 225–236; c) T. Hunter, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **2012**, *367*, 2513–2516.
- [2] a) J. V. Olsen, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 3444–3452; b) S. Lemeer, A. J. Heck, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 414–420.
- [3] K. Brumbaugh, W. Johnson, W. C. Liao, M. S. Lin, J. P. Houchins, J. Cooper, S. Stoesz, R. Campos-Gonzalez, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *717*, 3–43.
- [4] P. A. Grimsrud, D. L. Swaney, C. D. Wenger, N. A. Beauchene, J. J. Coon, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 105–119.
- [5] a) Y. Jia, C. M. Quinn, S. Kwak, R. V. Talanian, *Curr. Drug Discovery Technol.* **2008**, *5*, 59–69; b) C. Salazar, T. Hofer, *FEBS J.* **2009**, *276*, 3177–3198.
- [6] H. Nishi, K. Hashimoto, A. R. Panchenko, *Structure* **2011**, *19*, 1807–1815.
- [7] a) Y. L. Deribe, T. Pawson, I. Dikic, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 666–672; b) S. S. Taylor, R. Ilouz, P. Zhang, A. P. Kornev, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 646–658.
- [8] a) J. Marcoux, C. V. Robinson, *Structure* **2013**, *21*, 1541–1550; b) M. Sharon, *Science* **2013**, *340*, 1059–1060; c) A. J. Heck, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 927–933; d) J. A. Loo, *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16*, 1–23.
- [9] R. J. Rose, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A. J. Heck, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 1084–1086.
- [10] a) S. Rosati, R. J. Rose, N. J. Thompson, E. van Duijn, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A. J. Heck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12992–12996; b) S. Rosati, E. T. van den Bremer, J. Schuurman, P. W. Parren, J. P. Kamerling, A. J. Heck, *MABS* **2013**, *5*, 917–924.
- [11] a) K. Takio, S. B. Smith, K. A. Walsh, E. G. Krebs, K. Titani, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 5531–5536; b) A. Aitken, B. A. Hemmings, F. Hofmann, *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *790*, 219–225; c) M. W. Pinkse, A. J. Heck, K. Rumpel, F. Pullen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1392–1399; d) M. W. Pinkse, P. M. Uitto, M. J. Hilhorst, B. Ooms, A. J. Heck, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3935–3943.
- [12] a) A. Seki, J. A. Coppinger, C. Y. Jang, J. R. Yates, G. Fang, *Science* **2008**, *320*, 1655–1658; b) A. Hutterer, D. Berdnik, F. Wirtz-Peitz, M. Zigman, A. Schleiffer, J. A. Knoblich, *Dev. Cell* **2006**, *11*, 147–157; c) F. Eckerdt, J. L. Maller, *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 511–513.
- [13] T. M. Lincoln, N. Dey, H. Sellak, *J. Appl. Physiol.* **2001**, *91*, 1421–1430.
- [14] M. Mann, C. K. Meng, J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1702–1708.
- [15] H. Poppe, S. D. Rybalkin, H. Rehmann, T. R. Hinds, X. B. Tang, A. E. Christensen, F. Schwede, H. G. Genieser, J. L. Bos, S. O. Doskeland, J. A. Beavo, E. Butt, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 277–278.
- [16] E. H. Y. Chan, A. Santamaria, H. H. W. Sillje, E. A. Nigg, *Chromosoma* **2008**, *117*, 457–469.
- [17] A. O. Walter, W. Seghezzi, W. Korver, J. Sheung, E. Lees, *Oncogene* **2000**, *19*, 4906–49016.
- [18] A. N. Kettenbach, D. K. Schweppe, B. K. Faherty, D. Pechenick, A. A. Pletnev, S. A. Gerber, *Sci. Signaling* **2011**, *4*, rs5.