

蛋白质基因组学在肿瘤研究中的进展

黎啸啸,梁旭俊,陈主初,张鹏飞

(中南大学湘雅医院 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室,湖南 长沙 410008)

关键词:肿瘤;蛋白质基因组学;生物信息学
中图分类号:Q78;R73-3 文献标识码:C [中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2017,23(6):589-593,598]

近年来,随着高精度质谱技术、高通量检测技术以及深度基因测序技术的应用与发展,使得在多个水平同时进行组学分析成为可能^[1-3]。蛋白质基因组学(proteogenomics)是指在大规模的蛋白质及基因的水平上研究动态变化的蛋白质及翻译后修饰、组成与表达,并对基因转录过程中的表达或突变进行探究^[4],从而揭示蛋白质及基因间的相互作用。它是蛋白质组学、基因组学以及转录组学的联合^[5]。肿瘤是机体 DNA 损伤后被异常激活或基因重建出现 DNA 突变和修复缺陷的一种疾病,其产生与发展可能涉及到基因、转录、翻译及翻译后修饰等多个分子生物水平^[6]。近来蛋白质基因组学技术相继被应用到肿瘤研究的领域,形成了肿瘤蛋白质基因组学(onco-proteogenomics)^[7],即利用蛋白质基因组学技术研究肿瘤,分析患者的肿瘤细胞、组织的基因及蛋白质表达,通过与正常人的蛋白质基因组对比分析,筛选差异蛋白及突变基因。不仅可为癌症的预防、早期诊断、疾病监测寻找灵敏度高、特异性强的肿瘤标志物,并有助于选择肿瘤的治疗方法

1 蛋白质基因组学的发展

蛋白质基因组学是在基因组学与蛋白质组学的基础上发展而来,2004 年 Jaffe 第一次提出了蛋白质基因组学概念,并运用该技术以蛋白组数据改进基

因组注释和描述蛋白编码潜能的特征^[4]。自此,蛋白质基因组学技术迅速的改变了基因组学与蛋白质基因组学领域。肿瘤的发生、发展以及浸润迁移是一个可能涉及到单核苷酸变异、插入、缺失、基因融合、剪切点变异、翻译后修饰异常等多个水平的变异的生物学的过程^[6]。单一途径的组学分析很难覆盖完全。随着近年来质谱(MS)检测技术、高通量测序技术以及深度基因测序技术的改进,蛋白质基因组学技术得到了飞速发展。2010 年 Helmy 首次提出肿瘤蛋白质基因组学的概念^[7],并用鸟枪法蛋白质组学分析了人宫颈癌传代细胞(HeLa S3)。近年来,学者们开始用大规模癌症蛋白质基因组学测序技术来研究癌症基因组的复杂性和异质性^[2,10-11]。

2 蛋白质基因组学分析流程

蛋白质组学的分析方法主要有 3 种:从下到上途径(Bottom-up)、上到下途径(Top-down)以及中间途径(Middle-down)。而基于 MS 数据分析的肿瘤蛋白质基因组学技术大多采用 Bottom-up 途径^[12]。自下而上的蛋白质组学策略是将蛋白质消化成多肽,再通过串联 MS 法检测其质量和其片段的质量,然后与理论质量对比进行匹配。经 MS 验证后的多肽回帖到基因组,可以验证并修正翻译起始位点、剪切位点和非编码区域。蛋白质基因组学运用生物信息技术整合基因组学、转录组学和蛋白质组学数据,不仅在蛋白质水平验证基因的表达、精简基因模型,并能改进蛋白质序列数据库^[13]。大部分蛋白质基因组学流程包含以下几个主要步骤:①通过深度测序获得样本的 DNA 或转录组测序技术(RNA-seq)数据;②将获得的 DNA 或 RNA-seq 数据经六框翻译或三框翻译原则翻译成肽序列,建立制定的蛋白质数据库;③将实验获得的 MS/MS 数据在制定

基金项目:国家重点基础研究发展规划 973 计划,(2014CBA02000);国家自然科学基金(81372516);国家重大新药创制(2012ZX093030313);湖南省发改委科技基本建设项目投资计划资助(2013-1199 号)。
作者简介:黎啸啸,女,在读硕士研究生。
通信作者:张鹏飞,Email:zhangpf690421@csu.edu.cn

的蛋白质数据库中搜索;④寻找基因变异或者突变蛋白质,计算错误发现率(FDR)。

2.1 蛋白质组学测序数据

近年来高效液相色谱分离耦合串联质谱技术已经逐渐成为大规模研究蛋白质组学的常用方法,发展相对成熟,该技术又称为鸟枪法蛋白质组学^[4,7]。从肿瘤组织、肿瘤细胞或来自于周围体液中提取蛋白,大多采用酶消化法(如胰酶)获得对应的肽,然后串联高效质谱分析法来获取蛋白质组数据。在蛋白质基因组学中,鉴定蛋白质的关键步骤是匹配MS/MS谱、测定蛋白质序列数据^[14]。然而,肽谱比对往往依赖于已存在的蛋白数据库,对于未发现的新蛋白质鉴定十分有限。

2.2 基因组学与转录组学测序数据

传统的组学技术作为生物医学研究已经有十几年,需要全部基因或外显子测序,然后通过六码阅读框产生对应肿瘤特异性的肽数据库。然而,这需要庞大的计算量,且易增加错误发生率。蛋白质基因组学技术通过联合质谱测定的变异的肽,形成特异性的变异肽数据可有效的提高鉴定效率^[15]。近年来有研究报道深度基因测序的应用提高了蛋白的覆盖度、减少了偏倚、增加了精确性^[1,16-17]。

2.3 组学数据的整合及分析

既往对肿瘤相关的主要分子机制的研究主要集中在某个分子信号通道。然而,随着高通量测序与深度测序技术的发展,肿瘤的生物学涉及多水平、多个信号通道的特点变得越来越明显。Kreeger等^[18]指出肿瘤的发生、发展并不是单一的分子通道的异常,而是涉及多因素的一个十分复杂的过程。有多个分支通道形成相互作用形成一个分子机制网。组学技术近年来发展十分迅速,特别是即时聚合酶链锁反应(qRT-PCR)、蛋白免疫印迹(WB)、双向凝胶电泳是其检测常用的方法,但是上述方法需要特异性的抗体,可适用性范围窄^[19-20]。有研究者认为蛋白质基因组学是一种整合多维数据组的技术,可有效的覆盖不同的分子水平的信号通路的基因、肽、蛋白的变异以及蛋白的翻译后修饰的变化,可用来阐明单一分子通道模型不足以解释复杂的肿瘤生物系统^[1,3,18,21]。Sun等^[17]运用蛋白质基因组学技术分析流程,提高了Hela细胞基因的变异的预测的可信度。以MS为基础的蛋白质组学分析往往会低估蛋白质变异,因为标准的蛋白质数据库缺乏变异肽和翻译后修饰肽^[22]。多种蛋白的翻译后修饰在生物的过程中亦扮演着十分重要的角色,但因增加的

FDR导致翻译后修饰的肽类很难被检测。为克服上述技术的缺点、降低FDR,Cesnik采用源于RNAseq数据库和G-PTM搜索策略可有效的显示人体十种不同的细胞株的大量的变异氨基酸、新剪切肽段及翻译后修饰肽类^[16]。Halvy等^[23]报道了结肠癌中用转录组学数据库RNA-seq检测蛋白质变体的序列,表明相比较上皮转变成间叶组织的人结肠癌细胞系RKO(低分化),人结肠癌细胞系SW480更具有迁移和侵袭性。

2.4 错误发现率

蛋白质基因组学的关键在于控制FDR^[22]。FDR来自评分系统将MS/MS谱与蛋白质序列错误匹配。肽离子经化学修饰出现质量位移,与已知未修饰肽有质量差别,会被当成新肽,出现错误发现率。因此,需要将新肽与已知蛋白质及其经化学修饰后的蛋白质质量进行对比,避免出现FDR。Li等^[24]提倡先将MS数据在Uniprot等大型数据库中搜索,将未匹配的低质量光谱去掉后,再在可信度稍差的数据库中搜索,可以降低FDR。有学者也认为两步法搜索蛋白质数据库可以在降低FDR的同时避免假阴性率的升高^[25]。Woo等^[26]通过多步骤的FDR搜索控制策略,导致0.5%下降新的肽类99.9%的蛋白覆盖率。Nagaraj等^[27]采用一种新的分析软件PGTtools对MS结果进行分析,能够有效的降低FDR。

3 蛋白质基因组学的应用

在蛋白质基因组学策略中,将MS/MS谱搜索比对由基因组或转录组序列产生的含有预测新肽序列和变异序列定制的蛋白序列库从而鉴定新肽。传统的蛋白质组学和基因组学研究,是基于参考数据库中的数据,而这些数据来自一般人群,含有基因多态性和散发体细胞突变、突变蛋白质,所以个体癌变导致大量的体细胞突变的突变基因和突变蛋白质不存在于参考数据库中,如Ensembl,RefSeq或UniProtKB。整合蛋白质基因组学数据有助于注释基因、研究基因变异、显示蛋白的亚型、翻译后修饰、揭示翻译的起始区域、信号肽,筛选候选生物标志物及分析肿瘤免疫原性,而且能解决许多蛋白质组学与基因组学的交叉问题。

3.1 剪切位点

mRNA前体通过不同的剪接方式产生不同的mRNA剪接异构体,导致蛋白质组的多样性。蛋白

质基因组学不仅能验证剪切位点,并能发现可变剪切位点和剪切点变异。目前 Koch 等^[28]通过高通量检测受核糖体保护的 mRNA 片段的核糖体分析法确定人类结肠癌 HCT116 细胞系的可变剪切位点,并发现9种新蛋白质和突变蛋白质。亦有研究表明通过用 MS 法高通量检测标记 N 末端蛋白质片段,可用于确定可变剪切位点^[29-30]。还有研究者通过多步骤搜索制定的数据库,成功的鉴定结肠癌的97个新剪切位点以及11个可变剪切位点,并找到血红蛋白基因 HBA1 和 HBA2 的融合基因^[26]。Kim 等^[30]利用蛋白质基因组学技术对蛋白质数据库分析不匹配的峰进行了搜索,确定了包括66 947 剪接点、4 105 个蛋白 N 末端,并发现了140个假基因翻译物。有研究表明通过将 RNA 数据输入到 STAR 软件中分析,可获得可变剪切位点信息^[31]。

3.2 单核苷酸多态性

标准的蛋白质数据库不能利用基于液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)鸟枪法蛋白质组学的 MS/MS 数据鉴定出突变多肽,Zhang 等^[32]利用蛋白质基因组学方法,RNA-seq 数据建立制定的突变多肽数据库,分析95个结直肠癌样本,共鉴定多肽124 823 个,其中突变肽1 065 个,并鉴定出单核苷酸变异796 个,其中新发现162个单核苷酸变异,这些在 dbSNP、COSMIC、TCGA 数据库中都不存在。Lobas 等^[33]利用 SNPnexus 软件分析 HEK293 细胞外显子序列,获得1 336 个单核细胞多态性(SNP),联合 MS/MS 数据验证113 个 SNP 在蛋白质水平的表达。

3.3 翻译后修饰

与癌症分子信号通路相关的蛋白质出现翻译后修饰,如:磷酸化、乙酰化和糖基化等,会导致其功能发生改变,可能影响到癌症的进程。研究表明,黏蛋白的糖基化模型改变、CEA 相关的信号黏附分子、 $\alpha 1\beta$ 糖蛋白与胰腺癌相关^[34]。有报道,TP53 的多位点磷酸化、乙酰化、甲基化和泛素化与肿瘤的发生关系密切^[35-36]。基于 MS/MS 法目前尚不能鉴定磷酸化外翻译后修饰的蛋白质,其研究仍在早期阶段。Mertins 等^[10]利用4重 ITRAQ 试剂标记技术的蛋白质基因组学整合磷酸化蛋白质组数据,分析的乳腺癌组织样本共识别了62 679 个磷酸化位点,并鉴定 G 蛋白偶联受体群(不易在 mRNA 水平上鉴定出)的磷酸化蛋白质组,如扩增子相关的高度磷酸化激酶:CDK 激酶-12(CDK-12)、p21 小 GTP 酶活化激酶1(PAK1),蛋白络氨酸激酶2(PTK2),受体 TN-FRSF 结合丝氨酸苏氨酸激酶2(RIPK2)和丝氨酸/

苏氨酸激酶2(TLK2)。

3.4 突变蛋白

癌症组织出现大量基因变异,如拷贝数扩增、插入、缺失、杂合性缺失、框移突变等,蛋白质基因组学有助于研究从基因演绎到蛋白质到表型的过程,通过检测突变蛋白质从而在蛋白质水平验证基因的变异。Kim 等^[37]发现肺癌组织9号染色体产生的15种特异性蛋白质,搜索 COSMIC 癌症变体数据库,分别识别了正常组织/细胞和肺癌细胞株21种单核苷酸变异体和4种突变体。Woo 等^[26]整合 RNA-seq 数据和 MS/MS 数据,鉴定了524个新蛋白质。阿尔茨海默患者的 mRNA 建立的突变蛋白质数据库搜索导致免疫球蛋白轻链淀粉样变性的克隆突变蛋白质^[38]。

3.5 潜在生物标志物

目前癌症诊断仍然依赖于检测经典癌症生物标志物,如糖类抗原糖链抗原 CA-125、CA19-9、CA72-4 和癌胚抗原,联合做活组织组织病理检验。Huang 等^[39]研究了44例肝细胞肝癌和正常人类的尿液,认为尿液中 S100 钙结合蛋白 A9(S100A9)和颗粒体蛋白(GRN)可作为肝细胞性肝癌的潜在生物标志物,用于早期诊断疾病,其拷贝数扩增则提示预后差。Olsen 等^[40]认为2',5'-寡腺苷酸合成酶3(OAS3),骨髓基质细胞抗体2(BST2),分离蛋白1(SCRN1)和所有肿瘤抗原(TAs)等肿瘤抗原可作为浸润性导管癌的辅助诊断标志物。Jacob F 等^[41]利用蛋白质基因组学策略分析上皮性卵巢癌,发现人附睾蛋白4(HE4),骨桥蛋白(OPN),上皮细胞黏附分子(Ep-CAM)和间皮素可作为潜在生物标志物,血管内皮生长因子(VEGF),趋化因子受体4(104),表皮生长因子受体(EGFR),黏蛋白1(MUC1),封闭蛋白4(CLDN4)和 Stomatin 样蛋白(SLP)可作为治疗靶标。

3.6 分析肿瘤的免疫原性

肿瘤细胞在基因水平的突变、缺失、错义而导致细胞的表面相关抗原的变异,从而使得肿瘤细胞具有特异性的抗原决定簇。发现这些特异性的抗原,对肿瘤的早期诊断与制定新的治疗策略十分重要。Olsen 等^[40]利用蛋白质基因组学测定了32个浸润性导管乳腺癌的样本组织,结果发现了多种新的相关 TAs,结果显示信号传导子及转录激活子1(STAT1)、磷酸激酶1(PGK1)、骨髓基质细胞抗原2(BST2)在浸润性导管乳腺癌中明显增高,且发现 STAT1 与浸润性导管乳腺癌浸润能力的密切相关。尽管蛋白质

基因组技术的迅速发展,但蛋白质基因组学对于多个突变及 IgG 肽的鉴定仍然存在诸多挑战。Woo 等^[26,42]采用压缩的 RNAseq 联合 MS 的蛋白质基因组学技术去鉴定多个变异肽与其对应的基因。成功的显示了大范围的肿瘤免疫特征性描述以及揭示该法能够有效的提高了肿瘤亚型的分子特征的鉴定。Laumont 等^[43]运用蛋白质基因组学检测主要组织相容物-1 的相关肽 (MAPs),结果显示有 10% 的 MAPs 来源于非编码基因或外显子编码区外的转录基因。隐匿的 MAPs 在生物特性上与传统的 MAPs 不同,该种肽来自于非典型 C 端的短链蛋白,通过转录长 3' UTRs 不稳定元件编码。隐匿肽增加了主要组织相容物的表面簇基团的复杂性,提高了 CD8⁺ T 细胞的免疫监视功能。利用肿瘤蛋白质基因组学技术能够有效的鉴定异常的肿瘤抗原与主要组织相容性复合体-1 (MHC-1) 的变异靶点,为肿瘤的疫苗制备与寻找肿瘤的治疗靶点提供一种潜在的新研究方向^[44]。

4 总结与展望

近年来,蛋白质基因组学发展迅速的改变了基因组学与蛋白质组学领域,该技术有助于注释基因、研究基因的变异、显示蛋白的亚型、揭示翻译的起始区域、信号肽^[45-46],而且还能解决许多蛋白质组学与基因组学的交叉问题^[47-49]。随着基因测序技术与蛋白质组学技术的成熟,使得基因、转录、蛋白、代谢及生物信息学等组学技术能够互相整合应用成为必然趋势,肿瘤的发生、发展的机制探讨亦从单一的分子通道转向多个通道网的研究。蛋白质基因组学技术整合了多种基因组学技术进行联合应用分析,能够进行高通量、多维质量数据的分析从而使得肿瘤的机制的分析能够进行通道网络分析。肿瘤蛋白质组学技术能够有效的鉴定来自于突变蛋白、剪接变异体及融合蛋白的肽,其可作为肿瘤的潜在诊断或预后判断的分子标志物,也可作为潜在的治疗靶点。可预见性的,未来肿瘤蛋白质基因组学可应用于生物医药和生命科学等领域,在不久的将来还能够转向临床,蛋白质基因组学能够发现更多的敏感的分子标记物从而改善肿瘤诊断的精确性,提高对肿瘤预后的判断及检测肿瘤对治疗后的反应,更重要的是可选择个性的治疗方案。用该方法亦能有效的监测肿瘤的治疗效果、药物毒性及耐药性。更重要的是该方法能够被用与寻找新的肿瘤治疗靶

点,使得消除肿瘤的成为可能。

参考文献:

- [1] Brucher BL, Li Y, Schnabel P, et al. Genomics, microma, epigenetics, and proteomics for future diagnosis, treatment and monitoring response in upper gi cancers [J]. Clin Translational Med, 2016,5(1):13.
- [2] Subbannayya Y, Pinto SM, Gowda H, et al. Proteogenomics for understanding oncology: Recent advances and future prospects [J]. Exp Review Proteomics, 2016,13(3):297-308.
- [3] Yu KH, Snyder M. Omics profiling in precision oncology [J]. Molecular Cellular Proteomics, 2016,15(8):2525-2536.
- [4] Nesvizhskii AI. Proteogenomics: Concepts, applications and computational strategies [J]. Nature Methods, 2014,11(11):1114-1125.
- [5] Datta KK, Patil AH, Patel K, et al. Proteogenomics of candida tropicalis-an opportunistic pathogen with importance for global health [J]. OMICS, 2016,20(4):239-247.
- [6] Boja ES, Rodriguez H. Proteogenomic convergence for understanding cancer pathways and networks [J]. Clin Proteomics, 2014,11(1):22.
- [7] Alfaro JA, Sinha A, Kislinger T, et al. Onco-proteogenomics: Cancer proteomics joins forces with genomics [J]. Nature Method, 2014,11(11):1107-1113.
- [8] Locard-Paulet M, Pible O, Gonzalez de Peredo A, et al. Clinical implications of recent advances in proteogenomics [J]. Expert Review Proteomics, 2016,13(2):185-199.
- [9] Dimitrakopoulos L, Prassas I, Berns EM, et al. Variant peptide detection utilizing mass spectrometry: Laying the foundations for proteogenomic identification and validation [J]. Clin Chemistry Laboratory Medicine, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0947>.
- [10] Mertins P, Mani DR, Ruggles KV, et al. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer [J]. Nature, 2016,534(7605):55-62.
- [11] Ruggles KV, Tang Z, Wang X, et al. An analysis of the sensitivity of proteogenomic mapping of somatic mutations and novel splicing events in cancer [J]. Mol Cell Proteomics, 2015,15(3):1060-1071.
- [12] 巩鹏涛,方宣钧. 蛋白质组学与转化医学-用以癌症诊断、预后和疗效预测的分子生物标记物 [J]. 基因组学与应用生物学, 2014,33(6):1169-1180.
- [13] Ma C, Xu S, Liu G, et al. Improvement of peptide identification with considering the abundance of mrna and peptide [J]. BMC Bioinformatics, 2017,18(1):109.
- [14] Kang MG, Byun K, Kim JH, et al. Proteogenomics of the human hippocampus: The road ahead [J]. Biochimica Biophysica Acta, 2015,1854(7):788-797.
- [15] Krasnov GS, Dmitriev AA, Kudryavtseva AV, et al. Ppline: An automated pipeline for snp, sap, and splice variant detection in the context of proteogenomics [J]. J Proteome Research, 2015,14

- (9);3729–3737.
- [16] Cesnik AJ, Shortreed MR, Sheynkman GM, et al. Human proteomic variation revealed by combining rna-seq proteogenomics and global post-translational modification (g-ptm) search strategy[J]. J Proteome Research, 2016,15(3):800–808.
 - [17] Sun H, Chen C, Lian B, et al. Identification of hpv integration and gene mutation in hela cell line by integrated analysis of rna-seq and ms/ms data[J]. J Proteome Research, 2015,14(4):1678–1686.
 - [18] Kreeger PK LD. Cancer systems biology: A network modeling perspective. [J]. Carcinogenesis, 2010,31(1):2–8.
 - [19] Goh WW, Wong L. Networks in proteomics analysis of cancer [J]. Current Opinion Biotechnology, 2013,24(6):1122–1128.
 - [20] Semmes OJ, Conrads T. Focus on cancer proteomics[J]. Proteomics Clin Appl, 2013,7(5–6):315.
 - [21] Fiore LD, Rodriguez H, Shriver CD. Collaboration to accelerate proteogenomics cancer care: The department of veterans affairs, department of defense, and the national cancer institute's applied proteogenomics organizational and learning (apollo) network[J]. Clin Pharmacol Ther, 2017,101(5):619–621.
 - [22] McAfee A, Foster LJ. Proteogenomics: Recycling public data to improve genome annotations[J]. Methods Enzymology, 2017,58(5):217–243.
 - [23] Halvey PJ, Wang X, Wang J, et al. Proteogenomic analysis reveals unanticipated adaptations of colorectal tumor cells to deficiencies in DNA mismatch repair[J]. Cancer Research, 2014,74(1):387–397.
 - [24] Li Y, Wang X, Cho JH, et al. Jumpg: An integrative proteogenomics pipeline identifying unannotated proteins in human brain and cancer cells[J]. J Proteome Research, 2016, 15(7):2309–2320.
 - [25] Ryerson AB, Ehemann CR, Altekruse SF, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2012, featuring the increasing incidence of liver cancer[J]. Cancer, 2016,122(9):1312–1337.
 - [26] Woo S, Cha SW, Na S, et al. Proteogenomic strategies for identification of aberrant cancer peptides using large-scale next-generation sequencing data[J]. Proteomics, 2014,14(23–24):2719–2730.
 - [27] Nagaraj SH, Waddell N, Madugundu AK, et al. Pgtools: A software suite for proteogenomic data analysis and visualization[J]. J Proteome Research, 2015,14(5):2255–2266.
 - [28] Koch A, Gawron D, Steyaert S, et al. A proteogenomics approach integrating proteomics and ribosome profiling increases the efficiency of protein identification and enables the discovery of alternative translation start sites[J]. Proteomics, 2014,14(23–24):2688–2698.
 - [29] Lin C, Wu Z, Lin X, et al. Knockdown of flot1 impairs cell proliferation and tumorigenicity in breast cancer through upregulation of foxo3a[J]. Clinical Cancer Res, 2011,17(10):3089–3099.
 - [30] Kim MS, Pinto SM, Getnet D, et al. A draft map of the human proteome[J]. Nature, 2014,509(7502):575–581.
 - [31] Shukla HD, Mahmood J, Vujaskovic Z. Integrated proteo-genomic approach for early diagnosis and prognosis of cancer[J]. Cancer Letters, 2015,369(1):28–36.
 - [32] Zhang B, Wang J, Wang X, et al. Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer[J]. Nature, 2014,513(7518):382–387.
 - [33] Lobas AA, Karpov DS, Kopylov AT, et al. Exome-based proteogenomics of hek-293 human cell line: Coding genomic variants identified at the level of shotgun proteome[J]. Proteomics, 2016, 16(14):1980–1991.
 - [34] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. CA: A Cancer J Clin, 2017,67(1):7–30.
 - [35] Davis KL, Goyal RK, Able SL, et al. Real-world treatment patterns and costs in a us medicare population with metastatic squamous non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2015,87(2):176–185.
 - [36] Swanwick CC, Shapiro ME, Yi Z, et al. Nmda receptors interact with flotillin-1 and -2, lipid raft-associated proteins[J]. FEBS Lett, 2009,583(8):1226–1230.
 - [37] Kim YI, Lee J, Choi YJ, et al. Proteogenomic study beyond chromosome 9: New insight into expressed variant proteome and transcriptome in human lung adenocarcinoma tissues[J]. J Proteome Research, 2015,14(12):5007–5016.
 - [38] Santamaria A, Castellanos E, Gomez V, et al. PtoV1 enables the nuclear translocation and mitogenic activity of flotillin-1, a major protein of lipid rafts[J]. Molecular Cellular Biology, 2005,25(5):1900–1911.
 - [39] Huang CH, Kuo CJ, Liang SS, et al. Onco-proteogenomics identifies urinary s100a9 and grn as potential combinatorial biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. BBA Clin, 2015,3(2):205–213.
 - [40] Olsen L, Campos B, Winther O, et al. Tumor antigens as proteogenomic biomarkers in invasive ductal carcinomas[J]. BMC Med Genomics, 2014,7 (Suppl 3):S2.
 - [41] Jacob F, Goldstein DR, Fink D, et al. Proteogenomic studies in epithelial ovarian cancer: Established knowledge and future needs[J]. Biomarkers Med, 2009,3(6):743–756.
 - [42] Woo S, Cha SW, Bonissone S, et al. Advanced proteogenomic analysis reveals multiple peptide mutations and complex immunoglobulin peptides in colon cancer [J]. J Proteome Research, 2015,14(9):3555–3567.
 - [43] Laumont CM, Daouda T, Laverdure JP, et al. Global proteogenomic analysis of human mhc class i-associated peptides derived from non-canonical reading frames[J]. Nature Communications, 2016,7(10238):1–12.
 - [44] Mitchell CJ, Getnet D, Kim MS, et al. A multi-omic analysis of human naive cd4+ t cells[J]. BMC Systems Biology, 2015,9(6):75–84.
 - [45] Kwon SM, Cho H, Choi JH, et al. Perspectives of integrative cancer genomics in next generation sequencing era[J]. Genomics Informatics, 2012,10(2):69–73.

(下转第598页)