

• 综述 •

酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术研究进展及其在生物医学研究中的应用

李凯旋^{1,2}, 徐锋², 徐平^{1,2}

1 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002

2 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所 国家蛋白质科学中心 (北京) 北京蛋白质组研究中心 蛋白质组学国家重点实验室 中国医学科学院蛋白质组学与新药研发新技术创新单元, 北京 102206

李凯旋, 徐锋, 徐平. 酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术研究进展及其在生物医学研究中的应用. 生物工程学报, 2021, 37(1): 100-111.

Li KX, Xu F, Xu P. Application of tyrosine phosphoproteomics in biomedical research: a review. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 100-111.

摘要: 在酪氨酸磷酸化蛋白质组学的研究过程中, 酪氨酸磷酸化位点的富集是最重要的一步。目前常用的富集方法是抗体亲和富集或 SH2 superbinder 富集。此外, 通过质谱与生物信息学等技术, 可实现大规模酪氨酸磷酸化位点的鉴定。对酪氨酸磷酸化蛋白质组学进行深度覆盖研究, 揭示癌症发生发展过程中失调的激酶, 将有助于深入理解癌症的发生发展过程; 且由于 75% 的致癌基因是酪氨酸激酶基因, 酪氨酸激酶抑制剂作为抗癌药物受到了越来越多的关注。应用酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术, 可以鉴定与癌症等重大疾病相关的酪氨酸激酶, 从而帮助找到酪氨酸激酶抑制剂。总之, 酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术可以在酪氨酸激酶鉴定、酪氨酸激酶抑制剂研究及酪氨酸磷酸化信号通路研究等生物医学领域中得到很好的应用。

关键词: 酪氨酸激酶, 酪氨酸磷酸化, 酪氨酸磷酸化肽段富集, 精准医学

Application of tyrosine phosphoproteomics in biomedical research: a review

Kaixuan Li^{1,2}, Feng Xu², and Ping Xu^{1,2}

1 College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China

2 State Key Laboratory of Proteomics, Beijing Proteome Research Center, National Center for Protein Sciences Beijing, Research Unit of Proteomics & Research and Development of New Drug of Chinese Academy of Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 102206, China

Abstract: The enrichment of tyrosine phosphorylation sites plays an important role in the study of tyrosine

Received: May 2, 2020; **Accepted:** October 9, 2020

Supported by: National Key Research and Development Project (No. 2017YFA0505100), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31670834, 91839302).

Corresponding author: Ping Xu. Tel: +86-10-61777113; E-mail: xupingghy@gmail.com

国家重点研发计划 (No. 2017YFA0505100), 国家自然科学基金 (Nos. 31670834, 91839302) 资助。

网络出版时间: 2020-10-14

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20201013.0948.004.html>

phosphoproteomics and the commonly used enrichment methods are antibody affinity enrichment and SH2 superbinder enrichment. In addition, in order to achieve large-scale identification of tyrosine phosphorylation sites, biological mass spectrometry and bioinformatics have been applied in tyrosine phosphoproteomics. In-depth coverage research of tyrosine phosphoproteomics, revealing the dysregulated kinases in cancer process, may help us understanding the occurrence and development process of cancer. According to literature reports, three quarters of the oncogenes are tyrosine kinase genes. Therefore, tyrosine kinase inhibitors have received more and more attention as anticancer drugs. The application of tyrosine phosphoproteomics technology can identify tyrosine kinases related to cancer and other major diseases, so as to help finding tyrosine kinase inhibitors. In short, tyrosine phosphoproteomics technology can be applied in biomedical fields such as tyrosine kinase identification, tyrosine kinase inhibitor research, and tyrosine phosphorylation signal pathway research.

Keywords: tyrosine kinase, tyrosine phosphorylation, enrichment of tyrosine phosphorylation peptide, precision medicine

生物体常见的蛋白质翻译后共价修饰有磷酸化、泛素化、糖基化等，其中蛋白质磷酸化因分布广泛，功能重要而被广泛研究^[1]。蛋白质磷酸化是通过特异性激酶的作用将腺嘌呤核苷三磷酸的磷酸基团转移到底物特定氨基酸残基上而实现(图 1)^[2]。真核细胞的蛋白质磷酸化分为两种，一种是丝氨酸/苏氨酸磷酸化，另一种是酪氨酸磷酸化 (Tyrosine phosphorylation, pY)。

酪氨酸磷酸化于 1979 年被美国科学家 Tony Hunter 发现^[3]。真核细胞中磷酸化的丝氨酸：苏氨酸：酪氨酸的相对丰度约为 1 000 : 100 : 1^[4]。尽管已知的磷酸化酪氨酸所占比例小，但其功能极为重要，任何底物蛋白酪氨酸磷酸化的失调或者酪氨酸激酶的失控都将带来人类的疾患，甚至决定细胞和个体的命运^[5-6]。例如癌症的演化、细胞间的信号传递都与酪氨酸磷酸化有着密不可分的关系^[7-9]。已知 75%的致癌基因是酪氨酸激酶基

因^[10]，而 63%的小分子蛋白激酶肿瘤靶向药也是酪氨酸激酶抑制剂^[11]，亟待深入研究。随着酪氨酸磷酸化研究技术的不断发展这个比例也在逐渐改变^[12]。

酪氨酸磷酸化蛋白质组的理想目标是检测时空上所有的酪氨酸磷酸化蛋白质，但受技术条件的限制，这个目标还难以实现。其难点主要包括酪氨酸磷酸化蛋白质在细胞内的丰度非常低^[13]、酪氨酸磷酸化事件的动态性强，易受外界的变化而变化^[14]，因此亟需新的灵敏的酪氨酸磷酸化富集技术的发展。

精准医学 (Precision medicine, PM) 是使用基因组学、蛋白质组学等技术，对大量人群与特定疾病进行生物标记物分析鉴定和验证应用，进而找到疾病原因与治疗靶点。它的最终目的是实现对疾病和患者的个体化精准治疗。以治疗肿瘤为现阶段目标的精准医学时代已经来临^[15-16]。

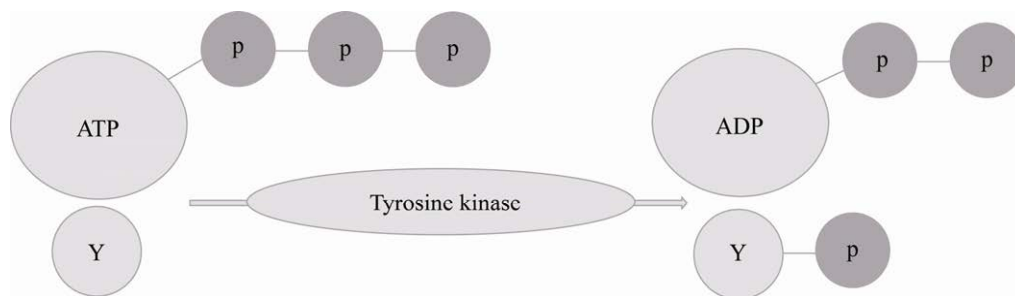


图 1 酪氨酸磷酸化^[2]

Fig. 1 Tyrosine phosphorylation^[2].

1 酪氨酸磷酸化蛋白质组学研究技术

酪氨酸磷酸化蛋白质组学研究主要包括生物样品的准备、酪氨酸磷酸化蛋白质/肽段的富集和酪氨酸磷酸化位点的鉴定等 3 个方面 (图 2)。

1.1 生物样品的准备

已有的酪氨酸磷酸化蛋白质组学研究主要集中在人和其他动物上, 植物和微生物样品较少。由于酪氨酸磷酸化失调和疾病紧密关联, 因此人类疾病, 特别是肿瘤相关的样品较为集中。在 NCBI-PubMed 中以“Tyrosine phosphorylation”为关键词进行搜索, 发现 53 555 篇相关文献。其中包括“species”中的“humans”和“other animals”关键词的酪氨酸磷酸化文献有 49 280 篇; 属于“humans”的有 30 572 篇。其中属于“cancer”的有 22 362 篇, 占总酪氨酸磷酸化文献的 42%。由此可见, 酪氨酸磷酸化的失调和人类肿瘤的关系非常密切。

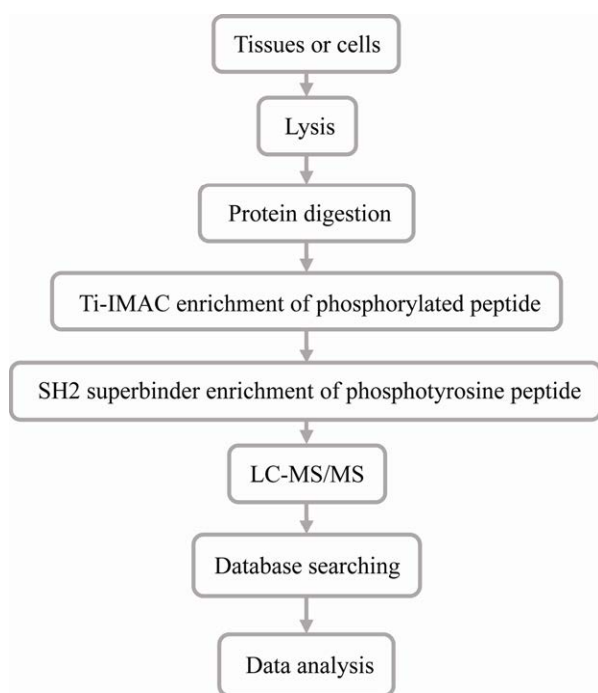


图 2 磷酸化酪氨酸大规模富集鉴定
Fig. 2 Large-scale enrichment and identification of phosphorylated tyrosine.

鉴于临床肿瘤样本的珍贵和实验目的需要, 现在酪氨酸磷酸化蛋白质组的研究对象多为各种癌细胞系。与酪氨酸磷酸化有关的常见癌症中尤以表皮癌 (Epidermal cancer) 相关的样本最为多见。在 NCBI-PubMed 中, 选择“species”中的“humans”和“subjects”中的“cancer”, 以“酪氨酸磷酸化”加“常见癌症”为关键词搜索, 其中筛选出文献较多的为“tyrosine phosphorylation epidermal cancer” 2 302 篇; “tyrosine phosphorylation leukemia” 2 199 篇; “tyrosine phosphorylation breast cancer” 1 908 篇; “tyrosine phosphorylation lung cancer” 1 198 篇。

与丝氨酸和苏氨酸磷酸化事件相比, 酪氨酸磷酸化修饰动态性强^[14]。为保证所研究样品的真实性, 需要在样品制备过程中使用氧化苯砷、钼酸盐、钒酸盐等酪氨酸磷酸酶抑制剂进行处理^[17], 其中过钒酸钠溶液对酪氨酸磷酸酶的抑制效率高, 在实践中最为常用^[18-19]。

1.2 酪氨酸磷酸化蛋白质/肽段的富集技术研究

1.2.1 抗体亲和富集

酪氨酸侧链上具有丝/苏氨酸侧链所没有的苯环, 磷酸化酪氨酸的抗原决定簇比丝氨酸和苏氨酸的大, 所以酪氨酸磷酸化抗体的特异性远强于其他两种氨基酸^[20], 因此抗体亲和富集在酪氨酸磷酸化蛋白质组研究中是一种非常经典的方法^[21-23]。根据酪氨酸磷酸化抗体亲和力特性的不同, 可将蛋白质消化成肽段后进行酪氨酸磷酸化抗体亲和富集^[24], 或者用酪氨酸磷酸化抗体直接亲和富集酪氨酸磷酸化修饰的蛋白质^[25-26]。这些抗体识别酪氨酸磷酸化基团, 但对底物的特异性不强, 因此是一种泛抗体。已知较好的酪氨酸磷酸化抗体有 4G10、PY100、PY20 等^[27]。它们的亲和模体分别为: L/F-L/F-pY-L-A-P、L-L-pY-L/S-A/P-P、L/G-pY-L/F-I/A-P, 在识别特异性上有很大的重叠^[28], 其中, 4G10 和 PY100 分别对富集磷酸酪氨酸蛋白和多肽最有效。大量样本

时, 4G10 和 PY100 的组合是最适合用来做亲和富集的^[29]。

蛋白质翻译后修饰在不同的氨基酸残基上可以被同一种化学基团修饰, 这形成了翻译后修饰的宏观不均一性^[30]。这些不同的氨基酸残基被修饰以后由于在结构上存在差异, 因此在二维凝胶电泳分离后呈现出不同的谱型。利用这一原理, 对亲和富集的酪氨酸磷酸化蛋白进行一维或二维凝胶电泳, 然后对酪氨酸磷酸化蛋白进行免疫印迹分析, 最后将感兴趣的蛋白质斑点或者条带进行位点特异性蛋白酶消化和质谱鉴定^[21-23]。但是由于亲和富集的抗体种类有限, 且对磷酸化位点上下游的氨基酸序列有一定的要求, 另外该方法还存在部分酪氨酸磷酸化蛋白易丢失, 重现性较差且成本高的局限性^[19], 导致该方法很难进行大规模的应用。近年来随着液相色谱-质谱联用等技术的快速发展, 基于二维凝胶电泳的传统蛋白质组学技术应用越来越少^[31-32]。

1.2.2 固相金属离子亲和层析和金属氧化物亲和层析

与丝氨酸和苏氨酸磷酸化相似, 酪氨酸磷酸化肽段也可利用离子间相互作用进行固相金属离子亲和层析 (Immobilized metal affinity chromatography, IMAC) 富集, 或者通过金属氧化物与磷酸基团相互作用进行金属氧化物亲和层析 (Metal oxide affinity chromatography, MOAC) 富集^[33]。它们不同的填料会对不同的基团展现亲和性, 进而表现出不同的基团偏好性。IMAC 中的 Fe^{3+} 、 Ti^{4+} 等和 MOAC 中的 TiO_2 、 ZrO_2 等对磷酸基团表现出较好的偏好性^[34-35]。

酪氨酸磷酸化的发生频率比丝氨酸/苏氨酸磷酸化的发生频率低得多, 在人类整个磷酸化蛋白质组中占比 1% 左右^[36]。因此用 IMAC 或 MOAC 从全蛋白中富集磷酸化酪氨酸肽段时, 有时需要用一些特殊的方法, 如级联富集等来提高酪氨酸磷酸化肽段的富集效果。Tian 等通过高 pH 高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 分

离策略并结合多步骤 IMAC 方法, 从 2.5 mg 细胞裂解物中, 鉴定出 2 930 个磷酸化蛋白, 6 593 个磷酸化肽段和 6 420 个磷酸化位点, 其中酪氨酸磷酸化位点占 2.85%^[37]。Ruprecht 等通过优化 Fe-IMAC 分离梯度时间等条件, 从 1 mg HeLa 消化液中富集到了 6 566 个磷酸化位点, 其中 3% 为酪氨酸磷酸化位点^[38]。Zarei 等通过强阳离子交换色谱 (Strong cation exchange chromatography, SCX)- TiO_2 技术富集到 1.8% 的酪氨酸磷酸化位点^[39]。

鉴于 IMAC 和 MOAC 的富集效率比较低, 它们在酪氨酸磷酸化蛋白质组中通常会和其他的富集方法联合使用, 对酪氨酸肽段进行多次富集, 以此来提高富集效率和捕获量。

1.2.3 SH2 超亲体 (SH2 superbinder) 富集

酪氨酸磷酸化蛋白质在细胞内有分子开关的作用, 其中原癌基因酪氨酸蛋白激酶 (Proto-oncogene tyrosine-protein kinase, Src) 同源结构域 2 (SH2) 通过与这些蛋白质结合, 在胞内转导信号, 调控细胞行为^[19,40]。正常生理状态下的 SH2 只是温和地与磷酸化酪氨酸相结合, 以适应细胞中瞬息万变的环境。2012 年, Shawn 等在 SH2 与磷酸化酪氨酸结合的区域引入了 3 个氨基酸突变, 分别为: Lys15Leu, 第 15 位的赖氨酸突变成亮氨酸; Cys10Ala, 第 10 位的半胱氨酸突变成丙氨酸; Thr8Val, 第 8 位的苏氨酸突变成缬氨酸^[34]。突变后的 SH2 与磷酸化酪氨酸的结合力比突变前增强了 380 倍^[41], 被称作 SH2 superbinder 超亲体。

Yao 等利用 SH2 superbinder 对酪氨酸磷酸化肽段 (pTyr) 残基序列的高亲和力, 开发出一种一步式 pTyr 富集技术。该方法使用固定的 SH2 superbinder 对生物样品内源性 pTyr 肽进行无偏和稳定的富集。在 3 mg 未用过钒酸钠处理的 Jurkat 细胞蛋白中, 高重现性 (Pearson 相关系数高达 0.94) 地鉴定出了 511 个非冗余 pTyr 肽, 对应 403 个高置信度的 pTyr 位点。证明了这种一步式富集技术既能降低样品的损失, 又能提高肽的捕获效率^[36]。

为降低磷酸化肽段背景噪音, 提高 SH2

superbinder 对酪氨酸磷酸化肽段的富集效率, 利用 SH2 superbinder 进行磷酸化酪氨酸肽段富集时, 通常会结合 IMAC 等方法进行磷酸化肽段的富集。Bian 等使用 SH2 superbinder 方法从 9 个人类细胞系中鉴定出约 20 000 个不同的磷酸酪氨酸肽段和大于 10 000 的 pTyr 位点, 其中 36% 的 pTyr 位点为新位点^[42]。

SH2 superbinder 可在工程菌中大量表达纯化^[43], 与酪氨酸磷酸化抗体相比, 成本低, 并且效果好, 用它进行磷酸化酪氨酸富集更为经济有效。

除作为酪氨酸磷酸化肽段富集的介质, Ke 等利用 SH2 superbinder 能有效穿透细胞膜并与 pTyr 蛋白特异结合的特性, 将其发展成为了活细胞中直接荧光成像的探针^[44]。Liu 等利用 SH2 superbinder 对酪氨酸磷酸化蛋白的高亲和力, 用基因工程将其与精氨酸 (Arginine, Arg) 连接后, 形成 Arg-SH2 superbinder。它可以进入黑色素瘤细胞, 通过取代细胞原有的含 SH2 的蛋白, 阻断多种基于酪氨酸磷酸化的途径, 表现出了有效的抗癌能力^[45]。

1.3 酪氨酸磷酸化位点的大规模质谱鉴定

基于鸟枪法的液相色谱-质谱联用技术, 鉴定蛋白质的通量高, 普适性强, 已经成为蛋白质组学研究的标准方法, 并在磷酸化蛋白质组分析中得到普及^[27], 是磷酸化蛋白质大规模分析的首选方法^[46]。下文提供了一种可行的质谱鉴定酪氨酸磷酸化位点的方法。

1.3.1 酪氨酸磷酸化位点鉴定时的液相参数

温度: 室温; 时间: 78 min; 样品采集体积 [μL]: 5.00; 液相流速 [$\mu\text{L}/\text{min}$]: 20.00; 样品加载: 体积 [μL]: 15.00, 最高压力 [Bar]: 280.00。

液相梯度如表 1 所示, 其中 B 为 98% 乙腈, 0.1% 甲酸, 1.9% 水; 另外 A 为 2% 乙腈, 0.1% 甲酸, 97.9% 水。

1.3.2 酪氨酸磷酸化位点鉴定时的质谱参数

质谱方法持续时间 (min): 78; 静电场轨道阱分辨率: 120 K; 扫描范围 (m/z): 300–1 400; 最大进样时间 (ms): 50; 自动增益控制目标 (主

表 1 酪氨酸磷酸化位点鉴定时的液相梯度

Table 1 Liquid phase gradient for identification of tyrosine phosphorylation sites

Time (mm:ss)	Duration (mm:ss)	Flow (nL/min)	Mixture (%B)
00:00	00:00	600	5
08:00	08:00	600	10
58:00	50:00	600	24
70:00	12:00	600	32
71:00	01:00	600	95
78:00	07:00	600	95

扫描): 500 000; 质谱扫描等级: 2; 离子化模式: Quadrupole (四级); 离子化窗口: 1.6; 质谱解离方式: HCD (高能碰撞解离); 最大进样时间 (ms): 35; 自动增益控制目标 (二级扫描): 5 000; 在所有可用的平行时间中注入离子: True。

在得到质谱鉴定的数据后, 可用 MaxQuant 等生物信息学软件对质谱数据进行处理。既可以对每个样品的质谱文件进行单个处理, 又可对所有样品的质谱数据进行合并处理, 从而实现酪氨酸磷酸化位点的大规模质谱鉴定。例如, 在用 MaxQuant 软件对质谱数据进行处理时: 在“Group-specific parameters”-“Modifications”-“Variable modifications”中选择“Phospho (STY)”。MaxQuant 软件运行结束后, 根据 Phospho (STY) Sites.txt 文件中的“Protein”、“Amino acid”、“Position”三列, 可分析出何种蛋白在何处鉴定到了酪氨酸磷酸化。

2 酪氨酸磷酸化蛋白质组技术的应用

肿瘤的发生、发展和转移与蛋白质磷酸化失调密不可分^[47], 因此特征性磷酸化位点也可被作为一些疾病诊断的潜在标志物。另外, 目前全世界多达 20%–33% 的药物涉及蛋白质激酶超家族^[11]。酪氨酸磷酸化在复杂的多细胞生命中较为常见, 并在细胞的生长、增殖、分化、物质新陈代谢等几乎所有的生命活动过程中扮演着重要角色。如在哺乳动物的精子获能过程中, 有大量的酪氨酸磷酸化发生, 这也是哺乳动物精子获能的一个显著标志^[48]。酪氨酸激酶在肿瘤的发生发展中起到了决定性的作用^[49]。通过对鉴定的酪氨酸磷酸化位

点数据进行深入的生物信息学分析, 关联对应的酪氨酸激酶, 可鉴定疾病发生发展过程失调的激酶通路及潜在的靶向调节药物, 支撑基于蛋白质组学的精准治疗。

2.1 基于酪氨酸磷酸化事件的酪氨酸激酶鉴定

酪氨酸激酶的活性如果发生异常, 将扰乱其下游的酪氨酸磷酸化以及相关的细胞信号通路, 然后导致细胞增殖紊乱, 最终使肿瘤在体内发生。人体的酪氨酸激酶包括 58 种受体酪氨酸激酶 (Receptor tyrosine kinase, RTK) 和 32 种非受体酪氨酸激酶 (Nonreceptor tyrosine kinase, NRTK)^[50]。酪氨酸激酶的受体型集中分布在细胞质膜上。当面对胞外的刺激因子时, 细胞通过质膜上的受体酪氨酸激酶介导的蛋白质磷酸化, 引发下游一系列蛋白的级联反应, 进而形成相应的信号通路, 最终将细胞质膜传来的信号传导至细胞核^[51]。酪氨酸激酶的非受体型主要位于细胞内, 它也催化蛋白质的酪氨酸残基进行磷酸化。从受体酪氨酸激酶、G 蛋白偶联受体和整合蛋白传来的外界信号, 可以通过非受体酪氨酸激酶向下游转导。此外非受体酪氨酸激酶还具有调节细胞生存、生长和迁移等功能。

研究发现酪氨酸激酶的基因在致癌基因中占 75%^[10]。如受体酪氨酸激酶: HER-1、HER-2、HER-3、HER-4、FGFR-2、EPHB4、DDR1、DDR2 和非受体酪氨酸激酶: BRK、SRC、SYK 均与乳腺癌有关。受体酪氨酸激酶: KIT/SCFR、FLK2/FLT3、FGFR-1、AXL 和非受体酪氨酸激酶: ABL1、ARG、JAK2、FGR 均与急性粒细胞白血病有关^[50]。对酪氨酸蛋白质组学进行深度覆盖研究, 揭示癌症发生发展过程中失调的激酶, 将有助于我们深入理解人类重大疾病的发生发展过程, 以及找出与重大疾病有关的酪氨酸位点来作为精准医学诊断的生物标志物。

在酪氨酸磷酸化蛋白质组学中, 会用到一些如 MaxQuant、pFind 等蛋白质序列比对分析软件。

这些软件在一定的参数下, 通过将质谱产生的 Raw 文件与蛋白质序列库文件进行搜索比对, 从而给出匹配到的蛋白的名称。由这些蛋白质名称可判断出是否鉴定到了酪氨酸激酶。另外, 生物信息学家们还发展了 SWISS-PROT、PROSITE、Phospho.ELM 等一系列工具。这些工具通过将鉴定的酪氨酸磷酸化肽段与酪氨酸激酶进行对应, 实现酪氨酸激酶参与的信号通路分析^[52]。

此外, 酪氨酸磷酸化蛋白质组技术还可鉴定出部分酪氨酸磷酸酶。酪氨酸磷酸酶在阴阳学说中作为酪氨酸激酶的对立面, 其功能也很重要。不过与酪氨酸激酶相比, 酪氨酸磷酸酶被研究的相对较少。在 NCBI 的 PubMed 中, 以“Tyrosine kinase”为关键词搜索出 254 236 篇相关文献, 以“Tyrosine phosphatase”为关键词搜索出 34 950 篇文献。

2.2 基于酪氨酸磷酸化事件的酪氨酸激酶抑制剂鉴定研究

蛋白激酶常被作为治疗疾病的靶点^[8]。超过 30% 的医学研究把关注点放在了蛋白激酶抑制剂上, 在接下来的几年内预计会增长到五成^[53]。2001 年, 酪氨酸激酶抑制剂 (Tyrosine kinase inhibitor, TKI) 类第一个小分子药物 Imatinib 经美国食品药品监督管理局 (Food and drug administration, FDA) 批准上市, 用于治疗慢性粒细胞白血病^[14]。由此兴起了酪氨酸激酶作为治疗靶点的抗肿瘤药物研究热潮。截至 2019 年, FDA 已先后批准了 11 种非受体酪氨酸激酶抑制剂, 其中有 7 种为抗肿瘤药物; 28 种受体酪氨酸激酶抑制剂, 其中有 26 种为抗肿瘤药物。33 种酪氨酸激酶肿瘤抑制剂占 52 种 FDA 已批准小分子蛋白激酶抑制剂 (表 2) 的 63%^[11]。不仅如此, 目前处于不同临床阶段的有关“Tyrosine kinase inhibitor”的研究有 1 193 项之多 (<https://clinicaltrials.gov/>), 预示了酪氨酸激酶抑制剂在肿瘤和其他重大疾病治疗中的良好前景。

表 2 FDA 批准的小分子蛋白激酶抑制剂, 及其蛋白激酶靶标和所治病症

Table 2 FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors, their protein kinase targets, and therapeutic indications

Drug (code) trade name	Year approved	Primary targets ^a	Therapeutic indications ^b
Abemaciclib (LY2835219) Verzenio	2017	CDK4/6	Combination therapy with an (i) aromatase inhibitor or with (ii) fulvestrant or as a monotherapy for breast cancers
Acalabrutinib (ACP-196) Calquence	2017	BTK	Mantle cell lymphomas, CLL, SLL
Afatinib (BIBW 2992) Tovok	2013	ErbB1/2/4	NSCLC
Alectinib (CH5424802) Alecensa	2015	ALK, RET	ALK-positive NSCLC
Axitinib (AG-013736) Inlyta	2012	VEGFR1/2/3	RCC
Baricitinib (LY 3009104) Olumiant	2018	JAK1/2	Rheumatoid arthritis
Binimetinib (MEK162) Mektovi	2018	MEK1/2	Combination therapy with encorafenib for <i>BRAF</i> ^{V600E/K} melanomas
Bosutinib (SKI-606) Bosulif	2012	BCR-Abl	CML
Brigatinib (AP 26113) Alunbrig	2017	ALK	ALK-positive NSCLC
Cabozantinib (BMS-907351) Cometriq	2012	RET, VEGFR2	Medullary thyroid cancers, RCC, HCC
Ceritinib (LDK378) Zykadia	2014	ALK	ALK-positive NSCLC resistant to crizotinib
Cobimetinib (GDC-0973) Cotellic	2015	MEK1/2	<i>BRAF</i> ^{V600E/K} melanomas in combination with vemurafenib
Crizotinib (PF 2341066) Xalkori	2011	ALK, ROS1	ALK or ROS1-positive NSCLC
Dabrafenib (GSK2118436) Tafinlar	2013	B-Raf	<i>BRAF</i> ^{V600E/K} melanomas, <i>BRAF</i> ^{V600E} NSCLC, <i>BRAF</i> ^{V600E} anaplastic thyroid cancers
Dacomitinib (PF-00299804) Visimpro	2018	EGFR	<i>EGFR</i> -mutant NSCLC
Dasatinib (BMS-354825) Sprycell	2006	BCR-Abl	CML
Encorafenib (LGX818) Braftovi	2018	B-Raf	Combination therapy with binimetinib for <i>BRAF</i> ^{V600E/K} melanomas
Entrectinib (RXDX-101) Rozlytrek	2019	TRKA/B/C, ROS1	Solid tumors with NTRK fusion proteins, ROS1-positive NSCLC
Erdaftinib (JNJ-42756493) Balversa	2019	FGFR1/2/3/4	Urothelial bladder cancers
Erlotinib (OSI-774) Tarceva	2004	EGFR	NSCLC, pancreatic cancers
Everolimus (RAD001) Afinitor	2009	FKBP12/mTOR	HER2-negative breast cancers, pancreatic neuroendocrine tumors, RCC, angiomyolipomas, subependymal giant cell astrocytomas
Fedratinib (TG101348) Inrebic	2019	JAK2	Myelofibrosis
Fostamatinib (R788) Tavalisse	2018	Syk	Chronic immune thrombocytopenia
Gefitinib (ZD1839) Iressa	2003	EGFR	NSCLC
Gilteritinib (ASP2215) Xospata	2018	Flt3	AML
Ibrutinib (PCI-32765) Imbruvica	2013	BTK	CLL, mantle cell lymphomas, marginal zone lymphomas, graft vs. host disease
Imatinib (STI571) Gleevec	2001	BCR-Abl	Ph ⁺ CML or ALL, aggressive systemic mastocytosis, chronic eosinophilic leukemias, dermatofibrosarcoma protuberans, hypereosinophilic syndrome, GIST, myelodysplastic/ myeloproliferative disease
Lapatinib (GW572016) Tykerb	2007	EGFR, ErbB2/HER2	HER2-positive breast cancers
Larotrectinib (LOXO-101) Vitakvi	2018	TRKA/B/C	Solid tumors with NTRK fusion proteins
Lenvatinib (AK175809) Lenvima	2015	VEGFR, RET	Differentiated thyroid cancers
Lorlatinib (PF-06463922) Lorbrena	2018	ALK	ALK-positive NSCLC

(待续)

(续表 2)

Drug (code) trade name	Year approved	Primary targets ^a	Therapeutic indications ^b
Midostaurin (CPG 41251) Rydapt	2017	Flt3	AML, mastocytosis, mast cell leukemias
Neratinib (HKI-272) Nerlynx	2017	ErbB2/HER2	HER2-positive breast cancers
Netarsudil (AR11324) Rhopressa	2018	ROCK1/2	Glaucoma
Nilotinib (AMN107) Tasigna	2007	BCR-Abl	Ph ⁺ CML
Nintedanib (BIBF-1120) Vargatef	2014	FGFR1/2/3	Idiopathic pulmonary fibrosis
Osimertinib (AZD-9292) Tagrisso	2015	EGFR T970M	NSCLC
Palbociclib (PD-0332991) Ibrance	2015	CDK4/6	Estrogen receptor- and HER2-positive breast cancers
Pazopanib (GW786034) Votrient	2009	VEGFR1/2/3	RCC, soft tissue sarcomas
Pexidartinib (PLX3397) Turalio	2019	CSF1R	Tenosynovial giant cell tumors
Ponatinib (AP 24534) Iclusig	2012	BCR-Abl	Ph ⁺ CML or ALL
Regorafenib (GSK2118436) Tafinlar	2012	VEGFR1/2/3	Colorectal cancers
R406	2018	Syk	Chronic immune thrombocytopenia
Ribociclib (LEE011) Kisqali	2017	CDK4/6	Combination therapy with an aromatase inhibitor for breast cancers
Ruxolitinib (INCB-018424) Jakafi	2011	JAK1/2/3, Tyk	Myelofibrosis, polycythemia vera
Sirolimus (AY 22989) Rapamycin	1999	FKBP12/mTOR	Kidney transplants, lymphangioliomyomatosis
Sorafenib (BAY 43-9006) Nexavar	2005	VEGFR1/2/3	HCC, RCC, thyroid cancer (differentiated)
Sunitinib (SU11248) Sutent	2006	VEGFR2	GIST, pancreatic neuroendocrine tumors, RCC
Temsirolimus (CCI-779) Torisel	2007	FKBP12/mTOR	RCC
Tofacitinib (CP-690550) Tasocitinib	2012	JAK3	Rheumatoid arthritis
Trametinib (GSK1120212) Mekinist	2013	MEK1/2	<i>BRAF</i> ^{V600E/K} melanomas, <i>BRAF</i> ^{V600E} NSCLC
Vandetanib (ZD6474) Zactima	2011	VEGFR2	Medullary thyroid cancers
Vemurafenib (PLX-4032) Zelboraf	2011	B-Raf	<i>BRAF</i> ^{V600E} melanomas

^a Although many of these drugs are multikinase inhibitors, only the primary therapeutic targets are given here. ^b ALL: acute lymphoblastic leukemias; AML: acute myelogenous leukemias; CLL: chronic lymphocytic leukemias; CML: chronic myelogenous leukemias; ErbB2/HER2: human epidermal growth factor receptor-2; GIST: gastrointestinal stromal tumors; HCC: hepatocellular carcinomas; NSCLC: non-small cell lung cancers; Ph⁺: philadelphia chromosome positive; RCC: renal cell carcinomas; SLL: small lymphocytic leukemias.

通过将候选酪氨酸激酶抑制剂处理的样本和未处理的样本进行比较, 分析失调酪氨酸激酶的活性, 鉴定酪氨酸激酶候选抑制剂, 这将为精准医学中重大疾病的治疗提供有效的手段。

2.3 在酪氨酸磷酸化信号通路研究中的应用

随着科研人员着眼于酪氨酸激酶靶向药物的研发, 酪氨酸磷酸化细胞信号通路也成为了研究热点。Menges 等用酪氨酸磷酸化蛋白质组学技术在恶性间皮瘤中找到了多条异常激活的酪氨酸激酶信号通路, 如信号传导和转录激活蛋白 1 (Signal transducer and activator of transcription 1, STAT1) 信号轴被异常激活, 原癌基因酪氨酸蛋

白激酶家族激酶 (Src family kinase, SFK) 被过度激活, 表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 和肝细胞生长因子受体 (Hepatocyte growth factor receptor, HGFR or c-MET) 被共同激活^[54]。

王一国等运用磷酸化蛋白质组学与信号转导研究策略, 建立并完善了酪氨酸磷酸化信号蛋白质组技术。他在细胞水平上对酪氨酸磷酸化蛋白及其结合蛋白进行大规模分析鉴定, 发现了一批新的酪氨酸磷酸化蛋白和结合蛋白^[55]。

虽然在单一线性酪氨酸磷酸化信号传导通路有了一些进展, 但是在全局上的调节机理研究

进展仍然比较缓慢。如何将复杂的酪氨酸磷酸化信号调控网络研究清楚,仍然是现在生物医学领域研究的难点。运用酪氨酸磷酸化蛋白质组技术可以富集到多条信号通路上的蛋白,这在一定程度上为酪氨酸磷酸化信号调控网络的分析提供了条件。而在精准医学酪氨酸激酶靶向药物的耐药性研究也可以作为一种可用的方法。

2.4 其他方面的应用

一些致病微生物也有酪氨酸磷酸化,并且扮演了很重要的角色。在具有荚膜包被的细菌中,荚膜多糖(荚膜多糖 1 (Capsular polysaccharide 1, CPS1); K 抗原)是导致细菌毒性的罪魁祸首,而酪氨酸磷酸化在荚膜多糖的生物合成中起到了关键的作用。如酪氨酸蛋白激酶多糖共聚酶 (Polysaccharide co-polymerase, Wzc),其自磷酸化程度可影响 CPS 产生的数量、长度和性质,且它的 C 端负责多糖的寡聚和自磷酸化,这在多糖的运输中很重要^[56-57]。Lin 等在肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 中发现酪氨酸磷酸化与细菌毒力之间的重要联系,并且证明了磷酸十一癸烯基糖基转移酶 (Undecaprenyl-phosphate glycosyltransferase, WcaJ) 上 Tyr5 残基的磷酸化可以影响多糖的产生^[33]。

另外,某些病毒的生存状况也会受到细胞内某些蛋白质酪氨酸磷酸化修饰的影响。H(血球凝集素, Hemagglutinin)1N(神经氨酸酶, Neuraminidase)1 猪流感病毒非结构蛋白 1 (Non-structural protein 1, NS1) 的 Tyr73 和 Ser83 去磷酸化可减弱病毒复制并诱导高水平的 β 干扰素^[58]。卡波西肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 可以引起 3 种人类恶性肿瘤。它的开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 21 编码一种酪氨酸激酶,该激酶对抗病毒药物 Zidovudine 和 Brivudine 的磷酸化和毒性分子的激活是必不可少的^[59]。

双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 1A (The dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated

kinase 1A, DYRK1A) 通过与细胞周期蛋白 L2 (Cyclin L2) 的相互作用促进 HIV-1 复制^[60]。组氨酸/天冬氨酸结构域蛋白 1 (Histidine/aspartic acid domain-containing protein 1, SAMHD1) 是重要的抗病毒蛋白。HIV 会诱导 SAMHD1 发生磷酸化从而导致其失活。酪氨酸激酶抑制剂 Dasatinib 通过干扰 SAMHD1 的失活磷酸化来阻止 HIV 的感染和复制^[61-63]。

通过酪氨酸磷酸化蛋白质组技术,可以研究抑制或杀死这些致病微生物的机制,从而找到相应疾病的治疗方法。

笔者所在的实验室也利用 SH2 superbinder 开展了系列肝癌的酪氨酸磷酸化蛋白质组研究。如 Li 等从 2 mg 高转移肝癌细胞 HCCLM6 蛋白中,鉴定到了 1 105 个酪氨酸磷酸化蛋白、2 666 个酪氨酸磷酸化肽段、1 884 个酪氨酸磷酸化位点^[64],并正在开展深入的功能研究。

3 展望

近 20 年来,随着酪氨酸磷酸化蛋白/肽段富集和质谱鉴定技术的进步,酪氨酸磷酸化位点的鉴定量越来越多,越来越准确,酪氨酸磷酸化蛋白质组技术也越来越成熟。在最新的 Phosphosite Plus 数据库 (<https://www.phosphosite.org/>) 中,酪氨酸磷酸化位点数接近 40 000 个,未来还会继续增多。然而大多数酪氨酸磷酸化的半衰期很短,有的甚至只有几秒钟^[14],并且酪氨酸磷酸化在磷酸化中的丰度很低,只有百分之几,所以在酪氨酸磷酸化的保护以及富集与鉴定方面仍有很大的发展空间。另外,由于肿瘤高度的异质性,采用肿瘤组织或细胞作为分析对象,已不能回答深层次的科学问题。近年来单细胞分析技术蔚然成风,但是由于上述等技术的限制,目前还无法用单细胞分析方法来研究酪氨酸磷酸化蛋白质组的研究。或许将来我们可以通过单细胞酪氨酸磷酸化蛋白质组技术来分析更深层次的科学问题。相信随着酪氨酸磷酸化蛋白质组技术的发展和成熟,它不仅会在基于酪氨酸

酸磷酸化事件的正常生理过程中有所建树,而且会在精准医学中寻找肿瘤关键生物标志物和酪氨酸激酶靶标抑制剂方面作出更多的贡献。

REFERENCES

- [1] Abdelrasoul M, Ponniah K, Mao A, et al. Conformational clusters of phosphorylated tyrosine. *J Am Chem Soc*, 2017, 139(48): 17632-17638.
- [2] McDonnell LM, Kernohan KD, Boycott KM, et al. Receptor tyrosine kinase mutations in developmental syndromes and cancer: two sides of the same coin. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(R1): R60-R66.
- [3] Hunter T. Discovering the first tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(26): 7877-7882.
- [4] Yu JS. From discovery of tyrosine phosphorylation to targeted cancer therapies: the 2018 Tang Prize in Biopharmaceutical Science. *Biomed J*, 2019, 42(2): 80-83.
- [5] Jiao QL, Bi L, Ren YD, et al. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Mol Cancer*, 2018, 17: 36.
- [6] Dustin CM, Heppner DE, Lin MCJ, et al. Redox regulation of tyrosine kinase signalling: more than meets the eye. *J Biochem*, 2020, 167(2): 151-163.
- [7] Chiasson-MacKenzie C, McClatchey AI. Cell-cell contact and receptor tyrosine kinase signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(6): a029215.
- [8] Hojjat-Farsangi M. Targeting non-receptor tyrosine kinases using small molecule inhibitors: an overview of recent advances. *J Drug Target*, 2016, 24(3): 192-211.
- [9] Du ZF, Lovly CM. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer*, 2018, 17: 58.
- [10] 杨梅. *N*-糖基化和酪氨酸磷酸化蛋白的分离富集研究[D]. 沈阳: 东北大学, 2015.
Yang M. Investigations on the separation and enrichment of *N*-glycosylated proteins and tyrosine phosphorylated proteins[D]. Shenyang: Northeastern University, 2015 (in Chinese).
- [11] Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol Res*, 2020, 152: 104609.
- [12] van Alphen C, Cloos J, Beekhof R, et al. Phosphotyrosine-based phosphoproteomics for target identification and drug response prediction in AML cell lines. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19(5): 884-899.
- [13] Lundby A, Franciosa G, Emdal KB, et al. Oncogenic mutations rewire signaling pathways by switching protein recruitment to phosphotyrosine sites. *Cell*, 2019, 179(2): 543-560.e26.
- [14] Hunter T. The genesis of tyrosine phosphorylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(5): a020644.
- [15] Iriart JAB. Precision medicine/personalized medicine: a critical analysis of movements in the transformation of biomedicine in the early 21st century. *Cad Saude Publica*, 2019, 35(3): e00153118.
- [16] Weil AR. Precision medicine. *Health Aff (Millwood)*, 2018, 37(5): 687.
- [17] Terada Y, Higashi N, Hidaka Y, et al. Protein tyrosine phosphatase inhibitor, Orthovanadate, induces contraction *via* Rho kinase activation in mouse thoracic aortas. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42(6): 877-885.
- [18] Kang SH, Jeong SJ, Kim SH, et al. Icariside II induces apoptosis in U937 acute myeloid leukemia cells: role of inactivation of STAT3-related signaling. *PLoS One*, 2012, 7(4): e28706.
- [19] Dong MM, Bian YY, Wang Y, et al. Sensitive, robust, and cost-effective approach for tyrosine phosphoproteome analysis. *Anal Chem*, 2017, 89(17): 9307-9314.
- [20] Beltran L, Cutillas PR. Advances in phosphopeptide enrichment techniques for phosphoproteomics. *Amino Acids*, 2012, 43(3): 1009-1024.
- [21] Mou Y, Zhou XX, Leung K, et al. Engineering improved antiphosphotyrosine antibodies based on an immunconvergent binding motif. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(48): 16615-16624.
- [22] Ke M, Chu BZ, Lin L, et al. SH2 domains as affinity reagents for phosphotyrosine protein enrichment and proteomic analysis//Machida K, Liu B, Eds. *SH2 Domains*. New York, NY: Humana Press, 2017, 1555: 395-406.
- [23] Zhang GL, Fang B, Liu RZ, et al. Mass spectrometry mapping of epidermal growth factor receptor phosphorylation related to oncogenic mutations and tyrosine kinase inhibitor sensitivity. *J Proteome Res*, 2011, 10(1): 305-319.
- [24] Yoshida T, Zhang GL, Smith MA, et al. Tyrosine

- phosphoproteomics identifies both codrivers and cotargeting strategies for T790M-related EGFR-TKI resistance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(15): 4059-4074.
- [25] Matsumoto M, Oyamada K, Takahashi H, et al. Large-scale proteomic analysis of tyrosine-phosphorylation induced by T-cell receptor or B-cell receptor activation reveals new signaling pathways. *Proteomics*, 2009, 9(13): 3549-3563.
- [26] Moritz A, Li Y, Guo AL, et al. Akt-RSK-S6-kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases. *Sci Signal*, 2010, 3(136): ra64.
- [27] Gembitsky DS, Lawlor K, Jacovina A, et al. A prototype antibody microarray platform to monitor changes in protein tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(11): 1102-1118.
- [28] Tinti M, Pio Nardoza A, Ferrari E, et al. The 4G10, pY20 and p-TYR-100 antibody specificity: profiling by peptide microarrays. *N Biotechnol*, 2012, 29(5): 571-577.
- [29] Lind SB, Molin M, Savitski MM, et al. Immunoaffinity enrichments followed by mass spectrometric detection for studying global protein tyrosine phosphorylation. *J Proteome Res*, 2008, 7(7): 2897-2910.
- [30] 兰秋艳, 高媛, 李衍常, 等. 泛素、泛素链和蛋白质泛素化研究进展. *生物工程学报*, 2016, 32(1): 14-30.
Lan QY, Gao Y, Li YC, et al. Progress in ubiquitin, ubiquitin chain and protein ubiquitination. *Chin J Biotech*, 2016, 32(1): 14-30 (in Chinese).
- [31] Aslam B, Basit M, Nisar MA, et al. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci*, 2017, 55(2): 182-196.
- [32] Chua XY, Mensah T, Aballo T, et al. Tandem Mass Tag approach utilizing pervanadate BOOST channels delivers deeper quantitative characterization of the tyrosine phosphoproteome. *Mol Cell Proteomics*, 2020, 19(4): 730-743.
- [33] Lin MH, Hsu TL, Lin SY, et al. Phosphoproteomics of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 reveals a tight link between tyrosine phosphorylation and virulence. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(12): 2613-2623.
- [34] Sun XS, Chiu JF, He QY. Application of immobilized metal affinity chromatography in proteomics. *Exp Rev Proteomics*, 2005, 2(5): 649-657.
- [35] Beckers GJM, Hoehenwarter W, Röhrig H, et al. Tandem metal-oxide affinity chromatography for enhanced depth of phosphoproteome analysis//Jorin-Novo J, Komatsu S, Weckwerth W, et al, Eds. *Plant Proteomics*. Totowa, NJ: Humana Press, 2014, 1072: 621-632.
- [36] Yao YT, Wang Y, Wang SJ, et al. One-step SH2 superbinder-based approach for sensitive analysis of tyrosine phosphoproteome. *J Proteome Res*, 2019, 18(4): 1870-1879.
- [37] Tian MM, Cheng H, Wang ZQ, et al. Phosphoproteomic analysis of the highly-metastatic hepatocellular carcinoma cell line, MHCC97-H. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 4209-4225.
- [38] Ruprecht B, Koch H, Domasinska P, et al. Optimized enrichment of phosphoproteomes by Fe-IMAC column chromatography//Comai L, Katz J, Mallick P, Eds. *Proteomics*. New York, NY: Humana Press, 2017, 1550: 47-60.
- [39] Zarei M, Sprenger A, Metzger F, et al. Comparison of ERLIC-TiO₂, HILIC-TiO₂, and SCX-TiO₂ for global phosphoproteomics approaches. *J Proteome Res*, 2011, 10(8): 3474-3483.
- [40] Veggiani G, Huang HM, Yates BP, et al. Engineered SH2 domains with tailored specificities and enhanced affinities for phosphoproteome analysis. *Protein Sci*, 2019, 28(2): 403-413.
- [41] Kaneko T, Huang HM, Cao X, et al. Superbinder SH2 domains act as antagonists of cell signaling. *Sci Signal*, 2012, 5(243): ra68.
- [42] Bian YY, Li L, Dong MM, et al. Ultra-deep tyrosine phosphoproteomics enabled by a phosphotyrosine superbinder. *Nat Chem Biol*, 2016, 12(11): 959-966.
- [43] Deng ZZ, Dong MM, Wang Y, et al. Biphasic affinity chromatographic approach for deep tyrosine phosphoproteome analysis. *Anal Chem*, 2017, 89(4): 2405-2410.
- [44] Ke AQ, Liu AD, Gao YN, et al. Development of novel affinity reagents for detecting protein tyrosine phosphorylation based on superbinder SH2 domain in tumor cells. *Anal Chim Acta*, 2018, 1032: 138-146.
- [45] Liu AD, Xu H, Gao YN, et al. (Arg)₉-SH2

- superbinder: a novel promising anticancer therapy to melanoma by blocking phosphotyrosine signaling. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37: 138.
- [46] Leitner A, Sturm M, Lindner W. Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review. *Anal Chim Acta*, 2011, 703(1): 19-30.
- [47] Singh V, Ram M, Kumar R, et al. Phosphorylation: Implications in Cancer. *Protein J*, 2017, 36(1): 1-6.
- [48] Chung JJ, Shim SH, Everley RA, et al. Structurally distinct Ca^{2+} signaling domains of sperm flagella orchestrate tyrosine phosphorylation and motility. *Cell*, 2014, 157(4): 808-822.
- [49] Yin B, Fang DM, Zhou XL, et al. Natural products as important tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Med Chem*, 2019, 182: 111664.
- [50] Bavcar S, Argyle DJ. Receptor tyrosine kinase inhibitors: molecularly targeted drugs for veterinary cancer therapy. *Vet Comp Oncol*, 2012, 10(3): 163-173.
- [51] Nakada M, Kita D, Teng L, et al. Receptor tyrosine kinases: principles and functions in glioma invasion//Barańska J, ed. *Glioma Signaling*. Cham: Springer, 2020, 1202: 151-178.
- [52] Ferrari E, Tinti M, Costa S, et al. Identification of new substrates of the protein-tyrosine phosphatase PTP1B by Bayesian integration of proteome evidence. *J Biol Chem*, 2011, 286(6): 4173-4185.
- [53] 林丛. 小鼠肝脏磷酸化蛋白质组学方法构建与 HBx 通过调控 PDK1 磷酸化参与 HCC 发生[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2015.
Lin C. Methodology application of mouse liver phosphoteome and HBx involved in the development of HCC through regulating PDK1[D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2015 (in Chinese).
- [54] Menges CW, Chen YB, Mossman BT, et al. A phosphotyrosine proteomic screen identifies multiple tyrosine kinase signaling pathways aberrantly activated in malignant mesothelioma. *Genes Cancer*, 2010, 1(5): 493-505.
- [55] 王一国. 酪氨酸磷酸化蛋白质组学及重要信号分子的调节通路生物学功能分析研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2007.
Wang YG. Proteome profiling of phosphotyrosine-mediated signaling and functional investigation of key signaling molecules[D]. Beijing: Shanghai Institutes for Biological Sciences, 2007 (in Chinese).
- [56] Lin CL, Chen FH, Huang LY, et al. Effect in virulence of switching conserved homologous capsular polysaccharide genes from *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 into K20. *Virulence*, 2017, 8(5): 487-493.
- [57] Pereira SB, Santos M, Leite JP, et al. The role of the tyrosine kinase Wzc (Slr0923) and the phosphatase Wzb (Slr0328) in the production of extracellular polymeric substances (EPS) by *Synechocystis* PCC 6803. *Microbiolopen*, 2019, 8(6): e00753.
- [58] Cheng JH, Tao J, Li BQ, et al. The tyrosine 73 and serine 83 dephosphorylation of H1N1 swine influenza virus NS1 protein attenuates virus replication and induces high levels of beta interferon. *Virology*, 2019, 16: 152.
- [59] Beauclair G, Naimo E, Dubich T, et al. Targeting Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus ORF21 tyrosine kinase and viral lytic reactivation by tyrosine kinase inhibitors Approved for Clinical Use. *J Virol*, 2020, 94(5): e01791-19.
- [60] Kisaka JK, Ratner L, Kyei GB. The dual-specificity kinase DYRK1A modulates the levels of cyclin L2 to control HIV replication in macrophages. *J Virol*, 2020, 94(6): e01583-19.
- [61] Ambrosioni J, Coiras M, Alcamí J, et al. Potential role of tyrosine kinase inhibitors during primary HIV-1 infection. *Exp Rev Anti Infect Ther*, 2017, 15(5): 421-423.
- [62] Szaniawski MA, Spivak AM, Cox JE, et al. SAMHD1 phosphorylation coordinates the anti-HIV-1 response by diverse interferons and tyrosine kinase inhibition. *mBio*, 2018, 9(3): e00819-18.
- [63] Rodríguez-Mora S, Spivak AM, Szaniawski MA, et al. Tyrosine kinase inhibition: a new perspective in the fight against HIV. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2019, 16(5): 414-422.
- [64] 李素贞, 徐锋, 徐平. 高转移肝癌细胞 HCCLM6 的酪氨酸磷酸化蛋白质组学研究. *军事医学*, 2019, 43(2): 106-111.
Li SZ, Xu F, Xu P. Tyrosine phosphoproteomics of high metastatic hepatocellular carcinoma cell line HCCLM6. *Mil Med Sci*, 2019, 43(2): 106-111 (in Chinese).

(本文责编 郝丽芳)