

particularly on high molecular weight proteins as visualized on 2-DE gels. Finally, LMPC method was checked by LC-MS/MS to assure correct layers isolation. 22 and 38 proteins were identified from in-solution digested preatherosclerotic coronary intima

and media extracts, respectively. Although some proteins are common between layers, due to similar cell types present; differential proteins are specific of contractile phenotype of VSMCs in the media and proliferative in the intima.

Identificación de péptidos específicos de cáncer colorrectal mediante el uso de librerías de fagos T7 impresas en microarrays

Ingrid Babel¹, Rodrigo Barderas¹, Victor Moreno², Ivan Cristobo¹, Gabriel Capellá², Ignacio Casal¹

¹ Laboratorio de proteómica funcional. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) Madrid. ² Instituto Catalán de Oncología (ICO) Barcelona

El cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer con mayor mortalidad en España por su tardía diagnosis. Actualmente, la herramienta de clasificación del CCR (clasificación de Dukes) se basa en observaciones histopatológicas como pueden ser la invasión de la capa muscular intestinal, los nódulos linfáticos adyacentes o la progresión metastática. Aunque se han realizado diversos estudios genómicos usando microarrays de DNA no se ha conseguido obtener una mejor clasificación [1-2]. La identificación de proteínas que puedan revelar diferencias en los estadios de diferenciación neoplásica sería muy importante para el conocimiento de la enfermedad, un mejor diagnóstico del CCR y para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. Aunque se han identificado muchas proteínas como diferencialmente expresadas en CCR utilizando diferentes técnicas proteómicas [3] hasta ahora se han descrito muy pocas como marcadores eficientes de CCR.

Los autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes con cáncer son biomarcadores indicativos de la enfermedad porque las proteínas modificadas antes o durante la formación del tumor pueden inducir una respuesta inmune una vez liberadas [4-6]. Así, la caracterización de la respuesta inmune en pacientes con cáncer constituye una nueva alternativa para la identificación de biomarcadores específicos de CCR, útiles para su diagnosis temprana

En este estudio, hemos usado una estrategia proteómica alternativa a los microarrays de proteínas recombinantes basada en el uso de microarrays de

fagos para identificar autoanticuerpos asociados a CCR. Se construyeron cuatro librerías de fagos que contenían cDNA de tejido de pacientes con CCR, que fueron cribadas con sueros de pacientes con CCR para identificar aquellos péptidos desplegados en la superficie de los fagos reconocidos por autoanticuerpos específicos de CCR. Se imprimieron un total de 1536 fagos T7 en soportes de nitrocelulosa y tras su cribado con 15 sueros normales y 15 tumorales se identificaron 128 fagos inmunogénicos que diferenciaban entre pacientes con CCR e individuos sanos. El punto de corte del False Discovery Rate se ajustó a 0.22. De los fagos que mostraron mayor reactividad en pacientes que en sueros control, únicamente 55 fagos presentaron una secuencia única.

La inmunoreactividad se verificó mediante ELISA utilizando 5 fagos elegidos por su homología con una proteína conocida. Dichos 5 Fagos contenían secuencias homólogas a MST1, SLC33A1, SREBF2, SULF1 y GTF2i. MST1 se describió como una proteína reactiva a autoanticuerpos de pacientes con CCR en nuestro estudio previo realizado con microarrays de proteínas humanas [7]. Por otra parte, en un análisis de expresión diferencial de genes SULF1 se observó sobreexpresada en CCR [8]. Mediante ensayo de ELISA utilizando una colección de 96 sueros, 50 de pacientes con cáncer colorrectal y 46 de individuos sanos, se obtuvieron curvas de ROC (Receiver Operating Characteristic) con áreas debajo de la curva entre 0.57 y 0.63. Sin embargo, su poder discriminatorio aumentó hasta una especificidad y sensibilidad de 78.6% y 66%,

respectivamente, con un área debajo de la curva de 0.81 tras realizar diferentes combinaciones de marcadores. Además, el uso de la proteína completa MST1 aumentaba la especificidad hasta un 82.6% (área debajo de la curva de 0.86). Un estudio de competición entre MST1 y el fago correspondiente preincubando el suero con la proteína recombinante redujo la unión de las IgG al fago MST1 hasta un 40%, indicando que el péptido desplegado en la superficie del fago es un epítipo inmunodominante de la proteína completa. Por otra parte, mediante western blot se determinó que la presencia de autoanticuerpos correlacionaba con una mayor expresión de las proteínas en líneas celulares de cáncer de colon y de muestras tumorales.

En resumen, en este trabajo hemos verificado un panel de péptidos desplegados en fagos que responden a autoanticuerpos de pacientes con CCR y que poseen capacidad diagnóstica de la enfermedad. Finalmente, se han encontrado las mismas proteínas reactivas a autoanticuerpos en diversas estrategias proteómicas lo que confirma la conveniencia del despliegue de péptidos en Fagos T7 para la identificación de biomarcadores útiles en clínica para diagnóstico y tratamiento de cáncer colorrectal.

Agradecimientos

Rodrigo Barderas, PhD, tiene un contrato postdoctoral de perfeccionamiento del FIS. Este trabajo se ha realizado gracias al Programa de Biotecnología del Ministerio de Educación y Ciencia BIO2006-07689.

Referencias

- [1] Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, Frederiksen CM, Laiho P, Aaltonen LA, Laurberg S, Sørensen FB, Hagemann R, ØRntoft TF. Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 4352-63.
- [2] Zou TT, Selaru FM, Xu Y, Shustova V, Yin J, Mori Y, Shibata D, Sato F, Wang S, Oлару A, Deacu E, Liu TC, Abraham JM, Meltzer SJ. Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon. *Oncogene* 2002; 21: 4855-62.
- [3] Barderas R, Babel I and Casal J.I Colorectal cancer proteomics, molecular characterization and biomarker discovery. *Proteomics Clin. App* 2009; 4: 1-20.
- [4] Anderson KS, LaBaer J. The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. *J Proteome Res* 2005; 4: 1123-33.
- [5] Chapman C, Murray A, Chakrabarti J, Thorpe A, Woolston C, Sahin U, Barnes A, Robertson J. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Ann Oncol.* 2007; 18: 868-73.
- [6] Soussi T p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer Res* 2000; 60: 1777-88.
- [7] Babel I, Barderas R, Díaz-Uriarte R, Martínez-Torrecedrera JL, Sánchez-Carbayo M, Casal JI. Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8: 2382-95.
- [8] Madoz-Gúrpide J, López-Serra P, Martínez-Torrecedrera JL, Sánchez L, Lombardía L, Casal JI Proteomics-based validation of genomic data: applications in colorectal cancer diagnosis. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1471-83.