



评述

蛋白质组学在细胞凋亡研究中的应用

王立顺, 陈国强*

上海交通大学医学院, 细胞分化与凋亡教育部重点实验室/上海高校化学生物学 E-研究院, 上海 200025

* 联系人, E-mail: chengq@shsmu.edu.cn

收稿日期: 2010-05-13; 接受日期: 2010-05-26

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB910104, 2009CB918404)、国家高技术研究发展计划(批准号: 2006AAZ105)、国家自然科学基金(批准号: 30630034, 90813034, 81071668)、上海市科委重点项目和启明星项目(批准号: 08JC1413700, 07QA14041)及上海市教委高校创新团队项目(批准号: E09013)资助

摘要 细胞凋亡是一种遗传决定的在多细胞生物生长发育和稳态维持中发挥重要作用的细胞程序性死亡。正常细胞中细胞凋亡程序受精细调控, 而肿瘤、自身免疫性疾病等多种疾病的发生与细胞凋亡的失调密切相关, 因此对其分子机制的研究备受关注。在过去的 20 多年研究中, 发现很多凋亡相关的蛋白质被翻译后机制调控, 包括蛋白质剪切、转位、蛋白质相互作用和各种翻译后修饰等, 这些正是蛋白质组学的研究范畴。近年来, 蛋白质组学技术飞速发展, 并与遗传学和化学生物学等学科交叉, 推动了功能蛋白质组学和化学/药物蛋白质组学的发展, 并被迅速地应用于细胞凋亡研究领域, 有对细胞凋亡研究产生重要影响的潜力。本文综述了近年来本实验室及国际上运用蛋白质组学技术和策略研究细胞凋亡的主要进展, 同时展望了蛋白质组学在凋亡研究领域的发展方向和挑战。

关键词细胞凋亡
蛋白质组学
小分子化合物
癌基因
抑癌基因

科学的发展往往依赖于不同学科的交叉以及新技术的推动。细胞凋亡作为生物医学领域最热门的问题之一, 其发展也得益于其他多个学科的发展。细胞凋亡是基因控制的细胞自杀程序, 以清除机体内冗余和异常的细胞, 从而维持多细胞生物组织稳态^[1]。凋亡程序的缺陷与肿瘤、自身免疫性疾病和心肌肥厚等多种疾病相关, 而凋亡加速则与退行性病变、免疫缺陷和不育症有关^[2]。目前, 细胞凋亡已成为近十几年来生物医学研究中发展最快的领域之一。从分子机制到疾病表型, 细胞凋亡拥有独到的学术内涵和较成熟的研究方法。但若追溯到细胞凋亡研究伊始, 会发现有多种学科的研究策略和技术推动了细胞凋亡研究的发展, 使其从学术萌芽逐步发展到现在的

水平。

20 世纪 60 年代, 细胞凋亡研究主要是现象描述。该阶段, 得益于光学显微镜和电子显微镜技术的发展。细胞凋亡的形态学特征, 如 DNA 断裂、细胞质浓缩、核固缩、染色质浓缩、细胞肿胀发泡、骨架坍塌、凋亡小体形成等被发现, 并在此基础上提出了 apoptosis 概念^[1,3,4]; 1977 年, 对模式生物秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的研究发现, 线虫 1090 个体细胞中有 131 个会发生凋亡^[5,6], 为凋亡的基因控制的分析奠定了基础^[5]。随后, 在发现一系列控制秀丽隐杆线虫细胞凋亡的关键基因的基础上, 陆续发现了人类同源基因^[7]; 20 世纪 80 年代早期, 基因转位和融合基因是白血病发病学研究的热点。在淋巴瘤

中发现了 *Bcl-2* 基因^[8]. 随后, *Bcl-2* 家族的成员被逐一发现^[9]. 可知, *Bcl-2* 家族是细胞凋亡线粒体通路的主要调控者^[9]; 而线粒体通路一些关键成分的发现依赖于生物化学技术的巧妙利用. Liu 等人^[10]借助基于色谱的蛋白质纯化策略发现了细胞色素 C 等线粒体途径的关键成分. 同时, 外源性凋亡途径也在对 *Fas* 蛋白相互作用的分析中逐步被解析^[7,11,12]. 对免疫学 CTL 杀伤机制的研究发现, 粒酶可以诱导细胞发生非自发性凋亡^[3,13,14]. 综上所述, 细胞凋亡研究的重要进展得益于显微镜、生物化学和分子生物学等技术以及模式生物、肿瘤学、遗传学和免疫学等众多学科的推动. 那么蛋白质组学在细胞凋亡研究中发挥什么作用呢?

细胞凋亡, 作为细胞的一种基本生命活动, 受到众多调控因子的复杂、精细地调控^[15]. 越来越多的基因被证实与凋亡有关. 前基因组时代, 常逐一分析基因或蛋白在特定凋亡程序中的变化及作用. 然而, 借助后基因组学的技术手段, 可以研究一整套的基因或蛋白在特定凋亡程序中的变化. 因此更容易发现凋亡程序中新的分子. 很多研究利用基因芯片分析凋亡中转录组的变化, 发现成百上千个基因的变化, 包括调控凋亡的重要基因^[16,17]. 然而, 在抗肿瘤治疗等细胞毒性应激时, 细胞的翻译系统会受到抑制, 再加上翻译后修饰等因素的影响, 很难确定基因水平的变化会在多大程度上与蛋白质相对应^[18]. 最近, 蛋白质组学技术在蛋白质的差异定量分析、翻译后修饰的分析等领域飞速发展, 激发了用化学蛋白质组学和功能蛋白质组学分析细胞凋亡分子机制的尝试^[19-23]. 尽管其敏感性和动态范围还有局限, 但该领域仍有很大的进展. 本文综述了本实验室及国际上运用蛋白质组学研究小分子化合物诱导细胞凋亡、凋亡的调控基因及 *caspase* 底物等方面的进展, 并展望了本领域所面临的挑战和发展方向.

1 小分子化合物诱导的细胞凋亡

很多小分子化合物, 包括化疗药物及一些环境污染物, 均可诱导细胞凋亡. 这些小分子化合物往往会通过触发 DNA 损伤, 进而引起线粒体外膜通透性开放, 释放细胞色素 C, 促使 Apaf-1 与 *caspase-9* 相互作用并诱发 *caspase* 链的活化, 特别是 *caspase-3* 的

活化, 最终导致细胞发生凋亡^[24]. 然而, 诱导细胞凋亡的触发信号往往有显著差异, 发生凋亡的细胞环境也不尽相同, 因此每种凋亡的分子机制和信号通路往往有所不同. 明确不同小分子化合物诱发细胞凋亡的分子机制, 可以为新药的研发及环境污染物的毒副作用的研究提供重要信息. 蛋白质组学结合其他生物化学技术, 有利于构建化学刺激触发的调控网络、信号传导链和代谢通路, 显示出其在化学刺激诱导的细胞凋亡过程中, 在药物靶标的鉴定、分子机制的分析以及化合物的毒副作用研究方面的价值^[20,23,25].

肿瘤的发生发展和治疗中, 肿瘤耐药现象的出现, 往往伴随肿瘤细胞凋亡的缺陷, 因此通过诱导肿瘤细胞凋亡来杀死肿瘤细胞是肿瘤治疗的核心策略之一^[2,26]. 但是, 肿瘤细胞凋亡的信号分子调控网络非常复杂, 单一的药物往往效果不佳. 肿瘤的治疗需要发展不同作用机制的新化疗药物, 特别是对常规治疗药物无效的患者而言^[27]. 药物研发是个漫长的过程, 药物靶标的确认往往成为药物研发和合理用药的限速步骤, 而蛋白质组学可以提供很多有价值的信息. 例如, 三氧化二砷通过诱导白血病细胞分化和凋亡, 治疗全反式维甲酸耐药及复发的急性早幼粒细胞性白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)患者^[28], 从而使 APL 成为第一种可以被治愈的急性髓细胞性白血病. 但三氧化二砷的直接分子靶点尚不清楚. 最近, Zhang 等人^[29]用生物素标记三氧化二砷, 分离获得与三氧化二砷相互作用的蛋白质, 证实了砷剂在细胞内可以直接结合癌蛋白 PML-RAR α , 而未标记的三氧化二砷则能竞争性抑制此种结合. 进一步研究发现, PML-RAR α 癌蛋白的 PML 部分含有锌指结构域, 生理条件下与锌结合, 砷在较高浓度下可以竞争性替换锌与蛋白结合, 诱导蛋白质构象变化和多聚化, 促进其与 UBC9 之间的相互作用, 使癌蛋白更容易被 SUMO 修饰, 继而发生泛素化修饰而被蛋白酶体降解. 癌蛋白的降解最终导致白血病细胞走向分化和凋亡. 三氧化二砷与全反式维甲酸均作用于 PML, 但是结合位点不同, 这为药物之间的联合应用提供了信息基础. 另如, 基于蛋白质表达谱差异发现和寻找 GAD 的靶标^[30]. GAD 是从灵芝中分离出的三萜类化合物的主要成分^[31], 可以抑制多种肿瘤细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 被认为是其抗

肿瘤效应的基础. Yue 等人^[30]利用 2DE 分析了 GAD 处理的肿瘤细胞的蛋白质变化情况, 发现 14-3-3 等 21 个蛋白发生了明显改变. 进一步, 利用药物靶标分析程序分析这些蛋白, 发现 14-3-3 家族蛋白可能和 GAD 结合. 表面等离子体共振仪显示, 14-3-3 ζ 可以直接结合 GAD. 而且, 这些利用蛋白质组学技术发现的蛋白中有 14 个蛋白存在紧密的直接或间接的相互作用, 其他蛋白可以较松散地与之相互作用. 借助蛋白质组学手段, 发现了 GAD 的靶标蛋白.

对药物作用机制的阐明一直是药物研发中重要的一个环节, 及时准确地阐明先导化合物的作用机制, 可以加速药物研发的进程并显著降低研发费用. 金复合物 Gold(III) 复合体作为一种低毒副作用的富有前景的抗肿瘤药物^[32], 对其作用机制的阐明一直很迫切. Wang 等人^[33]利用功能蛋白质组学的方法研究了抗癌药物 Gold(III) Porphyrin 1a 处理的 HONE1 凋亡细胞, 发现多个与能量代谢和 ROS 产生相关的蛋白发生变化. 进一步用抗氧化的药物 DTT 处理, 可以阻断 Gold(III) Porphyrin 1a 诱导的线粒体通透性的改变, 显示 ROS 通过调控线粒体跨膜电位在抗癌药物 Gold(III) Porphyrin 1a 诱导的细胞凋亡中发挥重要作用. 蛋白质组学研究提示, 抗癌药物 Gold(III) Porphyrin 1a 可能通过直接靶向线粒体发挥治疗效应. 在该研究中, 尽管未能非常准确地阐明其作用通路, 但已显示了蛋白质组学无偏见分析的特点. 同时, 由于蛋白质不能像基因一样扩增, 因此, 首先看到的是能量代谢通路和氧化反应等高丰度的蛋白质变化. 但在某种意义上, 这可能正反映了该药物效应最显著的部分.

药物抵抗是化疗药物的主要问题之一. 药物抵抗可能涉及不同的机制, 目前已经发现许多分子与之有关, 而确定某个特定细胞环境下的机制往往非常困难^[34]. 利用蛋白质组学分析耐药的细胞株与非耐药的母本细胞的差异, 发现发生变化的蛋白质, 可以帮助发现耐药的机制. 例如, 五价的锑是治疗利氏曼原虫的主要药物, 但对其耐药的利氏曼原虫在世界上多个区域有上升趋势^[35]. 从患者体内分离的耐药与不耐药杜氏利什曼原虫的比较蛋白质组学分析提示, 在耐药原虫中, 其程序性死亡的蛋白 HSP83 下调和 SKCRP14.1 上调. 进一步研究显示, HSP83 和 SKCRP14.1 可以通过影响线粒体跨膜电位的通透性,

降低凋亡的敏感性^[36].

另一方面, 药物可能存在副作用, 阐明药物副作用的分子机制可以为合理用药和避免副作用奠定基础. 例如, 霉酚酸(mycophenolic acid, MPA)是移植后广泛应用的免疫抑制剂^[37]. MPA 诱导的 β 细胞毒性是胰岛移植成功与否的重要因素, 其信号传导机制尚不清楚. 应用蛋白质组学方法, Park 等人^[38]检测了 MPA 处理的凋亡的 RIN-5 细胞, 发现两维电泳胶图上 RhoGDI α 表达下调. 过表达 RhoGDI α 可以增加细胞的活力, 减少 MPA 诱导的 JNK 的活化. 而沉默 RhoGDI α 的表达会增加 MPA 诱导的 JNK 活化. MPA 诱导的细胞凋亡可以被 JNK 抑制剂阻断. 该研究提示, MPA 可以诱导胰岛素分泌细胞 RhoGDI α 的表达下调, 增加 JNK 的活化, 导致细胞凋亡; 而 RhoGDI α /JNK 传导通路可能是预防 MPA 诱导的胰岛细胞凋亡的靶标.

同时, 随着工业经济的发展, 环境污染持续增加. 一些污染物通过诱导细胞凋亡对有机体产生毒害. 对这些污染物的蛋白质组学分析可以为保护人类健康提供有价值的信息. 环境污染物质二噁英(TCDD)具有广泛毒性, 被称为实验动物中最强的肝癌诱导剂^[39]. 为了系统地分析 TCDD 对肝细胞蛋白质的影响, Sarioglu 等人^[40]分析了 TCDD 处理前后的肝细胞蛋白质的表达谱, 发现 VDAC2 的上调表达依赖于芳香烃受体的有无. 结合近期发现, VDAC2 是凋亡因子 Bak 的重要抑制因子, 提示 VDAC2 可能在 TCDD 诱导的肝癌发生中发挥了一定作用, 这为研究 TCDD 的致癌机理提供了新的思路. 肾毒性药物 1, 2-(dichlorovinyl)-L-cysteine (DCVC)可以被肾脏的近端小管细胞吸收, 并在近端肾小管细胞中被肾脏的共轭裂解酶激活产生活性中间体, 引发细胞损伤^[41]. de Graauw 等人^[42]用 2D-DIGE 分析了 DCVC 诱发的肾脏上皮细胞凋亡初始阶段的蛋白质变化, 发现 HSP27 的 pI 迁移率改变, 并与其 82 位丝氨酸的磷酸化相关. 他们进一步发现, 用 SB203580 抑制 p38 可以减少 HSP27 的磷酸化, 加速细胞解离和凋亡. 阻断 JNK 的活化不能阻止 DCVC 诱导的 HSP27 磷酸化. 过表达磷酸化缺失的 HSP27 突变体, 可以显性负抑制 HSP27, 加速 DCVC 诱发的蛋白变化和细胞凋亡. 该研究提示, 促进和保持 p38 活化导致的 HSP27 磷酸化, 可能是保证细胞黏附, 抑制肾脏上皮细胞凋亡的

有效策略。

小分子化合物, 也许不能成为药物或先导化合物, 但因其特定的生物活性, 可能成为研究复杂生物系统中未知分子机制和信号传导通路的探针。如很多疾病均涉及 ER 应激诱导的细胞凋亡, 但对其分子机制尚不清楚^[43]。Salubrinal 是一个小分子, 通过激活 ER 通路上特定的蛋白分子, 保护细胞免于内质网应激诱导的细胞凋亡^[44]。Boyce 等人^[45]用 Salubrinal 作为探针, 研究 ER 应激诱发的细胞凋亡蛋白质表达谱, 发现了细胞内与 ER 应激相关的分子。他们在二维电泳图上发现, Salubrinal 处理后一组蛋白质向等电聚焦的酸性端迁移。这些蛋白经质谱鉴定为 eEF-2。向酸性端迁移与磷酸化修饰相一致, 经质谱分析定位其磷酸化位点为 55-59AA。并且可以经抗磷酸化抗体确认。结果提示, eEF-2 激酶是一个未知的内质网应激的调控者。

本实验室先前发现纳摩尔浓度的 NSC606985(一种新型喜树碱衍生物)通过剪切激活 PKC δ 诱导急性粒细胞性白血病细胞发生凋亡^[46]。随后的体内实验发现, NSC606985 对白血病小鼠具有治疗作用, 能够明显延长白血病小鼠的生存期^[47]。以 NSC606985 为探针诱导白血病细胞凋亡, 以白血病细胞 NB4 为模型, 动态分析了白血病细胞凋亡过程中的亚细胞器蛋白质组学变化, 发现一系列在细胞凋亡中表达或细胞内定位发生变化的蛋白质^[18]。结合生物信息学的分析, 以 NSC606985 为探针发现的变化的蛋白绘制了白血病细胞凋亡的可能信号通路网络, 为发现白血病细胞凋亡的机制提供了大量线索^[27]。根据上述发现, 以 NSC606985 作为凋亡诱导剂, 发现了酸性亮氨酸磷酸核蛋白 32b(ANP32B)的剪切片段出现在发生凋亡的白血病细胞 NB4 的胞浆中。ANP32B 的剪切发生通过 caspase-3 介导, 是凋亡过程中发生的普遍现象, 而 ANP32B 表达沉默会促进细胞的凋亡^[48]。在以 NSC606985 为探针的亚细胞水平的蛋白质组学分析中, 同时发现二氢叶酸还原酶 DHFR 在白血病细胞凋亡过程中, 会从细胞浆转位到细胞核。触发内质网应激药物, 如 brefeldin-A 和 tunicamycin, 也可以诱导 DHFR 在细胞内发生核转位^[49]。进一步研究发现, DHFR 在内质网应激诱发细胞凋亡通路中起重要的调控作用。另外, 本实验室还发现, 核不均一性核糖核蛋白 K(hnRNPK)在 NSC606985 诱导的细

胞凋亡中发生蛋白酶体途径的降解, 而 RNAi 使 hnRNPK 表达沉默, 会促进白血病细胞凋亡^[50]。在上述研究中, 发现大部分变化的蛋白质出现在凋亡的晚期。为了发现凋亡早期的蛋白质, 充分利用了化合物小分子探针灵活可调的特点, 调整处理白血病细胞 NSC606985 的剂量, 使诱导细胞凋亡发生的时间延长, 以便于发现凋亡发生早期的分子机制。借助该探针并结合定量蛋白质组学技术, 在白血病细胞 U937 中发现了 NDRG1(N-myc downstream regulated gene 1)在凋亡的早期就发生明显的下调, 用 PKC δ 抑制剂 rottlerin 可以阻断 PKC δ 蛋白的剪切激活, 并阻断 caspase-3 的剪切激活, 但不能阻断 NSC606985 诱导的 NDRG1 下调, 提示 NDRG1 发生在 PKC δ 蛋白剪切激活之前, 是凋亡早期事件。进一步研究发现, NDRG1 的下调表达可以促进白血病细胞凋亡, 而过表达 NDRG1 会降低白血病细胞对凋亡的敏感性^[51]。

2 凋亡调控基因

细胞凋亡过程受到众多基因的精细调控, 如抑癌基因 *p53*, *Bax* 及癌基因 *Bcl-2* 和 *Bcl-XL* 等分别发挥促进和抑制凋亡的作用^[26,52]。这些基因影响正常及癌变细胞对凋亡刺激的敏感性。其促进和抑制细胞凋亡分子机制的研究引起了人们的兴趣, 而蛋白质组学也成为很有效的研究策略。

Bcl-2 家族是线粒体凋亡途径的仲裁者^[53], 其进化高度保守, 分为 3 类成员: 第一类包括促凋亡成员 *Bax* 和 *Bak*, 构成线粒体凋亡通路的大门, 其变构活化导致线粒体外膜通透性增加和细胞色素 C 释放; 第二类是 BH3-only 分子, 包括 *Bad*, *Bid* 和其他可以激活 *Bax* 和 *Bak* 的分子, *Bcl-2* 等抗凋亡成员可以与之相互作用, 使其活性受到抑制; 第三类包括 *Bcl-2* 和 *Bcl-XL* 等抗凋亡成员。Bcl-2 家族成员之间的平衡和相互作用可以决定细胞的生死, 但是 Bcl-2 家族成员之间的相互作用和激活 *Bax* 和 *Bak* 的机制还不清楚, 是凋亡研究领域的难点^[9]。

Kerr 等人^[54]用不能转位到线粒体的 *Bax* 氨基端 21 个氨基酸短肽作为对照, 用其能够转位的突变体 S184V 分离 *Bax* 相互作用蛋白, 通过生物素标记的上述肽段富集 *Bax* 相互作用蛋白, 发现核仁磷蛋白与

Bax 相互作用, 基因沉默表达核仁磷蛋白, 细胞凋亡受到抑制, 从而发现了一个新的调控 Bax 的分子. 另一个蛋白质组表达分析显示, 沉默基因 *CTCF* 可上调 *Bax* 表达, 为理解 *CTCF* 在乳腺癌细胞系中高表达的作用及分子机制提供了重要线索^[55]. Bak 通常被认为是线粒体定位蛋白, 与 Bax 一起在细胞凋亡中控制线粒体外膜通透性的改变. 但 Hwang 等人^[56]用 SILAC 定量蛋白质组学技术分析 anti-fas 抗体诱导的细胞凋亡的 Jurkat 细胞的核组分, 发现线粒体蛋白 Bak 会被募集到核凹陷中, 提示在凋亡中 Bak 可能有新的未知机制. Danial 等人^[57]用凝胶过滤色谱技术分析了肝脏线粒体 Bad 的蛋白复合体, 发现 Bad 与 PKA, PP1 催化亚基 WAVE-1, 特别是葡萄糖激酶形成一个全酶复合体. Bad 是该复合体组装所必需的, 缺乏 Bad 的肝细胞不能形成该复合体, 并导致线粒体依赖的葡萄糖激酶活性降低, 葡萄糖对应的线粒体呼吸迟钝. 葡萄糖缺失导致 Bad 去磷酸化而被激活, 诱导细胞凋亡, 使 Bad 把葡萄糖代谢和细胞凋亡两个通路整合到一起. Liu 等人^[58]在酵母菌双杂交研究中发现, JAB 可以竞争性地在氨基末端与 Bcl-2/Bcl-XL 和 BH-3-only 成员 BclGs 相互作用, 从而促进凋亡, 沉默 JAB 的表达, 会降低凋亡的敏感性. Cimmino 等人^[59]发现, 过表达野生型的异天冬氨酸甲基转移酶 PCMT 会使细胞抗凋亡, 而其反义 RNA 会增加对 H_2O_2 的凋亡敏感性. 把纯化的 PCMT 与细胞裂解液共孵育, 并经 2DE 和质谱分析, 脱氨基后的 Bcl-XL 被鉴定发现甲基化, 是 PCMT 的特异性底物. 被修饰的 Bcl-XL 不能有效地阻断促凋亡蛋白的作用, 因此导致细胞死亡. 另外, 在 Myc 诱导的细胞凋亡的定量蛋白质组学分析中, 发现 Myc 可以降低 Bcl-2 和 Bcl-XL 的表达, 提示肿瘤细胞升高表达 Bcl-2 和 Bcl-XL 可能是其细胞凋亡缺陷的机制之一^[60]. 上述蛋白质组学研究为理解 Bcl-2 家族的调控及活化机制提供了很多有价值的信息.

p53 是主要的抑癌基因, 被称为基因组的守护者^[52]. 在 DNA 损伤情况下, p53 可以通过转录依赖和非依赖的方式引起细胞周期阻滞以修复 DNA, 或者在修复失败条件下诱导细胞凋亡. 而该通路的破坏会导致肿瘤的发生及对化疗药物的耐药. 例如, p53 在大约 50% 的自发性肿瘤中存在突变. 所以, 为了保证细胞的正常生长, p53 的表达水平和活性受到严密的调控. 如 p53 在多种刺激下可以发生翻译后修饰,

影响其稳定性和活性. 但对于 p53 的磷酸化和乙酰化修饰是否影响 p53 的功能存在争议. 在接受放射治疗的 p53(K317R)转基因老鼠的胸腺细胞蛋白质表达谱定量分析发现, 涉及转录、翻译和凋亡等多个通路的 46 个蛋白发生了明显的变化. p53(K317R)的活性比野生型高, 但是 *TNF* 通路的蛋白表达水平下降, 提示 317 位赖氨酸的乙酰化显著影响 p53 的活性^[61]. Tang 等人^[62]通过蛋白质组学策略鉴定出 p53 的所有乙酰化位点, 并发现不能乙酰化的 p53 失去活性, 而乙酰化的 p53 可以使 Mdm2 不能募集到其反应元件区, 发生不依赖于磷酸化的活化, 有力地阐明了乙酰化对 p53 活性的影响.

转录调控是 p53 发挥作用的机制之一. 鉴定 p53 的靶基因对于理解 p53 的功能有重要意义. Gu 等人^[63]比较 p53 诱导表达的人结肠癌细胞 DLD-1 与对照细胞的蛋白质表达谱, 鉴定出大量被上调表达的蛋白. Johnson 等人^[64]和 Rahman-Roblick 等人^[65]分别比较喜树碱及丝裂霉素处理的 p53 野生型和缺失的细胞, 发现了大量的差异蛋白. 除了转录调控, p53 也可以通过翻译后修饰等机制调控下游基因. 事实上, Rahman-Roblick 等人在鉴定 p53 的靶基因中发现除了转录调控的靶基因外, 还有转录非依赖的靶基因. 进一步, 用 Pro-Q 染色等策略, 他们还发现了一些磷酸化修饰蛋白^[66]. Orre 等人^[67]用 top-down 技术发现 S100A4 的磷酸化修饰依赖于 p53. 这些蛋白质组学研究为加深人们对 p53 调控及其功能的认识, 进而设计新的激活 p53 来干预肿瘤的药物提供了新的线索.

凋亡信号从浆膜到细胞核的传递涉及了一系列不同的通路和蛋白质修饰, 主要是磷酸化修饰, 磷酸化修饰导致一系列蛋白激酶的活化. 某些蛋白激酶的活化可以促进细胞凋亡, 而有些会阻滞细胞凋亡^[68]. 因此, 发现蛋白激酶的底物对于理解凋亡的分子机制意义重大. 蛋白质相互作用是蛋白激酶发挥激酶作用的前提, 对于激活下游信号通路非常重要, 因此通过蛋白质相互作用钓取其蛋白质底物及其调控蛋白是行之有效的策略. 癌基因融合蛋白 NPM/ALK 可以诱导发生间变性大细胞淋巴瘤. Galletta 等人^[69]运用免疫共沉淀方法发现包括 PSF 在内的多个 RNA/DNA 结合蛋白与其相互作用, PSF 是 ALK 的底物, 融合蛋白 NPM/ALK 使 PSF 磷酸化并使其从细胞核转位到细胞浆, 对肿瘤抗原 GAGE6 的抑制降低.

另外, 基于酵母菌双杂交相互作用蛋白研究发现, 整合素连接激酶 ILK 与 rictor 蛋白可以相互作用. 而 ILK 与 Akt 的磷酸化有关. 单纯敲除 rictor 会减少 Akt 473 位丝氨酸磷酸化, 而联合敲除 ILK 和 rictor 导致 Akt 473 位丝氨酸不能磷酸化, 提示 rictor 是 ILK 的调控者^[70]. 随着磷酸化蛋白及磷酸化肽段富集策略的增加和质谱高通量分析磷酸化位点敏感性和通量的提高, 利用磷酸化蛋白质表达谱分析的策略也成为很好的选择. 为了更好地理解癌基因 FGFR3 的信号通路, Kang 等人^[71]在持续表达活性形式 FGFR3 突变体的造血细胞中分析了其磷酸化蛋白质组的变化, 鉴定出大量的酪氨酸磷酸化蛋白. 他们发现, FGFR3 可以通过直接磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶 RSK2 的 529 位酪氨酸, 促进未活化的 ERK 与 RSK2 结合, 导致 ERK 介导的 RSK2 磷酸化和活化, 促进造血细胞的癌变.

有趣的是, 有些经典的磷酸化激酶通路, 有时其功能并不依赖于磷酸化激酶的活性. 例如, Raf 是 Ras 通路上重要的丝氨酸/苏氨酸激酶^[72], 但有研究显示, 缺失 Raf 基因, 尽管通过 B-Raf 可以正常调控 ERK, 但会引起广泛的细胞凋亡和胚胎致死^[73]. 相似地, Raf-1 沉默的成纤维母细胞对血清撤除、Fas 等诱发的凋亡高度敏感, 而表达无激酶活性 Raf-1 的突变体可以挽救这些细胞. 上述结果提示, 凋亡保护作用存在另一条机制. 为发现 Raf-1 通路新的分子, O'Neill 等人^[74]用免疫共沉淀法发现 MST2 蛋白与 Raf-1 相互作用. 在老鼠或细胞敲除 Raf 会激活 MST2, 导致细胞凋亡. 在 Raf 敲除的老鼠或细胞中沉默 MST2 的表达可以阻止凋亡发生, 而过表达 MST2 会诱导凋亡的发生. 提示 MST2 促进细胞凋亡, 而 Raf-1 通过相互作用抑制 MST2 活性, 进而抑制细胞凋亡. 进一步, 为了获得 MST2 的下游因子, 他们用 MST2 免疫沉淀发现了 LATS1^[75]. 同时发现, 抑癌基因 RASSF1A 破坏 Raf1-MST2 复合体, 并促进 MST2 与其底物 LATS1 的相互作用, 激活的 LATS1 磷酸化并释放转录调控因子 YAP1, 使 YAP1 从胞浆转位到细胞核与 p73 相互作用, 导致促凋亡靶基因 puma 的表达.

3 蛋白酶及其底物

自从人的 caspase-1 被鉴定为线虫凋亡基因

CED-3 的同源物, 关于 caspase 家族的生理功能、底物、不同激活机制及与疾病关系的研究就层出不穷, 为理解凋亡的分子机制提供了大量信息^[7,24]. 值得提出的是, 作为天冬氨酸特异的蛋白酶, caspase 通过剪切特异的蛋白质底物在细胞凋亡中发挥关键作用. 有些剪切仅仅是细胞凋亡过程中作为蛋白质降解的一种途径, 并不参与细胞凋亡. 然而, 有一些蛋白质的剪切, 如 caspases, RB, IAP, PARP 等, 被证明在蛋白质活化、转位等方面具有重要功能, 对凋亡后期的细胞膜结构改变、细胞收缩、染色质固缩和凋亡小体的形成非常重要^[76]. 本实验室近年来先后发现, caspase-3 底物白血病融合蛋白 AML-ETO 和 ANP32B 的剪切片段在细胞凋亡中发挥重要作用^[77].

另外, 所鉴定的底物有利于整体上理解酶的作用规律, 更好地把握蛋白酶的功能特性. 例如, caspase 家族成员在细胞凋亡中发挥了核心作用. 其中, caspase 的主要执行者 caspase-3 和 caspase-7 由于对特定的肽段表现出相似的活性, 可能发挥了冗余的作用^[78]. 然而, 两者的基因敲除老鼠的表型明显不同, 提示 caspase-3 和 caspase-7 事实上功能不同^[79], 但是缺乏生物化学证据. Walsh 等人^[80]用 caspase-3 缺失的 Jurkat 细胞提取物进行蛋白质组学分析, 发现 caspase-3 和 caspase-7 具有不同的活性. 清除 caspase-3 的细胞失去了大部分 caspase 依赖的蛋白剪切, 只有少数蛋白发生 caspase-3 非依赖的剪切, 支持 caspase-3 是凋亡后期主要的执行者. 因此, 识别 caspase 底物, 成为凋亡领域研究的热点之一. 在过去 10 多年中, 已有数百个 caspase 家族的底物被报道^[76,81-83]. 这些底物通常共享一段 4 个氨基酸的高度保守的序列, 预计尚有数百个底物还未被发现. 例如, 生物信息学曾对 caspase 底物在整个基因组范围的蛋白质做了预测分析, 并提供了大量潜在的底物及其剪切位点^[84]. 但是, 这些理论推算的底物还需要实验数据的支持. 因此, 亟需发展系统分析蛋白质剪切底物的方法. 基于蛋白质组学新的高通量的蛋白质分离和鉴定方法, 对在整个基因组范围内 caspase 底物的鉴定发挥了重要作用.

Dix 等人^[85]建立了一个基于常规凝胶电泳的自动化的技术平台, 可以在整个基因组直接看到蛋白质剪切发生的位置和程度. 把正常对照和凋亡细胞的蛋白质分别用 SDS-PAGE 分离, 未剪切的全长的

蛋白会出现在对照的泳道中, 而剪切的片段会出现在凋亡的泳道中, 但分子量较低. 为了鉴定这些蛋白, SDS-PAGE 的胶被切成很多条带, 胰酶消化后用 LC-MS/MS 分析, 同一种蛋白出现在两个泳道的不同分子量区域即为剪切蛋白的信息. 他们共鉴定出 91 个已知的 caspase 底物及 170 个新的被剪切的蛋白. 分析发现, 这些蛋白质不管如何剪切, 大多数总会产生与结构域相关的片段. 结果提示, 产生有效应的蛋白可能是凋亡中蛋白质剪切的重要功能. 同时, Mahrus 等人^[86]建立了一种方法来特异性地标记蛋白 N 端, 从而富集 N 端肽段以鉴定蛋白酶切的位点. 在细胞凋亡后, 他们用枯草连接酶把自由的 N 端链接上生物素肽, 然后用 LC-MS/MS 质谱分析. 他们对 292 个蛋白的 333 个 caspase 样酶切位点进行测序, 发现酶切位点往往位于表面及环形结构上, 而且很多蛋白底物之间存在相互作用, 提示 caspase 可能通过剪切蛋白质复合体和信号网络来诱发凋亡. 随着 SILAC 和 iTRAQ 等定量蛋白质组学技术的发展^[87], 人们发现新的 caspase 底物和酶切位点也变得越来越简单. 相应地, caspase 的蛋白底物列表越来越长. Luthi 和 Martin^[82]建立了一个权威的数据库, 囊括了大部分已知的 caspase 底物和酶切位点信息, 以利于分析这些蛋白质的功能, 为相关的研究提供了方便.

长期以来, 人们一直认为还存在 caspase 之外的其他蛋白酶在凋亡中发挥作用. Van Damme 等人^[88]用对角线色谱技术和同位素标记技术分析 anti-fas 处理的 Jurkat T 淋巴细胞, 鉴定了 71 个蛋白的 93 个酶切位点. 其中大部分是 caspase 位点. 然而, 35 个位点位于非天冬氨酸的羧基端, 多是碱性或是疏水的氨基酸, 提示有其他蛋白酶被激活. 同样, Impens 等人^[89]在分析紫杉醇诱导的非小细胞肺癌的蛋白质剪切位点时发现, 27 个既包括天冬氨酸的羧基端也包括非天冬氨酸的羧基端, 提示有非 caspase 的蛋白酶活化.

在细胞凋亡的非 caspase 蛋白酶中, T 淋巴细胞和 NK 细胞的蛋白酶粒酶 B 受到广泛重视^[13]. 粒酶 B 可以通过处理 caspase 酶原激活 caspase 家族, 从而在特定刺激下触发细胞凋亡^[14]. 为了在蛋白质剪切底物

中发现粒酶的底物, Bredemeyer 等人^[90]用粒酶 B 处理 YAC-1 细胞, 同时用粒酶 B 抑制剂, 进行 DIGE 和串联质谱分析, 发现了 procaspase-3 及其他一些底物. Adrain 等人^[91]则用无细胞系统和 2DE 分析粒酶 B 触发的细胞凋亡. 他们分析了 caspase-3 和 caspase-7 的存在对蛋白质被剪切的影响, 发现粒酶 B 的作用很狭窄, 细胞凋亡主要通过 caspase-3 完成.

线粒体丝氨酸蛋白酶 HtrA2/Omi 是核编码的, HtrA2/Omi 带有线粒体定位信号, 介导其进入线粒体膜间隙. HtrA2/Omi 是细胞凋亡过程中释放入胞浆的成分之一^[92]. HtrA2/Omi 的蛋白剪切活性是 caspase 依赖和非依赖的细胞凋亡所需要的. 但是, 除了 IAP^[93]外, 尚不清楚 HtrA2/Omi 的其他底物. Vande Walle 等人^[94]制备了重组的 HtrA2/Omi 和无活性突变体, 处理 Jurkat 细胞, 经质谱鉴定出 15 个底物和 50 个位点, 提示 HtrA2/Omi 的蛋白质剪切目标很狭窄, 细胞骨架蛋白是其首选目标.

4 结论与展望

本文主要综述了功能蛋白质组学及化学/药物蛋白质组学在凋亡研究领域的主要进展. 事实上, 蛋白质组学在蛋白激酶底物鉴定方面有非常独到的优势. 这不仅体现在细胞凋亡中, 还包括炎症等其他生物学过程中, 其通量和敏感性是传统的生物化学方法所不及的. 在转录因子靶基因鉴定方面可以与基因芯片、chip-on-chip 等技术互补. 但是, 不能否认蛋白质组学技术目前的敏感性和通量还有待进一步提高, 其还不能完全满足整个基因组水平上对蛋白质分析的要求, 只能分析表达丰度比较高的蛋白质. 因此, 仍需与各种蛋白质分离技术结合, 从而实现对某个特定蛋白质组的分析.

蛋白质组学技术的发展日新月异, 随着磷酸化等翻译后修饰技术和蛋白质-蛋白质相互作用技术、蛋白质核酸相互作用以及蛋白质小分子相互作用技术的进一步发展, 会有更多重要的凋亡调控因子及调控机制被发现, 从而推动凋亡研究步入新的高度.

参考文献

- 1 Raff M C. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992, 356: 397—400
- 2 Vermeulen K, Van Bockstaele D R, Berneman Z N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol*, 2005, 84: 627—639

- 3 Vaux D L. Apoptosis timeline. *Cell Death Differ*, 2002, 9: 349—354
- 4 Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26: 239—257
- 5 Ellis H M, Horvitz H R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*, 1986, 44: 817—829
- 6 Sulston J E, Horvitz H R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*, 1977, 56: 110—156
- 7 Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 2008, 27: 6194—6206
- 8 Vaux D L, Cory S, Adams J M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 1988, 335: 440—442
- 9 Youle R J, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9: 47—59
- 10 Liu X, Kim C N, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 1996, 86: 147—157
- 11 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003, 114: 181—190
- 12 Varfolomeev E E, Schuchmann M, Luria V, et al. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 1998, 9: 267—276
- 13 Trapani J A, Smyth M J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2: 735—747
- 14 Andrade F, Roy S, Nicholson D, et al. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity*, 1998, 8: 451—460
- 15 Chowdhury I, Tharakan B, Bhat G K. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*, 2006, 11: 506—525
- 16 Hofmann W K, de Vos S, Tsukasaki K, et al. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood*, 2001, 98: 787—794
- 17 Voehringer D W, Hirschberg D L, Xiao J, et al. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 2680—2685
- 18 Yu Y, Wang L S, Shen S M, et al. Subcellular proteome analysis of camptothecin analogue NSC606985-treated acute myeloid leukemic cells. *J Proteome Res*, 2007, 6: 3808—3818
- 19 Bredemeyer A J, Townsend R R, Ley T J. Use of protease proteomics to discover granzyme B substrates. *Immunol Res*, 2005, 32: 143—153
- 20 Kruse U, Bantscheff M, Drewes G, et al. Chemical and pathway proteomics: powerful tools for oncology drug discovery and personalized health care. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7: 1887—1901
- 21 Zhang J T, Liu Y. Use of comparative proteomics to identify potential resistance mechanisms in cancer treatment. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33: 741—756
- 22 Rix U, Superti-Furga G. Target profiling of small molecules by chemical proteomics. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 616—624
- 23 Kohnke P L, Mulligan S P, Christopherson R I. Membrane proteomics for leukemia classification and drug target identification. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11: 603—610
- 24 Riedl S J, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5: 897—907
- 25 Lecellier G, Brenner C. Genomic and proteomic screening of apoptosis mitochondrial regulators for drug target discovery. *Curr Med Chem*, 2007, 14: 875—881
- 26 Cotter T G. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9: 501—507
- 27 Chen G Q, Wang L S, Wu Y L, et al. Leukemia, an effective model for chemical biology and target therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28: 1316—1324
- 28 Chen G Q, Shi X G, Tang W, et al. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose-dependent dual effects on APL cells. *Blood*, 1997, 89: 3345—3353
- 29 Zhang X W, Yan X J, Zhou Z R, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR α oncoprotein by directly binding PML. *Science*, 2000, 288: 240—243
- 30 Yue Q X, Cao Z W, Guan S H, et al. Proteomics characterization of the cytotoxicity mechanism of ganoderic acid D and computer-automated estimation of the possible drug target network. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7: 949—961
- 31 Wang X M, Yang M, Guan S H, et al. Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41: 838—844
- 32 Wang Y, He Q Y, Che C M, et al. Proteomic characterization of the cytotoxic mechanism of gold (III) porphyrin 1a, a potential anticancer drug. *Proteomics*, 2006, 6: 131—142
- 33 Wang Y, He Q Y, Sun R W, et al. Gold(III) porphyrin 1a induced apoptosis by mitochondrial death pathways related to reactive oxygen species. *Cancer Res*, 2005, 65: 11553—11564
- 34 Fojo T. Multiple paths to a drug resistance phenotype: mutations, translocations, deletions and amplification of coding genes or promoter regions, epigenetic changes and microRNAs. *Drug Resist Update*, 2007, 10: 59—67
- 35 Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat*, 2007, 10: 68—78

- 2004, 7: 257—266
- 36 Vergnes B, Gourbal B, Girard I, et al. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6: 88—101
- 37 Allison A C, Eugui E M. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*, 2000, 47: 85—118
- 38 Park Y J, Ahn H J, Chang H K, et al. The RhoGDI- α /JNK signaling pathway plays a significant role in mycophenolic acid-induced apoptosis in an insulin-secreting cell line. *Cell Signal*, 2009, 21: 356—364
- 39 Gold L S, Slone T H, Manley N B, et al. The Carcinogenic Potency Database: analyses of 4000 chronic animal cancer experiments published in the general literature and by the U.S. National Cancer Institute/National Toxicology Program. *Environ Health Perspect*, 1991, 96: 11—15
- 40 Sarioglu H, Brandner S, Habegger M, et al. Analysis of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced proteome changes in 5L rat hepatoma cells reveals novel targets of dioxin action including the mitochondrial apoptosis regulator VDAC2. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7: 394—410
- 41 Chen J C, Stevens J L, Trifillis A L, et al. Renal cysteine conjugate beta-lyase-mediated toxicity studied with primary cultures of human proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990, 103: 463—473
- 42 de Graauw M, Tijdens I, Cramer R, et al. Heat shock protein 27 is the major differentially phosphorylated protein involved in renal epithelial cellular stress response and controls focal adhesion organization and apoptosis. *J Biol Chem*, 2005, 280: 29885—29898
- 43 Aridor M, Balch W E. Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat Med*, 1999, 5: 745—751
- 44 Boyce M, Bryant K F, Jousse C, et al. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*, 2005, 307: 935—939
- 45 Boyce M, Py B F, Ryazanov A G, et al. A pharmacoproteomic approach implicates eukaryotic elongation factor 2 kinase in ER stress-induced cell death. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 589—599
- 46 Song M G, Gao S M, Du K M, et al. Nanomolar concentration of NSC606985, a camptothecin analog, induces leukemic-cell apoptosis through protein kinase C δ -dependent mechanisms. *Blood*, 2005, 105: 3714—3721
- 47 Liu W, Zhu Y S, Guo M, et al. Therapeutic efficacy of NSC606985, a novel camptothecin analog, in a mouse model of acute promyelocytic leukemia. *Leuk Res*, 2007, 31: 1565—1574
- 48 Shen S M, Yu Y, Wu Y L, et al. Down-regulation of ANP32B, a novel substrate of caspase-3, enhances caspase-3 activation and apoptosis induction in myeloid leukemic cells. *Carcinogenesis*, 2009, 31: 419—426
- 49 Yuan T T, Huang Y, Zhou C X, et al. Nuclear translocation of dihydrofolate reductase is not a pre-requisite for DNA damage induced apoptosis. *Apoptosis*, 2009, 14: 699—710
- 50 Gao F H, Wu Y L, Zhao M, et al. Protein kinase C- δ mediates down-regulation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein: involvement in apoptosis induction. *Exp Cell Res*, 2009, 315: 3250—3258
- 51 Zheng Y, Wang L S, Xia L, et al. NDRG1 is down-regulated in the early apoptotic event induced by camptothecin analogs: the potential role in proteolytic activation of PKC δ and apoptosis. *Proteomics*, 2009, 9: 2064—2075
- 52 Vazquez A, Bond E E, Levine A J, et al. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 979—987
- 53 Lessene G, Czabotar P E, Colman P M. Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 989—1000
- 54 Kerr L E, Birse-Archbold J L, Short D M, et al. Nucleophosmin is a novel Bax chaperone that regulates apoptotic cell death. *Oncogene*, 2007, 26: 2554—2562
- 55 Docquier F, Farrar D, D'Arcy V, et al. Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis. *Cancer Res*, 2005, 65: 5112—5122
- 56 Hwang S I, Lundgren D H, Mayya V, et al. Systematic characterization of nuclear proteome during apoptosis: a quantitative proteomic study by differential extraction and stable isotope labeling. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5: 1131—1145
- 57 Danial N N, Gramm C F, Scorrano L, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature*, 2003, 424: 952—956
- 58 Liu X, Pan Z, Zhang L, et al. JAB1 accelerates mitochondrial apoptosis by interaction with proapoptotic BclGs. *Cell Signal*, 2008, 20: 230—240
- 59 Cimmino A, Capasso R, Muller F, et al. Protein isoaspartate methyltransferase prevents apoptosis induced by oxidative stress in endothelial cells: role of Bcl-XL deamidation and methylation. *PLoS ONE*, 2008, 3: e3258
- 60 Shiio Y, Suh K S, Lee H, et al. Quantitative proteomic analysis of myc-induced apoptosis: a direct role for Myc induction of the mitochondrial chloride ion channel, mtCLIC/CLIC4. *J Biol Chem*, 2006, 281: 2750—2756
- 61 Jenkins L M, Mazur S J, Rossi M, et al. Quantitative proteomics analysis of the effects of ionizing radiation in wild type and p53 K317R knock-in mouse thymocytes. *Mol Cell Proteomics*, 2008, 7: 716—727
- 62 Tang Y, Zhao W, Chen Y, et al. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell*, 2008, 133: 612—626

- 63 Gu S, Liu Z, Pan S, et al. Global investigation of p53—induced apoptosis through quantitative proteomic profiling using comparative amino acid-coded tagging. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3: 998—1008
- 64 Johnson M D, Yu L R, Conrads T P, et al. Proteome analysis of DNA damage-induced neuronal death using high throughput mass spectrometry. *J Biol Chem*, 2004, 279: 26685—26697
- 65 Rahman-Roblick R, Roblick U J, Hellman U, et al. p53 targets identified by protein expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 5401—5406
- 66 Rahman-Roblick R, Hellman U, Becker S, et al. Proteomic identification of p53-dependent protein phosphorylation. *Oncogene*, 2008, 27: 4854—4859
- 67 Orre L M, Pernemalm M, Lengqvist J, et al. Up-regulation, modification, and translocation of S100A6 induced by exposure to ionizing radiation revealed by proteomics profiling. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6: 2122—2131
- 68 Webb P R, Wang K Q, Scheel-Toellner D, et al. Regulation of neutrophil apoptosis: a role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. *Apoptosis*, 2000, 5: 451—458
- 69 Galletta A, Gunby R H, Redaelli S, et al. NPM/ALK binds and phosphorylates the RNA/DNA-binding protein PSF in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*, 2007, 110: 2600—2609
- 70 McDonald P C, Oloumi A, Mills J, et al. Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res*, 2008, 68: 1618—1624
- 71 Kang S, Dong S, Gu T L, et al. FGFR3 activates RSK2 to mediate hematopoietic transformation through tyrosine phosphorylation of RSK2 and activation of the MEK/ERK pathway. *Cancer Cell*, 2007, 12: 201—214
- 72 Baccarini M. An old kinase on a new path: Raf and apoptosis. *Cell Death Differ*, 2002, 9: 783—785
- 73 Huser M, Luckett J, Chiloeches A, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J*, 2001, 20: 1940—1951
- 74 O'Neill E, Rushworth L, Baccarini M, et al. Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science*, 2004, 306: 2267—2270
- 75 Matallanas D, Romano D, Yee K, et al. RASSF1A elicits apoptosis through an MST2 pathway directing proapoptotic transcription by the p73 tumor suppressor protein. *Mol Cell*, 2007, 27: 962—975
- 76 Timmer J C, Salvesen G S. Caspase substrates. *Cell Death Differ*, 2007, 14: 66—72
- 77 Lu Y, Peng Z G, Yuan T T, et al. Multi-sites cleavage of leukemogenic AML1-ETO fusion protein by caspase-3 and its contribution to increased apoptotic sensitivity. *Leukemia*, 2008, 22: 378—386
- 78 Stennicke H R, Renatus M, Meldal M, et al. Internally quenched fluorescent peptide substrates disclose the subsite preferences of human caspases 1, 3, 6, 7 and 8. *Biochem J*, 2000, 350 Pt 2: 563—568
- 79 Lakhani S A, Masud A, Kuida K, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 2006, 311: 847—851
- 80 Walsh J G, Cullen S P, Sheridan C, et al. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 12815—12819
- 81 Stroth C, Schulze-Osthoff K. Death by a thousand cuts: an ever increasing list of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 1998, 5: 997—1000
- 82 Luthi A U, Martin S J. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 2007, 14: 641—650
- 83 Demon D, Van Damme P, Berghe T V, et al. Caspase substrates: easily caught in deep waters? *Trends Biotechnol*, 2009, 27: 680—688
- 84 Wee L J, Tan T W, Ranganathan S. CASVM: web server for SVM-based prediction of caspase substrates cleavage sites. *Bioinformatics*, 2007, 23: 3241—3243
- 85 Dix M M, Simon G M, Cravatt B F. Global mapping of the topography and magnitude of proteolytic events in apoptosis. *Cell*, 2008, 134: 679—691
- 86 Mahrus S, Trinidad J C, Barkan D T, et al. Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini. *Cell*, 2008, 134: 866—876
- 87 Enoksson M, Li J, Ivancic M M, et al. Identification of proteolytic cleavage sites by quantitative proteomics. *J Proteome Res*, 2007, 6: 2850—2858
- 88 Van Damme P, Martens L, Van Damme J, et al. Caspase-specific and nonspecific *in vivo* protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nat Methods*, 2005, 2: 771—777
- 89 Impens F, Van Damme P, Demol H, et al. Mechanistic insight into taxol-induced cell death. *Oncogene*, 2008, 27: 4580—4591
- 90 Bredemeyer A J, Lewis R M, Malone J P, et al. A proteomic approach for the discovery of protease substrates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 11785—11790
- 91 Adrain C, Murphy B M, Martin S J. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem*, 2005, 280: 4663—4673
- 92 Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 2004, 23: 2861—2874
- 93 Hegde R, Srinivasula S M, Zhang Z, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*, 2002, 277: 432—438
- 94 Vande Walle L, Van Damme P, Lamkanfi M, et al. Proteome-wide Identification of HtrA2/Omi Substrates. *J Proteome Res*, 2007, 6: 1006—1015