

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Max-Planck-Institut für Biochemie

Strategien der quantitativen Phosphoproteomik zur Signaltransduktionsanalyse von Kinasen

Kathrin Margarete Grundner-Culemann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. Michael Sattler
Prüfer der Dissertation:	1. Priv.-Doz. Dr. Henrik Daub
	2. Univ.-Prof. Dr. Stephan Sieber

Die Dissertation wurde am 30.11.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 16.02.2012 angenommen.

Meiner Familie

VORBEMERKUNGEN

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom August 2007 bis zum Juli 2010 am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von PD Dr. Henrik Daub angefertigt. Die praktischen Arbeiten zur Untersuchung der Plk1 Kinase-Substratbeziehungen wurden aufgrund des Projektumfangs zusammen mit Felix Oppermann ausgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Proteinkinasen und Phosphorylierung	1
1.2	Mitotische Kinasen.....	3
1.2.1	Phasen und Prinzipien der Mitose.....	3
1.2.2	Die mitotische Serin-/Threoninkinase Plk1	4
1.2.3	Die mitotische Serin-/Threonin-/Tyrosinkinase Mps1	12
1.3	Proteinkinasen und Krebs	16
1.3.1	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom	17
1.4	Massenspektrometrie.....	19
1.4.1	Massenspektrometrie und Phosphoproteomik	19
1.4.2	Quantitative Massenspektrometrie	25
1.5	Identifikation von Kinasesubstraten	27
1.6	Aufgabenstellung	31
2	Material und Methoden	32
2.1	Material.....	32
2.1.1	Geräte	32
2.1.2	Verbrauchsmaterial	33
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	33
2.1.4	Puffer	36
2.1.5	Zelllinien.....	36
2.1.6	Software und Onlinedienste.....	37
2.2	Zellkultur und SILAC Markierung	38
2.2.1	Kultivierung von hTERT-RPE Zellen.....	38
2.2.2	Kultivierung von NSCLC Zelllinien	40
2.3	SDS-Polyacrylamid Gelelectrophorese und Immunoblotting.....	41
2.4	Durchflusszytometrie.....	42
2.5	Kinaseassay	43
2.6	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	43
2.6.1	Proteinverdau in Lösung.....	43
2.6.2	Peptidentsalzung mit C18 Kartuschen.....	44

2.6.3	Peptidfraktionierung mit SCX Chromatographie.....	44
2.6.4	Phosphopeptidanreicherung mit IMAC.....	45
2.6.5	Proben zur Bestimmung des Poolingfehlers und der Markierungseffizienz.	45
2.7	Massenspektrometrische Analyse.....	46
2.8	Prozessierung der massenspektrometrischen Daten.....	46
2.8.1	Plk1 und Mps1 Studie.....	48
2.8.2	NSCLC Studie.....	50
2.9	Bioinformatische Auswertung.....	51
2.9.1	Plk1 und Mps1 Studie.....	51
2.9.2	NSCLC Studie.....	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Plk1 Substratidentifikationsstudie.....	53
3.1.1	Optimierung der Synchronisation der Zellen.....	53
3.1.2	Bestimmung der optimalen Inhibitorkonzentration.....	55
3.1.3	Festlegung des Inhibitionsschemas.....	55
3.1.4	Durchführung des Massenspektrometrieexperiments.....	57
3.1.5	Massenspektrometrische Identifikationen.....	58
3.1.6	Statistische Analyse mit SAM.....	63
3.1.7	Bioinformatische Analyse der Plk1 regulierten Phosphopeptide und Phosphorylierungsstellen.....	67
3.2	Mps1 Substratidentifikationsstudie.....	74
3.2.1	Festlegung des Inhibitionsschemas.....	74
3.2.2	Durchführung des Massenspektrometrieexperiments.....	76
3.2.3	Massenspektrometrische Identifikationen.....	77
3.2.4	Statistische Analyse mit SAM.....	83
3.2.5	Analyse der Mps1 regulierten Phosphopeptide und Phosphorylierungsstellen.....	87
3.3	Analyse der Phosphosignaturen unbehandelter NSCLC Zelllinien.....	90
3.3.1	Durchführung der Studie.....	90
3.3.2	Massenspektrometrische Identifikationen.....	96
3.3.3	Cluster Analyse der Phosphorylierungsprofile.....	103
4	Diskussion.....	106

4.1	Substratidentifikationsstudien der mitotischen Kinasen Plk1 und Mps1	106
4.1.1	Plk1 Studie	109
4.1.2	Mps1 Studie	121
4.2	Phosphosignaturen unbehandelter NSCLC Zelllinien	132
5	Zusammenfassung	134
6	Literaturverzeichnis	136
7	Anhang	150
7.1	Allgemeine Abkürzungen	150
7.2	Verzeichnis verwendeter Proteinnamenabkürzungen	151
7.3	Abbildungsverzeichnis	153
7.4	Tabellenverzeichnis	154
7.5	Verzeichnis ergänzender Tabellen (MS Excel Format)	155
8	Publikationen	156
9	Danksagung	157

1 EINLEITUNG

1.1 PROTEINKINASEN UND PHOSPHORYLIERUNG

Proteinkinasen sind an der Steuerung nahezu aller zellulären Prozesse beteiligt. Durch die Phosphorylierung ihrer Substrate koordinieren sie komplexe Signaltransduktionsnetzwerke, kontrollieren den Zellzyklus, regulieren den Stoffwechsel und integrieren extrazelluläre Signale. Sie spielen somit eine fundamentale Rolle in der Differenzierung und Migration, in der Proliferation und Apoptose, sowie in der Kommunikation der Zelle mit ihrer Umgebung (Hunter, 1995; Mackay und Twelves, 2007). Die Fehlregulation ihrer Aktivität wird in Übereinstimmung mit ihren elementaren, zellbiologischen Funktionen sowohl mit der pathologischen Physiologie zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen, als auch mit Diabetes und Krebs assoziiert (Blume-Jensen und Hunter, 2001; De Meyts und Whittaker, 2002).

Das humane Genom kodiert für mehr als 500 Proteinkinasen, die somit eine der größten Proteinfamilien darstellen. Anhand ihrer Substratspezifität und Sequenzähnlichkeiten werden sie in zahlreiche Untergruppen gegliedert (Manning *et al.*, 2002). Kinasen katalysieren die Übertragung des γ -Phosphats von Adenosintriphosphat (ATP) auf Aminosäuren ihrer Proteinsubstrate, bei Eukaryoten zumeist auf Serin (Ser, S)-, Threonin (Thr, T)- oder Tyrosinreste (Tyr, Y). Schätzungen gehen davon aus, dass etwa ein Drittel aller zellulären Proteine an mindestens einer Aminosäure durch Phosphorylierung modifiziert werden (Cohen, 2001).

Nachdem zu einem bestimmten Zeitpunkt etwa 700.000 potentielle Phosphorylierungsstellen in der Zelle vorliegen, sind Mechanismen erforderlich, die Kinasen eine selektive Erkennung ihrer korrekten Substrate erlauben (Ubersax und Ferrell, 2007).

Grundsätzlich weisen alle Kinasen eine ähnliche Faltung und Struktur auf: sie sind in zwei Domänen gegliedert, wobei die N-terminale Domäne hauptsächlich aus β -Faltblatt Struktur besteht, während die C-terminale Domäne aus mehreren α -Helices aufgebaut ist (Zheng *et al.*, 1993). Beide Domänen bilden zusammen eine Tasche, die das aktive Zentrum des Enzyms darstellt. Die Substratspezifität einer Kinase wird größtenteils durch die Größe ihrer ATP-Bindungstasche im aktiven Zentrum, sowie der Hydrophobizität und Ladung ihrer Oberflächen bestimmt, die eine selektive Bindung an die charakteristische

Sequenzumgebung (Konsensussequenz) ihrer designierten Phosphorylierungsstellen ermöglichen (Ubersax und Ferrell, 2007). Auch weisen zahlreiche Kinasen Domänen auf, die an phosphorylierte Dockingmotive auf Substraten bzw. anderen Komplexpartnern binden und dadurch die Affinität der Kinase zu ihren Substraten deutlich verstärken (Seet *et al.*, 2006; Pawson, 2007). Zu den Domänen, die mit phosphorylierten Tyrosinmotiven interagieren gehören die SH2 (*src-homology 2*) Domäne und die PTB (*phosphotyrosin binding*) Domäne. Der Gruppe der Serin/Threonin bindenden Domänen werden unter anderem die WD40-Repeat Domänen und die Polo-Box Bindedomäne (PBD) zugeordnet (Seet *et al.*, 2006). Das komplexe Phosphorylierungsverhalten einer Kinase wird zudem durch ihre subzelluläre Lokalisierung, antagonistische Effekte durch Phosphatasen, sowie systemische Effekte wie z.B. die Konkurrenz zwischen den Substraten einer Kinase reguliert (Ubersax und Ferrell, 2007).

Die Kenntnis direkter Kinase-Substratbeziehungen ist für das Verständnis der Phosphoregulation zellulärer Signaltransduktionsnetzwerke und für die Entwicklung gezielter Kinase-spezifischer Krankheitstherapien von großer Bedeutung (Fischer *et al.*, 2003; Hynes und Lane, 2005; Quintas-Cardama *et al.*, 2007). Im Fokus dieser Arbeit stehen deshalb die Identifikation der Substrate zweier mitotischer Kinasen, sowie die Charakterisierung der Phosphoproteome einer Gruppe von Lungenkarzinomzelllinien. Der erste Teil der Einleitung behandelt neben einer kurzen Zusammenfassung der Vorgänge in der Mitose, den aktuellen Stand der Forschung der humanen Kinasen Plk1 (*polo-like kinase 1*) und Mps1 (*multipolar spindle-1 dual, auch dual specificity protein kinase TTK*). Der zweite Teil konzentriert sich auf die Entwicklung und Anwendung von Kinaseinhibitoren in der Onkologie und beschreibt die Indikation des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (*non-small cell lung cancer (NSCLC)*). Der dritte Teil widmet sich den neuesten Techniken der Massenspektrometrie(MS)-basierten Proteomik, insbesondere bei der systemweiten Analyse von Phosphomodifikationen, um einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendete Methodik zu geben. Der vierte Teil der Einleitung fasst experimentelle Strategien zur Identifikation von Kinasesubstraten zusammen. Die Einleitung schließt mit der Aufgabenstellung dieser Arbeit.

1.2 MITOTISCHE KINASEN

1.2.1 PHASEN UND PRINZIPIEN DER MITOSE

Die Mitose, der erste Abschnitt der somatischen Zellteilung, umfasst fünf verschiedene Phasen. In der Prophase kondensiert das Interphasen-Chromatin zu strukturell definierten Chromosomen. Die in der S-Phase duplizierten Zentrosomen wandern zu den Zellpolen und dienen als Nukleationspunkte der Mikrotubuli dem Aufbau des mitotischen Spindelapparats. Anschließend wird die Zellkernmembran aufgelöst. Durch die Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore (Proteinstrukturen auf den Zentromeren der Schwesterchromatiden) in der Prometaphase bewegen sich die Chromosomen in der Metaphase in die Äquatorialebene. Um eine korrekte bipolare Verbindung der Chromosomen zu beiden Polen sicherzustellen und eine falsche Segregation der Chromatiden zu vermeiden generiert die Zelle ein *wait anaphase* Signal, genannt Spindelcheckpunkt (*spindel assembly checkpoint* (SAC)). Nach Erfüllung der SAC Kriterien werden die Chromatiden in der Anaphase getrennt und zu entgegengesetzten Spindelpolen gezogen. In der Telophase reformiert sich die Zellkernmembran um die dekodensierenden Chromosomen. Die Zelle wird anschließend in der Zytokinese, dem zweiten Abschnitt der somatischen Zellteilung, durch die Kontraktion eines Aktomyosinrings in zwei Tochterzellen geteilt (für eine eingehende Besprechung siehe Nigg, 2001).

Der Fortschritt der M-Phase wird durch das koordinierte Wechselspiel zweier Mechanismen gesteuert: der Proteinmodifikation durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung, sowie der Proteindegradation. Während die proteolytische Maschinerie durch Kinasen und Phosphatasen reguliert wird, werden diese ihrerseits durch zeitgenaue Degradation inaktiviert und so die Abläufe der Mitose und Zytokinese koordiniert (Nigg, 2001). Die prominenteste mitotische Kinase ist Cdk1 (*cyclin-B-dependant kinase 1*), führendes Mitglied der Zellzyklus regulierenden Cdk Proteinkinasefamilie, die elementare Aufgaben beim Eintritt in die Mitose bis hin zur Erfüllung des SAC ausübt (Lindqvist *et al.*, 2009). Weitere wichtige mitotische Kinasen sind die Mitglieder der Polo Kinasefamilie, der Aurora Kinasefamilie, der NIMA Kinasefamilie, sowie die Kinasen Bub1, BubR1 (*budding uninhibited by benzimidazole 1, R1*) und Mps1, die zahlreiche Prozesse in den mitotischen Checkpunkten, dem Austritt aus der Mitose und der Zytokinese kontrollieren (Ma und Poon, 2011). Die mitotische Proteindegradation

wird hauptsächlich durch die Aktivität der Ubiquitinligase APC/C (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) gesteuert (für eine eingehende Besprechung siehe Peters, 2006).

1.2.2 DIE MITOTISCHE SERIN-/THREONINKINASE PLK1

Plk1 ist ein Schlüsselenzym der Zellteilung in allen eukaryotischen Zellen. Das *polo* Gen wurde erstmals in *Drosophila melanogaster* identifiziert und kodiert für eine in zahlreichen Spezies stark konservierte Kinase: Cdc5 (*cell division cycle 5*) in *Saccharomyces cerevisiae*, Polo in *Drosophila*, Plx1 in *Xenopus laevis* und die *polo-like* Kinasen (Plk) in Säugetieren (Sunkel und Glover, 1988; Llamazares *et al.*, 1991). Genetischer *knock-out* von Polo in *Drosophila*, genauso wie siRNA *knock-down* von Plk1 in humanen Zelllinien führen immer zu charakteristischen mitotischen und meiotischen Defekten, wie beispielsweise einem verzögerten Eintritt in die Mitose und einem globalen Versagen des Spindelaufbaus (Archambault und Glover, 2009).

Der humanen Plk Familie gehören vier Kinasen an: Plk1, Plk2, Plk3 und Plk4. Plk1, die am engsten mit Cdc5 und Polo verwandte Kinase, ist als elementarer Regulator der Mitose gut charakterisiert. Für Plk2 und Plk3 wird eine Beteiligung am G1-S Checkpunkt diskutiert, während Plk4 eine entscheidende Rolle bei der Duplikation der Zentriolen in der S-Phase spielt (van de Weerdts und Medema, 2006).

1.2.2.1 Regulation

Plk1 kontrolliert grundlegende Mechanismen der Mitose und eine Überaktivierung von Plk1 wird mit der Entstehung zahlreicher maligner Erkrankungen assoziiert (Strebhardt und Ullrich, 2006). Mehrere zelluläre regulatorische Signalwege konvergieren deshalb und bilden ein stark koordiniertes, mehrlagiges System, um die räumliche und zeitliche Dynamik der Plk1 Aktivität über drei Strategien zu kontrollieren: Phosphorylierung, subzelluläre Lokalisierung und Degradation. Die Regulation von Plk1 ist dabei eng mit ihrer Struktur verbunden. Plk1 weist eine amino(N)-terminale Ser/Thr Kinasedomäne, eine zentrale *destruction*(D)-Box und eine carboxy(C)-terminale Polo-Box Bindedomäne auf (siehe Abbildung 1).

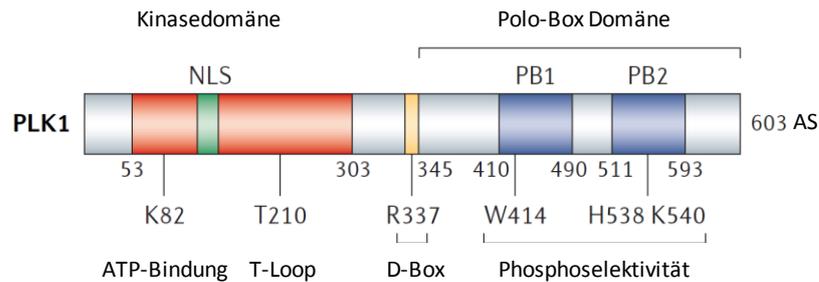


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Plk1 Struktur. Die Kinase besteht aus 603 Aminosäuren (AS) und ist aus zwei Domänen aufgebaut, einer N-terminalen Kinasedomäne (rot) und einer C-terminalen Polo-Box Domäne, die die Polo-Boxen (PB) 1 und 2 (blau) umfasst. Ebenfalls markiert sind die Sequenzabschnitte, die für die nukleare Lokalisation der Kinase (*nuclear localisation signal* (NLS), dargestellt in grün), sowie deren Abbau am Ende der Mitose (*destruction* (D)-Box, dargestellt in gelb) wichtig sind. Zudem sind die Aminosäuren angegeben, die für die ATP-Bindung (Lys82), die Aktivierung der Kinase (Phosphorylierung von Thr210), ihren Abbau (Arg337), sowie die Phosphoselektivität der Poloboxen (Trp414, His538, Lys540) von großer Bedeutung sind. (Leicht abgewandelte Abbildung aus Strebhardt und Ullrich, 2006).

Beim Eintritt in die Mitose wird Plk1 über die Phosphorylierung von Thr210 in der T-Loop Region der Kinasedomäne durch Aurora-A/Bora (*protein aurora borealis*) aktiviert (Macurek *et al.*, 2008; Seki *et al.*, 2008). Als zugrundeliegender Mechanismus wurde vorgeschlagen, dass Plk1 in seiner inaktiven Form zusammengefaltet vorliegt, wobei die PBD Domäne an die Kinasedomäne bindet und dadurch sowohl die Kinaseaktivität, als auch die Substratbindung verhindert werden (Jang *et al.*, 2002). Die Interaktion von Bora mit Plk1 könnte bewirken, dass diese autoinhibitorische Assoziation gestört und somit die aktivierende Phosphorylierung durch Aurora-A ermöglicht wird.

Die räumliche und zeitliche Regulation von Plk1 während der Mitose erfolgt über phosphorylierungsabhängige Protein-Protein Interaktionen. Die PBD des Enzyms enthält zwei Polo-Boxen, die eine positiv geladene Bindungstasche bilden und das phosphorylierte Konsensusmotiv *S-pS/pT-P/X* (X steht für eine beliebige Aminosäure (AS)) erkennen (Cheng *et al.*, 2003; Elia *et al.*, 2003a; Elia *et al.*, 2003b). Diese Präferenz impliziert, dass die Bindungspartner der Plk1 zuerst durch eine andere Kinase geprimed werden müssen, was eine genaue Abstimmung der Plk1 Aktivität mit vorangegangenen Phosphorylierungsereignissen ermöglicht (Lowery *et al.*, 2004). Die PBD trägt somit dazu bei, dass Plk1 in den verschiedenen Phasen der Mitose zu unterschiedlichen subzellulären Strukturen rekrutiert wird und dort ihre Funktionen ausüben kann. Bei den Interaktionspartnern kann es sich sowohl um spezifische Substratproteine, als auch um

reine Dockingproteine handeln, die dazu dienen die Konzentration des Enzyms an einer bestimmten zellulären Struktur zu erhöhen. Eine 2007 publizierte MS-Studie hat durch die Verwendung der Polo-Box-Bindedomäne als *bait* einige hundert Proteine identifiziert, die phosphorylierungsabhängig an die PBD binden (Lowery *et al.*, 2007). Inwieweit es sich bei diesen Kandidaten um tatsächliche Plk1 Substrate handelt muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Die D-Box in der zentralen Region der Kinase ist in den APC/C/Cdh1-abhängigen Abbau von Plk1 in der Anaphase involviert und schafft so die Voraussetzungen für einen geordneten Austritt aus der Mitose und eine erfolgreiche Zytokinese (Lindon und Pines, 2004).

1.2.2.2 Phasenabhängige, subzelluläre Lokalisationen und Proteininteraktionen

Plk1 assoziiert in der Prophase mit den Zentrosomen und ist in der Prometaphase und Metaphase hochangereichert am Kinetochor zu finden. In der Anaphase wird die Kinase dann zur zentralen Spindel rekrutiert, um sich in der Telophase am Midbody zu sammeln (Archambault und Glover, 2009).

Aktivität am Zentrosom in der Prophase. Plk1 ist in die Reifung der Zentrosomen involviert, ein Prozess durch den die Zentrosomen ihre Mikrotubuli-Nukleationsaktivität steigern und der Voraussetzung für den Aufbau der bipolaren Spindel ist (Lane und Nigg, 1996). Dabei phosphoryliert Plk1 mehrere zentrosomale Proteine: Nlp (*ninein-like protein*) dissoziiert nach Plk1 Phosphorylierung vom Zentrosom, was vermutlich die Bindung von γ -Tubulin Gerüstproteinen und somit von γ -Tubulin selbst fördert (Casenghi *et al.*, 2003). Asp (*abnormal spindle protein*) ist an der Nukleation und Verankerung der Mikrotubuli an den Spindelpolen beteiligt und muss für seine volle Funktionalität ebenfalls von Plk1 phosphoryliert werden (do Carmo Avides *et al.*, 2001). Dies gilt auch für Kizuna, welches nur in phosphorylierter Form zur notwendigen mechanischen Stabilität der Zentrosomen bei Mikrotubuli-Zugkräften beitragen kann (Oshimori *et al.*, 2006). Weitere zentrosomale Plk1 Substrate in Vertebraten sind drei für die Mikrotubuli-Dynamik essentielle Proteine: das Mikrotubuli-destabilisierende Protein Stathmin 1 (Budde *et al.*, 2001), das Mikrotubuli-stabilisierende Protein TPT1 (*tumor protein, translationally controlled 1*) (Yarm, 2002), sowie das Mikrotubuli-schneidende Protein Katanin (McNally *et al.*, 2002).

Der Übergang von der G2-Phase in die M-Phase wird durch die Aktivierung der Zellzykluskinase Cdk1/Cyclin-B kontrolliert. Während die Kinasen Wee1 (*dual specificity protein kinase Wee1*) und Myt1 (*myelin transcription factor 1*) Cdk1 phosphorylieren und dadurch inaktivieren, dephosphoryliert die Phosphatase Cdc25 die Kinase an denselben Phosphorylierungsstellen und treibt so den Eintritt in die Mitose voran. Vieles deutet darauf hin, dass Plk1 in Wirbeltieren Teil eines positiven Feedbackloops zur Cdk1 Aktivierung am Zentrosom ist und so den zeitlichen Ablauf steuert. Elia *et al.* (2003a) konnten zeigen, dass Cdk1 Cdc25 phosphoryliert, dadurch eine PBD Erkennungssequenz generiert und somit die PBD-abhängige Bindung und Phosphorylierung von Cdc25 durch Plk1 bewirkt. In der Prophase aktiviert Cdc25 wiederum Cdk1/Cyclin-B am Zentrosom (Jackman *et al.*, 2003). Plk1 phosphoryliert Cyclin-B1 auch direkt, was ebenfalls zur Aktivierung von Cdk1/Cyclin-B beiträgt (Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002; Jackman *et al.*, 2003). Zusätzlich wird dieser Mechanismus durch die Plk1 initiierte Degradation von Myt1 und Wee1 unterstützt (Watanabe *et al.*, 2004; Inoue und Sagata, 2005).

Um eine genaue Regulation der Mitose zu erreichen kooperieren Kinase-Phosphatase Signalkaskaden mit Ubiquitin Signalwegen. Zu den wichtigsten Ubiquitin E3 Ligasen der Mitose gehören der APC/C Komplex und der Skp1 (*S-phase kinase-associated protein 1*)/Cul1 (*cullin 1*)/F-Box Proteinkomplex (SCF). Diese zerstören gezielt verschiedene regulatorische Proteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Mitose, um den Fortgang und schließlich den Austritt aus der Mitose herbeizuführen. Plk1 ist an der Regulation von APC/C beteiligt (für eine eingehende Besprechung siehe Eckerdt und Strebhardt, 2006). In der späten Prophase generiert Plk1 ein Phosphodegron auf Emi1 (*early mitotic inhibitor 1*), einem APC/C Inhibitor, der vor allem während der S- und G2 Phase eine verfrühte APC/C Aktivität verhindert (Moshe *et al.*, 2004). Emi1 wird daraufhin von SCF in Kooperation mit β TrCP (*β -transducin repeat containing protein*), einem Protein der F-Box Familie, erkannt und degradiert (Hansen *et al.*, 2004). Des Weiteren phosphoryliert Plk1 APC/C auch direkt, was eine der Voraussetzung für die Aktivierung der Ubiquitinligase in der späteren Mitose darstellt (Kraft *et al.*, 2003). Nachdem neben Plk1 sowohl APC/C als auch Emi hochangereichert am Zentrosom vorliegen, könnten diese Interaktionen, eventuell PBD-gesteuert, an dieser zellulären Struktur stattfinden. Die Kooperation von Plk1 und SCF/ β TrCP spielt bei der SCF-gesteuerten Proteindegredation zu Beginn der Mitose generell eine wichtige Rolle. Wie Emi1, werden

auch die Plk1 Substrate Wee1 (Watanabe *et al.*, 2004, siehe oben), Bora (Seki *et al.*, 2008), das DDC (*DNA damage checkpoint*) Protein Claspin (Mailand *et al.*, 2006; Mamely *et al.*, 2006; Peschiaroli *et al.*, 2006) und Hsf1 (*heat shock factor 1*) (Lee *et al.*, 2008) von Plk1 an einer kanonische Degronsequenz (D-S-G-X-X-S) phosphoryliert und SCF/ β TrCP-abhängig degradiert.

Die Aktivität von Plk1 am Zentrosom wird von PP1C (*protein phosphatase 1C*) im Komplex mit ihrer regulatorische Untereinheit Mypt1 (*myosin phosphatase target subunit 1*) negativ kontrolliert. Plk1 assoziiert durch Interaktion ihrer PBD mit einer Cdk1 generierten Dockingsite auf Mypt1 und wird daraufhin von PP1C an Thr210 dephosphoryliert (Yamashiro *et al.*, 2008).

Aktivität am Kinetochor von der Prometaphase bis zur Telophase. In der Prometaphase akkumuliert Plk1 am Kinetochor und ist dort an der erfolgreichen Befestigung der Mikrotubuli beteiligt (Arnaud *et al.*, 1998; Sumara *et al.*, 2004). Die Kinase interagiert an dieser Stelle mit zahlreichen Proteinen, was zum einen ihren Verbleib am Kinetochor ermöglicht und zum anderen der Ausübung ihrer Funktionen dient. Das Zentromerprotein CENP-U (*centromere protein U*) ist an der initialen Rekrutierung von Plk1 beteiligt, wird von dieser phosphoryliert und anschließend degradiert (Kang *et al.*, 2006). Die Kinase Bub1, das Kinesin KIF2A (*kinesin heavy chain member 2A*), sowie INCENP (*inner centromere protein*), ein Mitglied des chromosomalen Passengerkomplexes, werden durch Cdk1-Phosphorylierung geprimed und binden daraufhin an die PBD von Plk1 (Goto *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2006; Rosasco-Nitcher *et al.*, 2008). Ein weiteres Plk1 Substrat ist NudC (*nuclear distribution gene C homolog*), ein Dynein-assoziiertes Protein, das ebenfalls für die Kinetochorlokalisierung von Plk1 notwendig ist (Nishino *et al.*, 2006). Auch spielt die Kinaseaktivität von Plk1 eine wichtige Rolle für ihre korrekte Kinetochorlokalisierung (Santamaria *et al.*, 2007).

Die Plk1 Konzentration ist an Kinetochoren solcher Chromosomen besonders hoch, die noch nicht mit beiden Polen der mitotischen Spindel verbunden sind (Lenart *et al.*, 2007). Dies aktiviert den Spindelcheckpunkt, in den Plk1 indirekt über mehrere Substrate involviert ist. Plk1 phosphoryliert BubR1, eine mit Bub1 (siehe oben) verwandte Kinase, die sowohl im Spindelcheckpunkt, als auch in der Bildung stabiler *end-on* Verbindungen zwischen Kinetochor und Mikrotubuli wichtige Funktionen ausübt (Meraldi *et al.*, 2004; Lampson und Kapoor, 2005). Dabei ist die Phosphorylierung durch Plk1 nur für letztere

essentiell und vor allem bei fehlender Kinetochorspannung besonders ausgeprägt (Elowe *et al.*, 2007). Plk1 ist auch für die Bildung des gut erforschten 3F3/2 Phosphoepitops verantwortlich, welches spezifisch auf Kinetochoren generiert wird, die nicht unter Spannung stehen und zur Assoziation wichtiger Checkpunktproteine mit dem Kinetochor führt (Ahonen *et al.*, 2005; Wong und Fang, 2005). Wong und Fang (2007) schlugen vor, dass das 3F3/2 Phosphoepitops auf BubR1 liegen könnte und eine wichtige Rolle im Spindel-Checkpunkt spielt.

Um während der Prophase die Verbindungen zwischen den Schwesterchromatiden zu lösen (was eine Voraussetzung für deren Trennung in der Anaphase darstellt), phosphoryliert Plk1 die SA2 Untereinheit von Cohesin, das daraufhin von den Chromosomenarmen dissoziiert. Bis zum Ende der Metaphase ist die Lokalisation von Cohesin am Zentromer jedoch für die korrekte Anordnung der Chromosomen notwendig. Cohesin wird dort von Sgo1 (*shugoshin 1*) geschützt, indem Sgo1 die Proteinphosphatase PP2A (*protein phosphatase 2A*) rekrutiert, welche die Plk1 Phosphorylierung der SA2 Untereinheit rückgängig macht. Ein ähnlicher Mechanismus existiert auch für die DNA Helikase PICH (*Plk1-interacting checkpoint helicase*), ein weiteres Protein des SAC und Substrat von Plk1, sowie für Plk1 selbst. Beide Proteine sind normalerweise am Kinetochor angereichert, verteilen sich jedoch bei Inhibition von Plk1 über die Chromosomenarme.

Aktivität an der Spindel in der Anaphase und Zytokinese. Während Plk1 auch in der späten Mitose noch an den Kinetochoren nachzuweisen ist, ist der Großteil der Kinase in der Ana- und Telophase an der zentralen Spindel und dem Midbody zu finden (Barr *et al.*, 2004). Die Rekrutierung von Plk1 zur zentralen Spindel erfolgt über einen selbst-priming Mechanismus: Plk1 phosphoryliert sowohl PRC1 (*protein regulator of cytokinesis 1*), ein Mikrotubuli-bündelndes Protein, welches die Architektur der zentralen Spindel reguliert, als auch die mitotischen Kinesine KIF23 und KIF20A (*kinesin family member 23* und *20A*), zwei Proteine der Spindel Midzone und kann anschließend mit der PBD an PRC1 und KIF23A binden (Neef *et al.*, 2003; Barr und Gruneberg, 2007; Neef *et al.*, 2007). Dies lässt auf einen positiven Feedbackloop schließen, der zur Akkumulation von Plk1 an der zentralen Spindel führt.

Durch die Entwicklung kleiner organischer, Plk1 spezifischer Inhibitoren konnten weitere Funktionen in der späten Mitose, wie zum Beispiel in der Spindelelongation oder

der Ausprägung der Teilungsfalte beleuchtet werden (Brennan *et al.*, 2007; Burkard *et al.*, 2007; Petronczki *et al.*, 2007; Santamaria *et al.*, 2007). Plk1 agiert auf der Ebene der RhoA (*ras homolog gene family, member A*) GTPase, einem Aktivator des kontraktilen Actomyosinrings, der in der Zytokinese für die Abschnürung des Zytoplasmas verantwortlich ist. Die zentrale Spindel dient bei diesem Prozess als Orientierungspunkt für die Positionierung der Teilungsfurche am äquatorialen Zellkortex und ist für die Aktivierung von RhoA verantwortlich (Kamijo *et al.*, 2006; Barr und Gruneberg, 2007). Plk1 phosphoryliert das Rho-GTPase Protein RacGAP1 (*Rac GTPase activating protein 1*), eine Untereinheit von Centralspindlin, einem für den Aufbau der zentralen Spindel wichtigen Heterotetramerkomplex (Burkard *et al.*, 2009). HsCyk-4 kann daraufhin an den Rho-*guanine nucleotide exchange factor* (GEF) Ect2 (*epithelial cell transforming sequence 2 oncogene*) binden und diesen so zur zentralen Spindel rekrutieren und aktivieren (Somers und Saint, 2003). Im Folgenden aktiviert Ect2 RhoA, woraufhin dieses die Myosin II Aktivität und Aktinpolymerisation fördert und so die Bildung des kontraktilen Rings und die Zytokinese einleitet (Nishimura und Yonemura, 2006).

Abbildung 2 zeigt die Lokalisation von Plk1 während des Zellzyklus, insbesondere während der Mitose und fasst die verschiedenen Aspekte Plk1-gesteuerter Enzymregulation zusammen.

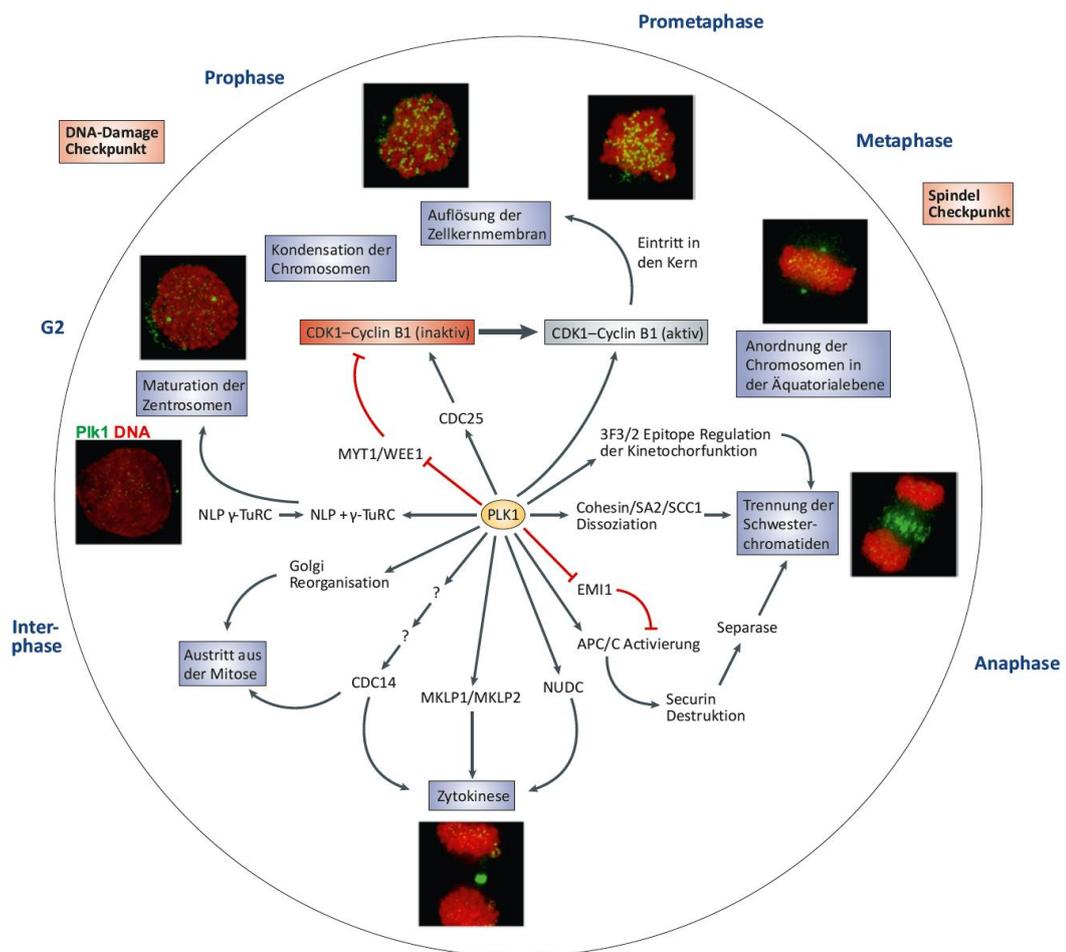


Abbildung 2: Plk1 Aktivität und Lokalisation während des Zellzyklus. Die Übersicht fasst die wichtigsten in der Fachliteratur beschriebenen und im Text angesprochenen Aspekte der Plk1 Regulation zahlreicher Abschnitte des Zellzyklus zusammen und veranschaulicht die entsprechende Lokalisation der Kinase an unterschiedlichen subzellulären Strukturen. Die Mikroskopieaufnahmen zeigten die zelluläre Fluoreszenzmarkierung der DNA (rot) und von Plk1 (grün). Das Diagramm zeigt inhibitorische (rot) und stimulatorische (schwarz) Interaktionen. (Abgewandelte Abbildung aus Strebhardt und Ullrich, 2006; und Petronczki *et al.*, 2007)

1.2.3 DIE MITOTISCHE SERIN-/THREONIN-/TYROSINKINASE MPS1

Die Proteinkinase Mps1 wurde erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* als notwendiger Faktor für die Duplikation des Spindelpolkkörpers identifiziert und nach den monopolaren Spindeln benannt, die sich in Mps1-mutierten Zellen bei der Zellteilung formieren (Winey *et al.*, 1991). Seitdem wurden orthologe Proteine in nahezu allen sequenzierten eukaryotischen Lebewesen charakterisiert (Winey und Huneycutt, 2002), allen voran die humane Form Mps1 (Mills *et al.*, 1992; Lindberg *et al.*, 1993; Hogg *et al.*, 1994). Die Kinase kann sowohl Serin-, Threonin- als auch Tyrosinreste phosphorylieren (Mills *et al.*, 1992). Mps1 Aktivität ist ein elementarer Bestandteil des mitotischen Spindelcheckpunkts (Abrieu *et al.*, 2001; Stucke *et al.*, 2002). Die Inhibition oder Abwesenheit von Mps1 verursacht schwerwiegende Störungen des mitotischen Ablaufs, wie z.B. falsch ausgerichtete Chromosomen in der Metaphase, zahlreiche verzögert segregierte Chromatiden in der Anaphase und Fehler in der Zytokinese (Fisk *et al.*, 2003; Jelluma *et al.*, 2008b). Dies führt zu aneuploiden Zellen und letztlich zum Zelltod, was Mps1 als potentielleres Krebstherapietarget nahelegt (Kops *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2009). In der Interphase interagiert Mps1, wie zahlreiche SAC Proteine, mit Komponenten des Zellkernporenkomplexes (Campbell *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003).

1.2.3.1 Subzelluläre Lokalisation und Proteininteraktionen

Mps1 übt seine Spindelcheckpunkt Funktion hauptsächlich am Kinetochor aus, spielt aber auch in gelöster Form eine Rolle bei der Generierung und Aufrechterhaltung des *wait-anaphase* Signals. FRAP Experimente haben gezeigt, dass Mps1 relativ hohe Fluktuationsraten am Kinetochor aufweist und ihre Inhibition, womöglich durch eine Verlangsamung der Fluktuationsgeschwindigkeit, zu einer deutlich erhöhten Konzentration am Kinetochor führt (Howell *et al.*, 2004; Hewitt *et al.*, 2010).

Hec1 (*highly expressed in cancer protein*), ein Protein des Ndc80 Komplexes, ist für die Rekrutierung von Mps1 zum Kinetochor notwendig (Martin-Lluesma *et al.*, 2002). Dort interagiert Mps1 mit zahlreichen Proteinen des Spindelcheckpunkts, um eine korrekte Verbindung von Kinetochor und Mikrotubuli sicherzustellen. Welches der Substrate jedoch für seine richtige Lokalisation und Funktionalität unbedingt auf die Aktivität von Mps1 angewiesen ist und in welcher Richtung und Reihenfolge sich die Wechselwirkungen ereignen wird derzeit aktiv diskutiert (Lan und Cleveland, 2010).

Analysen mit RNAi gegen Mps1, sowie eine Zahl kürzlich publizierter Studien, in denen verschiedene Mps1 Inhibitoren zum Einsatz kamen, ergaben teilweise widersprüchliche Resultate (siehe im Folgenden).

Interaktion mit Mad1 und Mad2. Die Funktion von Mps1 im Spindelcheckpunkt ist eng mit der Rekrutierung von Mad1 und Mad2 (*mitotic-arrest deficient homologue 1 and 2*) zum Kinetochor verbunden (Martin-Lluesma *et al.*, 2002; Fisk *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003). Mad1 ist als Dimer am Kinetochor verankert und fungiert als Rezeptor für Mad2. Dieses kann in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen: als offenes (O-Mad2) oder als geschlossenes (C-Mad2) Konformer (Shah *et al.*, 2004). Bindet Mad2 an Mad1, nimmt es seine geschlossene Konformation an und bildet den C-Mad2-Mad1 Kernkomplex. Da Mad2 ebenfalls dimerisieren kann, rekrutiert dieser Kernkomplex zwei weitere O-Mad2 Moleküle, die unter Konvertierung zu C-Mad2 auf zwei Cdc20 Moleküle übertragen werden. Die Cdc20 Aktivität ist durch diese Komplexbildung inhibiert und bewirkt somit eine Aufrechterhaltung des SAC (Musacchio und Salmon, 2007). In frühen RNAi Studien wurde beobachtet, dass Mps1 für die Lokalisation von Mad1 und Mad2 am Kinetochor notwendig ist (Martin-Lluesma *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Tighe *et al.* (2008) differenzierten, dass auch eine katalytisch inaktive Mps1 für eine substantielle Rekrutierung von Mad1 zum Kinetochor ausreicht, während Mad2 auf eine vollständige Mps1 Aktivität für seine Kinetochorlokalisierung angewiesen ist.

Drei kürzlich publizierte Studien konnten nach pharmakologischer Inhibition von Mps1 in mitotischen Zellen weder Mad1 noch Mad2 am Kinetochor nachweisen (Kwiatkowski *et al.*, 2010; Maciejowski *et al.*, 2010; Sliedrecht *et al.*, 2010) und Santaguida *et al.* (2010) zeigten, dass nach Mps1 Inhibition neben Mad1 auch die Rekrutierung seines Kinetochorrezeptors, des RZZ Komplexes (Rod (*rough deal*)/Zw10 (*zeste white-10*)/Zwilch) blockiert war. Hewitt *et al.* (2010) konnten in ihrer Inhibitorstudie nur partielle Lokalisationsdefekte von Mad1, jedoch stark ausgeprägte Auswirkungen auf Mad2 feststellen. Sie argumentierten, dass sich diese insgesamt diskrepanten Funde auf die Art und den Zeitpunkt der Mps1 Inhibition zurückzuführen ließen und konnten zeigen, dass Mps1 in zwei verschiedene Schritte involviert ist: Zu Beginn der Mitose ist Mps1 für die initiale Assoziation von Mad1 und Mad2 mit dem Kinetochor notwendig, möglicherweise indirekt über die Rekrutierung des RZZ Komplexes. Im weiteren Verlauf der Mitose wird die Mps1 Aktivität zwar nicht mehr für das Fortbestehen des C-Mad2-Mad1

Kernkomplexes am Kinetochor benötigt, ist aber für die ständige Bindung von O-Mad2 an den C-Mad2-Mad1 Kernkomplexes verantwortlich. Dies garantiert die Aufrechterhaltung der Cdc20 Inhibition bis alle Chromosomen ausgerichtet sind.

Förderung der Cdc20 Inhibitor Komplexbildung. Die Einleitung der Anaphase wird nicht nur über eine Kinetochor-abhängige Reaktionskette kontrolliert. Es sind auch Mechanismen notwendig, die mitotischen Zellen generell genügend Zeit geben, voll funktionsfähige Kinetochore auszubilden, um dann, wenn notwendig, den SAC in Kinetochor-abhängiger Weise in der Promethaphase zu aktivieren. Diese minimale Dauer der Mitose wird über eine bereits in der Interphase stattfindende Bindung von Cdc20 an Mad2 und BubR1/Bub3 bzw. lediglich einen der beiden erreicht (Sudakin *et al.*, 2001; Meraldi *et al.*, 2004; Malureanu *et al.*, 2009). Die Inhibition von Mps1 führt zu einer teils dramatischen Verkürzung der Mitose (Hewitt *et al.*, 2010; Maciejowski *et al.*, 2010; Santaguida *et al.*, 2010; Sliedrecht *et al.*, 2010). Maciejowski *et al.* (2010) konnten zeigen, dass Mps1 nicht nur während der Promethaphase, sondern auch in der Interphase für die Bildung von inhibitorischen Cdc20 Komplexen verantwortlich ist (Maciejowski *et al.*, 2010). Ob dies durch die Katalyse der Komplexbildung, oder die Inhibition eines Signalwegs, der zur Dissoziation des Komplexes führt, geschieht bleibt offen. Auch ist ungeklärt, wie die Aktivität der zytosolischen Mps1 nach der Erfüllung der Checkpunktkriterien reguliert wird.

Steuerung der Chromosomenorientierung. Neben seinen Funktionen in der Aufrechterhaltung des SAC steuert Mps1 auch die korrekte biaxiale Chromosomenorientierung. Ursprünglich wurde dies einer Mps1-abhängigen Regulation der Aurora-B Kinaseaktivität zugeschrieben, da Mps1 Borealin, einen Faktor des chromosomalen Passengerkomplexes phosphoryliert (Jelluma *et al.*, 2008b; Bourhis *et al.*, 2009). Jüngste Studien kamen jedoch zu dem Ergebnis, dass die Inhibition von Mps1 keine Auswirkung auf die Phosphorylierung bekannter Aurora-B Substrate hat (Hewitt *et al.*, 2010; Maciejowski *et al.*, 2010; Santaguida *et al.*, 2010). Vielmehr bestimmt Aurora-B die Lokalisation von Mps1 am Kinetochor und steht in der Signalkaskade über Mps1 (Hewitt *et al.*, 2010; Santaguida *et al.*, 2010). Die unterschiedlichen Resultate lassen vermuten, dass die Korrektur fehlerhafter Mikrotubuli-Kinetochorverbindungen nicht über eine

geradlinige Signalkette, sondern über ein Signalnetzwerk gesteuert wird, an dem beide Kinasen beteiligt sind (Lan und Cleveland, 2010).

Die durch Mps1 Inhibition hervorgerufenen Defekte in der Chromosomenorientierung lassen sich auch über die Mps1 Regulation des SAC Proteins Bub1 erklären, dessen Depletion zu SAC Defizienz und falsch ausgerichteten Chromosomen führt (Kiyomitsu *et al.*, 2007; Klebig *et al.*, 2009). Wird Mps1 nach der Spindeldepolymerisation durch Nocodazol inhibiert, ist Bub1 nicht mehr (Maciejowski *et al.*, 2010; Sliedrecht *et al.*, 2010), oder zumindest in geringerem Maße (Santaguida *et al.*, 2010) am Kinetochor zu lokalisieren.

Mps1 steuert auch die Rekrutierung von CENP-E, einem mit Kinesin verwandten Motorprotein, zum Kinetochor (Hewitt *et al.*, 2010). Nachdem CENP-E sowohl durch Mps1 (Espeut *et al.*, 2008), als auch durch Aurora-B (Kim *et al.*, 2010) phosphoryliert wird und CENP-E Inhibition charakteristische Spindel- und Chromosomensegregationsdefekte hervorruft (Weaver *et al.*, 2003; Kapoor *et al.*, 2006), könnte der beobachtete Phänotyp auch auf dieses Protein zurückzuführen sein.

Ungeklärte Funktionen. Mps1 dimerisiert und transphosphoryliert sowohl *in-vitro*, als auch in mitotischen Zellen *in-vivo* (Kang *et al.*, 2007; Hewitt *et al.*, 2010). Die daraus resultierenden Konsequenzen für die Lokalisierung, sowie die Auswirkung auf die unterschiedlichen Mps1 Funktionen müssen allerdings noch genau geklärt werden.

Im Gegensatz zu seiner essentiellen Rolle im SAC ist die Funktion von Mps1 in Vertebraten bei der Duplikation der Zentrosomen in der S-Phase und demzufolge auch beim Spindelaufbau umstritten (Stucke *et al.*, 2002; Fisk *et al.*, 2003; Stucke *et al.*, 2004; Kasbek *et al.*, 2007). Es scheint jedoch, dass für die Zentrosomenduplikation deutlich niedrigere Mps1 Konzentrationen ausreichen als für die Erfüllung der mitotischen Funktionen und die Diskrepanzen der Ergebnisse auf die verwendeten Techniken zurückzuführen sind (Fisk *et al.*, 2004).

1.3 PROTEINKINASEN UND KREBS

Die Veränderung der Aktivität von Kinasen und die daraus resultierenden Fehlregulationen zellulärer Signaltransduktionswege stehen in engem Zusammenhang mit der Entstehung zahlreicher Krebsarten (Hanahan und Weinberg, 2000). Ursachen können unter anderem die Überexpression von Kinasen durch Genamplifikationen oder Mutationen ihrer Promotorregionen, Mutationen der Kinasen selbst, oder Defekte negativer Regulationsmechanismen sein (Hanahan und Weinberg, 2000). Genetische Veränderungen von Kinasen wurden bis heute in einer Vielzahl von Krebsarten untersucht (Blume-Jensen und Hunter, 2001; Barber *et al.*, 2004; Parsons *et al.*, 2005; Stephens *et al.*, 2005). Darauf basierend wurden Kinaseinhibitoren entwickelt, um aktivierte onkogene Signalwege in malignen Zellen gezielt ausschalten zu können (Strebhardt und Ullrich, 2008; Knight *et al.*, 2010). Erfolgreiche Anwendung in der Klinik finden unter anderem der gegen die Rezeptortyrosinkinase ErbB2 (*receptor tyrosine-protein kinase erbB-2*, auch Her2) gerichtete Antikörper Trastuzumab bei Brustkrebs mit ErbB2-Amplifikation (Hudziak *et al.*, 1989; Slamon *et al.*, 2001), die Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib der EGF Rezeptortyrosinkinase (*epidermal growth factor receptor* (EGFR)) in der Therapie EGFR-mutierter Lungentumoren (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004; Pao *et al.*, 2004), sowie der gegen ABL (*tyrosine-protein kinase ABL 1*), KIT (*mast/stem cell growth factor receptor*) und PDGFR (β -*type platelet-derived growth factor receptor*) gerichtete Inhibitor Imatinib, der bei chronischer myeloischer Leukämie mit BCR (*breakpoint cluster region*)-ABL Translokation und bei gastrointestinalen Stromatumoren und Melanomen mit KIT oder PDGFR Mutation eingesetzt wird (Druker *et al.*, 2001a; Druker *et al.*, 2001b; Hodi *et al.*, 2008).

Die Diagnostizierung einer genetischen Läsion reicht jedoch oft nicht dazu aus, die therapeutische Wirksamkeit eines Inhibitors im individuellen Patienten abschätzen zu können. Das entartete Signalnetzwerk der Tumorzelle muss ausschließlich von der aktivierten Kinase abhängen, damit deren Inhibition zur Sensitivität des Tumors gegenüber dem Inhibitor führt (Sos *et al.*, 2009). Die Veränderungen in genomisch instabilen Zellen sind jedoch oftmals zu komplex, sodass genetische Forschungsansätze, die meist nur wenige Ursachen identifizieren können, in vielen Fällen zu kurz greifen. Von großer Wichtigkeit ist daher die globale Charakterisierung der veränderten zellulären Signaltransduktionsnetzwerke, sowie deren Verknüpfung mit der genetischen Disposition

und Inhibitorsensitivität von Krebszellen, um die Schlüsselstellen lokalisieren zu können, die die Krankheit vorantreiben. Dies ermöglicht nicht nur die Identifikation biologischer Marker oder Signaturen für eine zuverlässige Vorhersage des Therapieerfolgs, sondern auch neuer Interventionspunkte und letztlich therapeutischer Ansätze.

1.3.1 NICHT-KLEINZELLIGES LUNGENKARZINOM

Lungenkrebs ist mit einer durchschnittlichen Fünfjahres-Überlebensrate von 15% die häufigste maligne Todesursache der westlichen Welt (Jemal *et al.*, 2009). In 85% aller Fälle handelt es sich um nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (*non-small cell lung cancer* (NSCLC)), der in verschiedene histologische Varianten eingeteilt wird, wobei Adenokarzinome, großzellige Karzinome und Plattenepithelkarzinome am häufigsten vorliegen (Lehtio und De Petris, 2010). Obwohl NSCLC im frühen Stadium kurativ operativ entfernt werden kann und bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen Chemotherapie und Radiotherapie erfolgreich eingesetzt werden können, wird bei knapp 50% aller Patienten eine Fernmetastasierung diagnostiziert, die nur noch palliativ behandelt werden kann (Groome *et al.*, 2007).

1.3.1.1 Charakteristika und therapeutische Ansätze

Die Entwicklung gezielter Medikamente zur spezifischen Inhibition onkogener Signalwege eröffnete, oft in Kombination mit Chemotherapie, weitere therapeutische Möglichkeiten für NSCLC Patienten (Batus *et al.*, 2010). Aufgrund der genetischen Disposition beziehungsweise einer vorhandenen Primärresistenz profitiert jedoch nur ein kleiner Anteil der Erkrankten von diesen Strategien.

Mehr als 10% aller kaukasischen NSCLC Patienten weisen aktivierende Mutationen des EGF Rezeptors auf, einer Rezeptortyrosinkinase, die Wachstumssignale über den PI3K/AKT (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase/RAC serine/threonine-protein kinase*), den MAPK (*mitogen activated kinase*) und den STAT (*signal-transducer and activator of transcription*) Signaltransduktionsweg weiterleitet (Sordella *et al.*, 2004). Obwohl ein Großteil dieser Patienten zunächst gut auf eine Behandlung mit den reversiblen Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib und Gefitinib anspricht, entwickeln viele Patienten mit der Zeit Resistenzen, die durch sekundäre Mutationen des EGF Rezeptors oder redundante Signalweiterleitung über andere Rezeptoren und in der Signalkette

weiter unten liegende Akteure bedingt sein können (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2007; Mok *et al.*, 2009; Batus *et al.*, 2010). Unter anderem führt die sekundär erworbene Genamplifikation von c-Met (*hepatocyte growth factor receptor*) zur Umgehung des EGFR Signalwegs und Signaltransduktion über PI3K/AKT (Bean *et al.*, 2007). Möglicherweise haben auch weitere Mitglieder der EGF Rezeptorfamilie wie ErbB2 Einfluss auf eine erfolgreiche EGFR Inhibition (Cappuzzo *et al.*, 2005). Des Weiteren könnte die Rezeptortyrosinkinase VEGF (*vascular endothelial growth factor*), die ebenfalls zur Entstehung von NSCLC beiträgt, an kompensatorischen Signalwegen beteiligt sein (Viloria-Petit *et al.*, 2001). Wie aufschlussreich die Korrelation der therapeutischen Wirksamkeit eines Inhibitors mit der Charakteristik des entarteten Signalnetzwerks von Tumorzellen sein kann unterstreicht eine globale Proteomikstudie von Guo *et al.* (2008). Durch die Untersuchung der Phosphotyrosin-Signalweiterleitung in EGFR-Inhibitor sensitiven NSCLC Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die onkogene Kinase in sensitiven Zellen multiple weitere Rezeptortyrosinkinasen, sowie ein ausgeprägtes Netzwerke steuert, das nach Inhibitorbehandlung kollabiert.

Etwa 15% aller Patienten weisen aktivierende Mutationen in KRAS (*Kirsten rat sarcoma-2 viral oncogene homolog*) auf, einem Schlüsselenzym der EGFR Signaltransduktion (Quinlan und Settleman, 2009). Beachtenswerterweise schließen sich Mutationen in KRAS und Mutationen im EGF Rezeptor zumeist gegenseitig aus und KRAS Läsionen bedeuten oft eine verminderte initiale Antwort auf EGFR Tyrosinkinaseinhibitoren (Pao *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2008).

Weitere genetische Aberrationen, die mit der Entstehung von NSCLC in Verbindung gebracht werden, sind die durch eine chromosomale Translokation entstandene Kinase EML4-ALK (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4 - anaplastic lymphoma kinase*) (Solomon *et al.*, 2009), sowie Mutationen in ErbB2, PI3K und B-Raf (*serine/threonine-protein kinase B-raf*) (Greenman *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2007).

Um Resistenzen gegen EGFR gerichtete Therapeutika zu überwinden, werden in neueren Strategien eine oder mehrere Substanzen auf einmal gegen mehrere zelluläre Ziele eingesetzt. Vielversprechend ist dabei die Inhibition mehrerer Rezeptoren und Mitglieder des EGFR Signalwegs, sowie die duale Inhibition des EGFR und VEGFR, da das Tumorwachstum stark von der Tumorangio-genese des vaskulären Endotheliums abhängig ist (Tabernero, 2007; Batus *et al.*, 2010). Eine globale Proteomikstudie charakterisierte die

Tyrosinphosphorylierung von 41 NSCLC Zelllinien und mehr als 150 NSCLC Tumoren und konnte die Aktivierung bekannter onkogener Kinasen wie EGFR und c-Met, neuer ALK und ROS (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS*) Fusionsproteine, sowie der Tyrosinkinase PDGFR α und DDR1 (*discoidin domain receptor tyrosine kinase 1*) identifizieren (Rikova *et al.*, 2007). Die Beobachtung, dass Zelllinien und Tumore oft mehrere verschiedene aktivierte Kinasen exprimieren, die entweder gemeinsam in hierarchischen Netzwerken agieren oder unabhängig in parallelen Signalwegen, verdeutlicht, wie elementar eine fundierte Kenntnis der Zusammenhänge in der Zelle für die Wahl der Therapie und die Kombination der Medikamente ist, um die Krankheit erfolgreich bekämpfen zu können und Resistenzen zu vermeiden (Rikova *et al.*, 2007).

1.4 MASSENSPEKTROMETRIE

1.4.1 MASSENSPEKTROMETRIE UND PHOSPHOPROTEOMIK

Aufgabe und Herausforderung der Zellbiologie ist es die komplexen Abläufe und Mechanismen zellulärer Systeme zu erforschen. Jede Zelle integriert zu jedem Zeitpunkt eine Vielzahl extrazellulärer und intrazellulärer Signale in parallel ablaufenden, miteinander wechselwirkenden Prozessen, die durch die dynamische Interaktion zahlreicher Komponenten bewerkstelligt werden. Die Massenspektrometrie (MS)-basierte Proteomik gehört zu den wichtigsten Technologien der globalen Charakterisierung von Signalwegen, da sie die systemweite Analyse post-translationaler Modifikationen (PTMs) von Proteinen, Protein-Protein Wechselwirkungen und die Überwachung von Veränderungen der Proteinexpression ermöglicht. Ein entscheidender Vorteil dieser Methode ist die unvoreingenommene Analyse von Proben unbekannter Zusammensetzung und prinzipiell jeden biologischen Ursprungs ohne gezieltes Vorwissen.

Der allgemeine Arbeitsablauf massenspektrometrischer Proteomstudien, insbesondere der Phosphoproteomstudien umfasst vier Schritte auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll: (1) Extraktion der Proteine aus biologischem Material und anschließende Fraktionierung und/oder Anreicherung spezieller PTMs; (2) Auftrennung und Ionisierung der Peptide; (3) Aufnahme von Massenspektren der Peptide, sowie ihrer Fragmente und (4) Datenanalyse.

1.4.1.1 Proteinextraktion und Peptidanreicherung

Im ersten Schritt wird das biologische Material lysiert, die Proteine extrahiert und mit sequenzspezifischen Proteasen zu Peptiden verdaut. Die massenspektrometrische Analyse von Peptiden (*bottom-up approach*) im Gegensatz zu Proteinen (*top-down approach*) bietet wichtige Vorteile. Nicht nur sind Handhabung und Löslichkeit von Peptiden unproblematischer (insbesondere von Membranproteinen), auch weisen Massenspektrometer eine deutlich höhere Sensitivität für Peptide als für Proteine auf und können Sequenzinformationen am effizientesten bis zu einer Peptidlänge von 20 Aminosäuren detektieren (Steen und Mann, 2004). Am häufigsten wird das Verdauungsenzym Trypsin eingesetzt, oft auch in Kombination mit der Endo-Lysylpeptidase C (Lys-C). Beide Enzyme zeichnen sich durch eine hohe Aktivität, Stabilität und Sequenzspezifität aus (Trypsin schneidet vor Arginin und Lysin, Lys-C vor Lysin auf der carboxyterminalen Seite der Peptidbindung), was zur Erzeugung von Peptiden bevorzugter Länge und mit basischem Carboxylterminus führt und somit eine optimale Fragmentierbarkeit ermöglicht (Olsen *et al.*, 2004).

Der Verdau von Proteinen zu Peptiden erzeugt hochkomplexe Peptidgemische. Vor allem für groß angelegte Proteomstudien und die Analyse spezieller Subproteome, wie dem Phosphoproteom sind daher weitere Auftrennungs- und/oder Anreicherungsschritte notwendig, um die erwünschte Datentiefe zu erzielen (Zhao und Jensen, 2009).

Eine robuste Methode zur Reduktion der Komplexität ist die Auftrennung der Proteine durch eindimensionale SDS-PAGE mit anschließender Fraktionierung der Gelspuren, in-Gelverdau der Proteine und Extraktion der Peptide (Shevchenko *et al.*, 2006). Alternativ kommen nach einem in-Lösungsverdau der Proteine chromatographische Verfahren zum Einsatz, was einen geringeren Arbeitsaufwand und eine bessere Automatisierbarkeit der Probenvorbereitung ermöglicht. Vor allem bei Phosphoproteomstudien bietet sich die SCX (*strong cation exchange*) Chromatographie an, deren Trennprinzip auf Ladungsunterschieden beruht. Da die negativ geladene Phosphogruppe die durchschnittlich 2-fach positive Nettoladung eines Peptids (protonierte N-terminale Aminogruppe und C-terminales Arginin oder Lysin) um eins minimiert, können Phosphopeptide angereichert und von Nichtphosphopeptiden getrennt werden. Mehrfach phosphorylierte Peptide können aufgrund ihrer neutralen oder negativen Nettoladung nicht binden und befinden sich in der Durchflussfraktion, die

ebenfalls analysiert wird. Eine Weitere, auch in der Phosphoproteomik erfolgreich angewandte Methode ist HILIC (*hydrophilic interaction chromatography*), bei der die Peptide hinsichtlich ihrer hydrophilen Eigenschaften aufgetrennt werden (Boersema *et al.*, 2007; McNulty und Annan, 2008).

Die spezifische Anreicherung von Phosphopeptiden erfolgt am häufigsten und erfolgreichsten über affinitäts- oder Antikörper-basierte Verfahren, es kommen aber auch andere Methoden wie die der chemische Markierung zum Einsatz (Macek *et al.*, 2009). Für die Anreicherung durch IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*) werden trivalente Metallionen wie Fe^{3+} oder Ga^{3+} auf porösem Säulenmaterial (z.B. Sepharose) immobilisiert und Phosphopeptide durch die hochaffine Koordination der Phosphatgruppe an das Metallion gebunden (Andersson und Porath, 1986; Posewitz und Tempst, 1999). Breite Anwendung findet auch die Komplexierung von Phosphopeptiden durch Lewis-Säure-Base Interaktionen mit Titaniumdioxid (TiO_2) (Pinkse *et al.*, 2004). Die Selektivität des TiO_2 Materials für die Phosphatgruppe kann durch den Einsatz kompetitiver Bindungspartner wie Dihydroxybenzolsäure, Milchsäure oder Glykolsäure gegenüber anderen sauren Gruppen (Glutamat- und Aspartatreste) deutlich verstärkt werden (Larsen *et al.*, 2005; Sugiyama *et al.*, 2007). Eine ebenfalls seit längerem etablierte Strategie ist die Anreicherung von Phosphoproteinen oder -peptiden durch Immunpräzipitation mit Phosphotyrosinantikörpern (De Corte *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2000; Rush *et al.*, 2005; Rikova *et al.*, 2007). Nachdem Tyrosinphosphorylierungen nur etwa 1-3% aller zellulären Phosphorylierungsereignisse ausmachen, ist diese Technik vor allem bei der massenspektrometrischen Analyse von Rezeptortyrosinkinasen von großer Bedeutung (Blagoev *et al.*, 2004; Hinsby *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005b; Schmelzle *et al.*, 2006; Mertins *et al.*, 2008).

Ein kürzlich publiziertes Protokoll zur Probenvorbereitung für die quantitative Phosphoproteomik erlaubte durch die Kombination von Proteinverdau in Lösung mit SCX Chromatographie und IMAC-Anreicherung der Phosphopeptide eine hochauflösende Detektion zellulärer Phosphorylierungsereignisse (Villen und Gygi, 2008). In Abbildung 3 sind die verschiedenen Möglichkeiten der Probenvorbereitung für massenspektrometrische Proteomstudien anschaulich zusammengefasst.

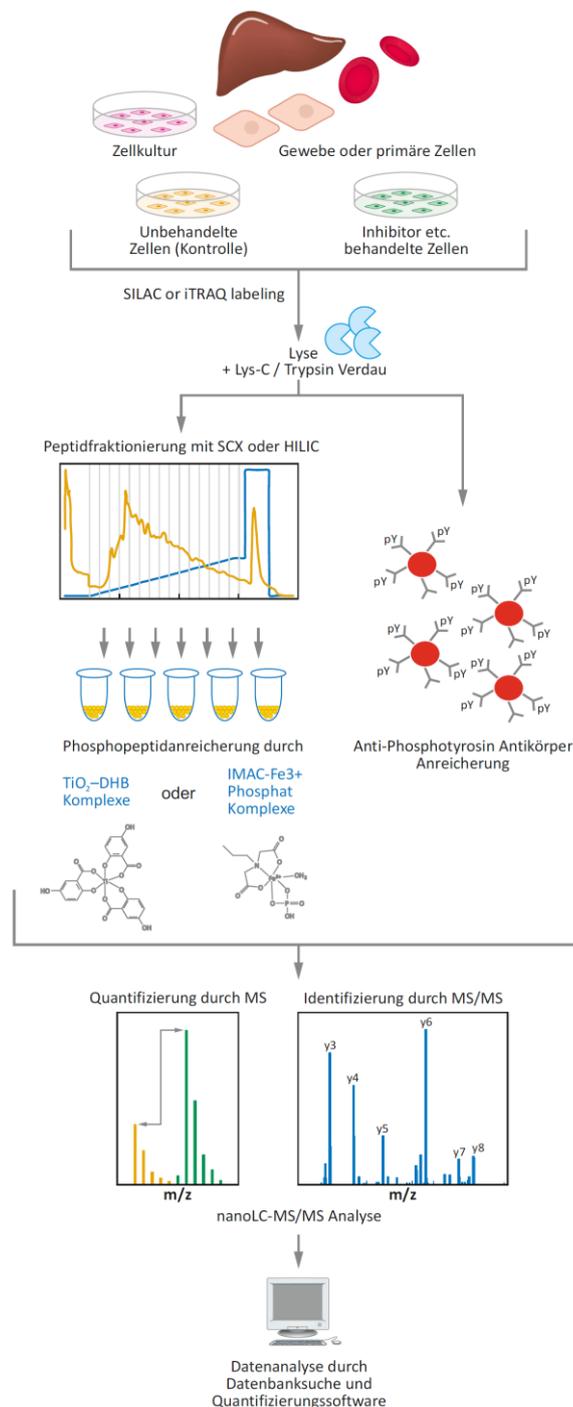


Abbildung 3: Typischer Arbeitsablauf der quantitativen Phosphoproteomik. Kontrollzellen und behandelte Zellen werden differentiell durch stabile Isotope markiert, lysiert und vermischt. Die Proteinextrakte werden verdaut und die Phosphopeptide durch die Kombination von Kationenaustausch und IMAC oder TiO₂ Chromatographie oder durch Immunpräzipitation mit phosphospezifischen Antikörpern angereichert. Die angereicherten Phosphopeptidmischungen werden durch nanoLC aufgetrennt und direkt im Massenspektrometer analysiert. Die relative Phosphopeptidquantifizierung erfolgt normalerweise durch die Aufnahme eines ersten Massenspektrums (MS), wobei die Peptididentifikation durch Fragmentierung in der Gasphase und der Aufnahme eines zweiten Tandemmassenspektrums (MS/MS) erfolgt. Die Peptidintensitäten und Sequenzdaten werden durch die Kombination von Datenbanksuchen (z.B. Mascot) und Quantifizierungssoftware (z.B. MaxQuant) ausgewertet. (Abgewandelte Abbildung aus Macek *et al.*, 2009)

1.4.1.2 Auftrennung und Ionisierung der Peptide

Nach der Probenvorbereitung werden die Peptide durch ein HPLC (*high performance liquid chromatography*) System auf eine mit C18 Material gepackte Mikrokapillarsäule aufgetragen und durch einen Lösungsmittelgradienten mit steigendem organischem Anteil eluiert. Die Peptide werden durch Elektronenspray Ionisation (ESI) am Ende der Kapillare ionisiert und treten daraufhin in der Gasphase direkt ins Massenspektrometer ein (Fenn *et al.*, 1989; Nobel Preis für Chemie 2002).

1.4.1.3 Messprinzipien der Massenspektrometrie

Im Massenspektrometer wird das Masse-Ladungsverhältnis (m/z Ratio) der eluierenden Peptide bestimmt. Von den zahlreichen verschiedenen Massenspektrometer Typen kommen in der Proteomik oftmals Quadrupol-TOF (*time-of-flight*) Instrumente oder lineare Ionenfalle (LIT)-Orbitrap Hybridinstrumente zum Einsatz (für eine eingehende Besprechung siehe Aebersold und Mann, 2003; sowie Chalkley, 2010). In TOF Instrumenten wird das Masse-Ladungsverhältnis der Peptidionen über die Zeit bestimmt, die diese benötigen um am Detektor anzukommen (Chernushevich *et al.*, 2001). In LIT-Orbitrap Instrumenten (siehe Abbildung 4), wie sie auch in dieser Studie verwendet wurden, können die eintreffenden Ionen in der linearen Quadrupol-Ionenfalle selektiert und manipuliert werden. Die Peptidionen können dann entweder mit hoher Sensitivität aber geringerer Auflösung und Massengenauigkeit in der Ionenfalle gemessen werden, oder in die Orbitrap transferiert und dort hochaufgelöst und massengenau detektiert werden, wobei durch den Transfer die Sensitivität vermindert wird (Makarov *et al.*, 2006). Das m/z Spektrum wird dabei aus der Frequenz mit der die Peptidionen in der Orbitrap oszillieren gewonnen (Senko *et al.*, 1996).

Für die genaue Identifikation und Quantifikation eines Peptidions muss neben seiner Masse und Intensität auch seine Aminosäuresequenz bestimmt werden (Steen und Mann, 2004). Dazu wechselt das Gerät zwischen zwei verschiedenen Modi: Nach Aufnahme des vollen Massenspektrums (MS) in der Orbitrap werden einzelne Peptide (z.B. die zehn intensivsten Massenpeaks des MS Spektrums) in der LIT isoliert und durch Kollision mit einem inerten Gas (zumeist Stickstoff oder Helium) entlang ihres Rückgrades fragmentiert (*collision induced decay* (CID)). Aus dem mit hoher Sensitivität in der LIT detektierten Fragmentspektrum (MS/MS oder MS^2) wird dann die Peptidsequenz

bestimmt. Strategien zur Charakterisierung von Phosphopeptiden basieren auf der Detektion charakteristischer Reporterionen oder *neutral loss* Fragmente im MS/MS Spektrum (Carr *et al.*, 2005). In LTQ-Orbitrap Instrumenten können *neutral loss* Ionen, die durch CID induzierten Verlust der Phosphogruppe entstanden sind, durch MSA (*multi stage activation*) direkt weiterfragmentiert werden (Schroeder *et al.*, 2004). Die Phosphopeptidsequenz wird dann aus dem entstandenen pseudo MSⁿ Spektrum gewonnen, das Informationen des MS² und des MS³ Spektrums enthält.

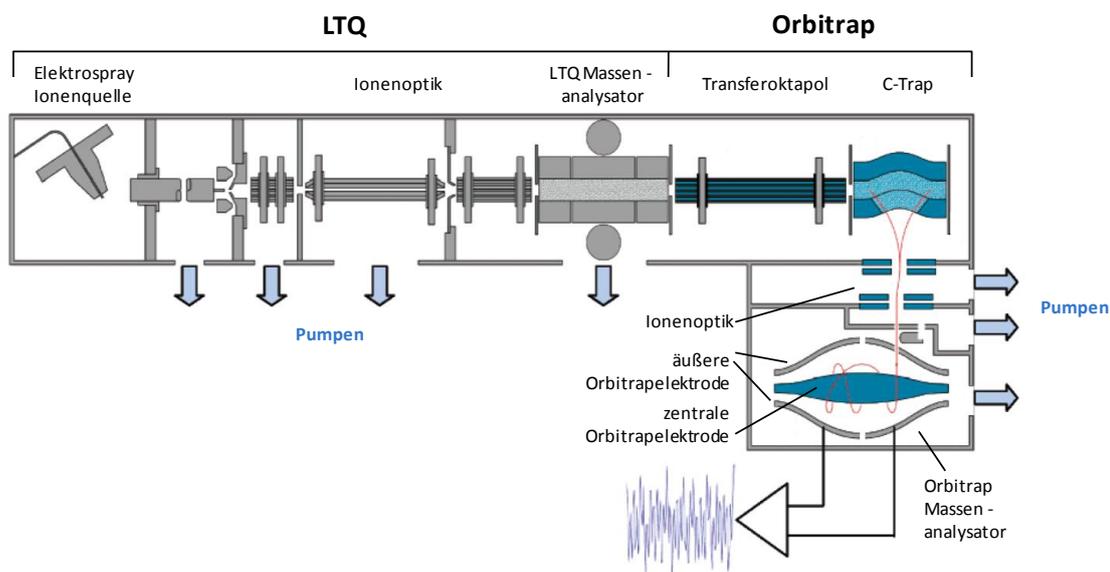


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines LTQ Orbitrap Massenspektrometers. Im vorderen Teil des Instruments befindet sich eine lineare Ionenfalle (LTQ) die für die Selektion und Manipulation von Ionen, wie auch für die sensitive Aufnahme von MS Spektren niedriger Auflösung geeignet ist. Akkumulierte Ionen werden über einen Oktapol-Ionenleiter in die C-trap (auch CLT, *curved linear trap*) geleitet. In der C-trap wird die Bewegung der Ionen durch einen geringen Stickstoffgasdruck gebremst und die Ionen sammeln sich in der Mitte der Falle. Die Ionen werden dann durch einen kurzen Puls in die Orbitrap injiziert und zirkulieren dort um und entlang der zentralen Elektrode. Die harmonisch oszillierenden Ionenpakete induzieren Ströme in den beiden Hälften der äußeren Elektrode (ICR Signal), die durch einen differentiellen Verstärker detektiert und durch schnelle Fouriertransformation in Frequenzen umgerechnet werden. Nachdem die Frequenz der Oszillationen eines Ions umgekehrt proportional zur Wurzel seines Masse-Ladungsverhältnisses ist ergibt sich so das Massenspektrum (Senko *et al.*, 1996). In der Orbitrap können MS Spektren mit geringerer Sensitivität aber höherer Auflösung gemessen werden. (Abbildung leicht abgewandelt entnommen aus Makarov *et al.*, 2006)

1.4.1.4 Analyse massenspektrometrischer Daten

Die Auswertung massenspektrometrischer Datensätze erfolgt durch hochentwickelte Identifizierungs- und Quantifizierungssoftware (für eine eingehende Besprechung siehe Nesvizhskii, 2010). Dabei kommen Suchalgorithmen zum Einsatz, die die detektierten Gesamt- und Fragmentmassen der Peptide mit theoretischen Fragmenten aller möglichen Peptide einer Proteindatenbank vergleichen (Mann, 1996; Taylor und Johnson, 1997; Perkins *et al.*, 1999). Im Prinzip lässt sich zwar aus den detektierten MS/MS Spektren durch die Massendifferenzen der Peaks die Aminosäuresequenz der Peptide bestimmen, diese enthalten jedoch oft nicht genügend Informationen für eine zweifelsfreie Aussage. Aufgrund der Tatsache, dass nur eine extrem kleine Anzahl aller möglichen Peptidsequenzen in der Natur vorkommt ist eine eindeutige Identifikation eines Peptids, auch bei unvollständiger MS/MS Information, durch Datenbankabgleiche möglich. Voraussetzung und Limitation dieser Strategie ist, dass nur Studien mit bereits sequenzierten Organismen durchgeführt werden können (Liska und Shevchenko, 2003). Die Suchalgorithmen (z.B. Mascot) werden meist in Kombination mit Softwarepaketen zur Quantifizierung der MS Intensitäten (z. B. MaxQuant) verwendet (Perkins *et al.*, 1999; Cox und Mann, 2008). Die ausgegebenen Peptidlisten enthalten neben Proteinannotationen und quantitativen Informationen auch Kennzahlen, die eine Beurteilung der Signifikanz einer Identifikation (sowohl der Peptidsequenz als auch eventueller PTMs) ermöglichen.

1.4.2 QUANTITATIVE MASSENSPEKTROMETRIE

Die Massenspektrometrie bietet, im Gegensatz zu anderen Methoden der Proteom- und Signaltransduktionsanalyse die Möglichkeit, mit höchster Genauigkeit quantitative Daten tausender Proteine und PTMs zu erheben. Allerdings erlaubt die Intensität des Massepeaks eines Peptidions noch keine direkte quantitative Aussage über die vorliegende Peptid- bzw. Proteinmenge. Sowohl die Zugänglichkeit der Protease, die Löslichkeit des Peptids, als auch seine Ionisationseffizienz, die stark von der chemischen Struktur des Peptids abhängt, beeinflussen das Signal. Um diese Problematik zu umgehen wurden mehrere Strategien entwickelt (Ong und Mann, 2005).

Die genaueste Quantifizierung ermöglicht der direkte Vergleich unterschiedlicher Proteinpopulationen durch differentielle Markierung mit stabilen Isotopen wie Deuterium (^2H), Kohlenstoff-13 (^{13}C), Stickstoff-15 (^{15}N) oder Sauerstoff-18 (^{18}O). Peptide mit

schweren oder leichten Isotopen verhalten sich während der Probenvorbereitung und LC-ESI gleich, können aber im Massenspektrometer aufgrund ihrer Massedifferenz unterschieden werden. Das Verhältnis der Peakintensitäten erlaubt eine sehr genaue, relative Quantifizierung der Peptid- und folglich auch Proteinmengen in den Populationen.

Die metabolische Markierung von Lebewesen mit stabilen Isotopen wurde erstmals in Mikroorganismen durch Zusatz von ^{15}N bzw. ^{13}C zum Wachstumsmedium angewendet (Oda *et al.*, 1999; Lahm und Langen, 2000). Mit SILAC (*stable isotope labeling in cell culture*) können auch Zellen höherer Organismen in Kultur durch isotopenmarkierte, essentielle Aminosäuren markiert werden (Ong *et al.*, 2002). Meist wird ^{13}C und/oder ^{15}N markiertes Arginin und Lysin eingesetzt, da dadurch nach tryptischem Verdau alle resultierenden Peptide (bis auf das C-terminale) carboxyterminal markiert vorliegen. Durch die Kombination verschiedener Isotopenvarianten (z.B. Arg⁰ und Lys⁰ (leicht, L) mit Arg⁶ und Lys⁴ (mittel, M) und Arg¹⁰ und Lys⁸ (schwer, H)) können bis zu drei unterschiedliche Populationen (*triple label*) in einer Probe analysiert werden. Mehrere *triple label* Experimente können zudem über eine gleichbleibende Kondition kombiniert werden, was vor allem für komplexere Studien wie z.B. Zeitreihen von großem Nutzen ist (Olsen *et al.*, 2006). Die Vermischung bekannter Proteinmengen direkt nach der Extraktion minimiert die Einschleusung quantitativer Fehler während der weiteren Probenvorbereitung (Mann, 2006). Mittlerweile findet SILAC auch über reine Zellkultursysteme hinaus Anwendung. Die Technik konnte vor Kurzem auf die Analyse von *in-vivo* Experimente in Mäusen und Gewebeproben übertragen werden (Kruger *et al.*, 2008; Geiger *et al.*, 2010). Für letztere wurde ein sog. SuperSILAC Referenzstandard eingesetzt, für den mehrere Zelllinien entsprechenden Gewebeansprungs in schwerem SILAC Medium kultiviert, lysiert und zu einem Referenzlysate vereinigt wurden, das dann jeweils mit den unmarkierten Gewebelysaten vermischt wurde.

Alternativ kann eine relative Quantifizierung unterschiedlicher Populationen auch durch chemische Markierung erfolgen (Julka und Regnier, 2004). Dabei werden Isotopenkodierte Massen-Tags eingesetzt, die mit Cysteinen, Aminogruppen oder Carboxylgruppen reagieren. Die Reaktion kann auf Proteinebene stattfinden, wird aber meistens auf Peptidebene angewendet. Am weitesten verbreitet ist iTRAQ (*isobaric tag for relative and absolute quantification*), eine Technik mit der vier oder acht verschiedene

Zustände auf einmal verglichen werden können (Ross *et al.*, 2004). Die mit Cysteinresten reagierenden Tags bestehen aus einer Reporter und einer Balancergruppe die im MS fragmentieren. Das freigesetzte Reporterion wird im MS/MS Spektrum aufgenommen und dient dann der Quantifizierung. Ihre uneingeschränkte Anwendbarkeit macht diese Methode besonders attraktiv für Studien mit Stammzellen, sowie Gewebe- und Patientenproben für die eine metabolische Markierung nicht in Frage kommt.

Auch die sogenannte *label-free* Methode, bei der Peptidsignale unterschiedlicher experimenteller Bedingungen und Messungen direkt verglichen werden, wurde bereits erfolgreich eingesetzt (Trost *et al.*, 2009; Luber *et al.*, 2010). Unterschiede in der Probenvorbereitung und Messung der Proben müssen jedoch aufwendig normalisiert werden, was hohe Anforderungen an die Quantifizierungssoftware stellt (Mueller *et al.*, 2008; Wong und Cagney, 2010).

Um die absolute Menge eines Proteins in einer Probe bestimmen zu können, werden isotoopenmarkierte Standards eingesetzt, die der Probe (am besten vor dem Verdau der Proteine) in einer definierten Mengen zugesetzt werden (Brunner *et al.*, 2007; Rivers *et al.*, 2007; Hanke *et al.*, 2008). Eine gute Abschätzung der Gesamtmenge eines Proteins ist auch durch die Summierung aller Signalintensitäten der zu einem Protein gehörenden Peptide möglich (Malmstrom *et al.*, 2006; de Godoy *et al.*, 2008).

1.5 IDENTIFIKATION VON KINASESUBSTRATEN

Signaltransduktionsnetzwerke werden durch die ihnen zugrundeliegenden Kinase-Substratbeziehungen bestimmt. Die umfassende und zuverlässige Identifikation aller Substrate einer Kinase ist daher von großem Interesse.

Für die Bestimmung der Spezifität einer Kinase kamen in der Vergangenheit *in-vitro* Screening Methoden wie orientierte Peptid Bibliotheken, Peptid Microarrays und Protein Microarrays zum Einsatz (für eine eingehende Besprechung siehe Schreiber *et al.*, 2008). Die immensen Unterschiede zwischen den Versuchsbedingungen und der tatsächlichen Situation *in-vivo* ermöglichten jedoch nur eine eingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse (Ubersax und Ferrell, 2007).

Neuere experimentelle Konzepte zur Beschreibung zellulärer Kinase-Substratbeziehungen nutzen Methoden der quantitativen Phosphoproteomik. Matsuoka *et al.* (2007) verwendeten eine Kollektion phosphoepitopspezifischer Antikörper gegen

bekannte ATM (*ataxia telangiectasia-mutated*) und ATR (*ATM and Rad3-related*) Kinase Substrate, sowie ATM/ATR-Konsensusmotiv (*pS/pT-Q*) tragende Proteine, um direkte Substrate nach Stimulation der DDR (*DNA damage response*) in SILAC markierten Zellen anzureichern. Die 700 identifizierten, *pS/pT-Q*-Motiv tragenden Kandidaten konnten sowohl bekannten DDR Signalnetzwerken, als auch bis dahin nicht mit der DDR in Verbindung gebrachten Modulen zugeordnet werden. Die beschriebene Strategie erfordert jedoch erhebliches Vorwissen und ist nicht vorurteilsfrei, was die allgemeine Anwendbarkeit in anderen Systemen erschwert. Smolka *et al.* (2007) verglichen Wildtyp Hefezellen mit Mec1/Tel1 (ATM/ATR Homologe in Hefe) oder Rad53 (Mec1/Tel1 Substrat) mutierten Stämmen und konnten durch chemische Markierung insgesamt 62 von über 2600 Phosphorylierungsstellen reguliert quantifizieren. Genetische Ablationsmethoden, wie Mutagenese, *knock-out*, oder RNAi können jedoch nur bei Kinasen angewendet werden, die für das normale Zellwachstum nicht essentiell sind. Zudem ist keine Unterscheidung zwischen katalytischen und nichtkatalytischen Eigenschaften der Kinase möglich und durch die zeitlich verzögerte Wirkung kommen sekundäre Effekte zum Tragen.

Um direkte zelluläre Phosphorylierungssubstrate zu identifizieren muss die katalytische Aktivität einer Kinase möglichst schnell reguliert werden. Dies kann durch pharmakologische Inhibition erreicht werden. In einer quantitativen Phosphoproteomstudien analysierten Pan *et al.* (2009) durch Inhibition mit kleinen Molekülen die Signaltransduktion von MAP Kinasen. Auch Holt *et al.* (2009) nutzen diese Strategie, um in Hefe direkte Substrate der Cdk1 zu identifizieren. Allerdings sind Kinaseinhibitoren durch die starke Konservierung der ATP-Bindungstasche innerhalb der Kinasefamilie relativ unselektiv, was eine genaue Kontrolle der *off-target* Effekte erfordert und die Dateninterpretation erschwert (Bain *et al.*, 2007; Karaman *et al.*, 2008).

1.5.1.1 Chemical Genetics

Eine Strategie, die die Schnelligkeit pharmakologischer Intervention mit der Spezifität genetischer Manipulation kombiniert, ist ein vom Shokat Labor entwickeltes chemisch-genetisches Konzept (Shah *et al.*, 1997). Durch die Mutation einer konservierten, meist relativ großen *gate keeper* Aminosäure zu einem kleineren Glycin- oder Alaninrest wird die ATP Bindungstasche einer Kinase vergrößert. Sie ist dann in der Lage, größere ATP-

analoge Moleküle zu binden, die im Prinzip von keiner Wildtyp Kinase gebunden werden können (siehe Abbildung 5). Diese analog-sensitive (as) Kinase kann dadurch hochselektiv von pharmakologischen Substanzen in intakten Zellen inhibiert werden, oder auch speziell modifizierte ATP-Moleküle umsetzen und dadurch eine spezifische Markierung ihrer Substrate bewirken (Bishop *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998).

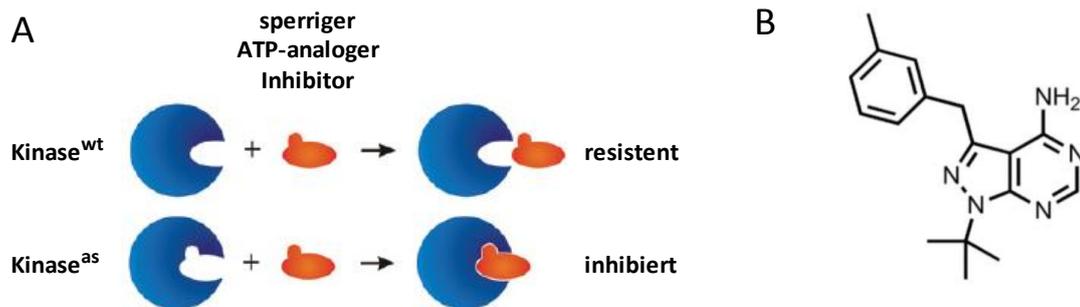


Abbildung 5: *Chemical genetics*. **(A)** Analog-sensitive Mutation. Die Wildtypkinase (Kinase^{wt}) besitzt eine enge katalytische Tasche, die für sperrige ATP-analoge Inhibitoren nicht zugänglich ist. Das Wildtypenzym kann daher den Inhibitor nicht binden und ist resistent gegen eine Inhibition. Eine kompensatorische Mutation der *gate keeper* Aminosäure der Bindungstasche vergrößert jedoch den Zugang. Die mutierte, nun analog sensitive Kinase (Kinase^{as}) kann den Inhibitor binden und ermöglicht so eine allelspezifische Inhibition. (Leicht abgewandelte Abbildung aus Randall *et al.*, 2007) **(B)** Chemische Struktur des ATP-analoger Inhibitors 3-MB-PP1.

Der as-Kinase Ansatz wurde unter anderem zur Analyse und Differenzierung der unterschiedlichen Rollen von JNK1 und JNK2 (*JUN N-terminal kinase 1* und 2) in Transkription und Apoptose eingesetzt (Ventura *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2007), sowie zur Charakterisierung der Funktionen von Plk1 bei der Positionierung von RhoA während der Zytokinese (Burkard *et al.*, 2007). Neben der Studie von phänotypischen Effekten durch die Inhibition einer bestimmten Kinase *in-vivo* findet das Konzept auch bei der *ex-vivo* und *in-vitro* Identifikation von Kinasesubstraten Verwendung. Durch den Einsatz radioaktiv markierter ATP-Analoga wurden unter anderem die Substratspezifitäten der Kinasen v-Src (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) (Shah und Shokat, 2002), JNK2 (Habelhah *et al.*, 2001), PKA (*protein kinase A*) (Niswender *et al.*, 2002), Cdk1 (Ubersax *et al.*, 2003), Erk2 (*mitogen-activated protein kinase 1*) (Eblen *et al.*, 2003) und Pho85-Pcl1 (Dephoure *et al.*, 2005) analysiert. Die Entwicklung von Thiophosphat-modifizierten ATP-Analoga und die Immobilisierung der thiophosphorylierten Peptide durch *solid-phase capture* Methoden in Kombination mit HPLC-MS/MS Analyse erlaubten die Identifikation neuer

Substrate unter anderem der Kinasen Cdk1/Cyclin-B und Cdk2 (Allen *et al.*, 2005; Allen *et al.*, 2007; Blethrow *et al.*, 2008; Chi *et al.*, 2008).

Die Aktivität der as-Kinase ist zumeist vergleichbar mit jener der Wildtyp Kinase. Führt jedoch die *gate keeper* Mutation zur Inaktivierung, kann die katalytische Aktivität durch die zusätzliche Mutation sogenannter *second site suppressor residues* wieder hergestellt werden (Zhang *et al.*, 2005a).

Zu den Nachteilen der chemisch genetischen Strategie gehören, dass vor allem substituierte ATP-Analoga nur schwer von lebenden Zellen aufgenommen werden und die Experimente oftmals *ex-vivo* in Zelllysaten aus entweder as-Kinase exprimierenden Zelllinien oder nach Zugabe rekombinanter Enzyme durchgeführt werden müssen. Durch den Verlust des biologischen Kontexts wie der subzellulären Lokalisation, der Dissoziation von Komplexen oder durch Unterschiede in der Konzentration von Enzym und Reaktionspartnern kann dies zu verfälschten Ergebnissen führen. Auch sind selbst ATP-Analoga wie NM-PP1 oder 3-MB-PP1, die speziell für die Inhibition von sensitivierten Kinasen konzipiert wurden nicht völlig frei von *off-target* Effekten (Bishop *et al.*, 2000; Bain *et al.*, 2007; Holt *et al.*, 2009). Die Kontrolle der Selektivität ist deshalb für die zuverlässige Zuordnung von Kinase-Substrat Verhältnissen von höchster Wichtigkeit.

1.6 AUFGABENSTELLUNG

Ziel des ersten Projektes dieser Arbeit war die Identifikation von direkten, zellulären Kinasesubstraten durch die Kombination einer schnellen und selektiven, chemisch-genetischen Kinase-Inhibitionsstrategie (sog. Shokat-Ansatz) mit den neusten Techniken der quantitativen Phosphoproteomik. Der Versuchsaufbau sollte es ermöglichen, sowohl die Inhibitorselektivität genau zu überprüfen, als auch die biologische Variabilität zu kontrollieren. Dazu sollten zwei genetisch veränderte humane retinale Pigmentepithelzelllinien eingesetzt werden (Burkard *et al.*, 2007): Eine Zelllinie exprimiert eine durch Mutagenese für einen Purinanalginhibitor sensitivierte Kinase und sollte durch den Vergleich von inhibiertem und nicht inhibiertem Zustand Aufschluss über die Phosphorylierungsaktivität der Kinase geben. Eine zweite Zelllinie exprimiert die Wildtypkinase und sollte, nach gleicher Behandlung, der Bestimmung von *off-target* Effekten und der Abschätzung falsch-positiver Identifikationen dienen. Um eine stringente statistische Analyse zu ermöglichen sollen die Versuche in beiden Zelllinien in vier Replikaten durchgeführt werden. Zur Etablierung dieser Strategie wurde die gut charakterisierte, mitotische Kinase Plk1 ausgewählt. In einem zweiten Schritt sollte dann die gewonnene Expertise auf die weniger erforschte, ebenfalls mitotisch aktive Kinase Mps1 übertragen werden. Die Ergebnisse beider Analysen sollten bioinformatisch ausgewertet und mit dem aktuellen Stand der Wissenschaft verglichen werden.

Ziel des zweiten Projekts dieser Arbeit war die globale Charakterisierung der Phosphoproteome einer Auswahl von 33 Lungenkrebszelllinien durch quantitative phosphozentrierte Massenspektrometrie. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit die beschriebenen genetischen Lesionen und Sensitivitäten dieser Zelllinien gegenüber gängigen, in der Krebstherapie eingesetzten Kinaseinhibitoren mit den detektierten Phosphorylierungssignaturen der Zelllinien korrelierten (Sos *et al.*, 2009). Des Weiteren sollten die veränderten zellulären Signaltransduktionsnetzwerke in malignen Zellen analysiert werden und wenn möglich biologische Marker und neue Interventionspunkte der Krebstherapie identifiziert werden. Dazu sollten unbehandelte NSCLC Zellen in exponentieller Wachstumsphase in Duplikaten analysiert werden, um hochqualitative Daten zu generieren. Die Probenvorbereitung der Großstudie sollte zeitlich gestaffelt werden, um eine optimale Auslastung der Ressourcen und des Messgeräts zu gewährleisten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 GERÄTE

Chromatographie

ÄKTA Explorer
Polysulfoethyl A, 250x9,4 mm, 5 µm, 200 Å

GE Healthcare
PolyLC

Elektrophorese und Immunoblot

Filmentwickler Optimax
Laufkammer XCell Surelock
Semidry Blotapparatur
Stromquelle EV261

Protec
Invitrogen
Bio-Rad
Peqlab

FACS

FACS Calibur

BD Bioscience

Gefriertrocknung

Chemie-HYBRID-Pumpe RC 6
Lyovac GT2

VACUUBRAND
Leybold-Heraeus

Massenspektrometrie

LTQ-Orbitrap MS 2.2
Proxeon Easy-nLC VI 2.0

Thermo Fisher Scientific
Proxeon

Schüttler

Schüttler Polymax 1040
Thermomixer comfort

Hydolph
Eppendorf

Scintillation

Scintillationszähler LS 6500

Beckmann

Spektrophotometer

ELISA Reader
Nanodrop ND-1000

MWG Biotech
Thermo Fisher Scientific

Zellkultur

Inkubator Hera Cell 150
Mikroskop Axiovert 135
Partikelzähler Z1
Sterilwerkbank Bioguard Hood
Ultraschallkopf Sonopulus GM70

Thermo Fisher Scientific
Zeiss
Beckman Coulter
The Baker Company
Brandelin electronic

Zentrifugen

Biofuge fresco
Sorvall RC 26 Plus SS 34
Universalzentrifuge
Vacuum Concentrator 5301
Zentrifuge 5415 R

Heraeus
Sorvall
Hettich
Eppendorf
Eppendorf

2.1.2 VERBRAUCHSMATERIAL

Elektrophorese und Immunoblot

3MM-Filterpapier	Whatman
Collodial Blue Staining Kit	Invitrogen
Hyperfilm MP	GE Healthcare
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE LDS Probenpuffer	Invitrogen
NuPAGE MOPS SDS Laufpuffer	Invitrogen
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel, 1 mm	Invitrogen
Protran Nitrozellulosemembran	Whatman

Massenspektrometrie

Empore Disk C18 47 mm	3M
Empore Disk C8 47 mm	3M
ReproSil-Pur C18-AQ	Dr. Maisch GmbH Quarzglas
Sep-Pak Vac tC18 Kartuschen 100 mg, 500 mg	Waters
Silikonabdeckung für Thermo-Fast	Nerbe Plus
Thermo-Fast 96 PCR Platte	Thermo Fisher Scientific

Probenvorbereitung

FACS Röhren	BD Bioscience
Gel Loading Tips	Invitrogen
Kanülen	Braun
P30 Glasfaserfilterpapier	Wallac
Parafilm	Dynatech
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl, 20µl, 10 µl	Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1 ml, 2 ml	Eppendorf
Scintillationsröhren, 27 x 58 mm, 20 ml	Nerbe Plus
Spritzen	BD Bioscience
Zentrifugenröhren 15 ml, 50 ml	TPP

Zellkultur

Cryotube	Nunc, Thermo Fisher Scientific
Stericup	Millipore
Zellkulturplatten (15 cm, 6 cm, 6-well)	Nunc, Thermo Fisher Scientific
Zellschaber 24 cm	TPP
Millex-HV/GV Filter (PVDF) 0,45/0,22 µm	Millipore

2.1.3 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Allgemeine Chemikalien und Biochemica

2-β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma-Aldrich
Ammoniumhydroxid	Merck
ATP	Invitrogen
Brij-35	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck

2 Material und Methoden

Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Ethanolaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ethyleneglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glycerin	Sigma-Aldrich
Harnstoff p.a.	Merck
HEPES	Roth
Iodoacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Magnesiumacetat	Roth
MOPS	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
n-Octosylglucosid	Roche
PBS	Sigma-Aldrich
PHOS-Select™ Iron Affinity Gel	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich
Thioharnstoff p.a.	Invitrogen
Triton X-100	Roth
Trizma Base (Tris)	Sigma-Aldrich
Antikörper	
Goat anti-rabbit-HRP	Sigma-Aldrich
Mouse anti-BubR1	Cell Signaling Technology
Biochemische und Molekularbiologische Kits	
Bradford Protein Assay	Bio-Rad
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Fisher Scientific
Western Lightning ECL Kit	Perkin Elmer
Enzyme, Proteine und Peptide	
Bovines Serumalbumin	Sigma
Caseinkinase 1δ	Millipore
CK1tide	Upstate
Endo-Lysylpeptidase C (Lys-C)	WAKO
Trypsin (Seq. grade, modified)	Promega
Inhibitoren	
3-MB-PP1	Priaxon
Aphidicolin	Sigma-Aldrich
Aprotinin	Alexis Biochemicals
Calyculin A	Alexis Biochemicals
Leupeptin	Alexis Biochemicals
MG132	Sigma-Aldrich
Natriumfluorid p.a.	Merck
Natriumorthovanadat Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich
Nocodazol	Sigma-Aldrich

Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)
Phosphatase Inhibitor Cocktail (PIC) 1 + 2

Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich

Isotopenmarkierte Aminosäuren

L-Arginin
L-Arginin: HCl, U-¹³C₆ ¹⁴N₄
L-Arginin: HCl, U-¹³C₆ ¹⁵N₄
L-Lysin
L-Lysin: 2 HCl, ²H₄
L-Lysin: 2 HCl, U-¹³C₆ ¹⁵N₂

Invitrogen
Cambridge Isotope Laboratories
Cambridge Isotope Laboratories
Invitrogen
Cambridge Isotope Laboratories
Cambridge Isotope Laboratories

Lösungsmittel

Acetonitril p.a. (ACN)
DMSO (wasserfrei)
Ethanol p.a. (EtOH)
Methanol p.a. (MeOH)
Scintillationslösung

Merck
Fluka
Riedel
Fisher Chemical
Bio-Rad

Radioisotope

[³³P]-ATP

PerkinElmer

Säuren und Basen

Ameisensäure (FA)
Ammoniaklösung, 32% reinst
Essigsäure (HAc)
Natronlauge (NaOH) 1 M
Phosphorsäure
Salzsäure (HCl) 1 M
Trichloressigsäure (TCA)
Trifluoressigsäure (TFA)

Fluka
Merck
Fluka
Merck
Merck
VWR
Fluka
Fluka

Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM
DMEM:F12
Fetales bovines Serum (FBS)
Fetales bovines Serum (FBS), dialysiert
L-Glutamin
Natriumpyruvat
Penicillin/Streptomycin, 100x
RPMI
SILAC DMEM
SILAC DMEM:F12
SILAC RPMI
Trypsin/EDTA

Invitrogen; Thermo Fisher Scientific
Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen
Invitrogen
PAA
Invitrogen; Thermo Fisher Scientific
Invitrogen; Thermo Fisher Scientific
Invitrogen
Invitrogen; Thermo Fisher Scientific
Invitrogen

2.1.4 PUFFER

Harnstoff-Lysepuffer

8 M Harnstoff, 50 mM Tris-HCl pH 8,2, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2,5 mM Na₃VO₄, 50 ng/ml Calyculin A, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1% PIC 1 (v/v), 1% PIC2 (v/v)

HEPES-Lysepuffer

50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2,5 mM Na₃VO₄, 50 ng/ml Calyculin A, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1% PIC 1 (v/v), 1% PIC2 (v/v)

PBS Puffer

137 mM NaCl, 27 mM KCl, 80,9 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4

2.1.5 ZELLINIEN

hTERT-RPE Plk^{as/wt}

Telomerase exprimierende, humane retinale Pigmentepithelzellen, Deletion beider endogener Plk1 Loci, transgene Expression von Plk1 Wildtyp oder analog-sensitiver Mutante (C67V/L130G) als EGFP Fusionsproteine (Burkard *et al.*, 2007).

Prasad V. Jallepalli,
Memorial Sloan-Kettering
Cancer Center,
New York, USA

hTERT-RPE Mps1^{as/wt}

Telomerase exprimierende, humane retinale Pigmentepithelzellen, Deletion beider endogener Mps1 Loci, transgene Expression von Mps1 Wildtyp oder analog-sensitiver Mutante (M602A) als EGFP Fusionsproteine (Maciejowski *et al.*, 2010).

Prasad V. Jallepalli,
Memorial Sloan-Kettering
Cancer Center,
New York, USA

Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom Zelllinien

A-427	Karzinom	ATCC
Calu-1	Epidermoides Karzinom	ATCC
Colo-699	Adenokarzinom	DSMZ
DV90	Adenokarzinom IV	DSMZ
LCL97TM	Großzelliges Karzinom	DSMZ
LouNH-91	Plattenepithelkarzinom	DSMZ
NCI-H157	Plattenepithelkarzinom	R.K. Thomas
NCI-H358	Bronchioalveolar Karzinom	ATCC
NCI-H441	Papilläres Adenokarzinom	ATCC
NCI-H596	Adenosquamöses Karzinom	ATCC
NCI-H1563	Adenokarzinom	ATCC
NCI-H1568	Adenokarzinom	ATCC
NCI-H1650	Adenokarzinom IIIB	ATCC

NCI-H1792	Adenokarzinom IV	ATCC
NCI-H1915	Schlecht Differenziertes IV	ATCC
NCI-H2077	Adenokarzinom	R.K. Thomas
NCI-H2126	Adenokarzinom	ATCC
NCI-H2444	Nicht-kleinzelliges Karzinom	ATCC
NCI-H2882	Plattenepithelkarzinom IV	R.K. Thomas
NCI-H3122	Adenocarcinom IV	R.K. Thomas
NCI-H3255	Adenokarzinom IIIB	R.K. Thomas
NCI-HCC95	Plattenepithelkarzinom IV	R.K. Thomas
NCI-HCC193	Adenokarzinom	R.K. Thomas
NCI-HCC461	Adenokarzinom IIIA	R.K. Thomas
NCI-HCC827	Adenokarzinom	ATCC
NCI-HCC1171	Adenokarzinom I	R.K. Thomas
NCI-HCC1833	Adenokarzinom I	R.K. Thomas
NCI-HCC2279	Adenosquamöses Karzinom IIIA	R.K. Thomas
NCI-HCC2450	Adenocarcinom I	R.K. Thomas
NCI-HCC2935	Adenokarzinom	ATCC
NCI-HCC4006	Adenokarzinom	ATCC
PC-9	Adenokarzinom	R.K. Thomas
SKLU-1	Adenokarzinom	ATCC

ATCC: American Type Culture Collection

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

R.K. Thomas: Roman K. Thomas, Max-Planck Institut für neurologische Forschung, Köln

2.1.6 SOFTWARE UND ONLINEDIENSTE

Corel Draw	Corel Corporation
Excel 2007	Microsoft
MaxQuant Suite	MPI Biochemie Abt. Mann
MeV 4.1	www.tm4.org/mev/
MotifX	www.MotifX.edu
R 2.8	www.r-project.org
Sigmaplot 10	Systat Software
STRING	www.string.embl.de
Unicorn 5.1	Thermo Fisher Scientific
Uniprot	www.uniprot.org
XCalibur 2.0	Thermo Fisher Scientific

2.2 ZELLKULTUR UND SILAC MARKIERUNG

2.2.1 KULTIVIERUNG VON hTERT-RPE ZELLEN

Telomerase exprimierende, humane retinale Pigmentepithelzellen (hTERT-RPE) aller Genotypen (siehe 2.1.5) wurden nach dem Auftauen aus Cryostocks mindestens zehn Tage in 20 ml DMEM:F12 Wachstumsmedium mit 10% (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat und 1% Penicillin-Streptomycin auf 15 cm Zellkulturschalen kultiviert (7% CO₂, 37°C), alle 72 h mittels Trypsin/EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:5 - 1:6 neu ausgesät. Für jedes unabhängige SILAC Experiment wurden die Zellen in Arginin- und Lysin-defizientem DMEM:F12 SILAC-Medium mit 10% (v/v) dialysiertem FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat und 1% Penicillin-Streptomycin und entweder 175 µM unmarkiertem L-Arginin (Arg⁰) und 250 µM unmarkiertem L-Lysin (Lys⁰) oder den gleichen Konzentrationen L-Arginin-U-¹³C₆-¹⁵N₄ (Arg¹⁰) und L-Lysin-U-¹³C₆-¹⁵N₂ (Lys⁸) kultiviert, um die Zellen differentiell zu markieren. Nach sechs Zellteilungen, die eine vollständige Proteommarkierung gewährleisten sollten, wurden jeweils 1,6 x 10⁶ Zellen auf 15 cm Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.1.1 Synchronisation und Inhibitorbehandlung von hTERT-RPE Plk1^{as/wt} Zellen

hTERT-RPE Zellen mit deletierten genomischen PLK1 Loci welche entweder Wildtyp Plk1 (Plk1^{wt}) oder eine analogsensitive Plk1 Mutante (C67V/L130G, Plk1^{as}) als EGFP Fusionsproteine exprimierten wurden wie unter 2.2.1 beschrieben kultiviert und jeweils differentiell durch SILAC markiert. 18 Stunden nach Aussaat wurde dem Medium 1 µg/ml Aphidicolin hinzugefügt und für weitere 12 Stunden kultiviert, um die Zellen in der S-Phase zu arretieren. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS (37°C) gewaschen und weitere 13 Stunden in frischem SILAC-Medium mit den jeweiligen SILAC Aminosäuren, sowie in Gegenwart von 50 ng/ml Nocodazol und 5 µg/ml 3-MB-PP1 kultiviert, um Plk1^{as} bzw. Plk1^{wt} Zellen in der M-Phase zu arretieren und zudem eine selektive Inhibition der analogsensitiven Kinaseaktivität in Plk1^{as} Zellen zu erreichen. Nach einem Waschschrift mit dem entsprechenden SILAC-Medium (Zusätze wie im folgenden Inkubationsschritt) wurde zu den Arg⁰/Lys⁰-markierten Zellen frisches SILAC-Medium mit 50 ng/ml Nocodazol und 5 µg/ml 3-MB-PP1 gegeben während zu den Arg¹⁰/Lys⁸-markierten Zellen frisches SILAC –Medium mit dem alleinigen Zusatz von 50 ng/ml Nocodazol gegeben wurde. Die

Zellen wurden daraufhin für weitere 30 min kultiviert. Dieses Markierungsschema wurde in zwei biologischen Replikaten mit Plk1^{as} (Plk1^{as} 1, Plk1^{as} 3) und Plk1^{wt} Zellen (Plk1^{wt} 1, Plk1^{wt} 3) verwendet, während in zwei weiteren biologischen Replikaten mit beiden Zelllinien (Plk1^{as} 2, Plk1^{as} 4 und Plk1^{wt} 2, Plk1^{wt} 4) reziproke Bedingungen verwendet wurden.

2.2.1.2 Synchronisation und Inhibitorbehandlung von hTERT-RPE Mps1^{as/wt} Zellen

HTERT-RPE Zellen mit deletierten genomischen MPS1 Loci welche entweder Wildtyp Mps1 (Mps1^{wt}), oder eine analogsensitive Mps1 Mutante (M602A, Mps1^{as}) als eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) Fusionsproteine exprimierten wurden wie unter 2.2.1 beschrieben kultiviert und SILAC markiert. 18 Stunden nach Aussaat wurde dem Medium 1 µg/ml Aphidicolin hinzugefügt und für weitere 12 Stunden kultiviert, um die Zellen in der S-Phase zu arretieren. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS (37°C) gewaschen und weitere 13 Stunden in frischem SILAC-Medium mit den jeweiligen SILAC Aminosäuren, sowie in Gegenwart von 50 ng/ml Nocodazol kultiviert, um Mps1^{as} bzw. Mps1^{wt} Zellen in der M-Phase zu arretieren. Um die analogsensitive Kinaseaktivität in Mps1^{as} Zellen selektiv zu inhibieren wurde dem Medium der Arg⁰/Lys⁰-markierten Zellen 10 µM MG132 und 10 µg/ml 3-MB-PP1 zugegeben, während dem Medium der Arg¹⁰/Lys⁸-markierten Zellen einzig 10 µM MG132 hinzugefügt wurde. Nachdem die Inhibition von Mps1 selbst in der Gegenwart des Spindelinhitors Nocodazol zu einer Überschreitung des Spindel-Checkpunkts führt, musste der Proteasominhibitor MG132 zugegeben werden, um ein Austreten der Zellen aus der Mitose zu verhindern. Die Zellen wurden daraufhin für weitere zwei Stunden kultiviert. Dieses Markierungsschema wurde in zwei biologischen Replikaten mit Mps1^{as} (Mps1^{as} 1, Mps1^{as} 3) und Mps1^{wt} Zellen (Mps1^{wt} 1, Mps1^{wt} 3) verwendet, während in zwei weiteren biologischen Replikaten mit beiden Zelllinien (Mps1^{as} 2, Mps1^{as} 4 und Mps1^{wt} 2, Mps1^{wt} 4) reziproke Bedingungen angewandt wurden.

2.2.1.3 Lyse von hTERT-RPE Zellen

Die Zellen wurden in 250 µl Harnstoff-Lysepuffer (8 M Harnstoff, 50 mM Tris-HCl pH 8,2, 75 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2,5 mM Na₃VO₄,

50 ng/ml Calyculin A, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin und 1% PIC 1 und 2 (v/v)) je 15 cm Zellkulturschalen für 5 min auf Eis aufgeschlossen und anschließend abgeschabt. Die Zellextrakte wurden auf Eis mit einem Ultraschallkopf homogenisiert (3 x 1 min) und Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation entfernt (13.000 rpm, 20 min, 4°C). Der Proteingehalt der Lösung wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Kits nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Für die weitere massenspektrometrische Probenvorbereitung (siehe 2.6) wurden gleiche Proteinmengen der entsprechenden, unterschiedlich durch SILAC markierten Zellpopulationen gemischt. Um die Markierungseffizienz der Zellen zu überprüfen wurden jeweils 100 µg der individuellen Zelllysate weiter verarbeitet.

2.2.2 KULTIVIERUNG VON NSCLC ZELLINIEN

NSCLC Zelllinien wurden nach dem Auftauen aus Cryostocks je nach Wachstumsverhalten für 10-14 Tagen in 20 ml RPMI Wachstumsmedium mit 10% (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat und 1% Penicillin-Streptomycin auf 15 cm Zellkulturschalen kultiviert (7% CO₂, 37°C) und bei 80%iger Konfluenz mittels Trypsin/EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:2 – 1:8 neu ausgesät. Die für den Referenzstandard eingesetzten Zelllinien wurden für zehn Tage in Arginin- und Lysin-defizientem RPMI SILAC-Medium mit 10% (v/v) dialysiertem FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat und 1% Penicillin-Streptomycin, sowie 175 µM unmarkiertem L-Arginin (Arg⁰) und 250 µM unmarkiertem L-Lysin (Lys⁰) kultiviert und in 500 µl Harnstoff-Lysepuffer je 15 cm Zellkulturschalen für 5 min auf Eis aufgeschlossen (siehe 2.2.1.3). Die Zellextrakte wurden vereinigt (siehe Tabelle 8), in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung als konstante Referenz in jeder NSCLC SILAC Probe bei -80°C gelagert. Für die Analyse des Phosphoproteoms jeder Zelllinie in jeweils zwei verschiedenen SILAC Experimenten wurden die Zellen in Arginin- und Lysin-defizientem RPMI SILAC-Medium mit den obigen Zusätzen und entweder 175 µM L-Arginin-U-¹³C₆-¹⁴N₄ (Arg⁶) und L-Lysin-²H₄ (Lys⁴) oder den gleichen Konzentrationen L-Arginin-U-¹³C₆-¹⁵N₄ (Arg¹⁰) und L-Lysin-U-¹³C₆-¹⁵N₂ (Lys⁸) kultiviert, um die Zellen zu markieren. Nach zwölf Tagen wurden die Zellen auf jeweils drei 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und für weitere 48 h kultiviert. Die Zellen wurden in 500 µl Harnstoff-Lysepuffer je 15 cm Zellkulturschalen für 5 min auf Eis aufgeschlossen (siehe 2.2.1.3). Für jede NSCLC SILAC Probe wurden zwei entsprechende, unterschiedlich

durch SILAC markierten Zellextrakte mit dem auf Eis aufgetauten Referenzstandard zu drei gleichen Teilen gemischt (siehe Tabelle 9) und für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet (siehe 2.6).

2.3 SDS-POLYACRYLAMID GELELECTROPHORESE UND IMMUNOBLOTTING

Für alle Immunoblot Analysen wurden für jede Kondition 180.000 hTERT-RPE Plk1^{as/wt} bzw. Mps1^{as/wt} Zellen je Vertiefung in 6-well Zellkulturschalen ausgesät. Für die Bestimmung der optimalen 3-MB-PP1 Konzentration zur Inhibition von Plk1^{as/wt} in hTERT-RPE Plk1^{as/wt} Zellen wurden die Zellen wie beschrieben (siehe 2.2.1.1) synchronisiert und während der 13-stündigen Nocodazolinkubation verschiedene Mengen des Inhibitors zugegeben (finale Konzentrationen 0 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM). Für die Analyse der Aktivierung der Kinase Plk1^{as/wt} nach Inhibitor *wash-out* wurden die Zellen wie für die SILAC Experimente beschrieben (siehe 2.2.1.1) synchronisiert und behandelt, mit dem Unterschied, dass die 13-stündige Nocodazolinkubation sowohl in Gegenwart des Inhibitors 3-MB-PP1 als auch in dessen Abwesenheit durchgeführt wurde. Für die Analyse der Inhibition der Kinase Mps1^{as/wt} nach Inhibitorinkubation wurden die Zellen wie für die SILAC Experimente beschrieben synchronisiert (siehe 2.2.1.1) und behandelt (siehe 2.2.1.2). Nach der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen in 100 µl HEPES-Lysepuffer (50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2,5 mM Na₃VO₄, 50 ng/ml Calyculin A, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin und 1% PIC 1 und 2 (v/v)) für 5 min auf Eis aufgeschlossen und anschließend abgeschabt. Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation entfernt (4°C, 13.000 rpm, 10 min) und der Proteingehalt der Lösung mit Hilfe des Pierce Micro BCA Protein Assay Kits nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Jeweils 20 µg der Proben wurden mit LDS Probenpuffer denaturiert und reduziert (5 min, 70°C), auf ein 10%iges SDS-PAGE Gel geladen und mit MOPS Laufpuffer bei 200 V aufgetrennt für 45 min (Sambrook *et al.*, 1990). Die Proteine wurden mit einer *semi-dry* Blotapparatur und Transblot Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 40 mM Glycin, 20 % MeOH, 0,004 % SDS) für 2 h bei 0,8 mA/cm² auf eine Nitrozellulose Membran übertragen (Gershoni und Palade, 1983) und anschließend mit Ponceau S (2 mg/ml in 2% TCA) gefärbt, um den Transfer zu überprüfen und die Banden des Proteinstandards zu markieren. Die Membran wurde mit Wasser

(bidest.) entfärbt und unspezifische Bindungsstellen wurden durch einstündige Inkubation der Membran in NET-Gelatine Lösung (50 mM Tris/HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,05 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,25% Gelatine) geblockt. Der monoklonale Antikörper anti-hBubR1 wurde 1:1000 in NET-Gelatine Lösung verdünnt und die Membran für 16 h bei 4°C in der Antikörperlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in NET-Gelatine Lösung wurden die Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären anti-IgG Antikörper (1:10.000 Verdünnung in NET-Gelatine Lösung) markiert. Nach abermals drei Waschschritten in NET-Gelatine Lösung wurde die Peroxidaseaktivität mit dem Perkin Elmer *Western Lightning* Chemilumineszenz Kit aktiviert, auf lichtsensitivem Hyperfilm detektiert und entwickelt.

2.4 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Zur Optimierung beziehungsweise Überprüfung der Synchronisations- und Inhibitorbehandlung von hTERT-RPE PIK1^{as/wt} und hTERT-RPE Mps1^{as/wt} Zellen wurden $0,5 \times 10^5$ bis 1×10^6 Zellen in 3 ml DMEM:F12 Wachstumsmedium (siehe 2.2.1) auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und 18 h kultiviert (7% CO₂, 37°C). Die Zellen wurden daraufhin nach unterschiedlichen Inhibitor- und Zeitschemata in Aphidicolin (1 µg/ml), Nocodazol (50 ng/ml), 3-MB-PP1 (0,01 bis 100 µM) und/oder MG132 (10 µM) haltigen Wachstumsmedien kultiviert (siehe 2.2.1.2). Zwischen den Medienwechseln wurden die Zellen jeweils mit PBS (37°C) gewaschen. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C) und einmal mit PBS gewaschen bevor sie in 1 ml EtOH (70%, -20°C) aufgenommen und über Nacht bei 4°C fixiert wurden. Nach Zentrifugation (300 g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml Propidiumiodid Färbelösung (0,01% Triton, 0,1% Natriumcitrat, 0,02 mM Propidiumiodid) im Dunkeln für 2 h bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) auf ihren DNA Gehalt hin untersucht. Anhand der CellQuestPro Software wurden die drei Peaks (welche jeweils Zellen in den drei Zellzyklusphasen G1, S, und G2/M repräsentierten) der erhaltenen Zytometrieprofile (Auftragung von Fluoreszenzintensität gegen Zellzahl) abgegrenzt und quantifiziert.

2.5 KINASEASSAY

Die *in-vitro* Kinaseaktivität der Caseinkinase 1 δ wurde in Gegenwart verschiedener 3-MB-PP1 Konzentrationen untersucht. Dazu wurde rekombinante Caseinkinase 1 δ zu 1 ng/ μ l in Enzympuffer (20 mM MOPS, pH 7,0, 1 mM EDTA, 5% Glycerin, 0,01% Brij-35, 0,1% β -Mercaptoethanol, 1 mg/ml BSA) gelöst und jeweils 2,5 ng zusammen mit 200 μ M des Substrats CK1tide in 8 mM MOPS-NaOH pH 7,0, 0,2 mM EDTA und acht verschiedenen 3-MB-PP1 Konzentrationen (0 μ M, 0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1 mM) gelöst in jeweils in 0,5 μ l DMSO) in einem finalen Volumen von 22 μ l für 30 min auf Eis inkubiert. Die Kinaseaktion wurde durch Zugabe von 3 μ l radioaktivem ATP-Puffer (10 mM Magnesiumacetat, 0,1 μ M ATP, 0,5 μ Ci [γ - 33 P]ATP) gestartet und für 10 min bei 30°C durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5 μ l 3%iger Phosphorsäure gestoppt und auf P30 Glasfaserfilterpapier aufpipettiert. Die Filterpapiere wurden zunächst drei Mal in 75 mM Phosphorsäure gewaschen, anschließend in 100% MeOH fixiert und in Scintillationslösung aufgenommen. Die inkorporierte 33 P-Radioaktivität wurde mit einem Beckmann Scintillationszähler gemessen. Die IC₅₀ Werte wurden mit der Systat Software SigmaPlot bestimmt. Nachdem die in der Reaktion eingesetzte ATP Konzentration (0,1 μ M) deutlich niedriger war als die K_M-Werte der analysierten Kinase für ATP, entsprach der gemessene IC₅₀ Wert annähernd dem K_d-Wert (Sharma *et al.*, 2009).

2.6 PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE MASSENSPEKTROMETRIE

2.6.1 PROTEINVERDAU IN LÖSUNG

Die Proteinlösungen der Harnstofflyse wurden auf 6 M Harnstoff und 2 M Thioharnstoff eingestellt. Die Thiolgruppen wurden mit 1 mM DTT (gelöst in 20 mM ABC) reduziert (45 min, 25°C) und anschließend die Cystein- und Histidinreste mit 5,5 mM IAA (gelöst in 20 mM ABC) alkyliert (30 min, 25°C). Die Proteine wurden in zwei konsekutiven Schritten zunächst mit Lys-C (4 h, 25°C, Enzym-Substrat-Verhältnis 1:100 (m/m)) und nach Reduktion der Harnstoffkonzentration auf < 2 M mit Wasser (bidest.) mit Trypsin (16 h, 25°C, Enzym-Substrat-Verhältnis 1:150 (m/m)) in einem Thermomixer (450 rpm) verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von 0,5% TFA abgestoppt und die Peptide mit 500 mg C18 Kartuschen (siehe 2.6.2) entsalzt.

2.6.2 PEPTIDENTSALZUNG MIT C18 KARTUSCHEN

Zur Entfernung interferierender Salze für eine spätere Peptidauftrennung mit SCX oder eine Phosphopeptidanreicherung mit IMAC wurden die verdauten Peptidproben mit tC18 SepPak *solid-phase* Extraktionskartuschen entsalzt (Villen und Gygi, 2008). Die Kartuschen (100 mg für Proben bis 5 mg Peptid, 500 mg für Proben bis 25 mg Peptid) wurden zunächst mit zwei Säulenvolumen (SV) ACN (100 %) und einem SV Elutionspuffer (50% (v/v) ACN, 0,5% (v/v) HAc) gewaschen und anschließend mit zwei SV Waschpuffer1 (0,1% (v/v) TFA) equilibriert. Die Peptidproben wurden durch 0,22 µm PVDF-Membranen filtriert und geladen. Nach dem Waschen mit zwei SV Waschpuffer 1 und einem SV Waschpuffer 2 (0,5% (v/v) HAc) wurden die Proben zwei Mal mit einem halben SV Elutionspuffer eluiert. Die entsalzten Peptide wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.6.3 PEPTIDFRAKTIONIERUNG MIT SCX CHROMATOGRAPHIE

Die nach Lösungsverdau und Entsalzung gefriergetrockneten Peptide wurden in 600 µl SCX Puffer A (7 mM KH₂PO₄, 30% (v/v) ACN, pH 2,65 eingestellt mit FA) gelöst und mit 1,5 µl FA (100%) auf pH 2,6 (Leitfähigkeit < 5 mS) eingestellt. Die Probe wurde manuell auf eine, an ein GE Healthcare Äkta Explorer Chromatographiesystem angeschlossene, polySULFOETHYL A Säule (250 x 9,4 mm, 200 Å Porengröße, 5 mm Partikelgröße) geladen. Das System wurde bei 3 ml/min betrieben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und die gebundenen Peptide wurden durch einen 33 minütigen Gradienten von 0 bis 105 mM KCl (0-30% SCX Puffer B, 7 mM KH₂PO₄, 350 mM KCl, 30% (v/v) ACN, pH 2,65 eingestellt mit FA) eluiert und in 3 ml Fraktionen gesammelt. Diese wurden anschließend, basierend auf dem aufgezeichneten Absorptionsspektrum bei 215 nm, zu 10 bzw. 12 distinkten Fraktionen vereinigt. Die Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gefriergetrocknet und anschließend mit 100 mg C18 Kartuschen wie beschrieben (siehe 2.6.2) entsalzt. Für die Projekte Plk1 und Mps1 wurden die entsalzten Fraktionen auf jeweils zwei Proben aufgeteilt, für das NSCLC Projekt wurde jeweils eine Probe belassen. Die entsalzten Peptidfraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gefriergetrocknet und bis zur weiteren Phosphopeptidanreicherung mit IMAC (siehe 2.6.4) bei -20°C gelagert.

2.6.4 PHOSPHOPEPTIDANREICHERUNG MIT IMAC

Die Anreicherung der SCX Fraktionen auf Phosphopeptide durch IMAC erfolgte nach einem von Villen und Gygi publizierten Protokoll (Villen und Gygi, 2008). Dafür wurden die entsalzten und gefriergetrockneten Proben in je 200 µl IMAC Bindungspuffer (40% ACN, 25 mM FA) gelöst und in einem Thermomixer mit 5 µl equilibriertem *PhosSelect Iron Affinity* Gel inkubiert (1.500 rpm, 1 h, 25°C). C18 Stage-Tips wurden hergestellt wie beschrieben (Rappsilber *et al.*, 2007) und durch sukzessives Waschen mit 70 µl MeOH, 70 µl Stage-Tip Elutionspuffer (50% (v/v) ACN, 0,5% (v/v) HAc) und zweimal mit je 70 µl Waschpuffer (1% (v/v) FA) vorbereitet. Die Proben wurden geladen und zweimal mit je 70 µl IMAC Bindungspuffer gewaschen. Die Stage Tips wurden mit 70 µl Waschpuffer equilibriert und die IMAC-Gel gebundenen Peptide in drei Elutionsschritten von je 70 µl mit IMAC Elutionspuffer (500 mM K₂HPO₄, pH 7) an das C-18 Material gebunden. Nach Entfernung der Salze durch zweimaliges Waschen mit 140 µl Waschpuffer wurden die Peptide mit 30 µl Stage-Tip Elutionspuffer eluiert. Alle Wasch- und Ladungsschritte wurden in einer Tischzentrifuge (1600 rpm, jeweils 2 min) durchgeführt. Die eluierten Peptide wurden auf ein Volumen von 5 µl konzentriert und vor der massenspektrometrischen Analyse im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer (4% ACN (v/v), 0,2% (v/v) TFA) gemischt.

2.6.5 PROBEN ZUR BESTIMMUNG DES POOLINGFEHLERS UND DER MARKIERUNGSEFFIZIENZ

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz der Zellen, sowie der Genauigkeit des Probenpoolings, wurden jeweils 100 µg der individuellen bzw. der gepoolten Lysate in Lösung verdaut (siehe 2.6.1) und direkt für die massenspektrometrische Messung vorbereitet. Dazu wurden C18 Stage-Tips wie beschrieben (Rappsilber *et al.*, 2007) hergestellt und mit 100 µl MeOH, 100 µl Elutionspuffer (80% (v/v) ACN, 0,5% (v/v) HAc) und 200 µl Waschpuffer (0,1% TFA, 0,5% (v/v) HAc) equilibriert. 5 µg der verdauten Proben wurden 1:3 mit Probenpuffer (5% ACN (v/v), 1% (v/v) TFA) verdünnt und auf die Stage-Tips geladen. Anschließend wurden die Stage-Tips mit 200 µl Waschpuffer gewaschen und die Peptide zweimal mit 20 µl Elutionspuffer eluiert. Vor der massenspektrometrischen Analyse wurde das Eluat im Vakuum auf ein Volumen von etwa 5 µl reduziert und im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer (4% ACN (v/v), 0,2% (v/v) TFA) gemischt.

2.7 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE

Sämtliche LC-MS/MS Analysen wurden mit einer Thermo Fisher Scientific LTQ-Orbitrap (welche über eine Proxeon Nanoelektronenspray Ionenquelle) mit einem Proxeon Nanoflow HPLC System verbunden war wie beschrieben durchgeführt (Olsen *et al.*, 2005; Daub *et al.*, 2008). Dazu wurden die Phosphopeptid-angereicherten Proben auf eine 15 cm lange, mit 3 μm ReproSil-Pur C18-AQ gepackte, analytische Quarzglas Kapillarsäule mit einem Innendurchmesser von 75 μm geladen und bei konstanten 30°C in einem 150 minütigen Gradienten von 5% bis 80% ACN in 0,5% HAc bei einer Flussrate von 250 nl/min eluiert. Eluierte Peptide wurden mit einer Spannung von 2,4 kV ionisiert und das Elektronenspray über die Heizkapillare (175°C) direkt in das Massenspektrometer injiziert. Die LTQ-Orbitrap wurde im positiven Ionenmodus, mit datenabhängiger Akquisition durch die Xcalibur 2.0 Software, betrieben.

MS-Übersichtsspektren, von m/z 350 - 1750, wurden nach der Akkumulation von 1×10^6 Ionen in der Orbitrap mit einer Auflösung von 60.000 bei m/z 400 akquiriert und die zehn abundantesten Ionen mit einer Ladung von ≥ 2 und einer Abundanz von über 1000 Ionen, nach einander isoliert, mit einem Q-Wert von 0,25 für 30 ms aktiviert, fragmentiert und die resultierenden Fragmentionen in der LTQ analysiert (Olsen *et al.*, 2006). Durch Verwendung einer dynamischen Ausschlussliste wurde die wiederholte Sequenzierung gleicher Peptide unterdrückt. In der linearen Ionenfalle wurde die *multi-stage activation* aktiviert, um *neutral loss species* der Phosphopeptide bei 97,97, 48,99, oder 32,66 m/z unter dem Vorläuferion, bei mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 35% für 30 ms, zu aktivieren (pseudo-MS³) (Schroeder *et al.*, 2004). Das Spektrometer wurde durch die Koinjektion interner Standardionen (m/z 429,08875) aus der Umgebungsluft in die C-Trap (*lock mass option*) in Echtzeit rekaliibriert (Olsen *et al.*, 2005).

2.8 PROZESSIERUNG DER MASSENSPEKTROMETRISCHEN DATEN

Die Rohdaten der massenspektrometrischen Analysen wurden mit der MaxQuant Software (Version 1.0.13.12) prozessiert, deren Leistungsspektrum die Erstellung von Peaklisten, SILAC-basierte Quantifikation, Abschätzung von falsch positiven Ergebnissen, Zuordnung von Peptiden zu Proteingruppen und die Lokalisation von Phosphorylierungsstellen umfasst (Cox und Mann, 2008; Olsen *et al.*, 2010). Die

Peaklisten der MS Spektren wurden gegen eine Datenbank mit 69.316 Einträgen aus dem International Protein Index (IPI, Version 3.37), sowie den 69.316 invertierten Proteinsequenzen zur Bestimmung und Begrenzung des Erwartungswertes für falsch positiv identifizierten Peptide/Proteine (*false discovery rate*, FDR), mit Hilfe der Matrix Science *Mascot Search Engine* (Version 2.2.04) gesucht. Zudem wurden 175 bekannte Proteinkontaminationen (wie z.B. humane Keratine, Trypsin oder Lys-C) in der Datenbank annotiert und im Verlauf der späteren Analyse aus dem Datensatz entfernt. Die maximal zulässigen Massenabweichungen betragen 7 ppm für MS-Spektren und 0,5 Da für MS/MS-Spektren. Als mögliche Modifikationen wurden Carbamidomethylcystein (*fixed*), sowie oxidiertes Methionin, Protein *N*-Acetylierung und Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin (*variable*) eingestellt. Je nach gewähltem SILAC Ansatz wurden die verwendeten Aminosäureisotope Arg¹⁰ und Lys⁸ (Projekte Plk1 und Mps1) oder Arg⁶, Arg¹⁰, Lys⁴ und Lys⁸ (Projekt NSCLC) als *variable* Modifikationen bei der Datenbanksuche berücksichtigt. Als Bedingung wurde weiterhin eine minimale Peptidlänge von sechs Aminosäuren, sowie tryptische Spezifität der identifizierten Peptide gefordert und maximal drei ausgelassene Schnittstellen und SILAC markierte Aminosäuren (Arginin oder Lysin) zugelassen. Für jedes Peptid wurde die Wahrscheinlichkeit einer falsch-positiven Identifikation (*posterior error probability*, PEP), auf Basis des individuellen Mascot-Score und der Peptidlängen-abhängigen Histogrammverteilung für jede Peptidzuordnung zu invertierten und nicht-invertierten Datenbankeinträgen unter Anwendung von Bayes' Theorem, bestimmt. Die PEP auf Proteinebene wurde entsprechend durch Multiplikation aller zu einer Proteingruppe gehörenden Peptid-PEPs berechnet. Der zu erwartende Anteil falsch-positiver Identifikationen des gesamten Datensatzes (*false discovery rate*, FDR) wurde sowohl auf Protein-, als auch auf Peptidebene auf 1% begrenzt. Die identifizierten Peptide wurden Proteingruppen zugeordnet, durch die Proteine mit überschneidenden und nicht-einzigartigen Peptiden zusammengefasst wurden. Das anführende Protein (*leading protein*) jeder Gruppe musste durch mindestens zwei Peptide, von denen mindestens eins diesem Protein eindeutig zuordbar (*unique*) sein musste, identifiziert sein. Die identifizierten Peptide wurden automatisch quantifiziert und eventuelle Phosphorylierungsstellen durch die in MaxQuant implementierte *post-translational modification* (PTM) *score-based localisation* zugeordnet (Olsen *et al.*, 2006; Olsen *et al.*, 2010). Für die Projekte Plk1 und Mps1 wurde zudem die *match between runs*

Funktion von MaxQuant genutzt. Hierdurch wurde bewirkt, dass die Identifikation eines Peptides einer Probe mit den zum gleichen Zeitpunkt eluierenden Peptiden gleicher Masse in einer anderen Probe korreliert wird. Dadurch kann insbesondere bei vergleichenden Analysen oder Replikaten, deren Zusammensetzung vergleichbar oder identisch ist, die konsistente Quantifizierung der Phosphopeptide/Proteine sichergestellt werden. Für spätere Analysen wurden alle Phosphopeptidevidenzen auf einem Mascot Score von mindestens 7, sowie einen *mass error* von weniger als 5 ppm gefiltert und nur Phosphorylierungsstellen mit einer Lokalisationswahrscheinlichkeit von mehr $p \geq 0,75$ (Klasse I Phosphorylierungsstellen) berücksichtigt.

2.8.1 PLK1 UND MPS1 STUDIE

Alle Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse der Proben des Plk1 und des Mps1 Projekts (jeweils 192 .RAW files) wurden mit MaxQuant prozessiert (siehe 2.8). Um Ungenauigkeiten bei der Vereinigung der einzelnen differentiell markierten Lysate auszugleichen, wurden die von MaxQuant ausgegebenen normalisierten Peptidratisos verwendet. Die in der Evidence Tabelle gelisteten Phosphopeptide wurden durch ihre Aminosäuresequenz und ihre Anzahl an Phosphorylierungsstellen spezifiziert. Für jedes technische Replikat wurde der Median der normalisierten SILAC Ratios der wiederholt quantifizierten Phosphopeptide berechnet. Falls in beiden technischen Replikaten eines biologischen Replikats SILAC basierte Phosphopeptidquantifizierung festgestellt werden konnte, wurden die entsprechenden Ratios gemittelt aufwiesen (siehe Anhang Tabelle A1 und Tabelle A5). Die sich daraus ergebenden, quantifizierten Phosphopeptidratisos aus biologischen Plk1^{as} und Plk1^{wt} bzw. Mps1^{as} und Mps1^{wt} Replikaten bildeten die Grundlage für alle weiterführenden vergleichenden und statistischen Analysen.

Für die Analyse aller Phosphorylierungsstellen wurden die entsprechenden Klasse I lokalisierten SILAC Ratios der biologischen Replikate gemittelt, soweit in den beiden entsprechenden technischen Replikaten ein Ratios bestimmt wurde (siehe Anhang Tabelle A2 und Tabelle A6).

Die paarweisen Überlappungen aller Phosphopeptiddaten der biologischen Replikate der Plk1^{as} oder Plk1^{wt} Zellen bzw. der Mps1^{as} und Mps1^{wt} wurden wie beschrieben berechnet (Choudhary *et al.*, 2009).

Die Verteilung der Phosphopeptidratios wurde durch Boxplots dargestellt, deren Zäune den fünffachen Interquartilsabstand (IQR) angeben. Sämtliche Boxplots wurden mit der statistischen Software R berechnet (Team, 2008) und beruhen entweder auf den individuellen biologischen Replikaten oder den gemittelten Ratios aller Analysen mit Plk1^{as} oder Plk1^{wt} Zellen bzw. Mps1^{as} oder Mps1^{wt} Zellen. In letztere Boxplots wurden nur solche Phosphopeptidratios (konfident identifizierte Ratios) eingeschlossen, die in mindestens zwei biologischen Plk1^{as} bzw. Mps1^{as} Replikaten, sowie in zwei biologischen Plk1^{wt} bzw. Mps1^{wt} Replikaten quantifiziert wurden und einen Variationskoeffizienten kleiner 0,4 (Plk1 Studie) beziehungsweise 0,3 (Mps1 Studie) in beiden Zelllinien aufwiesen (siehe Anhang Tabelle A1 und Tabelle A5).

Um die unterschiedlichen Auswirkungen der 3-MB-PP1 Inhibition auf die Phosphoregulation in Plk1^{as} versus Plk1^{wt} Zellen bzw. Mps1^{as} versus Mps1^{wt} zu ermitteln, wurden alle Phosphopeptid- und Phosphorylierungsstellenratios aus mindestens zwei biologischen Replikaten in jeweils beiden Zelllinien Log₂ transformiert und mit der SAM Funktion (*significance analysis of microarray, two-class unpaired*) der TM4 MeV Software untersucht (Tusher *et al.*, 2001). SAM berechnet einen statistischen d_i -Wert jedes Ratios, um signifikant unterschiedliche Ratios in Gruppe A versus Gruppe B zu identifizieren und verwendet Permutationen der wiederholten Messungen, um falsch positive Ergebniswahrscheinlichkeiten (q -Werte) für verschiedene Werte des Abgrenzungsparameters Δ zu ermitteln. Fehlende Werte wurden in SAM durch den *k-nearest neighbour* Normalisierungsalgorithmus eingesetzt (Anzahl der Nachbarn = 15). Für die weitere bioinformatische Analyse wurden alle Phosphopeptide und Phosphorylierungsstellen der SAM Ergebnistabellen mit einer falsch positiven Fehlerwahrscheinlichkeit (FDR bzw. q -Wert) von 0% als reguliert angesehen.

Für alle Ratiopaare (Ratio in analog-sensitiver Zelllinie und Ratio in Wildtypzelllinie) der SAM Ergebnislisten des Plk1 und des Mps1 Projekts (bis zu einer FDR von 60%) wurde für verschiedene Δ Parameter ermittelt, welches der beiden Ratios stärker von 1 abweicht. Nachdem angenommen werden kann, dass in den jeweiligen Wildtypzellen keine differentielle Phosphoregulation stattfindet, wurden sämtliche Wildtyp-spezifischen Regulationen als falsch positive Ereignisse angesehen und für die Berechnung von experimentbasierten Fehlerwahrscheinlichkeiten der spezifischen Regulation durch die analogsensitive Kinase verwendet.

2.8.2 NSCLC STUDIE

All Rohdaten der massenspektrometrischen Analyse der NSCLC Proben (330 .RAW files, ohne Rohdaten der Proben des Poolingfehlers und der Markierungseffizienzen) wurden mit MaxQuant prozessiert (siehe 2.8). Grundlage für die Phosphorylierungsstellen zentrierte Analyse war die von MaxQuant ausgegebene Phospho(STY) Tabelle. Alle SILAC Ratios der Klasse I lokalisierten Phosphorylierungsstellen beider Replikate jeder Zelllinie wurden durch den entsprechenden Faktor der Analyse des Poolingfehlers normalisiert. Die daraus resultierenden Daten wurden für alle weiterführenden vergleichenden und statistischen Analysen verwendet (siehe Anhang Tabelle A7). Auf eine Phosphopeptid-zentrierte Analyse der Daten wurde verzichtet.

2.8.2.1 Bestimmung des Poolingfehlers der NSCLC Proben

Die Rohdaten der massenspektrometrischen Analysen der gepoolt verdauten NSCLC Poolingfehler Proben (33 .RAW files) wurden separat mit MaxQuant prozessiert (siehe 2.8). Zur Bestimmung des Poolingfehlers wurden die von MaxQuant ausgegebene Protein Groups Tabelle verwendet. Für jede Probe wurden separat die gemessenen leichten, mittleren und schweren Intensitäten aller Proteine aufsummiert. Der Korrekturfaktor des Poolingfehlers für jedes der beiden Replikate jeder Zelllinie (Replikat 1: SILAC Markierung 6/4, Replikat 2: SILAC Markierung 10/8) berechnete sich aus dem Quotienten der, je nach SILAC Kultivierungsbedingung, Summe der mittleren oder schweren Intensitäten und der Summe der leichten Intensitäten.

2.8.2.2 Bestimmung der Markierungseffizienz der individuellen NSCLC Zelllysate

Die Rohdaten der massenspektrometrischen Analysen der individuell verdauten NSCLC Zelllysate (66 .RAW files, je Zelllinie Replikat 1 (SILAC Markierung 6/4) und Replikat 2 (SILAC Markierung 10/8)) wurden separat mit MaxQuant prozessiert (siehe 2.8). Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurden die von MaxQuant ausgegebene Protein Groups Tabelle verwendet. Für jede Probe wurden separat die gemessenen leichten, mittleren und schweren Intensitäten aller Proteine aufsummiert. Die Markierungseffizienz berechnete sich aus dem Prozentanteil der Summe der, je nach SILAC Kultivierungsbedingung, mittleren oder schweren Intensitäten an der Gesamtsumme.

2.9 BIOINFORMATISCHE AUSWERTUNG

Die Bearbeitung der von MaxQuant ausgegebenen .txt Dateien aller Projekte erfolgte mit der Software MS Office Excel. Die graphische Darstellung der Daten in Histogrammen, Streudiagrammen, sowie aller anderen Kurven erfolgte mit Hilfe der Systat Software SigmaPlot.

2.9.1 PLK1 UND MPS1 STUDIE

Zur Darstellung der normalisierten Häufigkeiten der verschiedenen Aminosäuren der ± 6 Positionen aller, durch 3-MB-PP1 Behandlung induzierten Phosphorylierungsereignisse in Plk1^{as} bzw. Mps1^{as} Zellen, wurde die Onlinesoftware WebLogo verwendet (Crooks *et al.*, 2004).

Die gleichen Sequenzabschnitte aller positiv induzierten Serin Phosphorylierungsstellen Plk1 Studie wurden mit der Onlinesoftware Motif-X analysiert, um im Vergleich zum Hintergrund aller SAM-analysierten Klasse I Serin Phosphorylierungsstellen signifikant überrepräsentierte Motive zu extrahieren (Schwartz und Gygi, 2005). Die minimale Häufigkeit der Motive wurde dazu mit 10, die minimal notwendige Signifikanz mit 10^{-6} angegeben.

Des Weiteren wurden die Sequenzabschnitte um alle Phosphorylierungsstellen (± 6 Positionen) auf das Vorkommen des Plk1 Konsensusmotivs D/E/N-X-pS/pT- φ (X steht für eine beliebige und φ für eine hydrophobe Aminosäure) (Burkard *et al.*, 2009), eines D/E/N -X-pS/pT Motivs und des PBD Erkennungsmotivs S-pS/pT-P/X (Elia *et al.*, 2003a) untersucht und die jeweiligen Häufigkeiten in Phosphoproteinen, die eine durch Plk1 regulierte Phosphorylierungsstelle tragen im Vergleich zu allen Phosphoproteinen, die eine SAM-analysierte Phosphorylierungsstelle tragen, berechnet. Entsprechende *p*-Werte wurden anhand eines einseitigen, exakten Fisher Tests ermittelt.

Alle, durch Plk1 positiv regulierten Phosphoproteine (auf Basis der SAM Analysen der Phosphopeptide und Phosphorylierungsstellen mit einer FDR von 0%; 372 IPI Einträge; siehe Anhang Tabelle A3) wurden auf eine Anreicherung in den *gene ontology* (GO) Kategorien zelluläre Komponenten (CC; *cellular component*), biologische Prozesse (BP; *biological process*) und molekulare Funktionen (MF; *molecular function*), sowie Pfam Proteindomänen (Finn *et al.*, 2008) und KEGG regulatorischen Signalwegen (Kanehisa *et al.*, 2006) untersucht. Dazu wurde der nicht-konditionale, hypergeometrische Test des GO

Statistik Pakets (Falcon und Gentleman, 2007) der statistischen Software R (Team, 2008) verwendet. Die Analysen wurden sowohl vor dem Hintergrund der gesamten IPI Datenbank ($p < 0,01$; siehe Anhang 7.5, Tabelle A3) als auch vor dem Hintergrund aller Phosphoproteine mit quantifizierten Phosphorylierungen in Plk1^{as} Zellen (3478 IPI Einträge; $p < 0,05$; siehe Anhang 7.5, Tabelle A3) durchgeführt.

Zur Darstellung von Netzwerken wurden alle identifizierten Phosphoproteine mit quantifizierten Phosphorylierungen, die in den GO CC Kategorien Zentrosom, Kinetochor, Mikrotubuli und Zellkernpore annotiert waren, in die Suchmaske der Online Software *STRING* (*search tool for the retrieval of interacting gens/proteins*, Version 8) eingegeben (Jensen *et al.*, 2009). Zuvor wurden alle IPI Identifikatoren mit dem BioMart Server (Haider *et al.*, 2009) in Ensembl Genidentifikatoren umgewandelt. Falls kein Ensembl Genidentifikator zugeordnet werden konnte, wurden die entsprechenden Gennamen verwendet. Die Protein-Protein Wechselwirkungen der Vorhersagemethoden „*experiments*“ und „*databases*“ hohen Konfidenzniveaus (Score > 0,7) wurden berücksichtigt (siehe Anhang Tabelle A4) und das Netzwerk mit der Cytoscape Software (Cline *et al.*, 2007) dargestellt.

2.9.2 NSCLC STUDIE

Für die Analyse der Phosphorylierungsprofile der NSCLC Zelllinien wurden die konsistent identifizierten Ratios aller Phosphorylierungsstellen die in mindestens 15 Zelllinien detektiert wurden \log_2 transformiert und mit der *K-means* Clustering Funktion der MeV Software (TM4) untersucht (Tusher *et al.*, 2001). Dabei wurde der KMC Modus „*calculated means*“ und die Entfernungsmetrik (*distance metric*) „*Pearson uncentered*“ verwendet. Die Anzahl der Cluster wurde auf 10 eingestellt und die Anzahl der maximalen Iterationen auf 50 begrenzt. Die hierarchische Clustering Funktion wurde aktiviert und sowohl für die Zelllinien (*samples*) als auch für die Phosphorylierungsstellen (*genes*) Bäume erstellt, wobei für beide die Reihenfolgenoptimierungsfunktion gewählt wurde. Wieder wurde die Entfernungsmetrik „*Pearson uncentered*“ verwendet und die *linkage method* „*average linkage clustering*“ ausgewählt. Eine Phosphorylierungsstelle galt als „konsistent identifiziert“, wenn sie in beiden Replikaten einer Zelllinie Ratios aufwies, die mit einem maximalen Variationskoeffizienten von 0,4 voneinander abwichen oder gleichförmig reguliert (größer 2-fache Regulation) waren.

3 ERGEBNISSE

3.1 PLK1 SUBSTRATIDENTIFIKATIONSSTUDIE

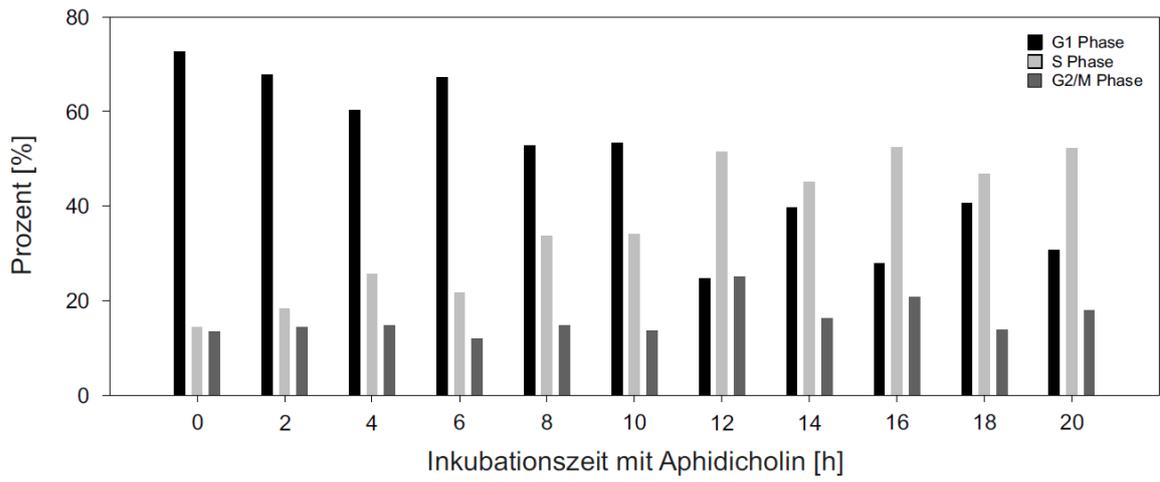
3.1.1 OPTIMIERUNG DER SYNCHRONISATION DER ZELLEN

HTERT-RPE Plk1^{as} Zellen wurden zur Optimierung des Arrestprotokolls nach verschiedenen Zeitschemata mit Aphidicolin und Nocodazol kultiviert, geerntet und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 6 zeigt den jeweiligen Prozentsatz der Zellen in den Zellzyklusphasen G1, S und G2/M nach bis zu 20-stündiger Inkubation mit Aphidicolin (Panel A), sowie nach 12-stündiger Aphidicolinbehandlung gefolgt von einer Inkubation mit Nocodazol von bis zu weiteren 20 Stunden (Panel B). HTERT-RPE Plk1^{as} Zellen zeigen ab einer 12-stündigen Aphidicolinbehandlung einen konstanten Arrest in der S-Phase. Nach weiteren 12 Stunden in Nocodazol befinden sich knapp 70% der Zellen im mitotischen Arrest. Nachdem die Teilungsgeschwindigkeit und das Zellzyklusverhalten der hTERT-RPE Plk1^{as} Zellen empfindlich von ihrer Kultivierungsdichte beeinflusst werden, wurden außerdem 24 Stunden vor der Behandlung unterschiedliche Zellzahlen ausgesät und nach 12 Stunden Aphidicolin-, sowie 13 Stunden Nocodazolbehandlung durch FACS analysiert. Abbildung 6C zeigt die deutliche Abhängigkeit der Effektivität des Arrestprotokolls von der Zelldichte. Bereits bei 400.000 Zellen pro 6 cm Zellkulturschale, was in etwa einer prozentualen Dichte von 60% entspricht, zeigt sich ein Anstieg der G1 Population der mit steigender Zellzahl stetig zunimmt. Als optimale Synchronisationsbedingungen für den mitotischen Arrest von hTERT-RPE Plk1^{as} Zellen wurden deshalb eine minimale Kultivierungszeit von 12 h in Aphidicolin- gefolgt von 13 h in Nocodazol-haltigem Medium bei einer Zelldichte von 11.000 Zellen/cm² (entspricht 250.000 Zellen/6 cm Zellkulturschale) festgelegt.

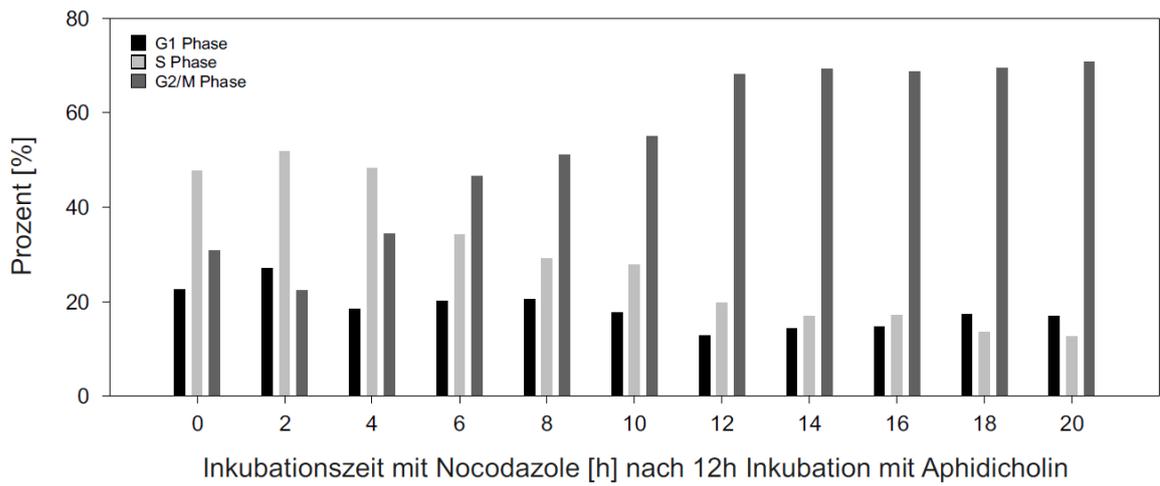
Abbildung 6: Zellzyklusverteilung von hTERT-RPE-Plk1^{as} Zellen nach Inkubation mit Synchronisationsreagenzien und Analyse mit FACS. **(A)** Die Inkubation mit Aphidicolin zur Vorsynchronisation der Zellen in der S-Phase zeigt den graduellen Anstieg der S-Phasen Zellpopulation (hellgrau) bei Abnahme der G1-Phasen Zellpopulation (schwarz). Nach 12-stündiger Inkubation ist ein Plateau erreicht, der Anteil der Zellen in der S-Phase schwankt um 50%. **(B)** Die Inkubation der Zellen mit Nocodazol (nach vorangegangener 12-stündiger Inkubation mit Aphidicolin) bewirkt einen Zellzyklusarrest in der Prophase der Mitose. Nach 12-stündiger Inkubation befinden sich etwa 70% der Zellen in der Mitose. **(C)** Die Zelldichte während der Inkubation mit Synchronisationsreagenzien beeinflusst die Effektivität der Zellsynchronisation. Bei der Aussaat von mehr als 300.000 Zellen/P6 sinkt der Anteil mitotischer Zellen nach jeweils 12-stündiger Inkubation mit Aphidicolin und Nocodazol.

3 Ergebnisse

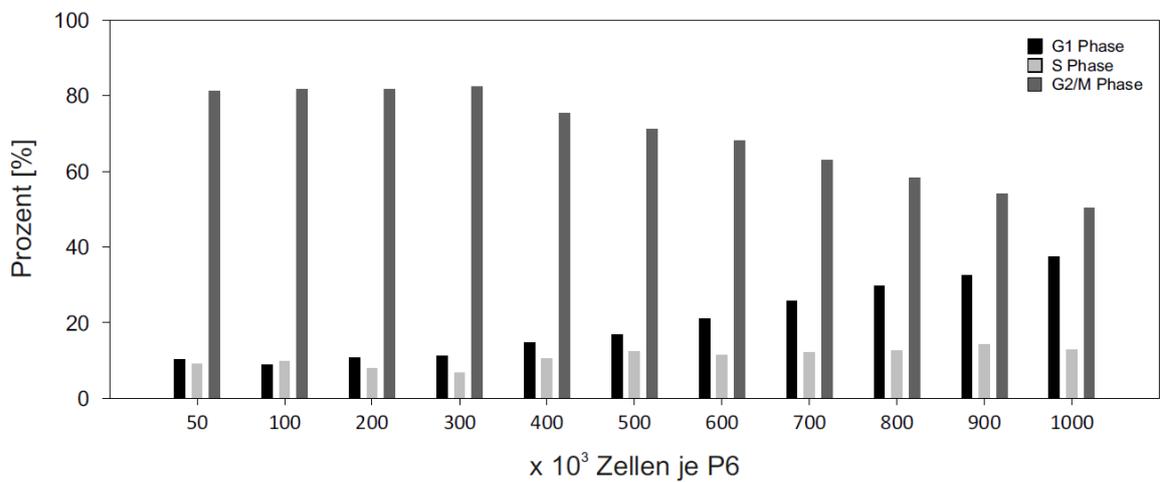
A



B



C



3.1.2 BESTIMMUNG DER OPTIMALEN INHIBITORKONZENTRATION

Um die optimale Konzentration des Inhibitors 3-MB-PP1 zur Inhibition der analogsensitiven Plk1 zu ermitteln, wurden hTERT-RPE Plk1^{as} Zellen unter den festgelegten Synchronisationsbedingungen in Gegenwart unterschiedlicher 3-MB-PP1 Konzentrationen während der 13-stündigen Nocodazolinkubation arretiert, lysiert und mittels Immunoblotting gegen das bekannte Plk1 Substrat BubR1 analysiert (Elowe *et al.*, 2007). BubR1 zeigt nach Phosphorylierung durch Plk1 eine charakteristische Verlagerung der Bande im Westernblot von 130 kDa auf ca. 135 kDa. Abbildung 7 zeigt die Abnahme der Intensität der phospho-BubR1 Bande mit steigender 3-MB-PP1 Konzentration und ihr vollständiges Verschwinden zwischen 0,1 und 1 μ M. Um eventuelle Schwankungen auszugleichen und eine effektive Inhibition der analogsensitiven Plk1 zu garantieren, wurde im Folgenden eine Standardkonzentration von 5 μ M 3-MB-PP1 eingesetzt.

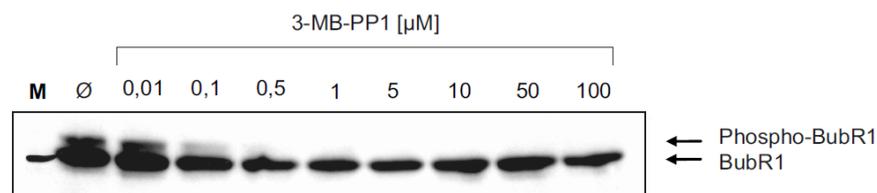


Abbildung 7: Ermittlung der optimalen 3-MB-PP1 Konzentration zur Inhibition der Plk1 Aktivität. hTERT-RPE Plk1^{as} Zellen wurden mit Aphidicolin vorsynchronisiert und während der anschließenden 13-stündigen mitotischen Arretierung mit Nocodazol zudem mit steigenden 3-MB-PP1 Konzentrationen inkubiert. Die Totalzelllysate wurde anschließend durch Immunoblot mit einem BubR1 spezifischem Antikörper analysiert. Die langsamer wandernde Bande des phosphorylierten Substrats nimmt mit steigender 3-MB-PP1 Konzentration ab und ist ab einer Konzentration von 1 μ M nicht mehr detektierbar.

3.1.3 FESTLEGUNG DES INHIBITIONSSCHEMAS

Für die Identifikation von Plk1 regulierten Substraten durch Inhibition mit 3-MB-PP1 sind zwei verschiedene Strategien denkbar. Der Inhibitor kann entweder gemeinsam mit Nocodazol während des mitotischen Arrests der Zellen zugegeben werden und in einem anschließenden, inhibitorfreien Inkubationsschritt unter Aufrechterhaltung des Nocodazolarrests ausgewaschen werden. Dadurch würde die Plk1 Aktivität reaktiviert werden und direkte Phosphorylierungsereignisse könnten detektiert werden.

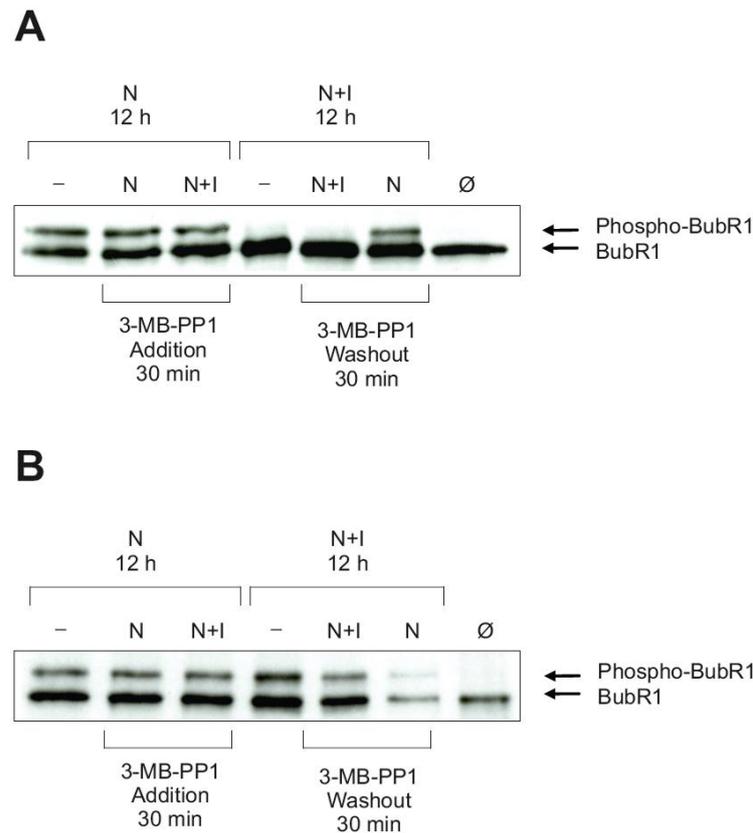


Abbildung 8: Zelluläre Induktion der Plk1 Aktivität. hTERT-RPE Plk1^{as} und hTERT-RPE Plk1^{wt} Zellen wurden mit Aphidicolin vorsynchronisiert und dann durch 13-stündige Inkubation mit Nocodazol (N) oder Nocodazol und 5 μ M 3-MB-PP1 (N+I) in der Mitose arretiert. Die Zellen wurden entweder direkt lysiert (-) oder gewaschen und weitere 30 min mit Nocodazol (N) oder Nocodazol und 5 μ M 3-MB-PP1 (N+I) inkubiert und anschließend lysiert. Zudem wurde Zelllysate nicht synchronisierter Zellen hergestellt (\emptyset). Die Totalzelllysate wurde anschließend durch Immunoblot mit einem BubR1 spezifischem Antikörper analysiert. **(A)** Behandlung von hTERT-RPE Plk1^{as} Zellen. Die langsamer wandernde Bande in der zweiten Spur von rechts zeigt das Erscheinen von Plk1 phosphoryliertem BubR1 nach 30-minütigem Auswaschen von 3-MB-PP1. In allen folgenden SILAC MS Experimenten wurde dieses Behandlungsschema mit der für 30 min aufrechterhaltenen Inkubation mit Nocodazol und 5 μ M 3-MB-PP1 (dritte Spur von rechts) verglichen. **(B)** Behandlung von hTERT-RPE Plk1^{wt} Zellen. BubR1 zeigt in Wildtypzellen keine Veränderung seines Phosphorylierungsstatus. Die langsamer wandernde Bande des phosphorylierten Substrats ist wie zu erwarten nur in asynchronen Zellen (erste Spur von rechts) nicht detektierbar. In allen folgenden SILAC MS Kontrollexperimenten mit hTERT-RPE Plk1^{wt} Zellen wurden die gleichen Behandlungsschemata wie in hTERT-RPE Plk1^{as} Zellen (30-minütige Inkubation mit Nocodazol gegen 30 min aufrechterhaltene Inhibition mit Nocodazol und 5 μ M 3-MB-PP1 (zweite Spur von rechts gegen dritte Spur von rechts) miteinander verglichen.

Eine zweite Möglichkeit bietet die Zugabe des Inhibitors nach erfolgtem Nocodazolarrest, wobei die Abnahme der durch Plk1 erfolgten Phosphorylierungsereignisse gemessen werden würde, da durch die Inhibition eine Verschiebung des Kinase-Phosphatase Gleichgewichts zu erwarten wäre. Um die Effektivität beider Schemata zu vergleichen

wurden hTERT-RPE Plk1^{as} Zellen nach entsprechender Behandlung lysiert und mittels Immunoblotting gegen BubR1 analysiert. In Abbildung 8 lässt sich die phosphorylierungsspezifische BubR1 Doppelbande nach dem Auswaschen von 3-MB-PP1 deutlich erkennen, was auf eine erfolgreiche Reaktivierung der Plk1 Aktivität hindeutet. Im Gegensatz dazu ist nach 30-minütiger Inhibition mit 3-MB-PP1 keine Schwächung der Intensität der oberen phospho-BubR1 Bande festzustellen. Dies lässt auf eine vergleichsweise ineffiziente Dephosphorylierung von BubR1 durch mitotische Phosphatasen schließen. Für die folgende massenspektrometrische Substratidentifikationsstudie wurde deshalb der Ansatz der Plk1 Reaktivierung durch Auswaschen des Inhibitors bevorzugt.

3.1.4 DURCHFÜHRUNG DES MASSENSPEKTROMETRIEEXPERIMENTS

Für die systematische und zuverlässige Identifikation direkter zellulärer Plk1 Substrate durch chemisch-genetische Inhibition und quantitative Phosphoproteomik wurden vier SILAC Replikate mit alternierenden Markierungsschemata sowohl mit hTERT-RPE Plk1^{as} als auch mit Plk1^{wt} Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 9). Die SILAC markierten Zelllinien wurden wie im vorangegangenen beschrieben durch Nocodazol im Beisein von 3-MB-PP1 in der Mitose arretiert, was die Aktivität der mitotischen Plk1 in Plk1^{as} Zellen, jedoch nicht in Plk1^{wt} Zellen blockierte. Daraufhin wurde in jeweils einer Population der mitotischen Zellen unter Aufrechterhaltung des Nocodazolarrests der Inhibitor 3-MB-PP1 ausgewaschen, um in Plk1^{as} Zellen die Aktivität der analogsensitiven Kinase zu reaktivieren. Die Zellen wurden lysiert und die inhibitorfreien Populationen der beiden Zelllinien mit den jeweiligen 3-MB-PP1-haltigen vereinigt (siehe Abbildung 9). Die Proteine wurden tryptisch verdaut und die Peptide mit SCX Chromatographie in 12 SCX Fraktionen aufgetrennt (Villen und Gygi, 2008). Anschließend wurden die Phosphopeptide jeder Fraktion in Duplikaten durch IMAC angereichert und die Proben durch LC-MS auf einer LTQ-Orbitrap gemessen. Die daraus resultierenden 192 MS Dateien wurden kombiniert mit der MaxQuant Software Suite prozessiert, um Peptide und Proteine zu identifizieren, sowie Phosphorylierungsunterschiede zwischen den vereinigten Populationen zu quantifizieren (Cox und Mann, 2008).

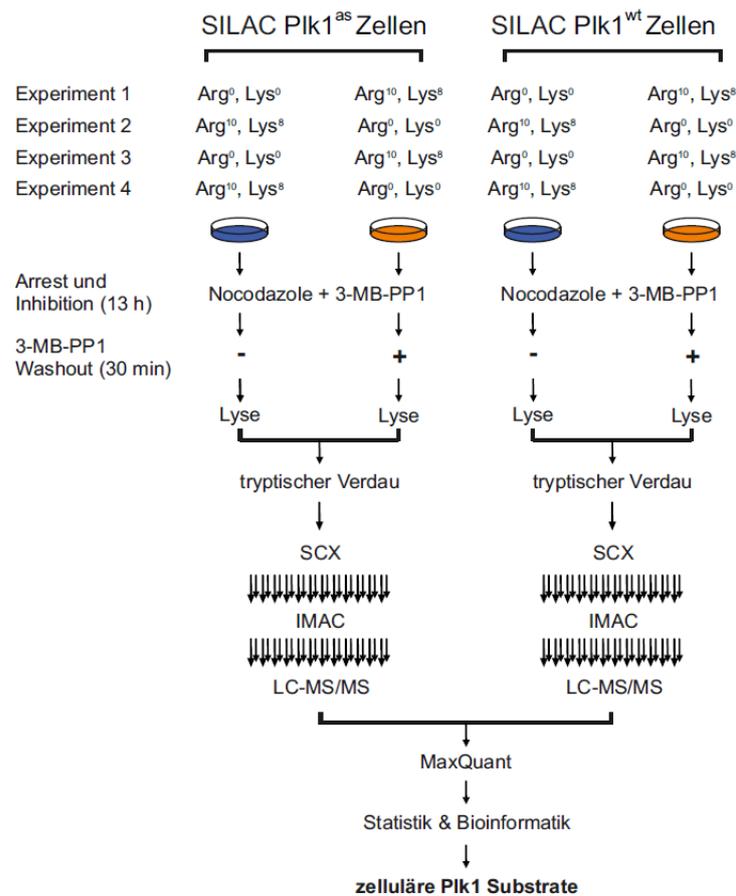


Abbildung 9: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus und der einzelnen Arbeitsschritte der Plk1 Studie. Nach Markierung durch SILAC wurden sowohl in hTERT-RPE Plk1^{as} als auch in hTERT-RPE Plk1^{wt} Zellen jeweils vier unabhängige biologische Replikate durchgeführt. In jedem Replikat wurde der Plk1^{as} Inhibitor 3-MB-PP1 bei einer der mitotisch arretierten Zellpopulation ausgewaschen, die Zellen anschließend lysiert und verdaut. Die Phosphopeptide wurden durch SCX Chromatographie in Kombination mit IMAC angereichert, mit LC-MS analysiert und die Daten mit der MaxQuant Software Suite analysiert.

3.1.5 MASSENSPEKTROMETRISCHE IDENTIFIKATIONEN

Insgesamt wurden in der Plk1 Studie 6.192 verschiedene Proteine identifiziert, von welchen 4.803 Proteine phosphoryliert vorlagen. Für 23.541 unterschiedliche Phosphopeptide dieser Proteine konnte der Einfluss der differentiellen Inhibitorbehandlung quantifiziert werden. Für die überwiegende Mehrheit der quantifizierten Daten war es möglich, die jeweiligen Ratios aus Plk1^{as} und Plk1^{wt} Zellen zu vergleichen, da mehr als 70% aller Phosphopeptide in beiden Zelllinien quantifiziert werden konnten (siehe Abbildung 10).

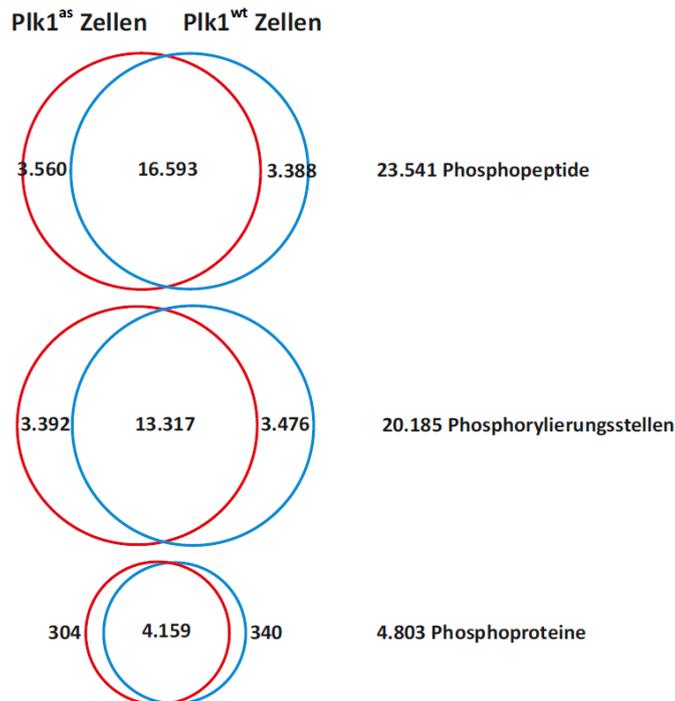


Abbildung 10: Venn Diagramme der Plk1 Studie. Darstellung der Anzahl der gemeinsam, sowie jeweils ausschließlich in hTERT-RPE Plk1^{as} und hTERT-RPE Plk1^{wt} Zellen identifizierten Phosphopeptide, Phosphorylierungsstellen und Phosphoproteine.

Auch deuteten die Daten auf sehr ähnliche Phosphoproteome von Plk1^{as} und Plk1^{wt} Zellen hin, da die mittlere Übereinstimmung zweier beliebiger Replikate, unabhängig davon ob es sich um Daten aus Plk1 Wildtyp oder analogsensitiven Zelllinien handelte, sehr ähnlich war (siehe Abbildung 11A und B). Durch die Durchführung von insgesamt vier Replikaten konnte die Anzahl der quantifizierten Phosphopeptide von durchschnittlich über 12.500 pro Einzelerperiment auf knapp 20.000 für alle vier Replikate in Plk1^{as} wie auch in Plk1^{wt} Zellen gesteigert werden (siehe Abbildung 12A).

Bei der Betrachtung der regulierten Phosphopeptide zeigte sich, dass von den jeweils über 10.000 automatisch quantifizierten SILAC Ratios der Einzelerperimente mit Plk1^{as} Zellen typischerweise circa 5% eine mindestens 2-fache Veränderung durch das Auswaschen des Inhibitors erfuhren. Bemerkenswerterweise war dies auch für jeweils etwas mehr als 100 Phosphopeptide der individuellen Replikate mit Plk1^{wt} Zellen der Fall (siehe Abbildung 12B). Um festzustellen, ob es sich hierbei um falsch-positive Identifikationen oder Plk1^{as}-unabhängige *off-target* Effekte des Inhibitors 3-MB-PP1 handelte, wurde die Reproduzierbarkeit der einzelnen Phosphopeptidratis in allen biologischen Replikaten überprüft. Dazu wurden alle Plk1^{as} und Plk1^{wt} Experimente

3 Ergebnisse

jeweils paarweise miteinander verglichen. Das sich hier ergebende Bild unterschied sich deutlich vom vorhergehenden Ergebnis. Während in den Überschneidungen der $Plk1^{as}$ Experimente noch circa 3% (durchschnittlich mehr als 250) aller Phosphopeptide eine konsistente, mindestens 2-fache Regulation aufwiesen, war in drei aus vier $Plk1^{wt}$ Experimentvergleichen mit reziproker SILAC Markierung nur ein einziges Phosphopeptid aus 9.000 in beiden Replikaten quantifizierten Phosphopeptiden konsistent reguliert. In einem einzigen $Plk1^{wt}$ Experimentvergleich konnten drei regulierte Phosphopeptide festgestellt werden. Wurden $Plk1^{wt}$ Replikate identischer SILAC Markierung verglichen, erhöhte sich die Anzahl regulierter Phosphopeptide auf fünf und sieben, was nahelegt, dass es sich hierbei um die von den SILAC markierten Zellen unabhängige Quantifikation von Hintergrundpeptiden handelte. Die Anzahl der mindestens 2-fach quantifizierten Phosphopeptide steigerte sich mit zunehmender Replikanzahl. Im Ganzen konnten in den jeweils vier $Plk1^{as}$ und $Plk1^{wt}$ Experimenten 60% mehr phosphorylierte Peptide wiederholt quantifiziert werden als in Duplikatanalysen (siehe Abbildung 12C).

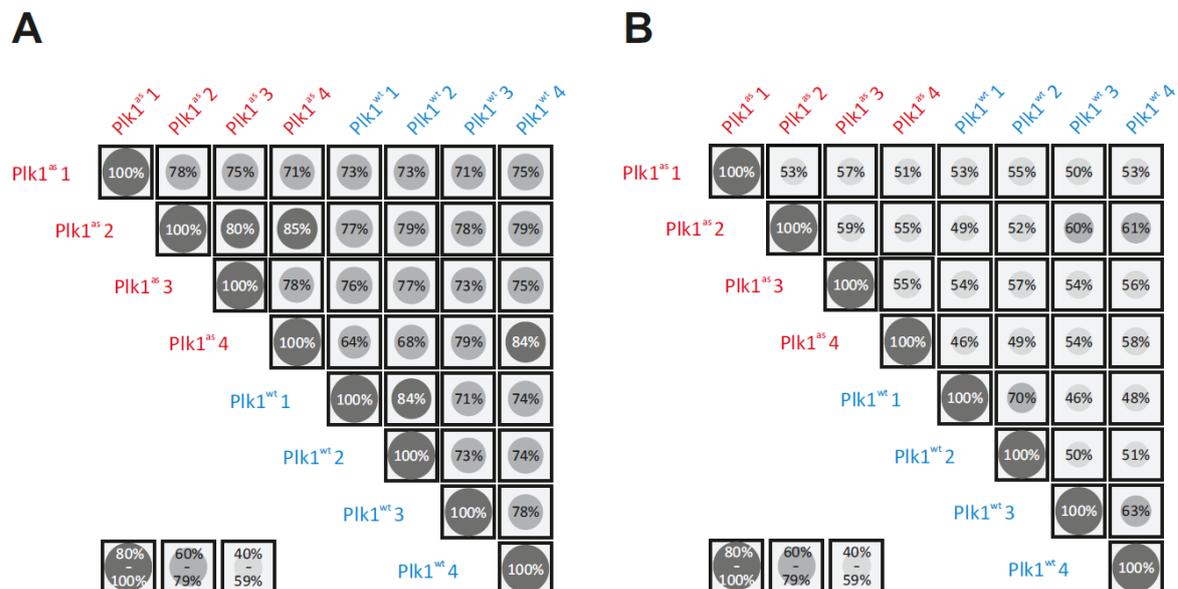
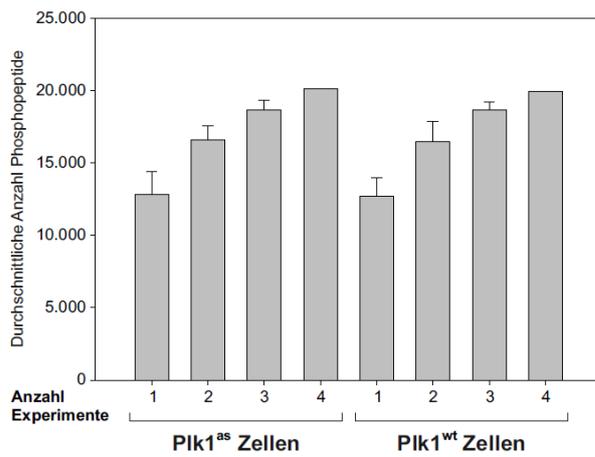


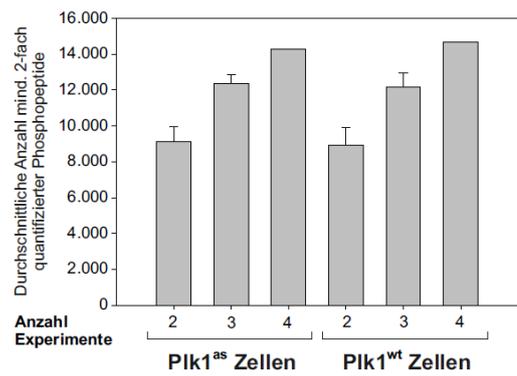
Abbildung 11: Paarweiser Vergleich der quantifizierten Phosphopeptide aller Experimente in $Plk1^{as}$ und $Plk1^{wt}$ Zellen. Für jeden Vergleich ist in **(A)** sowohl der Prozentsatz der in beiden Replikaten detektierten Phosphopeptide an der Gesamtzahl der Phosphopeptide des kleineren Datensatzes angegeben als auch in **(B)** der Prozentsatz der in beiden Replikaten detektierten Phosphopeptide an der Gesamtzahl verschiedener Phosphopeptide beider Datensätze (Ähnlichkeitskoeffizient nach Jaccard).

3 Ergebnisse

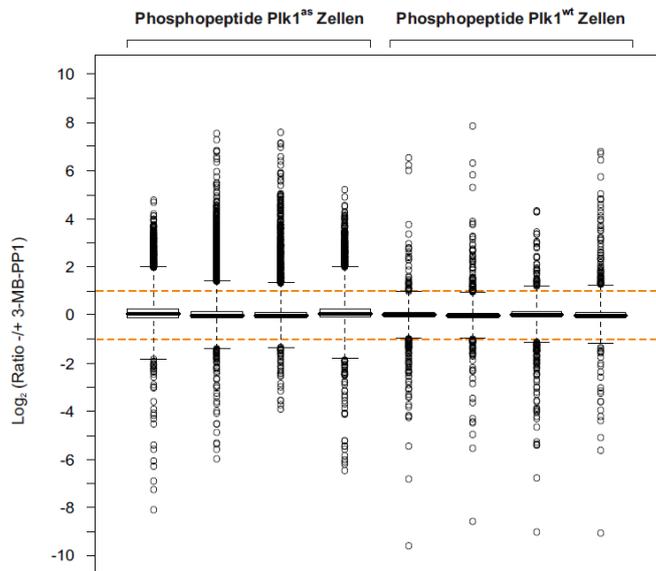
A



C



B



Experiment	as1	as2	as3	as4	wt1	wt2	wt3	wt4
Anzahl quantifiziert	12.195	15.223	13.122	10.877	11.194	11.679	13.906	14.094
> 2-fach	546	913	534	524	112	121	159	133
> 2-fach in beiden		as2: 287, as3: 218, as4: 231			wt1: 1, wt2: 5, wt3: 1			
quantifiziert in beiden		as2: 9.550, as3: 9.168, as4: 7.766			wt1: 9.411, wt2: 8.411, wt3: 10.814			

Abbildung 12: Phosphopeptididentifikationen der Plk1 Studie. **(A)** Auswirkung von biologischen Replikatanalyse auf die Phosphoproteomabdeckung. Dargestellt sind die durchschnittliche Anzahl quantifizierter Phosphopeptide aus einem, zwei oder drei Replikaten, sowie die Gesamtzahl aus allen vier Plk1^{as} bzw. Plk1^{wt} Experimenten. **(B)** Ratioverteilung und Reproduzierbarkeit zwischen den Replikaten. Darstellung der Verteilung der Phosphopeptidratios aller individueller Plk1^{as} und Plk1^{wt} Experimente im Boxplot. Für jedes Replikat ist die Anzahl aller quantifizierten Phosphopeptide, sowie die Anzahl der um mehr als 2-fach regulierten Phosphopeptide nach Auswaschen des Inhibitors 3-MB-PP1 angegeben. Im unteren Teil der Abbildung ist für alle paarweisen Vergleiche von Plk1^{as} bzw. Plk1^{wt} Experimenten die Anzahl der Phosphopeptide angegeben, die in die gleiche Richtung (positiv oder negativ) um mehr als 2-fach reguliert waren. Des Weiteren ist jeweils die Anzahl der in beiden Replikaten detektierten Phosphopeptide angegeben. **(C)** Anzahl der in mindestens zwei unabhängigen Experimenten quantifizierten Phosphopeptide für zwei, drei oder vier Replikatanalysen mit Plk1^{as} oder Plk1^{wt} Zellen. Die Zahlen für zwei bzw. drei Replikatanalysen sind die Durchschnittswerte aller möglichen Zweier- bzw. Dreiergruppen aus den insgesamt vier durchgeführten Experimenten.

Bei gemeinsamer Betrachtung aller acht Experimente konnten knapp 12.000 verschiedene Phosphopeptide mindestens zweimal sowohl in Plk1^{as} als auch in Plk1^{wt} Zellen konfident quantifiziert werden. Von diesen waren nach Auswaschen des Inhibitors 387 Phosphopeptide ausschließlich und mehr als 2-fach reproduzierbar in Plk1^{as} Zellen reguliert (im Vergleich zum respektiven Ratio aus Plk1^{wt} Zellen, siehe Tabelle A1). In Plk1^{wt} Zellen konnte keine ausschließliche Regulation detektiert werden. Des Weiteren konnte nur ein einziges Phosphopeptid identifiziert werden welches sowohl in Plk1^{as}, als auch in Plk1^{wt} Zellen konsistent reguliert war (siehe Abbildung 13A und B). Dabei handelte es sich um das 2-fach phosphorylierte Peptid 325-GLPSTASGRLR-335 der Caseinkinase 1δ (CK1δ). Nachdem die entsprechenden Phosphorylierungsstellen in einer C-terminalen, autoinhibitorischen Region der Kinase liegen (Graves und Roach, 1995) und die Umgebung der einen Phosphorylierungsstelle (Ser331) dem Konsensusmotiv pS/pT-X-X-pS/pT der CK1 Familie entspricht (Pearson und Kemp, 1991), wurde untersucht, ob die Aktivität der CK1δ durch 3-MB-PP1 spezifisch inhibiert werden kann. Bereits niedrige, mikromolekulare Konzentration des Inhibitors blockierten die *in-vitro* Aktivität der CK1δ gegenüber ihrem Substrat CK1tide (siehe Abbildung 13C). Die gemessene Dissoziationskonstante (K_d) betrug 0,20 μM. Daraus lässt sich schließen, dass die Regulation des CK1δ Peptids auf einen *off-target* Effekt des Inhibitors gegenüber CK1δ zurückzuführen ist und nicht mit der analogsensitiven Plk1 Aktivität in Verbindung steht. Auch wurde in Plk1^{wt} Zellen ein 2,01-fach reguliertes Peptid identifiziert welches in Plk1^{as} Zellen nur 1,58-fach induziert und somit als nicht reguliert eingestuft wurde.

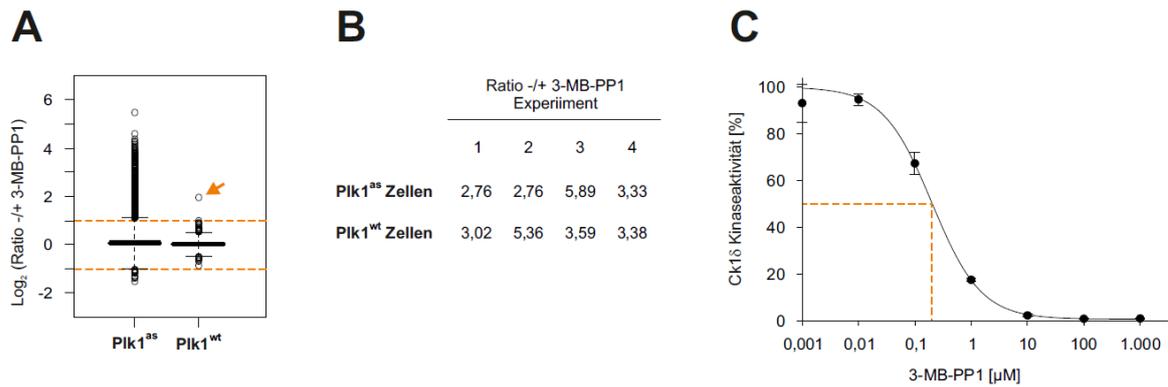


Abbildung 13: Konsistent quantifizierten Phosphopeptide und 3-MB-PP1 *off-target* Effekt. **(A)** Darstellung der Verteilung aller konsistent quantifizierten Phosphopeptidratios für Plk1^{as} und Plk1^{wt} Zellen im Boxplot. Die gestrichelten orangen Linien zeigen den Schwellenwert der 2-fachen Positiv- bzw. Negativregulation an. Der orange Pfeil verweist auf ein Phosphopeptid das eine konsistente Positivregulation in Plk1^{wt} Zellen aufweist. **(B)** Phosphopeptidratios der Induktion des 2-fach phosphorylierten CK1δ Peptids GLPSTASGRLR nach Auswaschen von 3-MB-PP1 in allen Experimenten mit Plk1^{as} und Plk1^{wt} Zellen. **(C)** *In-vitro* Inhibition von CK1δ durch 3-MB-PP1. Der gemessene IC₅₀ Wert von 0,02 μM entspricht ungefähr der Dissoziationskonstante des Inhibitors, nachdem [ATP] < K_M(ATP).

3.1.6 STATISTISCHE ANALYSE MIT SAM

Um die differentielle Regulation von Plk1^{as} versus Plk1^{wt} Zellen mit einzubeziehen und die Detektion von kleiner als 2-fachen Phosphorylierungsänderungen zu ermöglichen, wurde die *Significance Analysis of Microarrays* (SAM) zur quantitativen Datenanalyse eingesetzt. SAM ist im Bereich der Transkriptomik weit verbreitet und ermittelt auf der Grundlage justierbarer Grenzparameter und durch Permutation der Replikatmessungen falsch positive Ergebniswahrscheinlichkeiten (Tusher *et al.*, 2001). Zwar wurde SAM bereits in der quantitativen Massenspektrometrie angewendet, jedoch noch nie für die Analyse modifikationspezifischer, groß angelegter Proteomikstudien etabliert (Beck *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2006). Alle Ratios der Phosphopeptide, die in mindestens zwei Plk1^{as} Experimenten wie auch in zwei Plk1^{wt} Experimenten quantifiziert wurden, wurden mit SAM analysiert (siehe Abbildung 14A, C, D). Tabelle 1 listet für verschiedene Δ Parameter die Anzahl der von SAM ausgegebenen signifikant regulierten Phosphopeptide mit der jeweils korrespondierenden *false discovery rate* (FDR).

3 Ergebnisse

Tabelle 1: Vergleich der Ergebnisse der SAM Analyse der Phosphopeptide der Plk1 Studie mit den experimentellen Daten.

SAM Resultate der differentiellen Phosphoregulation				Experimentelle Daten der Plk1 ^{as} und Plk1 ^{wt} Zellen		
Δ	Anzahl der signifikant Positiven	Anzahl der falsch Positiven	FDR (SAM)	Anzahl reguliert in Plk1 ^{as} Zellen	Anzahl reguliert in Plk1 ^{wt} Zellen	FDR (experimentell)
0.597	1611	213	13.3%	1542	69	4.5%
0.788	1092	68	6.3%	1076	16	1.5%
1.005	913	29	3.2%	908	5	0.6%
1.195	800	13	1.6%	797	3	0.4%
1.412	722	6	0.9%	719	3	0.4%
1.602	662	3	0.5%	660	2	0.3%
1.792	620	2	0.4%	618	2	0.3%
1.955	582	1	0.2%	582	0	0.0%
2.172	551	1	0.1%	551	0	0.0%
2.363	534	0	0.0%	534	0	0.0%

Um die durch SAM erhaltenen Werte auf ihre Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zu überprüfen wurde für alle Phosphopeptide der SAM Ergebnisliste bestimmt ob das aus Plk1^{as} oder Plk1^{wt} Experimenten stammende mittlere Ratio stärker von eins abweicht. Die entsprechenden Zahlen wurden in Abhängigkeit der Δ Parameter aus Tabelle 1 aufgelistet. Plk1^{wt} spezifische Regulationen wurden als falsch positive Ereignisse gewertet und für die Berechnung einer experimentellen FDR durch die Anzahl der Plk1^{as} spezifischen Regulationen geteilt. Die durch SAM ausgegebenen falsch-positiven Ergebniswahrscheinlichkeiten lagen konstant über den aus den experimentellen Daten berechneten Werten. SAM konnte somit als stringente statistische Methode zur Identifikation differentieller Regulation in quantitativen Phosphoproteomikstudien etabliert werden. Bei einem Δ Wert von 2,363 enthielten die entsprechenden 534 Phosphopeptide sowohl nach SAM-Statistik, wie auch nach experimenteller Berechnung keine falsch positiven Regulationen mehr (siehe Tabelle 1 und Abbildung 14C, E).

3 Ergebnisse

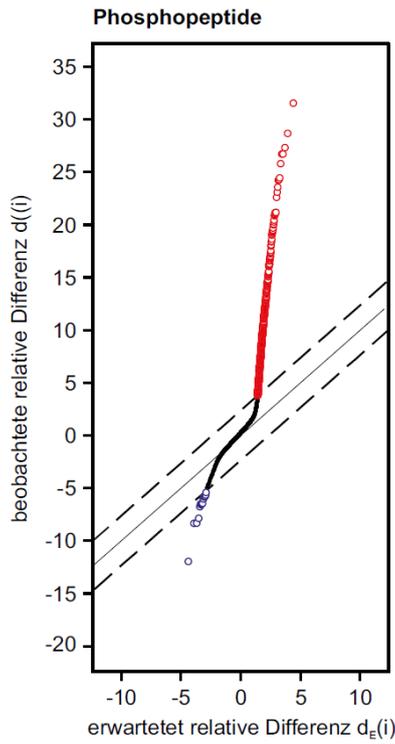
A

		Anzahl Experimente - quantifizierte Phosphopeptide in PIK1 ^{wt} Zellen				
		0	1	2	3	4
Anzahl Experimente - quantifizierte Phosphopeptide in PIK1 ^{wt} Zellen	0	-	2.330	847	150	61
	1	2.667	1.503	1.141	362	178
	2	679	934	1.184	626	425
	3	175	395	1.083	945	1.348
	4	39	123	754	1.095	4.497

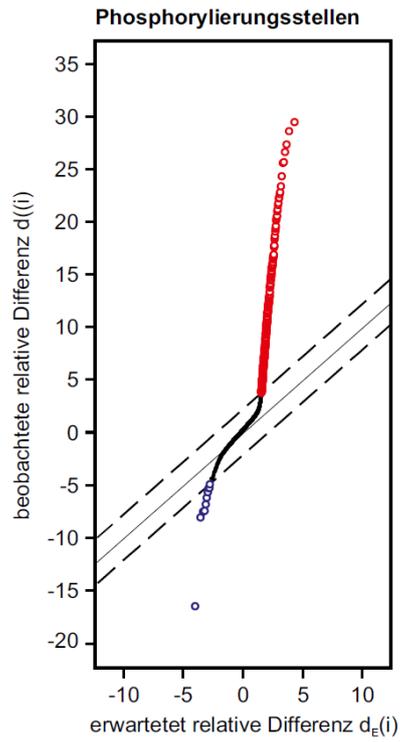
B

		Anzahl Experimente - quantifizierte Phosphorylierungsstellen in PIK1 ^{wt} Zellen				
		0	1	2	3	4
Anzahl Experimente - quantifizierte Phosphorylierungsstellen in PIK1 ^{wt} Zellen	0	-	2.525	730	167	54
	1	2.610	1.473	881	326	131
	2	592	819	932	523	312
	3	157	356	800	701	935
	4	33	127	584	868	3.549

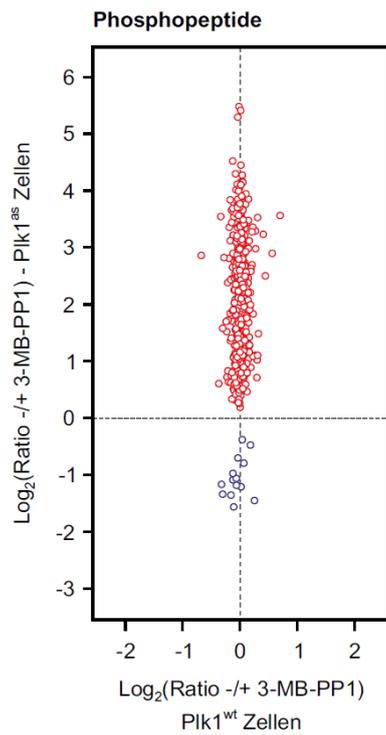
C



D



E



F

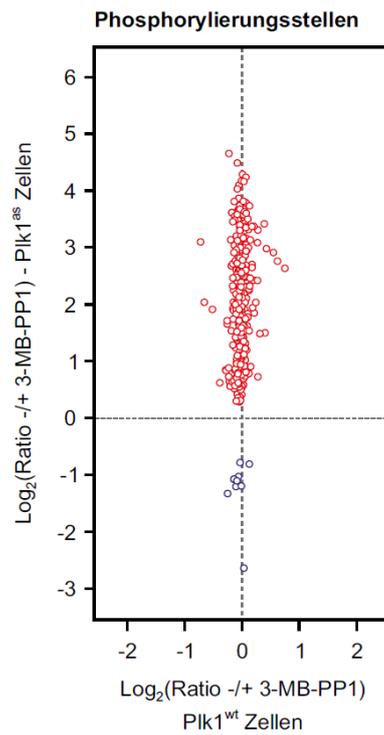


Abbildung 14: Identifikation von Plk1-abhängigen Phosphorylierungsänderungen durch SAM. **(A)** Matrix der Anzahl an Phosphopeptiden und **(B)** Matrix der Anzahl an Phosphorylierungsstellen die in x biologischen Replikaten in Plk1^{wt} Zellen und in y biologischen Replikaten in Plk1^{as} Zellen quantifiziert wurden ($x, y = 0,1,2,3,4$). Dargestellt sind die Zahlen aller möglichen Kombinationen zwischen den Replikaten. Für alle weiteren Analysen (inklusive der SAM Analysen) wurden nur die Phosphopeptide bzw. Phosphorylierungsstellen berücksichtigt, die in mindestens zwei Replikaten in beiden Zelllinien quantifiziert wurden (orange Rahmen). Der mittlere Teil der Abbildung zeigt die von SAM ausgegebenen Deltagraphen der differentiellen Analyse von **(C)** Phosphopeptidratos und **(D)** Phosphorylierungsstellenratios der Plk1^{as} und Plk1^{wt} Experimente. Unterscheiden sich die Populationen nicht voneinander, stimmen die Werte der beobachteten und erwarteten relativen Differenz überein (durchgezogene Linie). Die realen Werte weichen jedoch mit einer Differenz Δ voneinander ab, die Populationen unterscheiden sich. Die gestrichelten Linien deuten den Δ -Wert an, über den hinaus die Phosphopeptide ($\Delta = 2,363$) und die Phosphorylierungsstellen ($\Delta = 2,136$) mit einer FDR von 0% als signifikant positiv (rote Kreise) oder negativ (blaue Kreise) reguliert identifiziert wurden. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Auftragung der in Plk1^{as} Experimenten signifikant regulierten -/+ 3-MB-PP1 Ratios der **(E)** Phosphopeptide und **(F)** Phosphorylierungsstellen gegen die entsprechenden in Plk1^{wt} Experimenten detektierten Ratios. Rot: signifikant positiv regulierte Ratios; blau: signifikant negativ regulierte Ratios.

Parallel dazu wurde SAM mit den gleichen stringenten Kriterien auch für die Phosphorylierungsstellen zentrierte Datenanalyse angewendet und ergab 396 signifikant regulierte Phosphorylierungsstellen ohne falsch positive Ereignisse bei einem Δ Wert von 2,136 (siehe Tabelle 2 und Abbildung 14B, D, E).

Tabelle 2: Vergleich der Ergebnisse der SAM Analyse der Phosphorylierungsstellen der Plk1 Studie mit den experimentellen Daten.

SAM Resultate der differentiellen Phosphoregulation				Experimentelle Daten der Plk1 ^{as} und Plk1 ^{wt} Zellen		
Δ	Anzahl der signifikant Positiven	Anzahl der falsch Positiven	FDR (SAM)	Anzahl reguliert in Plk1 ^{as} Zellen	Anzahl reguliert in Plk1 ^{wt} Zellen	FDR (experimentell)
0.402	2765	943	34.1%	2477	288	11.6%
0.603	1214	159	13.1%	1160	54	4.7%
0.804	784	44	5.6%	771	13	1.7%
1.005	635	18	2.8%	631	4	0.6%
1.206	576	9	1.5%	575	1	0.2%
1.407	509	4	0.8%	508	1	0.2%
1.609	473	2	0.5%	472	1	0.2%
1.81	442	1	0.2%	442	0	0.0%
2.011	406	1	0.2%	406	0	0.0%
2.136	396	0	0.0%	396	0	0.0%

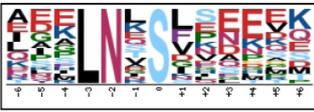
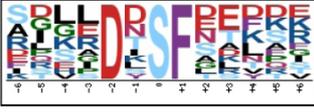
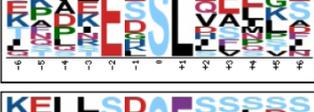
Wie Abbildung 14E und F zeigen handelte es sich bei der großen Mehrheit der signifikanten Veränderungen, welche durch Auswaschen des Inhibitors selektiv in Plk1^{as} Zellen hervorgerufen wurden, um die Induktion von Phosphorylierungen (520 von 534 Phosphopeptiden und 386 von 396 Phosphorylierungsstellen), die sich im Bereich zwischen 1,16-facher bis zu mehr als 50-facher Regulation im Vergleich zum Wildtyp erstreckten. Insgesamt ergaben sich aus den signifikant induzierten Phosphopeptiden und Phosphorylierungsstellen 372 zelluläre Plk1 Proteinsubstrate. Diese bildeten die Datengrundlage für alle weiteren bioinformatischen Analysen.

3.1.7 BIOINFORMATISCHE ANALYSE DER PLK1 REGULIERTEN PHOSPHOPEPTIDE UND PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN

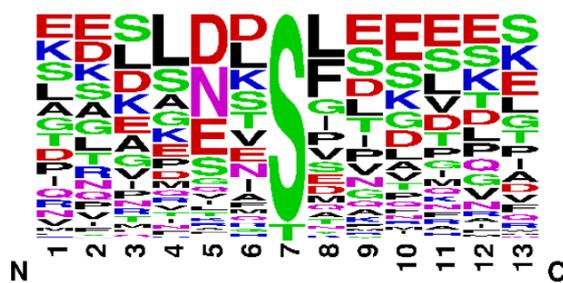
Die Analyse der Aminosäuresequenzen um die durch Plk1 induzierten Phosphorylierungsstellen (Schwartz und Gygi, 2005) zeigte, dass die sauren Reste Glutaminsäure und Asparaginsäure, sowie der hydrophile Rest Asparagin in der Position -2 häufig vertreten waren. Zusätzlich, bzw. unabhängig davon wurden die hydrophoben Reste Leucin oder Phenylalanin in der +1 Position überrepräsentiert gefunden (siehe Abbildung 15A, B). Dies ist in exzellenter Übereinstimmung mit dem bekannten Plk1 Konsensusmotiv D/E/N -X-pS/pT-φ (X steht für eine beliebige und φ für eine hydrophobe Aminosäure) (Burkard *et al.*, 2009) und deutet auf einen hohen Anteil von Phosphorylierungsstellen hin, die direkt von Plk1 phosphoryliert wurden. Interessanterweise wiesen mehr als 70% (279 von 386) der Plk1 induzierten Serin-Phosphorylierungsstellen in ihrer Umgebung mindestens eine der gefundenen Determinanten in der -2 (D/E/N) oder +1 (L/F) liegenden Position auf (siehe Anhang Tabelle A2).

Gleichermaßen konnte das Plk1 Konsensusmotiv genauso wie eine gekürzte Variante ohne den hydrophoben Rest auf der +1 Position (D/E/N-X-pS/pT) hoch angereichert in der Gruppe der Plk1 regulierten Proteine im Vergleich zu allen Phosphoproteinen der SAM Analyse gefunden werden (siehe Abbildung 15C). Eine solche Anreicherung konnte auch für das Polobox Bindungsmotiv S-pS/pT-P/X festgestellt werden, welches von der PBD der Plk1 erkannt wird, um zelluläre Substrate anhand ihres Phosphorylierungsstatus zu identifizieren (Elia *et al.*, 2003a; Lowery *et al.*, 2007).

A

Motiv	Motiv Score	Treffer Vordergrund	Größe Vordergrund	Treffer Hintergrund	Größe Hintergrund	n-fache Zunahme
	27,91	23	344	26	7049	18,13
	24,01	12	321	5	7023	52,51
	23,1	18	309	18	7018	22,71
	23,75	10	291	6	7000	40,09
	24,08	10	281	3	6994	82,97
	16	47	271	265	6991	4,58
	16	47	224	207	6726	6,82
	23,72	12	177	12	6519	36,83
	14,25	25	165	130	6507	7,58
	13,37	36	140	376	6377	4,36

B



C

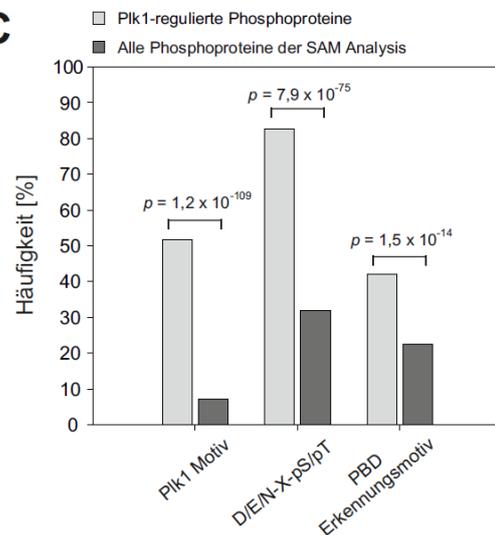


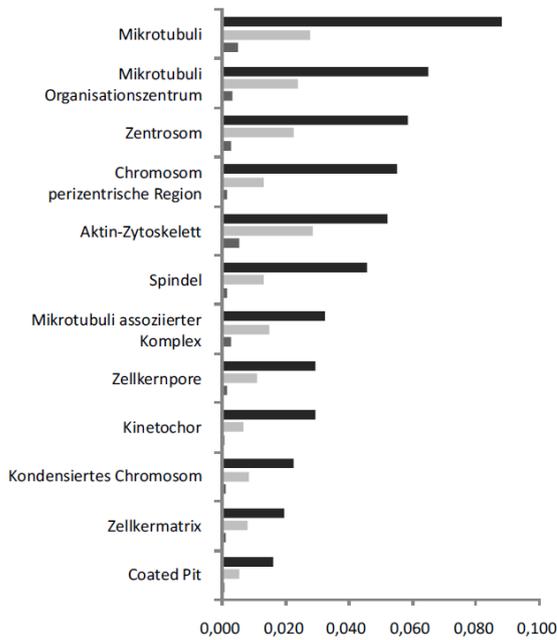
Abbildung 15: Anreicherung von Sequenzmotiven um Plk1-induzierte Phosphorylierungsstellen. **(A)** Analyse aller Plk1-induzierten Klasse I Serin-Phosphorylierungsstellen vor dem Hintergrund aller Serin-Phosphorylierungsstellen der SAM Analyse mit Motif-X (Schwartz und Gygi, 2005). Für die Analysen wurde der Sequenzbereich von sechs carboxyterminalen und sechs aminoterminalen Aminosäuren um die Serin-Phosphorylierungsstelle verwendet. Alle signifikanten Motive ($p < 0,001$) sind als Sequenz Logo Plots dargestellt und für jedes Motiv ist der jeweilige Motiv Score ($\sum -\log(p)$), die Anzahl der Treffer und die Größe von Vorder- und Hintergrund, sowie der Anreicherungsfaktor angegeben. Die extrahierten Motive repräsentieren 70% aller positiv regulierten Serin-Phosphorylierungsstellen und beinhalten Glu, Asp oder Asn in der Position -2 und/oder ein hydrophoben Leu oder Phe Rest in der +1 Position. Die extrahierten Motive stimmen somit sehr gut mit dem Plk1 Konsensusmotiv D/E/N-X-pS/pT-φ überein. **(B)** Logo Plot Darstellung der Häufigkeiten der Aminosäuren der ± 6 Positionen aller, durch 3-MB-PP1 Behandlung induzierten Phosphorylierungsereignisse in Plk1^{as} mit der Onlinesoftware WebLogo. **(C)** Häufigkeit des Plk1 Konsensusmotivs, des verkürzten Motivs D/E/N-X-pS/pT und des PBD Erkennungsmotivs S-pS/pT-P/X in der Gruppe der Plk1 regulierten Proteine im Vergleich zu allen Phosphoproteinen der SAM Analyse. Für alle Motive liegt eine starke Anreicherung innerhalb der identifizierten Plk1 Substrate vor.

Durch *gene ontology* (GO) Analyse wurde die bevorzugte zelluläre Lokalisation der regulierten Substrate untersucht (GO Kategorie Zelluläres Kompartiment; CC). Vor dem Hintergrund aller in Plk1^{as} Zellen identifizierten Proteine, bzw. der gesamten humanen IPI Datenbank konnten Plk1-regulierte Phosphoproteine stark überrepräsentiert an zellulären Strukturen wie dem Zentrosom, dem Kinetochor oder dem Spindelapparat festgestellt werden (siehe Abbildung 16A). Zudem waren Plk1 Substrate auch unter den Mitgliedern des Zellkernporenkomplexes prominent vertreten. Beachtenswerterweise konnten in dieser Studie 42% bis 74% aller in diesen mitotischen Kompartimenten annotierten Proteine als Phosphopeptide identifiziert werden, wobei für 7% bis 29% eine Regulation festgestellt wurde (siehe Abbildung 17A). Die Analyse der Phosphoproteine der vier CC Kategorien Zentrosom, Kinetochor, Spindelapparat und Zellkernporenkomplexe mit STRING resultierte in einem stark verwobenen Netzwerk mit zahlreichen Verbindungen zwischen und innerhalb der vier zellulären Strukturen, sowie einer Vielzahl durch Plk1 regulierter Komponenten (siehe Abbildung 18).

3 Ergebnisse

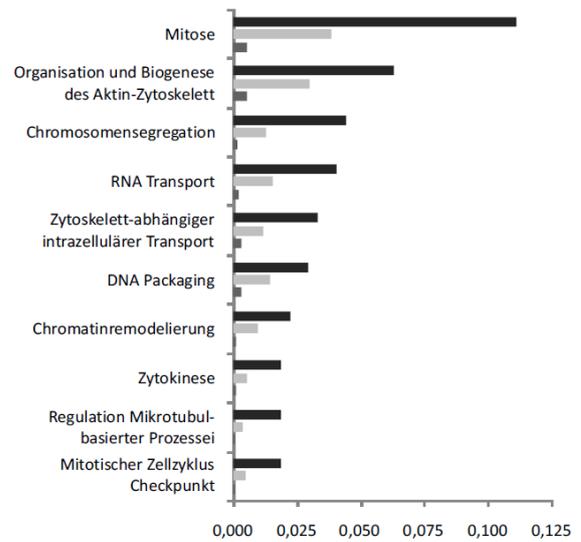
A

GO Zelluläre Kompartimente



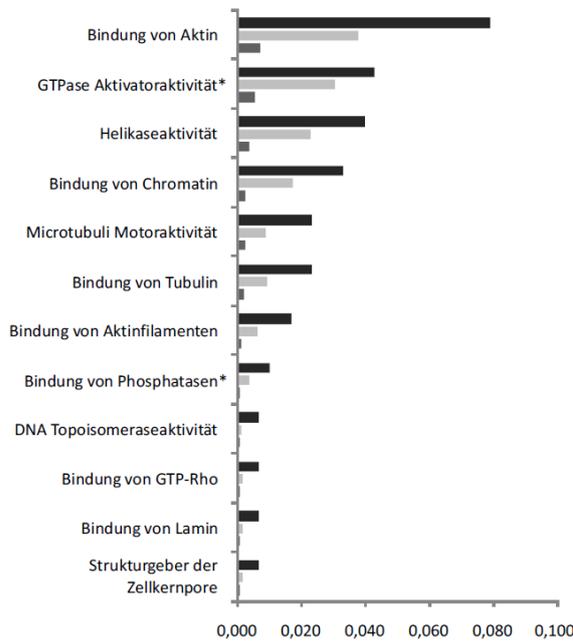
B

GO biologische Prozesse



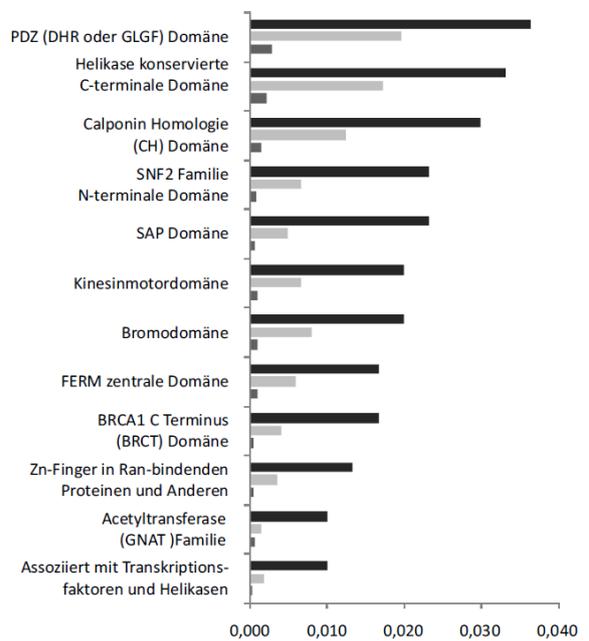
C

GO molekulare Funktionen



D

Pfam Proteindomänen



- Alle Plk1 regulierten Phosphoproteine des Terminus vs. alle regulierten Proteine der Kategorie
- Alle identifizierten Phosphoproteine (SAM Input) des Terminus vs. alle identifizierten Proteine der Kategorie
- Alle Proteine des Terminus vs. alle Proteine der Kategorie

Abbildung 16: Anreicherungsanalyse von Gene Ontology (GO) und Pfam Proteindomänen Termini in Plk1-regulierten Phosphoproteinen. Signifikant überrepräsentierte Termini wurden vor dem Hintergrund aller in Plk1^{as} Zellen (Eingabe der SAM Analyse) quantifizierten Proteine ($p < 0,05$), sowie aller Einträge der humanen IPI Datenbank ($p < 0,01$) ermittelt. Für die unterschiedlichen Kategorien sind für ausgewählte, überrepräsentierte Termini jeweils die Quotienten aus der Anzahl der regulierten, detektierten oder aller Proteine die dem jeweiligen GO/Pfam Terminus zugeordnet werden können und der Anzahl der regulierten, detektierten oder aller Proteine die irgendeinem GO Terminus der jeweiligen Kategorie (CC, BP, MF, Pfam) zugeordnet werden können, dargestellt. **(A)** GO zelluläre Kompartimente; **(B)** GO biologische Prozesse; **(C)** GO molekulare Funktionen; **(D)** Pfam Proteindomänen. *Termini die vor dem Hintergrund aller Einträge der humanen IPI Datenbank eine Signifikanz von $p < 0,01$ besitzen, jedoch vor dem Hintergrund aller in Plk1^{as} Zellen quantifizierten Proteine das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ nicht erreichen.

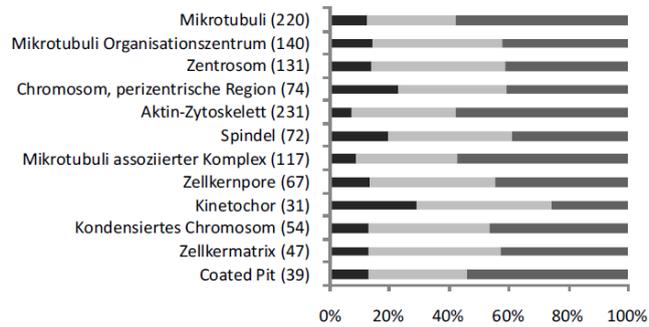
Die GO Analyse biologischer Prozesse (BP) brachte bekannte Plk1-gesteuerte Vorgänge wie die Chromosomensegregation, Mikrotubuliregulation und den mitotischen Zellzykluscheckpunkt hervor, deutete jedoch auch auf unbekannte Funktionen in der Chromatinmodellierung, sowie der Zytoskelettorganisation hin (siehe Abbildung 16B). Gleichmaßen machte die GO Analyse molekularer Funktionen (MF) unter den Plk1 Substraten bekannte Klassen wie Aktin- oder Tubulin-bindende Proteine aus, identifizierte jedoch auch Helikasen und DNA Topoisomerasen (siehe Abbildung 16C). Wie für die GO Kategorie CC zeigte sich für die Kategorien BP und MF, dass ein Großteil der in den verschiedenen Termini annotierten Proteine abgedeckt werden konnten (siehe Abbildung 17B, C).

Die in den GO Analysen identifizierten Funktionen spiegelten sich auch in der Analyse der unter den Plk1 Substratproteinen überdurchschnittlich häufig vertretenen Pfam Domänen wieder. Neben Signaltransduktions- und Zytoskelett-bindenden Domänen konnten für die Chromatinmodellierung wichtige Helikasedomänen und Acetyltransferasedomänen gefunden werden (siehe Abbildung 16D). Die Proteomabdeckung der Klassen bewegte sich im gleichen Rahmen wie im Fall der GO Analysen (siehe Abbildung 17D).

Abbildung 17: Proteomabdeckung der in Abbildung 16 ausgewählten, signifikant überrepräsentierten Termini der GO und Pfam Analyse. Angegeben ist die Gesamtzahl aller in diesen Termini annotierten Proteine (in Klammern), sowie der Prozentsatz der in Plk1^{as} Zellen identifizierten bzw. Plk1 regulierten Phosphoproteine dieser Studie an diesen Termini.

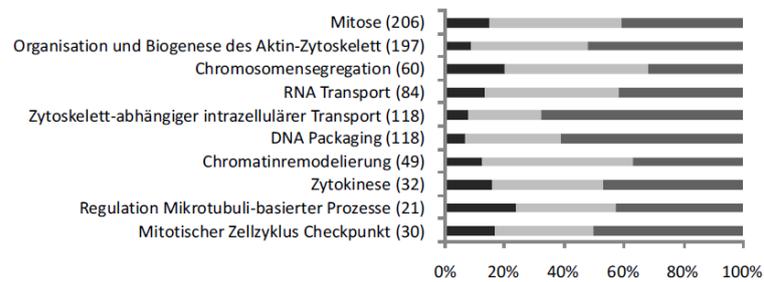
A

GO zelluläre Kompartimente



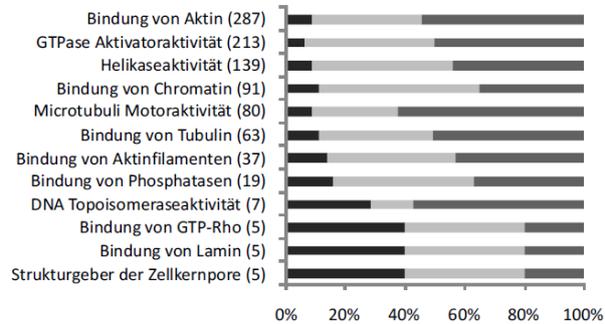
B

GO biologische Prozesse



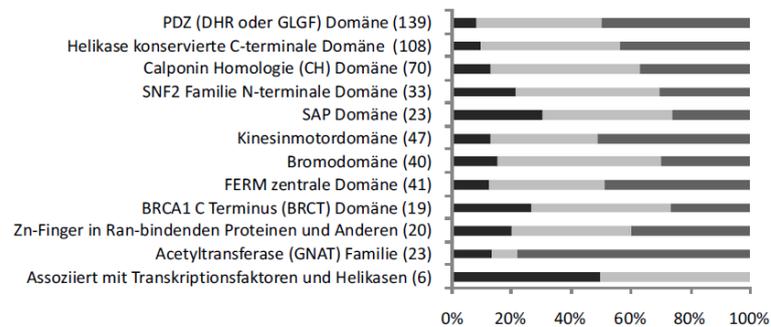
C

GO molekulare Funktionen



D

Pfam Proteindomänen



- Alle Plk1 regulierten Phosphoproteine des Terminus
- Alle identifizierten Phosphoproteine (SAM Input) des Terminus
- Alle Proteine des Terminus

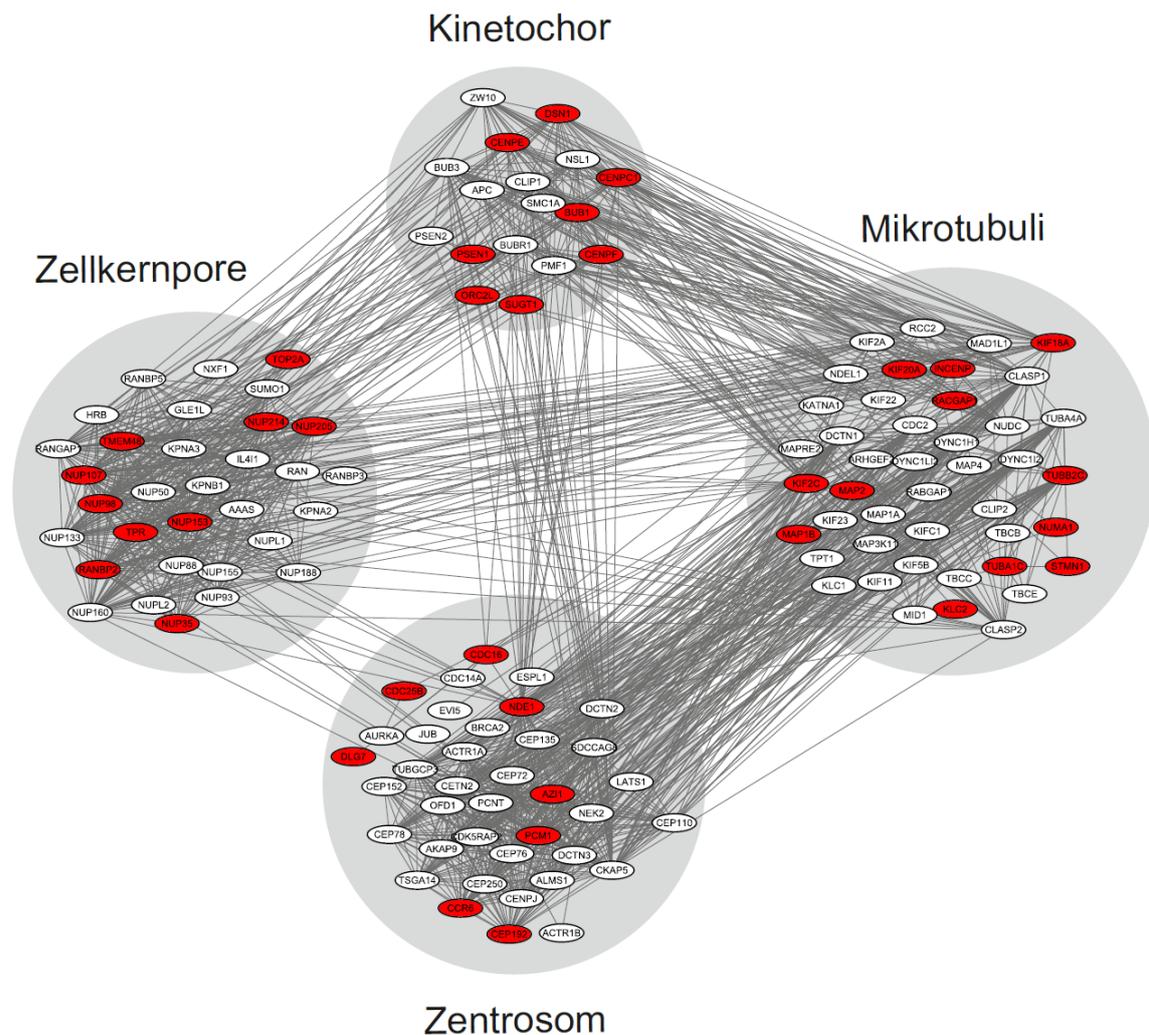


Abbildung 18: Plk1 Regulation von mitotischen Kompartimenten. Alle in Plk1^{AS} Zellen identifizierte Proteine die den Termini Kinetochor, Mikrotubuli, Zentrosom und Zellkernpore der GO Kategorie zelluläres Kompartiment zugeordnet werden konnten wurden mit STRING analysiert, um ein mitotisches Phosphoproteinnetzwerk auf der Basis bekannter funktioneller und physischer Interaktionen zu erstellen. Rote Knoten stellen Plk1 regulierte Phosphoproteine dar.

Bei der Betrachtung möglicher Plk1-regulierter Signaltransduktionswege konnte im mTOR *pathway* eine besonders ausgeprägte Regulation festgestellt werden (siehe Abbildung 19). Dabei zeigte sich abermals, dass ein Großteil der Proteine als Phosphoproteine identifiziert werden konnten.

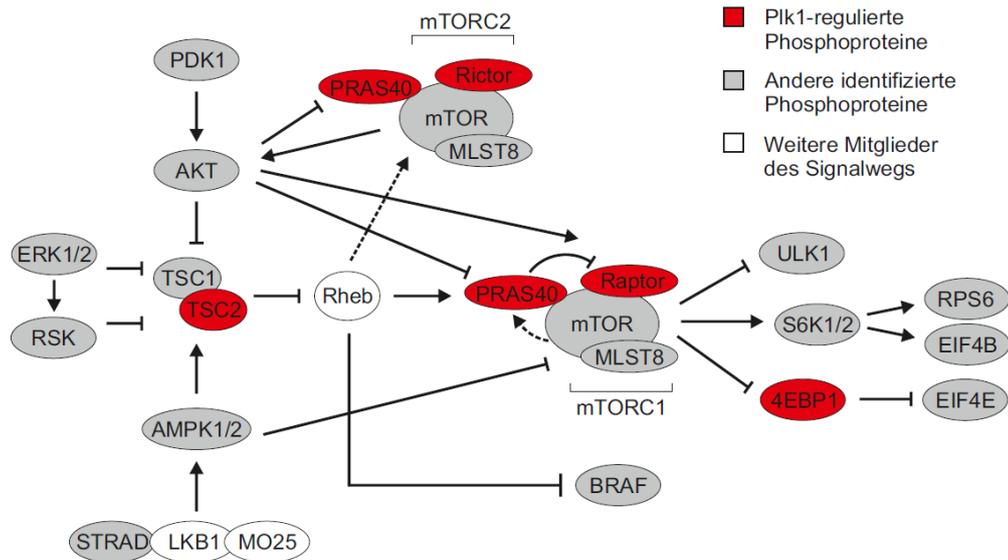


Abbildung 19: Plk1 Regulation der Komponenten des mTOR Signalwegs (aus *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)*). Plk1 regulierte Proteine sind rot gekennzeichnet, alle weiteren identifizierten Phosphoproteine sind grau gefärbt und die zusätzlichen Mitglieder des Signalwegs sind in weiß dargestellt. PRAS40 wurde aufgrund eines Literaturnachweises hinzugefügt (Sancak *et al.*, 2007).

3.2 MPS1 SUBSTRATIDENTIFIKATIONSSTUDIE

3.2.1 FESTLEGUNG DES INHIBITIONSSCHEMAS

Nachdem die Inhibition von Mps1 auch in der Gegenwart von Spindelgiften wie Nocodazol zu einer Überschreitung des Spindel-Checkpunkts führt, konnte das für Plk1 etablierte Inhibitionsschema nicht auf die Mps1 Studie übertragen werden. HTERT-RPE Mps1^{as} Zellen wurden deshalb nach dem für hTERT-RPE Zellen optimierten Protokoll (siehe 3.1.1) mit einer Zelldichte von 11.000 Zellen/cm² (entspricht 250.000 Zellen/6 cm Zellkulturschale) ausgesät, 12 h in Aphidicolin-haltigem Medium in der S-Phase vorsynchronisiert und anschließend 12 h in Nocodazol-haltigem Medium in der Mitose arretiert. Daraufhin wurde die Aktivität der analogsensitiven Mps1 durch Zugabe von 3-MB-PP1 in Gegenwart des Proteasominhibitors MG132 inhibiert, um während der zweistündigen Inkubation den Austritt der Zellen aus der Mitose zu verhindern. Das angepasste Inkubationsschema wurde mittels Durchflusszytometrie und Immunoblotting gegen BubR1 überprüft, welches auch durch Mps1 phosphoreguliert wird (persönliche Mitteilung P. Jallepalli). Knapp 60% der hTERT-RPE Mps1^{as} Zellen befanden sich nach dem

Ende der Synchronisationsbehandlung mit Aphidicolin und Nocodazol im mitotischen Arrest (siehe Abbildung 20A). Nach weiteren zwei Stunden in 3-MB-PP1 und MG132-haltigem Medium hatte sich der Anteil an mitotischen Zellen mit 65% nochmals leicht erhöht. Wurden die Zellen während der zweistündigen Inhibitorinkubation ohne MG132 kultiviert zeigte sich deutlich der erwartete Effekt der Mps1 Inhibition. Der Spindel-Checkpoint wurde übergangen und die Zellen traten aus der Mitose aus. Die Population der mitotischen Zellen nahm um knapp 15% ab, während sich der Anteil der Zellen in der G1- beziehungsweise in der S-Phase entsprechend erhöhte (siehe Abbildung 20A).

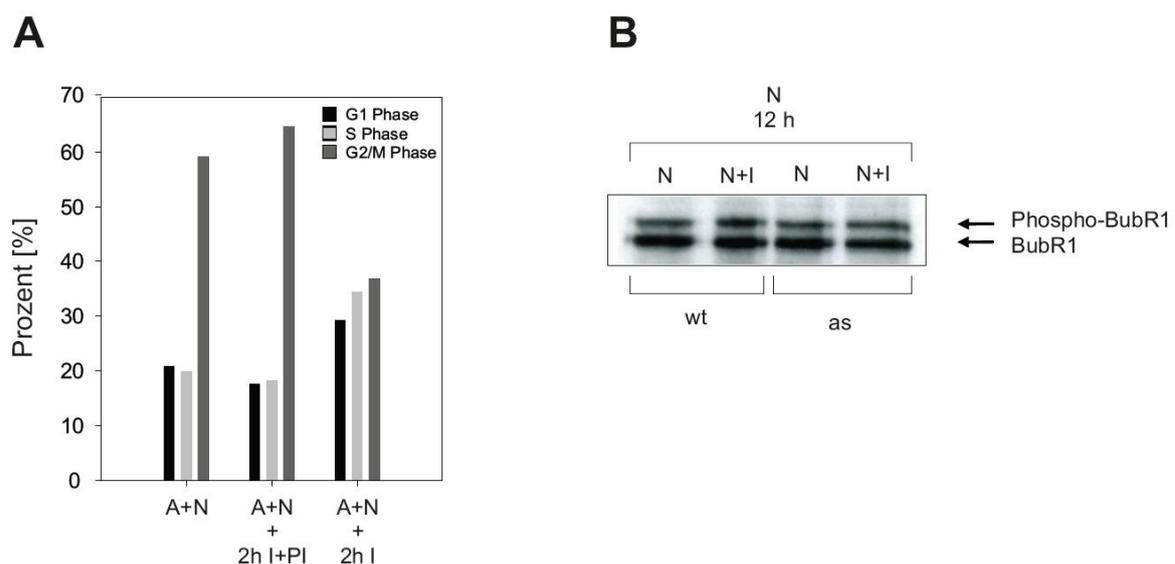


Abbildung 20: Synchronisation und Inhibitorbehandlung von hTERT-RPE-Mps1^{as} Zellen. **(A)** Histogrammdarstellung der Zellzyklusverteilung von hTERT-RPE-Mps1^{as} Zellen nach Inkubation mit Synchronisationsreagenzien, Inhibitoren und Analyse mit FACS. Die sequenzielle Inkubation mit Aphidicolin (A) und Nocodazol (N) führt zum mitotischen Arrest der Zellen. Wird während der zweistündigen Inhibitorbehandlung (I) der Proteasominhibitor (PI) MG132 zugesetzt kann der mitotische Arrest aufrecht erhalten werden. Wird MG132 nicht zugesetzt tritt ein Teil der Zellen aus der Mitose aus, die Populationen verschieben sich in Richtung G1 und S-Phase. **(B)** Zelluläre Inhibition der Mps1 Aktivität. hTERT-RPE Mps1^{as} und hTERT-RPE Mps1^{wt} Zellen wurden mit Aphidicolin vorsynchronisiert und dann durch 13-stündige Inkubation mit Nocodazol (N) in der Mitose arretiert. Die Zellen wurden weitere 2 h mit Nocodazol (N) oder Nocodazol und 10 µM 3-MB-PP1 (N+I) inkubiert und anschließend lysiert. Die Totalzelllysate wurde durch Immunoblot mit einem BubR1 spezifischem Antikörper analysiert. Die Intensität der langsamer wandernden Bande wird durch 3-MB-PP1 Inhibition in Mps1^{as} Zellen (zweite Spur von rechts) nicht schwächer. In Anbetracht des gewählten Behandlungsschemas lässt dies, wie auch schon im Fall der Plk1 Studie (vgl. Abbildung 8A), auf eine vergleichsweise ineffiziente Dephosphorylierung von BubR1 durch mitotische Phosphatasen schließen. Die Effektivität der Mps1 Inhibition konnte daher anhand dieses Substrates nicht überprüft werden.

Im Gegensatz dazu konnte die Inhibition der Mps1 durch Immunoblotting gegen BubR1 nicht erfolgreich nachgewiesen werden. Auch nach zweistündiger Inhibition mit 3-MB-PP1 war keine Schwächung der Intensität der oberen, phospho-BubR1 Bande festzustellen (siehe Abbildung 20B). Da für Mps1 noch kein weiteres bona fide Substrat bekannt war konnte die Effektivität der Inhibition nicht über Immunoblotting bestätigt werden. Nachdem jedoch die mitotische Inhibition von Mps1 zu einer deutlichen Verschiebung des Zellzyklusprofils nach G1 führte und es sich zudem bei dem getesteten Inhibitionsschema um ein für hTERT-RPE Mps1^{as} Zellen etabliertes Protokoll handelte (persönliche Mitteilung P. Jallepalli), wurde für die folgende massenspektrometrische Substratidentifikationsstudie das getestete Inhibitionsschema verwendet.

3.2.2 DURCHFÜHRUNG DES MASSENSPEKTROMETRIEEXPERIMENTS

Für die Identifikation direkter zellulärer Mps1 Substrate wurden analog zur Plk1 Studie vier SILAC Replikate mit alternierenden Markierungsschemata mit hTERT-RPE Mps1^{as}, sowie Mps1^{wt} Zellen durchgeführt. Die SILAC markierten Zelllinien wurden, wie im vorangegangenen beschrieben, durch Aphidicolin und Nocodazol in der Mitose arretiert. Daraufhin wurde in jeweils einer Population der mitotischen Zellen unter Aufrechterhaltung des Nocodazolarrests der Inhibitor 3-MB-PP1 zusammen mit dem Proteasominhibitor 3-MB-PP1 zugegeben, um in Mps1^{as} Zellen die Aktivität der analogsensitiven Kinase zu blockieren und um sicher zu stellen, dass die Zellen in der Mitose gehalten werden. Die Zellen wurden lysiert und die Inhibitor-behandelten Populationen der beiden Zelllinien mit den jeweiligen Unbehandelten vereinigt (siehe Abbildung 21). Die Proteine wurden tryptisch verdaut und die Peptide mit SCX Chromatographie in 12 SCX Fraktionen aufgetrennt (Villen und Gygi, 2008). Auch für die Mps1 Studie wurden die Phosphopeptide jeder Fraktion in Duplikaten durch IMAC angereichert und die Proben durch LC-MS auf einer LTQ-Orbitrap gemessen. Die daraus resultierenden 192 MS Dateien wurden kombiniert mit der MaxQuant Software Suite prozessiert, um Peptide und Proteine zu identifizieren, sowie Phosphorylierungsunterschiede zwischen den vereinigten Populationen zu quantifizieren (Cox und Mann, 2008).

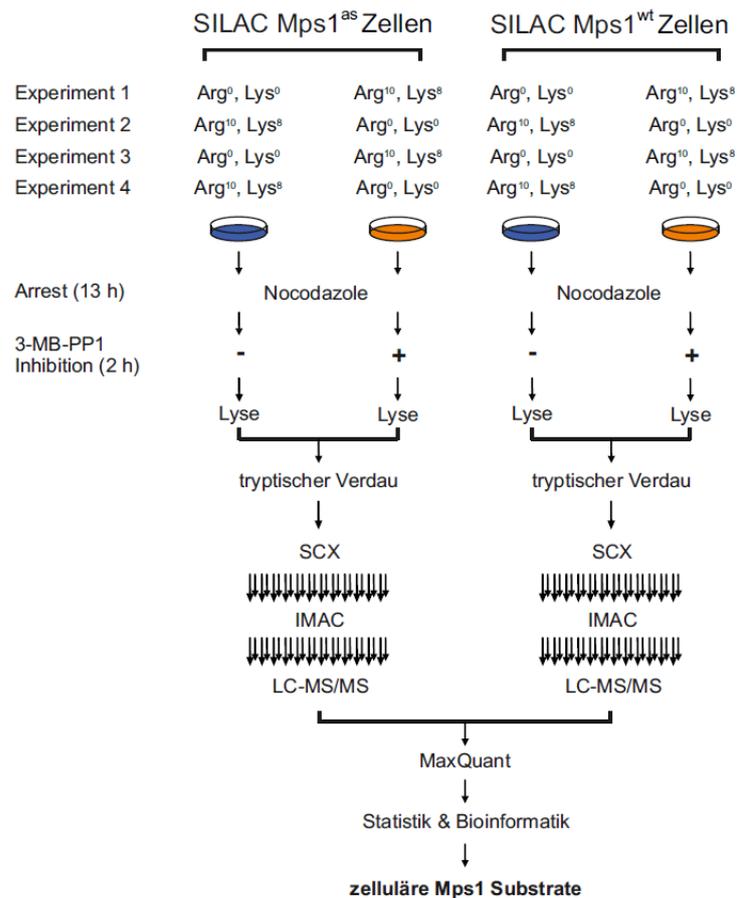


Abbildung 21: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus und der einzelnen Arbeitsschritte der Mps1 Studie. Nach Markierung durch SILAC wurden sowohl in hTERT-RPE Mps1^{as} als auch in hTERT-RPE Mps1^{wt} Zellen jeweils vier unabhängige biologische Experimente durchgeführt. In jedem Experiment wurde der Mps1^{as} Inhibitor 3-MB-PP1 zu einer der mitotisch arretierten Zellpopulation zugegeben, die Zellen anschließend lysiert und verdaut. Die Phosphopeptide wurden durch SCX Chromatographie in Kombination mit IMAC angereichert, mit LC-MS analysiert und die Daten mit der MaxQuant Software Suite analysiert.

3.2.3 MASSENSPEKTROMETRISCHE IDENTIFIKATIONEN

Insgesamt wurden in dieser zweiten Studie mit hTERT-RPE Zellen 4.897 verschiedene Phosphoproteine identifiziert, wobei für 27.035 unterschiedliche Phosphopeptide und 23.654 unterschiedliche Phosphorylierungsstellen der Einfluss der differentiellen Inhibitorbehandlung quantifiziert werden konnte (siehe Abbildung 22). Auch deuteten die Daten analog zur Plk1 Studie auf sehr ähnliche Phosphoproteome von Mps1^{as} und Mps1^{wt} Zellen hin, da die mittlere Übereinstimmung zweier beliebiger Experimente, unabhängig davon ob es sich um Daten aus Plk1 Wildtyp oder analogsensitiven Zelllinien handelte, sehr ähnlich war (siehe Abbildung 23A, B).

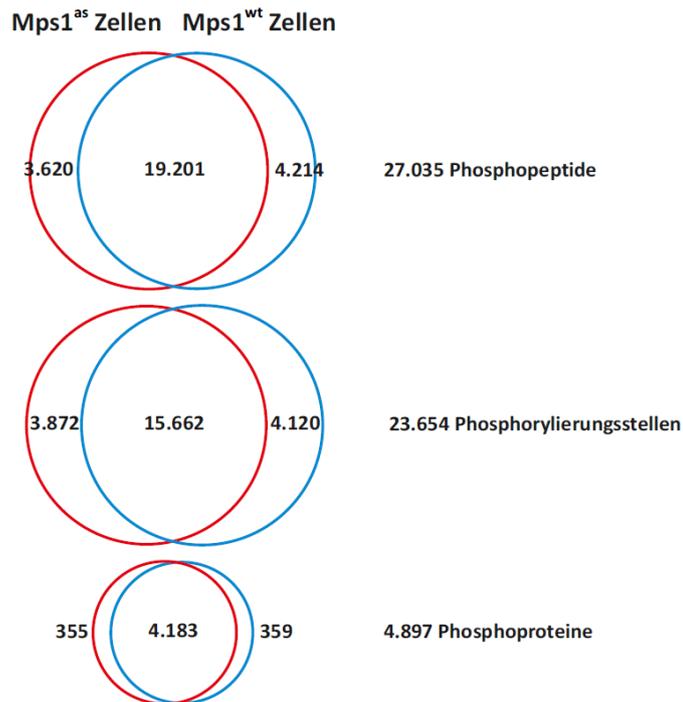


Abbildung 22: Venn Diagramme der *Mps1* Studie. Darstellung der Anzahl der gemeinsam, sowie jeweils ausschließlich in hTERT-RPE *Mps1^{as}* und hTERT-RPE *Mps1^{wt}* Zellen identifizierten Phosphopeptide, Phosphorylierungsstellen und Phosphoproteine.

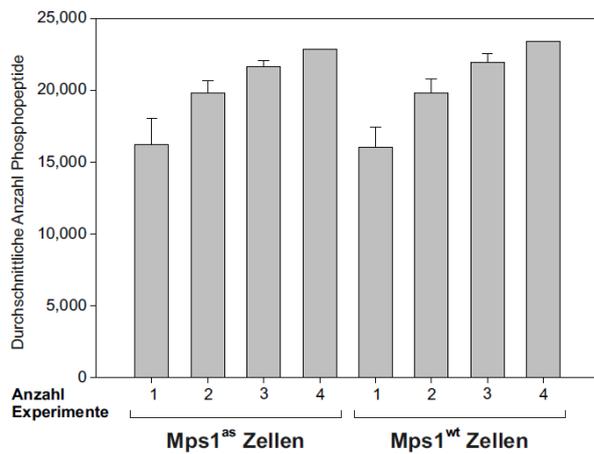
Die Durchführung von Replikaten steigerte die Anzahl der quantifizierten Phosphopeptide von durchschnittlich über 16.000 pro Einzelexperiment auf circa 23.000 für alle vier Experimente in *Mps1^{as}* wie auch in *Mps1^{wt}* Zellen (siehe Abbildung 24A).

In den Einzelexperimenten wurden zwischen 13.000 und über 18.000 Phosphopeptid SILAC Ratios automatisch quantifiziert. Betrachtet man all diejenigen Phosphopeptide, die durch Inhibition von *Mps1* eine mindestens 2-fache Veränderung ihres Ratios erfahren, zeigt sich ein relativ geringer Unterschied zwischen den beiden Zellgruppen. Durchschnittlich sind in *Mps1^{as}* Zellen über 300 Phosphopeptide reguliert, in *Mps1^{wt}* Zellen ist dies für jeweils über 200 Phosphopeptide der Fall (siehe Abbildung 24C).

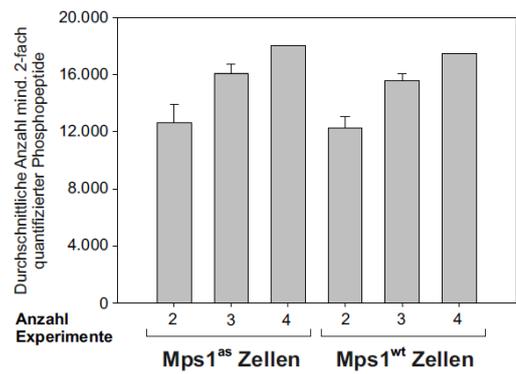
Der paarweise Vergleich aller *Mps1^{as}* beziehungsweise *Mps1^{wt}* Experimente deutete auf einen hohen Anteil falsch-positiver Identifikationen hin. In beiden Zelllinien war eine deutlich geringere Zahl der Phosphopeptide reproduzierbar reguliert als bei der Betrachtung der Einzelexperimente. In den Überschneidungen der *Mps1^{as}* Experimente wiesen nur noch jeweils zwischen 37 und 82 Phosphopeptide eine konsistente Regulation auf, in denen der *Mps1^{wt}* Experimente konnten nach wie vor zwischen 10 und 28 reproduzierbar regulierte Phosphopeptide detektiert werden (siehe Abbildung 24B).

3 Ergebnisse

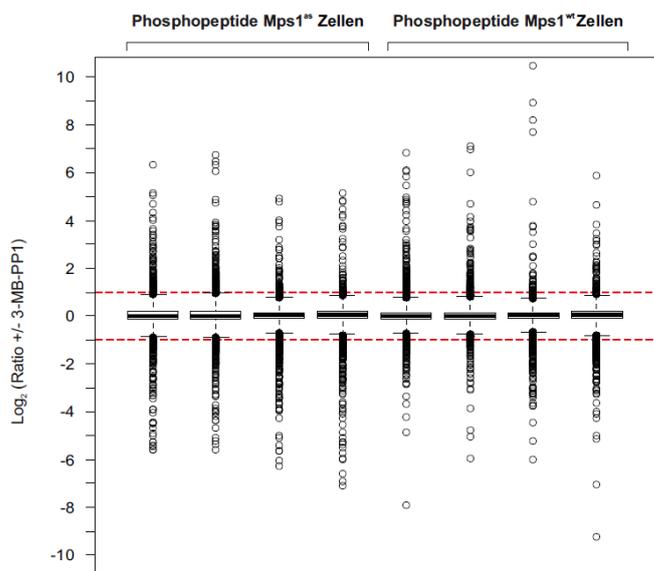
A



C



B



Experiment	as1	as2	as3	as4	wt1	wt2	wt3	wt4
Anzahl quantifiziert	17.266	18.210	16.078	13.267	18.088	15.205	16.428	14.479
> 2-fach	293	423	279	226	248	202	173	241
> 2-fach in beiden		as2: 82	as3: 53	as4: 37	wt1: 28	wt2: 10	wt3: 20	
quantifiziert in beiden		as2: 14.675	as3: 13.326	as4: 11.432	wt1: 12.980	wt2: 13.532	wt3: 11.739	
		as2: 13.399	as3: 12.040		wt2: 12.623	wt3: 11.367		
			as3: 10.872		wt3: 11.435			

D

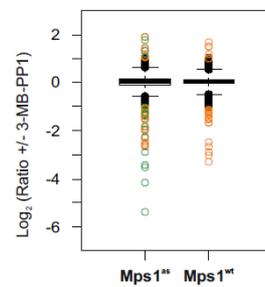


Abbildung 24: Phosphopeptididentifikationen der Mps1 Studie. **(A)** Auswirkung von biologischen Replikatanalysen auf die Proteomabdeckung. Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl quantifizierter Phosphopeptide aus einem, zwei oder drei Replikatexperimenten, sowie die Gesamtzahl aus allen vier Mps1^{as} bzw. Mps1^{wt} Experimenten. **(B)** Ratioverteilung und Reproduzierbarkeit zwischen den Replikatexperimenten. Darstellung der Verteilung der Phosphopeptidratis aller individuellen Mps1^{as} und Mps1^{wt} Experimente im Boxplot. Für jedes Experiment ist die Anzahl aller quantifizierten Phosphopeptide, sowie die Anzahl der um mehr als 2-fach regulierten Phosphopeptide nach Auswaschen des Inhibitors 3-MB-PP1 angegeben. Im unteren Teil der Abbildung ist für alle paarweisen Vergleiche von Mps1^{as} bzw. Mps1^{wt} Experimenten, die Anzahl der Phosphopeptide angegeben, die in die gleiche Richtung (positiv oder negativ) um mehr als 2-fach regulierten ist. Des Weiteren ist jeweils die Anzahl der in beiden Experimenten detektierten Phosphopeptide angegeben. **(C)** Anzahl der in mindestens zwei unabhängigen Experimenten quantifizierten Phosphopeptide für zwei, drei oder vier Replikatanalysen mit Mps1^{as} oder Mps1^{wt} Zellen. Die Zahlen für zwei bzw. drei Replikatanalysen sind die Durchschnittswerte aller möglichen Zweier- bzw. Dreiergruppen aus den insgesamt vier durchgeführten Experimenten. **(D)** Darstellung der Verteilung aller konsistent quantifizierten Phosphopeptidratis für Mps1^{as} und Mps1^{wt} Zellen im Boxplot. Die gestrichelten orangen Linien zeigen den Schwellenwert der 2-fachen Positiv- bzw. Negativregulation an. Die grünen Kreise stellen die 21 Phosphopeptide dar, die im Vergleich zum respektiven Ratio aus Mps1^{wt} Zellen mehr als 2-fach in Mps1^{as} Zellen reguliert waren. Die orangen Kreise verweisen auf die 21 Phosphopeptide die eine konsistente, größer 2-fache Regulation sowohl in Mps1^{as} als auch in Mps1^{wt} Zellen aufweisen.

Insgesamt konnten in allen acht Experimenten knapp 14.000 verschiedene Phosphopeptide mindestens zweimal sowohl in Mps1^{as} als auch in Mps1^{wt} Zellen konsistent quantifiziert werden (siehe Abbildung 24C und Tabelle A5). Durch Inhibition von Mps1 wurden 21 Phosphopeptide gefunden, die im Vergleich zum respektiven Ratio aus Mps1^{wt} Zellen mehr als 2-fach in Mps1^{as} Zellen reguliert waren. Zudem wurde für weitere 21 Phosphopeptide eine konsistente Regulation sowohl in Mps1^{as} als auch in Mps1^{wt} Zellen festgestellt. Unter diesen, unabhängig von Mps1^{as} regulierten Peptiden befinden sich neben Phosphopeptiden der bereits in der Plk1 Studie als *off-target* Effekt identifizierten CK1δ auch Peptide der Caseinkinase 1ε. Grund für die im Vergleich zur Plk1 Studie deutlich höhere Zahl an *off-target* Effekten könnte sowohl die doppelt so hoch eingesetzte Inhibitorkonzentration sein, als auch das veränderte Behandlungsschema (2-stündige Inhibitorinkubation mit Zusatz des Proteasominhibitors MG132 statt 30-minütiges Auswaschen des Inhibitors). Tabelle 3 listet die Peptide aller von der analogsensitiven Kinaseaktivität unabhängigen 3-MB-PP1 beeinflussten Proteine.

Tabelle 3: 3-MB-PP1 induzierte *off-target* Effekte der Mps1 Studie. In Mps1^{as} und Mps1^{wt} Zellen regulierte Phosphopeptide.

Protein Names	Kurzbezeichnung	Sequenz des Phosphopeptids	Anzahl an Phosphorylierungsstellen	Häufigkeit der Detektion in		CV in Mps1 ^{as} Zellen	Häufigkeit der Detektion in		Ratio +/- 3-MB-PP1 Mps1 ^{wt} Zellen
				Mps1 ^{as} Zellen	Mps1 ^{wt} Zellen		Mps1 ^{as} Zellen	Mps1 ^{wt} Zellen	
B-cell CLL/lymphoma 9-like protein	BCL9L	SVSVDSGEQREAGTPSLIDSEAK	1	4	0.28	0.45	4	0.41	
Casein kinase I isoform delta	CK1δ	GLPSTASGRLR	1	2	0.04	0.16	3	0.16	
Casein kinase I isoform delta	CK1δ	GLPSTASGRLR	2	4	0.13	0.16	3	0.13	
Casein kinase I isoform delta	CK1δ	LRGTQEVAPPTLPTTSHTANTSPRPVSGMER	2	4	0.15	2.71	4	2.82	
Casein kinase I isoform epsilon	CK1ε	IQPAGNTSPRAISR	2	2	0.24	2.67	2	2.79	
Catenin alpha-1	CTNNA1	SRTSVQTEDDQLIAGQSAR	2	4	0.07	0.28	4	0.31	
Catenin alpha-1	CTNNA1	SRTSVQTEDDQLIAGQSAR	3	2	0.19	0.20	2	0.12	
Catenin alpha-1	CTNNA1	TPEELDDDFETEDFVRSRTSVQTEDDQLIAGQS	4	3	0.08	0.18	4	0.18	
CLIP1 protein	CLIP1	ASSTPSSETQEEFVDDFRVGER	2	3	0.22	0.25	4	0.35	
Cytospin-A	CYTA	TPAAAASVPMQRHSISGPISTSK	1	4	0.19	0.43	2	0.34	
Dedicator of cytokinesis protein 5	DOCK5	LSPFHGSSPPQSTPLSPPLTPK	4	2	0.29	2.15	3	2.02	
Fos-related antigen 2	FRA2	RSSSSGDQSSDSLNSPTLLAL	1	4	0.09	0.38	4	0.43	
Histone acetyltransferase MYST2	MYST2	LSQSSQDSSPVR	1	3	0.27	2.08	2	2.28	
MAP7 domain-containing protein 1	MAP7D1	RSSQSPPTAVPASDSPPTK	1	4	0.20	0.49	3	0.45	
Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4	MAST4	SAGNIPLPLAR	1	4	0.11	0.41	4	0.35	
PH-interacting protein	PHIP	AQSYDIQAWKK	1	2	0.15	0.25	2	0.40	
Protein FAM199X	FAM199X	AHSDSNLSASAAER	2	3	0.17	0.16	3	0.10	
Pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1	PDXDC1	GSDALSETSSVSHIEDLEK	3	4	0.04	0.34	4	0.31	
Radiation-inducible immediate-early gene IEX-1	IEX-1	RSGGPEIFTDPLPEPAAAAPAGRPSASR	1	4	0.19	0.47	4	0.44	
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	SSRSSPELTRK	1	2	0.07	3.73	3	3.21	
Tripartite motif-containing protein 3	TRIM3	RPSSMYSTGGK	2	4	0.11	0.34	2	0.38	

3.2.4 STATISTISCHE ANALYSE MIT SAM

Die in der Plk1 Studie validierte statistische Analyse der Daten mit SAM wurde auch für die stringente Detektion der differentiellen Regulation von Mps1^{as} versus Mps1^{wt} Zellen eingesetzt. Alle Ratios der Phosphopeptide und Phosphorylierungsstellen des Mps1 Datensatzes, die in mindestens zwei Mps1^{as} Experimenten wie auch in zwei Mps1^{wt} Experimenten quantifiziert wurden, wurden mit SAM analysiert (siehe Abbildung 25).

Tabelle 4 und Tabelle 5 listen die Anzahl der von SAM ausgegebenen signifikant regulierten Phosphopeptide beziehungsweise Phosphorylierungsstellen mit der jeweils korrespondierenden FDR für verschiedene Δ Parameter, sowie die analog zur Plk1 Studie (siehe 3.1.6) experimentell ermittelten Fehlerwahrscheinlichkeiten.

Abbildung 25: Identifikation von Mps1-abhängigen Phosphorylierungsänderungen durch SAM. **(A)** Matrix der Anzahl an Phosphopeptiden und **(B)** Matrix der Anzahl an Phosphorylierungsstellen die in x biologischen Replikaten in Plk1^{wt} Zellen und in y biologischen Replikaten in Plk1^{as} Zellen quantifiziert wurden ($x, y = 0,1,2,3,4$). Dargestellt sind die Zahlen aller möglichen Kombinationen zwischen den Replikaten. Für alle weiteren Analysen (inklusive der SAM Analysen) wurden nur die Phosphopeptide bzw. Phosphorylierungsstellen berücksichtigt, die in mindestens zwei Replikaten in beiden Zelllinien quantifiziert wurden (orange Rahmen). Der mittlere Teil der Abbildung zeigt die von SAM ausgegebenen Deltagraphen der differentiellen Analyse von **(C)** Phosphopeptidratios und **(D)** Phosphorylierungsstellenratios der Mps1^{as} und Mps1^{wt} Experimente. Unterscheiden sich die Populationen nicht voneinander stimmen die Werte der beobachteten und erwarteten relativen Differenz überein (durchgezogene Linie). Die realen Werte weichen jedoch mit einer Differenz Δ voneinander ab, die Populationen unterscheiden sich. Die gestrichelten Linien deuten den Δ -Wert an über den hinaus **(C)** die Phosphopeptide ($\Delta = 2,363$) und **(D)** die Phosphorylierungsstellen ($\Delta = 2,136$) mit einer FDR von 0% als signifikant positiv (rote Kreise) oder negativ (blaue Kreise) reguliert identifiziert wurden. Der untere Teil der Abbildung zeigt die Auftragung der in Mps1^{as} Experimenten signifikant regulierten +/- 3-MB-PP1 Ratios der **(E)** Phosphopeptide und **(F)** Phosphorylierungsstellen gegen die entsprechenden in Mps1^{wt} Experimenten detektierten Ratios. Rot: signifikant und >2-fach positiv regulierte Ratios; blau: signifikant und >2-fach negativ regulierte Ratios; grau: signifikant, jedoch <2-fach regulierte Ratios; grau ausgefüllt: stärkere, jedoch <2-fache Regulation des Ratios in Plk1^{wt} Experimenten im Vergleich zum Ratio in Plk1^{as} Experimenten.

3 Ergebnisse

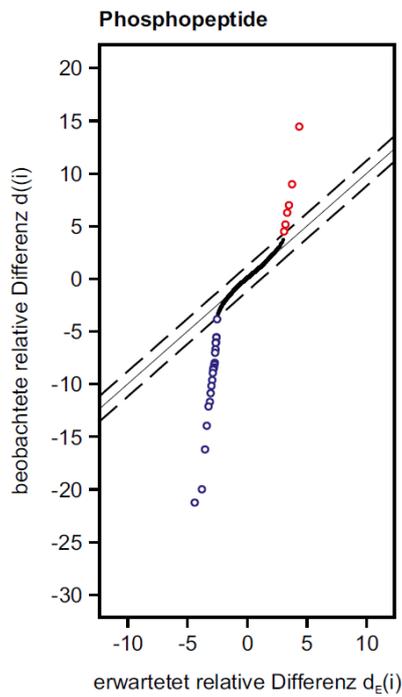
A

Anzahl Experimente - quantifizierte Phosphopeptide in Mps1 ^{wt} Zellen	Anzahl Experimente - quantifizierte Phosphopeptide in Mps1 ^{wt} Zellen				
	0	1	2	3	4
0	-	2.789	940	370	115
1	2.163	1.235	738	470	187
2	911	981	799	724	413
3	421	597	851	1.163	1.396
4	125	302	526	1.313	7.506

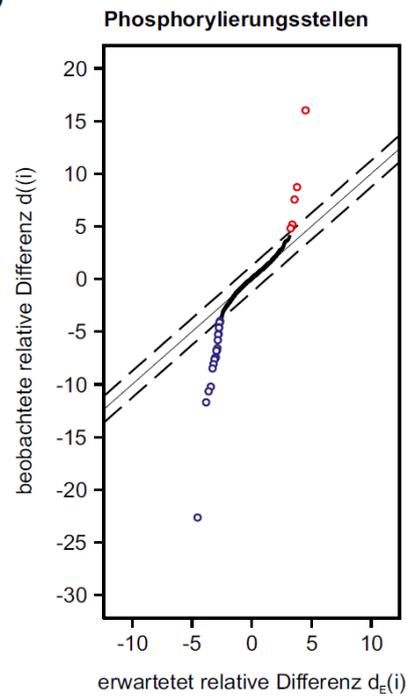
B

Anzahl Experimente - quantifizierte Phosphorylierungsstellen in Mps1 ^{wt} Zellen	Anzahl Experimente - quantifizierte Phosphorylierungsstellen in Mps1 ^{wt} Zellen				
	0	1	2	3	4
0	-	2.999	819	241	61
1	2.655	1.481	759	399	149
2	844	899	768	594	354
3	299	441	737	925	1.049
4	74	194	392	1.032	5.489

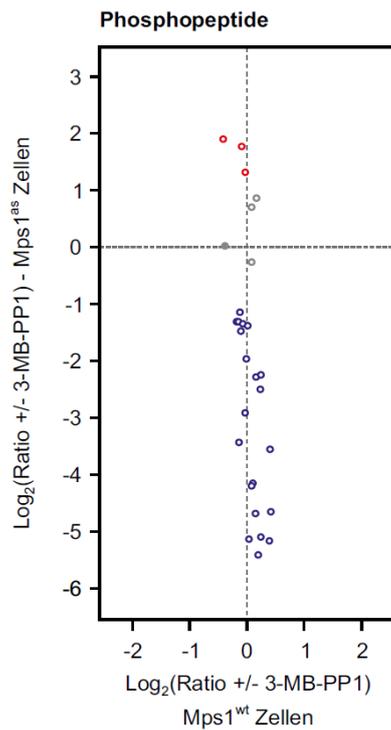
C



D



E



F

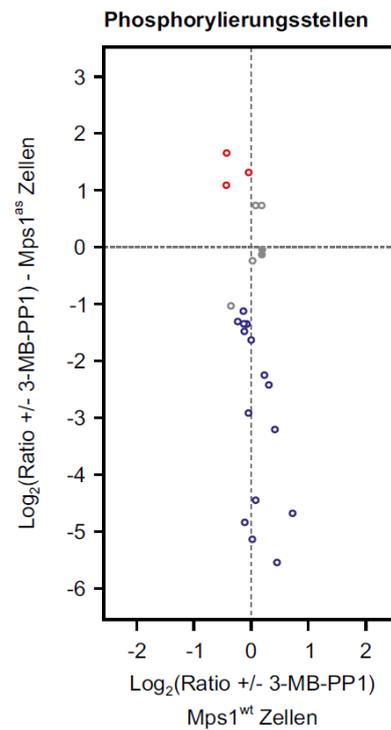


Tabelle 4: Vergleich der Ergebnisse der SAM Analyse der Phosphopeptide der Mps1 Studie mit den experimentellen Daten.

Δ	SAM Resultate der differentiellen Phosphoregulation						Experimentelle Daten der Mps1 ^{as} und Mps1 ^{wt} Zellen					
	Anzahl der signifikant Positiven	Anzahl der falsch Positiven	Anzahl der > 2-fach regulierten, signifikant Positiven	Anzahl der > 2-fach regulierten, falsch Positiven	FDR (SAM)	Anzahl reguliert in Mps1 ^{as} Zellen	Anzahl reguliert in Mps1 ^{wt} Zellen	FDR (experimentell)	Anzahl der > 2-fach regulierten, signifikant Positiven	Anzahl der > 2-fach regulierten, falsch Positiven	FDR (> 2-fach Regulation, experimentell)	
0	8493	7949	58	54	93.6%	5339	3154	59.1%	50	8	16.0%	
0.102	630	471	28	21	74.8%	407	223	54.8%	25	3	12.0%	
0.203	242	128	25	13	52.9%	171	71	41.5%	25	0	0.0%	
0.304	136	50	25	9	36.8%	108	28	25.9%	25	0	0.0%	
0.405	83	19	24	5	22.9%	66	17	25.8%	24	0	0.0%	
0.506	70	13	24	4	18.6%	59	11	18.6%	24	0	0.0%	
0.608	50	6	24	3	12.0%	45	5	11.1%	24	0	0.0%	
0.692	46	4	24	2	8.7%	43	3	7.0%	24	0	0.0%	
0.776	37	2	24	1	5.4%	34	3	8.8%	24	0	0.0%	
0.911	32	1	24	1	3.1%	29	3	10.3%	24	0	0.0%	
1.198	28	0	24	0	0.0%	27	1	3.7%	24	0	0.0%	

Tabelle 5: Vergleich der Ergebnisse der SAM Analyse der Phosphorylierungsstellen der Mps1 Studie mit den experimentellen Daten.

Δ	SAM Resultate der differentiellen Phosphoregulation						Experimentelle Daten der Mps1 ^{as} und Mps1 ^{wt} Zellen					
	Anzahl der signifikant Positiven	Anzahl der falsch Positiven	Anzahl der > 2-fach regulierten, signifikant Positiven	Anzahl der > 2-fach regulierten, falsch Positiven	FDR (SAM)	Anzahl reguliert in Mps1 ^{as} Zellen	Anzahl reguliert in Mps1 ^{wt} Zellen	FDR (experimentell)	Anzahl der > 2-fach regulierten, signifikant Positiven	Anzahl der > 2-fach regulierten, falsch Positiven	FDR (> 2-fach Regulation, experimentell)	
0	6600	6113	50	46	92.6%	4060	2540	62.6%	41	9	22.0%	
0.091	662	533	30	24	80.4%	450	212	47.1%	24	6	25.0%	
0.199	355	206	26	15	58.0%	240	115	47.9%	24	2	8.3%	
0.308	236	103	22	10	43.7%	163	73	44.8%	22	0	0.0%	
0.399	149	48	22	7	32.1%	108	41	38.0%	22	0	0.0%	
0.507	82	17	21	4	20.7%	63	19	30.2%	21	0	0.0%	
0.598	66	10	21	3	15.9%	52	14	26.9%	21	0	0.0%	
0.707	53	6	20	2	12.2%	41	12	29.3%	20	0	0.0%	
0.797	39	3	20	2	7.7%	36	3	8.3%	20	0	0.0%	
0.888	37	2	20	1	5.4%	34	3	8.8%	20	0	0.0%	
1.033	34	1	20	1	2.9%	31	3	9.7%	20	0	0.0%	
1.105	30	1	20	1	3.3%	28	2	7.1%	20	0	0.0%	
1.214	27	1	20	1	3.7%	25	2	8.0%	20	0	0.0%	
1.268	25	0	19	0	0.0%	23	2	8.7%	19	0	0.0%	

SAM gibt in der Analyse der Phosphopeptide bei einem Δ Werte von 1,198, der einer FDR von 0% entspricht ein signifikant reguliertes Peptid aus, bei dem das in Plk1^{wt} Experimenten ermittelte Ratio im Vergleich zum Ratio in Plk1^{as} Experimenten stärker reguliert ist (1,3-fach; grau ausgefüllter Kreis in Abbildung 25E und Tabelle 4). Bei der Analyse der Phosphorylierungsstellen sind bei einem Δ Wert von 1,268 (FDR = 0%) zwei Ratios unter den Ergebnissen, die in Plk1^{wt} Experimenten im Vergleich zum Ratio in Plk1^{as} Experimenten stärker reguliert sind (1,1 und 1,05-fach; grau ausgefüllte Kreise in Abbildung 25F und Tabelle 5). Um sämtliche Mps1^{as}-unabhängige 3-MB-PP1 bedingte Nebeneffekte auszuschließen, wurde daraufhin für die Beurteilung der Signifikanz der Ratios zusätzlich das in SAM einstellbare Kriterium der mindestens 2-fachen Regulation angewendet. Damit enthielten die resultierenden 24 Phosphopeptide und 19 Phosphorylierungsstellen sowohl nach SAM-Statistik, wie auch nach experimenteller Berechnung keine falsch positiven Regulationen mehr (siehe Abbildung 25, Tabelle 4 und Tabelle 5).

3.2.5 ANALYSE DER MPS1 REGULIERTEN PHOSPHOPEPTIDE UND PHOSPHORYLIERUNGSTELLEN

Wie aufgrund des Versuchsaufbaus zu erwarten war, handelte es sich bei den meisten signifikanten Veränderungen um Phosphorylierungsabnahmen, die maximal 40-fach reguliert waren (siehe Abbildung 25E, F). Nur drei Peptide bzw. Phosphorylierungsstellen eines einzigen Enzyms, der *E3 ubiquitin-protein ligase* Huwe1 wurden durch Mps1 Inhibition induziert. In Tabelle 6 und Tabelle 7 sind alle regulierten Peptidsequenzen und Phosphorylierungsstellen der insgesamt 12 Mps1-regulierten Proteine mit den zugehörigen SILAC Ratios aufgelistet. Bei Betrachtung der Aminosäureumgebung der 19 signifikant regulierten Phosphorylierungsstellen (siehe Abbildung 26) zeigt sich, dass mit Glutaminsäure, Asparaginsäure und Asparagin in der Position -2 drei Aminosäuren mit polaren Resten häufig vertreten waren. In der Position -1 treten die Aminosäuren Leucin (aliphatischer Rest), Lysin (positiver Rest) und Asparagin (polarer Rest) gehäuft auf. Auffallend ist ebenfalls die deutliche Präsenz von Leucin und Asparagin in der Position +5. Aufgrund der geringen Zahl an eingegangenen Sequenzen lässt sich jedoch kein signifikantes Phosphorylierungsmotiv für Mps1 ableiten.

Tabelle 6: Mps1 regulierte Phosphopeptide.

Name des Proteins	Kurzbezeichnung	Sequenz des Phosphopeptids	Anzahl an Phosphorylierungsstellen	Häufigkeit der Detektion in Mps1 ^{as} Zellen	Ratio +/- 3-MB-PP1 Mps1 ^{as} Zellen	Häufigkeit der Detektion in Mps1 ^{wt} Zellen	Ratio +/- 3-MB-PP1 Mps1 ^{wt} Zellen
Centromere protein E	CENP-E	LALSPISLGGK	2	4	0.45	4	0.92
Centromere protein F	CENP-F	SLSPHPVPR	2	2	0.09	4	0.91
Dual specificity protein kinase TTK	TTK; MPS1	DLVVPGSKPSGNDSCCLR	1	4	0.04	4	1.33
Dual specificity protein kinase TTK	TTK; MPS1	FKNEDLTDELSLNK	1	4	0.06	4	1.07
Dual specificity protein kinase TTK	TTK; MPS1	FKNEDLTDELSLNK	2	4	0.03	4	1.18
Dual specificity protein kinase TTK	TTK; MPS1	ISADTTDMSGTVNQIMMMANNPEDWLSLLLK	2	4	0.04	4	1.11
Dual specificity protein kinase TTK	TTK; MPS1	NEDLTDELSLNK	1	4	0.05	4	1.06
Dual specificity protein kinase TTK	TTK; MPS1	NEDLTDELSLNK	2	4	0.02	4	1.15
Dual specificity protein kinase TTK	TTK; MPS1	NKTESSLLAK	1	4	0.08	2	1.32
Dual specificity protein kinase TTK	TTK; MPS1	NKTESSLLAK	2	4	0.03	4	1.31
Dual specificity protein kinase TTK	TTK; MPS1	NSVPLSDALLNK	1	4	0.03	3	1.02
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	GNDTPLALESTNTEK	1	4	2.47	4	0.98
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	LGSSGLGSASSIQAAYR	1	4	3.38	2	0.94
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	LGSSGLGSASSIQAAYR	2	4	3.69	4	0.75
F-actin binding protein Nexilin	NEXN	EMLASDDEEDVSSKVEK	2	2	0.20	3	1.12
Histone H2A type 2-C	HIST2H2AC	VTTAQQGVLPNIQAVLLPKKTESHK	2	3	0.39	4	0.95
Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	SLMSSPEDLTK	3	4	0.18	4	1.18
Mitotic checkpoint serine/threonine protein kinase BUB1 beta	BUBR1	LELTNETSENPTQSPWCQYRR	1	4	0.25	2	0.99
Protein CASC5	CASC5	SANSVLLIK	1	4	0.36	4	0.93
Protein CASC5	CASC5	SANSVLLIK	2	4	0.21	2	1.18
Spindle and kine tochore-associated protein 3	SKA3	ALDGEESDFEDYPMR	1	2	0.13	2	0.98
Spindly, Coiled-coil domain-containing protein 99	CCDC99	LIGVPADAEALSERSGNTSPR	2	4	0.40	4	0.90
Spindly, Coiled-coil domain-containing protein 99	CCDC99	LIGVPADAEALSERSGNTSPRLAAESK	2	4	0.38	3	1.01
Spindly, Coiled-coil domain-containing protein 99	CCDC99	SGNTSPRLAAESK	2	4	0.40	4	0.88

Tabelle 7: Mps1 regulierte Phosphorylierungsstellen.

Name des Proteins	Kurz- bezeichnung	Phosphory- lierungsstelle	Sequenzfenster	Häufigkeit der Detektion in Mps1 ^{as} Zellen	Ratio +/- 3-MB-PP1 Mps1 ^{as} Zellen	Häufigkeit der Detektion in Mps1 ^{wt} Zellen	Ratio +/- 3-MB-PP1 Mps1 ^{wt} Zellen
Centromere protein F	CENPF	S3122	LALSPL <u>S</u> LGKENL	4	0.46	4	0.92
Spindly	CCDC99	T552	SERSGN <u>I</u> PNSPRL	4	0.40	4	0.86
Spindly	CCDC99	S549	EALSER <u>S</u> GNT PNS	4	0.39	4	0.92
Dual specificity protein kinase TTK	TTK	T33	FKNEDL <u>I</u> DELSLN	4	0.05	4	1.07
Dual specificity protein kinase TTK	TTK	S49	ADTTDN <u>S</u> GTVNIQI	3	0.03	3	0.93
Dual specificity protein kinase TTK	TTK	S80	KNSVPL <u>S</u> DALLNK	4	0.03	3	1.02
Dual specificity protein kinase TTK	TTK	S321	KPSGND <u>S</u> CELRNL	4	0.04	3	1.66
Dual specificity protein kinase TTK	TTK	T360	ITLKNK <u>I</u> ESSLLA	3	0.02	3	1.38
Dual specificity protein kinase TTK	TTK	S363	KNKTES <u>S</u> LLAKLE	4	0.11	4	1.34
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	T1722	ENKGND <u>I</u> PLALES	4	2.47	4	0.98
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	S3757	GSSGLG <u>S</u> ASSIQA	4	3.12	4	0.75
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	S3760	GLGSAS <u>S</u> IQAAVR	4	2.11	3	0.75
Histone H2A type 2-C	HIST2H2AC	T121	VLLPKK <u>I</u> ESHKAK	3	0.39	4	0.96
Histone H2A type 2-C	HIST2H2AC	S123	LPKkte <u>S</u> HKAKSK	3	0.39	4	0.96
Kinesin light chain 2	KLC2	S581	PRMKRA <u>S</u> SINFLN	2	0.32	3	1.01
Microtubule-associated protein 1B	MAP1B	T837	SSPEDL <u>I</u> KDFEEL	4	0.19	4	1.25
Protein CASC5	CASC5	S1831	EEDIDK <u>S</u> ANSVLI	4	0.36	4	0.93
Protein CASC5	CASC5	S1834	IDKSAN <u>S</u> VLIKNL	4	0.21	2	1.18
Spindle and kinetochore-associated protein 3	SKA3	S34	ALDGE <u>S</u> DFEDYP	2	0.13	2	0.98

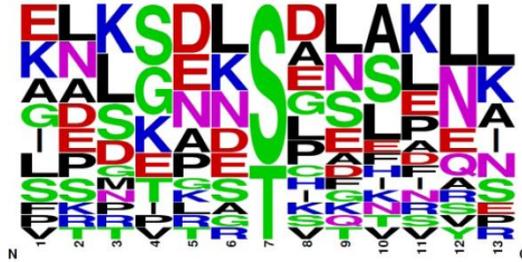


Abbildung 26: Anreicherung von Sequenzmotiven um Mps1-induzierte Phosphorylierungsstellen. Logo Plot Darstellung der Häufigkeiten der Aminosäuren der ± 6 Positionen aller, durch 3-MB-PP1 Behandlung induzierten Phosphorylierungsereignisse in Mps1^{as} mit der Onlinesoftware WebLogo.

3.3 ANALYSE DER PHOSPHOSIGNATUREN UNBEHANDELTEN NSCLC ZELLINIEN

3.3.1 DURCHFÜHRUNG DER STUDIE

In einer vergleichenden Großstudie wurden die Phosphoproteome von 33 *non-small cell lung cancer* (NSCLC) Zelllinien analysiert. Die Zelllinien wurden in einer früheren Studie des Roman Thomas Labors (Sos *et al.*, 2009) hinsichtlich der Korrelation krebszellspezifischer, genetischer Lesionen mit der biologischen Wirksamkeit von Krebsmedikamenten untersucht. Die Zelllinien wurden für Duplikatanalysen in Arg⁶/Lys⁴ sowie in Arg¹⁰/Lys⁸ markiertem SILAC Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase lysiert. Um alle Zelllinien miteinander vergleichen zu können, wurden zehn ausgewählte Zelllinien in unmarkiertem Arg⁰/Lys⁰ SILAC Medium kultiviert und ein SuperSILAC Referenzstandard hergestellt (siehe Tabelle 8) (Geiger *et al.*, 2010). Jeweils zwei invers markierte Zelllinien wurden mit einem Aliquot des Referenzstandards zu einer SILAC NSCLC Probe vereinigt (siehe Tabelle 9). Die Proteine wurden tryptisch verdaut, die Peptide mit SCX Chromatographie in 10 SCX Fraktionen aufgetrennt und die Phosphopeptide jeder Fraktion durch IMAC angereichert (siehe Abbildung 27) (Villen und Gygi, 2008). Die Proben wurden durch LC-MS auf einer LTQ-Orbitrap gemessen und die insgesamt 330 MS Dateien kombiniert mit der MaxQuant Software Suite prozessiert (Cox und Mann, 2008).

Die Effizienz der Markierung der Zelllinien durch Kultivierung im SILAC Medium wurde durch die Messung von Markierungseffizienzproben überprüft. Diese lag bei allen Zelllinien über der kritischen Marke von 95% (siehe Tabelle 10). Um Ungenauigkeiten

3 Ergebnisse

beim Pooling der Zelllinien mit dem SuperSILAC Referenzstandard auszugleichen, wurden die Poolingfehler durch Proteommessungen der gepoolten, verdauten SILAC NSCLC Proben bestimmt und die SILAC Ratios jedes Experiments durch den entsprechenden Faktor korrigiert (siehe Tabelle 10).

Tabelle 8: NSCLC Zelllinien des Super SILAC Referenzstandards für die vergleichende Analyse von 33 NSCLC Zelllinien. Für jede Zelllinie ist der prozentuale Anteil an der Gesamtproteinmenge angegeben.

Zelllinie	Prozentualer Anteil an der Gesamtproteinmenge
Calu1	5.9%
Colo699	9.8%
H441	5.9%
H1568	11.8%
H1650	5.9%
H1792	9.8%
H2444	7.8%
H3255	3.9%
HCC95	5.9%
HCC461	7.8%
HCC1833	5.9%
PC9	15.7%
SKLU1	3.9%

3 Ergebnisse

Tabelle 9: Poolingschema der NSCLC Zelllinien. Jede Zelllinie wurde in Duplikaten, einmal mit mittlerer SILAC Markierung (Arg⁶/Lys⁴) und einmal mit schwerer SILAC Markierung (Arg¹⁰/Lys⁸), analysiert.

#	Zelllinie Markierung 6/4	Zelllinie Markierung 10/8
1	H1650	H1792
2	H1792	PC9
3	PC9	HCC461
4	HCC461	H1650
5	SKLU1	Colo699
6	Colo699	H441
7	H441	H2444
8	H2444	HCC95
9	HCC95	HCC1833
10	HCC1833	H1568
11	H1568	Calu1
12	Calu1	SKLU1
13	LouNH91	H596
14	H596	H3255
15	HCC193	H358
16	DV90	A427
17	A427	LCL97TM
18	LCL97TM	H2126
19	H2126	LouNH91
20	H2882	HCC193
21	H3255	DV90
22	H358	H1563
23	H1563	HCC2279
24	HCC2279	HCC2450
25	HCC2450	H2882
26	HCC4006	H157
27	H157	HCC827
28	HCC827	HCC1171
29	HCC1171	H1915
30	H1915	H2077
31	H2077	HCC2935
32	HCC2935	H3122
33	H3122	HCC4006

Tabelle 10: Markierungseffizienzen der NSCLC Zelllinien und Korrekturfaktoren des Probenpoolings.

#	Zelllinie	Markierungseffizienz - Replikat 1 (6/4)	Markierungseffizienz - Replikat 2 (10/8)	Korrekturfaktor - Replikat 1 (6/4)	Korrekturfaktor - Replikat 2 (10/8)
1	A427	98.8%	99.2%	1.38	1.19
2	Calu1	98.9%	99.3%	0.86	1.07
3	Colo699	99.1%	99.1%	1.20	0.60
4	DV90	98.5%	99.1%	1.03	1.10
5	H157	97.6%	98.7%	0.94	1.11
6	H358	98.8%	99.2%	1.27	1.31
7	H441	98.8%	99.0%	0.79	0.74
8	H596	98.9%	99.2%	0.89	0.96
9	H1563	98.7%	97.0%	0.81	1.06
10	H1568	98.7%	98.5%	0.91	1.09
11	H1650	97.4%	98.3%	0.71	0.95
12	H1792	98.8%	98.9%	1.02	1.00
13	H1915	98.0%	98.3%	0.90	1.18
14	H2077	97.3%	98.4%	0.89	0.94
15	H2126	98.6%	99.4%	1.35	0.98
16	H2444	99.2%	98.5%	0.81	1.00
17	H2882	99.1%	98.7%	1.26	1.30
18	H3122	98.4%	98.0%	1.38	1.37
19	H3255	98.2%	98.8%	0.86	1.05
20	HCC95	98.5%	98.8%	0.77	0.85
21	HCC193	99.0%	98.5%	1.16	1.43
22	HCC461	98.9%	98.9%	1.33	1.24
23	HCC827	98.3%	99.3%	1.11	1.16
24	HCC1171	98.6%	98.4%	0.92	1.07
25	HCC1833	99.1%	99.1%	0.74	0.79
26	HCC2279	98.4%	98.8%	0.76	0.80
27	HCC2450	99.0%	99.4%	0.76	1.13
28	HCC2935	97.4%	98.3%	1.27	1.62
29	HCC4006	98.4%	98.5%	1.17	1.25
30	LCL97TM	98.4%	99.1%	0.99	1.27
31	LouNH91	98.8%	99.1%	0.77	0.83
32	PC9	98.6%	98.6%	1.25	1.35
33	SKLU1	98.6%	99.0%	1.10	1.13

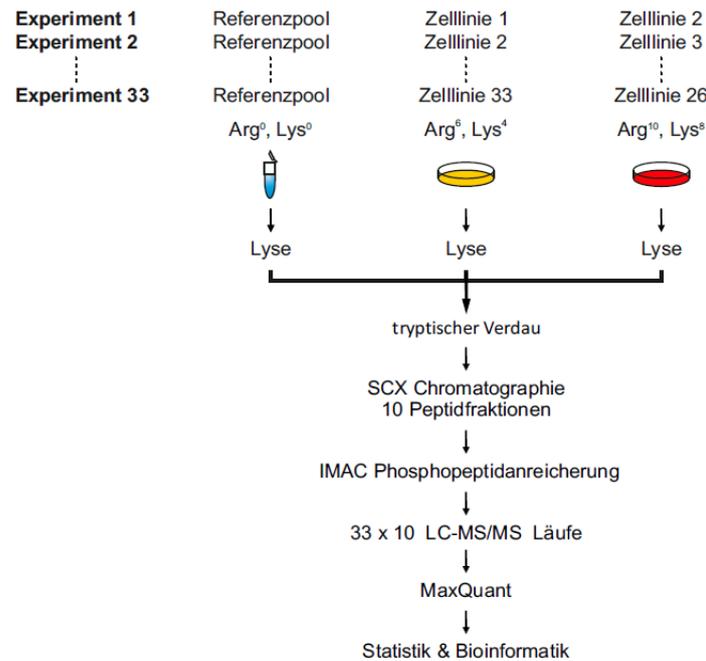


Abbildung 27: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus und der einzelnen Arbeitsschritte der NSCLC Studie. Die Zelllinien des SILAC Referenzstandards wurden in leichtem SILAC Medium kultiviert, lysiert, vereinigt und das Lysat bei -80°C bis zur jeweiligen Verwendung gelagert. Jede der 33 Zelllinien wurde einmal in mittlerem SILAC Medium ($\text{Arg}^6/\text{Lys}^4$) und einmal in schwerem SILAC Medium ($\text{Arg}^{10}/\text{Lys}^8$) kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und jeweils gleiche Proteinmengen zweier unterschiedlich schwer markierter Zelllinien (siehe Schema in Tabelle 9) mit einer gleichen Menge des unmarkierten, aufgetauten Super SILAC Referenzstandard vereinigt. Das vereinigte Proteinlysate wurde verdaut und die Phosphopeptide durch SCX Chromatographie in Kombination mit IMAC angereichert. Die resultierenden Fraktionen wurden mit LC-MS analysiert und die Daten mit der MaxQuant Software Suite analysiert.

Um eine effektive Probenpräparation und optimale Ausnützung der Messzeit zu ermöglichen, wurden die Zelllinien in fünf Blöcke aufgeteilt. Diese wurden in Abhängigkeit des zeitlichen Aufwands der unterschiedlichen Abschnitte der Probenvorbereitung gestaffelt und bearbeitet (siehe Abbildung 28). Die einzelnen Blöcke enthielten bis zu acht Zelllinien und wurden im Abstand von jeweils zwei Wochen begonnen. Dadurch konnte erreicht werden, dass nie mehr als 15 Zelllinien gleichzeitig in Kultur gehalten werden mussten und sich die massenspektrometrische Probenvorbereitung der einzelnen Blöcke nur in sehr geringem Maße überschneidet, wobei immer die Verfügbarkeit von Proben für die Massenspektrometriemessung sichergestellt war. Insgesamt konnten die 33 NSCLC SILAC Proben in 20 Wochen prozessiert und gemessen werden.

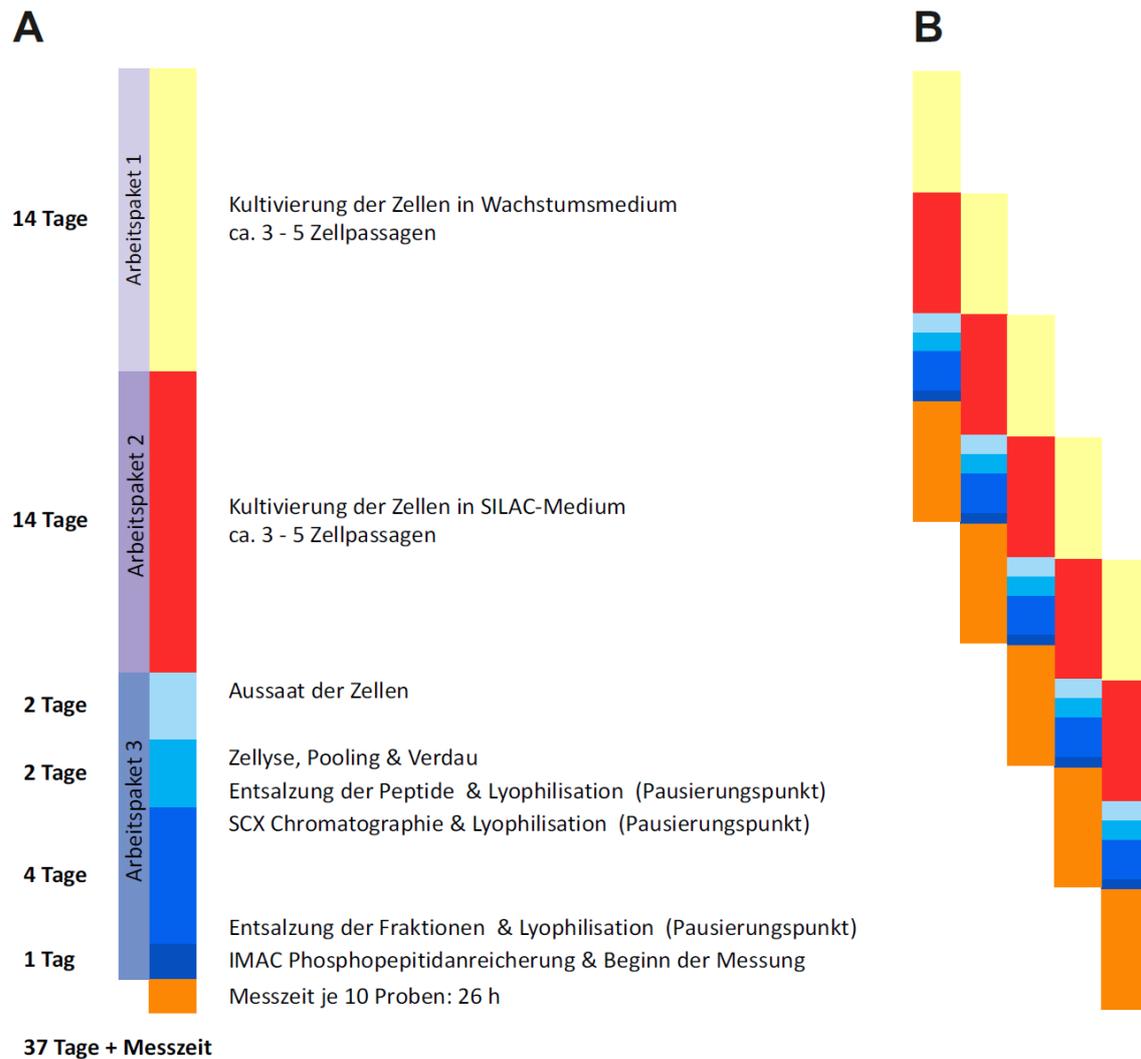


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung der NSCLC Studie. **(A)** Abfolge der unterschiedlichen Arbeitspakete der Probenvorbereitung mit jeweiligen Zeitangaben. Die massenspektrometrische Messzeit ist für die zehn Phosphopeptidfraktionen einer Probe angegeben. Insgesamt ergibt sich eine Dauer von 38 Tagen für die Gesamtdurchführung. **(B)** Mögliche Staffelung von Probenvorbereitungsblöcken. Die Arbeitspakete wurden so ineinander verschachtelt, dass zu keinem Zeitpunkt ein gleiches Arbeitspaket bearbeitet werden musste. Nachdem die Arbeitslast bzw. der Inhalt der unterschiedlichen Pakete stark voneinander abweicht, konnte eine optimale Auslastung der Arbeitskraft bei stetiger Verfügbarkeit von Proben für eine ununterbrochene Massenspektrometriemessung erreicht werden. Die Probenvorbereitungsblöcke enthielten zwischen vier und acht Zelllinien die jeweils in beiden schweren SILAC Medien kultiviert wurden und nach der Lyse zur gleichen Anzahl an Proben vereinigt wurden.

3.3.2 MASSENSPEKTROMETRISCHE IDENTIFIKATIONEN

In 33 NSCLC SILAC Experimenten wurden insgesamt 20.967 verschiedene Phosphopeptide mit 23.905 verschiedenen Phosphorylierungsstellen quantifiziert, von denen es sich bei 18.173 um Klasse I Phosphorylierungsstellen handelte (siehe Abbildung 29 und Tabelle A7). In den einzelnen Zelllinien wurden in einem einzigen Experiment zwischen knapp 3.600 und 6.900 Klasse I Phosphorylierungsstellen quantifiziert, die Gesamtzahlen aus zwei SILAC Experimenten schwankten je nach Zelllinie zwischen 5.200 und knapp 9.000 (siehe Abbildung 30). Nachdem die Messung einer NSCLC SILAC Probe nicht erfolgreich verlaufen war, konnten die Phosphoproteomdaten der Zelllinien Calu1 und Sklu1 jeweils nur in einem Experiment erfolgreich bestimmt werden. Der Prozentsatz der in beiden Replikaten gefundenen Phosphorylierungsstellen an der jeweiligen Gesamtzahl betrug im schlechtesten Fall 32%, im besten Fall 50% (siehe Abbildung 30 und Tabelle 11). Die in beiden Replikaten der Zelllinien bestimmten Ratios zeigen mit Pearson Korrelationskoeffizienten zwischen 0,82 und 0,91 eine gute Übereinstimmung (siehe Abbildung 31 und Tabelle 11). Die Verteilungen der entsprechenden Mittelwerte jeder Zelllinie schwanken zumeist um null und sind großteils symmetrisch (siehe Abbildung 32). In Tabelle 11 sind die Zahlen und statistischen Parameter für jede der Zelllinien aufgelistet.

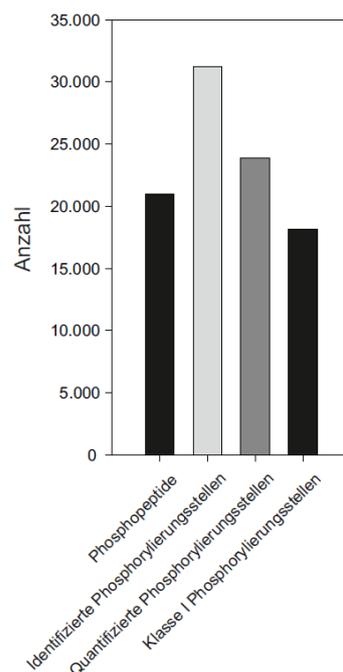


Abbildung 29: Anzahl an Phosphopeptiden, sowie an identifizierten, quantifizierten und Klasse I Phosphorylierungsstellen der NSCLC Studie.

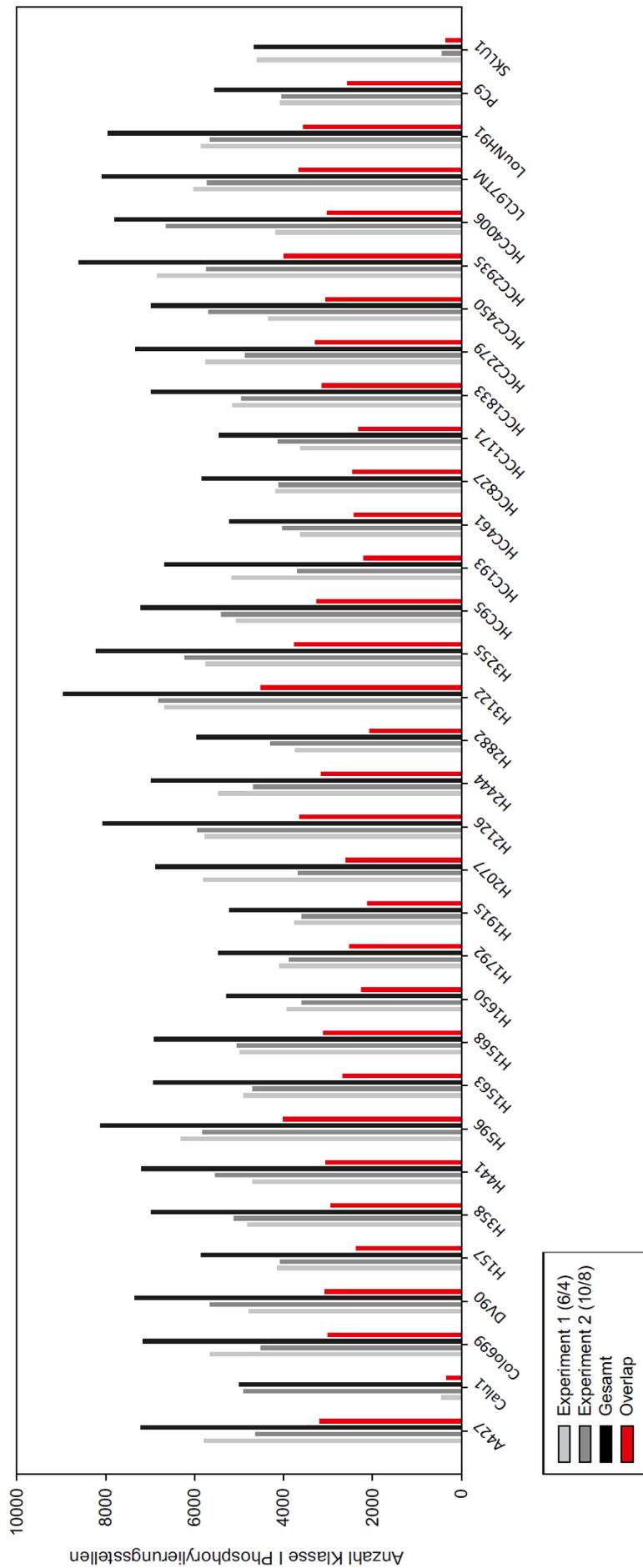
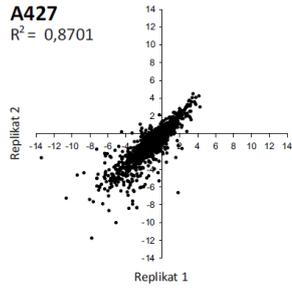


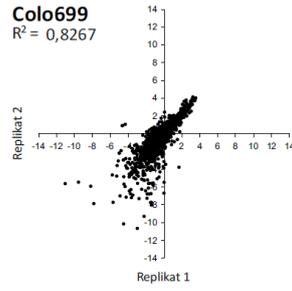
Abbildung 30: Quantifizierte Klasse I Phosphorylierungsstellen der NSCLC Studie. Anzahl an Klasse I Phosphorylierungsstellen die in den einzelnen Zelllinien in Experiment 1 und Experiment 2 quantifiziert wurden, sowie die sich daraus ergebende Gesamtzahl und die Anzahl der in beiden Experimenten quantifizierten Klasse I Phosphorylierungsstellen.

3 Ergebnisse

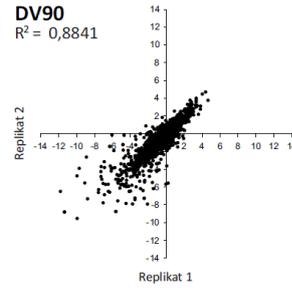
A427
 $R^2 = 0,8701$



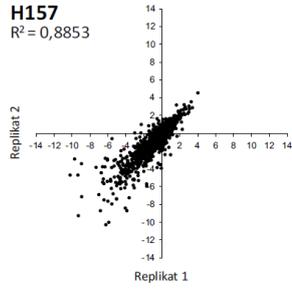
Colo699
 $R^2 = 0,8267$



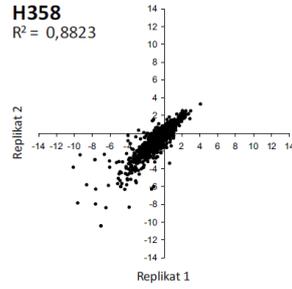
DV90
 $R^2 = 0,8841$



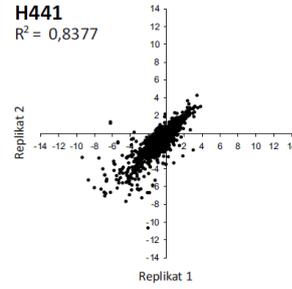
H157
 $R^2 = 0,8853$



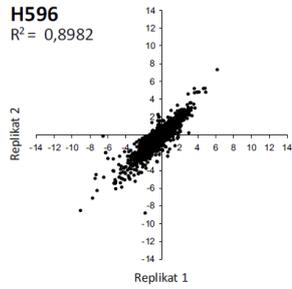
H358
 $R^2 = 0,8823$



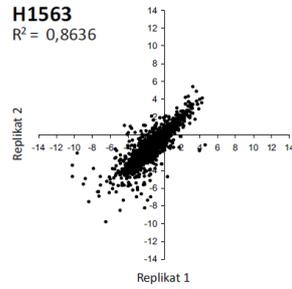
H441
 $R^2 = 0,8377$



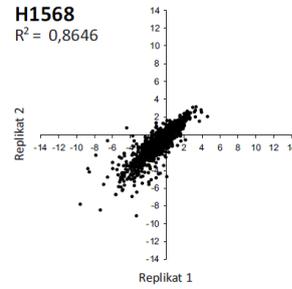
H596
 $R^2 = 0,8982$



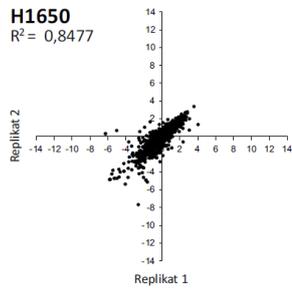
H1563
 $R^2 = 0,8636$



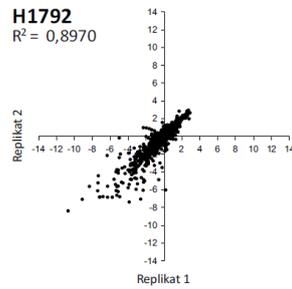
H1568
 $R^2 = 0,8646$



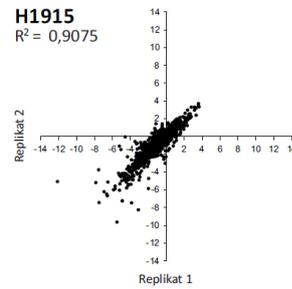
H1650
 $R^2 = 0,8477$



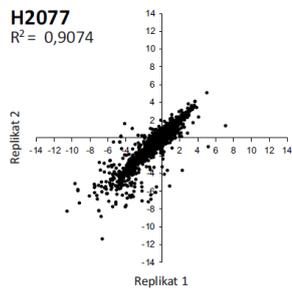
H1792
 $R^2 = 0,8970$



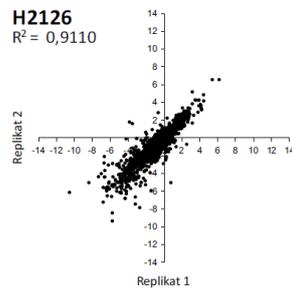
H1915
 $R^2 = 0,9075$



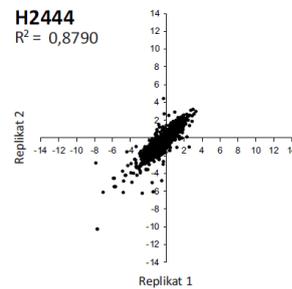
H2077
 $R^2 = 0,9074$



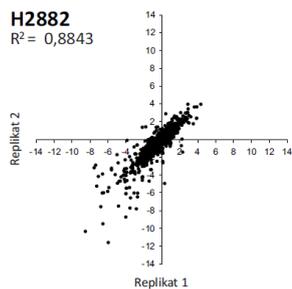
H2126
 $R^2 = 0,9110$



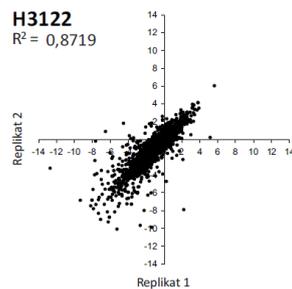
H2444
 $R^2 = 0,8790$



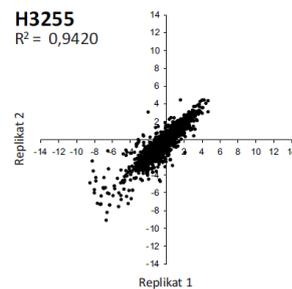
H2882
 $R^2 = 0,8843$



H3122
 $R^2 = 0,8719$



H3255
 $R^2 = 0,9420$



3 Ergebnisse

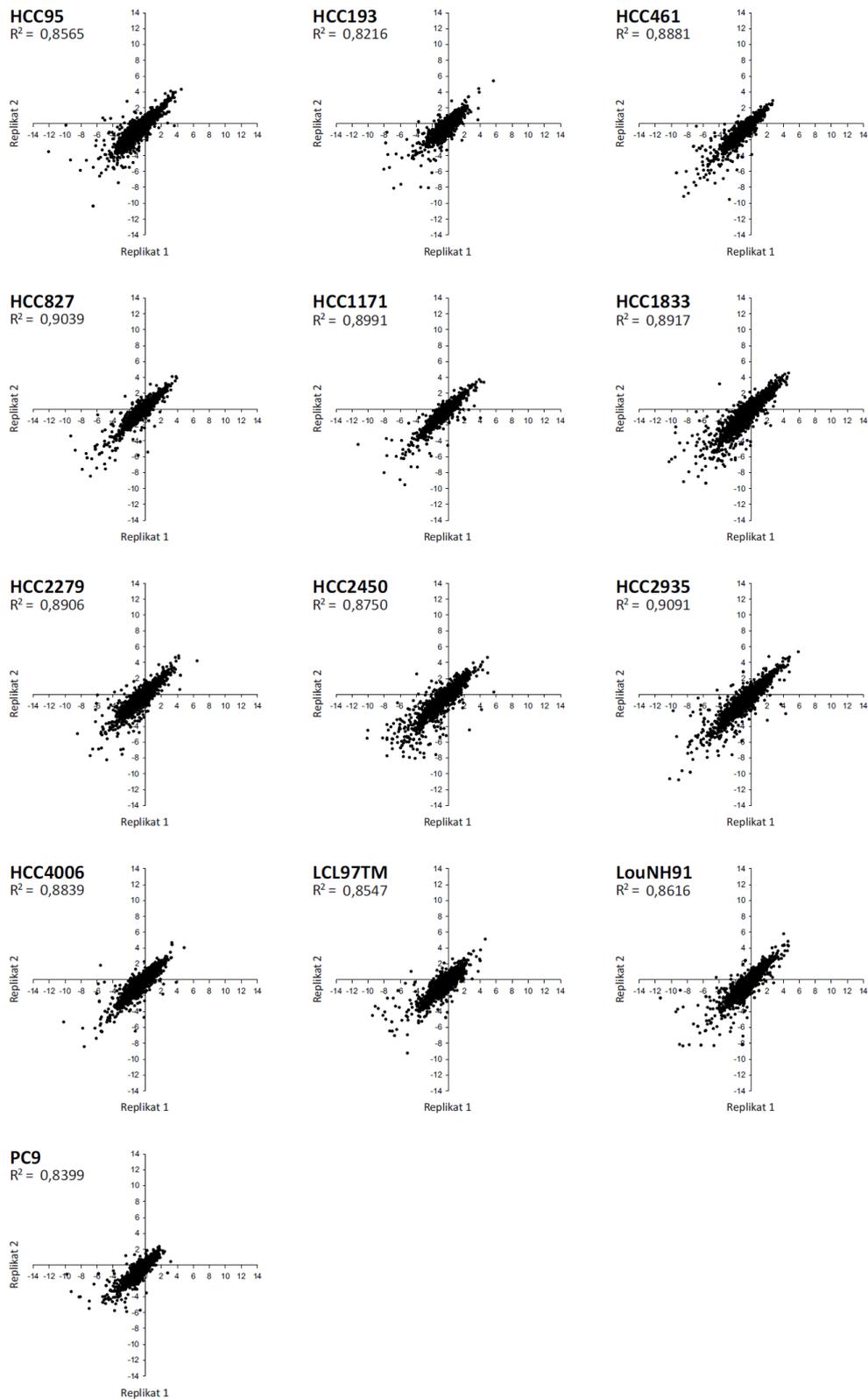
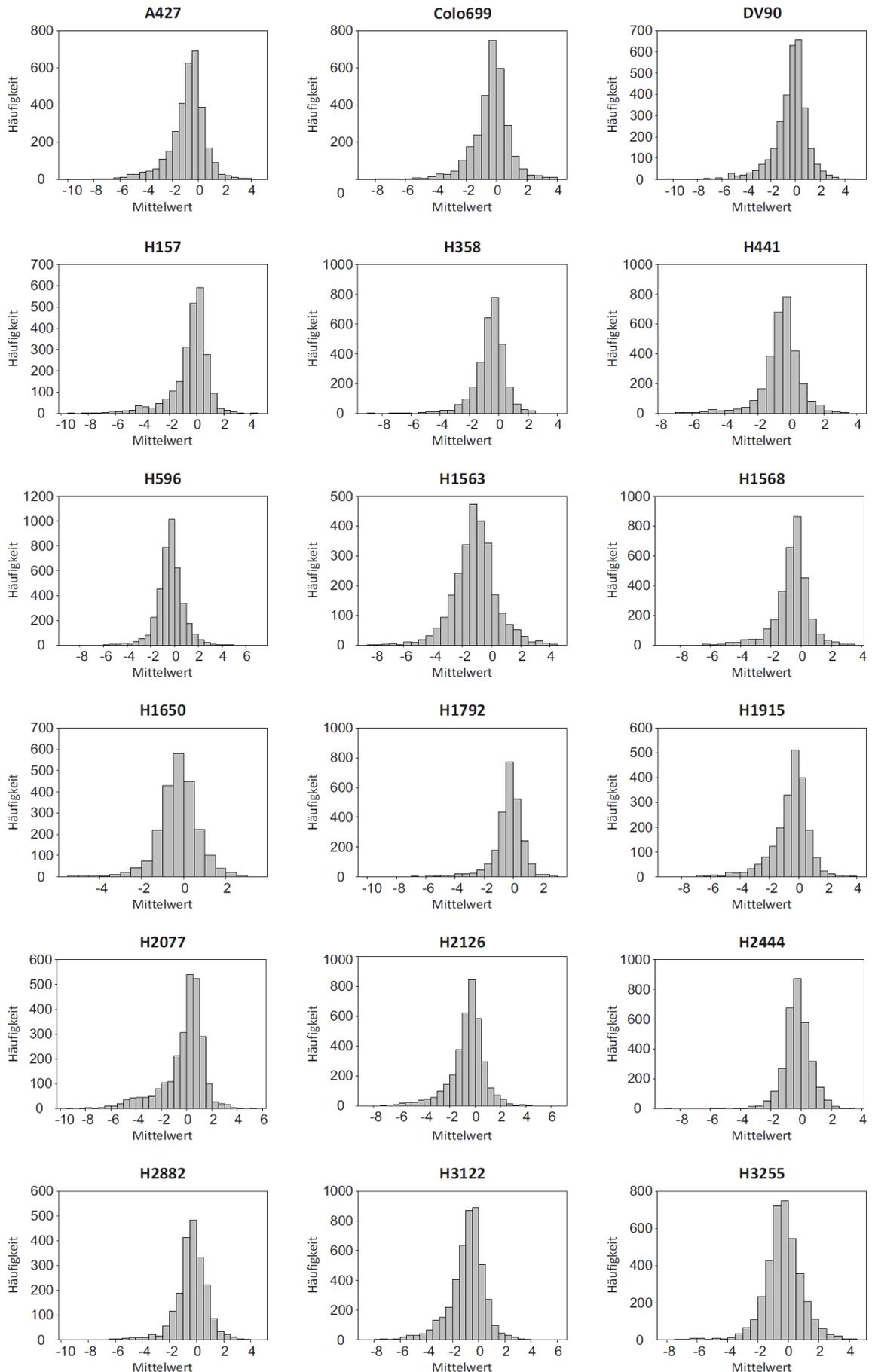


Abbildung 31: Korrelation der logarithmierten Ratios der in beiden Experimenten einer NSCLC Zelllinie detektierten Klasse I Phosphorylierungsstellen. Streudiagramme der Werte der (A) NSCLC Zelllinien mit EGFR Mutationen, (B) der NSCLC Zelllinien mit KRAS Mutationen und (C) der NSCLC Zelllinien ohne RAS/RAF oder EGFR Mutationen. Für jede Zelllinie ist der Korrelationskoeffizient der beiden Replikate angegeben.

3 Ergebnisse



3 Ergebnisse

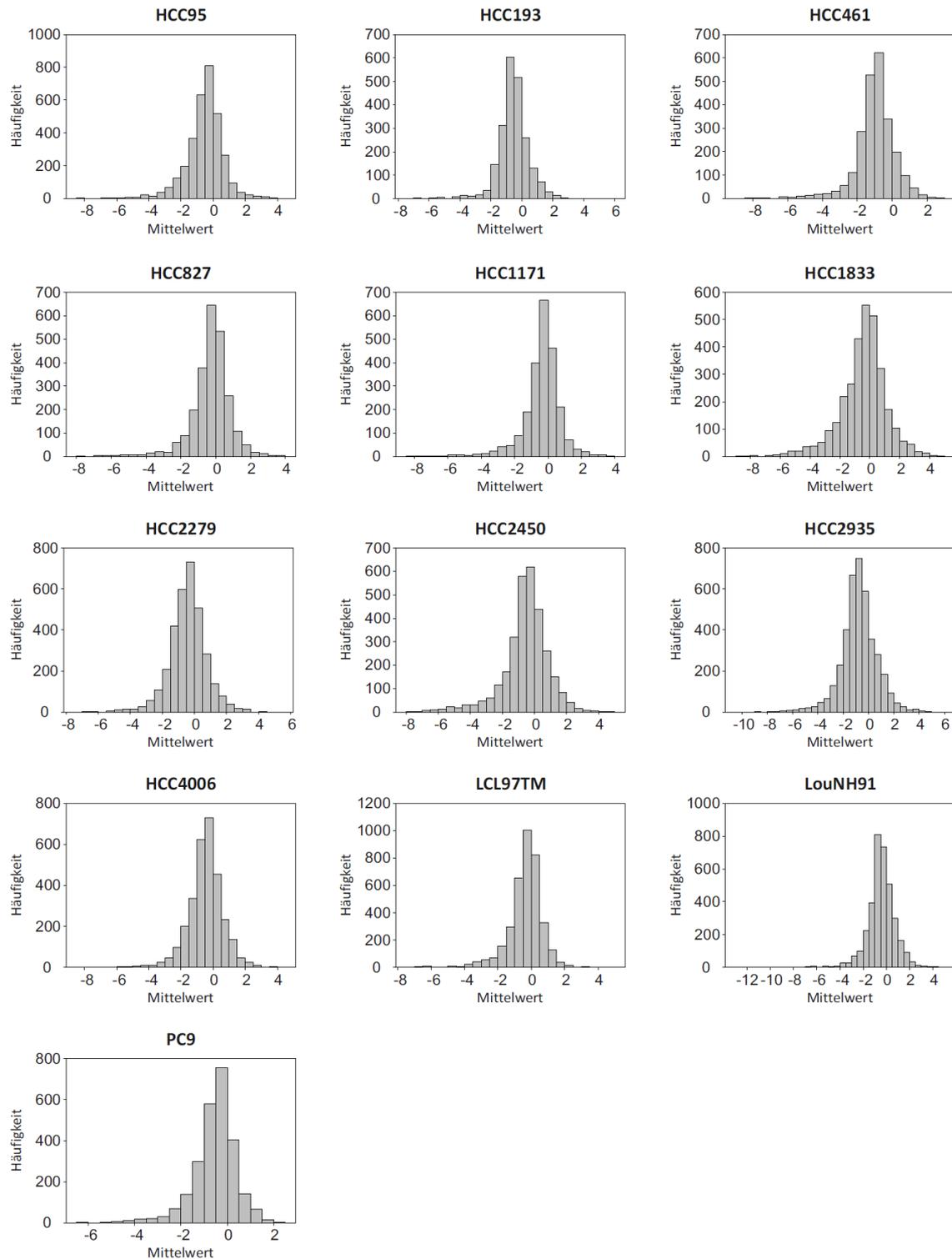


Abbildung 32: Verteilungen der logarithmierten Mittelwerte der Ratios der in beiden Experimenten einer NSCLC Zelllinie detektierten Klasse I Phosphorylierungsstellen. Histogrammdarstellungen der **(A)** NSCLC Zelllinien mit EGFR Mutationen, **(B)** der NSCLC Zelllinien mit KRAS Mutationen und **(C)** der NSCLC Zelllinien ohne RAS/RAF oder EGFR Mutationen. Die Graphen wurden mit der Histogrammfunktion (automatisches Binning) der Software SigmaPlot erstellt.

Tabelle 11: Anzahl quantifizierter Klasse I Phosphorylierungsstellen jeder Zelllinie der NSCLC Studie mit statistischen Kennzahlen.

# Zelllinie	Mutation	Replikate	Anzahl Replikate 1 (6/4)	Anzahl Replikate 2 (10/8)	Anzahl Klasse I Ratios gesamt	Anzahl Klasse I Ratios in beiden Replikaten	Anzahl konsistenter Ratios	Anzahl konsistenter Klasse I Ratios in ≥ 15 Zelllinien	Pearson Korrelationskoeffizient (Log ₂)	Mittelwert ratio of ratios	Standardabweichung ratio of ratios
1	A427	2	5786	4625	7218	3193	3102	2027	0.87	-0.05	0.75
2	Calu1	1	446	4895	5001	340	0	0	0.81	-0.17	0.56
3	Col0699	2	5646	4506	7156	2996	2905	1860	0.83	0.06	0.81
4	DV90	2	4776	5646	7354	3068	2991	1969	0.88	0.00	0.73
5	H157	2	4137	4071	5851	2357	2291	1626	0.89	0.06	0.70
6	H358	2	4808	5118	6985	2941	2896	1878	0.88	-0.02	0.55
7	H441	2	4704	5534	7188	3050	2946	1919	0.84	0.19	0.71
8	H596	2	6313	5816	8125	4004	3932	2255	0.90	0.01	0.52
9	H1563	2	4896	4704	6924	2676	2580	1698	0.86	-0.01	0.80
10	H1568	2	4974	5047	6914	3107	3025	1883	0.86	0.08	0.61
11	H1650	2	3931	3591	5283	2239	2182	1646	0.85	-0.01	0.56
12	H1792	2	4101	3879	5464	2516	2487	1780	0.90	-0.04	0.52
13	H1915	2	3751	3590	5224	2117	2067	1514	0.91	-0.08	0.57
14	H2077	2	5806	3681	6881	2606	2536	1694	0.91	-0.04	0.76
15	H2126	2	5776	5943	8074	3645	3579	2031	0.91	-0.04	0.60
16	H2444	2	5460	4675	6977	3158	3110	1988	0.88	0.05	0.48
17	H2882	2	3736	4287	5957	2066	2029	1339	0.88	-0.05	0.62
18	H3122	2	6669	6805	8959	4515	4386	2166	0.87	-0.10	0.74
19	H3255	2	5754	6228	8228	3754	3659	2141	0.90	0.15	0.60
20	HCC95	2	5065	5398	7214	3249	3172	2022	0.86	-0.07	0.65
21	HCC193	2	5169	3696	6676	2189	2124	1435	0.82	0.15	0.64
22	HCC461	2	3617	4019	5216	2420	2391	1725	0.89	-0.13	0.58
23	HCC827	2	4173	4103	5830	2446	2398	1695	0.90	-0.17	0.52
24	HCC1171	2	3632	4133	5446	2319	2287	1696	0.90	-0.04	0.53
25	HCC1833	2	5148	4953	6973	3128	3039	1945	0.89	0.04	0.76
26	HCC2279	2	5760	4857	7334	3283	3213	1894	0.89	-0.11	0.57
27	HCC2450	2	4336	5684	6972	3048	2963	1803	0.87	-0.01	0.75
28	HCC2935	2	6851	5741	8604	3988	3901	2131	0.91	0.06	0.64
29	HCC4006	2	4177	6644	7808	3013	2949	1918	0.88	-0.06	0.55
30	LC197TM	2	6015	5724	8079	3660	3568	2139	0.85	0.02	0.59
31	LouNH91	2	5858	5649	7950	3557	3486	2106	0.86	-0.03	0.68
32	PC9	2	4080	4035	5549	2566	2523	1812	0.84	-0.04	0.57
33	SKLU1	1	4599	430	4671	358	0	0	0.85	0.06	0.62
Gesamt			18171	17877	18173	9988	9893	2605			

3.3.3 CLUSTER ANALYSE DER PHOSPHORYLIERUNGSPROFILE

Um zu untersuchen wie und ob die Phosphorylierungsprofile der einzelnen Zelllinien sich zu charakteristischen Gruppen zusammenfassen ließen, wurden die konsistent quantifizierten Ratios aller Phosphorylierungsstellen die in mindestens 15 Zelllinien detektiert wurden durch K-means Clustering analysiert. Eine Phosphorylierungsstelle galt als „konsistent“ quantifiziert, wenn sie in beiden Replikaten einer Zelllinie Ratios aufwies, die mit einem maximalen Variationskoeffizienten von 0,4 voneinander abwichen oder gleichförmig reguliert (größer 2-fache Regulation) waren. Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der Phosphorylierungsstellen, die in 15 oder mehr Zelllinien quantifiziert werden konnte, nur 2605 von insgesamt 9893 konsistent quantifizierten Phosphorylierungsstellen betrug (siehe Abbildung 33A und Tabelle 11). Obwohl bei über 96% der in jeder Zelllinie in beiden Replikaten quantifizierten Phosphorylierungsstellen konsistente Ratios vorlagen, gingen daher im Durchschnitt nur 63% der in den einzelnen Zelllinien identifizierten Phosphorylierungsstellen in die Cluster Analyse ein (siehe Abbildung 33B und Tabelle 11). Die Daten der Zelllinien Calu1 und SKLU1 konnten nicht berücksichtigt werden, da für diese Zelllinien nur ein Replikat erfolgreich quantifiziert werden konnte.

Die Analyse ergab zehn distinkte Cluster, die Ähnlichkeiten zwischen den Zelllinien erkennen ließen (siehe Abbildung 34). In keiner der Subgruppen clustern jedoch die jeweiligen Zelllinien der drei Genotypen EGFR Mutationen, KRAS Mutationen und keine RAS/RAF oder EGFR Mutationen zusammen.

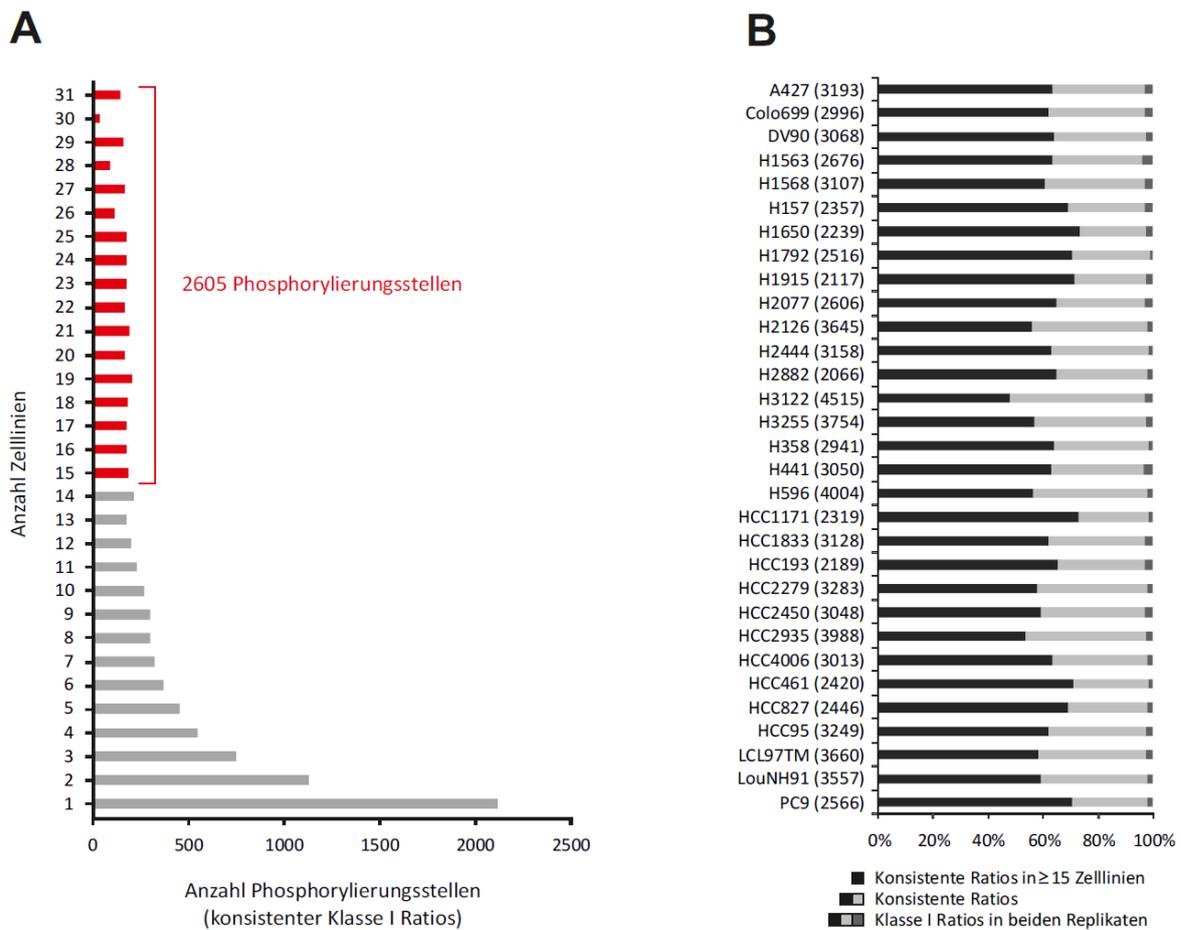
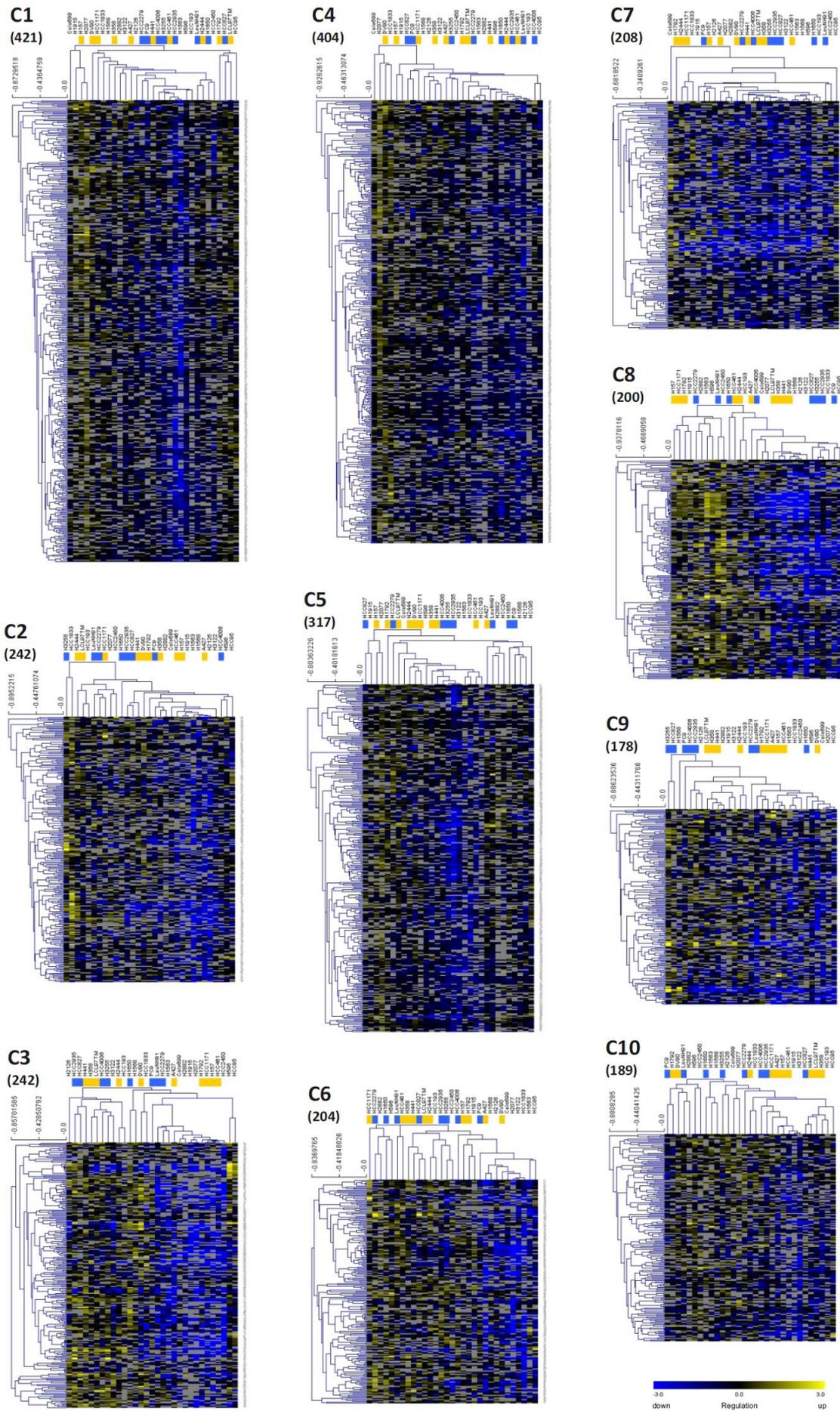


Abbildung 33: Datengrundlage der Cluster Analyse der Phosphorylierungsprofile von 31 der 33 NSCLC Zelllinien. **(A)** Anzahl an Phosphorylierungsstellen (konsistente Klasse I Ratios) die in 1, 2, ..., 31 NSCLC Zelllinien quantifiziert wurden. Die Balken aller Phosphorylierungsstellen die in mindestens 15 Zelllinien quantifiziert wurden sind rot markiert. Die respektiven Phosphorylierungsstellen (2605) gingen in die Cluster Analyse ein. **(B)** Anteil der Phosphorylierungsstellen mit konsistent quantifizierten Ratios an der Anzahl an Phosphorylierungsstellen die in beiden Replikaten einer Zelllinie quantifiziert wurde (Zahl in Klammern), sowie der Anteil der Phosphorylierungsstellen die konsistent in noch mindestens 14 weiteren Zelllinien quantifiziert werden konnten.

Abbildung 34: Cluster Analyse der Phosphorylierungsprofile von 31 der 33 NSCLC Zelllinien. Die Erstellung der zehn Clustern erfolgte mit der *K-means* Cluster Funktion der Software MeV (TM4). Analysiert wurden alle konsistent identifizierten Phosphorylierungsstellen die in mindestens 15 Zelllinien detektiert worden waren. Die Daten der Zelllinien Calu1 und SKLU1 konnten nicht berücksichtigt werden, da für diese Zelllinien nur ein Replikat erfolgreich quantifiziert werden konnte. Die Anzahl der Phosphorylierungsstellen jedes Clusters ist jeweils in Klammern angegeben. Die Cluster lassen nicht auf eine Korrelation des Genotyps der Zelllinien mit dem Phosphoproteom schließen.

3 Ergebnisse



4 DISKUSSION

4.1 SUBSTRATIDENTIFIKATIONSSTUDIEN DER MITOTISCHEN KINASEN PLK1 UND MPS1

Für die globale Analyse direkter zellulärer Substrate der Kinasen Plk1 und Mps1 wurde in der vorliegenden Studie eine hochselektive chemisch-genetische Inhibitionsstrategie mit optimierten Methoden der quantitativen Phosphoproteomik und sensitiver, hochauflösender Massenspektrometrie kombiniert. Die gewählte Strategie berücksichtigt wie keine andere Studie im Bereich der Phosphoproteomik zuvor die Variabilität biologischer Systeme, die Besonderheiten der experimentellen Methoden, sowie die Selektivitätsproblematik niedermolekularer Inhibitoren.

Die quantitative Massenspektrometrie generiert im Allgemeinen normalverteilte Daten. Die einmalige Messung erlaubt somit keine zuverlässige Aussage über die Regulation von Peptiden, Phosphorylierungsstellen oder Proteinen, da auch beim Vergleich identischer Bedingungen immer ein gewisser Prozentsatz der Ratios über einem willkürlich festgesetzten Schwellenwert der Regulation liegt. Die Messergebnisse in Wildtypzellen unterstreichen dies sehr anschaulich, da bei der Betrachtung der einzelnen Experimente jeweils mehr als 100 mindestens zweifach „regulierte“ Ratios detektiert werden konnten, obwohl keinerlei Regulation in diesen Zellen zu erwarten ist. Die Durchführung von Replikatanalysen und die Erfüllung der Bedingung, dass ein reguliertes Ereignis mindestens zweimal mit geringer Varianz detektiert werden muss, sind deshalb unerlässlich für die Minimierung falsch-positiver Ergebnisse. Auch birgt die relative Quantifizierung über schwere und leichte Isotope das Risiko, dass vom eigentlichen Zellkultur-Experiment unabhängige Kontaminationen (z. B. Serumbestandteile) mit Ratios detektiert werden und durch ihre geringe Abundanz eine Regulation vorspiegeln können. Durch die Variation der Zuordnung von SILAC Markierung und Behandlungskondition zwischen den einzelnen Replikaten (*label-switch*) können diese jedoch sehr effektiv eliminiert werden. Dieses Vorgehen hat sich in den hier durchgeführten Studien bewährt und empfiehlt sich somit als Standard für alle SILAC Studien. Nachdem bei wiederholter massenspektrometrischer Messung (selbst der gleichen Probe) ein maximaler Overlap von 80% erreicht werden kann, sind mindestens drei Replikatanalysen erforderlich, um eine ausreichende Proteomabdeckung zu erzielen. Die viermalige Wiederholung der Experimente der Plk1 und Mps1 Studien ermöglichte eine 60%ige Steigerung der

mehrfach quantifizierten Phosphopeptide gegenüber Duplikatmessungen und schaffte so eine deutlich breitere Datengrundlage.

Neben der Durchführung von Replikatanalysen ist die Überwachung der Selektivität des Inhibitors von großer Bedeutung für die zuverlässige Zuordnung von zellulären Kinase-Substratbeziehungen. Selbst extrem selektive Inhibitoren wie das hier eingesetzte 3-MB-PP1, welches speziell für die Inhibition genetisch sensitivierter Kinasen konzipiert wurde, zeigen *in-vitro off-target* Effekte und erfordern somit eine strenge Überwachung ihrer zellulären Selektivität (Bishop *et al.*, 2000; Bain *et al.*, 2007; Holt *et al.*, 2009). Die Verwendung einer analog-sensitiven Zelllinie für die Substratanalyse und einer gleichen, jedoch insensitiven Wildtypzelllinie als Kontrolle ermöglichte sowohl die Identifikation Kinase-unabhängiger *off-target* Effekte (Regulation in analog-sensitiven wie auch in Wildtypzellen), als auch die Bestimmung des Anteils falsch-positiver Ereignisse (Regulation nur in Wildtypzellen). In der Plk1 Studie konnten bei einer Inhibitorkonzentration von 5 μM zwei Plk1-unabhängig regulierte Phosphopeptide detektiert werden. In der Mps1 Studie wurden beim Einsatz der doppelten Inhibitorkonzentration 21 Phosphopeptide und somit zehnmal mehr *off-target* Effekte identifiziert, obwohl ein zusätzliches Regulationskriterium (mindestens 2-fache Regulation) erfüllt werden musste. Diese Ergebnisse verdeutlichen, wie elementar die Kontrolle unerwünschter Nebeneffekte für eine vertrauenswürdige Identifikation tatsächlicher Zielproteine ist.

Ein Vorteil bei der Plk1 Substratanalyse war die Messung Plk1 vermittelter Phosphorylierungsereignisse infolge der zellulären Aktivierung der Kinaseaktivität. Die Kinase wurde nach Inhibitorinkubation durch Auswaschen des Inhibitors aktiviert, wodurch die Plk1-abhängige Phosphorylierung des bekannten Substrats BubR1 detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte keine Abnahme der Phosphorylierung von BubR1 festgestellt werden, wenn mitotisch arretierte Plk1^{as} Zellen mit 3-MB-PP1 behandelt und danach direkt analysiert wurden, obwohl es sich dabei um eine Strategie handelt, die in einem vergleichbaren System in einer kürzlich publizierten Studie zur Identifikation von zellulären Cdk1 Substraten angewendet wurde (Holt *et al.*, 2009). Dies ist sehr wahrscheinlich auf eine ineffiziente Dephosphorylierung durch mitotische Phosphatasen zurückzuführen und verdeutlicht einen klaren Vorteil der Kinaseaktivierung im Gegensatz zur Inhibition in zellulären Systemen.

In der Mps1 Studie musste dieser Nachteil jedoch in Kauf genommen werden: Die Inhibition der Kinase führt zum Austritt der Zellen aus der Mitose. Obwohl die Inhibitorbehandlung nicht für 30 Minuten sondern für zwei Stunden erfolgte, um Phosphatasen genügend Zeit zur Dephosphorylierung zellulärer Mps1 Substrate zu lassen, ist anzunehmen, dass einige Mps1-vermittelte Phosphorylierungsereignisse womöglich durch dieses Behandlungsschema nicht detektiert werden konnten. Insbesondere auch deshalb, weil die Kontrolle der BubR1 Phosphorylierung im Westernblot keine Veränderung nach Mps1 Inhibition infolge 3-MB-PP1 Zugabe zeigte, was auch in dem entsprechenden Vorexperiment der Plk1 Studie beobachtet wurde. Allerdings ist die indirekte Quantifizierung von Phosphorylierungen anhand eines veränderten Laufverhaltens im Gel oftmals nur bedingt aussagekräftig. Dies wird durch das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse verdeutlicht, in der BubR1 dennoch als Mps1 Substrat ausgemacht werden konnte. Die Liste der Mps1 Substrate lässt darauf schließen, dass trotz des nachteiligen Inkubationsschemas ein großer Teil aller Mps1 Substrate in der Prophase der Mitose durch diese Studie identifiziert werden konnten (siehe Diskussion Mps1 Substratproteine).

Die Durchführung von Replikatanalysen in Zellen mit Inhibitor-sensitiven und -insensitiven Kinasevarianten ergab eine Microarray-ähnliche Datenstruktur, die eine Signifikanzanalyse mit SAM erlaubte. Für beide Kinastudien wurden nur mehrfach in analog-sensitiven wie auch in Wildtypzellen quantifizierte Phosphopeptide (bzw. Phosphorylierungsstellen) für die Analyse zugelassen und die Ergebnisse nach sehr stringenten statistischen Kriterien (0% FDR) gefiltert. Aufgrund der höheren Inhibitorkonzentration wurde in der Mps1 Studie zudem eine mindestens 2-fache Regulation der Ratios gefordert. Die vorliegenden Daten sind aufgrund einer augenscheinlich fehlerfreien Proteomquantifizierung von bis dato unerreichter Qualität. Mit 23.541 und 27.035 quantifizierten, verschiedenen Phosphopeptiden stellen die beiden Substratidentifikationsstudien zwei der umfassendsten eigenständigen Datensätze auf dem Gebiet der Phosphoproteomik dar.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der beiden Substratidentifikationsstudien diskutiert. Die Diskussion der Plk1 Studie ist aufgrund der großen Zahl identifizierter Substrate relativ allgemein gehalten. Die einzelnen Proteine werden gruppiert analysiert und nur ein Teil der gesamten Substratliste findet Erwähnung. In der Diskussion der Mps1

Studie wird jedes der 12 Substrate detailliert behandelt, insbesondere da eine ausführliche bioinformatische Analyse der Ergebnisse durch die geringe Anzahl der Proteine nicht möglich war.

4.1.1 PLK1 STUDIE

Die Proteinkinase Plk1 spielt als Regulator beim Eintritt und Fortgang der Mitose in einer Vielzahl von Schritten eine zentrale Rolle. In der Substratidentifikationsstudie konnten insgesamt 372 zelluläre Plk1 regulierte Phosphoproteine detektiert werden unter denen sich neben zahlreichen mitotischen Proteinen mit teilweise bereits bekannten Plk1 Interaktionen auch Proteine befanden, denen bis dato keine Rolle in der Mitose zugeordnet werden konnte. In Tabelle 12 sind ausgewählte Plk1 Substrate aufgeführt. Insgesamt handelte es sich bei 45 der 386 nach Plk1 Aktivierung induzierten Phosphorylierungsstellen um bereits beschriebene Modifikationen, was darauf hindeutet, dass der experimentelle Ansatz bekannte Mechanismen der zellulären Plk1 Signalweiterleitung genau abbildet. 36 dieser 45 Phosphorylierungsstellen wurden nach Plk1 shRNA oder Inhibitorbehandlung in einer kürzlich publizierten Phosphoproteomstudie humaner Spindelproteine negativ reguliert gefunden (siehe Anhang Tabelle A2) (Santamaria *et al.*, 2011).

Hoher Anteil direkter Substratmodifikationen. Trotz der kurzen Induktion der Plk1 Aktivität lässt sich nicht ausschließen, dass es sich bei einigen der Proteine mit regulierten Phosphorylierungsstellen nicht um direkte Substrate handelt. Die Ergebnisse der Analyse der Aminosäuresequenzen um die durch Plk1 induzierten Phosphorylierungsstellen deuten jedoch auf einen hohen Anteil direkter Modifikationen durch Plk1 hin. Die identifizierten Motive stimmen nicht nur hervorragend mit dem bekannten Plk1 Konsensusmotiv überein (Burkard *et al.*, 2009), sondern die große Mehrzahl der induzierten Phosphorylierungsstellen weist auch mindestens eine der gefundenen Spezifitätsdeterminanten in den Aminosäurepositionen -2 oder +1 auf. Des Weiteren konnte eine deutliche Anreicherung des PBD Motivs unter den Plk1 regulierten Phosphoproteinen detektiert werden, was ebenfalls auf überwiegend direkte Plk1 Substrate hindeutet.

Regulation spezifischer zellulärer Komponenten. In exzellenter Übereinstimmung mit bekannten Orten mitotischer Plk1 Aktivität zeigte die Untersuchung der Lokalisation Plk1 regulierter Phosphoproteine durch Gene Ontologie Analyse eine starke Anreicherung unter anderem für die zellulären Komponenten Zellkernpore, Kinetochor, Zentrosom und Spindelapparat (Archambault und Glover, 2009). Insbesondere konnte für bis zu 29% der in diesen Kategorien annotierten Proteine eine Plk1-abhängige Regulation detektiert werden, wobei für bis zu 74% der dort annotierten Proteine Phosphopeptide identifiziert wurden. Dies stellt nicht nur eine ausgeprägte Regulation sondern auch eine bemerkenswert hohe Abdeckung des Proteoms für eine Phosphoproteomstudie dar.

Die Identifikation von phosphoregulierten Netzwerken im Kontext bekannter biologischer Interaktionen mit STRING veranschaulicht die Plk1-gesteuerte Regulation multipler Phosphoproteine in eng verknüpften Netzwerkmodulen und lässt darauf schließen, dass die Proteinkinase eine koordinierte Kontrolle über mehrere mitotische Prozesse ausübt anstatt einzelne Komponenten gezielt zu steuern.

Regulation von Proteinen des Zellkernporenkomplex und der Zellkernmembran. Nach Plk1 Aktivierung konnte ein Anstieg der Phosphorylierung zahlreicher Proteine des Zellkernporenkomplexes und der Zellkernmembran detektiert werden. Dies steht im Einklang mit dem Ergebnis einer vor kurzem publizierten Studie von Santamaria *et al.* (2011), die ebenfalls den NPC als einen wichtigen Ort der Plk1-gesteuerten Regulation identifizierte und deutet auf Plk1 Funktionen bei der Einleitung der offenen Mitose wie der Auflösung der Zellkernmembran (*nuclear envelope breakdown (NEB)*), als auch des NPC in der Prometaphase hin. Eine Erklärung für diese Funde lieferte bereits eine Studie in intakten somatischen Zellen, die zeigte, dass die Blockierung von Plk1 durch den Inhibitor BI2536 keinen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf des Eintritts in die Prophase hat, sondern zu einer starken Verzögerung des Übergangs in die Prometaphase führt (Lenart *et al.*, 2007).

Die Plk1-abhängige Phosphorylierung von Lamin-A/C und B, des Lamina-assoziierten Proteins Lap2 (*lamina-associated polypeptide 2*) und von Man1 (*inner nuclear membrane protein Man1*), einem Protein der inneren nuklearen Membran, welche in der vorliegenden Studie als hochsignifikant reguliert detektiert wurden, könnten Auslöser für die Auflösung der Zellkernmembran sein. Dies geschieht eventuell in Kombination mit der

nuklearen Form des aktiven Cyclin-B/Cdk1 Komplexes, für den eine wichtige Rolle beim NEB bereits bekannt ist (Gong *et al.*, 2007).

Vor der tatsächlichen Auflösung der Zellkernmembran wird bereits die Permeabilität des Zellkernporenkomplexes durch dessen Dissoziation verändert. Innerhalb von Minuten zerfällt die zwei Megadalton große Struktur in einzelne Proteine oder Unterkomplexe (Kutay und Hetzer, 2008). Eines der ersten Proteine, das aus dem Komplex freigesetzt wird, ist Nup98 (*nuclear pore complex protein 98*), ein in der Signalkaskade unter Plk1 stehendes Protein, das auch in dieser Analyse identifiziert wurde (Dultz *et al.*, 2008). Mit großer Wahrscheinlichkeit folgen andere, sich in der Peripherie des NPC befindende Proteine, unter anderem TPR (*nucleoprotein TPR*) auf der nukleären, oder RanBP2 auf der zytoplasmatischen Seite des NPC. Beide Proteine trugen nach Plk1 Aktivierung induzierte Phosphorylierungsstellen, deren Sequenzumgebung mit dem Plk1 Konsensusmotiv übereinstimmte. Neben der Auflösung der Zellkernmembran könnten die Plk1 Phosphorylierungen von Nup107, Nup96 oder RanBP2 auch die beschriebenen mitotischen Funktionen dieser integralen oder assoziierten Bestandteile des NPC regulieren. Eine Einheit des Nup107 Komplexes (bestehend aus Nup160, Nup133, Nup107 und Nup96) ist nach der Dissoziation des Zellkernporenkomplexes an den Kinetochoren zu finden (Belgareh *et al.*, 2001; Loiodice *et al.*, 2004). Zudem konnte eine massenspektrometrische Studie zwölf mitotische Phosphorylierungsstellen innerhalb dieses Komplexes identifizieren (Glavy *et al.*, 2007). Passend zu dieser speziellen mitotischen Lokalisation zeigen Daten aus dem zellfreien System von *Xenopus laevis* Oozytenextrakten, sowie siRNA basierte *knock-down* Experimente in somatischen Zellen, dass der Nup107 Komplex für den richtigen Spindelaufbau und eine korrekte Kinetochorfunktion benötigt wird. (Orjalo *et al.*, 2006; Zuccolo *et al.*, 2007). Gleichermäßen ist ein Komplex aus RanBP2, SUMO-modifiziertem RanGAP1 und dem nuklearen Exportrezeptor Crm1 (*exportin 1*) mit den Kinetochoren assoziiert und für deren fehlerfreie Funktion verantwortlich (Salina *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 2004; Arnaoutov *et al.*, 2005). Interessanterweise hängt die Rekrutierung des RanBP2 Komplexes von der Lokalisation des Nup107 Komplexes am Kinetochor ab. Die Plk1-abhängige Phosphorylierung von Nup107, Nup96 oder RanBP2 könnte daher die Verlagerung der entsprechenden mitotischen Subkomplexe des NPC zum Kinetochor bewirken, damit diese dort ihre mitotischen Funktionen ausüben können.

Regulation von Proteinen des Kinetochors, der mitotischen Spindel und des Zentrosoms.

Neben Proteinen des NPC, die erst nach der Auflösung der Zellkernmembran an den Kinetochoren ortbar sind, konnten in dieser Studie eine Reihe elementarer Bestandteile des Kinetochors gefunden werden, die nach Plk1 Aktivierung einen Anstieg ihrer Phosphorylierung aufwiesen. Unter ihnen befinden sich INCENP, das Motorprotein CENP-E, die Spindelcheckpunktregulatoren Haspin (*serine/threonine-protein kinase haspin*) und Bub1, sowie zahlreiche weitere Zentromerkomponenten. Dies unterstreicht die essentielle und konservierte Funktion von Plk1 im Spindelcheckpunkt (Dai *et al.*, 2003).

BubR1, dessen Plk1 Interaktion gut beschrieben ist und dessen Phosphorylierungszustand in Vorexperimenten zur Festlegung des Inhibitionsschemas diente, befindet sich aufgrund der sehr stringenten statistischen Kriterien nicht in der Liste der Plk1 regulierten Phosphoproteine. Zwar konnte eine starke Regulation von Thr710 in hTERT-RPE Plk1^{as} Zellen festgestellt werden, in allen Replikaten mit Wildtypzellen wurde jedoch nur ein Ratio detektiert, weshalb diese Phosphorylierungsstelle nicht in die Analysen mit eingehen konnte (siehe Anhang Tabelle A2).

Nach Erfüllung der Spindelcheckpunktkriterien erfolgt die Trennung der Chromosomen und die Segregation der Chromatiden, was die Hauptfunktion der mitotischen Spindel darstellt. Der Aufbau des Spindelapparates wird in eukaryotischen Systemen im Allgemeinen von den Polo Kinasen gelenkt. Im Einklang damit konnten in dieser Studie zahlreiche Plk1-abhängige Phosphorylierungsstellen auf bekannten Spindelproteinen detektiert werden. Neben Motorproteinen wie KIF18A und KIF20A für die Funktionen in der Spindelorganisation bereits beschrieben worden sind, wurden mehrere gut charakterisierte Mikrotubuli-assoziierte Proteine wie NuMA (*nuclear mitotic apparatus protein 1*), Tpx2 (*targeting protein for Xklp2*) und Clasp2 (*CLIP-associating protein 2*) identifiziert. Zudem konnten phosphoregulierte Proteine gefunden werden, die die Kommunikation zwischen der Spindel und den Chromosomen vermitteln. Zu ihnen gehören das Chromokinesin KIF4A, sowie das kürzlich charakterisierte MKI-67 (*antigen KI-67*), das für die Kontaktvermittlung zwischen dem Motorprotein KIF15 (auch Hk1p2) und den Chromosomen verantwortlich ist (Vanneste *et al.*, 2009).

Die ausgeprägteste Plk1 vermittelte Phosphoregulation unter den Spindelproteinen und Regulatoren der Spindelfunktionen wurde jedoch bei den Proteinen des *anaphase*

promoting complex (APC) ausgemacht. Bekanntermaßen werden zentrale Untereinheiten des APC von Cdk1 und Plk1 phosphoryliert, um eine Cdc20-abhängige Aktivierung des Komplexes zu ermöglichen (Peters, 2006). Zudem ist es vorstellbar, dass die unterschiedlichen Substrate, welche vom APC erkannt werden müssen, genauso wie die Vielzahl der verschiedenen Signale, die an der Regulation des APC beteiligt sind, die reversible Modifikation von APC Untereinheiten erforderlich machen. In diesem Sinn wurden zahlreiche Plk1 regulierte Phosphopeptide, die von den APC Komponenten ANAPC1, Cdc27 (auch ANAPC3), Cdc16 (auch ANAPC6) und Cdc23 (auch APC8) stammten, gefunden. Die Daten deuten auf eine deutlich ausgeprägtere Phosphoregulation des APC durch Plk1 hin als bisher angenommen und stellen eine maßgebliche Erweiterung des Wissens um die Phosphorylierungsstellen-spezifische mitotische Regulation des Komplexes dar (Kraft *et al.*, 2003).

Die Plk1-abhängige Phosphorylierung von Tubulin, dem abundantesten Protein der Spindel, ist eine von mehreren Plk1-Verbindungen zum Zentromer, die in dieser Studie identifiziert werden konnten. Durch die zelluläre Aktivierung von Plk1 wurde die Tubulin α -1C Kette an Ser48, einer dem Konsensusmotiv entsprechenden Stelle, in deutlichem Maße phosphoryliert. Diese Aminosäure befindet sich in einem Abschnitt des Proteins, in dem sich α - und β -Tubulin signifikant unterscheiden. Strukturelle Daten sagen voraus, dass diese Phosphorylierung innerhalb des 25 nm Filaments begraben liegt (Nogales *et al.*, 1998). Dies lässt vermuten, dass die Phosphorylierung auf der Ebene des Tubulindimers stattfindet, was wiederum die Zugänglichkeit für Tubulin-bindende Proteine und/oder die Eingliederung in das wachsende Polymer regulieren könnte. Für diese Sichtweise spricht auch die hier identifizierte Plk1-abhängige Phosphorylierung des zentrosomalen Mikrotubuli-destabilisierenden Proteins Stathmin, das an ein Heterotetramer aus jeweils zwei α - und β -Tubulinuntereinheiten binden kann (Redeker *et al.*, 2000; Steinmetz *et al.*, 2000). Interessanterweise wurde in *Xenopus laevis* eine Negativregulation dieses Proteins durch Plx1 beschrieben, die letztlich die Mikrotubulipolymerisation förderte (Budde *et al.*, 2001).

Plk1 könnte auch in die Kontrolle seiner eigenen Aktivität am Zentromer involviert sein. Für ein Phosphopeptid der regulatorischen Untereinheit Mypt1 (PPP1R12A) der Proteinphosphatase PP1C konnte eine deutliche Induktion festgestellt werden. Ob dies die Plk1 Negativregulation durch Mypt1 vermittelte PP1C Dephosphorylierung (Yamashiro

et al., 2008) konterkariert wäre eine interessante Fragestellung für weiterführende Studien.

Die Organisation der Mikrotubuli am Zentromer wird von Plk1 an mehreren Stellen beeinflusst. Ein bislang nicht beschriebenes Substrat dieser Schnittstelle ist Cep192, das in dieser Studie an einer mit dem Plk1 Konsensusmotiv übereinstimmenden Stelle phosphoryliert wurde (Gomez-Ferrera *et al.*, 2007). Dies auch für Cep107 der Fall, das bereits in einem *yeast two-hybrid screen* als Plk1 Interaktionspartner und *in-vitro* Substrat identifiziert wurde (Guarguaglini *et al.*, 2005). Gleichmaßen konnten auf Aspm zwei Plk1-regulierte Phosphorylierungsstellen detektiert werden, einem Zentromerprotein, das in *Drosophila* als Polo Substrat klassifiziert wurde (do Carmo Avides *et al.*, 2001). Nicht nur an diesem Plk1 Aktivitätsbereich wird anschaulich klar, wie genau der gewählte Ansatz vorhandenes Wissen abbildet und erweitert.

Bei der hier detektierten S436-Phosphorylierung von Cep55 handelt es sich ebenfalls um eine bereits beschriebene Modifikation (Fabbro *et al.*, 2005). Dem phosphorylierten Protein wird eine wichtige Rolle in der Zytokinese zugeschrieben. Neuere Forschungen belegen immer deutlicher, wie wichtig die Plk1 Aktivität für einen geordneten Ablauf dieser Zellzyklusphase ist. Die Ergebnisse dieser Studie können dies nur unterstreichen: Für Cep97, ein neues Plk1 Substrat, wurden Funktionen in der Zytokinese beschrieben (Spektor *et al.*, 2007). Des Weiteren wurden nicht nur auf dem bekannten Plk1 Interaktionspartner RacGAP1 drei Plk1-regulierte Phosphorylierungsstellen identifiziert (Burkard *et al.*, 2009). Auch für die weiter *downstream* liegenden Akteure der Rho Signaltransduktionskette, Ect2 und Myosin-9, konnte eine Regulation durch Plk1 festgestellt werden.

Regulation von Ubiquitylierungsenzymen. Die Ergebnisse lassen auch auf mögliche Plk1 Effekte auf die Ubiquitylierung mitotischer Proteine schließen, die über die Regulation von Komponenten des APC hinausgehen. Plk1-abhängige Phosphorylierungsstellen konnten auf der E3 Ligase Huwe1 und auf zwei Untereinheiten des SCF Ubiquitin Ligase Komplexes, Sugt1 (*suppressor of G2 allele of SKP1 homolog*) und Fbxo30 (*F-box only protein 30*) detektiert werden. Zudem konnten die Ubiquitinhydrolasen Usp5 und Usp47 (*ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5 und 47*) als zelluläre Plk1 Ziele identifiziert werden, was nahe legt, dass Plk1 das Wechselspiel von Ubiquitylierungs- und Deubiquitylierungsprozessen während des Fortschreitens der Mitose koordiniert.

Regulation von Phosphatasen. Die in dieser Studie identifizierte Induktion der Phosphorylierung der Phosphatase Cdc25C an Ser191 lässt auf einen weiteren Mechanismus schließen, mit dem Plk1 den Übergang von G2 in die M-Phase reguliert. Die Phosphorylierung dieser Aminosäure wurde bereits als spezifische Modifikation der verwandten Kinase Plk3 beschrieben und fördert die Relokalisation der Phosphatase in den Nukleus (Bahassi *et al.*, 2004). Die Plk1-gesteuerte Phosphoregulation von Proteinphosphatasen könnte auch die Suppression von Phosphorylierungsstellen einiger Proteine erklären, die nach dem Auswaschen des Inhibitors 3-MB-PP1 aus Plk1^{as} Zellen festgestellt werden konnte.

Regulation von DNA Helikasen und Topoisomerasen. Die GO Analyse der molekularen Funktionen Plk1 regulierter Phosphoproteine ergab eine starke Anreicherung von Enzymen mit Helikase- und Topoisomeraseaktivität. Mehrere Plk1 regulierte Phosphorylierungsstellen konnten auf der Plk1-interagierenden ATPase PICH, einem Mitglied der Snf2 Familie identifiziert werden, welches in die Signaltransduktion des Spindelcheckpunkts involviert ist (Baumann *et al.*, 2007). Zudem konnte neben Topoisomerase 2 α , die eine essentielle Rolle bei der korrekten Segregation der Chromosomen spielt (Carpenter und Porter, 2004), auch für Topoisomerase 1, der bis jetzt keine bestimmte mitotische Funktion zugeschrieben wurde, eine Plk1-abhängige Phosphoregulation festgestellt werden. Gemeinsam mit der Identifikation zahlreicher weiterer regulierter Phosphorylierungen von ATP-abhängigen DNA Helikasen und Topoisomerasen (siehe Tabelle 12) verweisen diese Ergebnisse auf einen bedeutenden Aktivitätsbereich von Plk1, der in bisherigen Studien wenig Beachtung gefunden hat.

Regulation von Signaltransduktionswegen. Die Daten zeigen nach induzierter Plk1 Aktivität eine ausgeprägte Regulation zahlreicher Mitglieder des mTOR (*mammalian target of rapamycin*) Signalwegs, dessen mitotische Funktionen noch weitestgehend unklar sind (Wang und Proud, 2009). Tsc2 (*tuberous sclerosis 2 protein*), ein bereits als Plk1 Interaktionspartner beschriebenes Protein, wurde an einem Serinrest phosphoryliert, dessen Umgebung dem Plk1 Konsensusmotiv entspricht und dadurch mit großer Wahrscheinlichkeit ein direktes Plk1 Substrat darstellt (Astrinidis *et al.*, 2003). Zudem handelt es sich bei den Plk1 regulierten Phosphorylierungsstellen Thr267 (Thr246 in Sancak *et al.*, 2007) auf PRAS40 (*proline-rich AKT1 substrate 1*) und 4E-BP1 (Ser112;

eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1), sowie bei einer der drei Phosphorylierungsstellen auf einem Plk1 regulierten Phosphopeptid des Proteins Raptor (Ser863; *regulatory-associated protein of mTOR*) um funktionelle Modifikationen, die alle auf eine Aktivierung des mTOR Komplexes 1 hindeuten (Wang *et al.*, 2003; Sancak *et al.*, 2007; Foster *et al.*, 2010).

Mit der Detektion einer verstärkten Phosphorylierung des EGF Rezeptors an Ser1064, dessen Sequenzumgebung dem Plk1 Konsensusmotiv entspricht, konnte eine neue Verbindung von Plk1 mit einem weiteren Signalweg aufgezeigt werden. Die Plk1-gesteuerte EGFR Regulation könnte Teil eines konzertierten Mechanismus sein, da zur Liste der Plk1 regulierten Proteine auch die EGFR Substrate Eps15 und Eps15R (*epidermal growth factor receptor substrate 15* und *15-like-1*) gehören, für die eine Negativregulation der EGFR Signaltransduktion beschrieben wurde (Naslavsky und Caplan, 2011). Auch sind Eps15 und Eps15R an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt ähnlich wie Synaptojanin-1 (Synj1), für welches ebenfalls eine durch Plk1 Aktivität induzierte Phosphorylierung an der mit dem Konsensusmotiv übereinstimmenden Stelle Ser830 festgestellt werden konnten.

Zusammenfassend konnten in dieser Phosphoproteomikstudie zur Analyse der Signalweiterleitung durch Plk1 in der Mitose nicht nur bekannte Interaktionen bestätigt werden, sondern auch zahlreiche neue und bis jetzt unbeachtete Funktionen der Kinase in verschiedensten mitotischen Prozessen und Netzwerken identifiziert werden. Diese Studie stellt somit eine stark vergrößerte Wissensgrundlage dar und bietet zahlreiche interessante Startpunkte für weiterführende funktionelle Studien Kinase-gesteuerter mitotischer Vorgänge.

Tabelle 12: Ausgewählte Plk1 regulierte Phosphorylierungsstellen und Phosphopeptide.

Name des Proteins (Tabellenteil 1)	Kurzbezeichnung ^a	Phosphorylierungsstelle bzw. Anzahl an Phosphorylierungsstellen	Sequenzfenster ^b bzw. Sequenz des Phosphopeptids	Motiv ^c	Häufigkeit der	Ratio (Median)	Häufigkeit der	Ratio (Median)
					Detektion in Plk1 ^{as} Zellen ^d	Plk1 ^{as} Zellen	Detektion in Plk1 ^{wt} Zellen ^d	Plk1 ^{wt} Zellen
Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	ASPM	S283	TETSFN <u> </u> VNVANGQ		2	10,88	2	1,12
Abnormal spindle-like microcephaly-associated protein	ASPM	S370	KILSPD <u> </u> FIKDNY		4	5,13	4	0,90
Anaphase-promoting complex subunit 1	ANAPC1	S377 ^e	ISSHNQ <u> </u> PKRHSI	D/E/N-X-pS/pT	4	5,75	4	0,99
Antigen KI-67	MKI67	S1118	PGPSEE <u> </u> MTDEKT	PIK1	4	15,71	3	1,06
ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	XRCC6	S6	_MSGWE <u> </u> YYKTEG		4	7,38	4	0,96
ATP-dependent helicase SMARCAD1	SMARCAD1	S146	RRNDDI <u> </u> ELEDLS	D/E/N-X-pS/pT	4	2,06	2	1,00
Cell division cycle protein 16 homolog	CDC16	S112 ^e	KYLKDE <u> </u> GFKDPS	D/E/N-X-pS/pT	2	20,19	4	1,03
Cell division cycle protein 23 variant	CDC23	3 pSTY	RVSPNLLSVTP		2	2,62	2	0,99
Cell division cycle protein 27 homolog	CDC27	S387	LFTSDS <u> </u> TTKENS	D/E/N-X-pS/pT	4	2,12	3	1,01
Cell division cycle protein 27 homolog	CDC27	S426 ^e	QPNIND <u> </u> LEITKL	PIK1	4	18,06	4	0,98
Cell division cycle protein 27 homolog	CDC27	S435 ^e	ITKLDL <u> </u> IIEGK	PIK1	4	9,37	4	0,99
Centromere protein E	CENP-E	S611	NIKMDL <u> </u> YSLESI	PIK1	4	7,90	3	1,01
Centromere protein F	CENP-F	S1747	LOGLDL <u> </u> SRSLLG	D/E/N-X-pS/pT	4	24,13	4	0,96
Centromere protein N	CENP-N	S282	KSGLNG <u> </u> ILAERE	PIK1	2	2,83	2	1,33
Centromere protein U	MLF1IP	S232	AIGSDT <u> </u> DIVHIW	D/E/N-X-pS/pT	2	2,53	2	1,05
Centrosomal protein of 170 kDa	CEP170	S887	SIDPDS <u> </u> MDTTLI	PIK1	4	7,82	4	1,01
Centrosomal protein of 192 kDa	CEP192	S1502	KHGGNV <u> </u> LDVLPV	PIK1	2	5,58	2	0,95
Centrosomal protein of 55 kDa	CEP55	S436 ^f	TAALNE <u> </u> LVECPK	PIK1	4	7,72	4	0,94
Centrosomal protein of 97 kDa	CEP97	S308	RQLMNQ <u> </u> QNEELS	D/E/N-X-pS/pT	4	2,99	3	1,03
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4	CHD4	S1676	EKVEEK <u> </u> AIDLTP	D/E/N-X-pS/pT	3	8,70	4	0,95
Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8	CHD8	S1544	RVLDNF <u> </u> DIVEGV	D/E/N-X-pS/pT	3	2,12	2	0,96
Chromosome-associated kinesin KIF4A	KIF4A	S1038	EKFLEQ <u> </u> MDIEDL	PIK1	4	13,71	4	0,98
CLIP-associating protein 2	CLASP2	S1186	EAIQNF <u> </u> FRSQED	PIK1	4	9,92	2	1,23
DNA excision repair protein ERCC-6-like	ERCC6L	S810	GTGSAD <u> </u> IATLPK		2	5,60	2	0,90
DNA topoisomerase 1	TOP1	S10	DHLHND <u> </u> QIEADF	D/E/N-X-pS/pT	2	7,93	2	0,99
DNA topoisomerase 2-alpha	TOP2A	T1280	KIKNEI <u> </u> EGSPQE	D/E/N-X-pS/pT	2	5,13	4	1,11

Name des Proteins (Tabellenteil 2)	Kurzbezeichnung ^a	Phosphorylierungsstelle bzw. Anzahl an Phosphorylierungsstellen	Sequenzfenster ^b bzw. Sequenz des Phosphopeptids	Motiv ^c	Häufigkeit der Detektion in Plk1 ^{wt} Zellen ^d	Ratio (Median) -/+ 3-MB-PP1 Plk1 ^{wt} Zellen	Häufigkeit der Detektion in Plk1 ^{wt} Zellen ^d	Ratio (Median) -/+ 3-MB-PP1 Plk1 ^{wt} Zellen
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RANBP2	S1447	TKSANK <u>S</u> GSSFVH	D/E/N-X-pS/pT	3	2,12	4	0,96
E3 SUMO-protein ligase RanBP2	RANBP2	S2270	TTGFNF <u>S</u> FKSALS	Plk1	3	6,93	4	0,94
E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	HUWE1	S1368	GVRDL <u>S</u> MSEEDQ	Plk1	4	4,41	4	1,01
Epidermal growth factor receptor	EGFR	S1064	CPKED <u>S</u> FLQRY S	Plk1	2	5,65	4	1,02
Epidermal growth factor receptor substrate 15	EPS15	S467	TAELEE <u>S</u> VESGKA	Plk1	2	2,87	2	1,02
Epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1	EPS15L1	S708	LDPFES <u>S</u> DPFESS	D/E/N-X-pS/pT	2	5,68	3	0,95
Epithelial cell-transforming sequence 2 oncogene	ECT2	1 pSTY	ENLLIGSTWEEEMPQIETR		4	8,21	4	0,97
Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1	EIF4EBP1	S112	RAGGEE <u>S</u> QFEMDI	D/E/N-X-pS/pT	3	2,98	3	0,97
F-box only protein 30	FBXO30	S213	IGMLNT <u>S</u> VPNDMD	Plk1	2	6,16	3	0,97
FAS-associated death domain protein	FADD	S190 ⁶	RDLOQR <u>S</u> GAMS PM	D/E/N-X-pS/pT	2	12,88	2	0,90
Inner centromere protein	INCENP	2 pSTY	ILESITVSSLMATPQDPK		4	2,53	2	1,01
Inner nuclear membrane protein Man1	MAN1	1 pSTY	KLTPLPPPLTDMDSSTGSLK		4	0,35	4	0,93
Kinesin light chain 2	KLC2	S589	LNFLNK <u>S</u> VEPTQ	Plk1	4	10,41	4	1,00
Kinesin-like protein KIF18A	KIF18A	2pSTY	SPPSQVQLNDSLK		4	10,04	4	1,02
Kinesin-like protein KIF20A	KIF20A	S528	SFKEH <u>S</u> LQVSP S	Plk1	4	6,47	4	0,99
Lamin-A/C	LMNA	S12	QRRATR <u>S</u> GAQASS		4	1,26	4	0,98
Lamin-B1	LMNB1	S210	DLEFRK <u>S</u> MYEEI		2	2,16	4	0,99
Lamina-associated polypeptide 2 B/gamma	LAP2	S378	GRPLEL <u>S</u> DFRMEE	D/E/N-X-pS/pT	4	3,41	4	0,98
Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1	BUB1	S445	HTTPNT <u>S</u> LGMVQA	Plk1	2	1,85	2	0,86
M-phase inducer phosphatase 2	CDC25B	T69	AGLGSE <u>I</u> PKSQVG	PBD	3	1,76	2	0,96
M-phase inducer phosphatase 2	CDC25B	S160	VRLIGH <u>S</u> PVL RNI		4	1,67	4	0,95
M-phase inducer phosphatase 3	CDC25C	S191 ^h	DQAEI <u>S</u> DELMEF	D/E/N-X-pS/pT	2	8,82	2	0,88
Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1	BUB1	2 pSTY	VANTSSFHTTNTSLGMVQATPSK		3	1,58	4	0,95
Myosin-9	MYH9	T1151	KTELED <u>I</u> LDSTAA	Plk1	4	20,92	4	1,01

Name des Proteins (Tabellenteil 3)	Kurzbezeichnung ^a	Phosphorylierungsstelle bzw. Anzahl an Phosphorylierungsstellen	Sequenzfenster ^b bzw. Sequenz des Phosphopeptids	Motiv ^c	Häufigkeit der	Ratio (Median)	Häufigkeit der	Ratio (Median)
					Detektion in Plk1 ^{as} Zellen ^d	-/+ 3-MB-PP1 Plk1 ^{as} Zellen	Detektion in Plk1 ^{wt} Zellen ^d	-/+ 3-MB-PP1 Plk1 ^{wt} Zellen
Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 1	NEDD1	S404 ^l	KNQDFS S FDDTGG	PBD	3	1,79	4	0,99
Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	S1789	QAPLES L LDSLGD	Plk1	2	3,97	3	0,92
Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	S1834	PDSANS L FYSTRS	Plk1	2	3,60	4	0,95
Nuclear pore complex protein Nup107	NUP107	2 pSTY	MDRSGFGIESSPVIR		3	5,66	3	1,00
Nuclear pore complex protein Nup153	NUP153	T202	ITVSKN I SLPLW		3	2,91	2	1,10
Nuclear pore complex protein Nup205	NUP205	S1939	SRRLLQD L FASETN		4	1,66	2	1,22
Nuclear pore complex protein Nup214	NUP214	S970	PASLSR L AFLSQR		2	6,78	2	1,67
Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	NUP98	S664	GNKHSN L NSVDDT		2	3,91	3	1,05
Nuclear pore complex protein Nup98-Nup96	NUP98	T983	MKASLL I DEEDVD		4	1,91	4	1,04
Nucleophosmin	NPM1	S4 ^l	—MED L MDMDMMS	Plk1	4	2,41	4	0,98
Nucleoporin NUP53	NUP35	S99	SIYDDI L SPGLGS	D/E/N-X-pS/pT	2	12,04	2	0,95
Nucleoporin TPR	TPR	S1185	QGPLNV L LSEEGK	Plk1	4	5,28	4	1,00
Nucleoporin TPR	TPR	S2048	TGAAES L FSQEVLS	Plk1	2	14,55	2	0,92
PLK1-interacting checkpoint helicase	ERC6L	S1000	HSKTCL L WEFSEK		2	1,86	2	0,94
PLK1-interacting checkpoint helicase	ERC6L	S1004	CLSWEF L EKDDPEP	D/E/N-X-pS/pT	2	2,06	2	0,96
Poly [ADP-ribose] polymerase 4	PARP4	T768	NENLQD I VEKICI		4	2,62	4	1,03
Poly [ADP-ribose] polymerase 4	PARP4	S1288	EKLIDL L WTESCK	Plk1	4	7,05	4	0,97
Poly(A)-specific ribonuclease PARN	PARN	S557	HYRRNN L FTAPST	Plk1	4	2,70	4	1,01
Proline-rich AKT1 substrate 1	AKT1S1	S267	RPRLLT L DFQKIK	D/E/N-X-pS/pT	3	4,83	4	0,99
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	PPP1R12A	1 pSTY	FADRSLLMEK		3	11,27	4	0,97
Rac GTPase-activating protein 1	RACGAP1	S154	EGSIL L DISFDK		3	10,39	2	0,94
Rac GTPase-activating protein 1	RACGAP1	S157 ^k	SILSDI L FDKTDE	Plk1	3	11,83	2	0,99
Rac GTPase-activating protein 1	RACGAP1	S170 ^k	SLDWDS L LVKTFK	Plk1	3	3,89	3	0,74
Rapamycin-insensitive companion of mTOR	RICTOR	S1370	ITMKAN L FESRLT		4	2,91	4	0,99
Rapamycin-insensitive companion of mTOR	RICTOR	T1376	SFESRL I PRFMIK		3	2,95	4	0,95
Regulatory-associated protein of mTOR	RAPTOR	3 pSTY	VLDTSSLIQSAPSPITNK		3	5,19	3	1,03

Name des Proteins (Tabellenteil 4)	Kurzbezeichnung ^a	Phosphorylierungsstelle bzw. Anzahl an Phosphorylierungsstellen	Sequenzfenster ^b bzw. Sequenz des Phosphopeptids	Motiv ^c	Häufigkeit der Detektion in PIK1 ^{as} Zellen ^d	Ratio (Median) +/- 3-MB-PP1 PIK1 ^{as} Zellen	Häufigkeit der Detektion in PIK1 ^{wt} Zellen ^d	Ratio (Median) +/- 3-MB-PP1 PIK1 ^{wt} Zellen
Serine/threonine-protein kinase haspin	GSG2	S288	EGPGLS <u>S</u> TGKRRR	PBD	3	2,26	2	0,98
Serine/threonine-protein kinase haspin	GSG2	T289	GPGLSS <u>I</u> GKRRAT	PBD	4	2,19	2	1,03
Shugoshin-like 2	SGOL2	2 pSTY	SLSEIHSPNIQDSFDSVR		2	1,74	2	1,03
Stathmin	STMN1	S46	PKKKDL <u>S</u> LEEIQK	PIK1	4	1,71	4	1,00
Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	SUGT1	S331	KRAMNK <u>S</u> FMESGG	PIK1	2	4,38	3	1,00
Synaptojanin-1	SYNJ1	S830	LDLLNA <u>S</u> FQDESK	PIK1	3	4,94	3	1,04
Targeting protein for Xklp2	TPX2	S646	PKKEKK <u>S</u> VAEGLS		3	1,58	2	0,93
Targeting protein for Xklp2	TPX2	S652	SVAEGL <u>S</u> GSLVQE		2	3,41	2	1,07
Tuberous sclerosis 2 protein	TSC2	S1346	SSQEEK <u>S</u> LHAEEEL	PIK1	4	2,75	4	1,01
Tubulin α -1C chain	TUBA1C	S48	IGGGDD <u>S</u> FNTFFS	PIK1	4	9,08	4	1,08
Tubulin β -2C chain	TUBB2C	1 pSTY	NSSYFVEWIPNNVK		3	1,70	4	1,01
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47	USP47	S876	EAILLE <u>S</u> TEKLKS	D/E/N-X-pS/pT	2	2,81	4	0,99
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	USP5	S760	GRSAAD <u>S</u> ISESVP		3	6,23	3	1,93

^a Abkürzung des Proteinennamens nach PhosphoSitePlus (<http://phosphosite.org>);

^b Phosphorylierungsstelle jeweils unterstrichen und fett markiert;

^c PIK1: PIK1 Konsensusmotiv D/E/N-X-pS/pT- ϕ (Burkard *et al.*, 2009), PDB: PDB Erkennungsmotiv S-pS/pT-P/X (Eliä *et al.*, 2003a);

^d Anzahl der biologischen Replikate in denen die Phosphorylierungsstelle bzw. das Phosphopeptid quantifiziert wurde;

^e bekannte *in-vitro* PIK1 Phosphorylierungsstelle (Kraft *et al.*, 2003);

^f bekannte *in-vivo* PIK1 Phosphorylierungsstelle (Fabbro *et al.*, 2005);

^g bekannte *in-vivo* PIK1 Phosphorylierungsstelle (Alappat *et al.*, 2005);

^h bekannte *in-vivo* PIK3 Phosphorylierungsstelle (Bahassi *et al.*, 2004);

ⁱ bekannte *in-vitro* PIK1 Phosphorylierungsstelle, Position der Phosphorylierungsstelle nach der IPI Datenbank, entspricht der Position Ser397 des Eintrags für NEDD1_human der UniProtKB Datenbank NEDD1 (Zhang *et al.*, 2009);

^j bekannte *in-vivo* PIK1 Phosphorylierungsstelle (Zhang *et al.*, 2004);

^k bekannte *in-vivo* PIK1 Phosphorylierungsstelle (Burkard *et al.*, 2009).

4.1.2 *MPS1 STUDIE*

Die Proteinkinase Mps1 ist in die Zellproliferation involviert und spielt in der Mitose eine elementare Rolle bei der Ausrichtung der Chromosomen, sowie der Aufrechterhaltung des mitotischen Spindelcheckpunkts. In der Substratidentifikationsstudie konnten neben zahlreichen Mps1 Autophosphorylierungsstellen elf zelluläre Mps1 regulierte Phosphoproteine detektiert werden, unter denen sich sowohl bekannte als auch unbekannte Mps1 Interaktionspartner befinden. Für nahezu alle identifizierten Proteine ist eine mitotische Funktion an den Mikrotubuli, dem Kinetochor oder dem Zentromer beschrieben, was die hohe Spezifität dieses Ansatzes unterstreicht und das Aktivitätsspektrum von Mps1 bei der Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore verdeutlicht.

Mps1 Autophosphorylierung. Die ausgeprägteste Änderung des Phosphorylierungsstatus nach Mps1 Inhibition wurde in dieser Studie an Mps1 selbst detektiert. An insgesamt sechs Ser-/Thr-Phosphorylierungsstellen konnte eine bis zu 60-fache Abnahme der Phosphorylierung festgestellt werden (siehe Tabelle 7). Die Hyperphosphorylierung von Mps1 in der Mitose ist gut dokumentiert (Stucke *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Fisk *et al.*, 2004; Stucke *et al.*, 2004). Mps1 wird sowohl durch Autophosphorylierung als auch durch Transphosphorylierung von MAP beziehungsweise Cdk2 Kinasen modifiziert und dadurch aktiviert, was die Ausübung ihrer Spindelcheckpunkt Funktionen, sowie die Rekrutierung von Bub1, Bub3, Mad1 und Mad2 zum Kinetochor ermöglicht (Zhao und Chen, 2006; Kang *et al.*, 2007; Kasbek *et al.*, 2007). Bei vier der hier identifizierten Phosphorylierungsstellen (Thr33, Ser80, Thr360, Ser363) handelt es sich um beschriebene Autophosphorylierungsstellen außerhalb der Kinasedomäne im N-terminalen Bereich des Proteins (Kang *et al.*, 2007; Jelluma *et al.*, 2008a; Xu *et al.*, 2009). Zwei weitere Phosphorylierungsstellen in dieser Proteinregion (Ser49, Ser321) wurden in groß angelegten Phosphoproteomik Studien identifiziert, aber nicht funktionell charakterisiert (Daub *et al.*, 2008; Dephoure *et al.*, 2008; Oppermann *et al.*, 2009). Unter den vier bekannten Sites befindet sich keine Phosphorylierungsstelle, die einer anderen Kinase zugeordnet werden kann, was darauf schließen lässt, dass es sich auch bei Ser49 und Ser321 um Autophosphorylierungsstellen handelt. Allerdings konnte in dieser Studie nur einen relativ kleiner Teil der für Mps1 beschriebenen Autophosphorylierungsstellen

detektiert werden. Dies könnte einerseits daran liegen, dass durch die massenspektrometrische Analyse nie alle vorhandenen Phosphorylierungsstellen gemessen werden können und die Daten zudem mit sehr stringenten statistischen Kriterien analysiert wurden. Andererseits lässt sich dies aber auch mit dem gewählten Inhibitionsmodus begründen: Durch die Inaktivierung von Mps1 wurden keine direkten Phosphorylierungsereignisse gemessen, sondern die Abnahme der Phosphorylierung durch Phosphataseaktivität detektiert. Dadurch konnten Phosphorylierungsereignisse, die zwar durch Mps1 erfolgten, jedoch durch fehlende, beziehungsweise zu geringe Phosphataseaktivität nicht rückgängig gemacht wurden, nicht detektiert werden.

Regulation von Motorproteinen der mitotischen Spindel. Kinesinmotorproteine der Mikrotubuli sind während der Mitose in den Aufbau, die Organisation, die Stabilisierung und die Funktionen des Spindelapparates involviert. Mit CENP-E und KLC2 (*kinesin light chain 2*), der leichten Kette des Kinesin-1 Motors, sowie dem Mikrotubuli assoziierten Protein MAP1B (*microtubule-associated protein 1B*) wurden drei Proteine dieses Themenkomplexes identifiziert, die von Mps1 reguliert werden.

CENP-E, ein Kinetochor-lokalisiertes, zum Plusende gerichtetes Mikrotubulimotorprotein der Kinesin-7 Familie, ist an der koordinierten Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene beteiligt. In *Xenopus laevis* wird die Aktivität der CENP-E Motordomäne durch Assoziation mit der C-terminalen Domäne des Proteins autoinhibiert. Die Phosphorylierung dieser Domäne durch *Xenopus* Mps1 oder Cdk1/Cyclin-B hebt diese Interaktion auf, wodurch der CENP-E ATPase Motor aktiviert wird (Espeut *et al.*, 2008). Nach Mps1 Inhibition konnte ein stark negativ reguliertes, 2-fach phosphoryliertes Peptid dieser C-terminalen Domäne identifiziert werden, dessen beide Phosphorylierungsstellen bereits in einer massenspektrometrischen Studie des Spindelphosphoproteoms beschrieben wurden (Nousiainen *et al.*, 2006). Dies bedeutet, dass Mps1 auch im humanen System eine elementare Rolle bei der dynamischen Phosphoregulation von CENP-E am Kinetochor spielt und lässt darauf schließen, dass es sich bei diesem Mechanismus um einen in verschiedenen Spezies konservierten Signalweg handelt. In Übereinstimmung damit konnten Hewitt *et al.* feststellen, dass die Lokalisation von CENP-E am Kinetochor stark von einer aktiven Mps1 abhängt und es sich bei CENP-E um einen wichtigen *downstream* Effektor dieser Kinase handelt (Hewitt *et al.*, 2010).

Kinesin-1 besteht aus zwei schweren (KHCs) und zwei leichten Ketten (KLCs) und ist ein plusgerichtetes Mikrotubulimotorprotein, das für den Transport von Vesikeln, Organellen und mRNA verantwortlich ist. Das Protein interagiert über seine leichten Ketten auch mit dem minusgerichteten Motorprotein Dynein und kooperiert mit diesem beim bidirektionalen Transport von Cargo entlang der Mikrotubuli (Ligon *et al.*, 2004). Zudem werden beiden Motorproteinen antagonistische Rollen bei der relativen Positionierung von Nukleus und Zentrosomen vor dem Eintritt in die Mitose zugeschrieben (Splinter *et al.*, 2010). Auf der leichten Kinesinkette KLC2 konnte eine Mps1 regulierte Phosphorylierungsstelle detektiert werden (Ser581). Wie auch CENP-E nimmt inaktives Kinesin-1 eine gefaltete Konformation an, bei der die leichten Ketten direkt mit den Motordomänen interagieren und dadurch die Motilität des Proteins inhibieren (Cai *et al.*, 2007). Kinesin-1 wird durch die Bindung an zwei Proteine aktiviert (Blasius *et al.*, 2007), dies scheint jedoch nicht der einzige Aktivierungsmechanismus zu sein, nachdem Kinesin-1 auch trotz Frachtproteinbindung inaktiv vorliegen kann (Wozniak und Allan, 2006). In Anbetracht dieser Ergebnisse wäre auch hier analog zu CENP-E eine mögliche Erklärung, dass die Phosphorylierung der leichten Kinesinketten durch Mps1 die Assoziation mit der Motordomäne aufhebt und das Protein dadurch aktiviert wird. Eine weitere durch Mps1-gesteuerte Regulation von Kinesin-1 könnte indirekt über MAP1B erfolgen. Das Mikrotubuli-assoziierte Protein, auf dem eine Mps1 regulierte Thr-Phosphorylierungsstelle (Thr837) identifiziert werden konnte, kann einen negativen Einfluss auf die Bindung von Kinesin-1 an die Mikrotubulistränge haben (Verhey und Hammond, 2009).

Regulation von Proteinen des äußeren Kinetochors und der Corona. Die Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore ist sehr dynamisch und zahlreiche am Kinetochor-lokalisierte Proteinkomplexe sind in diesen Prozess involviert (Cheeseman und Desai, 2008). Eine zentrale Rolle spielt dabei das im äußeren Kinetochor lokalisierte und aus drei Einheiten bestehende KMN (KNL1 (bekannter als Protein CASC5), Mis12, Ndc80) Netzwerk, für dessen Komponente CASC5, eine Mps1-abhängige Regulation an zwei Serin-Phosphorylierungsstellen (Ser1831 und Ser1834) detektiert werden konnte. CASC5 bildet zusammen mit den aus jeweils vier Untereinheiten bestehenden Komplexen Mis12 und Ndc80 die Kernstruktur für die Mikrotubulibindung (Cheeseman *et al.*, 2006; DeLuca *et al.*, 2006; Ciferri *et al.*, 2008). Wird nur eine einzige Komponente dieses Netzwerkes

entfernt wird die Struktur des äußeren Kinetochors so nachhaltig gestört, dass keine Bindung an die Mikrotubuli mehr möglich ist (DeLuca *et al.*, 2005; Kline *et al.*, 2006). Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Bindungsaktivität des Ndc80 Komplex an Mikrotubuli durch Aurora-B Phosphorylierung seiner N-terminalen, unstrukturierten Region reguliert wird. Welburn *et al.* (2010) demonstrierten in einer vor kurzem publizierten Studie, dass Aurora-B zudem Dsn1 (*kinetochore-associated protein DSN1*), eine Untereinheit des Mis12 Komplexes und CASC5 phosphoryliert. Sie fanden, dass die Phosphorylierung aller drei Komponenten die Mikrotubulibindungsaktivität des KMN Netzwerkes inaktiviert, während bei einer teilweisen Phosphorylierung intermediäre Aktivierungszustände erreicht werden, wodurch die Funktionalität der Kinetochor-Mikrotubuli Plattform je nach Bindungssituation moduliert werden kann. Im Gegensatz zu den durch Aurora-B phosphorylierten Aminosäuren, die im Mikrotubuli-bindenden N-terminalen Bereich von CASC5 liegen, befinden sich die beiden durch Mps1 regulierten Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich des Proteins, der für die Assoziation mit dem Mis12 und Ndc80 Komplex verantwortlich ist. Nachdem Mps1 von Hec1, einem Protein des Ndc80 Komplexes, an das Kinetochor rekrutiert wird (Martin-Lluesma *et al.*, 2002) ist denkbar, dass die Kinase im Anschluss CASC5 durch Phosphorylierung modifiziert, dadurch die Assoziation von CASC5 mit Hec1 und Mis12 fördert und somit die Interaktion von Kinetochor und Mikrotubuli stabilisiert. Mps1 könnte allerdings auch synergistisch mit Aurora-B wirken. Die Aurora-B Phosphorylierung von Dsn1, der CASC5 bindenden Untereinheit des Mis12 Komplexes, führt zur Sensibilisierung des KMN Netzwerkes für weitere Phosphorylierungen in den Mikrotubuli bindenden Regionen, was dann zu einer dramatischen Reduktion der Netzwerkaktivität führt (Welburn *et al.*, 2010). Auch die Mps1 Modifikation von CASC5 könnte eher zu einer Destabilisierung der KMN Netzwerk-Mikrotubuli Verbindungen führen und dadurch die Funktion von Mps1 in der Korrektur fehlerhafter Kinetochor-Mikrotubuli Verbindungen widerspiegeln.

Das KMN Netzwerk bildet zwar das Kernstück der Kinetochor-Mikrotubuli Verbindung, es wird jedoch durch zahlreiche Proteinkomplexe unterstützt, die an dieser kritischen Plattform fungieren. Eine dieser Strukturen ist der dreiteilige Ska Komplex, der zur Stabilisierung der Mikrotubuli-Kinetochor Verbindung beiträgt und den Übergang von der Metaphase in die Anaphase reguliert, möglicherweise durch die Signalisierung von erfolgreicher Verbindung (Hanisch *et al.*, 2006; Gaitanos *et al.*, 2009; Raaijmakers *et al.*,

2009; Theis *et al.*, 2009). Der Komplex wird vom Ndc80 Komplex des KMN Netzwerks ans Kinetochor rekrutiert und als funktionelles Homolog des Dam1 Komplexes diskutiert, welcher eine ringförmige Struktur um Mikrotubuli bilden kann und, wie auch der Ska Komplex, in die Chromosomensegregation involviert ist (Welburn *et al.*, 2009). Im N-terminalen Bereich von Ska3 (*spindle and kinetochore-associated protein 3*) konnte eine Serin-Phosphorylierungsstelle detektiert werden, die von Mps1 reguliert wird. Mps1 kontrolliert somit eine weitere für die Ausbildung stabiler Mikrotubuli-Kinetochor Verbindungen verantwortliche Struktur und unterstreicht ihre Rolle im korrekten Spindelaufbau. Ob diese Modifikation die Assemblierung des Ska Komplexes oder die Oligomerisierung von Ska3 Monomeren einleitet und somit von struktureller Bedeutung ist, oder aber die Aktivität und Signalfunktion dieses Komplexes beeinflusst muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Die Identifikation einer Mps1-abhängigen Phosphorylierungsstelle auf CENP-F (Ser3122), einem hyperphosphorylierten Kinetochorprotein, welches in die Chromosomensegregation involviert ist (Bomont *et al.*, 2005; Holt *et al.*, 2005), liefert einen interessanten Hinweis auf den Mechanismus, mit dem Mps1 seine Aufgaben in der Zellteilung ausüben könnte. CENP-F interagiert mit Nde1 und Ndel1 (*nudE nuclear distribution gene E homolog 1* und *NudE-like protein 1*), zwei NudE-verwandten Proteinen, die an der Regulation des Lis1 (*lissencephaly 1 protein*)/Dynein Motorkomplexes beteiligt sind und verknüpft dadurch den Nde1/Ndel1/Lis1/Dynein/Dynactin Signalweg mit dem Kinetochor (Vergnolle und Taylor, 2007). Dynein/Dynactin, eines der prominentesten mitotischen Motorproteine, kontrolliert nicht nur die initiale Etablierung lateraler Kinetochor-Mikrotubuli Interaktionen, das Chromosomenalignment und den Aufbau der Kinetochorspannung, sondern spielt auch bei der korrekten Formation und Orientierung der mitotischen Spindel, sowie bei der Inaktivierung des Spindelcheckpunkts eine wichtige Rolle (Bader und Vaughan, 2010). Vor Kurzem wurde zudem das Kinetochorprotein Spindly (CCD99) als Bindungspartner des Dynein/Dynactin Komplexes am Kinetochor charakterisiert und auch dieses Protein wird nach Mps1 Inhibition an zwei Serin-Phosphorylierungsstellen (Ser450 und Ser453) negativ reguliert (Chan *et al.*, 2009). Spindly bindet Aurora-B-abhängig an den RZZ Komplex am Kinetochor, rekrutiert daraufhin Dynein/Dynactin und fördert so die Anordnung der Chromosomen in der Äquatorialebene. Die Modifikation von insgesamt

drei Dynein/Dynactin regulierenden Proteinen der Kinetochor-Mikrotubuli Schnittstelle (KLC2, CENP-F und Spindly) legt nahe, dass Mps1 wichtige Teile seiner beschriebenen elementaren Funktionen bei Chromosomenalignment und -segregation über die indirekte Steuerung dieses Komplexes ausüben könnte.

Beteiligung am Spindelcheckpunkt. Die Verbindung von Mps1 zum Spindelcheckpunkt konnte durch die Detektion eines einfach phosphorylierten BubR1 Peptids (AS 707-728) untermauert werden. BubR1, eine für den Spindelcheckpunkt und die Etablierung stabiler Verbindungen zwischen Mikrotubuli und Kinetochor essentielle Kinase, wird in der Mitose unter anderem von Aurora-B, Plk1 und Cdk1 hyperphosphoryliert (Ditchfield *et al.*, 2003; Elowe *et al.*, 2007; Elowe *et al.*, 2010). Auch für Mps1 ist eine Phosphorylierung von BubR1 bekannt, jedoch ist noch nicht vollständig geklärt welche der beschriebenen Phosphorylierungsstellen eindeutig dieser Kinase zugeordnet werden können (Huang *et al.*, 2008). Elowe *et al.* (2010) identifizierten in ihrer BubR1 Studie eine mitotische Phosphorylierungsstelle an Ser720, die auf dem hier gefundenen regulierten Peptid lokalisiert ist. Obwohl nach der Inhibition von Mps1 Auswirkungen auf die Phosphorylierung von BubR1 festgestellt werden konnten, schlossen sie Mps1 als verantwortliche Kinase aus. Sie vermuteten vielmehr, dass die beobachtete Abnahme des Phosphorylierungsstatus auf eine fehlerhafte Lokalisation von BubR1 zurückzuführen ist und somit einen indirekten Mps1 Effekt darstellt. Von den vier durch Huang *et al.* (2008) beschriebenen und mit Mps1 in Verbindung gebrachten Phosphorylierungsstellen (Ser435, Ser543, Ser670 und Ser1043) konnten in dieser Analyse nur zwei Stellen detektiert werden: Ser543 als eindeutig nicht reguliert und Ser670 als positiv reguliert (kleiner 2-fach, daher nicht in Tabelle 6 aufgeführt), was eher auf einen sekundären Effekt und eine Phosphorylierung dieser Aminosäure durch eine andere Kinase hindeutet. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen dennoch die Sichtweise, dass BubR1 ein direktes Mps1 Substrat ist. Auch legt die Phosphorylierungsstellenanalyse nahe, dass es sich bei der phospho-modifizierten Aminosäure des regulierten Peptids um Ser710 und damit eine neue, bis jetzt nicht beschriebene Phosphorylierungsstelle handelt. Die komplexe Regulation der BubR1 Aktivität durch mehrere Kinasen an zahlreichen Phosphorylierungsstellen erschwert die eindeutige Zuordnung von Phosphorylierungsstellen zu Kinasen und Funktionalitäten. Es scheint jedoch, dass BubR1 verschiedene Signalwege integriert und dadurch sowohl frühe der Etablierung stabiler *end-on*

Mikrotubuliverbindungen dienende Prozesse, als auch spätere Abläufe beim Aufbau von Spannung und der Erfüllung des SAC, koordiniert.

Interaktionen Mps1 regulierter Kinetochorproteine. Interessanterweise sind für die in dieser Studie detektierten Mps1 regulierten Kinetochorkomponenten zahlreiche direkte Interaktionen beschrieben: BubR1 bindet an den N-terminalen Bereich von CASC5 und assoziiert sowohl mit CENP-E als auch mit CENP-F, die ihrerseits ebenfalls miteinander interagieren (Chan *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2003; Linding *et al.*, 2004; Kiyomitsu *et al.*, 2007). CENP-F, BubR1 und CENP-E finden sich während der Prophase in sequentieller Reihenfolge am Kinetochor ein und definieren somit diskrete Schritte in dessen Aufbau zu Beginn der Mitose (Chan *et al.*, 1998). Denkbar wäre daher, dass Mps1 durch Phosphorylierung dieser Proteine deren gegenseitige Interaktion fördert und so durch gezielte Regulation mehrerer Komponenten eines Netzwerks deren Funktionen bei der Knüpfung stabiler Mikrotubuli-Kinetochor Verbindungen koordiniert.

Auch konnten mit CASC5, BubR1, CENP-E und Spindly vier Kinetochorkomponenten identifiziert werden, die sowohl von Aurora-B als auch von Mps1 reguliert werden (Espeut *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). Dies unterstreicht die enge Kooperation der beiden Kinasen in der Regulation von Kinetochor-Mikrotubuli Verbindungen und plädiert für einen Netzwerkcharakter der Mps1/Aurora-B Interaktion, im Gegensatz zu einer linearen Signalkaskade, bei der die eine Kinase über der Anderen agiert (Jelluma *et al.*, 2008b; Hewitt *et al.*, 2010; Lan und Cleveland, 2010; Santaguida *et al.*, 2010; Sliedrecht *et al.*, 2010).

Aktivität am Zentromer. Die Phosphorylierung von Histon H2A an Thr121 (Thr210 in Kawashima *et al.*) bewirkt die Rekrutierung von Sgo1 zum Zentromer und verhindert so die vorzeitige Spaltung von Cohesin, was die perizentromere Kohäsion bis zur Erfüllung des SAC aufrechterhält (Kawashima *et al.*, 2010). Kawashima *et al.* identifizierten in ihrer Studie in *Saccharomyces cerevisiae* Bub1 als verantwortliche Kinase. Maciejowski *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die Inaktivierung von Mps1 die Thr121 Phosphorylierung von Histon H2A verhindert, woraufhin Sgo1 sich auf den Armen des Chromosoms verteilt. In Übereinstimmung damit, konnten in dieser Studie nach Mps1 Inhibition die Negativregulation von Thr121 und Ser123 auf Histon H2A festgestellt werden, was die Frage nach der verantwortlichen Kinase aufwirft. Ist im humanen System Mps1 und nicht,

wie in Hefe der Fall, Bub1 für die direkte Phosphorylierung von H2A verantwortlich? Oder reguliert Mps1 Bub1 sowohl räumlich als auch funktional und reguliert H2A dadurch indirekt? Hierfür spricht, dass Bub1 nach Mps1 Inhibition nicht mehr am Kinetochor-lokalisiert werden kann (Maciejowski *et al.*, 2010; Santaguida *et al.*, 2010; Sliedrecht *et al.*, 2010). Dagegen ist anzuführen, dass diese Regulation zumindest nach dem heutigen Stand der Forschung allein durch Assoziation der beiden Kinasen von statten gehen müsste, da in keiner Studie, inklusiver der vorliegenden, eine Phosphomodifikation von Bub1 durch Mps1 nachgewiesen werden konnte. Nachdem zusätzlich zu Thr121 eine weitere Phosphorylierungsstelle bei Ser123 detektiert werden konnte wäre auch eine konzertierte Aktivität beider Kinasen denkbar: Mps1 rekrutiert Bub1 zum Zentromer, dieses phosphoryliert Histon H2A an Thr121, was wiederum die Phosphoaktivität von Mps1 im Bezug auf Ser123 stimuliert. Unabhängig davon welche Zusammenhänge weiterführende Studien ans Licht bringen werden steht fest, dass Mps1 in Kooperation mit Bub1 einen elementaren Beitrag zur Ausrichtung der Chromosomen bei der Zellteilung leistet.

Kinetochor-unabhängige Aktivität. Nexilin, ein F-Aktin bindendes Protein, ist das einzige Mps1 regulierte Substrat dieser Analyse, für das bisher keine Funktion an der Kinetochor-Mikrotubuli Plattform beschrieben wurde. Das Protein ist in die Regulation der Zellmigration involviert und assoziiert mit dem Aktinzytoskelett (Wang *et al.*, 2005). Zudem spielt es eine essentielle Rolle bei der Stabilisierung der sarkomeren Z-Scheiben in Muskelfibrillen, die der Verankerung der Myofilamente dienen und diese mit der Kraftaufnahme und -übertragung verknüpfen (Hassel *et al.*, 2009). In dieser Studie konnte nach Mps1 Inhibition die Regulation eines 2-fach phosphoryliertes Nexilin Peptid (AS 76-92) detektiert werden. Interessanterweise wurde die auf diesem Peptid liegende Serin-Phosphorylierungsstelle Ser80 auch in zwei MS Studien des mitotischen Phosphoproteoms detektiert (Dephoure *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2010). Welche Funktionen dieses Protein in der Mitose am Zytoskelett ausübt und inwiefern Mps1 diese reguliert muss noch beantwortet werden.

Nicht detektierte Interaktionspartner. Wie auch für Bub1 wurden für Mad1 und Mad2, sowie für die RZZ Komponenten Zw10 und Zwilich, Mps1-abhängige Regulationen beschrieben (Tighe *et al.*, 2008; Hewitt *et al.*, 2010; Kwiatkowski *et al.*, 2010; Maciejowski

et al., 2010; Slidrecht *et al.*, 2010). In der vorliegenden Studie konnten jedoch keine direkten Phosphorylierungen dieser Kinetochorkomponenten detektiert werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die genannten Studien nicht den Phosphorylierungszustand, sondern die Lokalisation dieser Proteine am Kinetochor analysierten. Hewitt *et al.* (2010) postulierten vor Kurzem MAD1L1 (*MAD1 mitotic arrest deficient-like 1*, auch $p31^{\text{comet}}$) einen Inhibitor der Mad1/C-Mad2/O-Mad2 Templatefunktion, als direktes Mps1 Substrat und Effektor. Aber auch MAD1L1 wurde in dieser Studie nicht-reguliert detektiert. Die Daten lassen vielmehr den Schluss zu, dass Mad1 und Mad2 über Mps1-gesteuerte BubR1 Aktivität reguliert werden. Eine Möglichkeit die Effekte auf den RZZ Komplex zu erklären wäre, dass Mps1 die Integrität des KMN Netzwerk über CASC5 sicher stellt (siehe oben).

Indirekte Effekte. Die positive Regulation dreier Phosphorylierungsstellen auf der Ubiquitin Ligase Huwe1 lässt darauf schließen, dass in dieser Studie auch sekundäre Effekte der Mps1 Inhibition beobachtet werden. Die einzige bekannte mitotische Funktion von Huwe1 ist die Degradation von nicht Chromatin gebundenem TopBP1 (*DNA topoisomerase 2-binding protein 1*), einem in der Mitose am Zentromer-lokaliserten Protein des ATM/ATR Checkpunkts, welcher vor der Zellteilung die DNA Integrität sicherstellt (Reini *et al.*, 2004; Cimprich und Cortez, 2008; Herold *et al.*, 2008). In Hefe wurde zudem kürzlich die Verbindung des ATM/ATR Checkpunkts mit Mad2 und anderen SAC Proteinen nach Induktion eines DNA Doppelstrangbruchs festgestellt (Dotiwala *et al.*, 2010). Wie und ob Mps1 auch an diesen Prozessen beteiligt ist, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Möglicherweise hängt die detektierte Regulation der E3 Ubiquitin Ligase Huwe1 auch mit der Überschreitung des Spindelcheckpunkts in Abwesenheit der Mps1 Aktivität zusammen. Obwohl bei der Behandlung durch die Zugabe des Proteasominhibitors MG132 der Austritt der Zellen aus der Mitose verhindert wird, werden die Signalkaskaden zur Einleitung der Anaphase und somit die E3 Ubiquitinligase APC/C-Cdc2 aktiviert. Dies führt unter normalen Umständen zur Degradation zahlreicher mitotischer Proteine, dem Abbau der Spindel und abschließend zur Zytokinese (Sullivan und Morgan, 2007). Nicht zuletzt wird Mps1 selbst durch die sequentielle Aktivität von APC/C in Verbindung mit Cdc20 und Cdh1 in der späten Anaphase degradiert (Cui *et al.*, 2010). Eine Beteiligung von Huwe1 an diesen Prozessen, ausgelöst durch Mps1, ist dabei durchaus vorstellbar.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Mps1 die Lokalisation und Aktivität zahlreicher Hauptakteure des Kinetochoren Netzwerks gezielt über wenige direkte Substrate steuert, sodass Fehlfunktionen dieser Kinase weitreichende Defekte im Spindelaufbau und der Chromosomensegregation hervorrufen. Das Aktivitätsspektrum der Kinase kann in drei miteinander verbundene Bereiche gegliedert werden: Zum einen steuert Mps1 die korrekte Ausrichtung der mitotischen Spindel durch Modifikation von Kinesinmotorproteinen (Kinesin-1, CENP-E, MAP1B) und Komponenten des äußeren Kinetochors (CENP-F, Spindly), womöglich über den Dynein/Dynactin-Weg. Zum anderen fördert Mps1 an der Kinetochor-Mikrotubuli Schnittstelle über die Kontrolle struktureller Kinetochorkomplexe (CASC5 des KMN Netzwerks, Ska3 des Ska Komplexes), sowie einiger weiterer Kinetochorkomponenten (BubR1 und CENP-E) die Knüpfung stabiler Verbindungen. Und letztlich trägt Mps1 durch die Modifikation von SAC-Proteinen (BubR1) und Zentromerkomponenten (Histon H2A, Huwe1) zur Aufrechterhaltung des *wait-anaphase* Signals bei. Abbildung 35 veranschaulicht die räumliche Nähe der Mps1 Substratproteine am Kinetochor im Kontext anderer Kinetochorkomponenten.

Die Ergebnisse der hier angewandten Phosphoproteomikstrategie zur Analyse der Signalweiterleitung durch Mps1 in der Mitose stimmen in überzeugender Weise mit den bekannten Funktionen der Kinase überein. Nicht nur die molekularen Grundlagen bisher beschriebener Beobachtungen konnten weiter aufgeklärt werden, sondern es konnten auch neue Interaktionspartner im etablierten Wirkungskreis der Kinase identifiziert werden. Dies schafft eine sehr interessante Ausgangsposition für weiterführende Studien und verdeutlicht die extrem hohe Sensitivität und Genauigkeit der Methode, da selbst relativ kleine Substratspektren weniger bekannter Kinasen zuverlässig analysiert werden können.

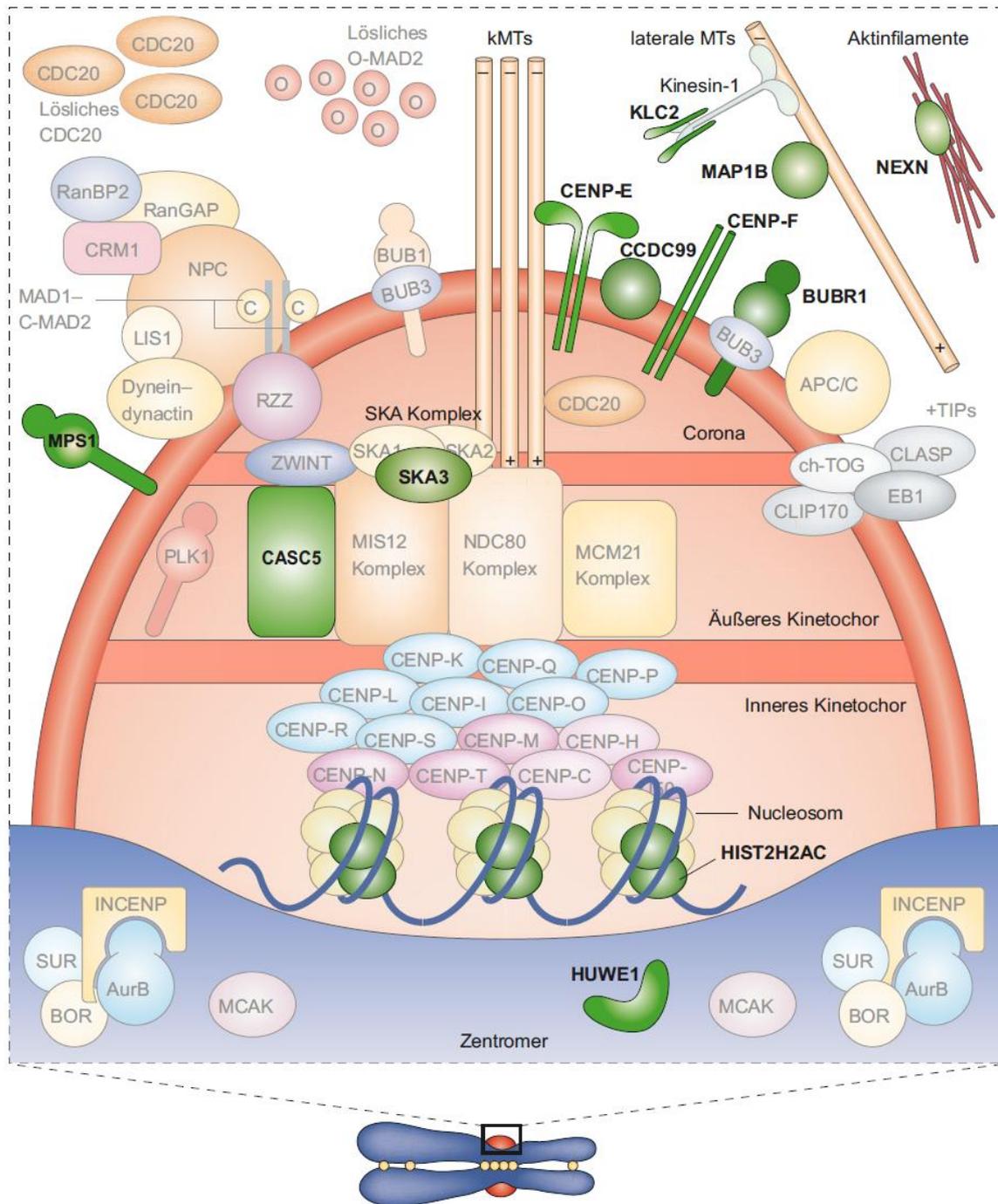


Abbildung 35: Lokalisation der Mps1 Substratproteine in der Zentromer-Kinetochor-Region und Peripherie. Die Abbildung wurde aus Mussachio *et al.* (2007) entnommen und verändert. Die Grafik zeigt die räumliche Nähe der Kinase Mps1 und ihrer elf in dieser Studie identifizierten Substrate (intensiv gefärbten Komponenten) und veranschaulicht die gezielte punktuelle Steuerung des Kinetochoren Netzwerks durch Mps1. Eine detaillierte Diskussion der Substrate und ihrer Funktionen, sowie einiger der dargestellten Kinetochorkomponenten findet sich im Haupttext. Für eine eingehende Besprechung aller weiteren dargestellten Proteine wird auf die Publikation Mussachio *et al.* (2007) verwiesen.

4.2 PHOSPHOSIGNATUREN UNBEHANDELTEN NSCLC ZELLINIEN

Die Phosphoproteomanalyse von 33 NSCLC Zelllinien stellt eine der umfassendsten Phosphoproteomikstudien des Forschungsgebietes dar. Anhand eines Super-SILAC Standards nach dem Vorbild einer Studie mit Tumorgewebeproben (Geiger *et al.*, 2010; Geiger *et al.*, 2011) konnten die Phosphorylierungsprofile unbehandelter NSCLC Zelllinien unterschiedlicher Herkunft und unterschiedlichen Genotyps miteinander verglichen werden. Durch die Einteilung der Zelllinien in Blöcke und eine gestaffelte standardisierte Probenverarbeitung konnte ein ambitionierter Zeitplan effektiv umgesetzt werden. Die Qualität der Probenvorbereitung wurde durch Bestimmung der Markierungseffizienz jedes SILAC Ansatzes, sowie der Vermessung des Gesamtproteoms jeder MS Probe zur Bestimmung der Poolinggenauigkeit sicher gestellt. Zudem wurden jeweils zwei Replikate unterschiedlicher SILAC Markierung gemessen, um Experiment-unabhängige Kontaminationen zu eliminieren. Die vorliegende Studie erfüllt damit alle wichtigen Grundvoraussetzungen für qualitativ hochwertige Phosphoproteomikdaten.

Allerdings zeigte sich nach der Prozessierung, dass der Prozentsatz der Klasse I Phosphorylierungsstellen, der in beiden Replikaten einer Zelllinie detektiert wurde, je nach Zelllinie sehr unterschiedlich und vergleichsweise gering war. Der minimale Overlap lag bei 35%, der maximale Overlap betrug 50%. Dies grenzte die Menge der vertrauenswürdigen Ratios für nachfolgende Analysen stark ein. Eine Verbesserung für zukünftige Studien könnte die Messung von Triplikaten bringen, was jedoch beim Vergleich zahlreicher Zelllinien oder Gewebeproben in groß angelegten, vergleichenden Phosphoproteomik Studien durch die Menge der Probenzahl sowohl in zeitlicher Hinsicht, wie auch aus Kostengründen problematisch werden könnte. Auch eine genaue Überwachung der Performance des Massenspektrometrieapparats könnte zu besseren Ergebnissen führen. Trotz der genannten Nachteile konnte eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Daten erzielt werden, was eine eingeschränkte bioinformatische Analyse der Daten ermöglichte.

Das *K-means* Clustering der Intensitäten der Phosphorylierungsstellen, die sowohl in beiden Replikaten einer Zelllinie ein konsistentes Ratio aufwiesen, als auch in mindestens 15 Zelllinien detektiert wurden ergab keine Korrelation des Genotyps mit dem Phosphoproteom. Dieses Ergebnis ist jedoch nicht völlig überraschend. Zum einen bedeutet die Mindestanforderung von 15 Quantifikationen bei 31 möglichen

Quantifikationen, dass der Clustering Algorithmus mit einer relativ hohen Anzahl an fehlenden Werten konfrontiert war, was die Analyse beeinträchtigt haben könnte. Aufgrund der Datenlage ging durch dieses Kriterium auch nur ein vergleichsweise geringer Anteil der in den einzelnen Ziellinien identifizierten Phosphorylierungsstellen in die Analyse ein, was das Ergebnis ebenfalls verfälscht haben könnte. Zum anderen ist, wie eingangs beschrieben, die Korrelation von Genotyp und Phosphoproteom aufgrund der sensiblen Gleichgewichte in zellulären Signalnetzwerken nicht immer geradlinig. Auch können in den verwendeten Zelllinien zusätzlich zu den charakterisierenden Mutationen noch zahlreiche weitere unbekannte genomische Veränderungen vorliegen, die in ihrer Gesamtheit zu deutlich unterschiedlichen phosphoproteomischen Phänotypen führen.

Die globale Charakterisierung der Zelllinien auf Phosphoproteomebene stellt daher einen deutlichen Schritt in Richtung eines besseren Verständnisses der veränderten Signaltransduktionswege in Krebszellen da. Trotz des unerwartet geringen Umfangs ermöglichen die Daten weitere bioinformatische Analysen und können als Startpunkt weiterführender Studien dienen. Denkbar wäre z.B. eine Korrelation der Ergebnisse mit pharmakologischen Untersuchungen oder Daten anderer (Phospho-)Proteomanalysen maligner Zellen. Auch könnten die Phosphorylierungsprofile der NSCLC Zelllinien detailliert nach veränderten zellulären Signaltransduktionsnetzwerken und biologischen Markersignaturen auf Protein- oder Peptidebene untersucht werden. Nicht zuletzt könnten die angewendeten Qualitätskriterien und die Strukturierung der Studie als Vorbild für zukünftige, groß angelegte Proteomstudien dienen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Fortschritte in der Massenspektrometrie-basierten Analyse der Proteinphosphorylierung haben in den letzten Jahren die Durchführung groß angelegter Signaltransduktionsstudien ermöglicht. Es bedarf daher systematischer Ansätze, die eine umfassende und zuverlässige Zuordnung der zugrunde liegenden, zellulären Kinase-Substrat-Paare gewährleisten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit durch die Kombination aktueller Techniken eine neuartige experimentelle Strategie entwickelt, mit der die Signaltransduktion der mitotischen Kinasen Plk1 und Mps1 untersucht wurde. Zum einen wurde ein pharmakologischer Inhibitor eingesetzt, womit eine schnelle zelluläre Modulation der Kinaseaktivität und somit die Identifikation von großteils direkten Substraten erreicht werden konnte. Zum anderen exprimierte das ausgewählte, chemisch-genetische Zellsystem die jeweilige Kinase in genetisch veränderter, für den Purinanalginhibitor 3-MB-PP1 sensitivierter Form (K^{as}) und erlaubte dadurch eine hochselektive Inhibition. Die Kombination von metabolischer Markierung der Zelllinien durch SILAC mit den neuesten Techniken der quantitativen Phosphoproteomik ermöglichte die zuverlässige Detektion von Phosphoregulation nach Inhibitorzugabe. Durch den Einsatz einer Kontrollzelllinie, die die jeweilige Kinase in Wildtypform exprimierte (K^{wt}), konnte die zelluläre Selektivität des Inhibitors 3-MB-PP1 genau überprüft und unspezifische Effekte vollständig herausgefiltert werden. Des Weiteren ermöglichte die viermalige Wiederholung der Experimente in beiden Zelllinien eine stringente statistische Analyse und somit eine genaue Kontrolle der experimentellen und biologischen Variabilität. In der Analyse der mitotischen Kinase Plk1, einem zentraler Regulator der Zellteilung, konnten dadurch in über 23.000 verschiedenen, quantifizierten Phosphopeptiden über 500 Phosphopeptide und knapp 400 Phosphorylierungsstellen auf mehr als 350 Phosphoproteinen identifiziert werden, die mit hoher Signifikanz Plk1-abhängig modifiziert wurden. Die bioinformatische Datenanalyse ergab eine deutliche Überrepräsentation des Plk1 Substratmotivs innerhalb der Plk1 regulierten Phosphorylierungsstellen. Zudem konnten die gefundenen Substrate nicht nur bekannten Plk1 Funktionsorten wie dem Zentrosom, Kinetochor und Spindelapparat zugeordnet werden, sondern wiesen auch auf bis jetzt weniger beachtete Aktivitäten am Zellkernporenkomplex, sowie eine Beteiligung an Vorgängen der Chromatinmodulation, Helikaseaktivität und des mTOR Signalwegs hin. Auch in der Studie der mitotischen Kinase

Mps1, einem hauptsächlich in Spindel-Checkpoint Funktionen involvierten Enzym, konnten über 27.000 unterschiedliche Phosphopeptide quantifiziert werden. Entsprechend dem relativ kleinen Wirkungsspektrum dieser Kinase befanden sich darunter nur 24 Mps1-regulierte Phosphopeptide und 19 Phosphorylierungsstellen auf 12 Phosphoproteinen. Zu den identifizierten Substraten gehörten zahlreiche für die Kinetochor- und Spindelfunktion wichtige Proteine. Die Resultate beider Analysen schaffen für die Kinasen Plk1 und Mps1 eine völlig neue Datenbasis für eine Vielzahl zukünftiger Studien. Das hier entwickelte Konzept ist nicht nur für die globale Kinasesubstratidentifizierung geeignet, sondern auch auf andere Teilgebiete der vergleichenden quantitativen Proteomik zur hochsignifikanten Identifikation differentieller Regulation übertragbar.

Ziel des zweiten Projekts dieser Arbeit war die globale Charakterisierung der Phosphoproteome einer Auswahl von 33 Lungenkrebszelllinien durch quantitative Massenspektrometrie. Die Analyse wurde in Duplikaten in unbehandelten Zellen durchgeführt. Dabei wurde der Versuchsaufbau in einer Weise gestaffelt, die eine optimale Auslastung der Ressourcen und des Messgeräts ermöglichte. Die Qualität der Probenvorbereitung wurde durch die Überwachung der Markierungseffizienz jeder Zelllinie, sowie der Korrektur von Poolingfehlern sichergestellt. Der Prozentsatz der in beiden Replikaten einer Zelllinie quantifizierten Phosphorylierungsstellen war zwar etwas geringer als erwartet, allerdings wurde eine sehr gute Korrelation der wiederholt gemessenen Ratios beobachtet. Eine Clustering Analyse der quantitativ erfassten Phosphorylierungsstellen ergab verschiedene Untergruppen mit unterschiedlichen Phosphoproteomprofilen, wobei diese nicht mit den Genotypen der Zelllinien übereinstimmten. Dieser Befund deutet daraufhin, dass die funktionelle Ebene der gesamtzellulären Signaltransduktionsaktivität nicht von An- bzw. Abwesenheit einzelner onkogener Mutationen abhängt. Die aufgenommenen Phosphorylierungsprofile der NSCLC Zelllinien bieten eine ausreichende Datenmenge für weiterführende Analysen wie z.B. die Korrelation der Ergebnisse mit pharmakologischen Studien, oder die Untersuchung veränderter zellulärer Signaltransduktionsnetzwerke. Die Qualitätskriterien und die Strukturierung der Studie können als Vorbild für zukünftige groß angelegte Proteomikstudien dienen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J.A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D.W., und Labbe, J.C. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 106, 83-93.
- Aebersold, R., und Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207.
- Ahonen, L.J., Kallio, M.J., Daum, J.R., Bolton, M., Manke, I.A., Yaffe, M.B., Stukenberg, P.T., und Gorbsky, G.J. (2005). Polo-like kinase 1 creates the tension-sensing 3F3/2 phosphoepitope and modulates the association of spindle-checkpoint proteins at kinetochores. *Curr Biol* 15, 1078-1089.
- Alappat, E.C., Feig, C., Boyerinas, B., Volkland, J., Samuels, M., Murmann, A.E., Thorburn, A., Kidd, V.J., Slaughter, C.A., Osborn, S.L., *et al.* (2005). Phosphorylation of FADD at serine 194 by CK1alpha regulates its nonapoptotic activities. *Mol Cell* 19, 321-332.
- Allen, J.J., Lazerwith, S.E., und Shokat, K.M. (2005). Bio-orthogonal affinity purification of direct kinase substrates. *J Am Chem Soc* 127, 5288-5289.
- Allen, J.J., Li, M., Brinkworth, C.S., Paulson, J.L., Wang, D., Hubner, A., Chou, W.H., Davis, R.J., Burlingame, A.L., Messing, R.O., *et al.* (2007). A semisynthetic epitope for kinase substrates. *Nat Methods* 4, 511-516.
- Andersson, L., und Porath, J. (1986). Isolation of phosphoproteins by immobilized metal (Fe³⁺) affinity chromatography. *Anal Biochem* 154, 250-254.
- Archambault, V., und Glover, D.M. (2009). Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 265-275.
- Arnautov, A., Azuma, Y., Ribbeck, K., Joseph, J., Boyarchuk, Y., Karpova, T., McNally, J., und Dasso, M. (2005). Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. *Nat Cell Biol* 7, 626-632.
- Arnaud, L., Pines, J., und Nigg, E.A. (1998). GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma* 107, 424-429.
- Astrinidis, A., Senapedis, W., Coleman, T.R., und Henske, E.P. (2003). Cell cycle-regulated phosphorylation of hamartin, the product of the tuberous sclerosis complex 1 gene, by cyclin-dependent kinase 1/cyclin B. *J Biol Chem* 278, 51372-51379.
- Bader, J.R., und Vaughan, K.T. (2010). Dynein at the kinetochore: Timing, Interactions and Functions. *Semin Cell Dev Biol* 21, 269-275.
- Bahassi el, M., Hennigan, R.F., Myer, D.L., und Stambrook, P.J. (2004). Cdc25C phosphorylation on serine 191 by Plk3 promotes its nuclear translocation. *Oncogene* 23, 2658-2663.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., und Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408, 297-315.
- Barber, T.D., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., und Velculescu, V.E. (2004). Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *N Engl J Med* 351, 2883.
- Barr, F.A., und Gruneberg, U. (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* 131, 847-860.
- Barr, F.A., Sillje, H.H., und Nigg, E.A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 429-440.
- Batus, M., Fidler, M.J., und Bonomi, P.D. (2010). Primary and secondary therapeutic strategies for EGFR receptor pathway inhibition in non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 10, 1589-1599.
- Baumann, C., Korner, R., Hofmann, K., und Nigg, E.A. (2007). PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell* 128, 101-114.
- Bean, J., Brennan, C., Shih, J.Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., Chitale, D., Motoi, N., Szoke, J., Broderick, S., *et al.* (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20932-20937.
- Beck, H.C., Nielsen, E.C., Matthiesen, R., Jensen, L.H., Sehested, M., Finn, P., Grauslund, M., Hansen, A.M., und Jensen, O.N. (2006). Quantitative proteomic analysis of post-translational modifications of human histones. *Mol Cell Proteomics* 5, 1314-1325.
- Bishop, A.C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C., und Shokat, K.M. (1998). Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. *Curr Biol* 8, 257-266.
- Bishop, A.C., Ubersax, J.A., Petsch, D.T., Matheos, D.P., Gray, N.S., Blethrow, J., Shimizu, E., Tsien, J.Z., Schultz, P.G., Rose, M.D., *et al.* (2000). A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* 407, 395-401.

- Blagoev, B., Ong, S.E., Kratchmarova, I., und Mann, M. (2004). Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* 22, 1139-1145.
- Blasius, T.L., Cai, D., Jih, G.T., Toret, C.P., und Verhey, K.J. (2007). Two binding partners cooperate to activate the molecular motor Kinesin-1. *J Cell Biol* 176, 11-17.
- Blethrow, J.D., Glavy, J.S., Morgan, D.O., und Shokat, K.M. (2008). Covalent capture of kinase-specific phosphopeptides reveals Cdk1-cyclin B substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1442-1447.
- Blume-Jensen, P., und Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355-365.
- Boersema, P.J., Divecha, N., Heck, A.J., und Mohammed, S. (2007). Evaluation and optimization of ZIC-HILIC-RP as an alternative MudPIT strategy. *J Proteome Res* 6, 937-946.
- Bomont, P., Maddox, P., Shah, J.V., Desai, A.B., und Cleveland, D.W. (2005). Unstable microtubule capture at kinetochores depleted of the centromere-associated protein CENP-F. *EMBO J* 24, 3927-3939.
- Bourhis, E., Lingel, A., Phung, Q., Fairbrother, W.J., und Cochran, A.G. (2009). Phosphorylation of a borealin dimerization domain is required for proper chromosome segregation. *Biochemistry* 48, 6783-6793.
- Brennan, I.M., Peters, U., Kapoor, T.M., und Straight, A.F. (2007). Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis. *PLoS One* 2, e409.
- Brunner, E., Ahrens, C.H., Mohanty, S., Baetschmann, H., Loevenich, S., Potthast, F., Deutsch, E.W., Panse, C., de Lichtenberg, U., Rinner, O., *et al.* (2007). A high-quality catalog of the *Drosophila melanogaster* proteome. *Nat Biotechnol* 25, 576-583.
- Budde, P.P., Kumagai, A., Dunphy, W.G., und Heald, R. (2001). Regulation of Op18 during spindle assembly in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Biol* 153, 149-158.
- Burkard, M.E., Maciejowski, J., Rodriguez-Bravo, V., Repka, M., Lowery, D.M., Clauser, K.R., Zhang, C., Shokat, K.M., Carr, S.A., Yaffe, M.B., *et al.* (2009). Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells. *PLoS Biol* 7, e1000111.
- Burkard, M.E., Randall, C.L., Larochelle, S., Zhang, C., Shokat, K.M., Fisher, R.P., und Jallepalli, P.V. (2007). Chemical genetics reveals the requirement for Polo-like kinase 1 activity in positioning RhoA and triggering cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4383-4388.
- Cai, D., Hoppe, A.D., Swanson, J.A., und Verhey, K.J. (2007). Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. *J Cell Biol* 176, 51-63.
- Campbell, M.S., Chan, G.K., und Yen, T.J. (2001). Mitotic checkpoint proteins HsMAD1 and HsMAD2 are associated with nuclear pore complexes in interphase. *J Cell Sci* 114, 953-963.
- Cappuzzo, F., Varella-Garcia, M., Shigematsu, H., Domenichini, I., Bartolini, S., Ceresoli, G.L., Rossi, E., Ludovini, V., Gregorc, V., Toschi, L., *et al.* (2005). Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol* 23, 5007-5018.
- Carpenter, A.J., und Porter, A.C. (2004). Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell* 15, 5700-5711.
- Carr, S.A., Annan, R.S., und Huddleston, M.J. (2005). Mapping posttranslational modifications of proteins by MS-based selective detection: application to phosphoproteomics. *Methods Enzymol* 405, 82-115.
- Casenghi, M., Meraldi, P., Weinhart, U., Duncan, P.I., Korner, R., und Nigg, E.A. (2003). Polo-like kinase 1 regulates Nlp, a centrosome protein involved in microtubule nucleation. *Dev Cell* 5, 113-125.
- Chalkley, R. (2010). Instrumentation for LC-MS/MS in proteomics. *Methods Mol Biol* 658, 47-60.
- Chan, G.K., Schaar, B.T., und Yen, T.J. (1998). Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1. *J Cell Biol* 143, 49-63.
- Chan, Y.W., Fava, L.L., Uldschmid, A., Schmitz, M.H., Gerlich, D.W., Nigg, E.A., und Santamaria, A. (2009). Mitotic control of kinetochore-associated dynein and spindle orientation by human Spindly. *J Cell Biol* 185, 859-874.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., und Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* 127, 983-997.
- Cheeseman, I.M., und Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 33-46.
- Cheng, K.Y., Lowe, E.D., Sinclair, J., Nigg, E.A., und Johnson, L.N. (2003). The crystal structure of the human polo-like kinase-1 polo box domain and its phospho-peptide complex. *EMBO J* 22, 5757-5768.
- Chernushevich, I.V., Loboda, A.V., und Thomson, B.A. (2001). An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 36, 849-865.
- Chi, Y., Welcker, M., Hizli, A.A., Posakony, J.J., Aebersold, R., und Clurman, B.E. (2008). Identification of CDK2 substrates in human cell lysates. *Genome Biol* 9, R149.

- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., und Mann, M. (2009). Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* **325**, 834-840.
- Ciferri, C., Pasqualato, S., Screpanti, E., Varetto, G., Santaguida, S., Dos Reis, G., Maiolica, A., Polka, J., De Luca, J.G., De Wulf, P., *et al.* (2008). Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex. *Cell* **133**, 427-439.
- Cimprich, K.A., und Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 616-627.
- Cline, M.S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., *et al.* (2007). Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* **2**, 2366-2382.
- Cohen, P. (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* **268**, 5001-5010.
- Cox, J., und Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.*
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., und Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research* **14**, 1188-1190.
- Cui, Y., Cheng, X., Zhang, C., Zhang, Y., Li, S., Wang, C., und Guadagno, T.M. (2010). Degradation of the human mitotic checkpoint kinase Mps1 is cell cycle-regulated by APC-cCdc20 and APC-cCdh1 ubiquitin ligases. *J Biol Chem* **285**, 32988-32998.
- Dai, W., Huang, X., und Ruan, Q. (2003). Polo-like kinases in cell cycle checkpoint control. *Front Biosci* **8**, d1128-1133.
- Das, M., Jiang, F., Sluss, H.K., Zhang, C., Shokat, K.M., Flavell, R.A., und Davis, R.J. (2007). Suppression of p53-dependent senescence by the JNK signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15759-15764.
- Daub, H., Olsen, J.V., Bairlein, M., Gnad, F., Oppermann, F.S., Korner, R., Greff, Z., Keri, G., Stemmann, O., und Mann, M. (2008). Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol Cell* **31**, 438-448.
- De Corte, V., Demol, H., Goethals, M., Van Damme, J., Gettemans, J., und Vandekerckhove, J. (1999). Identification of Tyr438 as the major in vitro c-Src phosphorylation site in human gelsolin: a mass spectrometric approach. *Protein Sci* **8**, 234-241.
- de Godoy, L.M., Olsen, J.V., Cox, J., Nielsen, M.L., Hubner, N.C., Frohlich, F., Walther, T.C., und Mann, M. (2008). Comprehensive mass-spectrometry-based proteome quantification of haploid versus diploid yeast. *Nature* **455**, 1251-1254.
- De Meyts, P., und Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 769-783.
- DeLuca, J.G., Dong, Y., Hergert, P., Strauss, J., Hickey, J.M., Salmon, E.D., und McEwen, B.F. (2005). Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites. *Mol Biol Cell* **16**, 519-531.
- DeLuca, J.G., Gall, W.E., Ciferri, C., Cimini, D., Musacchio, A., und Salmon, E.D. (2006). Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell* **127**, 969-982.
- Dephoure, N., Howson, R.W., Blethrow, J.D., Shokat, K.M., und O'Shea, E.K. (2005). Combining chemical genetics and proteomics to identify protein kinase substrates. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 17940.
- Dephoure, N., Zhou, C., Villen, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., und Gygi, S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 10762-10767.
- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., und Taylor, S.S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol* **161**, 267-280.
- do Carmo Avides, M., Tavares, A., und Glover, D.M. (2001). Polo kinase and Asp are needed to promote the mitotic organizing activity of centrosomes. *Nat Cell Biol* **3**, 421-424.
- Dotiwala, F., Harrison, J.C., Jain, S., Sugawara, N., und Haber, J.E. (2010). Mad2 prolongs DNA damage checkpoint arrest caused by a double-strand break via a centromere-dependent mechanism. *Curr Biol* **20**, 328-332.
- Druker, B.J., Sawyers, C.L., Kantarjian, H., Resta, D.J., Reese, S.F., Ford, J.M., Capdeville, R., und Talpaz, M. (2001a). Activity of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in the Blast Crisis of Chronic Myeloid Leukemia and Acute Lymphoblastic Leukemia with the Philadelphia Chromosome. *N Engl J Med* **344**, 1038-1042.

- Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., *et al.* (2001b). Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **344**, 1031-1037.
- Dultz, E., Zanin, E., Wurzenberger, C., Braun, M., Rabut, G., Sironi, L., und Ellenberg, J. (2008). Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells. *J Cell Biol* **180**, 857-865.
- Eblen, S.T., Kumar, N.V., Shah, K., Henderson, M.J., Watts, C.K., Shokat, K.M., und Weber, M.J. (2003). Identification of novel ERK2 substrates through use of an engineered kinase and ATP analogs. *J Biol Chem* **278**, 14926-14935.
- Eckerdt, F., und Strebhardt, K. (2006). Polo-like kinase 1: target and regulator of anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis. *Cancer Res* **66**, 6895-6898.
- Elia, A.E., Cantley, L.C., und Yaffe, M.B. (2003a). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* **299**, 1228-1231.
- Elia, A.E., Rellos, P., Haire, L.F., Chao, J.W., Ivins, F.J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., und Yaffe, M.B. (2003b). The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* **115**, 83-95.
- Elowe, S., Dulla, K., Uldschmid, A., Li, X., Dou, Z., und Nigg, E.A. (2010). Uncoupling of the spindle-checkpoint and chromosome-congression functions of BubR1. *J Cell Sci* **123**, 84-94.
- Elowe, S., Hummer, S., Uldschmid, A., Li, X., und Nigg, E.A. (2007). Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore microtubule interactions. *Genes Dev* **21**, 2205-2219.
- Espeut, J., Gaussen, A., Bieling, P., Morin, V., Prieto, S., Fesquet, D., Surrey, T., und Abrieu, A. (2008). Phosphorylation relieves autoinhibition of the kinetochore motor Cenp-E. *Mol Cell* **29**, 637-643.
- Fabbro, M., Zhou, B.B., Takahashi, M., Sarcevic, B., Lal, P., Graham, M.E., Gabrielli, B.G., Robinson, P.J., Nigg, E.A., Ono, Y., *et al.* (2005). Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Dev Cell* **9**, 477-488.
- Falcon, S., und Gentleman, R. (2007). Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* **23**, 257-258.
- Fang, R., Elias, D.A., Monroe, M.E., Shen, Y., McIntosh, M., Wang, P., Goddard, C.D., Callister, S.J., Moore, R.J., Gorby, Y.A., *et al.* (2006). Differential label-free quantitative proteomic analysis of *Shewanella oneidensis* cultured under aerobic and suboxic conditions by accurate mass and time tag approach. *Mol Cell Proteomics* **5**, 714-725.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., und Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **246**, 64-71.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S.R., Sonnhammer, E.L., *et al.* (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**, D281-288.
- Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S., und Ullrich, A. (2003). Beyond Herceptin and Gleevec. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 490-495.
- Fisk, H.A., Mattison, C.P., und Winey, M. (2003). Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14875-14880.
- Fisk, H.A., Mattison, C.P., und Winey, M. (2004). A field guide to the Mps1 family of protein kinases. *Cell Cycle* **3**, 439-442.
- Foster, K.G., Acosta-Jaquez, H.A., Romeo, Y., Ekim, B., Soliman, G.A., Carriere, A., Roux, P.P., Ballif, B.A., und Fingar, D.C. (2010). Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J Biol Chem* **285**, 80-94.
- Gaitanos, T.N., Santamaria, A., Jeyapakash, A.A., Wang, B., Conti, E., und Nigg, E.A. (2009). Stable kinetochore-microtubule interactions depend on the Ska complex and its new component Ska3/C13Orf3. *EMBO J* **28**, 1442-1452.
- Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., Wisniewski, J.R., und Mann, M. (2010). Super-SILAC mix for quantitative proteomics of human tumor tissue. *Nat Methods* **7**, 383-385.
- Geiger, T., Wisniewski, J.R., Cox, J., Zanivan, S., Kruger, M., Ishihama, Y., und Mann, M. (2011). Use of stable isotope labeling by amino acids in cell culture as a spike-in standard in quantitative proteomics. *Nat Protoc* **6**, 147-157.
- Gershoni, J.M., und Palade, G.E. (1983). Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* **131**, 1-15.

- Glavy, J.S., Krutchinsky, A.N., Cristea, I.M., Berke, I.C., Boehmer, T., Blobel, G., und Chait, B.T. (2007). Cell-cycle-dependent phosphorylation of the nuclear pore Nup107-160 subcomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 3811-3816.
- Gomez-Ferreria, M.A., Rath, U., Buster, D.W., Chanda, S.K., Caldwell, J.S., Rines, D.R., und Sharp, D.J. (2007). Human Cep192 is required for mitotic centrosome and spindle assembly. *Curr Biol* *17*, 1960-1966.
- Gong, D., Pomerening, J.R., Myers, J.W., Gustavsson, C., Jones, J.T., Hahn, A.T., Meyer, T., und Ferrell, J.E., Jr. (2007). Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. *Curr Biol* *17*, 85-91.
- Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E.A., und Inagaki, M. (2006). Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat Cell Biol* *8*, 180-187.
- Graves, P.R., und Roach, P.J. (1995). Role of COOH-terminal phosphorylation in the regulation of casein kinase I delta. *J Biol Chem* *270*, 21689-21694.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., *et al.* (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* *446*, 153-158.
- Groome, P.A., Bolejack, V., Crowley, J.J., Kennedy, C., Krasnik, M., Sobin, L.H., und Goldstraw, P. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* *2*, 694-705.
- Guarguaglini, G., Duncan, P.I., Stierhof, Y.D., Holmstrom, T., Duensing, S., und Nigg, E.A. (2005). The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Mol Biol Cell* *16*, 1095-1107.
- Guo, A., Villen, J., Kornhauser, J., Lee, K.A., Stokes, M.P., Rikova, K., Possemato, A., Nardone, J., Innocenti, G., Wetzel, R., *et al.* (2008). Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 692-697.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., und Ronai, Z. (2001). Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. *J Biol Chem* *276*, 18090-18095.
- Haider, S., Ballester, B., Smedley, D., Zhang, J., Rice, P., und Kasprzyk, A. (2009). BioMart Central Portal-- unified access to biological data. *Nucleic Acids Res* *37*, W23-27.
- Hanahan, D., und Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanisch, A., Sillje, H.H., und Nigg, E.A. (2006). Timely anaphase onset requires a novel spindle and kinetochore complex comprising Ska1 and Ska2. *EMBO J* *25*, 5504-5515.
- Hanke, S., Besir, H., Oesterheld, D., und Mann, M. (2008). Absolute SILAC for accurate quantitation of proteins in complex mixtures down to the attomole level. *J Proteome Res* *7*, 1118-1130.
- Hansen, D.V., Loktev, A.V., Ban, K.H., und Jackson, P.K. (2004). Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* *15*, 5623-5634.
- Hassel, D., Dahme, T., Erdmann, J., Meder, B., Hüge, A., Stoll, M., Just, S., Hess, A., Ehlermann, P., Weichenhan, D., *et al.* (2009). Nexilin mutations destabilize cardiac Z-disks and lead to dilated cardiomyopathy. *Nat Med* *15*, 1281-1288.
- Herold, S., Hock, A., Herkert, B., Berns, K., Mullenders, J., Beijersbergen, R., Bernards, R., und Eilers, M. (2008). Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1. *EMBO J* *27*, 2851-2861.
- Hewitt, L., Tighe, A., Santaguida, S., White, A.M., Jones, C.D., Musacchio, A., Green, S., und Taylor, S.S. (2010). Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J Cell Biol* *190*, 25-34.
- Hinsby, A.M., Olsen, J.V., und Mann, M. (2004). Tyrosine phosphoproteomics of fibroblast growth factor signaling: a role for insulin receptor substrate-4. *J Biol Chem* *279*, 46438-46447.
- Hodi, F.S., Friedlander, P., Corless, C.L., Heinrich, M.C., Mac Rae, S., Kruse, A., Jagannathan, J., Van den Abbeele, A.D., Velazquez, E.F., Demetri, G.D., *et al.* (2008). Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol* *26*, 2046-2051.
- Hogg, D., Gidos, C., Bailey, D., Amendola, A., Groves, T., Davidson, J., Schmandt, R., und Mills, G. (1994). Cell cycle dependent regulation of the protein kinase TTK. *Oncogene* *9*, 89-96.
- Holt, L.J., Tuch, B.B., Villen, J., Johnson, A.D., Gygi, S.P., und Morgan, D.O. (2009). Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* *325*, 1682-1686.

- Holt, S.V., Vergnolle, M.A., Hussein, D., Wozniak, M.J., Allan, V.J., und Taylor, S.S. (2005). Silencing Cenp-F weakens centromeric cohesion, prevents chromosome alignment and activates the spindle checkpoint. *J Cell Sci* *118*, 4889-4900.
- Howell, B.J., Moree, B., Farrar, E.M., Stewart, S., Fang, G., und Salmon, E.D. (2004). Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol* *14*, 953-964.
- Huang, H., Hittle, J., Zappacosta, F., Annan, R.S., Hershko, A., und Yen, T.J. (2008). Phosphorylation sites in BubR1 that regulate kinetochore attachment, tension, and mitotic exit. *J Cell Biol* *183*, 667-680.
- Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M., und Ullrich, A. (1989). p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* *9*, 1165-1172.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* *80*, 225-236.
- Hynes, N.E., und Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* *5*, 341-354.
- Inoue, D., und Sagata, N. (2005). The Polo-like kinase Plx1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of *Xenopus* eggs. *EMBO J* *24*, 1057-1067.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E.A., und Pines, J. (2003). Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* *5*, 143-148.
- Jang, Y.J., Lin, C.Y., Ma, S., und Erikson, R.L. (2002). Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1984-1989.
- Janssen, A., Kops, G.J., und Medema, R.H. (2009). Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 19108-19113.
- Jelluma, N., Brenkman, A.B., McLeod, I., Yates, J.R., 3rd, Cleveland, D.W., Medema, R.H., und Kops, G.J. (2008a). Chromosomal instability by inefficient Mps1 auto-activation due to a weakened mitotic checkpoint and lagging chromosomes. *PLoS One* *3*, e2415.
- Jelluma, N., Brenkman, A.B., van den Broek, N.J., Crujisen, C.W., van Osch, M.H., Lens, S.M., Medema, R.H., und Kops, G.J. (2008b). Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell* *132*, 233-246.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., und Thun, M.J. (2009). Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* *59*, 225-249.
- Jensen, L.J., Kuhn, M., Stark, M., Chaffron, S., Creevey, C., Muller, J., Doerks, T., Julien, P., Roth, A., Simonovic, M., *et al.* (2009). STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucl Acids Res* *37*, D412-416.
- Joseph, J., Liu, S.T., Jablonski, S.A., Yen, T.J., und Dasso, M. (2004). The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr Biol* *14*, 611-617.
- Julka, S., und Regnier, F. (2004). Quantification in proteomics through stable isotope coding: a review. *J Proteome Res* *3*, 350-363.
- Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J.S., und Miki, T. (2006). Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. *Mol Biol Cell* *17*, 43-55.
- Kanehisa, M., Goto, S., Hattori, M., Aoki-Kinoshita, K.F., Itoh, M., Kawashima, S., Katayama, T., Araki, M., und Hirakawa, M. (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Res* *34*, D354-357.
- Kang, J., Chen, Y., Zhao, Y., und Yu, H. (2007). Autophosphorylation-dependent activation of human Mps1 is required for the spindle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 20232-20237.
- Kang, Y.H., Park, J.E., Yu, L.R., Soung, N.K., Yun, S.M., Bang, J.K., Seong, Y.S., Yu, H., Garfield, S., Veenstra, T.D., *et al.* (2006). Self-regulated Plk1 recruitment to kinetochores by the Plk1-PBIP1 interaction is critical for proper chromosome segregation. *Mol Cell* *24*, 409-422.
- Kapoor, T.M., Lampson, M.A., Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E.D., McEwen, B.F., und Khodjakov, A. (2006). Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* *311*, 388-391.
- Karaman, M.W., Herrgard, S., Treiber, D.K., Gallant, P., Atteridge, C.E., Campbell, B.T., Chan, K.W., Ciceri, P., Davis, M.I., Edeen, P.T., *et al.* (2008). A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* *26*, 127-132.
- Kasbek, C., Yang, C.H., Yusof, A.M., Chapman, H.M., Winey, M., und Fisk, H.A. (2007). Preventing the degradation of mps1 at centrosomes is sufficient to cause centrosome reduplication in human cells. *Mol Biol Cell* *18*, 4457-4469.
- Kawashima, S.A., Yamagishi, Y., Honda, T., Ishiguro, K., und Watanabe, Y. (2010). Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* *327*, 172-177.

- Kim, Y., Holland, A.J., Lan, W., und Cleveland, D.W. (2010). Aurora kinases and protein phosphatase 1 mediate chromosome congression through regulation of CENP-E. *Cell* **142**, 444-455.
- Kiyomitsu, T., Obuse, C., und Yanagida, M. (2007). Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev Cell* **13**, 663-676.
- Klebig, C., Korinth, D., und Meraldi, P. (2009). Bub1 regulates chromosome segregation in a kinetochore-independent manner. *J Cell Biol* **185**, 841-858.
- Kline, S.L., Cheeseman, I.M., Hori, T., Fukagawa, T., und Desai, A. (2006). The human Mis12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. *J Cell Biol* **173**, 9-17.
- Knight, Z.A., Lin, H., und Shokat, K.M. (2010). Targeting the cancer kinome through polypharmacology. *Nat Rev Cancer* **10**, 130-137.
- Kops, G.J., Weaver, B.A., und Cleveland, D.W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* **5**, 773-785.
- Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J., und Peters, J.M. (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J* **22**, 6598-6609.
- Kruger, M., Moser, M., Ussar, S., Thievensen, I., Luber, C.A., Forner, F., Schmidt, S., Zanivan, S., Fassler, R., und Mann, M. (2008). SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell* **134**, 353-364.
- Kutay, U., und Hetzer, M.W. (2008). Reorganization of the nuclear envelope during open mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 669-677.
- Kwiatkowski, N., Jelluma, N., Filippakopoulos, P., Soundararajan, M., Manak, M.S., Kwon, M., Choi, H.G., Sim, T., Deveraux, Q.L., Rottmann, S., *et al.* (2010). Small-molecule kinase inhibitors provide insight into Mps1 cell cycle function. *Nat Chem Biol* **6**, 359-368.
- Lahm, H.W., und Langen, H. (2000). Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis* **21**, 2105-2114.
- Lampson, M.A., und Kapoor, T.M. (2005). The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol* **7**, 93-98.
- Lan, W., und Cleveland, D.W. (2010). A chemical tool box defines mitotic and interphase roles for Mps1 kinase. *J Cell Biol* **190**, 21-24.
- Lane, H.A., und Nigg, E.A. (1996). Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J Cell Biol* **135**, 1701-1713.
- Larsen, M.R., Thingholm, T.E., Jensen, O.N., Roepstorff, P., und Jorgensen, T.J. (2005). Highly selective enrichment of phosphorylated peptides from peptide mixtures using titanium dioxide microcolumns. *Mol Cell Proteomics* **4**, 873-886.
- Lee, Y.J., Kim, E.H., Lee, J.S., Jeoung, D., Bae, S., Kwon, S.H., und Lee, Y.S. (2008). HSF1 as a mitotic regulator: phosphorylation of HSF1 by Plk1 is essential for mitotic progression. *Cancer Res* **68**, 7550-7560.
- Lehtio, J., und De Petris, L. (2010). Lung cancer proteomics, clinical and technological considerations. *J Proteomics* **73**, 1851-1863.
- Lenart, P., Petronczki, M., Steegmaier, M., Di Fiore, B., Lipp, J.J., Hoffmann, M., Rettig, W.J., Kraut, N., und Peters, J.M. (2007). The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* **17**, 304-315.
- Ligon, L.A., Tokito, M., Finklestein, J.M., Grossman, F.E., und Holzbaur, E.L. (2004). A direct interaction between cytoplasmic dynein and kinesin I may coordinate motor activity. *J Biol Chem* **279**, 19201-19208.
- Lindberg, R.A., Fischer, W.H., und Hunter, T. (1993). Characterization of a human protein threonine kinase isolated by screening an expression library with antibodies to phosphotyrosine. *Oncogene* **8**, 351-359.
- Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F., und Serrano, L. (2004). A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *J Mol Biol* **342**, 345-353.
- Lindon, C., und Pines, J. (2004). Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol* **164**, 233-241.
- Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V., und Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J Cell Biol* **185**, 193-202.
- Liska, A.J., und Shevchenko, A. (2003). Expanding the organismal scope of proteomics: cross-species protein identification by mass spectrometry and its implications. *Proteomics* **3**, 19-28.
- Liu, S.T., Chan, G.K., Hittle, J.C., Fujii, G., Lees, E., und Yen, T.J. (2003). Human MPS1 kinase is required for mitotic arrest induced by the loss of CENP-E from kinetochores. *Mol Biol Cell* **14**, 1638-1651.

- Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L., und Shokat, K.M. (1998). Engineering Src family protein kinases with unnatural nucleotide specificity. *Chem Biol* 5, 91-101.
- Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B.A., Gonzalez, C., Karess, R.E., Glover, D.M., und Sunkel, C.E. (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 5, 2153-2165.
- Lowery, D.M., Clauser, K.R., Hjerrild, M., Lim, D., Alexander, J., Kishi, K., Ong, S.E., Gammeltoft, S., Carr, S.A., und Yaffe, M.B. (2007). Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. *Embo J* 26, 2262-2273.
- Lowery, D.M., Mohammad, D.H., Elia, A.E., und Yaffe, M.B. (2004). The Polo-box domain: a molecular integrator of mitotic kinase cascades and Polo-like kinase function. *Cell Cycle* 3, 128-131.
- Luber, C.A., Cox, J., Lauterbach, H., Fancke, B., Selbach, M., Tschopp, J., Akira, S., Wiegand, M., Hochrein, H., O'Keefe, M., *et al.* (2010). Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity* 32, 279-289.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., *et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350, 2129-2139.
- Ma, H.T., und Poon, R.Y. (2011). How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *Biochem J* 435, 17-31.
- Macek, B., Mann, M., und Olsen, J.V. (2009). Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and applications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 199-221.
- Maciejowski, J., George, K.A., Terret, M.E., Zhang, C., Shokat, K.M., und Jallepalli, P.V. (2010). Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* 190, 89-100.
- Mackay, H.J., und Twelves, C.J. (2007). Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer* 7, 554-562.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompmaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., und Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 455, 119-123.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., und Lukas, J. (2006). Destruction of Claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell* 23, 307-318.
- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., und Horning, S. (2006). Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* 78, 2113-2120.
- Malmstrom, J., Lee, H., Nesvizhskii, A.I., Shteynberg, D., Mohanty, S., Brunner, E., Ye, M., Weber, G., Eckerskorn, C., und Aebersold, R. (2006). Optimized peptide separation and identification for mass spectrometry based proteomics via free-flow electrophoresis. *J Proteome Res* 5, 2241-2249.
- Malureanu, L.A., Jeganathan, K.B., Hamada, M., Wasilewski, L., Davenport, J., und van Deursen, J.M. (2009). BubR1 N terminus acts as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C(Cdc20) in interphase. *Dev Cell* 16, 118-131.
- Mamely, I., van Vugt, M.A., Smits, V.A., Semple, J.I., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R.H., und Freire, R. (2006). Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. *Curr Biol* 16, 1950-1955.
- Mann, M. (1996). A shortcut to interesting human genes: peptide sequence tags, expressed-sequence tags and computers. *Trends Biochem Sci* 21, 494-495.
- Mann, M. (2006). Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 952-958.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., und Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Mao, Y., Abrieu, A., und Cleveland, D.W. (2003). Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* 114, 87-98.
- Martin-Lluesma, S., Stucke, V.M., und Nigg, E.A. (2002). Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science* 297, 2267-2270.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.
- McNally, K.P., Buster, D., und McNally, F.J. (2002). Katanin-mediated microtubule severing can be regulated by multiple mechanisms. *Cell Motil Cytoskeleton* 53, 337-349.

- McNulty, D.E., und Annan, R.S. (2008). Hydrophilic interaction chromatography reduces the complexity of the phosphoproteome and improves global phosphopeptide isolation and detection. *Mol Cell Proteomics* 7, 971-980.
- Meraldi, P., Draviam, V.M., und Sorger, P.K. (2004). Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell* 7, 45-60.
- Mertins, P., Eberl, H.C., Renkawitz, J., Olsen, J.V., Tremblay, M.L., Mann, M., Ullrich, A., und Daub, H. (2008). Investigation of protein-tyrosine phosphatase 1B function by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics* 7, 1763-1777.
- Mills, G.B., Schmandt, R., McGill, M., Amendola, A., Hill, M., Jacobs, K., May, C., Rodricks, A.M., Campbell, S., und Hogg, D. (1992). Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *J Biol Chem* 267, 16000-16006.
- Mok, T.S., Wu, Y.L., Thongprasert, S., Yang, C.H., Chu, D.T., Saijo, N., Sunpaweravong, P., Han, B., Margono, B., Ichinose, Y., *et al.* (2009). Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361, 947-957.
- Moshe, Y., Boulaire, J., Pagano, M., und Hershko, A. (2004). Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7937-7942.
- Mueller, L.N., Brusniak, M.Y., Mani, D.R., und Aebersold, R. (2008). An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *J Proteome Res* 7, 51-61.
- Musacchio, A., und Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 379-393.
- Naslavsky, N., und Caplan, S. (2011). EHD proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends Cell Biol* 21, 122-131.
- Neef, R., Gruneberg, U., Kopajtich, R., Li, X., Nigg, E.A., Sillje, H., und Barr, F.A. (2007). Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat Cell Biol* 9, 436-444.
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E.A., Mayer, T.U., und Barr, F.A. (2003). Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol* 162, 863-875.
- Nesvizhskii, A.I. (2010). A survey of computational methods and error rate estimation procedures for peptide and protein identification in shotgun proteomics. *J Proteomics* 73, 2092-2123.
- Nigg, E.A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.
- Nishimura, Y., und Yonemura, S. (2006). Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci* 119, 104-114.
- Nishino, M., Kurasawa, Y., Evans, R., Lin, S.H., Brinkley, B.R., und Yu-Lee, L.Y. (2006). NudC is required for Plk1 targeting to the kinetochore and chromosome congression. *Curr Biol* 16, 1414-1421.
- Niswender, C.M., Ishihara, R.W., Judge, L.M., Zhang, C., Shokat, K.M., und McKnight, G.S. (2002). Protein engineering of protein kinase A catalytic subunits results in the acquisition of novel inhibitor sensitivity. *J Biol Chem* 277, 28916-28922.
- Nogales, E., Wolf, S.G., und Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.
- Nousiainen, M., Sillje, H.H., Sauer, G., Nigg, E.A., und Korner, R. (2006). Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5391-5396.
- Oda, Y., Huang, K., Cross, F.R., Cowburn, D., und Chait, B.T. (1999). Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6591-6596.
- Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnad, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., und Mann, M. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127, 635-648.
- Olsen, J.V., de Godoy, L.M., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., und Mann, M. (2005). Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* 4, 2010-2021.
- Olsen, J.V., Ong, S.E., und Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 3, 608-614.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., *et al.* (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* 3, ra3.

- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., und Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**, 376-386.
- Ong, S.E., und Mann, M. (2005). Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol* **1**, 252-262.
- Oppermann, F.S., Gnad, F., Olsen, J.V., Hornberger, R., Greff, Z., Keri, G., Mann, M., und Daub, H. (2009). Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol Cell Proteomics* **8**, 1751-1764.
- Orjalo, A.V., Arnaoutov, A., Shen, Z., Boyarchuk, Y., Zeitlin, S.G., Fontoura, B., Briggs, S., Dasso, M., und Forbes, D.J. (2006). The Nup107-160 nucleoporin complex is required for correct bipolar spindle assembly. *Mol Biol Cell* **17**, 3806-3818.
- Oshimori, N., Ohsugi, M., und Yamamoto, T. (2006). The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. *Nat Cell Biol* **8**, 1095-1101.
- Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., *et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**, 1497-1500.
- Pan, C., Olsen, J.V., Daub, H., und Mann, M. (2009). Global effects of kinase inhibitors on signaling networks revealed by quantitative phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics* **8**, 2796-2808.
- Pandey, A., Podtelejnikov, A.V., Blagoev, B., Bustelo, X.R., Mann, M., und Lodish, H.F. (2000). Analysis of receptor signaling pathways by mass spectrometry: identification of vav-2 as a substrate of the epidermal and platelet-derived growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 179-184.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., *et al.* (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13306-13311.
- Pao, W., Wang, T.Y., Riely, G.J., Miller, V.A., Pan, Q., Ladanyi, M., Zakowski, M.F., Heelan, R.T., Kris, M.G., und Varmus, H.E. (2005). KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* **2**, e17.
- Parsons, D.W., Wang, T.L., Samuels, Y., Bardelli, A., Cummins, J.M., DeLong, L., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Willson, J.K., *et al.* (2005). Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* **436**, 792.
- Pawson, T. (2007). Dynamic control of signaling by modular adaptor proteins. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 112-116.
- Pearson, R.B., und Kemp, B.E. (1991). Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods Enzymol* **200**, 62-81.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., und Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**, 3551-3567.
- Peschiaroli, A., Dorrello, N.V., Guardavaccaro, D., Venere, M., Halazonetis, T., Sherman, N.E., und Pagano, M. (2006). SCFbetaTrCP-mediated degradation of Claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. *Mol Cell* **23**, 319-329.
- Peters, J.M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 644-656.
- Petronczki, M., Glotzer, M., Kraut, N., und Peters, J.M. (2007). Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev Cell* **12**, 713-725.
- Pinkse, M.W., Uitto, P.M., Hilhorst, M.J., Ooms, B., und Heck, A.J. (2004). Selective isolation at the femtomole level of phosphopeptides from proteolytic digests using 2D-NanoLC-ESI-MS/MS and titanium oxide precolumns. *Anal Chem* **76**, 3935-3943.
- Posewitz, M.C., und Tempst, P. (1999). Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides. *Anal Chem* **71**, 2883-2892.
- Qi, W., Tang, Z., und Yu, H. (2006). Phosphorylation- and polo-box-dependent binding of Plk1 to Bub1 is required for the kinetochore localization of Plk1. *Mol Biol Cell* **17**, 3705-3716.
- Quinlan, M.P., und Settleman, J. (2009). Isoform-specific ras functions in development and cancer. *Future Oncol* **5**, 105-116.
- Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., und Cortes, J. (2007). Flying under the radar: the new wave of BCR-ABL inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 834-848.
- Raaijmakers, J.A., Tanenbaum, M.E., Maia, A.F., und Medema, R.H. (2009). RAMA1 is a novel kinetochore protein involved in kinetochore-microtubule attachment. *J Cell Sci* **122**, 2436-2445.
- Randall, C.L., Burkard, M.E., und Jallepalli, P.V. (2007). Polo kinase and cytokinesis initiation in mammalian cells: harnessing the awesome power of chemical genetics. *Cell Cycle* **6**, 1713-1717.

- Rappsilber, J., Mann, M., und Ishihama, Y. (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* 2, 1896-1906.
- Redeker, V., Lachkar, S., Siavoshian, S., Charbaut, E., Rossier, J., Sobel, A., und Curmi, P.A. (2000). Probing the native structure of stathmin and its interaction domains with tubulin. Combined use of limited proteolysis, size exclusion chromatography, and mass spectrometry. *J Biol Chem* 275, 6841-6849.
- Reini, K., Uitto, L., Perera, D., Moens, P.B., Freire, R., und Syvaoja, J.E. (2004). TopBP1 localises to centrosomes in mitosis and to chromosome cores in meiosis. *Chromosoma* 112, 323-330.
- Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., *et al.* (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131, 1190-1203.
- Rivers, J., Simpson, D.M., Robertson, D.H., Gaskell, S.J., und Beynon, R.J. (2007). Absolute multiplexed quantitative analysis of protein expression during muscle development using QconCAT. *Mol Cell Proteomics* 6, 1416-1427.
- Rosasco-Nitcher, S.E., Lan, W., Khorasanizadeh, S., und Stukenberg, P.T. (2008). Centromeric Aurora-B activation requires TD-60, microtubules, and substrate priming phosphorylation. *Science* 319, 469-472.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., *et al.* (2004). Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154-1169.
- Rush, J., Moritz, A., Lee, K.A., Guo, A., Goss, V.L., Spek, E.J., Zhang, H., Zha, X.M., Polakiewicz, R.D., und Comb, M.J. (2005). Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 23, 94-101.
- Salina, D., Enarson, P., Rattner, J.B., und Burke, B. (2003). Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly. *J Cell Biol* 162, 991-1001.
- Sambrook, J., Fritsch, E., und Maniatis, T. (1990). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York).
- Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., und Sabatini, D.M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25, 903-915.
- Santaguida, S., Tighe, A., D'Alise, A.M., Taylor, S.S., und Musacchio, A. (2010). Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J Cell Biol* 190, 73-87.
- Santamaria, A., Neef, R., Eberspacher, U., Eis, K., Husemann, M., Mumberg, D., Prechtel, S., Schulze, V., Siemeister, G., Wortmann, L., *et al.* (2007). Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Mol Biol Cell* 18, 4024-4036.
- Santamaria, A., Wang, B., Elowe, S., Malik, R., Zhang, F., Bauer, M., Schmidt, A., Sillje, H.H., Korner, R., und Nigg, E.A. (2011). The Plk1-dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics* 10, M110 004457.
- Schmelzle, K., Kane, S., Gridley, S., Lienhard, G.E., und White, F.M. (2006). Temporal dynamics of tyrosine phosphorylation in insulin signaling. *Diabetes* 55, 2171-2179.
- Schreiber, T.B., Mausbacher, N., Breitkopf, S.B., Grundner-Culemann, K., und Daub, H. (2008). Quantitative phosphoproteomics--an emerging key technology in signal-transduction research. *Proteomics* 8, 4416-4432.
- Schroeder, M.J., Shabanowitz, J., Schwartz, J.C., Hunt, D.F., und Coon, J.J. (2004). A neutral loss activation method for improved phosphopeptide sequence analysis by quadrupole ion trap mass spectrometry. *Anal Chem* 76, 3590-3598.
- Schwartz, D., und Gygi, S.P. (2005). An iterative statistical approach to the identification of protein phosphorylation motifs from large-scale data sets. *Nat Biotechnol* 23, 1391-1398.
- Seet, B.T., Dikic, I., Zhou, M.M., und Pawson, T. (2006). Reading protein modifications with interaction domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 473-483.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.Y., Yates, J.R., und Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 320, 1655-1658.
- Senko, M.W., Canterbury, J.D., Guan, S., und Marshall, A.G. (1996). A high-performance modular data system for Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10, 1839-1844.
- Shah, J.V., Botvinick, E., Bonday, Z., Furnari, F., Berns, M., und Cleveland, D.W. (2004). Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. *Curr Biol* 14, 942-952.

- Shah, K., Liu, Y., Deirmengian, C., und Shokat, K.M. (1997). Engineering unnatural nucleotide specificity for Rous sarcoma virus tyrosine kinase to uniquely label its direct substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 3565-3570.
- Shah, K., und Shokat, K.M. (2002). A chemical genetic screen for direct v-Src substrates reveals ordered assembly of a retrograde signaling pathway. *Chem Biol* *9*, 35-47.
- Sharma, K., Weber, C., Bairlein, M., Greff, Z., Keri, G., Cox, J., Olsen, J.V., und Daub, H. (2009). Proteomics strategy for quantitative protein interaction profiling in cell extracts. *Nat Methods* *6*, 741-744.
- Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., und Haber, D.A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* *7*, 169-181.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., und Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* *1*, 2856-2860.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* *344*, 783-792.
- Sliedrecht, T., Zhang, C., Shokat, K.M., und Kops, G.J. (2010). Chemical genetic inhibition of Mps1 in stable human cell lines reveals novel aspects of Mps1 function in mitosis. *PLoS One* *5*, e10251.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., und Zhou, H. (2007). Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 10364-10369.
- Solomon, B., Varella-Garcia, M., und Camidge, D.R. (2009). ALK gene rearrangements: a new therapeutic target in a molecularly defined subset of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* *4*, 1450-1454.
- Somers, W.G., und Saint, R. (2003). A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis. *Dev Cell* *4*, 29-39.
- Sordella, R., Bell, D.W., Haber, D.A., und Settleman, J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* *305*, 1163-1167.
- Sos, M.L., Michel, K., Zander, T., Weiss, J., Frommolt, P., Peifer, M., Li, D., Ullrich, R., Koker, M., Fischer, F., *et al.* (2009). Predicting drug susceptibility of non-small cell lung cancers based on genetic lesions. *J Clin Invest* *119*, 1727-1740.
- Spektor, A., Tsang, W.Y., Khoo, D., und Dynlacht, B.D. (2007). Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell* *130*, 678-690.
- Splinter, D., Tanenbaum, M.E., Lindqvist, A., Jaarsma, D., Flotho, A., Yu, K.L., Grigoriev, I., Engelsma, D., Haasdijk, E.D., Keijzer, N., *et al.* (2010). Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol* *8*, e1000350.
- Steen, H., und Mann, M. (2004). The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 699-711.
- Steinmetz, M.O., Kammerer, R.A., Jahnke, W., Goldie, K.N., Lustig, A., und van Oostrum, J. (2000). Op18/stathmin caps a kinked protofilament-like tubulin tetramer. *EMBO J* *19*, 572-580.
- Stephens, P., Edkins, S., Davies, H., Greenman, C., Cox, C., Hunter, C., Bignell, G., Teague, J., Smith, R., Stevens, C., *et al.* (2005). A screen of the complete protein kinase gene family identifies diverse patterns of somatic mutations in human breast cancer. *Nat Genet* *37*, 590-592.
- Strebhardt, K., und Ullrich, A. (2006). Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* *6*, 321-330.
- Strebhardt, K., und Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* *8*, 473-480.
- Stucke, V.M., Baumann, C., und Nigg, E.A. (2004). Kinetochores localization and microtubule interaction of the human spindle checkpoint kinase Mps1. *Chromosoma* *113*, 1-15.
- Stucke, V.M., Sillje, H.H., Arnaud, L., und Nigg, E.A. (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J* *21*, 1723-1732.
- Sudakin, V., Chan, G.K., und Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* *154*, 925-936.
- Sugiyama, N., Masuda, T., Shinoda, K., Nakamura, A., Tomita, M., und Ishihama, Y. (2007). Phosphopeptide enrichment by aliphatic hydroxy acid-modified metal oxide chromatography for nano-LC-MS/MS in proteomics applications. *Mol Cell Proteomics* *6*, 1103-1109.
- Sullivan, M., und Morgan, D.O. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 894-903.
- Sumara, I., Gimenez-Abian, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., und Peters, J.M. (2004). Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Curr Biol* *14*, 1712-1722.

- Sunkel, C.E., und Glover, D.M. (1988). polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* 89 (Pt 1), 25-38.
- Taberero, J. (2007). The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents. *Mol Cancer Res* 5, 203-220.
- Taylor, J.A., und Johnson, R.S. (1997). Sequence database searches via de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11, 1067-1075.
- Team, R.D.C. (2008). R: a language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Theis, M., Slabicki, M., Junqueira, M., Paszkowski-Rogacz, M., Sontheimer, J., Kittler, R., Heninger, A.K., Glatter, T., Kruusmaa, K., Poser, I., *et al.* (2009). Comparative profiling identifies C13orf3 as a component of the Ska complex required for mammalian cell division. *EMBO J* 28, 1453-1465.
- Thomas, R.K., Baker, A.C., DeBiasi, R.M., Winckler, W., Laframboise, T., Lin, W.M., Wang, M., Feng, W., Zander, T., MacConaill, L., *et al.* (2007). High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet* 39, 347-351.
- Tighe, A., Staples, O., und Taylor, S. (2008). Mps1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores. *J Cell Biol* 181, 893-901.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., und Nishida, E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 3, 341-348.
- Trost, M., English, L., Lemieux, S., Courcelles, M., Desjardins, M., und Thibault, P. (2009). The phagosomal proteome in interferon-gamma-activated macrophages. *Immunity* 30, 143-154.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., und Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5116-5121.
- Ubersax, J.A., und Ferrell, J.E., Jr. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 530-541.
- Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., und Morgan, D.O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425, 859.
- van de Weerd, B.C., und Medema, R.H. (2006). Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 5, 853-864.
- Vanneste, D., Takagi, M., Imamoto, N., und Vernos, I. (2009). The role of Hklp2 in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. *Curr Biol* 19, 1712-1717.
- Ventura, J.J., Hubner, A., Zhang, C., Flavell, R.A., Shokat, K.M., und Davis, R.J. (2006). Chemical genetic analysis of the time course of signal transduction by JNK. *Mol Cell* 21, 701-710.
- Vergnolle, M.A., und Taylor, S.S. (2007). Cenp-F links kinetochores to Ndc11/Ndc1/Lis1/dynein microtubule motor complexes. *Curr Biol* 17, 1173-1179.
- Verhey, K.J., und Hammond, J.W. (2009). Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 765-777.
- Villen, J., und Gygi, S.P. (2008). The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nat Protoc* 3, 1630-1638.
- Viloria-Petit, A., Crombet, T., Jothy, S., Hicklin, D., Bohlen, P., Schlaeppli, J.M., Rak, J., und Kerbel, R.S. (2001). Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* 61, 5090-5101.
- Wang, W., Zhang, W., Han, Y., Chen, J., Wang, Y., Zhang, Z., und Hui, R. (2005). NELIN, a new F-actin associated protein, stimulates HeLa cell migration and adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 1127-1131.
- Wang, X., Li, W., Parra, J.L., Beugnet, A., und Proud, C.G. (2003). The C terminus of initiation factor 4E-binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation. *Mol Cell Biol* 23, 1546-1557.
- Wang, X., und Proud, C.G. (2009). Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. *Trends Cell Biol* 19, 260-267.
- Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Hunter, T., und Osada, H. (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4419-4424.
- Weaver, B.A., Bonday, Z.Q., Putkey, F.R., Kops, G.J., Silk, A.D., und Cleveland, D.W. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol* 162, 551-563.
- Welburn, J.P., Grishchuk, E.L., Backer, C.B., Wilson-Kubalek, E.M., Yates, J.R., 3rd, und Cheeseman, I.M. (2009). The human kinetochore Ska1 complex facilitates microtubule depolymerization-coupled motility. *Dev Cell* 16, 374-385.

- Welburn, J.P., Vleugel, M., Liu, D., Yates, J.R., 3rd, Lampson, M.A., Fukagawa, T., und Cheeseman, I.M. (2010). Aurora B phosphorylates spatially distinct targets to differentially regulate the kinetochore-microtubule interface. *Mol Cell* **38**, 383-392.
- Winey, M., Goetsch, L., Baum, P., und Byers, B. (1991). MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J Cell Biol* **114**, 745-754.
- Winey, M., und Huneycutt, B.J. (2002). Centrosomes and checkpoints: the MPS1 family of kinases. *Oncogene* **21**, 6161-6169.
- Wong, J.W., und Cagney, G. (2010). An overview of label-free quantitation methods in proteomics by mass spectrometry. *Methods Mol Biol* **604**, 273-283.
- Wong, O.K., und Fang, G. (2005). Plx1 is the 3F3/2 kinase responsible for targeting spindle checkpoint proteins to kinetochores. *J Cell Biol* **170**, 709-719.
- Wong, O.K., und Fang, G. (2007). Cdk1 phosphorylation of BubR1 controls spindle checkpoint arrest and Plk1-mediated formation of the 3F3/2 epitope. *J Cell Biol* **179**, 611-617.
- Wozniak, M.J., und Allan, V.J. (2006). Cargo selection by specific kinesin light chain 1 isoforms. *EMBO J* **25**, 5457-5468.
- Xu, Q., Zhu, S., Wang, W., Zhang, X., Old, W., Ahn, N., und Liu, X. (2009). Regulation of kinetochore recruitment of two essential mitotic spindle checkpoint proteins by Mps1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* **20**, 10-20.
- Yamashiro, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G., Goto, H., Kaibuchi, K., Ito, M., Hartshorne, D.J., und Matsumura, F. (2008). Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev Cell* **14**, 787-797.
- Yarm, F.R. (2002). Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol* **22**, 6209-6221.
- Zhang, C., Kenski, D.M., Paulson, J.L., Bonshtien, A., Sessa, G., Cross, J.V., Templeton, D.J., und Shokat, K.M. (2005a). A second-site suppressor strategy for chemical genetic analysis of diverse protein kinases. *Nat Methods* **2**, 435-441.
- Zhang, H., Shi, X., Paddon, H., Hampong, M., Dai, W., und Pelech, S. (2004). B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. *J Biol Chem* **279**, 35726-35734.
- Zhang, X., Chen, Q., Feng, J., Hou, J., Yang, F., Liu, J., Jiang, Q., und Zhang, C. (2009). Sequential phosphorylation of Nedd1 by Cdk1 and Plk1 is required for targeting of the gammaTuRC to the centrosome. *J Cell Sci* **122**, 2240-2251.
- Zhang, Y., Wolf-Yadlin, A., Ross, P.L., Pappin, D.J., Rush, J., Lauffenburger, D.A., und White, F.M. (2005b). Time-resolved mass spectrometry of tyrosine phosphorylation sites in the epidermal growth factor receptor signaling network reveals dynamic modules. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1240-1250.
- Zhao, Y., und Chen, R.H. (2006). Mps1 phosphorylation by MAP kinase is required for kinetochore localization of spindle-checkpoint proteins. *Curr Biol* **16**, 1764-1769.
- Zhao, Y., und Jensen, O.N. (2009). Modification-specific proteomics: strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* **9**, 4632-4641.
- Zheng, J., Knighton, D.R., ten Eyck, L.F., Karlsson, R., Xuong, N., Taylor, S.S., und Sowadski, J.M. (1993). Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry* **32**, 2154-2161.
- Zhu, C.Q., da Cunha Santos, G., Ding, K., Sakurada, A., Cutz, J.C., Liu, N., Zhang, T., Marrano, P., Whitehead, M., Squire, J.A., *et al.* (2008). Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* **26**, 4268-4275.
- Zuccolo, M., Alves, A., Galy, V., Bolhy, S., Formstecher, E., Racine, V., Sibarita, J.B., Fukagawa, T., Shiekhhattar, R., Yen, T., *et al.* (2007). The human Nup107-160 nuclear pore subcomplex contributes to proper kinetochore functions. *EMBO J* **26**, 1853-1864.

7 ANHANG

7.1 ALLGEMEINE ABKÜRZUNGEN

ABC, Ammoniumbicarbonat; **ACN**, Acetonitril; **Ala, A**, Alanin; **Arg, R**, Arginin; **AS**, Aminosäure(n); **as**, analog-sensitiv; **Asn, N**, Asparagin; **Asp, D**, Asparaginsäure; **ATCC**, *American Type Culture Collection*; **ATP**, Adenosintriphosphat; **bidest.**, bidestilliert; **BP**, biological process (biologische Prozesse); **bzw.**, beziehungsweise; **C-**, carboxy-; **ca.**, circa; **CC**, cellular component (zelluläre Komponenten); **CID**, *collision induced decay*; **C-trap, CLT**, *curved linear trap*; **Cys, C**, Cystein; **D-Box**, *destruction box*; **DDC**, *DNA damage checkpoint*; **DDR**, *DNA damage response*; **DMEM**, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; **DMSO**, Dimethylsulfoxid; **DSMZ**, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; **DTT**, Dithiothreitol; **EDTA**, Ethylendiamintetraessigsäure; **EGFP**, *enhanced green fluorescent protein*; **EGTA**, Ethyleneglykoltetraessigsäure; **ESI**, Elektronenspray Ionisation; **EtOH**, Ethanol; **F12**, Ham's F12 Zellkulturmedium; **FA**, Ameisensäure; **FACS**, *fluorescence activated cell sorting* (Durchflusszytometrie); **FBS**, Fetales bovines Serum; **FDR**, *false discovery rate*; **Fe³⁺**, Eisen(3+) Ion; **Ga³⁺**, Gallium(3+) Ion; **Gln, Q**, Glutamin; **Glu, E**, Glutaminsäure; **Gly, G**, Glycin; **GTP**, Guanintriphosphat; **H**, *heavy*; **HAc**, Essigsäure; **HCl**, Salzsäure; **HEPES**, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; **HILIC**, *hydrophilic interaction chromatography*; **His, H**, Histidin; **HPLC**, *high performance liquid chromatography*; **hTERT-RPE**, Telomerase exprimierende, humane retinale Pigmentepithelzellen; **IAA**, Iodoacetamid; **Ile, I**, Isoleucin; **IMAC**, *immobilized metal affinity chromatography*; **IPI**, *international protein index*; **iTRAQ**, *isobaric tag for relative and absolute quantification*; **K₂HPO₄**, Dikaliumhydrogenphosphat; **K^{as}**, analog-sensitive Kinase; **KCl**, Kaliumchlorid; **kDa**, Kilodalton; **KEGG**, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; **KH₂PO₄**, Kaliumdihydrogenphosphat; **K^{wt}**, Wildtypkinase; **L**, *light*; **LC**, *liquid chromatography*; **Leu, L**, Leucin; **LTQ**, Lineare Ionenfalle; **Lys, K**, Lysin; **Lys-C**, Endo-Lysylpeptidase C; **M**, *medium*; **m/m**, Masse zu Masse; **m/z**, Masse zu Ladung; **MeOH**, Methanol; **Met, M**, Methionin; **MF**, *molecular function* (molekulare Funktionen); **MOPS**, 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure; **MS**, Massenspektrometrie, Massenspektrum; **MS/MS**, **MS^{2/3/n}**, Tandemmassenspektrum; **MSA**, *multi stage activation*; **N-**, amino-; **Na₃VO₄**, Natriumorthovanadat; **NaCl**, Natriumchlorid; **NaOH**, Natronlauge; **NEB**, *nuclear envelope breakdown*; **NET**, NaCl-EDTA-Triton; **NLS**, *nuclear localisation signal*; **NSCLC**, *non-small cell lung cancer* (nicht-kleinzelliger Lungenkrebs); **PB**, Polo-Box; **PBD**, Polo-Box Bindedomäne; **PBS**, *phosphate buffered saline*; **PEP**, *posterior error probability*; **Phe, F**, Phenylalanin; **PIC**, Phosphatase Inhibitor Cocktail; **PMSF**, Phenylmethanesulfonylfluorid; **Pro, P**, Prolin; **PTB**, *phosphotyrosin-binding*; **PTM**, *post-translational modification*; **PVDF**, Polyvinylidenfluorid; **rpm**, *rotations per minute*; **RPMI**, RPMI- (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Zellkulturmedium; **SAC**, *spindel assembly checkpoint*; **SAM**, *significance analysis of microarray*; **SCX**, *strong cation exchange*; **SDS**, Natriumdodecylsulfat; **SDS-PAGE**, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese; **Ser, S**, Serin; **SH2**, *src-homology-2*; **SILAC**, *stable isotope labeling in cell culture*; **sog.**, sogenannt; **STRING**, *search tool for the retrieval of interacting gens/proteins*; **SV**, Säulenvolumen; **TAL**, ZK-thiazolidinone; **TCA**, Trichloressigsäure; **TFA**, Trifluoressigsäure; **Thr, T**, Threonin; **TiO₂**, Titandioxid; **TOF**, *time-of-flight*; **Tris**, Trizma Base; **Trp, W**, Tryptophan; **Tyr, Y**, Tyrosin; **v/v**, Volumen zu Volumen; **Val, V**, Valin; **vgl.**, vergleiche; **wt**, Wildtyp; **z.B.**, zum Beispiel

7.2 VERZEICHNIS VERWENDETER PROTEINNAMENABKÜRZUNGEN

4E-BP1, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; **ABL1**, tyrosine-protein kinase ABL 1; **AKT**, RAC serine/threonine-protein kinase; **ALK**, anaplastic lymphoma kinase; **ANAPC1**, anaphase-promoting complex subunit 1; **APC/C**, anaphase-promoting complex/cyclosome; **Asp**, abnormal spindle protein; **ASPM**, abnormal spindle-like microcephaly-associated protein; **ATM**, ataxia telangiectasia-mutated; **ATR**, ATM and Rad3-related; **AurA**, **Aurora-A**, aurora kinase A; **AurB**, **Aurora-B**, aurora kinase B; **BCL9L**, B-cell CLL/lymphoma 9-like protein; **BCR**, breakpoint cluster region; **Bor**, borealin; **Bora**, protein aurora borealis; **BRAF**, serine/threonine-protein kinase B-raf; **Bub1**, mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1; **Bub3**, budding uninhibited by benzimidazole 3; **BubR1**, mitotic checkpoint serine/threonine protein kinase BUB1 beta; **CASC5**, protein CASC5; **CCDC99**, spindly, Coiled-coil domain-containing protein 99; **Ccd16**, **ANAPC6**, cell division cycle protein 16 homolog; **Cdc20**, cell division cycle 20; **Ccd23**, **APC8**, cell division cycle protein 23 variant; **Cdc25**, cell division cycle 25; **Ccd25B**, M-phase inducer phosphatase 2; **Ccd25C**, M-phase inducer phosphatase 3; **Cdc27**, **ANAPC3**, cell division cycle protein 27 homolog; **Cdc5**, cell division cycle 5; **Cdk1**, cyclin-dependant kinase 1; **Cdk2**, cyclin-dependant kinase 1; **Cenp-A**, centromere protein A; **Cenp-E**, centromere protein E; **Cenp-F**, centromere protein F; **Cenp-N**, centromere protein N; **Cenp-U**, centromere protein U; **CEP170**, centrosomal protein of 170 kDa; **CEP192**, centrosomal protein of 192 kDa; **CEP55**, centrosomal protein of 55 kDa; **CEP97**, centrosomal protein of 97 kDa; **CHD4**, chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4; **CHD8**, chromodomain-helicase-DNA-binding protein 8; **CK1d**, casein kinase I isoform delta; **CK1e**, casein kinase I isoform epsilon; **CK1δ**, casein kinase 1 delta; **CLASP1**, CLIP-associating protein-1; **CLASP2**, CLIP-associating protein 2; **CLIP1**, CLIP1 protein; **CLIP170**, cytoplasmic linker protein-170; **CLSPN**, claspin; **C-Mad2**, closed Mad2; **c-Met**, hepatocyte growth factor receptor (met proto-oncogene tyrosine kinase); **Crn1**, exportin 1; **CTNNA1**, catenin alpha-1; **Cul1**, cullin 1; **CYTSA**, cytospin-A; **Ddr1**, discoidin domain receptor tyrosine kinase 1; **DOCK5**, dedicator of cytokinesis protein 5; **Dsn1**, kinetochore-associated protein DSN1 homolog; **Eb1**, end-binding protein-1; **ECT2**, epithelial cell-transforming sequence 2 oncogene; **EGFR**, epidermal growth factor receptor; **Emi1**, early mitotic inhibitor 1; **EML4**, echinoderm microtubule-associated protein-like 4; **EPS15**, epidermal growth factor receptor substrate 15; **EPS15L1**, epidermal growth factor receptor substrate 15-like 1; **ErbB2**, **Her2**, receptor tyrosine-protein kinase erbB-2; **ERCC6L**, DNA excision repair protein ERCC-6-like; **Erk2**, mitogen-activated protein kinase 1; **FADD**, FAS-associated death domain protein; **FAM199X**, protein FAM199X; **FBXO30**, F-box only protein 30; **FRA2**, Fos-related antigen 2; **GEF**, guanine nucleotide exchange factor; **GSG2**, serine/threonine-protein kinase haspin; **Hec1**, **Ndc80**, highly expressed in cancer protein; **HIST2H2AC**, histone H2A type 2-C; **Hsf1**, heat shock factor 1; **Huwe1**, E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1; **IEX-1**, radiation-inducible immediate-early gene IEX-1; **INCENP**, inner centromere protein; **JNK1**, JUN N-terminal kinase 1; **JNK2**, JUN N-terminal kinase 2; **KHC**, kinesin heavy chain; **KIF15**, **Hklp2**, kinesin family member 15; **KIF18A**, kinesin-like protein KIF18A; **KIF20A**, kinesin-like protein KIF20A; **KIF23**, kinesin family member 23; **KIF2A**, kinesin heavy chain member 2A; **KIF4A**, chromosome-associated kinesin KIF4A; **KIT**, mast/stem cell growth factor receptor; **KLC**, kinesin light chain; **KLC2**, kinesin light chain 2; **KMN Netzwerk**, CASC5 (Knl1)/Mis12/Ndc80; **kMTs**, kinetochore microtubules; **KRAS**, Kirsten rat sarcoma-2 viral (v-Ki-ras2) oncogene homolog; **K-RAS**, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene; **Lap2**, lamina-associated polypeptide 2 beta/gamma; **Lis1**, lissencephaly-1; **LMNA**, lamin; **LMNA**, lamin-A/C; **LMNB1**, lamin-B1; **Mad1**, mitotic-arrest deficient homologue 1; **Mad1L1**, MAD1 mitotic arrest deficient-like 1; **Mad2**, mitotic-arrest deficient homologue 2; **Man1**, inner nuclear membrane protein Man1; **MAP1B**, microtubule-associated protein 1B; **MAP7D1**, MAP7 domain-containing protein 1; **MAPK**, mitogen activated protein kinase; **MAST4**, microtubule-associated serine/threonine-protein kinase 4; **Mcak**, mitotic centromere-associated kinesin; **Mcm21**, minichromosome maintenance protein-21; **Mec1**, ATM Hefe Homolog; **MIS12**, MIND kinetochore complex component, homolog (*S. pombe*); **Mis12 Komplex**, Mis12/Dsn1/Nsl1/Pmf1 Proteinkomplex; **MKI67**, antigen KI-67; **MLF1IP**, centromere

protein U; **Mps1**, multipolar spindle-1 dual, dual specificity protein kinase TTK; **mTOR**, mammalian target of rapamycin; **MYH9**, myosin-9; **Mypt1**, myosin phosphatase target subunit 1; **MYST2**, histone acetyltransferase MYST2; **Myt1**, myelin transcription factor 1; **Ndc80 Komplex**, Hec1/Nuf2/Spc24/Spc25 Proteinkomplex; **Nde1**, nudE nuclear distribution gene E homolog 1 (*A. nidulans*); **Ndel1**, nudE-like protein 1; **NEDD1**, neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 1; **NEXN**, F-actin binding protein Nexilin; **Nlp**, ninein-like protein; **NPC**, nuclear pore complex; **NPM1**, nucleophosmin; **NSL1**, kinetochore-associated protein NSL1 homolog; **NudC**, nuclear distribution gene C homolog; **Nuf2**, NDC80 kinetochore complex component, homolog (*S. cerevisiae*); **NUMA1**, nuclear mitotic apparatus protein 1; **Nup107**, nuclear pore complex protein Nup107; **Nup153**, nuclear pore complex protein Nup153; **Nup205**, nuclear pore complex protein Nup205; **Nup214**, nuclear pore complex protein Nup214; **Nup35**, nucleoporin NUP53; **Nup98**, nuclear pore complex protein Nup98-Nup96; **O-Mad2**, open Mad2; **PARN**, poly(A)-specific ribonuclease PARN; **PARP4**, poly [ADP-ribose] polymerase 4; **PDGFR α/β** , alpha/beta-type platelet-derived growth factor receptor; **PDXDC1**, pyridoxal-dependent decarboxylase domain-containing protein 1; **PHIP**, PH-interacting protein; **Pho85-Pcl1**, Pho85-Pcl1 cyclin-dependent kinase; **PI3K**, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; **PICH**, Plk1-interacting checkpoint helicase; **PKA**, protein kinase A; **Plk1**, polo-like kinase 1; **PMF1**, polyamine-modulated factor 1; **PP1C**, protein phosphatase 1C; **PP2A**, protein phosphatase 2A; **PPP1R12A**, protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A; **PRAS40**, proline-rich AKT1 substrate 1; **PRC1**, protein regulator of cytokinesis 1; **RACGAP1**, Rac GTPase-activating protein 1; **Rad53**, Rad53 kinase; **RanBP2**, E3 SUMO-protein ligase RanBP2; **RanGAP1**, Ran-GTPase-activating protein; **RAPTOR**, regulatory-associated protein of mTOR; **RhoA**, ras homolog gene family, member A; **RICTOR**, rapamycin-insensitive companion of mTOR; **Rod**, rough deal; **ROS**, proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS; **RZZ**, Rod/Zw10/Zwilich Komplex; **SCF Komplex**, Skp1/Cul1/F-Box Ubiquitin Ligase Proteinkomplex; **Sgo1**, shugoshin 1; **SGOL2**, shugoshin-like 2; **Ska Komplex**, Ska1/Ska2/Ska3 Proteinkomplex; **Ska1**, spindle and kinetochore-associated protein 1; **Ska2**, spindle and kinetochore-associated protein 2; **Ska3**, spindle and kinetochore-associated protein 3; **Skp1**, S-phase kinase-associated protein 1; **SMARCAD1**, ATP-dependent helicase SMARCAD1; **Spc24**, spindle pole body component 24, homolog (*S. cerevisiae*); **Spc25**, spindle pole body component 25, homolog (*S. cerevisiae*); **SRRM2**, serine/arginine repetitive matrix protein 2; **STAT**, signal-transducer and activator of transcription; **STMN1**, stathmin; **SUGT1**, suppressor of G2 allele of SKP1 homolog; **Sur**, survivin; **SYNJ1**, synaptojanin-1; **Tel1**, ATR Hefe Homolog; **TMPO**, lamina-assoziiertem Proteins Thymopoietin; **TOP1**, DNA topoisomerase 1; **TOP2A**, DNA topoisomerase 2-alpha; **TopBP1**, DNA topoisomerase 2-binding protein 1; **TPR**, nucleoprotein TPR; **TPX2**, targeting protein for Xklp2; **TRIM3**, tripartite motif-containing protein 3; **TSC2**, tuberous sclerosis 2 protein; **TTK**, **MPS1**, dual specificity protein kinase TTK; **TUBA1C**, tubulin alpha-1C chain; **TUBB2C**, tubulin beta-2C chain; **USP47**, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47; **USP5**, ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5; **VEGF**, vascular endothelial growth factor; **v-Src**, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src; **Wee1**, dual specificity protein kinase Wee1; **XRCC6**, ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1; **Zw10**, zeste white-10; **Zwint**, Zw10 interactor; **β TrCP**, beta-transducin repeat containing protein

7.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Schematische Darstellung der Plk1 Struktur	5
Abbildung 2:	Plk1 Aktivität und Lokalisation während des Zellzyklus	11
Abbildung 3:	Typischer Arbeitsablauf der quantitativen Phosphoproteomik	22
Abbildung 4:	Schematische Darstellung eines LTQ Orbitrap Massenspektrometers	24
Abbildung 5:	Chemical genetics	29
Abbildung 6:	Zellzyklusverteilung von hTERT-RPE-Plk1 ^{as} Zellen nach Inkubation mit Synchronisations-reagenzien und Analyse mit FACS.....	53
Abbildung 7:	Ermittlung der optimalen 3-MB-PP1 Konzentration zur Inhibition der Plk1 Aktivität	55
Abbildung 8:	Zelluläre Induktion der Plk1 Aktivität	56
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus und der einzelnen Arbeitsschritte der Plk1 Studie	58
Abbildung 10:	Venn Diagramme der Plk1 Studie.....	59
Abbildung 11:	Paarweiser Vergleich der quantifizierten Phosphopeptide aller Experimente in Plk1 ^{as} und Plk1 ^{wt} Zellen.....	60
Abbildung 12:	Phosphopeptididentifikationen der Plk1 Studie	62
Abbildung 13:	Konsistent quantifizierten Phosphopeptide und 3-MB-PP1 <i>off-target</i> Effekt ..	63
Abbildung 14:	Identifikation von Plk1-abhängigen Phosphorylierungsänderungen durch SAM	66
Abbildung 15:	Anreicherung von Sequenzmotiven um Plk1-induzierte Phosphorylierungsstellen	69
Abbildung 16:	Anreicherungsanalyse von Gene Ontology (GO) und Pfam Proteindomänen Termini in Plk1-regulierten Phosphoproteinen.....	71
Abbildung 17:	Proteomabdeckung der in Abbildung 16 ausgewählten, signifikant überrepräsentierten Termini der GO und Pfam Analyse	71
Abbildung 18:	Plk1 Regulation von mitotischen Kompartimenten	73
Abbildung 19:	Plk1 Regulation der Komponenten des mTOR Signalwegs	74
Abbildung 20:	Synchronisation und Inhibitorbehandlung von hTERT-RPE Mps1 ^{as} Zellen.....	75
Abbildung 21:	Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus und der einzelnen Arbeitsschritte der Mps1 Studie.....	77
Abbildung 22:	Venn Diagramme der Mps1 Studie	78
Abbildung 23:	Paarweiser Vergleich der quantifizierten Phosphopeptide aller Experimente in Mps1 ^{as} und Mps1 ^{wt} Zellen.....	79

Abbildung 24: Phosphopeptididentifikationen der Mps1 Studie	81
Abbildung 25: Identifikation von Mps1-abhängigen Phosphorylierungsänderungen durch SAM	83
Abbildung 26: Anreicherung von Sequenzmotiven um Mps1-induzierte Phosphorylierungsstellen	90
Abbildung 27: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus und der einzelnen Arbeitsschritte der NSCLC Studie	94
Abbildung 28: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung der NSCLC Studie.....	95
Abbildung 29: Anzahl an Phosphopeptiden, sowie an identifizierten, quantifizierten und Klasse I Phosphorylierungsstellen der NSCLC Studie.....	96
Abbildung 30: Quantifizierte Klasse I Phosphorylierungsstellen der NSCLC Studie	97
Abbildung 31: Korrelation der logarithmierten Ratios der in beiden Experimenten einer NSCLC Zelllinie detektierten Klasse I Phosphorylierungsstellen	99
Abbildung 32: Verteilungen der logarithmierten Mittelwerte der Ratios der in beiden Experimenten einer NSCLC Zelllinie detektierten Klasse I Phosphorylierungsstellen	101
Abbildung 33: Datengrundlage der Cluster Analyse der Phosphorylierungsprofile von 31 der 33 NSCLC Zelllinien	104
Abbildung 34: Cluster Analyse der Phosphorylierungsprofile von 31 der 33 NSCLC Zelllinien	104
Abbildung 35: Lokalisation der Mps1 Substratproteine in der Zentromer-Kinetochor Region und Peripherie	131

7.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Vergleich der Ergebnisse der SAM Analyse der Phosphopeptide der Plk1 Studie mit den experimentellen Daten	64
Tabelle 2: Vergleich der Ergebnisse der SAM Analyse der Phosphorylierungsstellen der Plk1 Studie mit den experimentellen Daten.....	66
Tabelle 3: 3-MB-PP1 induzierte off-target Effekte der Mps1 StudieIn Mps1 ^{as} und Mps1 ^{wt} Zellen regulierte Phosphopeptide	82
Tabelle 4: Vergleich der Ergebnisse der SAM Analyse der Phosphopeptide der Mps1 Studie mit den experimentellen Daten	85

Tabelle 5: Vergleich der Ergebnisse der SAM Analyse der Phosphorylierungsstellen der Mps1 Studie mit den experimentellen Daten	86
Tabelle 6: Mps1 regulierte Phosphopeptide	88
Tabelle 7: Mps1 regulierte Phosphorylierungsstellen.....	89
Tabelle 8: NSCLC Zelllinien des Super SILAC Referenzstandards für die vergleichende Analyse von 33 NSCLC Zelllinien	91
Tabelle 9: Poolingschema der NSCLC Zelllinien.....	92
Tabelle 10: Markierungseffizienzen der NSCLC Zelllinien und Korrekturfaktoren des Probenpoolings	93
Tabelle 11: Anzahl quantifizierter Klasse I Phosphorylierungsstellen jeder Zelllinie der NSCLC Studie mit statistischen Kennzahlen	102
Tabelle 12: Ausgewählte Plk1 regulierte Phosphorylierungsstellen und Phosphopeptide	117

7.5 VERZEICHNIS ERGÄNZENDER TABELLEN (MS EXCEL FORMAT)

Tabelle A1: Daten der Phosphopeptide aller SILAC Experimente der Plk1 Studie.

Tabelle A2: Daten der Phosphorylierungsstellen aller SILAC Experimente der Plk1 Studie. Des Weiteren listet die Tabelle alle quantifizierten Phosphorylierungsstellen die nach Plk1 Inhibition entweder durch den Inhibitor ZK-thiazolidinone (TAL) oder durch zelluläre Expression einer Plk1 shRNA in Santamaria *et al.* (2007) als negativ reguliert beschrieben wurden. Zudem werden alle zugehörigen SILAC Ratios der jeweils zwei biologischen Replikate aufgeführt. Die Tabelle listet ebenfalls bekannte *in-vitro* und *in-vivo* Plk1 Phosphorylierungsstellen, sowie weitere funktionell charakterisierte Phosphorylierungsstellen, denen bis dato noch kleine Plk1-abhängige Phosphorylierung nachgewiesen wurde. Alle Informationen wurden aus der PhosphoSitePlus® Datenbank gewonnen (<http://www.phosphosite.org>).

Tabelle A3: Daten und Ergebnisse der GO, Pfam und KEGG Anreicherungsanalysen. Des Weiteren werden die Anzahl der Einträge der humanen IPI Datenbank, die Anzahl aller in Plk1³⁵ Zellen identifizierten Phosphoproteine und die Anzahl aller durch Plk1 regulierten Phosphoproteine der Plk1 Studie, die in den GO Kategorien CC, BP und MF, sowie in der Pfam Domänen Datenbank annotiert sind, gelistet.

Tabelle A4: Daten der STRING Interaktionsanalyse.

Tabelle A5: Daten der Phosphopeptide aller SILAC Experimente der Mps1 Studie.

Tabelle A6: Daten der Phosphorylierungsstellen aller SILAC Experimente der Mps1 Studie.

Tabelle A7: Daten der Phosphorylierungsstellen aller SILAC Experimente der NSCLC Studie.

8 PUBLIKATIONEN

Schreiber, T.B., Mausbacher, N., Breitkopf, S.B., **Grundner-Culemann, K.** und Daub, H. (2008). *Quantitative phosphoproteomics - an emerging key technology in signal-transduction research*. *Proteomics* 8, 4416-4432.

Oppermann, F.S.*, **Grundner-Culemann, K.***, Kumar, C., Gruss, O.J., Jallepalli, P.V. und Daub, H. (2012). *Combination of chemical genetics and phosphoproteomics for kinase signaling analysis enables confident identification of cellular downstream targets*. *Mol Cell Proteomics* 11, O111 012351. *Gleichberechtigte Erstautoren.

9 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Henrik Daub für die Vergabe des interessanten und spannenden Themas und die erstklassige Betreuung und Förderung. Seine Erfahrung und hilfreichen Anregungen, sein Vertrauen in mich und meine Arbeit und sein Interesse an deren Fortgang haben mich stets sehr motiviert.

Prof. Dr. Axel Ullrich danke ich für die großzügige Unterstützung und die Gewährleistung bester Arbeitsbedingungen in seiner Abteilung am Max-Planck-Institut für Biochemie. Des Weiteren danke ich meinem Zweitprüfer Prof. Dr. Stephan Sieber für die Begutachtung dieser Arbeit und Prof. Dr. Michael Sattler für seine Arbeit als Vorsitzender der Prüfungskommission.

Prof. Dr. Matthias Mann und seinen Mitarbeitern möchte ich für die gute Kooperation und die technische Beratung und Unterstützung beim Betrieb der Massenspektrometer danken. Dr. Jürgen Cox danke ich für die Bereitstellung der immer aktuellsten Version der Software MaxQuant. Prof. Dr. Prasad Jallepalli danke ich für die Bereitstellung der Zelllinien hTERT-RPE-PIk1^{wt/as} und hTERT-RPE-Mps1^{wt/as}.

Weiterhin bedanke ich mich bei Felix Oppermann für die hervorragende Zusammenarbeit. Ein großes Dankeschön geht auch an Renate Hornberger für ihre ausgezeichnete Unterstützung bei Labor- und Zellkulturarbeiten, insbesondere bei der Durchführung des Zelllinienprojekts.

Vielen herzlichen Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Signaltransduktion und der gesamten Abteilung Molekularbiologie des Max-Planck-Instituts für Biochemie für zahlreiche Anregungen, interessante Diskussionen und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Kathi und David für ihr engagiertes Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Schwester Eva, meinen Eltern und meinem Mann Sebastian. Vielen Dank für Euren Halt und Eure uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung.