

蛋白质组学的发展及其在急性髓系白血病中的应用

季欣瑶^{1,2}, 牛长春^{1,2*}

¹重庆医科大学, 重庆

²重庆市人民医院, 重庆

收稿日期: 2024年2月25日; 录用日期: 2024年3月19日; 发布日期: 2024年3月25日

摘要

急性髓系白血病作为一种复发率高的造血系统恶性肿瘤, 其分子机制、预后预测以及药物反应一直是这个疾病诊疗的关键, 而近年来飞速发展的蛋白质组学技术也逐渐进入了急性髓系白血病应用研究领域。该文对急性髓系白血病蛋白质组涉及的技术进行了回顾, 总结了急性髓系白血病蛋白质组研究及应用的进展。

关键词

急性髓系白血病, 蛋白质组学, 生物标志物

Development of Proteomics and Its Use in Acute Myeloid Leukemia

Xinyao Ji^{1,2}, Changchun Niu^{1,2*}

¹Chongqing Medical University, Chongqing

²Chongqing People's Hospital, Chongqing

Received: Feb. 25th, 2024; accepted: Mar. 19th, 2024; published: Mar. 25th, 2024

Abstract

As a hematopoietic malignancy with high recurrence rate, acute myeloid leukemia's molecular mechanism, prognosis prediction and drug response have always been the key to the diagnosis and treatment of this disease. The rapid development of proteomics technology in recent years

*通讯作者。

文章引用: 季欣瑶, 牛长春. 蛋白质组学的发展及其在急性髓系白血病中的应用[J]. 临床医学进展, 2024, 14(3): 1255-1263. DOI: 10.12677/acm.2024.143836

has gradually entered the applied research field of acute myeloid leukemia. This paper reviews the techniques involved in the acute myeloid leukemia proteome and summarizes the progress of the acute myeloid leukemia proteome study and application.

Keywords

Acute Myeloid Leukemia, Proteomics, Biomarker

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

急性髓系白血病(Acute myeloid leukemia, AML)是一种髓系干细胞前体的高复发率血液系统恶性肿瘤,其特征在于造血系统增殖克隆、异常分化的髓系细胞对骨髓、血液和其他组织的浸润。目前 AML 最新的分类程序是通过骨髓标本和血涂片的形态学评估、细胞表面标记物的流式细胞术分析、染色体的常规细胞遗传学检测以及分子遗传学病变来完成[1] [2] [3]。现阶段针对 AML 的标准治疗方案主要为蒽环类或蒽二酮类药物联合阿糖胞苷(“3 + 7”方案)进行强化化疗的标准诱导方案,以及缓解后进行的巩固化疗和/或造血干细胞移植,但是 AML 的复发率仍居高不下。尽管一些基于基因组学的分子变化已经应用于临床诊疗,并揭示了一些药物作用靶点,但仍然存在一些患者的实际生存结果与其遗传风险不符合的情况,另外大多数 AML 突变所揭示的药物靶点(例如酪氨酸激酶抑制剂)目前并不能用于临床药物治疗[4] [5] [6],因此更需要超越基因组特征的预后标志物来提高预测的准确性,改善治疗效果。近年来,蛋白质组学不仅为基因组学和转录组学提供了补充信息,还揭示了新的分子机制,为完善 AML 预后预测提供了新的可能性。

2. AML 蛋白质组学研究中主要使用蛋白质组技术

蛋白质作为生物功能的直接执行者,对其的直接检测可以为细胞动态分子行为提供依据,提高我们对基因型到表型关系的理解[7]。1995年, Marc Wilkin 首次提出蛋白质组学这个概念[8],它将蛋白质组实验与数据分析相结合,目的在于研究蛋白质的组成结构与表达,蛋白质间的相互作用和联系以及蛋白质与不同代谢途径的关系。目前蛋白质组学可以分为三个主要领域:首先在于蛋白质微观表征,用于大规模鉴定蛋白质及其翻译后修饰;其次是差异蛋白质组学,用于比较蛋白质水平在不同疾病中的表达差异与潜在应用;最后是通过质谱法等技术研究蛋白质与蛋白质间的相互作用[9]。传统的蛋白质组学是通过免疫组织化学染色(Immunohistochemistry, IHC)、蛋白免疫印迹(Western blot, WB)以及酶联免疫吸附实验(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)对蛋白质进行定性以及初步的定量检测,耗时较长,精度也无法满足高通量的蛋白质组研究,而随着测序技术的发展,诸如质谱分析、组织微阵列这类实验时间短,检测精度高的技术的问世,满足了人类大规模蛋白组的探索需求。现简单总结目前急性髓系白血病蛋白质组研究主要使用技术。

2.1. 用于蛋白质表达谱的质谱技术

质谱技术作为蛋白质研究的中心分析技术,是通过将蛋白质分子转化为离子,并根据其质量和电荷比进行分析和鉴定而完成对蛋白质的分析和鉴定。目前的蛋白质定性技术通常是飞行时间质谱(Time of

flight mass spectrometer, TOF MS), 适用于对蛋白质进行全局定性分析, 判断蛋白有无, 并有效提高了鉴定低丰度目标蛋白的可行性。基质辅助激光解吸/电离(Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)和电喷雾电离(Electrospray ionization, ESI)技术是质谱离子化最常用的两个技术, MALDI 是通过将样品与有机基质共结晶, 并利用激光脉冲将基质激发, 从而将离子快速转移到气相中。ESI 则是通过在大气压下将电生成的离子细雾喷入质谱仪的进口[10][11][12]。

基于质谱的蛋白质组学的工作流程通常包括将蛋白质酶促消化成肽、液相色谱(Liquid chromatograph, LC)分离和基于串联质谱(Mass spectrometer, MS)的肽测量, 然后是数据库搜索。同位素和化学标签标记的质谱方法被广泛用于评估复杂环境中的相对和绝对蛋白质丰度, 包括通过细胞培养物中的氨基酸进行稳定同位素标记(Stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC)、用于相对和绝对定量的同量异位素标签(Isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)和串联质量标签(Tandem mass tag, TMT) [13]。早期由于技术的限制, 仅能对于简单生物进行蛋白表达谱的研究, 例如酵母蛋白、恶性疟原虫、小鼠体液等[14][15][16]。随着质谱技术的准确度及鉴定通量不断提高, 蛋白质表达谱的研究对象也逐渐转于人体组织器官[17], 开始对各种疾病相关的蛋白质表达差异进行探索[18][19][20][21]。而现在, 质谱技术的进展使我们更接近于表征单细胞蛋白质组, 超高灵敏度质谱法和细胞表型图像分析的结合使得检测单细胞中蛋白质成为可能[22]。

2.2. 蛋白质修饰研究

蛋白质修饰是指蛋白质在生物合成后的化学修饰, 也称为翻译后修饰(Post-translational modification, PTM), 它可以决定蛋白活性状态、定位、转运以及与其他蛋白质的相互作用, 能够引起蛋白质性质和功能的变化, 在细胞过程中起着重要作用。由于蛋白质可以通过不同的方式进行修饰(如甲基化、乙酰化和磷酸化; 小肽或蛋白质的共价偶联; 泛素化等), 因此蛋白质在不同修饰状态下的功能是不同的[23]。

2.2.1. 磷酸化蛋白质组学

蛋白质磷酸化修饰(Phosphorylation)是生物体内最为重要、含量最丰富、研究力最深入的修饰方式, 包括肿瘤细胞、发育和分化、信号转导、细胞凋亡、新陈代谢和肿瘤发生。对细胞裂解后提取的蛋白质进行酶解, 再对其中的磷酸化肽段进行质谱分析是目前磷酸化蛋白质组的常用方法。磷酸化蛋白质组学技术正在不断发展, 其在疾病尤其是肿瘤研究中的应用也更加广泛。Liu 等人通过蛋白质组学和磷酸化蛋白质组学的分析, 探索了具有 KRAS 突变的肿瘤的蛋白质和磷酸化蛋白质的特征, 将具有不同特征的 KRAS 突变癌症分为三个子集(T1、T2 和 T3)。这些子集与不同类型的肿瘤相关: T1 主要与肺腺癌、肺鳞癌、膀胱癌、乳腺癌和宫颈癌相关; T2 主要与胰腺癌相关; T3 主要与结肠癌、直肠癌和胃癌相关。每个子集具有不同的特性。这些子集具有不同的分子特征和临床结果, 这些特征可能与肿瘤的生物学特性和临床预后有关[24]。还有研究通过分析目前最大的蛋白质基因组学数据集(该数据集来自 1110 名患者, 包含了 11 种癌症类型的)的 PTM 特征, 发现了这些癌症过程中涉及的蛋白质乙酰化和磷酸化变化的泛癌模式, 这些模式揭示了来自不同癌症类型的肿瘤亚群, 丰富了 PTM 的生物信息库, 揭示了潜在的新治疗途径[25]。

2.2.2. 泛素化蛋白质组学

泛素化修饰(Ubiquitination)是泛素分子在一系列特殊酶类的作用下, 从细胞内选出靶蛋白分子并对其进行修饰的过程, 泛素化在蛋白质定位、代谢、降解中发挥着重要作用, 参与了包括细胞周期转录及免疫反应在内的几乎一切生命活动。泛素化检测技术包括免疫印迹、质谱测定法与纳米孔传感技术[26][27]。纳米孔传感技术是目前最新的泛素化技术, 该方法无需标记, 快速高效, 能够同时跟踪不同底物的泛素

化, 但该方法在复杂生物泛素化研究还很有限。目前用于复杂生物的蛋白质泛素化研究技术主要是质谱技术, 例如小鼠巨噬细胞亚群的泛素化谱[28]或是人类肝细胞癌标本的蛋白泛素化水等[29]。

3. 蛋白质组学在 AML 诊断中的应用

AML 的细胞遗传学结果和分子异常是非常重要的预后因素, 目前 AML 预后相关的基因组、转录组信息逐渐被挖掘, 并被纳入 AML 风险分层因素[3], 而根据这些风险因素而划定分层的患者中仍然存在实际治疗效果与自己的风险分层不符的情况, 这一直是 AML 诊疗中亟待解决的问题。蛋白质作为细胞功能的直接执行者, 是 mRNA 中遗传信息的直接体现, 因此 AML 的蛋白质组研究对阐明 AML 机制以及 AML 的诊断、鉴定和预测具有非常重要的价值, 随着蛋白质检测技术的发展, 蛋白质组技术在 AML 应用的可行性得到证实[30], 蛋白质组学逐渐登上 AML 研究的舞台。

3.1. AML 发病机制的探索

发展可靠的蛋白质组学表征对于在蛋白质水平上更全面地了解癌细胞生理学和发病机制至关重要。早在 2006 年, 黄东等人就通过双向凝胶电泳结合质谱技术研究了亚硒酸钠诱导人急性早幼粒细胞白血病细胞(NB4 细胞)凋亡蛋白质表达的总体变化, 挖掘出三种参与该细胞凋亡调控的蛋白, 明确了亚硒酸钠诱导 NB4 细胞凋亡的机制[31], 并进一步建立了 NB4 细胞株的蛋白质组图谱[32]。基于二维凝胶电泳的蛋白质组学分析了 PML-RAR α (Promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α)融合蛋白在 APL 中的作用机制和调控网络[33]。最近有研究利用 TMT 技术, 对人早幼粒白血病细胞(HL-60 细胞)在全反式维甲酸(All-trans-retinoic acid, ATRA)诱导分化过程中的蛋白质进行鉴定和定量分析, 识别出了近千种在之前的研究中未被检测到的蛋白质, 进一步揭示了与 p53 (Tumor protein 53)调控相关的蛋白质组特征, 包括下调的核心转录因子和与 p53 功能相关的双链断裂修复蛋白, 这些结果为进一步研究 p53 通路的调控机制提供了线索[34]。

磷酸化蛋白质组学在 AML 发病机制探索中也有广泛的应用。2012 年, Matthias Trost 等人用定量蛋白质组学和磷酸蛋白质组学的方法分析表达 Hoxa9 (Homeobox A9) + Meis1 (Meis homeobox 1)的两种表型相似的 AML, 揭示了白血病干细胞(leukemia stem cells, LSCs)的自我更新能力的后转录调控机制[35]。J Bertacchini 等人通过选择性抑制磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B/mammalian target of Rapamycin, PI3K/AKT/mTOR)信号通路的特定抑制剂, 利用磷酸蛋白质组学分析 80 个 AML 患者的原代细胞对这些抑制剂的反应, 结果表明抑制 Akt 或 mTOR 的活性会稳定 Akt/mTOR 的下游效应物 FoxO (Forkhead box O)和胰岛素受体底物-1 (Insulin receptor substrate, IRSs), 从而通过上调选择性生长因子受体酪氨酸激酶(Receptor tyrosine kinase, RTKs)的表达或磷酸化来增强信号传导, RTKs 的激活反过来重新激活 PI3K 和下游信号传导, 从而抵消了药物的作用[36]。随着定量磷酸化蛋白质组技术的完善, 该技术也被用以辅助 AML 发病机制的探索, 通过该技术研究人员揭示了 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-dependent protein kinase, DNA-PK)和 Fms 相关酪氨酸激酶 3 (Fms related receptor tyrosine kinase 3, FLT3)抑制剂在突变型 FLT3 AML 中的协同作用, 为进一步研究其作用机制提供线索[37]。

3.2. AML 异质性及生物标志物挖掘研究

人们一直致力于建立基于蛋白质组学的 AML 分类方法, 最初利用二维电泳法和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)进行非靶向蛋白质组研究, 鉴定部分差异表达蛋白[38] [39], 尽管限于技术与样本规模鉴定出的差异

蛋白有限,但也提示了细胞不同蛋白的表达水平与预后的相关性。有研究者通过反相蛋白质阵列(Revers phase protein microarray, RPPA)分析新发 AML 患者白血病细胞中的蛋白质,发现蛋白质的表达与 FAB (French-American-British)亚型之间存在差异,揭示了一些亚型中的表达特征[40]。质谱技术的逐渐成熟,鉴定的蛋白质数量增多,实验时间的减少也使得更大样本量的研究成为可能,研究者们开始从不同角度去深度挖掘 AML 的异质性,挖掘不同亚型 AML 的蛋白表达谱。早期研究者利用双向电泳和质谱技术分析 AML 亚型 M1 和 M2 的蛋白质谱,揭示了 5 种差异蛋白质膜联蛋白 III、L-纤维蛋白酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、膜联蛋白 I 和肌动蛋白 γ 1,成为区分 M1、M2 的潜在标志物[41]。

Flt3 基因编码的蛋白质是参与正常造血过程的酪氨酸激酶受体,该基因在 AML 中的突变率高达 30%,而内部串联重复(Internal tandem duplication, ITD)引起的 Flt3 突变是 AML 中已知的最常见的分子改变之一,挖掘 Flt3 野生型或 Flt3 ITD 型的下游介质有助于研究在髓系祖细胞系增殖中发挥特定作用的差异蛋白[42] [43]。也有研究利用深度学习神经网络分析 FLT3-ITD 突变在 AML 中的蛋白质表达情况,将转录组学与蛋白质组学结合,寻找与 Flt3-ITD 突变相关的关键分子,最终筛选出 20 种关键蛋白质,这 20 种关键蛋白质的水平与 Flt3-ITD 突变之间存在良好的相关性[44]。TP53 突变是公认的 AML 高风险危险因素,但异质性 TP53 突变的基因型-表型相关性研究相对较少。Tashakori 等人对 528 名 AML 患者进行了基因组、蛋白质组学综合分析发现 TP53 蛋白的高表达与 TP53 基因的突变相关,并且可以作为检测 AML 患者中有影响的 TP53 突变的快速和经济有效的工具,解决了如何确定 AML 患者的突变状态的问题[45]。

蛋白质组与基因组、转录组数据结合,对 AML 的风险分层,治疗决策提供了重要的参考。在最近的一项研究中,Ashok Kumar Jayavelu 教授团队为了探究 AML 的亚型之间的差异,运用多组学因子分析(Multi-omics factor analysis, MOFA),将蛋白质组学、基因组学、细胞遗传学和突变数据进行联合分解,确定了五种蛋白质组学 AML 亚型,每种亚型都反映了特定的生物学特征,且这些生物学特征并不局限于基因组层面,没有一种亚型与特定的基因组畸变完全相关[46]。其中 C-Mito (Mito cluster)亚型与患者预后高度相关,在用强化诱导化疗治疗时具有降低的缓解率和较短的总生存期;它的特点是线粒体相关的蛋白质表达水平显著增加,与其他亚型相比,线粒体通路的蛋白质表达水平升高。将蛋白质组学信息与基因组等其他信息结合,有助于我们去探索更为准确的预后预测模型,提高预后预测能力。

3.3. 治疗效果的评估与治疗靶点的发掘

除了 AML 的发生外,LSCs 还被认为与 AML 的高复发和化疗耐药相关,因此根除 LSCs 对提高患者生存率至关重要。以往对于 LSCs 的研究主要局限于转录水平,缺乏有关基因转录后调节和相关网络的信息,随着蛋白组技术的成熟,将蛋白组与转录组联合成为现实。有研究通过将之前关于 LSCs 蛋白质组的报告扩展到健康的年龄匹配的造血干细胞和祖细胞(Hematopoietic stem and progenitor cells, HSPCs),将 LSCs 与白血病原始细胞和健康 HSPCs 进行比较,验证了候选 LSCs 标志物,并发现了 HSPCs 中不存在或仅低表达的新型和潜在靶向蛋白:MBOAT7 (Membrane-bound O-acyltransferase), CRIP2 (Cysteine-rich intestinal protein 2),该研究通过将同一单个样本的蛋白质组和转录本数据相关联突出了蛋白质组分析的优势[47]。

通过分析不同药物如阿扎胞苷[48]治疗前后 AML 细胞蛋白质表达水平的差异[49],能够发掘药物作用靶点,进一步确认这些蛋白质在 AML 细胞中的作用,有助于深入了解药物对 AML 细胞的影响机制,并为开发新的治疗策略提供重要线索,还可以利用蛋白质组学对 AML 细胞药物敏感性进行分析[50]。蛋白质表达谱也可用于监测微小残留病和评估临床结果,通过对不同分组的 AML 患者进行血清肽分析,可以挖掘出与患者临床结局相关的血清肽,例如有研究者通过快速分类器模型结合质谱鉴定出与 AML 临床结果相关的肽段:泛素样修饰物激活酶 1 (Ubiquitin-Like Activating Enzyme 1, UBA 1)、纤维蛋白原 α

链前体(Fibrinogen Alpha Chain Precursor, FIBA)亚型 1 和血小板因子 4 (Platelet Factor 4, PF 4) [51]。

磷酸化蛋白质组学作为蛋白质组学的分支在 AML 治疗与耐药的研究领域也得到了广泛应用。Alpen 等人使用酪氨酸靶向磷酸蛋白质组学对 16 种 AML 细胞系进行整合的激酶活性推断分析(Integrative Inferred Kinase Activity, INKA), 鉴定出高度磷酸化的活性激酶作为靶向治疗的候选物; 另外, INKA 分析还精确定位了除与这些细胞系中存在的激活突变对应的驱动激酶外, 标准分子分析未检测到的驱动激酶, 并通过药物反应实验进行了验证[52]。另一个研究通过整合基因组学、蛋白质组和磷酸蛋白质组学以及免疫表型数据, 以及对 MEK (Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase)、PAK (P21-activated kinases)、PKC (Protein kinase C)/Flt3、CK 2 (Casein kinase 2)和 MAPK (Mitogen-activated protein kinase)抑制剂的离体反应, 挖掘了与治疗反应相关的分子特征的证据, 并确定了激酶和分化决定因素作为原发性白血病原始细胞对激酶抑制剂敏感性的标志物[50]。蛋白组数据的不断增加, 使得研究者们能够通过整合基因组、转录组、蛋白组和药物反应数据, 建立一个肿瘤细胞系的蛋白组活动景观, 为药物敏感性的预测和药物靶点的鉴定提供了重要的信息, 并为进一步研究肿瘤生物学和药物作用机制提供了基础[53]。

3.4. AML 相关蛋白质组全局图谱的建立

虽然 AML 相关蛋白质组学的研究已经取得了许多进展与突破, 然而, 建立一个全面的 AML 蛋白质组, 以及修饰蛋白质组(例如糖基化、泛素化、乙酰化、甲基化和氧化还原修饰)数据库仍然是目前亟待解决的问题。早期的研究表明, 骨髓中收集的 AML 原始细胞的蛋白表达谱与从外周血样品收集的原始细胞相比基本上没有差异[54], 表明了通过外周血这类常规检查可获得的生物材料来进一步进行 AML 蛋白质组分析的可行性, 降低了 AML 蛋白质全局分析的门槛, 同时飞速发展的测序技术也提供了更多的技术支持。有研究通过收集 AML 患者和健康人群的血清, 鉴定了 AML 患者外周血中不同表达水平的蛋白质, 形成了初步的 AML 血清蛋白质组谱[55]。而另一研究则利用外周血, 通过无标记定量(Label Free Quantitation, LFQ)的方法对总蛋白质组和磷酸酪氨酸蛋白质组进行定量, 并对经典酪氨酸磷酸酶组进行了全面的表征, 获得了关于 AML 的综合蛋白质组景观[56]。

随着技术的不断突破, AML 蛋白质组的研究也从标本数量、蛋白质通量、涉及领域等方面不断扩大。Kornblau 等人对 282 个外周血样本和 387 个骨髓样本进行蛋白质组、磷酸化蛋白质组以及蛋白质功能分析, 全面定量了解 AML 蛋白质组异质性和特征[57]。而最近的一项研究开发了一个深度蛋白质组和磷酸化蛋白质组数据库, 该数据库收集了来自 TCGA (The Cancer Genome Atlas), LAML (Acute Myeloid Leukemia-like)数据集的 44 名代表性 AML 患者和 6 名健康骨髓来源的对照, 并利用 TMT 和 LFQ 两种方法, 分别对蛋白质样本进行定量分析, 获得了数千种蛋白质信息, 检测到近 30,000 个磷酸化位点。这些数据为 AML 的发病机制、治疗靶点和预后提供了重要的信息[58]。

4. 总结

十年前, 相较于 AML 的基因组研究, 蛋白质组学对 AML 生物标志物研究的贡献非常局限, 而高通量蛋白质组学在过去几年中变得逐渐流行, 这种技术的速度和灵敏度使得我们能够鉴定和定量数千种蛋白质, 包括低丰度蛋白质和翻译后修饰, 而该技术在 AML 的应用也逐渐增加。目前对于 AML 蛋白质的研究已经不仅限于单一的蛋白质层面, 除了与蛋白质修饰组学、基因组、转录组结合, 一些新兴技术如代谢组学、单细胞组学、热蛋白质组学也正与蛋白质组学结合并应用于 AML 的相关研究[59] [60]。尽管蛋白质组学在 AML 机制、生物标志物以及治疗方面的应用取得了上述进展, 但这些进展仍然有限, 并且在部分情况下尚未得到验证。因此, AML 蛋白质组探索之路的前方, 还有很多的挑战等待着我们去解决。

参考文献

- [1] Pelcovits, A. and Niroula, R. (2013) Acute Myeloid Leukemia: A Review. *Rhode Island Medical Journal*, **103**, 38-40.
- [2] Döhner, H., Weisdorf, D.J. and Bloomfield, C.D. (2015) Acute Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, **373**, 1136-1152. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406184>
- [3] Khoury, J.D., Solary, E., Abla, O., *et al.* (2022) The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*, **36**, 1703-1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>
- [4] Solh, M., Yohe, S., Weisdorf, D., *et al.* (2014) Core-Binding Factor Acute Myeloid Leukemia: Heterogeneity, Monitoring, and Therapy. *American Journal of Hematology*, **89**, 1121-1131. <https://doi.org/10.1002/ajh.23821>
- [5] Lachowiec, C.A., Loghavi, S., Kadia, T.M., *et al.* (2020) Outcomes of Older Patients with NPM1-Mutated AML: Current Treatments and the Promise of Venetoclax-Based Regimens. *Blood Advances*, **4**, 1311-1320. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001267>
- [6] Shafer, D. and Grant, S. (2016) Update on Rational Targeted Therapy in AML. *Blood Reviews*, **30**, 275-283. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2016.02.001>
- [7] Liu, Y., Beyer, A. and Aebersold, R. (2016) On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, **165**, 535-550. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>
- [8] Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., *et al.* (1995) Progress with Gene-Product Mapping of the Mollicutes: Mycoplasma Genitalium. *Electrophoresis*, **16**, 1090-1094. <https://doi.org/10.1002/elps.11501601185>
- [9] Pandey, A. and Mann, M. (2000) Proteomics to Study Genes and Genomes. *Nature*, **405**, 837-846. <https://doi.org/10.1038/35015709>
- [10] Domon, B. and Aebersold, R. (2006) Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, **312**, 212-217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>
- [11] Bensimon, A., Heck, A.J.R. and Aebersold, R. (2012) Mass Spectrometry-Based Proteomics and Network Biology. *Annual Review of Biochemistry*, **81**, 379-405. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-100424>
- [12] Guerrero, I.C. and Kleiner, O. (2005) Application of Mass Spectrometry in Proteomics. *Bioscience Reports*, **25**, 71-93. <https://doi.org/10.1007/s10540-005-2849-x>
- [13] Li, X., Wang, W. and Chen, J. (2017) Recent Progress in Mass Spectrometry Proteomics for Biomedical Research. *Science China Life Sciences*, **60**, 1093-1113. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9175-2>
- [14] Washburn, M.P., Wolters, D. and Yates, J.R. (2001) Large-Scale Analysis of the Yeast Proteome by Multidimensional Protein Identification Technology. *Nature Biotechnology*, **19**, 242-247. <https://doi.org/10.1038/85686>
- [15] Lasonder, E., Ishihama, Y., Andersen, J.S., *et al.* (2002) Analysis of the Plasmodium Falciparum Proteome by High-Accuracy Mass Spectrometry. *Nature*, **419**, 537-542. <https://doi.org/10.1038/nature01111>
- [16] Gauss, C., Kalkum, M., Löwe, M., *et al.* (1999) Analysis of the Mouse Proteome. (I) Brain Proteins: Separation by Two-Dimensional Electrophoresis and Identification by Mass Spectrometry and Genetic Variation. *Electrophoresis*, **20**, 575-600. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(19990301\)20:3<575::AID-ELPS575>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990301)20:3<575::AID-ELPS575>3.0.CO;2-3)
- [17] Miyamoto, M., Yoshida, Y., Taguchi, I., *et al.* (2007) In-Depth Proteomic Profiling of the Normal Human Kidney Glomerulus Using Two-Dimensional Protein Prefractionation in Combination with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, **6**, 3680-3690. <https://doi.org/10.1021/pr070203n>
- [18] Deeb, S.J., D'Souza, R.C.J., Cox, J., *et al.* (2012) Super-SILAC Allows Classification of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Subtypes by Their Protein Expression Profiles. *Molecular & Cellular Proteomics*, **11**, 77-89. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015362>
- [19] Rudnick, P.A., Markey, S.P., Roth, J., *et al.* (2016) A Description of the Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC) Common Data Analysis Pipeline. *Journal of Proteome Research*, **15**, 1023-1032. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01091>
- [20] Zhu, X., Liu, X., Cheng, Z., *et al.* (2016) Quantitative Analysis of Global Proteome and Lysine Acetylation Reveal the Differential Impacts of VPA and SAHA on HL60 Cells. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 19926. <https://doi.org/10.1038/srep19926>
- [21] Geiger, T., Cox, J., Ostasiewicz, P., *et al.* (2010) Super-SILAC Mix for Quantitative Proteomics of Human Tumor Tissue. *Nature Methods*, **7**, 383-385. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1446>
- [22] Mund, A., Coscia, F., Kriston, A., *et al.* (2022) Deep Visual Proteomics Defines Single-Cell Identity and Heterogeneity. *Nature Biotechnology*, **40**, 1231-1240. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01302-5>
- [23] Wang, R. and Wang, G. (2019) Protein Modification and Autophagy Activation. *Advances in Experimental Medicine*

- and Biology*, **1206**, 237-259. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_12
- [24] Liu, Z., Liu, Y., Qian, L., *et al.* (2021) A Proteomic and Phosphoproteomic Landscape of KRAS Mutant Cancers Identifies Combination Therapies. *Molecular Cell*, **81**, 4076-4090.E8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.021>
- [25] Geffen, Y., Anand, S., Akiyama, Y., *et al.* (2023) Pan-Cancer Analysis of Post-Translational Modifications Reveals Shared Patterns of Protein Regulation. *Cell*, **186**, 3945-3967.E26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.07.013>
- [26] Yoshida, Y., Saeki, Y., Murakami, A., *et al.* (2015) A Comprehensive Method for Detecting Ubiquitinated Substrates Using TR-TUBE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **112**, 4630-4635. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422313112>
- [27] De Silva, A.R.I. and Page, R.C. (2023) Ubiquitination Detection Techniques. *Experimental Biology and Medicine*, **248**, 1333-1346. <https://doi.org/10.1177/15353702231191186>
- [28] Lin, X., Zhang, H., Boyce, B.F., *et al.* (2020) Ubiquitination of Interleukin-1 α Is Associated with Increased Pro-Inflammatory Polarization of Murine Macrophages Deficient in the E3 Ligase ITCH. *The Journal of Biological Chemistry*, **295**, 11764-11775. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014298>
- [29] Ji, F., Zhou, M., Sun, Z., *et al.* (2021) Integrative Proteomics Reveals the Role of E3 Ubiquitin Ligase SYVN1 in Hepatocellular Carcinoma Metastasis. *Cancer Communications*, **41**, 1007-1023. <https://doi.org/10.1002/cac2.12192>
- [30] Tibes, R., Qiu, Y., Lu, Y., *et al.* (2006) Reverse Phase Protein Array: Validation of a Novel Proteomic Technology and Utility for Analysis of Primary Leukemia Specimens and Hematopoietic Stem Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, **5**, 2512-2521. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0334>
- [31] Dong, H., Ying, T., Li, T., *et al.* (2006) Comparative Proteomic Analysis of Apoptosis Induced by Sodium Selenite in Human Acute Promyelocytic Leukemia NB4 Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, **98**, 1495-1506. <https://doi.org/10.1002/jcb.20755>
- [32] He, P., Liu, Y., Zhang, M., *et al.* (2012) Establishment of Two-Dimensional Gel Electrophoresis Profiles of the Human Acute Promyelocytic Leukemia Cell Line NB4. *Molecular Medicine Reports*, **6**, 570-574. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.963>
- [33] Zada, A.A.P., Geletu, M.H., Pulikkan, J.A., *et al.* (2006) Proteomic Analysis of Acute Promyelocytic Leukemia: PML-RAR α Leads to Decreased Phosphorylation of OP18 at Serine 63. *Proteomics*, **6**, 5705-5719. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600307>
- [34] Novikova, S., Tolstova, T., Kurbatov, L., *et al.* (2022) Nuclear Proteomics of Induced Leukemia Cell Differentiation. *Cells*, **11**, Article 3221. <https://doi.org/10.3390/cells11203221>
- [35] Trost, M., Sauvageau, M., Hérault, O., *et al.* (2012) Posttranslational Regulation of Self-Renewal Capacity: Insights from Proteome and Phosphoproteome Analyses of Stem Cell Leukemia. *Blood*, **120**, e17-e27. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-397844>
- [36] Bertacchini, J., Guida, M., Accordi, B., *et al.* (2014) Feedbacks and Adaptive Capabilities of the PI3K/Akt/MTOR Axis in Acute Myeloid Leukemia Revealed by Pathway Selective Inhibition and Phosphoproteome Analysis. *Leukemia*, **28**, 2197-2205. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.123>
- [37] Murray, H.C., Enjeti, A.K., Kahl, R.G.S., *et al.* (2021) Quantitative Phosphoproteomics Uncovers Synergy between DNA-PK and FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukaemia. *Leukemia*, **35**, 1782-1787. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01050-y>
- [38] Balkhi, M.Y., Trivedi, A.K., Geletu, M., *et al.* (2006) Proteomics of Acute Myeloid Leukaemia: Cytogenetic Risk Groups Differ Specifically in Their Proteome, Interactome and Post-Translational Protein Modifications. *Oncogene*, **25**, 7041-7058. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209689>
- [39] Rithidech, K.N., Honikel, L. and Simon, S.R. (2007) Radiation Leukemogenesis: A Proteomic Approach. *Experimental Hematology*, **35**, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.01.019>
- [40] Kornblau, S.M., Tibes, R., Qiu, Y.H., *et al.* (2009) Functional Proteomic Profiling of AML Predicts Response and Survival. *Blood*, **113**, 154-164. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-10-119438>
- [41] Luczak, M., Kaźmierczak, M., Handschuh, L., *et al.* (2012) Comparative Proteome Analysis of Acute Myeloid Leukemia with and without Maturation. *Journal of Proteomics*, **75**, 5734-5748. <https://doi.org/10.1016/j.jprote.2012.07.030>
- [42] Habif, G., Grasset, M.F., Kieffer-Jaquinod, S., *et al.* (2013) Phosphoproteome Analyses Reveal Specific Implications of Hcls1, P21-Activated Kinase 1 and Ezrin in Proliferation of a Myeloid Progenitor Cell Line Downstream of Wild-Type and ITD Mutant Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Receptors. *Journal of Proteomics*, **78**, 231-244. <https://doi.org/10.1016/j.jprote.2012.09.009>
- [43] Daver, N., Schlenk, R.F., Russell, N.H., *et al.* (2019) Targeting FLT3 Mutations in AML: Review of Current Knowledge and Evidence. *Leukemia*, **33**, 299-312. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0357-9>
- [44] Liang, C.A., Chen, L., Wahed, A., *et al.* (2019) Proteomics Analysis of FLT3-ITD Mutation in Acute Myeloid Leuke-

- mia Using Deep Learning Neural Network. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, **49**, 119-126.
- [45] Tashakori, M., Kadia, T., Loghavi, S., *et al.* (2022) TP53 Copy Number and Protein Expression Inform Mutation Status Across Risk Categories in Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, **140**, 58-72. <https://doi.org/10.1182/blood.2021013983>
- [46] Jayavelu, A.K., Wolf, S., Buettner, F., *et al.* (2022) The Proteogenomic Subtypes of Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*, **40**, 301-317.E12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.02.006>
- [47] Raffel, S., Klimmeck, D., Falcone, M., *et al.* (2020) Quantitative Proteomics Reveals Specific Metabolic Features of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Blood*, **136**, 1507-1519. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003654>
- [48] Leung, K.K., Nguyen, A., Shi, T., *et al.* (2019) Multiomics of Azacitidine-Treated AML Cells Reveals Variable and Convergent Targets That Remodel the Cell-Surface Proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **116**, 695-700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813666116>
- [49] Kaźmierczak, M., Luczak, M., Lewandowski, K., *et al.* (2013) Esterase D and γ 1 Actin Level Might Predict Results of Induction Therapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia Without and with Maturation. *Medical Oncology*, **30**, Article No. 725. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0725-2>
- [50] Casado, P., Wilkes, E.H., Miraki-Moud, F., *et al.* (2018) Proteomic and Genomic Integration Identifies Kinase and Differentiation Determinants of Kinase Inhibitor Sensitivity in Leukemia Cells. *Leukemia*, **32**, 1818-1822. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0032-1>
- [51] Bai, J., He, A., Zhang, W., *et al.* (2013) Potential Biomarkers for Adult Acute Myeloid Leukemia Minimal Residual Disease Assessment Searched by Serum Peptidome Profiling. *Proteome Science*, **11**, Article No. 39. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-11-39>
- [52] Van Alphen, C., Cloos, J., Beekhof, R., *et al.* (2020) Phosphotyrosine-Based Phosphoproteomics for Target Identification and Drug Response Prediction in AML Cell Lines. *Molecular & Cellular Proteomics*, **19**, 884-899. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001504>
- [53] Frejno, M., Meng, C., Ruprecht, B., *et al.* (2020) Proteome Activity Landscapes of Tumor Cell Lines Determine Drug Responses. *Nature Communications*, **11**, Article No. 3639. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17336-9>
- [54] Hütter, G., Letsch, A., Nowak, D., *et al.* (2009) High Correlation of the Proteome Patterns in Bone Marrow and Peripheral Blood Blast Cells in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Translational Medicine*, **7**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-7>
- [55] Zheng, R.J., Wu, R.J. and Ma, X.D. (2017) Serum Proteomic Spectral Characteristics of Acute Myeloid Leukemia and Their Clinical Significance. *Genetics and Molecular Research*, **16**, gmr16029172. <https://doi.org/10.4238/gmr16029172>
- [56] Tong, J., Helmy, M., Cavalli, F.M.G., *et al.* (2017) Integrated Analysis of Proteome, Phosphotyrosine-Proteome, Tyrosine-Kinome, and Tyrosine-Phosphatome in Acute Myeloid Leukemia. *Proteomics*, **17**, Article ID: 1600361. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600361>
- [57] Hu, C.W., Qiu, Y., Ligeralde, A., *et al.* (2019) A Quantitative Analysis of Heterogeneities and Hallmarks in Acute Myelogenous Leukaemia. *Nature Biomedical Engineering*, **3**, 889-901. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0387-2>
- [58] Kramer, M.H., Zhang, Q., Sprung, R., *et al.* (2022) Proteomic and Phosphoproteomic Landscapes of Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, **140**, 1533-1548. <https://doi.org/10.1182/blood.2022016033>
- [59] Schoof, E.M., Furtwängler, B., Üresin, N., *et al.* (2021) Quantitative Single-Cell Proteomics as a Tool to Characterize Cellular Hierarchies. *Nature Communications*, **12**, Article No. 3341. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23667-y>
- [60] Goroshchuk, O., Kolosenko, I., Kunold, E., *et al.* (2021) Thermal Proteome Profiling Identifies PIP4K2A and ZADH2 as Off-Targets of Polo-Like Kinase 1 Inhibitor Volasertib. *FASEB Journal*, **35**, e21741. <https://doi.org/10.1096/fj.202100457RR>