ARTIGO ORIGINAL

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTÍDEOS LIGANTES A PROTEÍNAS DO SORO DE MULHERES COM CÂNCER DE MAMA POR *PHAGE DISPLAY*

Dra. Cristina Soares de Sousa [1]
Dr. Carlos Ueira Vieira [2]
Dr. Rone Cardoso [3]
Caxias Arlen Graciano de Souza [4]
Dra. Ana Maria Bonetti [5]
Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho [6]

RESUMO

No Brasil, o câncer de mama é a patologia maligna mais frequente na população feminina e tem o seu quadro agravado pelo fato do diagnóstico ser estabelecido, na maioria das vezes, em fase tardia da doença. Nesse trabalho foi utilizada a técnica de *Phage Display* para isolar peptídeos ligantes às proteínas do soro de mulheres com câncer de mama para obtenção de biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico sorológico dessa patologia. Para seleção dos peptídeos foi realizado um *bioppaning* subtrativo utilizando uma biblioteca de peptídeos *Ph.D.-12* expressa na superfície do fago filamentoso M13. A biblioteca de fagos foi colocada, primeiramente, em contato com soro de mulheres clinicamente sadias, depois em contato com soro de mulheres com doenças benignas de mama, e por último, em contato com soro de mulheres com câncerde mama, para que os fagos ligantes a proteínas do soro de mulheres sem a patologia ou com doença benigna fossem eliminados. O DNA dos fagos selecionados foi sequenciado e as sequências analisadas por bioinformática. As técnicas ELISA e *dot-blotting* foram utilizadas para confirmar o sucesso da seleção. Todos os clones analisados apresentaram Razão do Índice ELISA maior do que um e alto grau de informação. A sequência IETYESTHQSPP foi a mais frequente e apresentou alta reatividade nas análises de *dot-blotting* com IgGs do soro de pacientes com câncer de mama. Os clones T03, T18 e T09 apresentaram similaridade com a Ubiquitina e os clones T06, T19, T04, T10, T11, T14, T17 com motivos Zinc Finger. O fato de diferentes clones apresentarem similaridade para um mesmo tipo de proteína sugere que diferentes motivos de uma mesma proteína podem ser epítopos reconhecidos por autoanticorpos ou que esses motivos estejam interagindo com proteínas associadas ao câncer de mama, visto que o *bioppaning* foi feito com soro total.
Palavras-chave: Câncer de mama, *Phage Display*

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent malignant pathology in the Brazilian women population, which is aggravated by diagnosis in later stages of the disease. The aim of this investigation was to select and identify ligand peptides to serum proteins of women with breast cancer through phage display in order to usethem as serological biomarkers. Selection of phages was performed in three steps using a random peptide library of 12 residues (*Ph.D.-12*). The first two selection steps consisted of a pre clearing using the phage libraries against sera proteins of healthy individuals, followed by a second selection against sera proteins of patients with benign breast diseases. After subtraction, the library was submittedto a

1-Professora no Centro Universitário Mário Palmério
2-Professor na Universidade Federal de Uberlândia
3-Professor na Universidade Federal de Uberlândia
4-Professor no Centro Universitário Mário Palmério
5-Professora na Universidade Federal de Uberlândia

positive selection against sera of patients with breast cancer. Phage ligands were selected, amplified, and the DNA was sequenced and translated. Peptide sequences were subimtted bioinformatic analyses and to ELISA and *dot-blotting* assays to confirm selection success. All clones presented significant ELISA indexes and a high information content. The sequence IETYESTHQSPP was the most frequent and presented a high reactivity against IgG from breast cancer patients´ in the *dot-blotting* analysis. Clones T03, T18 and T09 presented similaritywith the ubiquitin and clones T06, T19, T04, T10, T11, T14, T17 with zinc finger motifs. The fact of different clones to present similarity for the same type of protein suggests that different motifs of one same protein can be epitopes recognized by auto-antibodies or that these motifs are interacting with proteins associated to breast cancer, since biopanning was made with total serum.
Keywords: Breast cancer, Phage Display

INTRODUÇÃO

Vários fatores impedem o diagnóstico precoce do câncer de mama. Entre eles pode-se citar: a baixa aderência aos programas, a baixa resolução da mamografia, a falta de acesso aos postos de saúde. Por tratar-se de doença com alto poder de metastização, um número significativo de pacientes morre antes dos cinco anos, após o tratamento primário. Sua história natural e prognóstico variame tumores muito pequenos (milimétricos) podem apresentar alto potencial metastático (1).

Terapias tradicionais no tratamento do câncer consistem de drogas quimioterápicas que podem com sucesso erradicar o tumor mas, também, são tóxicas às células sadias (2).

O conhecimento a respeito da estrutura, perfil de expressão e imunogenicidade de antígenos específicos do câncer são importantes para o desenvolvimento de novos diagnósticos e terapias (3).

Embora existam muitas evidências de anticorpos naturais contra cânceres (4), antígenos tumorais são, geralmente, imunogenicamente fracos por causa da tolerância sistêmica e a resposta imune contra antígenos tumorais falha em alcançar altos títulos de anticorpos (5).

As respostas imunes dos linfócitos B e T contra proteínas derivadas de tumor foram identificadas em muitos pacientes com câncer, porém tais respostas, na grande maioria, são insuficientes para curá-lo. Um desafio no tratamento do câncer é aumentar a resposta imune anti-tumor, o que talvez seja possível através da descoberta de novos antígenos tumorais com potencial imunogênico mais elevado (6).

A descoberta da resposta imune humoral contra antígenos associados a tumores que são reconhecidos como “estranhos” pelo sistema imune pode fornecer ambos, diagnóstico e informação de prognóstico (7).

A tecnologia de *Phage Display* tem sido utilizada na pesquisa e tem contribuição significante na caracterização das interações antígeno-anticorpo. Tem se mostrado eficiente para mapeamento de epítopos (8) e identificação de peptídeos miméticos que funcionam como imunogênicos miméticos de epítopos dos antígenos (9), podendo ser usados como vacina, para diagnóstico e/ou prognóstico da doença (10).

Esse trabalho teve como objetivo selecionar peptídeos ligantes específicos a proteínas do soro de mulheres com câncer de mama, que possam ser usados, no futuro como biomarcadores moleculares dessa patologia.

MATERIAL E MÉTODOS

1.0-Material biológico

O estudo foi realizado com mulheres que recorreram ao Serviço de Mastologia da Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte, Minas Gerais, no período de janeiro de 2005 a julho de 2006 e ao Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

As mulheres que recorreram ao hospital para realização de exames de rotina, cirurgia de mama ou ginecológica e que realizaram mamografia foram solicitadas a participar do estudo como voluntárias. As mulheres com diagnóstico de câncer de mama, idade entre 32 e 73 anos, compuseram o grupo "casos" – CAN (Tabela 1). As neoplasias malígnas da mama foram classificadas de acordo com a sexta edição do Sistema TNM (Classificação de tumores malignos), da American Joint Comittee on Câncer. As mulheres com idade entre 20 e 62 anos que, após a cirurgia, não apresentaram diagnóstico de câncer de mama mas sim fibroadenoma, hiperplasia ductal atípica, papiloma, cisto mamário, necrose adiposa, ectasia ductal, mastite, fibrose estromal e adenose esclerosante constituíram o grupo de "doença benigna da mama" – DBM. As mulheres com idade entre 31 e 55 anos que recorreram ao hospital para a realização de examesde rotina e para a realização de cirurgias ginecológicas e que posteriormente tiveram mamografia normal com Cat I e Cat II, classificação segundo BIRADS, fizeram parte do grupo "controle" – COM.

Foram utilizadas amostras de soro de 50 pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo graus I, II e III soro de 50 pacientes diagnosticadas como sadias e soro de 50 pacientes diagnosticadas como tendo doença benigna de mama.

As pacientes assinaram Termo de Consentimento e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (Processo nº 0013/2000).

TABELA 1- Parâmetros clínicos e laboratoriais das pacientes que doaram sangue para realização do *biopanning*. Os laudos anátomo-patológicos foram realizados na Maternidade Odete Valadares e no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Resultado Anatomo-patológico	Receptor de Estrógeno	Grau Histopatológico	Estadio	TNM
Carcinoma Ductal Invasivo (50)	+ (32)	1 (18)	I (4)	pT2pN1aMO (2)
				pT2pN2aMO (2)
			IIA (8)	pT1cpNOMO (3)
				pT2pN1aMO (3)
				pT2pNxMO (2)
			IIIA (2)	pT2pN2aMO (2)
			IIB (4)	PTpN1aMO (4)
		2 (9)	I (3)	pT2pNOMO (3)
			IIA (3)	pT2pNOMO (3)
			IIIA (3)	pT1cpNOMO (3)
		3 (5)	IIIA (5)	pT2pNxMO (5)
	- (18)	1 (8)	I (4)	pT1cpN1MO (4)
			IIA (4)	pT2pNOMO (4)
		2 (8)	IIB (6)	pT2pN1aMO (2)
				pT1cpNOMO (2)
				pT1cpN1MO (2)
			IIIC (2)	pT2pNOMO (2)
		3 (2)	IIA (2)	pT2pNOMO (2)

Os números apresentados dentro dos parênteses representam o número de pacientes que estão incluídas dentro de cada classificação.

2.0-*Biopanning*

Para selecionar fagos ligantes a proteínas do soro de pacientes com câncer de mama, foi utilizada uma biblioteca comercial de peptídeos randômicos apresentados em fago M-13, *Ph.D.-12* (complexidade: 2,7 x 10^9 transformantes), fusionados a proteína pIII (5 cópias por partícula de fago) da New England BioLabs, Schwalbach, Alemanha.

Para a seleção de peptídeos ligantes foi utilizada uma placa de microtitulação (NUNC maxisorp ^{rt} Nalge Nunc International Co., Rochester, NY, USA), na qual três poços foram sensibilizados com 20 µl de soro de mulheres sadias, três poços sensibilizados com 20 µl de soro de mulheres com doença benigna de mama e um poço, com soro de mulheres com

carcinoma ductal infiltrante.

A placa foi agitada em câmara úmida overnight a 4º C e o excesso de proteínas, que não se ligaram, foi descartado. Ao final da sensibilização, a placa foi bloqueada com Tampão (0,1M $NaHCO_3$ pH 8,6; 5mg/mL BSA e NaN_3 0,02%) por 1 hora a 4º C. Após o bloqueio a placa foi lavada por seis vezes em TBS contendo 0.1% de TWEEN 20 (TBST). As proteínas do soro de mulheres sadias, presentes no 1° poço foram incubadas com 2 x 10^{10} partículas de fagos da biblioteca e incubado por uma hora à temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao 2° poço que, também, continha proteínas do soro de mulheres sadias e, novamente, incubado por 1 hora. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e adicionado ao poço contendo soro de mulheres com doenças benignas da mama, sendo incubado por 1 h à temperatura ambiente. Este passo foi repetido mais uma vez. Os fagos não ligantes foram removidos lavando 10 vezes com TBS-Tween 0,1% no primeiro *round* e 0,5% nos seguintes e eluidos com 50 mM de Tampão Glicina pH 2,0. Os fagos recuperados foram amplificados em *Escherichia coli* ER2738. A seleção foi repetida mais duas vezes utilizando-se o eluato anterior ao *round* em questão, como representante da biblioteca de fagos.

3.0-Titulação

Para determinar o número de entrada e saída das partículas virais durante os ciclos do "*Biopanning*", a solução de fagos a ser titulada foi submetida a diluições seriais de 10 vezes em meio LB. Para eluatos não amplificados foram utilizadas as diluições de 10^{-1} até 10^{-4}; para soluções com fagos amplificados, a faixa de diluição utilizada foi de 10^{-8} a 10^{-11}. Cada diluição foi acrescida de 200mL da cultura de ER2738 na fase *mid-log* (OD_{600} ~0,5). A mistura foi agitada brevemente e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. As células, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de AgaroseTop a 45ºC e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/X-Gal e tetraciclina. Para cada diluição foi preparada uma placa.

As placas foram incubadas à 37ºC, durante 16 horas. Após, foram contadas as colônias das placas que apresentavam aproximadamente 100 colônias. O título dos fagos foi obtido pela multiplicação do número de colônias pelo fator de diluição empregado.

4.0- Amplificação dos fagos

Para a amplificação, uma colônia de ER2738 foi inoculada em 20mL de meio LB e incubada sob agitação a 37ºC por 14 horas. Em seguida, 1mL dessa cultura foi diluído em 120mL de meio LB (autoclavado e com tetraciclina-1µl /1mL) distribuindo 1 mL em cada

poço da placa *Deepwell*.

Com palitos de dente esterilizados, 96 colônias azuis (bactérias infectadas com fagos) foram retiradas da placa de *Petri* (3º ciclo não-amplificado) e cada colônia foi transferida para1 poço da placa *Deepwell* contendo cultura diluída. A placa foi vedada com adesivo próprio e incubada, por 5 horas sob agitação, a 37ºC. Para estoque, foram retirados 100µl de cada poço e transferidos para uma placa de microtitulação *Corning Incorporated Costar*® 3591 e adicionados 100 µl de glicerol 50%. Após incubação, a placa foi centrifugada por 20 minutos a 3700 rpm, transferindo o sobrenadante para uma outra *Deepwell* estéril. Foi adicionado 1/6 do volume em PEG/NaCl e incubado por mais 14 horas a 4ºC. A placa foi, então, centrifugada por 1 hora a 3700 rpm e todo o sobrenadante dispensado, secando a placa sobre papel-toalha (trocado várias vezes para evitar contaminação cruzada) e o precipitado foi resuspendido em 200µl de PBS 1X(Tampão Fosfato Salina).

5.0-Extração de DNA do fago

Para a extração do DNA dos fagos, colônias isoladas de uma placa oriundado 3º ciclo de *Biopanning* foram transferidas para poços de 2mL em placas de cultura tipo *Deepwell*, contendo 1mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* (OD_{600} ~ 0,3). A cada poço foi adicionada apenas uma colônia de bactéria infectada com fago.

A placa foi vedada com adesivo próprio e incubada a 37ºC, por 24 horas, sob agitação (250 rpm). Para isolar os fagos das bactérias, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20ºC, durante 10 minutos. 800mL do sobrenadante da centrifugação foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350mL de PEG/NaCl. Após incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20ºC, durante 40 minutos, para precipitação dos fagos. O sobrenadante foi descartado e 100mL de Tampão Iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTAe 4M de NaI) foram adicionados ao precipitado de fagos.

A placa foi agitada vigorosamente e, em seguida, 250mL de Etanol absoluto foram acrescentados. Após incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente, a placa foi centrifugada (3700 rpm, 20ºC, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O precipitado de fagos foi lavado com 500mL de Etanol 70% e recentrifugado. O precipitado remanescente foi diluído em 20mL de água Milli-Q.A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela separação eletroforética em gel de Agarose 1% corado com solução de Brometo de Etídeo.

6.0-Sequenciamento do DNA e dedução de aminoácidos

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 500ng de DNA molde, 5pmol do

primer -96 gIII (5'-^{OH} CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em Termociclador de placas (MasterCycler - Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (a 95ºC por 20 segundos); anelamento do *primer* (a 58ºC por 15 segundos) e extensão (a 60ºC por 1minuto). O DNA sequenciado foi precipitado com 1mL de acetato de amônio 7,5M e etanol, homogeneizando a placa com leve agitação. Foram acrescentados 27,5 mL de etanol absoluto e a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 4000 rpm e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 150mL de etanol 70% ao DNA precipitado e a placa centrifugada por 10 minutos, a 4000 rpm. A solução de etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800 rpm, durante um segundo. A placa foi coberta com um papel alumínio, permanecendo por cinco minutos a temperatura ambiente, para evaporar o Etanol. Os precipitados resultantes foram ressuspendidos no tampão de diluição (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit. –Amersham Biosciences).

A leitura do sequenciamento foi realizada em sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no laboratório de Genética Molecular (UFU) .

7.0-ELISA

Uma placa de alta afinidade (Costar-Corning 3590, NY, USA) foi sensibilizada com 20µL de soro de mulheres com câncer de mama, uma placa sensibilizada com soro de mulheres que apresentam doença benigna de mama e outra com soro de mulheres clinicamente sadias, diluídos em Tampão Bicarbonato 0,006M pH 9,6, durante 16 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas durante 1 hora, utilizando leite desnatado 5% (Molico). A seguir as placas foram lavadas por 3 X com PBST e incubadas por 1 hora a 37°C com 1x 10^{11} fagos selecionados por poço. Posteriormente, as placas foram lavadas em PBS-T 6x e incubadas por 2 horas a 37°C com anti-M13 (SIGMA) conjugado com peroxidase, diluído em Tampão Bloqueio, na concentração de 1:5000. Após incubação, as placas foram novamente lavadas por 6X em PBS-T e a reação ocorreu pela adição de Tampão Citrato-Fosfato 0,1M pH 5,0 suplementado com H_2O_2 0,03% e orto-fenilenodiamina (OPD) a 1 $mg.mL^{-1}$. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2 N e a OD obtida em Leitor de Placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492 nm.

Foi calculado o valor *cut off* para cada amostra (cut-off= média Helper + 3X desvio padrão). O índice ELISA foi calculado considerando-se OD/ cut-off. Em seguida, foi calculada a razão do índice ELISA tumor/controle. Valores acima de 1 foram considerados positivos.

8.0- Bioinformática

A tradução da sequência de aminoácidos obtidas no sequenciamento se deu pelo programa DNA2PRO12. Este programa é designado para tradução de sequências. De insertos tanto de bibliotecas da New England Biolabs (Ph.D.-12^{TM} or Ph.D.-7^{TM}) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as sequências inicial e final do vetor. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na sequência do inserto (tais como códons inesperados ou erros na sequência próxima) (http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx).

O alinhamento dos peptídeos com proteínas humanas foi feito utilizando os programas *Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov) e *immunepitope* (www.immunepitope.org) e o cálculo da frequência de aminoácidos dentro da população de peptídeos foi realizado utilizando o programa AAFREQ (http://relic.bio.anl.gov/aafreq.aspx).

O programa CLUSTAL W foi utilizado para análise do pareamento entre os peptídeos recombinantes selecionados e o cálculo da freqüência e da medida de informação de cada um dos peptídeos dentro da biblioteca original foi feita pelo programa INFO (http://relic.bio.anl.gov/info.aspx).

9-0-*Dot Immunoblotting* com IgG

Para a identificação dos clones imunorreativos foi utilizado o método de *Dot Immunoblotting*, no qual 2µL dos clones a 10^{11} pfu (unidade formadora de colônias), foram plotados em membranas de Nitrocelulose (uma membrana para cada grupo de estudo) (Hybond ECL – GE Healthcare) com poros de 0,22 µm. Após a plotagem dos clones, foi adicionada a solução de bloqueio TBSTM (TBST,0,05% de Tween 20 com 5% de leite desnatado) por 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com TBST e incubadas com os respectivos soros (de mulheres sadias, com doença benigna e com câncer de mama) diluídos em TBSTM por 1 hora, à temperatura ambiente e lavadas três vezes. A detecção da ligação dos anticorpos aos peptídeos imobilizados em nitrocelulose pôde ser verificada pela subsequente incubação das membranas com o anticorpo anti-IgG complexado com a enzima fosfatase alcalina e revelação com o substrato NBT/BCIP. Como controle negativo utilizou-se o fago Helper, que não apresenta nenhum peptídeo conjugado.

RESULTADOS

1.0-*Biopanning*

Nesse trabalho foi realizado o *biopanning* subtrativo para selecionar fagos ligantes em soro de paciente com câncer de mama. Em cada ciclo de seleção o eluato e o amplificado foram titulados (Tabela 2).

TABELA 2: Títulos (em *pfu*: unidade formadora de colônias) obtido nos três ciclos de seleção

Ciclos de seleção	Entrada	Saída
1º	$1{,}5 \times 10^{11}$	$6{,}9 \times 10^{3}$
2º	$1{,}13 \times 10^{11}$	$7{,}5 \times 10^{2}$
3º	$4{,}4 \times 10^{11}$	$3{,}1 \times 10^{3}$

2.0-Extração de DNA do fago

Após três ciclos de seleção, os clones foram tomados aleatoriamente para análise das interações fago-proteína, extração de DNA (Figura 1) e identificação dos peptídeos expressos na superfície do fago, por sequenciamento.

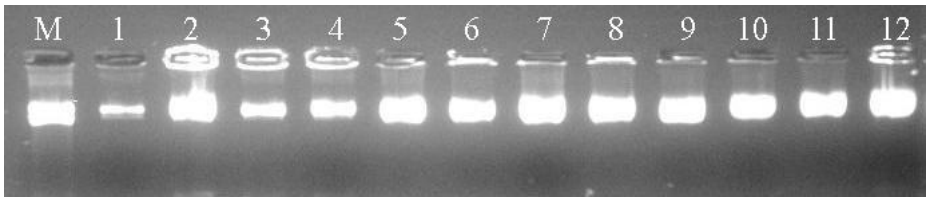


Figura 1: Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, contendo amostras da extração de DNA do fago M13. **M**: DNA de fago M13 padrão contendo 400ng de DNA (Pharmacia). **1-12**: Amostras aleatórias do DNA de fago M13 selecionados no *Biopanning*.

3.0-Análise dos dados por bioinformática

A tabela 3 apresenta parâmetros importantes para indicação do sucesso de seleção de cada peptídeo, conforme (11). São eles: sequências de aminoácidos obtidas, frequência dos peptídeos selecionados, frequência esperada desses peptídeos na biblioteca original, amplificação dos peptídeos decorrentes do processo de seleção em relação à frequência esperada dos peptídeos da biblioteca original, o grau de informação de cada peptídeo e o número provável declones independentes dentro da biblioteca.

Tabela 3**:** Sequência de aminoácidos, respectivos clones, freqüência observada, frequência esperada, amplificação dos peptídeos e grau de informação.

Clone	Peptídeo	Frequência Observada (FO) %	Probabilidade da Frequência Randômica* (FE)	Amplificação (FO/FE)	I(m)**	λ***
T01	SSWRRTGSPLSA	3,33	$6,8x10^{-16}$	$4,8x10^{15}$	34,9	0,0000013
T02	ANLYNMKRVVWN	3,33	$4,0x10^{-13}$	$7,9x10^{11}$	26,2	0,0083
T03	YLGTNPSLPPVL	3,33	$5,0x10^{-15}$	$6,6x10^{16}$	32,9	0,0000099
T04	HWEQRPQWPYQN	3,33	$3,4x10^{-14}$	$9,6x10^{13}$		0,00006
T05	FMKPNLVRNEAV	3,33	$3,0x10^{-13}$	$1,0x10^{13}$	28,8	0,0006
T06	WHWNSYLYSIDQ	3,33	$1,3x10^{-16}$	$2,4x10^{14}$	31,9	0,000002
T07	QNKLWDTPSNPW	6,66	$8,3x10^{-14}$	$3,9x10^{6}$	30,1	0,00016
T08	ATHHPSMTHGRD	3,33	$4,1x10^{-14}$	$7,9x10^{13}$	30,8	0,00008
T09	HSTALYQPLLRS	3,33	$4,9x10^{-16}$	$6,7x10^{15}$	35,2	0,0000009
T10	EALLSSSPLCCH	3,33	$8,7x10^{-14}$	$3,8x10^{13}$	30,1	0,0001
T11	SNPSMRNLLAPL	3,33	$3,7x10^{-17}$	$8,8x10^{16}$	37,8	0,00000007
T12	QNFSMSQSLRSL	3,33	$1,8x10^{-13}$	$1,7x10^{13}$	29,3	0,0003
T13	SLYEISTYSFNH	3,33	$1,4x10^{-14}$	$2,2x10^{12}$	31,8	0,00002
T14	IETYESTHQSPP	23,33	$4,5x10^{-19}$	$5,1x10^{19}$	42,2	0,00000000009
T15	SATMYNSHQLPT	3,33	$9,4x10^{-17}$	$2,4x10^{17}$	36,9	0,0000001
T16	TQWPLNSLSNLP	3,33	$3,4x10^{-19}$	$9,7x10^{18}$	42,5	0,0000000006
T17	LVPWPSNQNTTV	3,33	$1,1x10^{-17}$	$2,7x10^{10}$		0,00000002
T18	LVPCPSNQNTTV	3,33	$1,6x10^{-18}$	$2,0x10^{18}$		0,000000003
T19	SYSNPVRAHHLV	3,33	$2,3x10^{-12}$	$1,4x10^{12}$	26,8	0,004
T20	HLHNITARSPAH	3,33	$1,8x10^{-16}$	$1,7x10^{16}$	32,6	0,000003
T21	HNTFLLSSLTWT	3,33	$4,4x10^{-16}$	$7,4x10^{15}$	35,4	0,000000008
T22	SYASEDNNAWRT	3,33	$1,8x10^{-13}$	$1,8x10^{13}$	29,3	0,00036
T23	SYASDDNNAWRT	3,33	$1,4x10^{-13}$	$2,2x10^{13}$	29,6	0,0002
T24	SHWWSSLYSFGY	3,33	$8,4x10^{-13}$	$3,9x10^{12}$	27,8	0,001

*Probabilidade de seqüência randômica = freqüência esperada na biblioteca (FE) **I(m) = grau de informação = -In (probalidade de seqüência randômica) *** λ = numero provável de clones independentes na biblioteca = complexidade x FE, onde complexidade da biblioteca ($2,7 \times 10^9$ - Ph.D.- 12).

Após a tradução das sequências de DNA pelo programa DNA2PRO12, o cálculo da frequência de cada aminoácido nos peptídeos sequenciados foi realizado pelo programa AAFREQ. Os aminoácidos mais frequentes foram:

Serina, Leucina, Prolina e Asparagina (Tabela 4), sugerindo que esses aminoácidos estão envolvidos na maioria das interações peptídeo-proteína.

TABELA 4-Frequência dos aminoácidos dos clones seqüenciados. Em azul estão representados os aminoácidos mais freqüentes.

Aa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Total	Frequência
A (Alanina)	2	2	1	1	0	0	1	1	2	2	2	1	15	0,0521
C (Cisteína)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	3	0,0104
D (Aspartato)	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	1	5	0,0174
E (Glutamato)	1	1	1	1	2	0	0	0	0	1	0	1	8	0,0278
F (Fenilanina)	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0,0139
G (Glicina)	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0,0104
H (Histidina)	5	1	2	2	0	0	0	2	2	1	0	3	18	0,0625
I (isoleucina)	1	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	4	0,0139
K (Lisina)	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0,0104
L (Leucina)	2	4	2	2	3	2	1	4	6	3	2	3	34	0,1181
M (Metionina)	0	1	0	1	2	1	1	0	0	0	0	0	6	0,0208
N(Asparagina)	0	5	0	3	3	2	4	1	3	2	2	2	27	0,0938
P (Prolina)	0	1	3	3	5	2	0	3	3	2	4	2	28	0,0972
Q (Glutamina)	2	1	0	1	0	0	3	2	2	0	1	1	13	0,0451
R (Arginina)	0	0	0	1	3	1	2	4	0	1	3	0	15	0,0521
S (Serina)	6	2	2	3	2	7	5	3	5	2	2	1	40	0,1389
T (Treonina)	1	1	4	1	0	3	3	1	0	3	2	4	23	0,0799
V (Valina)	0	2	0	0	0	2	1	0	1	1	1	4	12	0,0417
W (Triptofano)	1	1	4	1	1	0	0	1	0	1	2	1	13	0,0451
Y (Tirosina)	2	2	1	2	1	2	0	2	0	1	1	0	14	0,0486
Consenso	**S**	**N**	**T**	**N/P/S**	**P**	**S**	**S**	**L/R**	**L**	**L/T**	**P**	**T/V**	**288**	

O programa CLUSTAL W (18.1) foi utilizado para identificação de sequências consenso entre os peptídeos selecionados. Como pode ser observado na Figura 2 não foi encontrado nenhum motivo dominante.

Os prováveis alvos biológicos que apresentaram identidade com os peptídeos selecionados foram determinados pelo programa BLAST, utilizando a procura por similaridade pelo sistema “short nearly peptides” e estão relacionados na Tabela 5.

A

```
T01      --SSWRR-TGSPLSA-- 12
T11      SNPSMRN-LLAPL---- 12
T09      -HSTA---LYQPLLRS- 12
T21      -HNTF---LLSSLTWT- 12
T03      ----YLG-TNPSLPPVL 12
T14      -IETYES-THQSSP--- 12
T13      --SLYEI-STYSFNH-- 12
T20      --HLHNI-TARSPAH-- 12
T22      ---SYAS-EDNNAWRT- 12
T23      ---SYAS-DDNNAWRT- 12
T17      -LVPWPS-NQNTTV--- 12
T18      -LVPCPS-NQNTTV--- 12
T10      --EAL-L-SSSPLCCH- 12
T19      ---SYSN-PVRAHHLV- 12
T07      QNKLWDT-PSNPW---- 12
T12      --QNFS--MSQSLRSL- 12
T16      --TQWPL-NSLSNLP-- 12
T04      ---HWEQRPQWPYQN-- 12
T08      -ATHHPS-MTHGRD--- 12
T06      --WHWNS-YLYSIDQ-- 12
T15      SATMYNS-HQLPT---- 12
T02      -ANLYN--MKRVVWN-- 12
T05      --FMKPN-LVRNEAV—12
```

B

```
T01      --SSWRR-TGSPLSA-- 12
T11      SNPSMRN-LLAPL---- 12
T09      -HSTA---LYQPLLRS- 12
T21      -HNTF---LLSSLTWT- 12
T03      ----YLG-TNPSLPPVL 12
T14      -IETYES-THQSSP--- 12
T13      --SLYEI-STYSFNH-- 12
T20      --HLHNI-TARSPAH-- 12
T22      ---SYAS-EDNNAWRT- 12
T23      ---SYAS-DDNNAWRT- 12
T17      -LVPWPS-NQNTTV     12
T18      -LVPCPS-NQNTTV     12
T10      --EAL-L-SSSPLCCH- 12
T19      ---SYSN-PVRAHHLV- 12
T07      QNKLWDT-PSNPW---- 12
T12      --QNFS--MSQSLRSL- 12
T16      --TQWPL-NSLSNLP-- 12
T04      ---HWEQRPQWPYQN-- 12
T08      -ATHHPS-MTHGRD--- 12
T06      --WHWNS-YLYSIDQ-- 12
T15      SATMYNS-HQLPT---- 12
T02      -ANLYN--MKRVVWN-- 12
T05      --FMKPN-LVRNEAV—12
```

Figura 2: Alinhamento dos peptídeos selecionados por Clustal W. **A:** vermelho: aminoácidos hidrofóbicos, incluindo aromáticos; azul: ácidos; rosa: básicos; verde: Hidroxila + Amina + Basico.**B:** Motivos em comum entre os clones selecionados.

Tabela 5- Análise da similaridade dos peptídeos selecionados com proteínas humanas.

CLONE	PEPTÍDEO	MOTIVOS PROVÁVEIS	PROVÁVEIS PROTEÍNAS	NÚMERO DE ACESSO	IDENTIDADE %
T10	EALLSSSPLCCH	AALLTSQPHSPL EALLPSSPTLGA NLALLSSLGCCH	-pregnancy-associated plasma protein-E -BRF1 protein - zinc finger protein 547	|CAC11134.1| |AAH86856.1| |EAW72498.1|	41,67 58,33 50,00
T13	SLYEISTYSFNH	SGFAFSTYSFNW GLYPGTTYSFTI HLKGDPHYSFNH	-circulating B cell antibody heavy chain variable region - Receptor-type tyrosine-protein phosphatase - forkhead box A1	|ABF83280.1| |P28827| |NP_004487.2|	58,33 50,00 50,00
T01	SSWRRTGSPLSA	GSGRPTGSPLSA SSWRRSRSPYSP EALRRTGSPLAA	- tumor endothelial marker 6 -Cell division cycle 2-like protein kinase 5 - melanoma differentiation associated protein-5	|AAL11993.1| |Q14004| |AAG34368.1|	75,00 66,67 66,67
T02	ANLYNMKRVVWN	EDERFEGRVVWN ETAPAVQRVVWN ETAPAVQRVVWN	- SCN1B protein - protein kinase C binding protein 1 - CTCL tumor antigen se14-3	|AAH21266.2| |CAI21840.1| |AAG34905.1|	41,67 41,67 41,67

T11	SNPSMRNLLAPL	SNSTRSLLSPL PNLRNFNMMAPL CGKSLRNLLSPK	- similar to zinc finger protein - coiled-coil domain containing 34 -ankyrin-like protein 1	|EAW68287.1| |NP_015628.2| |XP_001130086.1|	50,00 50,00 41,67
T08	ATHHPSMTHGRD	DTHHPGLSHSYM, STHHPITTYPPY GTHHPALTPAPH HVPHPSMTSQSS	-GATA-3 -jumonji domain-containing 1 C splice variant - forkhead box	|CAA38877.1| |ABK64187.1| |NP_005240.3|	41,67 41,67 41,67
T15	SATMYNSHQLPT	LRKRYNSHQMGQ, SHQMGQSKQFPL SSTMYNPIIYCC QSSMHNSHLPTA, SRTNYQSFHFNK	- F-box protein - Tachykinin receptor 1, 2 e 3 - neuromedin U receptor 2	|NP_995308.1| |AAH96842.1| NP_064552.2|	41,67 41,67 33,33
T17	LVPWPSNQNTTV	LLPWPQHQNANG QTQWPSNQDYDS CGPWPSHQLLTN	- cadherin-4 - zinc fingers and homeoboxes 3 - THO complex 5	|AAA35627.1| |NP_055850.1| |NP_003669.4|	50,00 41,67 50,00
T06	WHWNSYLYSIDQ	KVWNSYLQKSGE PVWKSYLYQLQQ AEKNSYLYSTEI	-coiled-coil containing 121 -chimerin -Zinc Finger protein 783	NP_078860.2| |NP_001813.1| |NP_001004302.1	41,67 50,00 50,00

T22	SYASEDNNAWRT	DYDSEDDNDWRP TGKDNLLNAWRT IYSSEDKNAQRH	- PHD finger protein 14 - transducin-like enhancer protein - hGCMa	|O94880| |AAA61193.1| |BAA13651.1|	58,33 41,67 58,33
T16	TQWPLNSLSNLPT	TPRPLISLSASS DPWPLNPLSIQQ DPWPLNPLSIQQ	-seven transmembrane helix receptor - AF171066_1 CYP1B1 - cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	|BAC05810.1| |AAG43404.1| |NP_000095.1|	50,00 50,00 50,00
T19	SYSNPVRAHHLV	SYSNPVEYELLW GFSPSPVAHHLV ALKNHVRAHHRP	- melanoma antigen family E, - semaphorin 5B isoform 1 - zinc finger protein 646	|NP_619648.1| |NP_001026872.2 |EAW52171.1	58,33 50,00 50,00
T04	HWEQRPQWPYQN	HWDQLPQYQLN R GSEQRPKWFHPL SDDRRPQWRRED	- caspase - ADAM -Zinc Finger 106	|CAI40546.1| |BAD93081.1| |NP_071918.1	41,67 41,67 33,33
T09	HSTALYQPLLRS	ASALYGQPLLLS AQSLPSQPLLRS VKSTQYQSLLRS	- Ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene) - MECT1/MAML2 fusion -bullous pemphigoid antigen	|AAI25132.1| |AAK93833.1| |CAI16610.1|	50,00 50,00 50,00

T20	HLHNITARSPAH	RTKNITAKNPAK HLRNIAARNIVN PRTWPTARSPAW	- SUHW4_HUMAN Suppressor of hairy wing homolog 4 - p63 - seven transmembrane helix receptor	|Q6N043| |CAA67507.1| |BAC06129.1|	50,00 50,00 50,00
T21	HNTFLLSSLTWT	YDLRLLSSLTGS LHYFLLVSFTWM ISVLLLSGLTWQ	- Insulin-like growth factor 2 receptor variant -G protein-coupled receptor - interleukin-2	|BAD92905.1| |AAW78659.1| |AAA59142.1|	50,00 50,00 50,00
T18	LVPCPSNQNTTV	GVPCPSAQPNHC LVPCPQTFQEND SEPCPSNYKYVS	- ubiquitin specific protease - interleukin 1, - EHMT1 protein	|XP_950671.2| |EAW73606.1| |AAH11608.2|	50,00 41,67 41,67
T12	QNFSMSQSLRSL	KIEGMTQSLRGL GIDSMSQSLALA KIEGMTQSLRGL	- AH antigen - DEAD box protein - mitosin	|AAA86889.1| |CAC14786.1| |AAA82935.1|	50,00 50,00 50,00
T03	YLGTNPSLPPVL	KLGTQPSLPHVR DLLTDPSLPPQV AGGANPALAPVL	- ubiquitin specific protease - cyclic nucleotide phosphodiesterase -PI-3-kinase-related kinase SMG-1	|NP_055832.3| |CAA64774.1| |AAK00511.1|	66,67 58,33 58,33

T07	QNKLWDTPSNPW	SLTGWSTPSNPL PDTLWQCPSSPW PDFLWDVPSNWT	- KIR antigen 3DL2 - M130 antigen cytoplasmic variant 2 - fatty acid synthase	|AAS73161.1 |CAA80543.1| |NP_004095.4|	50,00 50,00 50,00
T14	IETYESTHQSPP	SKHSLSTHQSPT DNTRESTHQSED NLETESSHQSVC	- similar to Six transmembrane epithelial antigen of prostate - ARHGAP5 protein -zinc finger, CCHC domain containing 11	|EAL24267.1| |AAH50059.1| |CAI23477.1|	50,00 58,33 41,67
T05	FMKPNLVRNEAV	CIKPNKVRNETK DDKKRLVRKEAV CIKPNKVRNETK	-growth factor receptor-bound protein 10 - MMS19-like (MET18 homolog, S. cerevisiae), isoform CRA_e - KIAA0207	|EAL23897.1| |EAW49925.1| |BAA13198.2|	58,33 58,33 58,33
T23	SYASDDNNAWRT	SCCSDGNIAVWD, TGKDNLLNAWRT GAQIDDNNPRRT RYDSDDDLAWNI	- transducin-like enhancer ofsplit 3 (E(sp1) - collapsin response mediatorprotein 1 - transmembrane 7 superfamily member 1	|EAW77848.1| |EAW82403.1| |BAD97352.1|	41,67 50,00 50,00

As proteínas expostas na tabela na cor azul são antígenos já identificados por outros autores para câncer de mama

4.0-ELISA

O teste ELISA foi realizado para analisar a reatividade dos fagos às proteínas do soro de paciente com câncer de mama (Figura 3) e foram considerados significativos os valores com razão do índice ELISA maior do que um.

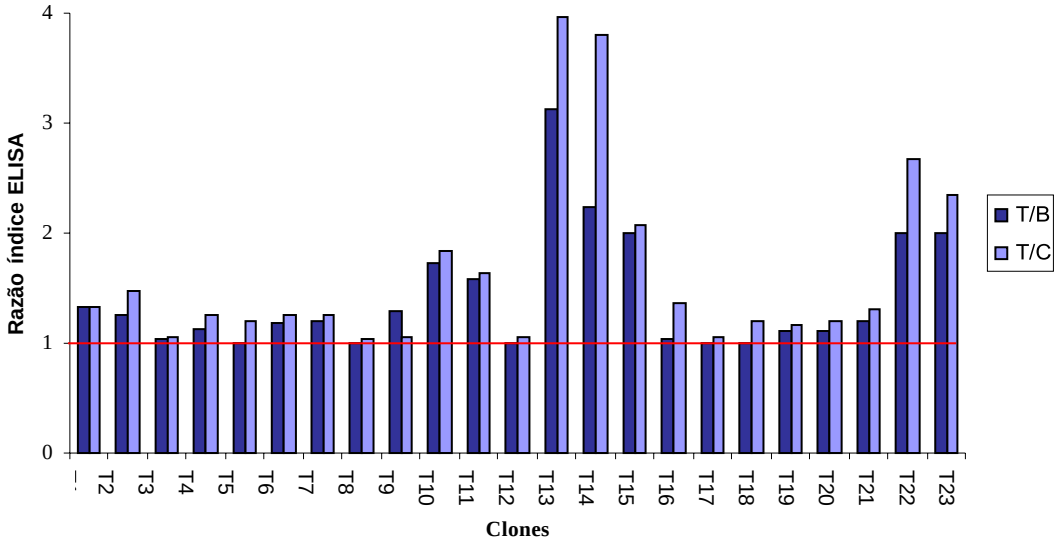


Figura 3: Gráfico representativo da Razão do Índice ELISA mostrando a reatividade dos clones de fagos capturados por anticorpo anti-M13 contra soro total de mulheres com câncer de mama, com doenças benignas de mama e mulheres clinicamente sadias. T/B: Razão do índice ELISA Tumor/Benigno, T/C: Razão do índice ELISA Tumor/Controle.

A imunorreatividade dos peptídeos aos 3 grupos de IgG foi estimada calculando-se as densidades óticas (DO) relativas obtidas no *dot-blotting*, como mostra o gráfico apresentado na Figura 4. Constatou-se que 17 clones selecionados no *panning* foram mais reativos para câncer de mama.

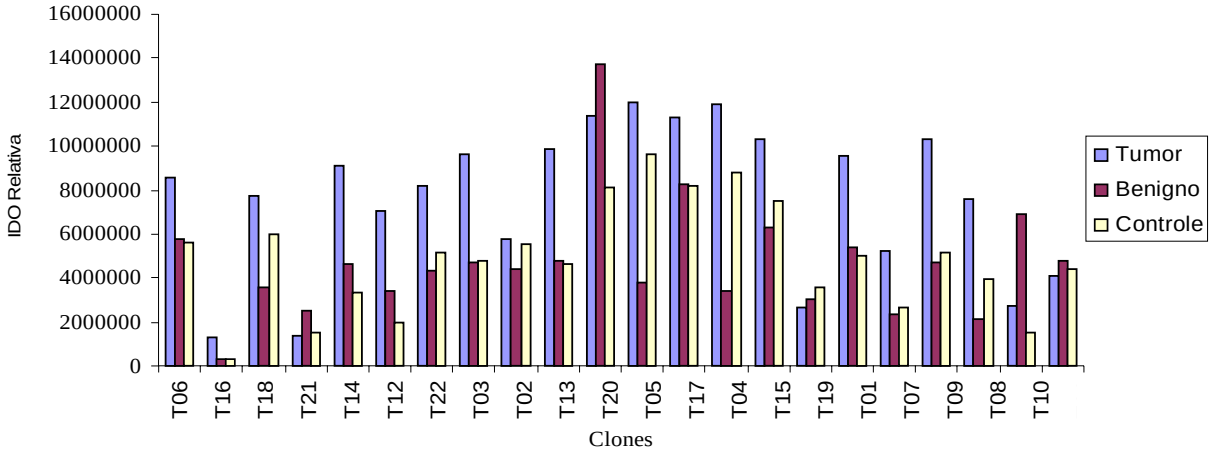


Figura 4: Gráfico representativo das densidades óticas relativas obtidas para cada um dos clones recombinantes e para o fago Helper nos ensaios de *Dot-Blotting* com IgGs de pacientes com Câncer de mama (Tumor), Benigno e Controle sadio.

DISCUSSÃO

Inovações em métodos imunológicos para identificação de genes têm levado à descoberta de um grande repertório de antígenos reconhecidos pelo sistema imune celular e humoral (3). Dentre essas inovações encontra-se a tecnologia de *Phage Display*, que é uma técnica eficiente para o mapeamento de epítopos, podendo ser utilizada no isolamento de peptídeos que podem ser empregados como vacinas e/ou para diagnóstico de doenças.

Nesse trabalho foi utilizada a técnica de *Phage Display* para identificar peptídeos ligantes a proteínas do soro de pacientes com câncer de mama. No teste ELISA, os 30 clones selecionados no *biopanning* do soro de mulheres com câncer de mama apresentaram razão do índice ELISA maior do que 1 e elevado grau de informação de cada peptídeo, demonstrando a eficiência do *biopanning* subtrativo utilizado.

Quando esses clones foram testados em relação ao reconhecimento pelas IgGs, pôde-se observar que IgG dos três grupos analisados (câncer, doenças benignas e mulheres sadias) reconheceram esses peptídeos, porém, alguns deles foram capazes de detectar diferença na expressão entre os grupos, sugerindo que algumas IgGs são mais expressas no soro de pacientes com câncer de mama. O *biopanning* foi feito em soro total, logo os peptídeos podem ser reconhecidos por IgG, como provado nos testes de *dot-blotting* e também podem interagir com outras proteínas do soro. Parte do resultado desse ensaio pode ser consequência de reatividade cruzada entre as IgGs e as proteínas do capsídeo viral e por isso, outros testes são necessários para otimização dessas reações, possibilitando o uso desses peptídeos como marcadores séricos tumorais.

Foi relatado, pela primeira vez, o uso de um peptídeo isolado por *Phage Display* em câncer de mama correlacionado com a sobrevida do paciente. Peptídeos ligantes específicos a IgG de pacientes com câncer de mama foram selecionados utilizando 3 bibliotecas de peptídeos (15, 12 e 7 aminoácidos). De 6 pacientes que apresentaram forte imunorreatividade para o peptídeo SQRIPARIHHFPTSI, 3 continuam vivos e os três falecidos apresentaram maior tempo de sobrevida em relação aos pacientes que não apresentaram imunoreatividade para o peptídeo ligante (12).

O clone T14 é um forte candidato a marcador sérico tumoral. Apesar de apresentar baixo número provável de clone independente na biblioteca, esse clone foi o que apresenta maior frequência entre os peptídeos selecionados no *biopanning* (23,33 %) e elevado grau de informação, descartando a possibilidade de ter sido selecionado ao acaso. Os resultados do teste ELISA mostram que o clone T14 apresentou alta reatividade com soro de pacientes com câncer de mama. Nas análises de *dot-blotting*, onde foi analisada a

reatividade dos peptídeos com IgGs, o clone T14, também, mostrou elevada imunoreatividade.

Análises de bioinformática do clone T14 revelaram que ele apresenta similaridade com proteínas diferencialmente expressas em tumores. As três proteínas apresentadas na tabela com similaridade ao clone T14 apresentam o motivo HQS, sugerindo ser esse, um motivo de ligação entre as proteínas do soro e o peptídeo. Entre as proteínas com similaridade a esse peptídeo, a STEAP, uma proteína transmembrana, já foi descrita como diferencialmente expressa em câncer de próstata e outros carcinomas (13). A falta de expressão dessa proteína em tecido sadio, exceto para próstata, que apresenta um nível muito baixo,sugere que essa proteína é um alvo ideal para imunoterapia. A proteína ARHGAP5 que, também, teve similaridade com o clone T14, não está totalmente caracterizada, porém, sabe-se que em câncer de mama ocorre duplicação gênica e altos níveis de expressão do mRNA dessa proteína (14).

Nas análises de similaridade dos clones T02, T12, T13, T17, T08, T16 e T21 foram encontrados motivos dentro de cada clone que, provavelmente, representam a região de interação entre os peptídeos e proteínas do soro (tabela 4).

Os peptídeos T03, T17 e T18 tiveram similaridade com proteínas que também foram encontradas num experimento onde a técnica SEREX foi utilizada para identificar antígenos associados ao câncer de mama (15) (Tabela 4), reforçando a possibilidade de utilização dos peptídeos selecionados nesse trabalho como marcadores tumorais e na imunoterapia.

A caracterização estrutural de antígenos tumorais em humanos por anticorpos auto-imunes tem fornecido evidências substanciais do reconhecimento do câncer pelo sistema imune e tem levado à identificação de alvos atrativos em técnicas baseadas em vacinas como terapia do câncer (18).

Apesar dos peptídeos expressos pelos fagos selecionados no *bioppaning* serem muito pequenos para afirmar sua identidade, o fato de diferentes clones apresentarem similaridade para um mesmo tipo de proteína, sugere que diferentes motivos de uma mesma proteína podem ser epítopos reconhecidos por autoanticorpos ou que esses motivos estejam interagindo com proteínas associadas ao câncer de mama, visto que o *bioppaning* foi feito com soro total.

Os clones T03, T18 e T09 apresentaram similaridade com a Ubiquitina, que é responsável pela sinalização de proteínas que deverão ser degradadas pelo proteasoma. Alterações nesse processo pode acarretar o desenvolvimento de câncer (16).

Os clones T06, T19, T04, T10, T11, T14, T17 apresentam similaridade com motivos Zinc Finger que estão relacionados a regulação da transcrição do DNA. Atualmente esses

motivos têm sido utlilizados em pesquisas para redução do tumor (17).

Mais experimentos serão desenvolvidos para comprovar a especificidade da ligação dos peptídeos selecionados à proteínas do soro de mulheres com câncer de mama e posteriormente estes serão utilizados em experimentos com cobaias para que sua função seja definida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kesari AL, Chellam VG, Nair PP,– p53 tumor suppressor protein and tissue proliferative fraction in infiltrating duct carcinoma. J Surg Oncol *65*:159-63, 1997

2. Daniels TR, Delgado T, Helguera G et al., The transferring receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells 121:144-158, 2006

3. Scalan MJ, Gout I, Williamson B, et al: Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. Cancer Immunity 1:4, 2001

4. Lake DF, Huynh WC, Hers EM. Natural and induced human antibody response to cancer. Cancer Invest 18: 480-489, 2000

5. Coronella-Wood JA, Hersh EM. Naturally occurring B-cell responses to breast cancer . Cancer Immunol immunother 169: 2701-2711, 2003

6. Blanca A, Laura ME, Stephen T et al: A novel method to identify and characterise peptide mimotopes of heat shock protein 70-associated antigens. J Immune Based Ther Vaccines 4: 40-49, 2006

7. Mintz PJ, Kim J, Do KA: Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. Nat Biotechnol 21: 57-63, 2003

8. Bentley L, Fehrsen J, Jordan F et al: identification of antigenic regions on VP2of African horsesickness virus serotype 3 by using phage-displayed epitope libraries. J Gen Virol 81: 993-1000, 2000

9. Grabowska AM, Jennings R, Laing P et al: immunisation with phage- displaying peptides representing single epitopes of the glyprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2. Virology 269: 47-53, 2000

10. Kouzmitcheva GA, Petrenko VA, Smith GP: identifying diagnostic peptides for lyme disease through epitope discovery. Clin Diagn Lab immunol 8:150-160, 2001

11. Rodi DJ, Sores AS, Makouski L: Quantitative assessment of peptide sequencediversity in M13 combinatorial peptide Phage Display Libraries. J Mol Biol 322: 1039-1052, 2002

12. Hansen MH, Ostenstad B, Sioud M: Antigen-specific IgG antibodies in stages IV

long-time survival breast cancer patients. Molecular Medicine 7: 230-239, 2001

13. Rodeberg DA, Nuss RA, Elsawa SF: Recognition of Six-TransmembraneEpithelial Antigen of the Prostate “ExpressingTumor Cells by Peptide Antigen Induced Cytotoxic T Lymphocytes.” Clin Cancer Res 1: 4545-4552, 2005

14. Katoh M, Katoh M: *FNBP2* gene on human chromosome 1q32.1 encodes ARHGAP family protein with FCH, FBH, RhoGAP and SH3 domains. Int J MolMed 11: 791-797, 2003

15. Qian F, Odunsi K, Blatt LM et al: Tumor associated recognition by autologous seum in patients with breast cancer. Mol Cell Proteomics 15: 137-144, 2005

16. Boon T, OLD LJ: Cancer turmor antigens. Curr Opin Immunol 9: 681-3,1997

17. Ohta T, Fukuda M: Ubiquitin and breast cancer. Nature 23: 2079-2088,2004

18. Wang LH, Yang XY, Zhang X: Supressor of breast cancer by chemical modulation of vulnerable zinc fingers in estrogen receptor. Nat Med 10: 40-47, 2004