



Automatisierte Detektion von Proteinphosphorylierung durch Nanoliter-Enzymreaktionen auf Mikroarrays**

Simon K. Küster, Martin Pabst,* Renato Zenobi und Petra S. Dittrich*

Abstract: Wir beschreiben eine neue, empfindliche Screening-Methode zur Detektion von Proteinphosphorylierung in komplexen Proteinproben. Der proteolytische Verdau einer Probe wird zuerst mithilfe von nano-Flüssigchromatographie (nano-LC) aufgetrennt, das Eluat wird unmittelbar danach hochfrequent in Mikrotröpfchen kompartimentiert und schließlich auf eine Mikroarray-MALDI-Platte abgelegt. Nach Aufbringen eines Ölfilms werden pL-Tröpfchen einer Phosphataselösung zu jeder zweiten Fraktion auf der Mikroarray-Platte hinzugefügt. Dies induziert in den Fraktionen eine Verschiebung der Massen der phosphorylierten Peptide um $n \times -80$ Da und führt somit zu einem Zickzackprofil des chromatographischen Peaks. Zur Identifizierung wird nun die MALDI-MS-Spur der gesamten Trennung von einem Matlab-Skript auf diese induzierten chromatographischen Peakmustern hin untersucht, wodurch auch Phosphopeptide von sehr geringer Intensität erkannt werden. Die hier vorgestellte Screening-Methode verwendet keine Peaklisten und es bedarf auch keiner umfangreichen MS/MS-Experimente.

Die Untersuchung post-translationaler Modifikationen von Proteinen (PTMs), insbesondere deren Natur und Dynamik, ist essenziell, um die Funktion und Wirkungsweise von Proteinen in zellulären Prozessen zu verstehen.^[1] Zu den häufigsten post-translationalen Modifikationen zählt die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren an definierten Stellen im Protein.^[2,3] Man vermutet, dass bis zu ein Drittel aller

Proteine in eukaryotischen Zellen mindestens einmal während ihres Lebenszyklus phosphoryliert vorliegt^[4] und dass die Kodierung von Kinasen und Phosphatasen etwa 2% des menschlichen Genoms ausmacht.^[5] Trotz dieser Relevanz geben heutige Routineanalysenmethoden oft nur ein sehr unvollständiges Bild der Phosphorylierung wieder.

Die am häufigsten genutzten Methoden für die Analyse von Proteinphosphorylierung setzen auf herkömmliche Vorschriften zur Proteomanalyse, die im Wesentlichen auf Flüssigchromatographie (LC) in Verbindung mit ESI-MS/MS basieren.^[6] Diese, wie auch ähnliche Methoden, haben allerdings auch bestimmte Nachteile. In MS/MS-Experimenten wird typischerweise eine hohe Zahl von Peptiden – meist solche mit schwacher Intensität – nicht für die Fragmentierung selektiert oder nur unzureichend fragmentiert und somit in der Datenauswertung nicht oder falsch bewertet. Dies spielt besonders bei der Analyse von Phosphopeptiden eine Rolle, von denen bekannt ist, dass sie geringe Intensität^[7] und oftmals auch niedrigere Ionisierungseffizienzen aufweisen.^[8,9] Systematisch falsch-positive Bewertungen in MS/MS-Experimenten können auch durch eine Kombination aus Probenaufarbeitung und inakkurater Selektion massenspektrometrischer Signale verursacht werden.^[10] Auch unzureichende Massenauflösung oder fehlende Präzision der Massenspektrometer sind Limitierungen, was durch das Beispiel der Differenzierung zwischen Phosphatierung und Sulfatierung verdeutlicht wird, die mit den herkömmlichen Methoden nur sehr schwer erreicht werden kann.^[11] Nicht zuletzt liefern (verschiedene) automatisierte Interpretationsalgorithmen mehr oder weniger unterschiedliche Ergebnisse, auch abhängig davon, welche Parameter verwendet oder berücksichtigt wurden.^[12]

Alternative Methoden zur Analyse von Proteinphosphorylierungen, die nicht auf Fragmentierung beruhen, setzen meist auf eine Kombination von Massenspektrometrie mit enzymatischer Dephosphorylierung.^[4] Dabei wird die Probe einmal mit vorhergehender enzymatischer Dephosphorylierung und einmal ohne diese analysiert. Die Abtrennung von n Phosphatgruppen wird dann durch eine Reduzierung der Masse um $n \times 80$ Da erkennbar.^[6e.g.,13] Problematisch an dieser Methode ist allerdings, dass die Abtrennung der Phosphatgruppe(n) auch zu einer Veränderung der Retention bei der Flüssigchromatographie führt, sodass bei der Datenauswertung Peaklisten aus großen Retentionsbereichen verglichen werden müssen. Dies verlangsamt und erschwert eine Korrelation der zu vergleichenden LC-MS-Experimente erheblich.^[14]

Die Kombination mit Phosphataseverdau kann auch in Verbindung mit MALDI-MS verwendet werden. Hier erfolgt der enzymatische Verdau auf dem MALDI-Substrat selbst

[*] S. K. Küster,^[+] Dr. M. Pabst,^[+] Prof. R. Zenobi, Prof. P. S. Dittrich^[§]
Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften
ETH Zürich
Vladimir-Prelog-Weg 3, 8093 Zürich (Schweiz)
E-Mail: martin.pabst@alumni.ethz.ch
petra.dittrich@bsse.ethz.ch

[+] Derzeitige Adresse: Departement Biosysteme
ETH Zürich (Schweiz)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen und teilen sich die Erstautorenschaft.

[**] Diese Arbeit wurde vom Europäischen Forschungsrat (ERC Starting Grant n° LIPIDS, Projekt Nr. 203428) sowie von der Schweizerischen Kommission für Technologie und Innovation (KTI, Projekt Nr. 13123.1 PFNM-NM) gefördert. Simon K. Küster bedankt sich für das Forschungsstipendium der Schweizerischen Chemischen Industrie (Scholarship Fund of the Swiss Chemical Industry; SSCI). Weiterhin danken wir Tobias Schibli von AB Sciex und Xiangyang Zhang vom MS Service am Laboratorium für Organische Chemie der ETH Zürich. Darüber hinaus möchten wir Konstantin Jefimovs (EMPA Dübendorf, Schweiz) und Fabian Wahl von Sigma-Aldrich für die Unterstützung bei der Entwicklung der Mikroarrays danken.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409440> zu finden.

noch vor der Zugabe der MALDI-Matrix.^[6a,7c] Auch eine vorangestellte Trennung kann integriert werden, jedoch werden mit gängigen LC-MALDI-Spottern nur vergleichsweise große Fraktionen gesammelt, sodass eine vorgelagerte LC-Trennung durch den Spotting-Prozess wieder verschlechtert wird. Das Sammeln von großen Eluatfraktionen auf einem Spot verursacht außerdem eine zunehmende Unterdrückung von schwachen Peptidsignalen und verhindert die mehrfache Nutzung ein und desselben chromatographischen Peaks.

Hier beschreiben wir eine neuartige und robuste Screening-Methode, mit der auch Phosphopeptidsignale von geringer Intensität aus komplexen Proteinproben detektiert werden können. Die Methode integriert eine weitere Analysedimension (die Substratspezifität) in den Arbeitsablauf eines nano-LC-MALDI-MS-Prozesses.

Eine wesentliche Komponente des Systems beruht auf der Verwendung Tropfen-basierter Mikrofluidik, einer Technik, bei der Wassertropfen in ein hydrophobes Trägermaterial (z.B. ein Öl) injiziert und in diesem transportiert werden. Das Potenzial dieser Technik wurde in vielfältiger Weise für biochemische Synthesen^[15] und bioanalytische Fragestellungen^[16] demonstriert. In unseren vorherigen Arbeiten haben wir bereits ein System eingeführt, das es ermöglicht, mikrofluidisch generierte Tropfen durch MALDI-MS zu analysieren.^[17] Das hier vorgestellte System ermöglicht es nun, Eluatfraktionen im Bereich von wenigen Nanolitern auf einem speziellen MALDI-Substrat (einem Mikroarray mit mehreren Tausend Mikrosplots) zu deponieren und dort die Phosphatgruppen der Peptide enzymatisch abzuspalten (Abbildung 1). Dieser Schritt wird durch das Einbetten des

Mikroarrays in ein Ölbad ermöglicht, wodurch die Verdampfung des wässrigen Reaktionsvolumens verhindert wird und die Fraktionen der Enzymlösung über einen beliebigen Zeitraum inkubiert werden können. Die Eluatfraktionierung mit sehr hoher zeitlicher Auflösung ermöglicht die simultane Detektion von unbehandelten und behandelten Fraktionen innerhalb eines einzelnen chromatographischen Peaks. Unsere Methode umfasst außer Retentionszeit und Masse also noch eine dritte analytische Dimension, nämlich die der enzymatischen Substratspezifität. Insgesamt ermöglicht diese sehr robuste Methode die Identifizierung von starken wie schwachen Phosphopeptidsignalen, ohne dass eine detaillierte Kenntnis über die Probe erforderlich ist. Auch ist wegen der feinen Fraktionierung und des korrelierten Enzymverdaus keine vorherige Aufkonzentrierung der Phosphopeptide oder die Durchführung von Fragmentierungsexperimenten mehr nötig.

Der experimentelle Arbeitsablauf beginnt mit dem proteolytischen Verdau einer Proteinmischung (hier bestehend aus α -Casein S1, α -Casein S2, β -Casein und Rinderserumalbumin (BSA)), die in ein nano-LC-System mit Umkehrphase injiziert wird. Das Eluat der nano-LC-Trennung wird direkt mithilfe eines einfachen mikrofluidischen Systems in Tropfen fraktioniert und mit einer Rate von 1 Hz auf das Mikroarray übertragen.^[17b] Die direkte Fraktionierung in Tropfen innerhalb des hydrophoben Trägermaterials bewahrt die chromatographische Trennung und ermöglicht die schnelle Deposition von wässrigen Nanolitervolumina auf das Mikroarray (Abbildung 1A1). Selbst schmale Peaks aus der Flüssigchromatographie werden so auf mehrere Fraktionen (d.h. Spots) verteilt, sodass nebeneinanderliegende Fraktionen auf dem Mikroarray annähernd die gleiche Zusammensetzung haben.

Im Anschluss werden wenige Nanoliter einer Phosphataselösung zu jedem zweiten Spot hinzugefügt (Abbildung 1A2 sowie Abbildung S1 der Hintergrundinformationen). Während dieses Vorgangs sind sowohl das Mikroarray als auch das Ende der Kapillare in ein flüssiges Bad aus Perfluordecalin eingetaucht. Das Ölbad bewahrt die Nanoliter-Enzymtropfen vor schnellem Verdampfen und ermöglicht dadurch die enzymatische Reaktion. Es kann im Anschluss durch Dekantieren wieder entfernt werden, wobei noch bestehende Reste des flüchtigen Öls rückstandslos verdunsten. Abschließend wird jeder Spot nach der gleichen Methode mit der MALDI-Matrix versetzt, und die gesamte chromatographische Trennung wird durch MALDI-MS analysiert.

Die Phosphatasen induzieren in den hochaufgelösten, kontinuierlichen Peaks von Phosphopeptiden ein charakteristisches Zickzackmuster. Im gleichen Elutionszeitraum entsteht auf den mit Phosphatasen behandelten Spots noch ein weiterer Peak, der ebenfalls ein solches Muster aufweist. Dieser Peak stammt vom dephosphorylierten Peptid und hat somit eine Massendifferenz von $n \times -80$ Da. Diese charakteristischen Chromatogramme werden in Abbildung 2 für das phosphorylierte Peptid KTVDME(p)STEVFTK (α -Casein S2) gezeigt. Die Zahl der Phosphorylierungen lässt sich aus der beobachteten Verschiebung der Masse ablesen (hier: eine einfache Phosphorylierung). Peptide ohne Phosphorylierung(en) oder Peptide mit anderen Modifikationen (z.B. mit

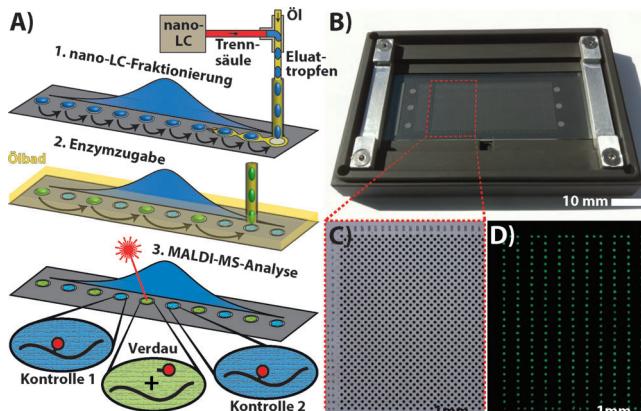


Abbildung 1. A) Experimenteller Ablauf der Proteinphosphorylierungsanalyse. 1. Das Eluat der nano-LC wird mithilfe tropfenbasierter Mikrofluidik in Pikoliter-Tropfen kompartimentiert. Diese Tropfen werden dann mit hoher zeitlicher Auflösung als LC-Fraktionen mit einem Volumen von je 5 nL auf einer Mikroarray-Platte gesammelt. 2. Die Platte wird in ein schützendes Bad aus perfluoriertem Öl gelegt, und jeder zweite Spot wird mit Pikolitertröpfchen einer Phosphataselösung versetzt. 3. Nach Zugabe von MALDI-Matrix zu jedem Spot (nicht gezeigt) wird das gesamte Mikroarray durch MALDI-MS ausgelesen. B) Photo einer Mikroarray-Platte mit 2780 hydrophilen Spots (Durchmesser eines Spots: 300 μm) in einem Probenhalter. C) Mikroaufnahme des linken Bereiches der Platte nach Fraktionierung des Eluates. D) Fluoreszenzaufnahme, die den gleichen Ausschnitt wie (C) zeigt, nach Zugabe der Enzymlösung zu jedem zweiten Spot. Die Enzymlösung enthielt Fluorescein zur Visualisierung.

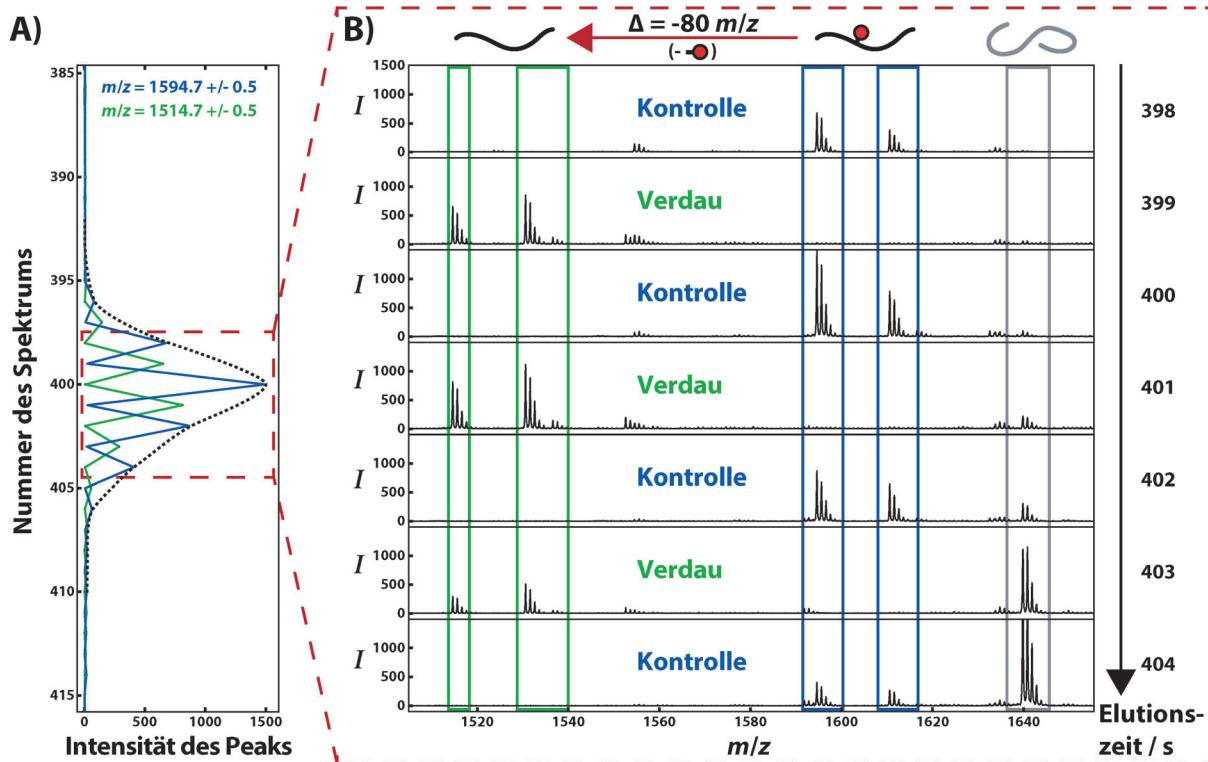


Abbildung 2. A) Extrahierte Ionenchromatogramme für $m/z = 1594.7 \pm 0.5$ (grün) und $m/z = 1514.7 \pm 0.5$ (blau), die ein charakteristisches, verzahntes Zickzackmuster bilden und zur phosphorylierten bzw. dephosphorylierten Form des Peptids KTVDME(p)STEVFTK (α -Casein S2) gehören. Die gestrichelte Linie zeigt die hypothetische Form eines Peaks ohne Enzymzugabe. B) Massenspektren von sieben aufeinanderfolgenden Spots, die jeweils ein Eluat von einer Sekunde repräsentieren. Peaks mit einer Masse von 1594.7 und 1610.7 Da (+16 Da durch Methionin-Oxidation) erscheinen nur in den Kontrollen. Andere Peaks mit einer Masse von 1517.7 und 1530.7 Da (+16 Da durch Methionin-Oxidation) sind nur in den enzymatisch behandelten Spots zu finden. Die Reduzierung der Masse um -80 Da zeigt, dass das vorliegende Peptid einfach phosphoryliert ist. Peaks von nicht-phosphorylierten Peptiden weisen diese Reduzierung der Masse nicht auf (als Beispiel dienen hier die grau markierten Peaks bei 1639.8 Da).

Sulfatierung) werden durch die enzymatische Reaktion nicht beeinflusst (Abbildung 2B, bei 1639.8 Da).

Das Vorhandensein eines Phosphopeptides oder das Entstehen des entsprechenden Produktes durch den enzymatischen Verdau kann also direkt aus den Ionenchromatogrammen abgelesen werden. Dies vereinfacht ganz entscheidend die Komplexität und damit auch die Dauer der Datenauswertung gegenüber anderen Methoden, bei denen die enzymatische Abtrennung der Phosphatgruppen vor der chromatographischen Trennung erfolgt.^[6c,e,g] Dadurch ist unsere Methode unabhängig von massenspektrometrischen Fragmentanalysen, und darüber hinaus beruht die Auswertung ausschließlich auf der Beobachtung von charakteristischen Verdaumustern und ist damit selektiver als die übliche Verwendung von umfangreichen Peaklisten.

Für eine automatisierte Auswertung wurde ein Matlab-Skript entwickelt, das die gesamten Daten, hier bestehend aus 1430 Massenspektren für eine 25-minütige LC-Trennung, systematisch nach charakteristischen Zickzackprofilen durchsucht. Abbildung 3 (Reihe 1) zeigt die Details dreier extrahierter Ionenchromatogramme (XICs), die von einem phosphorylierten (A1), einem dephosphorylierten (B1) und einem nicht-phosphorylierten Peptid (C1) erhalten wurden. Zur Unterscheidung dieser drei Peptidklassen wird das Verhältnis der Intensität jedes Spots (n) zu seinem nächsten Spot

($n+1$) berechnet (Reihe 2). Nun werden die Intensitätsverhältnisse in zwei Gruppen aufgeteilt (Reihen 3 und 4). Das Verhältnis der Intensitäten eines Spots ohne enzymatische Behandlung zum nächsten Spot mit enzymatischer Behandlung weist nur für die Phosphopeptide hohe Werte auf, da bei einer enzymatischen Abspaltung beim folgenden Spot das Signal fehlt (A3, A4). Ähnlich verhält es sich bei den dephosphorylierten Peptiden, bei denen in den unbehandelten Spots das Signal gänzlich fehlt (B3, B4). Für die nicht-phosphorylierten Peptide findet sich nach dieser Auswertung kein Peak (C3, C4). Mithilfe eines Schwellenwertes kann nun ein Signal als „möglicher Treffer“ oder als „Hintergrund“ eingestuft werden. Diese Auswertungsmethode ermöglicht es, auch phosphorylierte oder dephosphorylierte Peptide mit geringen Peakintensitäten zu finden (Abbildung 3A).

Die Unterteilung in „Treffer“, „möglicher Treffer“ oder „negativ“ wurde auf Basis von zwei Kriterien getroffen: 1) dem Vorhandensein eines Zickzackprofils und 2) dem Auftreten eines zweiten, ineinander greifenden Zickzackprofils, das zum ersten Profil eine Massendifferenz von $n \times -80 \text{ Da}$ aufweist. Peptide, die beide Kriterien erfüllen, werden als „Treffer“ gewertet. Peptide, bei denen kein zweites, ineinander greifendes Zickzackprofil erkennbar ist, werden als „möglicher Treffer“ gewertet und einer weiteren Analyse („count-up“- oder „count-down“-Methode) unter-

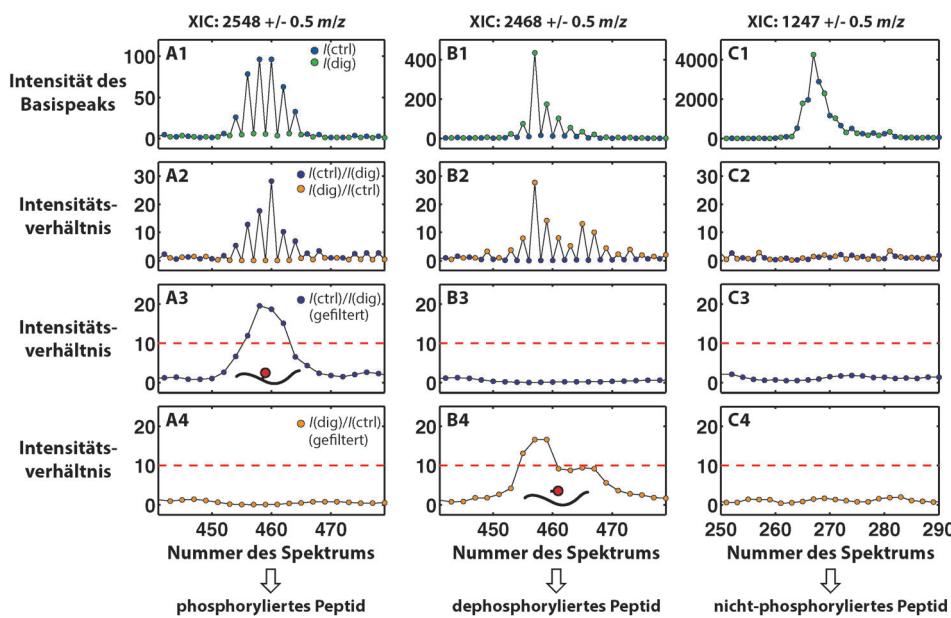


Abbildung 3. Automatisierte Klassifizierung von Peaks für phosphorylierte und dephosphorylierte Peptide, exemplarisch für drei ausgewählte Massen (A–C). A1 zeigt das extrahierte Ionenchromatogramm (XIC) eines phosphorylierten Peptids (von α -Casein S1), und B1 das von dem zugehörigen dephosphorylierten Peptid. C1 zeigt das XIC eines nicht-phosphorylierten Peptids (von α -Casein S2). Für jedes XIC wurden die Intensitätsverhältnisse der Peaks von einem zum nächsten Spot ermittelt (A2, B2, C2) und getrennt für $I(\text{Kontrolle})/I(\text{Verdau})$ [$I(\text{ctrl})/I(\text{dig})$] oder $I(\text{Verdau})/I(\text{Kontrolle})$ aufgetragen (A3, B3, C3 bzw. A4, B4, C4). Durch Einführung eines Schwellenwertes lassen sich nicht-phosphorylierte Peptide erkennen (C3, C4) und phosphorylierte Peptide (A3) von dephosphorylierten Peptiden (B4) unterscheiden.

zogen. Hierbei wird das identifizierte XIC mit den rechnerisch nächstfolgenden XICs von $+/-n \times 80$ überlagert (ein Beispiel ist in Abbildung S6C der Hintergrundinformationen gezeigt) und manuell untersucht. Dadurch wird unter Umständen auch das vormals kaum sichtbare korrelierende Zickzackprofil erkennbar und kann als „Treffer“ identifiziert werden.

Die hier beschriebene Screening-Methode wurde mit dem tryptischen Verdau einer definierten Proteinmischung aus α -Casein (S1 und S2) sowie β -Casein und BSA validiert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und S1 (Hintergrundinformationen) zusammengefasst. Fast 40 Treffer mit den überlagerten Zickzackprofilen und Übergängen von $n \times 80$ Da wurden gefunden (ein überlagertes XIC für jeden Treffer ist

in den Hintergrundinformationen gezeigt), wobei sich die meisten Treffer allen bekannten oder erwarteten Phosphorylierungsstellen zuordnen ließen. Dabei ergaben sich für eine Stelle oftmals mehrere Treffer, da verschiedene zusätzliche Modifikationen vorliegen können. Einige Treffer, besonders jene mit geringen Signalintensitäten, ließen sich allerdings keinem der verwendeten Modellproteine zuordnen (Tabelle 1). Außerdem gab es auch eine große Zahl möglicher Treffer, bei denen das charakteristische Zickzackprofil nur in den enzymatisch behandelten Spots aufzufinden war. Weitere Analysen wären hier erforderlich, um die verwendete Probe auf etwaige „Hintergrundproteine“ zu untersuchen, was jedoch außerhalb des Fokus dieser Arbeit war.

Wir haben eine neue Screening-Strategie entwickelt, mit der Proteinphosphorylierungen

in komplexen Proben detektiert werden können. Durch die Integration von Nanoliter-Phosphatasereaktionen in einen typischen nano-LC-MALDI-MS-Arbeitsablauf wird die Identifizierung von Phosphopeptiden basierend auf charakteristischen Zickzack-Peakprofilen ermöglicht, ohne auf MS/MS-Experimente zurückgreifen zu müssen. Dabei wird außer der Retentionszeit und der Masse noch eine weitere analytische Dimension genutzt, nämlich die der enzymatischen Substratspezifität. Die MS/MS-Analyse der Analyten ist für eine Identifizierung nicht mehr zwingend erforderlich, kann jedoch bei Bedarf weiterhin nach einer ersten Detektion an vorselektierten Peaks durchgeführt werden. Hierfür können sowohl die phosphorylierte als auch die dephosphorylierte Variante des Peptids verwendet werden, was die Sequenzie-

Tabelle 1: Detektierte „Treffer“ (Anzahl der Übergänge).^[a]

Nr.	α -Casein S1 (#P)	α -Casein S2 (#P)	β -Casein (#P)	nicht Modellproteinen zugeordnet (Teil 1) (#P)	nicht Modellproteinen zugeordnet (Teil 2) (#P)
1	1660.7 → 1580.8 (1)	1466.5 → 1386.6 (1)	2061.7 → 1981.8 (1)	3184.4 → 3104.4 (1)	1933.9 → 1853.9 (1)
2	1951.9 → 1871.9 (1)	1594.6 → 1514.6 (1)	2431.9 → 2352.0 (1)	2794.4 → 2714.4 (1)	1991.9 → 1912.0 (1)
3	2079.9 → 2000.0 (1)	1738.7 → 1658.7 (1)	2556.0 → 2476.1 (1)	2755.2 → 2675.2 (1)	1989.8 → 1909.8 (1)
4	2548.2 → 2468.2 (1)	1418.5 → 1338.5 (1)	2984.2 → 2904.2 (1)	2445.0 → 2365.1 (1)	1682.7 → 1602.8 (1)
5	2720.9 → 2321.0 (5)	1546.5 → 1466.5 (1)	3122.2 → 2802.3 (4)	2424.1 → 2344.1 (1)	1550.5 → 1390.5 (2)
6	1927.6 → 1767.7 (2)	1539.5 → 1379.5 (2)		2109.7 → 2029.8 (1)	1482.5 → 1402.5 (1)
7	1943.6 → 1783.7 (2)	2716.1 → 2556.2 (2)		2083.7 → 2003.7 (1)	1453.6 → 1373.6 (1)
8	1879.5 → 1719.6 (2)	3008.1 → 2688.2 (4)		2050.0 → 1970.0 (1)	
9	1832.8 → 1752.8 (1)	2093.8 → 2013.8 (1)			
10		3132.0 → 2812.2 (4)			

[a] Spalten 2, 3 und 4 zeigen „Treffer“ für α -Casein S1, α -Casein S2 bzw. β -Casein. Spalten 5 und 6 zeigen nicht zugeordnete „Treffer“ (aufgespalten in zwei Teile). Die Zahl der Phosphorylierungen (#P) pro Übergang ist in Klammern angegeben.

rung und/oder Lokalisierung der Phosphorylierungsstelle erleichtert. Die Methode für die automatisierte Datenauswertung beruht ausschließlich auf der Analyse von chromatographischen Peakprofilen und vermeidet dabei umfangreiche Peaklisten.

Die hier vorgestellte Plattform lässt sich darüber hinaus vorteilhaft in eine Vielzahl proteomischer Arbeitsabläufe integrieren. Nicht zuletzt können Mikrofluidiksysteme, die komplexere regulative Eingriffe ermöglichen – z.B. eine Teilung oder eine Vorsortierung einzelner Tropfen –, noch weitere Anwendungsbereiche eröffnen.

Eingegangen am 24. September 2014
Online veröffentlicht am 12. Dezember 2014

Stichwörter: Massenspektrometrie · Mikroarrays · Proteinmodifikationen · Proteinphosphorylierung · Tropfen-Mikrofluidik

- [1] a) P. Minguez, I. Letunic, L. Parca, P. Bork, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D306–311; b) R. Aebersold, B. F. Cravatt, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, S1–S2.
- [2] a) S. Prabakaran, G. Lippens, H. Steen, J. Gunawardena, *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2012**, *4*, 565–583; b) C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7342–7372; *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7508–7539.
- [3] G. A. Khoury, R. C. Baliban, C. A. Floudas, *Sci. Rep.* **2011**, *1*, DOI: 10.1038/srep00090.
- [4] M. Mann, S. E. Ong, M. Gronborg, H. Steen, O. N. Jensen, A. Pandey, *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 261–268.
- [5] J. C. Venter, *Science* **2001**, *291*, 1304–1351.
- [6] a) M. P. Torres, R. Thapar, W. F. Marzluff, C. H. Borchers, *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 1628–1635; b) H. Steen, B. Küster, M. Fernandez, A. Pandey, M. Mann, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1440–1448; c) H. Wang, J. Duan, L. Zhang, Z. Liang, W. Zhang, Y. Zhang, *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 480–487; d) R. D. Unwin, J. R. Griffiths, M. K. Leverentz, A. Grallert, I. M. Hagan, A. D. Whetton, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1134–1144; e) H.-Y. Wu, V. S.-M. Tseng, P.-C. Liao, *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1812–1821; f) A. Wolf-Yadlin, S. Hautaniemi, D. A. Lauffenburger, F. M. White, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5860–5865; g) H.-Y. Wu, V. S.-M. Tseng, L.-C. Chen, Y.-C. Chang, P. Ping, C.-C. Liao, Y.-G. Tsay, J.-S. Yu, P.-C. Liao, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7778–7787; h) R. D. Unwin, J. R. Griffiths, A. D. Whetton, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 870–877; i) P. Picotti, R. Aebersold, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 555–566; j) N. St-Denis, A.-C. Gingras, *Mass Spectrometric Tools for Systematic Analysis of Protein Phosphorylation*, Elsevier, Amsterdam, **2012**; k) A. Leitner, M. Sturm, W. Lindner, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *703*, 19–30.

- [7] a) D. S. Jones, W. Heerma, P. D. van Wassenaar, J. Haverkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 192–195; b) K. M. Loyet, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 235–245; c) P. C. Liao, J. Leykam, P. C. Andrews, D. A. Gage, J. Allison, *Anal. Biochem.* **1994**, *219*, 9–20; d) T. Miliotis, P. O. Ericsson, G. Marko-Varga, R. Svensson, J. Nilsson, T. Laurell, R. Bischoff, *J. Chromatogr. B* **2001**, *752*, 323–334.
- [8] a) A. Leitner, A. Foettinger, W. Lindner, *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 950–959; b) M. M. Savitski, M. L. Nielsen, R. A. Zubarev, *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 1180–1188.
- [9] E. Kapp, F. Schütz, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2007**, Chapter 25, Unit25.2.
- [10] R. Krüger, C.-W. Hung, M. Edelson-Averbukh, W. D. Lehmann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1709–1716.
- [11] a) R. E. Bossio, A. G. Marshall, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1674–1679; b) B. W. Gibson, P. Cohen, *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 480–501.
- [12] B. M. Balgley, T. Laudeman, L. Yang, T. Song, C. S. Lee, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1599–1608.
- [13] H. Yamaguchi, M. Miyazaki, H. Kawazumi, H. Maeda, *Anal. Biochem.* **2010**, *407*, 12–18.
- [14] a) T. Kawakami, K. Tateishi, Y. Yamano, T. Ishikawa, K. Kuroki, T. Nishimura, *Proteomics* **2005**, *5*, 856–864; b) H. Steen, J. A. Jebanathirajah, J. Rush, N. Morrice, M. W. Kirschner, *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 172–181; c) M. E. Boehm, J. Seidler, B. Hahn, W. D. Lehmann, *Proteomics* **2012**, *12*, 2167–2178.
- [15] a) C. J. Gerdts, D. E. Sharoyan, R. F. Ismagilov, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6327–6331; b) L. Frenz, A. El Harrak, M. Pauly, S. Bégin-Colin, A. D. Griffiths, J.-C. Baret, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6817–6820; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6923–6926; c) A. B. Theberge, E. Mayot, A. El Harrak, F. Kleinschmidt, W. T. S. Huck, A. D. Griffiths, *Lab Chip* **2012**, *12*, 1320–1326; d) R. Ameloot, F. Vermoortele, W. Vanhove, M. B. J. Roeffaers, B. F. Sels, D. E. De Vos, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 382–387.
- [16] a) P. S. Dittrich, M. Jahnz, P. Schwille, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 811–814; b) J. S. Edgar, G. Milne, Y. Zhao, C. P. Pabbati, D. S. W. Lim, D. T. Chiu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2719–2722; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2757–2760; c) Q. Li, J. Pei, P. Song, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5260–5267; d) J. J. Agresti, E. Antipov, A. R. Abate, K. Ahn, A. C. Rowat, J. C. Baret, M. Marquez, A. M. Klibanov, A. D. Griffiths, D. A. Weitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 4004–4009; e) A. B. Theberge, G. Whyte, W. T. S. Huck, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 3449–3453; f) D. Lombardi, P. S. Dittrich, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 347–352; g) J.-Y. Kim, S.-W. Cho, D.-K. Kang, J. B. Edel, S.-I. Chang, A. J. deMello, D. O'Hare, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 9144–9146.
- [17] a) S. K. Küster, S. R. Fagerer, P. E. Verboket, K. Eyer, K. Jefimovs, R. Zenobi, P. S. Dittrich, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1285–1289; b) S. K. Küster, M. Pabst, K. Jefimovs, R. Zenobi, P. S. Dittrich, *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4848–4855.