

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 1504/2004

(22) Anmeldetag: 08.09.2004

(45) Veröffentlicht am: 15.06.2010

(51) Int. Cl.⁸: **G01N 33/68** (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56)

FOUNTOULAKIS M ET AL., J CHROMATOGR
A. 1038(1-2) (2004):
247-65

VERCOUTTER-EDOUART AS ET AL., EXP
CELL RES. 262(1)
(2001):59-68

HONDERMARCK H ET AL., PROTEOMICS
1(10) (2001): 1216-32

PUCCI-MINAFRA ET AL., PROTEOMICS 2(7)
(2002):919-27

PUCCI-MINAFRA ET AL., ANN N Y ACAD SCI.
963 (2002):
122-39

SHIN BK ET AL., J BIOL CHEM 278(9)
(2003):7607-16

YOKOTA S ET AL., CELL STRESS
CHAPERONES 6(4) (2001):
345-50

KIM KK ET AL., J KOREAN MED SCI. 13(4)
(1998):383-8

(73) Patentinhaber:

RED BULL GMBH
A-5330 FUSCHL AM SEE (AT)

(72) Erfinder:

LUBEC BARBARA DR.
WIEN (AT)

(54) **CHAPERONE ALS TUMORMARKER**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur differentiellen Diagnose von Tumoren, wobei mindestens acht Proteine mindestens einer Protein-Familie ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus der Hitzeschock-Protein-90-Familie, der Hitzeschock-Protein-70-Familie, der TCP-I/cpn60-Chaperonin-Familie, der DnaJ-Familie und der Thioredoxin-Familie, und/oder mindestens ein Protein ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29, Prefoldin-Untereinheit 2, Prefoldin-Untereinheit 3, Aktivator des 90 kDa-Hitzeschock-Protein-ATPase-Homologs 1, molekularem Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie, Mitochondrien-GrpE-Protein-Homolog 1 und HSPC015 als Marker-Protein verwendet wird.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostizierung eines Tumors in einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe.

[0002] Chaperone (CH) und Hitzeschock-Proteine (HSPs) spielen in der Tumor-Biologie eine wichtige Rolle und stehen noch immer im Mittelpunkt des Interesses. Die Hitzeschock-Antwort wurde im Jahre 1962 von Ritossa [1] entdeckt, der berichtete, dass eine höhere Temperatur bei den Polyethylen-Chromosomen der Speicheldrüse von *Drosophila busckii* zum Auftreten eines neuen Aufblähungsmusters führte. Seit damals zeigten die Bemühungen zahlreicher Forscher, dass die Hitzeschock-Antwort ubiquitär und hoch konserviert ist - bei allen Organismen, von Bakterien bis zu Pflanzen und Tieren - als essentieller Verteidigungsmechanismus zum Schutze der Zellen gegen eine Vielfalt schädlicher Bedingungen, einschließlich Temperaturanstieg oder Hitzeschock, Verringerung des pH-Werts, Übersalzung, Alkohole, Schwermetalle, oxidativen Stress, Inhibitoren des Energie-Metabolismus, Fieber oder Entzündung [2, 3]. Dieses breite Spektrum von Funktionen führte zum Ausdruck 'molekularer Chaperon' und zur Entität, die wirkt, um die 'Faltung und Reifung' anderer Proteine in der Zelle zu unterstützen. Es sind jedoch nicht alle HSPs CH, und nicht alle CH sind HSPs [4].

[0003] Genetische Untersuchungen zeigten, dass die meisten HSPs lebensnotwendig sind. Man nimmt an, dass sie bei der Konformations-Reifung einer entstehenden Polypeptid-Kette in prokaryontischen und eukaryontischen Zellen eine unverzichtbare Rolle spielen. HSPs sind traditioneller Weise nach dem Molekulargewicht in fünf Hauptfamilien gruppiert. Sie wurden als HSP90 (Hitzeschock-Protein mit apparentem Molekulargewicht 90 kDa), HSP70 (70-kDa HSPs), HSP60 (60-kDa HSPs), HSP40 oder DnaJ (40-kDa HSPs) und kleine Hitzeschock-Proteine (small heat shock proteins, sHSPs) bezeichnet [5, 6, 7].

[0004] Die Verbindung von HSPs mit der Tumor-Immunität wurde in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts [8, 9, 10] entdeckt. Es wurde festgestellt, dass strukturell unveränderte HSPs, die aus Tumorzellen gereinigt werden, Tiere immunisieren konnten, um eine Tumor-spezifische Immunität zu erzeugen, wogegen entsprechende Präparate aus normalen Geweben dies nicht bewirkten. Viele interessante Beobachtungen wurden in jüngster Zeit im Hinblick auf die Fähigkeit der CHs, die Tumor-Biologie zu regulieren, gemacht. Man weiß, dass HSP70 und andere CHs Determinanten für den Zelltod und Zelltransformationsprozesse sind. Die erhöhte Expression von HSP70 und HSP90 in Tumorzellen wurde in mehreren Fällen nachgewiesen [11, 12]. Kürzlich wurde erkannt, dass HSPs die Apoptose regulieren. HSP27 und HSP70 wirken anti-apoptotisch, wogegen HSP60 und HSP10 proapoptotisch wirken. Die Fähigkeit der HSPs, Zellen vor belastenden Stimuli zu schützen, lässt den Schluss zu, dass diese Proteine eine Rolle bei der Tumorgenität („tumorigenicity“) spielen, mit der Tatsache, dass es sich zeigte, dass Zellen oder Gewebe aus verschiedenen Tumoren ungewöhnlich große Mengen eines oder mehrerer HSPs exprimieren. Versuchsmodelle bestätigten die Rolle der HSPs in der Tumorgenese, da es sich zeigte, dass HSP27 und HSP70 das Tumor-bildende Potential von Nager-Zellen bei syngenetischen Wirten erhöhen [13, 14].

[0005] Der Beitrag der HSPs zur Tumorgenese kann auf ihre pleiotropen Aktivitäten als molekulare Chaperone zurückzuführen sein, die den Krebszellen die Möglichkeit bieten, Protein-Aktivitäten, insbesondere Komponenten des Zellzyklus-Mechanismus, Kinasen und andere Proteine, die bei der Weiterentwicklung des Tumors impliziert sind, zu verändern. Die HSP70-Chaperon-Aktivität beeinflusst möglicherweise auch die Tumorgenese, indem sie die Aktivität von Proteinen, die am Zellzyklus-Mechanismus beteiligt sind, reguliert [15].

[0006] Klinisch gesehen wurde bei einer Reihe von Krebsarten, wie Leukämie, Brustkrebs und Gebärmutter-schleimhaut-Krebs eine erhöhte Menge an HSP27 im Vergleich zu der bei nicht-transformierten Zellen vorhandenen Menge nachgewiesen [16]. Außerdem wurde eine gesteigerte Expression von HSP70 auch bei hochgradig malignen Tumoren, wie Brustkrebs und Gebärmutter-schleimhaut-Krebs, Osteosarkom und Nierenzellentumoren berichtet [17, 18, 19]. Die HSP70-Mengen korrelieren mit der Malignität bei Osteosarkom und Nierenzellentumoren;

seine Expression ist paradoxerweise mit einer besseren Prognose verbunden [18, 20]. HSP90 und HSP60 werden auch bei Brust-Tumoren, Lungenkrebs, Leukämien und Hodgkin-Krankheit überexprimiert [19, 21, 22, 23]. Die molekulare Basis für die Überexpression von HSPs bei Tumoren wird nicht vollständig verstanden und könnte verschiedene Ätiologien haben. Beispielsweise kann sie auf eine suboptimale Zellumgebung in gefäßarmen hypoxischen Tumoren zurückzuführen sein, oder auf Wachstumsbedingungen innerhalb des soliden Tumors [24].

[0007] In Fountoulakis M et al. (J Chromatogr A. 1038(1-2) (2004): 247-65) wird das Proteinprofil und die Identifizierung von ca. 1200 Proteinen der HeLa-Zelllinie (Gebärmutterhals-Zellen) geoffenbart.

[0008] In Vercoutter-Edouart AS et al. (Exp Cell Res. 262(1) (2001): 59-68) wird die Änderung des Proteinbiosyntheseprofils der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7, welche durch den Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF-2) induziert wurde, beschrieben. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Hitzeschockproteine HSP90 und HSP70 das „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) und das transkriptionell kontrollierte Tumorprotein (TCTP) durch diese Induktion in erhöhtem Ausmaß exprimiert werden.

[0009] Hondermarck H et al. (Proteomics 1(10) (2001): 1216-32) betrifft die Untersuchung des Proteinexpressionsprofils von Brustkrebszellen zur Identifizierung von Marker-Proteinen bzw. von Proteinen der Signalverarbeitungswege.

[0010] In Pucci-Minafra et al. (Proteomics 2(7) (2002):919-27) wird das Proteom einer weiteren Brustkrebszelllinie (8701-BC) geoffenbart. Dabei konnten 84 Protein-Spots, welche in einem 2D-Elektrophoresegele nachgewiesen wurden, identifiziert werden.

[0011] In Pucci-Minafra et al. (Ann N Y Acad Sci. 963 (2002): 122-39) wird geoffenbart, dass 140 Protein-Spots eines 2D-Elektrophorese-Gels der Brustkrebszelllinie 8701-BC und einer Brustepithelzelllinie, welche nicht von einem Tumor stammt, untersucht wurden. Dabei konnte festgestellt werden, dass vier Proteine nur in der Krebszelllinie und acht Proteine nur in der Epithelzelllinie exprimiert werden.

[0012] In Shin BK et al. (J Biol Chem 278(9) (2003):7607-16) wird das Expressionsprofil von Zelloberflächenproteinen bei verschiedenen Krebszelllinien beschrieben.

[0013] In Yokota S et al. (Cell Stress Chaperones 6(4) (2001):345-50) wird die erhöhte Expression von cytosolischen Chaperonin (CCT) in humanen Krebszelllinien, insbesondere in Kolon-Krebszellen, beschrieben. Dabei konnte festgestellt werden, dass in diesen Zellen bestimmte Chaperone (u.a. das Hitzeschockprotein 70) eine erhöhte Expressionsrate aufweisen.

[0014] In Kim KK et al. (J Korean Med Sci. 13(4) (1998):383-8) ist die Expression des Hitzeschock-Proteins 70 (HSP70) und eines Östrogen-Rezeptors in Tumorzellen, insbesondere in Gewebeproben von Gebärmutterhalskrebs, geoffenbart.

[0015] In der WO 00/70340 ist ein Diagnose-System offenbart, bei welchem Gewebeproben von Patienten mittels 2-D-Gel-Elektrophorese, gefolgt von einer Computer-unterstützten multivariaten Analyse (mit der Partial Least Square Diskriminanz-Analyse) untersucht werden. Dieser Ansatz war jedoch sehr unspezifisch, und mit diesem Verfahren können viele unverlässliche Daten erhalten werden.

[0016] Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, Mittel vorzusehen, welche die Diagnose eines breiten Spektrums von Tumoren bei einem Individuum ermöglichen.

[0017] Daher sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur differentialen Diagnose von Tumoren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Osteosarkom, Knochenmark-Neuroblastom, colorektalem Karzinom, Eierstock-Adenokarzinom, Lungen-Karzinom, akuter Promyelozyten-Leukämie, malignem Hautmelanom, Rhabdomyosarkom, Brustkrebs und Gebärmutterhals-Karzinom bei einem Menschen, umfassend die folgenden Schritte:

[0018] - Vorsehen einer Probe einer Körperflüssigkeit oder einer Gewebeprobe eines Menschen,

[0019] - Feststellen des Vorhandenseins von mindestens acht Proteinen ausgewählt aus der Gruppe der Protein-Familien, bestehend aus

[0020] • der Hitzeschock-Protein-90-Familie, bestehend aus Hitzeschock-Protein HSP90-alpha, Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, 88,1% Homolog der Isoform von HSP90-beta (DKFZ-p76IK0511) und Tumor-Rejection-Antigen (gp96) 1,

[0021] • der Hitzeschock-Protein-70-Familie, bestehend aus Hitzeschock-Protein 105 kDa, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Hitzeschock-verwandtem 70 kDa-Protein 2, Hitzeschock-70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-verwandtem Protein, BiP-Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, 150 kDa-Sauerstoff-reguliertem Protein und Hitzeschock-70kDa-Protein 8,

[0022] • der TCP-1/cpn60-Chaperonin-Familie, bestehend aus Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, und hypothetischem Protein, das zu 96% homolog ist mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit,

[0023] • der DnaJ-Familie, bestehend aus DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 1, DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 2 und DnaJ-Homolog-Unterfamilie B-Mitglied 11 und

[0024] • der Thioredoxin-Familie, bestehend aus Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase A3 und Protein-Disulfid-Isomerase A6,

[0025] und/oder ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29, Prefoldin-Untereinheit 2, Prefoldin-Untereinheit 3, Aktivator des 90 kDa-Hitzeschock-Protein-ATPase-Homologs 1, molekularem Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie, Mitochondrien-GrpE-Protein-Homolog 1 und HSPO15, und

[0026] - Diagnostizieren

[0027] • von Osteosarkom, wenn das Vorhandensein von Tumor-Rejection-Antigen (gp96) 1 in der Probe festgestellt wird,

[0028] • von Knochenmark-Neuroblastom, wenn das Vorhandensein von DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 2 in der Probe festgestellt wird,

[0029] • von colorektalem Karzinom, wenn das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP 90-alpha, Hitzeschock-Protein HSP 90-beta, Endoplasmin, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1 alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96 % homolog mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit ist, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Stress-induziertem Phosphoprotein 1 und Hitzeschock-27 kDa-Protein in der Probe festgestellt wird,

[0030] • von Eierstock-Adenokarzinom, wenn das Vorhandensein von Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-Protein 105 kDa, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase A3 und Stress-induziertem Phosphoprotein 1 in der Probe festgestellt wird,

- [0031]** • von Lungen-Karzinom, wenn das Vorhandensein von DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 1 in der Probe festgestellt wird,
 - [0032]** • von akuter Promyelozyten-Leukämie, wenn das Vorhandensein von Hitzeschock-70 kDa-Protein 8 und/oder HSPC015 in der Probe festgestellt wird,
 - [0033]** • von malignem Hautmelanom, wenn das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock 70 kDa-Protein 1, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Unter-einheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96% homolog ist mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Peptidyl-Prolylcis-trans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4 und endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29 in der Probe festgestellt wird,
 - [0034]** • von Rhabdomyosarkom, wenn das Vorhandensein von 88,1% Homolog der Isoform von HSP90-beta (DK-Fzp761K0511) und/oder Mitochondrien-GrpE-Protein-Homolog 1 in der Probe festgestellt wird,
 - [0035]** • von Brustkrebs, wenn das Vorhandensein von BiP-Protein und/oder 150 kDa-Sauerstoff-reguliertem Protein in der Probe festgestellt wird, und
 - [0036]** • von Gebärmutterhals-Karzinom, wenn das Vorhandensein von Prefoldin-Untereinheit 3 in der Probe festgestellt wird.
- [0037]** Mit der vorliegenden Erfindung stellte man fest, dass jeder Tumor seinen charakteristischen „Chaperon-Fingerabdruck“ („chaperone fingerprint“) hat, d.h. ein charakteristisches Profil der Chaperon-Expression, die für den Tumor einzigartig ist und von Patient zu Patient nur geringfügig verschieden ist.
- [0038]** Außerdem sind diese „Chaperon-Fingerabdrücke“, die nachfolgend auch als Chaperon-Referenz-Karten („chaperone reference maps“, CRMs) bezeichnet werden, für den Tumor-Zustand charakteristisch und ermöglichen eine verlässliche differential-diagnostische Analyse mit einer sehr geringen Menge des (Tumor)-Gewebes oder der Körperflüssigkeit des Patienten.
- [0039]** Eine bestimmte Art von Chaperon-Fingerabdruck kann durch die zweidimensionale Gel-Elektrophorese, verbunden mit einer Massenspektrometrie-Analyse der detektierten Protein-Spots, vorgesehen werden. Andere Verfahren können je nach ihrer Durchführbarkeit für die Überprüfung einer großen Menge von Marker-Chaperonen (z.B. >10, >20, >30, >40 oder sogar >50 verschiedene Chaperone) innerhalb einer kurzen Zeit (innerhalb 1 Woche, innerhalb von zwei Tagen, innerhalb eines Tages oder selbst innerhalb von ein paar (z.B. 2, 8, 12) Stunden) angewendet werden.
- [0040]** Der Versuchsansatz gemäß der WO 00/70340 (die durch Bezugnahme hierin mit eingeschlossen ist) kann für die vorliegende Erfindung leicht adaptiert werden, insbesondere bis zum (d.h. einschließlich des) Vorsehen(s) der 2-D-Gel-Elektrophorese. Die Analyse gemäß der vorliegenden Erfindung involviert jedoch ausdrücklich nur die Chaperone, vorzugsweise kombiniert mit einer sehr spezifischen Detektionsmethode, wie MS, und ermöglicht auch die Detektion von Chaperonen in Protein-Spots, die mehr als eine Protein-Spezies enthalten.
- [0041]** Auf Grund der Tatsache, dass Tumoren unterschiedliche Protein-Expressions-Profile zeigen, erwiesen sich die hierin offenbarten Proteine als geeignete Marker-Moleküle für Tumoren.
- [0042]** Diese Proteine und die Gene dafür sind bereits im Stand der Technik offenbart, z.B. als Swiss-Prot-Eintragenen, oder als durch Fachleute überprüfte Veröffentlichung, oder beides. Die Bezugnahme auf diese Proteine oder Gene wird immer als Bezugnahme auf diese Eintragenen oder Veröffentlichungen angesehen, insbesondere im Hinblick auf ihre Aminosäu-

re/Nukleinsäure-Sequenzen (auch im Fall von mehr als einer Sequenz-Variation). Die Hinterlegungsnummern für die Swiss-Prot-Datenbank der hierin offenbarten Proteine sind in Tabelle 1 auf gelistet. Es ist klar, dass für die Detektion oder die Bestimmung jedes dieser Proteine/Gene nicht nur die Proteine oder Gene (mRNA, cDNA) als Ganzes, sondern auch charakteristische Fragmente dieser Proteine oder Gene für die vorliegende Erfindung geeignet sind, solange eine spezifische Bestimmung/Detektion möglich ist.

[0043] Die Marker-Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung werden in gesunden Individuen nicht exprimiert und können daher ideal für die Diagnostizierung von Tumoren verwendet werden.

[0044] Die zu analysierende Probe kann dem Gewebe (z.B. Biopsie) oder der Körperflüssigkeit (z.B. dem Blut), von dem bzw. der man vermutet, dass es bzw. sie Tumorzellen enthält, direkt entnommen werden. Auf Grund der Tatsache, dass die exprimierten Marker-Proteine durch Körperflüssigkeiten in andere Regionen des Körpers transprotiert werden können, können diese Marker auch in Körperflüssigkeiten oder Geweben bestimmt werden, die nicht von Tumorzellen betroffen sind. Das spezifische Protein-Expressions-Profil der Tumorzellen macht daher eine Diagnose eines bestimmten Tumor-Typs auch durch Analysieren von nicht vom Tumor betroffenen Körperflüssigkeiten und Geweben möglich.

[0045] Natürlich kann nicht nur die Anwesenheit, sondern auch die Menge der Marker-Proteine bestimmt werden.

[0046] Vorzugsweise wird das Vorhandensein mindestens eines Proteins durch ein Verfahren bestimmt, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Protein-Massenspektrometrie, Antikörperbindung, Gel-Elektrophorese, vorzugsweise zweidimensionale Gel-Elektrophorese, Array-Technologie, vorzugsweise unter Verwendung eines Antikörper-Arrays, oder Kombinationen davon.

[0047] Alle diese Methoden können verwendet werden, um ein Marker-Protein gemäß der vorliegenden Erfindung zweifelsfrei zu identifizieren, und die aus diesen Analysen erhaltenen Ergebnisse können verwendet werden, um eine bestimmte Art von Tumor zu identifizieren. Z.B. kann die Western-Blot-Technik verwendet werden, wenn spezifische Antikörper für das nachzuweisende Marker-Protein zur Verfügung stehen. Auch an ein Array gebundene Antikörper können zum Bestimmen des Vorhandenseins von Marker-Proteinen verwendet werden. Alternativ kann, wenn keine Antikörper zur Verfügung stehen, Massenspektrometrie angewendet werden.

[0048] Natürlich können alle hierin erwähnten Techniken kombiniert werden, um ein noch leistungsfähigeres Diagnosemittel zu ergeben. Beispielsweise kann ein im Laufe der Gel-Elektrophorese erhaltener Protein-Spot mit einem Massenspektrometer oder mittels der Dot-Blot-Analyse analysiert werden. Alle diese Techniken gehören zum Stand der Technik und sind in vielen Artikeln und Fachbüchern offenbart (z.B. „Bioanalytik“, Lottspeich und Zorbas, 1998, Spektrum Akademischer Verlag).

[0049] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das Vorhandensein des mindestens einen Proteins durch Bestimmen der für das mindestens eine Protein kodierenden mRNA festgestellt.

[0050] Vorzugsweise wird die für das mindestens eine Protein kodierende mRNA mit einem Verfahren bestimmt, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Array-Technologie, vorzugsweise unter Verwendung eines DNA-Arrays, Nukleinsäure-Amplifikation, vorzugsweise Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, Hybridisierungstechniken und Kombinationen davon.

[0051] Die Synthese eines Proteins in einer lebenden Zelle sowie in lebenden Systemen erfordert die vorherige Produktion von mRNA, um es dem Organismus zu ermöglichen, das entsprechende Protein auf Basis einer vorgesehenen Matrize zu synthetisieren. Daher kann das Vorhandensein von Marker-Proteinen der vorliegenden Erfindung in einer Probe auch durch eine mRNA Detektions-Technik festgestellt werden.

[0052] Gemäß einer anderen bevorzugten Ausführungsform wird das Vorhandensein von zehn oder mehr des mindestens einen Proteins gleichzeitig in der Probe bestimmt.

[0053] Vorteilhaft wird mit dem vorliegenden Verfahren nicht nur ein Protein bestimmt. Die gleichzeitige Bestimmung von mehr als einem Marker-Protein ist zeitsparend und ermöglicht auch eine raschere Diagnostizierung von Tumoren mit einem komplexen Marker-Protein-Profil. Weiters kann das vorliegende Verfahren auch mit anderen Tests, insbesondere mit anderen bei der Tumor-Diagnose verwendeten Tests, z.B. mit Tests für andere Tumor-Marker, kombiniert werden.

[0054] Erfindungsgemäß ist der zu diagnostizierende Tumor ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Osteosarkom, Knochenmark-Neuroblastom, colorektalem Karzinom, Eierstock-Adenokarzinom, Lungen-Karzinom, akuter Promyelozyten-Leukämie, malignem Hautmelanom, Rhabdomyosarkom, Brustkrebs und Gebärmutterhals-Karzinom.

[0055] Je nach dem Marker-Protein oder den Proteinen, die in der Probe bestimmt werden, kann die Art des Tumors genau diagnostiziert werden. Insbesondere ermöglicht das Vorhandensein eines oder mehrerer spezifischer Proteine die Diagnostizierung einer bestimmten Art von Tumor.

[0056] Osteosarkom wird diagnostiziert, wenn das Vorhandensein des Tumor-Rejection-Antigens (gp96) 1 in der Probe festgestellt wird.

[0057] Das Tumor-Rejection-Antigen (gp96) 1 wird nur in Osteosarkom-Zellen exprimiert, und daher ermöglicht die Expression dieses Marker-Proteins seine zweifelsfreie Identifizierung. Natürlich kann dieses Protein alleine oder in Kombination mit anderen Marker-Proteinen bestimmt werden.

[0058] Vorzugsweise kann Osteosarkom diagnostiziert werden, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, Protein-Disulfid-Isomerase A3 und Protein-Disulfid-Isomerase A6 in der Probe festgestellt wird.

[0059] Die kombinierte Bestimmung dieser Marker-Proteine ergibt ein noch stärkeres Werkzeug zur Identifizierung von Osteosarkom. Natürlich müssen nicht alle dieser Marker-Proteine für eine genaue Diagnose des Osteosarkoms bestimmt werden. In der Praxis kann auch die Bestimmung einiger dieser Marker-Proteine ausreichen, um eine Diagnose zu ermöglichen, wenn die zu bestimmenden Proteine ausgewählt werden, um eine zweifelsfreie Identifizierung zu ermöglichen. Tabelle 1 zeigt die Protein-Expressions-Profile von Tumorzellen, die die in der vorliegenden Erfindung offenbarten Marker-Proteine exprimieren. Auf der Basis dieser Tabelle können Osteosarkom sowie alle anderen hierin erwähnten Tumorarten auf genaue Weise diagnostiziert werden.

[0060] Knochenmark-Neuroblastom wird diagnostiziert, wenn die Anwesenheit von DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 2 in der Probe festgestellt wird.

[0061] Außerdem kann auch die Anwesenheit von Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-verwandtem 70 kDa-Protein 2, Hitzeschock-70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96% homolog ist mit der Isoform von T-Komplex Protein 1-epsilon-Untereinheit, DnaJ-Homolog der Unterfamilie B-Mitglied 11, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29, Pre-foldin-Untereinheit 2 und Aktivator von 90 kDa-Hitzeschock-Protein ATPase-Homolog 1 in der

Probe bestimmt werden, um die Diagnose von Knochenmark-Neuroblastom zu ermöglichen.

[0062] Colorektales Karzinom wird erfindungsgemäß diagnostiziert, wenn das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP 90-alpha, Hitzeschock-Protein HSP 90-beta, Endoplasmin, Hitzeschock 70 kDa-Protein 1, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1 alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96% homolog mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit ist, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Stress-induziertem Phosphoprotein 1 und Hitzeschock-27 kDa-Protein in der Probe festgestellt wird.

[0063] Eierstock-Adenokarzinom wird diagnostiziert, wenn das Vorhandensein von Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-Protein 105 kDa, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase A3 und Stress-induziertem Phosphoprotein 1 in der Probe festgestellt wird.

[0064] Erfindungsgemäß wird Lungen-Karzinom diagnostiziert, wenn das Vorhandensein von DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 1 in der Probe festgestellt wird.

[0065] Weiters wird Lungen-Karzinom diagnostiziert, wenn zusätzlich das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP 90-alpha, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Hitzeschock-70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1 alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96% homolog mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit ist, DnaJ-Homolog-Unterfamilie B-Mitglied 11, Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29 und molekularem Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie in der Probe festgestellt wird.

[0066] Akute Promyelozyten-Leukämie wird diagnostiziert, wenn das Vorhandensein von Hitzeschock-70 kDa-Protein 8 und/oder HSPC015 in der Probe festgestellt wird.

[0067] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird akute Promyelozyten-Leukämie diagnostiziert, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Hitzeschock-70 kDa-Protein-1, Hitzeschock 70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96 % homolog mit der Isoform von T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit ist, Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Peptidyl-Prolylcistrans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4 und Hitzeschock-27 kDa-Protein in der Probe festgestellt wird.

[0068] Malignes Hautmelanom wird erfindungsgemäß diagnostiziert, wenn das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock 70 kDa-Protein 1, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit,

hypothetischem Protein, das zu 96% homolog ist mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Peptidyl-Prolylcis-trans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4 und endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29 in der Probe festgestellt wird.

[0069] Rhabdomyosarkom wird diagnostiziert, wenn das Vorhandensein eines 88,1 % Homologs der Isoform von HSP90-beta (DK-FZp761K0511) und/oder Mitochondrien-GrpE-Protein-Homolog 1 in der Probe festgestellt wird.

[0070] Vorzugsweise wird Rhabdomyosarkom diagnostiziert, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-alpha, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-Protein 105 kDa, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Hitzeschock-70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96% homolog mit der Isoform von T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit ist, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A und Stress-induziertem Phosphoprotein 1 in der Probe festgestellt wird.

[0071] Erfindungsgemäß wird Brustkrebs diagnostiziert, wenn das Vorhandensein von BiP-Protein und/oder 150 kDa-Sauerstoff-reguliertem Protein in der Probe festgestellt wird.

[0072] Vorzugsweise wird Brustkrebs diagnostiziert, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-alpha, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-Protein 105 kDa, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Hitzeschockverwandtem 71 kDa-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96 % homolog mit der Isoform von T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit ist, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, und endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29 in der Probe festgestellt wird.

[0073] Gebärmutterhals-Karzinom wird diagnostiziert, wenn das Vorhandensein von Prefoldin-Untereinheit 3 in der Probe festgestellt wird.

[0074] Vorzugsweise wird Gebärmutterhals-Karzinom diagnostiziert, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-alpha, Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, DnaJ-Homolog-Unterfamilie B-Mitglied 11, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29, Prefolding-Untereinheit 2, Aktivator von 90 kDa-Hitzeschock-Protein ATPase-Homolog 1 und molekularem Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie in der Probe festgestellt wird.

[0075] Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Set zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die mindestens acht Proteine ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus mindestens einer Protein-Familie ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus der Hitzeschock-Protein-90-Familie, der Hitzeschock-Protein-70-Familie, der TCP-1/cpn60-Chaperonin-Familie, der DnaJ-Familie und der Thiothredoxin-Familie, und/oder der Gruppe bestehend aus Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29, Prefoldin-Untereinheit 2, Prefoldin-Untereinheit 3, Aktivator des 90 kDa-Hitzeschock-Protein-ATPase-Homologs 1, molekularem Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie, Mitochondrien-GrpE-Protein-Homolog 1 und HSPC015, wobei das Set umfasst

[0076] - einen Probenbehälter,

[0077] - Mittel zur Detektion der mindestens zwei Proteine, insbesondere Antikörper, welche die Proteine spezifisch erkennen, und

[0078] - Mittel zum Bestimmen der Menge der detektierten Proteine.

[0079] Das vorliegende Set enthält vorzugsweise als Mittel zur Detektion des mindestens einen Proteins und als das Mittel zum Bestimmen der Menge der detektierten Proteine konjugierte, vorzugsweise markierte, Antikörper, insbesondere radioaktiv oder Fluoreszenzmarkierte Antikörper.

[0080] Vorzugsweise sind die Mittel zur Detektion des mindestens einen Proteins an einer festen Oberfläche immobilisiert.

[0081] Die Sets gemäß der vorliegenden Erfindung können gemäß Standard-Protokollen, die an die neuen Tumor-Marker, die durch die vorliegende Erfindung vorgesehen sind, adaptiert sind, hergestellt und entworfen sein.

[0082] Die vorliegende Erfindung ist weiters durch das folgende Beispiel und die Figuren veranschaulicht, ohne auf diese eingeschränkt zu sein.

[0083] Fig. 1 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel, das die Protein-Karte der Zelllinie Saos-2 (Osteosarkom) darstellt. Swiss-Prot Hinterlegungsnummern sind zur Identifizierung der Proteine verwendet.

[0084] Fig. 2 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel, das die Protein-Karte der Zelllinie SK-N-SH (Knochenmark-Neuroblastom) darstellt. Swiss-Prot Hinterlegungsnummern sind zur Identifizierung der Proteine verwendet.

[0085] Fig. 3 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel, das die Protein-Karte der Zelllinie HCT 116 (colorektales Karzinom) darstellt. Swiss-Prot Hinterlegungsnummern sind zur Identifizierung der Proteine verwendet.

[0086] Fig. 5 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel, das die Protein-Karte der Zelllinie A549 (Lungen-Karzinom) darstellt. Swiss-Prot Hinterlegungsnummern sind zur Identifizierung der Proteine verwendet.

[0087] Fig. 6 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel, das die Protein-Karte der Zelllinie HL-60 (akute Promyelozyten-Leukämie) darstellt. Swiss-Prot Hinterlegungsnummern sind zur Identifizierung der Proteine verwendet.

[0088] Fig. 7 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel, das die Protein-Karte der Zelllinie A-375 (malignes Hautmelanom) darstellt. Swiss-Prot Hinterlegungsnummern sind zur Identifizierung der Proteine verwendet.

[0089] Fig. 8 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel, das die Protein-Karte der Zelllinie A-673 (Rhabdomyosarkom) darstellt. Swiss-Prot Hinterlegungsnummern sind zur Identifizierung der Proteine verwendet.

[0090] Fig. 9 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel, das die Protein-Karte der Zelllinie MCF-7 (Brustkrebs) darstellt. Swiss-Prot Hinterlegungsnummern sind zur Identifizierung der Proteine verwendet.

[0091] Fig. 10 zeigt ein Coomassie-gefärbtes 2D-Gel, das die Protein-Karte der Zelllinie Hela (Gebärmutterhals-Karzinom) darstellt. Swiss-Prot Hinterlegungsnummern sind zur Identifizierung der Proteine verwendet.

BEISPIEL

[0092] Materialien und Methoden: Zellkultur:

[0093] Zehn verschiedene Tumor-Zelllinien wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) käuflich erworben. Die Zelllinien und ihre ATCC-Nummern sind in der folgenden Tabelle angegeben.

ATCC-Nummer	Bezeichnung	Gewebe
HTB-85	Saos-2	Knochen; Osteosarkom
HTB-75	CaOv-3	Eierstock; Adenokarzinom
HTB-11	SK-N-SH	Gehirn; Metastasen-Stelle: Knochenmark-Neuroblastom
CCL-247	HCT116	Colon; colorektales Karzinom
CCL-185	A549	Lunge; Karzinom
CCL-240	HL-60	peripheres Blut; Promyeloblast; akute Promyelozyten-Leukämie
CRL-1619	A-375	Haut; malignes Melanom

ATCC-Nummer	Bezeichnung	Gewebe
CRL-1598	A-673	Muskel; Rhabdomyosarkom
HTB-22	MCF-7	Mamma; Brust; Epithel; Metastasen-Stelle: Pleuraerguss-Adenokarzinom
CCL-2	Hela	Gebärmutterhals; Epithel; Adenokarzinom

[0094] SK-N-SH (Knochenmark-Neuroblastom) und Hela (Gebärmutterhals-Karzinom) - Zelllinien wurden in minimalem essentiellen Medium (Eagle) mit 2 mM L-Glutamin und Earle's Basic Salt Solution (BSS), das so eingestellt war, dass es 1,5 g/l Natriumbicarbonat, 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren und 1,0 mM Natriumpyruvat, mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS) enthielt, gezüchtet. Dieselben Bedingungen wurden zum Züchten der MCF-7-Zelllinie verwendet, außer dass 10 % FBS durch 90 % 0,01 mg/ml Rinder-Insulin ersetzt wurde. HCT 116 (colorektales Karzinom) und Saos-2 (Osteosarkom)-Zelllinie wurden in McCoy's 5a Medium mit 90 % 1,5 mM L-Glutamin und 10 % FBS gezüchtet. HamAs F12K-Medium mit 2 mM L-Glutamin, so eingestellt, dass es 1,5 g/l Natriumbicarbonat und 10% FBS enthielt, wurden für die A549(Lungen-Karzinom) -Zellkultur verwendet. HL-60(akute Promyelozyten-Leukämie)-Zellen wurden mit Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium mit 4 mM L-Glutamin gezüchtet, das so eingestellt war, dass es 80 % 1,5 g/l Natriumbicarbonat und 20 % FBS enthielt. A-673(Rhabdomyosarkom) -, Caov-3(Eierstock-Adenokarzinom)- und A-375(maligne Melanom)-Zelllinien wurden in DMEM mit 4 mM L-Glutamin gezüchtet, das so eingestellt war, dass es 1,5 g/l Natriumbicarbonat und 4,5 g/l Glucose mit 10% FBS enthielt.

[0095] Alle Zellkulturen wurden in einer angefeuchteten Atmosphäre von 5 % (V/V) CO₂ in Luft bei 37° C gehalten und logarithmisch wachsende Zellen wurden durch Trypsinisierung geerntet.

PROBENVORBEREITUNG

[0096] Geerntete Zellen wurden drei Mal mit 10 ml PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) gewaschen und 10 min lang mit 8000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in 1,0 ml Proben-Puffer bestehend aus 40 mM Tris, 7 M Harnstoff (Merck, Darmstadt, Deutschland), 2M Thioharnstoff (Sigma, St. Louis, MO, USA), 4 % CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propan sulfonat) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 65 mM 1,4-Dithioerythritol (Merck, Deutschland), 1 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) (Merck, Deutschland), Protease-Hemmern komplett (Roche, Basel, Schweiz) und 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) suspendiert. Die Suspension wurde etwa 30 Sekunden lang mit Ultraschall behandelt.

Nach dem Homogenisieren wurden die Proben 1 h lang bei Raumtemperatur belassen und mit 14.000 U/min 1 h lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Ultrafree-4 zentrifugierten Filtereinheit (Millipore, Bedford, MA) zum Entsalzen und Konzentrieren von Proteinen transferiert. Der Protein-Gehalt des Überstands wurde mit dem Bradford-Protein-Testsystem quantifiziert [25]. Die Standard-Kurve wurde unter Verwendung von Rinderserumalbumin erzeugt, und die Absorption wurde bei 595 nm gemessen.

ZWEIDIMENSIONALE GEL-ELEKTROPHORESE (2-DE):

[0097] Proben, die von jeder Zelllinie hergestellt worden waren, wurden wie an anderer Stelle [26] beschrieben, einer 2-DE unterzogen. 1 mg Protein wurde auf immobilisierte, pH 3-10 nicht-lineare Gradienten-Streifen in Probenschalen an ihren basischen und sauren Enden aufgetragen. Die Fokussierung begann bei 200 V, und die Spannung wurde allmählich auf 5000 V mit einer Geschwindigkeit von 3 V/min gesteigert und danach weitere 24 h lang konstant gehalten (etwa 180.000 Vh insgesamt). Nach der ersten Dimension wurden Streifen (18 cm) 15 min lang im Puffer, der 6 M Harnstoff, 20 % Glycerin, 2 % SDS, 2 % DTT (Dithiothreitol) enthielt, und danach 15 min lang im selben Puffer, der 2,5 % Iodacetamid anstelle von DTT enthielt, äquilibriert. Nach dem Äquilibrieren wurden die Streifen auf 9-16 % Gradienten-Natrium- Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gele zur Trennung in der zweiten Dimension geladen. Die Gele (180 x 200 x 1,5 mm) wurden bei 40 mA pro Gel laufen lassen. Sofort nach dem Lauf der zweiten Dimension wurden die Gele 18 h lang in 50 % Methanol, das 10 % Essigsäure enthielt, fixiert, die Gele wurden mit kolloidalem Coomassie-Blau (Novex, San Diego, CA) 12 h lang auf einem Rocking Shaker gefärbt. Die Molekularmassen wurden durch Laufenlassen von Standard-Protein-Markern (Biorad Laboratories, Hercules, CA), die den Bereich 10-250 kDa abdeckten, bestimmt. Die pI-Werte wurden verwendet, wie vom Hersteller der immobilisierten pH-Gradienten-Streifen angegeben (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden). Überschüssige Farbe wurde mit destilliertem Wasser aus den Gelen ausgewaschen, und die Gele wurden mit dem ImageScanner (Amersham Bioscience) gescannt. Die elektronischen Bilder der Gele wurden unter Verwendung von Adobe Photoshop und Microsoft Power Point Software aufgezeichnet.

MATRIX-UNTERSTÜTZTE LASER-DESORPTION-IONISATIONS-MASSENSPEKTROMETRIE

[0098] Spots wurden mit einem Spot-Picker (PROTEINEER sp™, Bruker Daltonics, Deutschland) herausgeschnitten, in Mikrotiter-Platten mit 96 Vertiefungen platziert, und ein In-Gel-Verdau und die Proben-Zubereitung für die MALDI-Analyse wurden mit einem automatisierten Verfahren durchgeführt (PROTEINEER dp™, Bruker Daltonics) [27, 28]. Kurz gesagt, es wurden Spots ausgeschnitten und mit 10 mM Ammoniumbicarbonat und 50 % Acetonitril in 10 mM Ammoniumbicarbonat gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Gel-Pfropfen durch Zugabe von Acetonitril geschrumpft und durch Ausblasen der Flüssigkeit durch den durchstochenen Boden der Vertiefung getrocknet. Die getrockneten Gel-Stücke wurden mit 40 ng/µl Trypsin (Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland) in Enzympuffer (bestehend aus 5 mM Octyl-β-D-Glucopyranosid (OGP) und 10 mM Ammoniumbicarbonat) wieder gequollen und 4 h lang bei 30° C inkubiert. Die Peptid-Extraktion wurde mit 10 µl 1 % TFA in 5 mM OGP vorgenommen. Die extrahierten Peptide wurden direkt auf ein Ziel (AnchorChip™, Bruker Daltonics) aufgebracht, das mit α-Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (CHCA) (Bruker Daltonics)-Matrix-Dünnschicht beladen war. Das bei dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer war ein Ultraflex™ TOF/TOF (Bruker Daltonics), das im Reflektor für MALDI-TOF-Peptid-Massen-Fingerabdruck(PMF)-oder im LIFT-Modus für MALDI-TOF/TOF mit einem vollkommen automatisierten Modus unter Verwendung der FlexControl™-Software betrieben wurde. Eine beschleunigende Spannung von 25 kV wurde für PMF verwendet. Die Eichung des Instruments erfolgte extern mit [M+H]⁺-Ionen von Angiotensin I, Angiotensin II, Substanz P, Bombesin und adrenocorticotropen Hormonen (Clip 1-17 und Clip 18-39). Jedes Spektrum wurde durch Ansammeln von Daten von 200 aufeinander folgenden Laser-Beschüssen erzeugt. Jene Proben, die mittels PMF von MALDI-TOF analysiert wurden, wurden zusätzlich unter Verwendung von LIFT-TOF/TOF MS/MS vom selben Ziel analysiert. Ein Maximum von drei Vorläufer-Ionen pro Probe wurde für die MS/MS-Analyse gewählt. Im TOF1-Stadium wurden alle Ionen auf 8 kV unter

Bedingungen beschleunigt, die eine metastabile Fragmentierung fördern. Nach der Selektion von gemeinsam wandernden Stamm- und Fragment-Ionen in einem getimeten Ionen-Gatter wurden die Ionen mittels 19 kV auf hohe Potential-Energie in der LIFT-Zelle angehoben. Nach weiterer Beschleunigung der Fragment-Ionen in der zweiten Ionenquelle konnten ihre Massen gleichzeitig im Reflektor mit hoher Empfindlichkeit analysiert werden. Die PMF- und LIFT-Spektren wurden mit der Mascot-Software (Matrix Science Ltd, London, UK) interpretiert. Datenbank-Abfragen, durch Mascot, unter Verwendung von kombinierten PMF- und MS/MS-Daten-Sätzen wurden über die BioTools 2.2-Software (Bruker) durchgeführt. Eine Massentoleranz von 100 ppm und 2 fehlende Schnittstellen für PMF und MS/MS-Toleranz von 0,5 Da und 1 fehlende Schnittstelle für die MS/MS-Suche wurden gestattet, und die Oxidation von Methionin-Resten wurde in Betracht gezogen. Die von der Software errechnete Wahrscheinlichkeits-Bewertung wurde als Kriterium für die korrekte Identifizierung verwendet.

[0099] Der zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit einer falsch positiven Übereinstimmung mit einem gegebenen Massenspektrum verwendete Algorithmus ist an anderer Stelle [29] beschrieben.

ERGEBNISSE

[00100] Eine Reihe von Chaperon-Proteinen mit verschiedenen Expressionsmustern in zehn verschiedenen Tumor-Zelllinien unter Verwendung von 2-DE und MALDI-MS wurde identifiziert und in Tabelle 1 angeführt. Chaperon-Proteine wurden gemäß ihren Domänen klassifiziert. Die meisten Proteine haben ähnliche pI-Werte und Molekulargewichte mit theoretischem Wert. Der beobachtete pI und das Molekulargewicht sind in Tabelle 2 mit der Gesamtbewertung und der Anzahl an übereinstimmenden Peptiden dargestellt. Die Expressionsmuster jeder Tumor-Zelllinie sind in den Fig. 1 bis 10 gezeigt.

PROTEINE MIT HATPASE_C UND HSP90-DOMÄNEN

[00101] Prominente Mitglieder der HSP90-Protein-Familie sind Hitzeschock-Protein 90-alpha (HSP90 α), Hitzeschock-Protein 90-beta (HSP90 β) und Endoplasmin (GRP94) [30]. Die beiden HSP90-Isoformen sind für die Lebensfähigkeit eukaryontischer Zellen wesentlich. Sie sind konstitutiv ziemlich reichlich vorhanden und machen 1-2% der cytosolischen Proteine aus, und ihre Expressionsmenge kann durch Stress weiter stimuliert werden. HSP90 α und HSP90 β wurden in HTC116- und Heia-Zellen exprimiert. Außerdem wurde HSP90 α auch in A-673- MCF-7- und A549-Zelllinien nachgewiesen, und HSP90 β in Saos-2-, SK-N-SH-, HL-60- bzw. A375-Zelllinien. Die Isoform von HSP90 β (Hinterlegungs-Nr. Q9NTK6) wurde ebenfalls in der A-673-Zelle nachgewiesen und in Fig. 8 dargestellt.

[00102] Alle Zelllinien, außer den Adenokarzinom-Zellen (CaOv-3) exprimierten Endoplasmin (GRP94)-Protein, welches im endoplasmatischen Reticulum [31] wirkt, und das dem Tumor-Rejection-Antigen ähnliche Protein wird in den in Fig. 1 dargestellten Osteosarkom (Saos-2)-Zelllinien beobachtet.

[00103] Hitzeschock-Protein 75-kDa wird Tumor-Nekrosefaktor Typ 1-Rezeptor-assoziiertes Protein oder TRAP1 genannt. Die 2,4 Kilobasen-TRAP-1-mRNA wurde in Skelettmuskel, Leber, Herz, Gehirn, Niere, Pankreas, Lunge und Placenta variabel exprimiert. TRAP-1-mRNA wurde auch in jeder von acht verschiedenen transformierten Zelllinien nachgewiesen [32]. Auf Protein-Ebene wurde es bei Eierstock (CaOv-3)-, Lungen (A549)-, Haut (A-375)-, Rhabdomyosarkom (A-673)-, Brustkrebs (MCF-7) - und Gebärmutterhals-Karzinom (Heia)-Zellen exprimiert.

PROTEINE MIT HSP70-DOMÄNE

[00104] Die HSP70-Familie stellt die am meisten konservierte und am besten untersuchte Klasse von HSPs dar. Humane Zellen enthalten mehrere Mitglieder der HSP70-Familie, einschließlich Stress-induzierbares HSP70, konstitutiv exprimiertes HSC70, Mitochondrien-HSP75 und GRP78, das im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert ist [33]. Es zeigte sich, dass HSP70 die Tumorgenität von Krebszellen in Nager-Modellen erhöht [13]. Alle zehn Tumor-Zellen exprimier-

ten HSC70-Proteine, und die Isoform von HSC70 fand man auch in Promyeloblasten (HL-60).

[00105] Das 105 kDa-Protein ist dem HSP90 bei der Peptid-Kartierung mit Trypsin-Verdau sehr ähnlich. Außer der Molekülmasse sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften des 105 kDa-Proteins ähnlich jenen des HSP90, obwohl es keine HSP70-Domäne hat. Es wird im Gehirn nachgewiesen, jedoch nicht in Leber, Lunge, Milz, Niere, Eierstock oder Uterus, im Gegensatz zur weiten Verbreitung von HSP90 [34]. Im Falle von Tumorzellen wurde es bei Adenokarzinom(CaOv-3)-, Rhabdomyosarkom(A-673)-, Brustkrebs(MCF-7)- und Gebärmutterhals-Karzinom(Hela)-Zellen beobachtet und ist in Fig. 4, 8, 9 und 10 gezeigt.

[00106] HSP70 kDa-Protein 1 (HSP70-1) stabilisiert präexistente Proteine gegen eine Aggregation und vermittelt die Faltung von neu translatierten Polypeptiden im Cytosol sowie in den Organellen. HSP70-1 spielt in Mitochondrien und im endoplasmatischen Reticulum eine zusätzliche Rolle, indem es eine treibende Kraft für Protein-Translokation liefert. Sie spielen bei den Signalleitungsbahnen zusammen mit HSP90 eine Rolle und sind an all diesen Prozessen durch ihre Fähigkeit, nicht-native Konformationen anderer Proteine zu erkennen, beteiligt. Acht Zelllinien, außer SK-N-SH und CaOv-3-Zellen, exprimierten HSP70-1.

[00107] Das Hitzeschock-70 kDa-Protein-4 wurde bei SK-N-SH-, HL-60- und A-673-Zellen beobachtet und ist in den Fig. 2, 6 und 10 dargestellt.

[00108] Es wurde vorgeschlagen, dass das Stress-70-Protein (GRP75) in der Steuerung der Zellproliferation und Zellalterung impliziert ist [35], und es wurde bei acht Zelllinien, außer MCF-7- und Hela-Zellen, beobachtet.

[00109] Das Hitzeschock-verwandte 70 kDa-Protein 2 und das 150 kDa Sauerstoff-regulierte Protein wurden in SK-N-SH- und MCF-7-Zellen nachgewiesen.

[00110] Das am besten charakterisierte der GRPs ist ein 78 kDa-Protein, das als GRP78 bekannt ist, welches mit dem BiP, dem die schwere Kette von Immunglobulin bindenden Protein („Immunoglobulin heavy chain binding protein“) identisch ist [36]. Da GRP78 eine ähnliche Funktion und eine 60% Aminosäure-Homologie mit HSP70 gemeinsam hat [37], wird es auch in die Kategorie der HSP70-Multi-Gen-Familie [38] einbezogen. GRP78 / BiP-Protein wurden bei allen zehn Tumor-Zellen exprimiert.

PROTEINE MIT CPN60_TCP1-DOMÄNE

[00111] Proteine mit einer Cpn60_TCPI-Domäne sind an den Chaperoninen beteiligt, die zur 55-64 kDa-Familie von HSP oder Stress-Proteinen gehören [39]. Säuger-HSP60, das auch Chaperonin genannt wird, ist vor allem in der Mitochondrien-Matrix enthalten, obwohl es auch an extramitochondrialen Stellen nachgewiesen wurde. HSP60 ist an der Faltung von Mitochondrien-Proteinen beteiligt und erleichtert den proteolytischen Abbau von falsch gefalteten oder denaturierten Proteinen in ATP-abhängiger Weise. Die Chaperon-Funktion von HSP60 wird von SHP10 reguliert, welches an HSP60 bindet und die Substrat-Bindung und ATPase-Aktivität reguliert [40]. Bei dieser Untersuchung exprimierten alle Zellen außer MCF-7 60-kDa-Hitzeschock-Protein, Mitochondrien-Präkursor.

[00112] Das Chaperonin-hältige T-Komplex-Polypeptid hat viele Untereinheiten. Von diesen wurden alpha, beta, gamma, epsilon und beta-Einheiten sowie die Isoform der epsilon-Untereinheit in 2-DE-Gelen dieser Untersuchung gezeigt. Insbesondere fand man T-Komplex-Protein 1, beta-Untereinheit bei allen zehn Tumor-Zelllinien.

PROTEINE MIT DNAJ- UND DNAJ_C-DOMÄNEN

[00113] Unter zahlreichen Co-Chaperonen für HSC70 [41] ist die DnaJ-Familie eine wesentliche Gruppe. Die humane DnaJ(HSP40)-Familie [42] ist ein nicht-anerkanntes Mitglied von DnaJ, dem die Zink-Finger-Domäne fehlt. DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 1 und 2 wurden in A549- bzw. SK-N-SH-Zelllinien nachgewiesen, und DnaJ-Homolog-Unterfamilie B-Mitglied 11 fand man auch bei SK-N-SH-, A549- und Heia-Zellen (Fig. 2, 5 und 10).

DIE PROTEINE MIT THIOREDOXIN-DOMÄNE

[00114] Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-A3 und A6, die 2 Thioredoxin-Domänen enthalten, sind Mitglieder der Protein-Disulfid-Isomerase-Familie und ordnen sowohl Intra-Ketten- als auch Inter-Ketten-Disulfid-Bindungen in Proteinen um, um die nativen Strukturen zu bilden. Protein-Disulfid-Isomerase wurde in CaOv-3-, A549- und HL-60-Zellen exprimiert. Protein-Disulfid-Isomerase A3 wurde in neun Zellen, außer der Hela-Zelle, nachgewiesen, und Protein-Disulfid-Isomerase A6 wurde in HL-60-, A-375-, A-673- und Hela-Zelllinien beobachtet.

PROTEINE MIT TPR-DOMÄNE

[00115] Stress-induziertes Phosphoprotein 1, das 9 TPR-Domänen aufweist, wurde in allen Zelllinien außer der Saos-2-Zelle exprimiert. Hsc70-interagierendes Protein mit 3 TPR-Domänen wurde in der H160- und A-375-Zelle nachgewiesen. FK506-bindendes Protein 4 hat 3 TPR-Domänen und 2FKBP_C. Dieses Protein wurde bei der SK-N-SH-, A549-, HL-60, A-375- und MCF-7-Zelle beobachtet.

PROTEINE MIT ANDEREN DOMÄNEN

[00116] Hitzeschock-27kDa-Protein (HSP27) ist an der Stabilisierung von Zellskelett-Proteinen und an den Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress beteiligt, indem es die Anhäufung („burst“) von intrazellulären reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) verhindert [43]. HSP27 ist das einzige Protein, das unter kleinen Hitzeschock-Proteinen in der SK-N-SH-, HCT-, A549-, HL-60-, MCF-7- und Hela-Zelle nachgewiesen wird.

[00117] Peptidyl-prolyl-cis-trans-Isomerase A enthält eine Pro_Isomerase-Domäne und beschleunigt die Faltung von Proteinen. Es wurde bei SK-N-SH-, A549-, HL-60-, A-375- und A-673-Zelllinien beobachtet.

[00118] ERP29_C wurde kürzlich als neues 29 kDa-endoplasmatisches Retikulum-Protein charakterisiert, das in Rattengewebe in großem Umfang exprimiert wird. Es spielt bei der Verarbeitung von sekretorischen Proteinen innerhalb des ER eine wichtige Rolle [44]. SK-N-SH-, A549-, A-375-, MCF-7- und Hela-Zellen exprimierten ERP29-Protein.

[00119] Prefoldin-Untereinheit 2 hat eine KE2-Domäne, doch Prefoldin-Untereinheit 3 hat eine Prefoldin-Domäne. Zwei davon wurden in Hela-Zellen exprimiert, und Prefoldin-Untereinheit 2 wurde auch in der SK-N-SH-Zelle nachgewiesen. Das Protein DUF704 ist ein Aktivator von 90 kDa-Hitzeschock-Protein ATPase-Homolog 1. Dieses Protein wurde in Knochenmark-Neuroblastom(SK-N-SH)- und (Hela)-Zellen beobachtet.

[00120] BAG-1 bindet die ATPase-Domänen von HSP70 und Hsc70, wobei es ihre Chaperon-Aktivität moduliert und als konkurrierender Antagonist des Co-Chaperons Hip fungiert. Die humanen BAG-1-, BAG-2- und BAG-3-Proteine binden mit hoher Affinität an die ATPase-Domäne von Hsc70 und inhibieren ihre Chaperon-Aktivität. Alle diese Proteine enthalten eine konservierte 45-Aminosäuren-Region in der Nähe ihrer C-Termini (der BAG-Domäne) die Hsc70/HSP70 bindet, doch unterscheiden sie sich stark in ihrem N-Terminus [45]. Dieses Protein wurde in A549- und Hela-Zellen beobachtet.

[00121] GrpE-Protein-Homolog 1 mit der GrpE-Domäne und HSPC015 mit DcpS-Domäne wurden ausschließlich in der A-673- und HL-60-Zelle beobachtet.

DISKUSSION

[00122] Tumorzell-spezifische Muster der Chaperon- und Hitzeschock-Protein-Expression liefern eine Basis für die Schaffung von diagnostischen Verfahren zur Identifizierung einer bestimmten Tumor-Art.

[00123] Eine Reihe von Chaperonen wurden durch mehr als einen Spot präsentiert, was auf

das Vorhandensein von Spleiß-Varianten oder post-translationalen Modifikationen einschließlich Glycosylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Oxidation und Trunkierung hindeutet.

[00124] Von der Methodik her ist die Identifizierung von Proteinen mittels MS-MS ein sicherer Ansatz, jedoch werden natürlich auch andere Verfahren zweckmäßig verwendet.

[00125] Verschiedene Antibiotika oder Fungizide, die verwendet werden, können sehr wohl zu Unterschieden in der Chaperon-Expression führen, und tatsächlich wurde bereits berichtet, dass die Verwendung von Geldanamycin eine Hitzeschock-Protein-Expression im Hirngewebe induziert [46]. Andere tentative durcheinander bringende Faktoren, wie z.B. Zellzyklus-Unterschiede, Unterschiede in Wachstum und Proliferation müssen in Erwägung gezogen werden, doch wurde die Chaperon-Expression in Zelllinien in Abwesenheit von Stressoren oder einer Stoffwechselstörung untersucht, was durch die Verwendung von Standard-Protokollen verlangt war, aus welchen toxische Wirkungen erwartet werden. Außerdem wurde eine Liste von Nicht-Tumor-Zelllinien auf Chaperon-Expression untersucht, wobei dieses Prinzip bereits angewendet wurde, sowie eine vergleichbare Analyse-Technik, und dies kann einen gewissen Vergleich zwischen Tumor- und Nicht-Tumor-Zelllinien-Chaperon-Profilen ermöglichen [47].

[00126] Grundlegend können Unterschiede zwischen einzelnen Chaperon-Expressionsmustern auf verschiedene funktionelle Rollen bei einzelnen Zellen und die Anwesenheit spezifischer Proteine in den einzelnen Zelllinien zurückzuführen sein: es gibt Chaperone, um einzelne Proteine spezifisch zu schützen, z.B. spezifisches Chaperoning von Tubulin beta 1 durch den TCP-Komplex [48] und von Procollagen durch HSP47 [49]. Eine unterschiedliche Chaperon-Expression kann Tumor-biologische Merkmale einschließlich Dignität und Karzinogenese widerspiegeln oder zu dieser führen, und das hierin angeführte Verfahren sieht die Möglichkeit und Option vor, diese Merkmale mit einer hohen Durchsatzrate zu testen. Das spezifische Wesen von Zelllinien-Mustern ist durch die Beobachtung gegeben, dass nur Hitzeschock-verwandtes 71 kDa-Protein und TCP-beta-Untereinheit-Protein nicht-spezifisch in allen zehn Zelllinien exprimiert wurden.

LITERATURSTELLEN

- [1] Ritossa, F., *Experientia* 1962, 18, 571-573.
- [2] Lindquist, S., *Annu. Rev. Biochem.* 1986 55, 1151-1191.
- [3] Morimoto, R.I., *Science* 1993, 259, 1409-1410.
- [4] Ellis, R.J., Hartl, F.U., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999, 9, 102-110.
- [5] Agashe, V.R., Hartl, F.U., *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2000, 11, 15-25.
- [6] Buchner, J., *FASEB J.* 1996, 10, 10-19.
- [7] Bukau, B., Horwich, A.L., *Cell* 1998, 92, 351-366.
- [8] Li, Z., *Semin. Immunol.* 1997, 9, 315-322.
- [9] Li, Z., *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* 2001, 19, 371 -383.
- [10] Srivastava, P.K., Menoret, A., Basu, S., Binder, R.J., Mc-Quade, K.L., *Immunity* 1998, 8, 657-665.
- [11] Helmbrecht, K., Zeise, E., Rensing, L., *Cell Prolif.* 2000, 33, 341-365
- [12] Jolly, C, Morimoto, R.I., *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, 92, 1564-1572.
- [13] Jaattela, M., *Int. J. Cancer* 1995, 60, 689-693.
- [14] Garrido, C, Fromentin, A., Bonnotte, B., Favre, N., Moutet, M., Arrigo, A.P., Mehlen, P., Solary, E., *Cancer Res.* 1998, 58, 5495-5499.
- [15] Zylicz, M., King, F.W., Wawrzynow, A., *EMBO J.* 2001, 20, 4634-4638.

- [16] Garrido, C., Arrigo, A.P., Solary, E., *Ree. Res. Dev. Cancer* 2000, 2, 105-114.
- [17] Nanbu, K., Konishi, I., Mandai, M., Kuroda, H., Hamid, A.A., Komatsu, T., Mori, T., *Cancer Detect. Prev.* 1998, 22, 549-555.
- [18] Santarosa, M., Favaro, D., Quaia, M., Galligioni, E., *Eur. J. Cancer* 1997, 33, 873- 877.
- [19] Jameel, A., Skilton, R.A., Campbell, T.A., Chander, S.K., Coombes, R.C., Luqmani, Y.A., *Int. J. Cancer* 1992, 50, 409-415.
- [20] Trieb, K., Lechleitner, T., Lang, S., Windhager, R., Kotz, R., Dirnhofer, S., *Hum. Pathol.* 1998, 29, 1050-1055.
- [21] Wong, H.R., Wispe, J.R., *Am. J. Physiol.* 1997, 273, L1-L9.
- [22] Yufu, Y., Nishimura, J., Nawata, H., *Leuk. Res.* 1992, 16, 597-605.
- [23] Hsu, P.L., Hsu, S.M., *Cancer Res.* 1998, 58, 5507-5513.
- [24] Garrido, C, Ottavi, P. , Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A.P., Chauffert, B., Mehlen, P., *Cancer Res.* 1997, 57, 2661-2667.
- [25] Bradford, M.M., *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-254.
- [26] Weitzdoerfer, R., Fountoulakis, M., Lubec, G., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 293, 836-841.
- [27] Sückau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A., *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 376, 952-965.
- [28] Yang, J.W., Czech, T., Lubec, G., *Electrophoresis* 2004, 25, 1169-1174.
- [29] Berndt, P., Hobohm, U., Langen, H., *Electrophoresis* 1999, 20, 3521-3526.
- [30] Csermely, P., Schnaider, T., Soti, C, Prohaszka, Z., Nardai, G., *Pharmacol. Ther.* 1998, 79, 129-168.
- [31] Nicchitta, C.V., *Curr. Opin. Immunol.* 1998, 10, 103-109.
- [32] Song, H.Y., Dunbar, J.D., Zhang, Y.X., Guo, D., und Donner, D.B., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 3574-3581.
- [33] Jaattela, M., *Ann. Med.* 1999, 31, 261-271.
- [34] Matsumori, M., Itoh, H., Toyoshima, I., Komatsuda, A., Sa-wada, K., Fukuda, J., Tanaka, T., Okubo, A., Kinouchi, H. , Mizoi, K., Hama, T., Suzuki, A., Hamada, F., Otaka, M., Shoji, Y., Takada, G., *Eur. J. Biochem.* 2002, 269, 5632-5641.
- [35] Bhattacharyya, T., Karnezis, A.N., Murphy, S.P., Hoang, T., Freeman, B.C., Phillips, B., Morimoto, R.I., *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 1705-1710.
- [36] Haas, I.G., *Experientia* 1994, 50, 1012-1020.
- [37] Munro, S., Pelham, H.R., *Cell* 1986, 46, 291-300.
- [38] Feige, U., Polla, B.S., *Experientia* 1994, 50, 979-986.
- [39] Dunn, A.Y., Melville, M.W., Frydman, J., *J. Struct. Biol.* 2001, 135, 176-184.
- [40] Bukau, B., Horwich, A.L., *Cell* 1998, 92, 351-366.
- [41] Johnson, J.L., Craig, E.A., Johnson, J.L., Craig, E.A., *Cell* 1997, 90, 201-204.
- [42] Ohtsuka, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993, 197, 235-240.
- [43] Acarin, L., Paris, J., Gonzalez, B., Castellano, B., *Glia* 2002, 38, 1-14.

- [44] Hubbard, M.J., McHugh, N.J., Electrophoresis 2000, 21, 3785-3796.
- [45] Takayama, S., Xie, Z., Reed, J.C., J. Biol. Chem. 1999, 274, 781-786.
- [46] Lu, A., Ran, R., Parmentier-Batteur, S., Nee, A., Sharp, F.R., J. Neurochem. 2002, 81, 355-364.
- [47] Myung, J. K., Krapfenbauer, K., Weitzdoerfer, R., Peyrl, A., Fountoulakis, M. , Lubec, G., Mol. Geriet. Metab. 2003, 80, 444-450.
- [48] Schuller, E., Gulesserian, T., Seidl, R., Cairns, N., Lubec, G., Life Sei. 2001, 69, 263-270.
- [49] Tasab, M., Batten, M.R., Bulleid, N.J., EMBOJ. 2000, 19, 2204-2211.

Tabelle 1. Identifizierte Proteine in verschiedenen humanen Tumor_Zelllinien: A. Saos-2, B. SK-N-SH, C. HCT 116, D. CaOv-3, E. A549, F. HL-60, G. A-375, H. A-673, I. MCF-7 und J. HeLa (+ : detektiert, - : nicht-detektiert, Hinterl.-Nr.: Hinterlegungs-Nummer in Swiss-Prot, abgek. Bezeichn.: abgekürzte Bezeichnung)

Hinter- leg.Nr.	abgek. Be- zeichn.	Protein-Bezeichnung	Domäne	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
HSP90 / HATPas_C													
P07900	HS9A_HUMAN	Hitzeschock-Protein HSP90-alpha	HATPas_C HSP90	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
P08238	HS9B_HUMAN	Hitzeschock-Protein HSP90-beta	HATPas_C HSP90	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
P14625	ENPL_HUMAN	Endoplasmin [Präkursor]	HATPas_C HSP90	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Q12931	TRAL_HUMAN	Hitzeschock-Protein 75 kDa, Mit- ochondrien [Präkursor]	HATPas_C HSP90	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Q9NTK6	Q9NTK6	zu 88.1% homolog mit der Isoform von HSP90-beta (DKFZp761K0511)	HATPas_C HSP90	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Q96GW1	Q96GW1	ähnlich dem Tumor-Rejection-An- tigen (gp96) 1	HATPas_C HSP90	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HSP70													
Q92598	H105_HUMAN	Hitzeschock-Protein 105 kDa	HSP70	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
P08107	HS71_HUMAN	Hitzeschock 70 kDa-Protein 1	HSP70	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
P54652	HS72_HUMAN	Hitzeschock-verwandtes 70 kDa- Protein 2	HSP70	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
P34932	HS74_HUMAN	Hitzeschock 70 kDa-Protein 4	HSP70	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
P38646	GR75_HUMAN	Stress-70-Protein, Mitochondrien [Präkursor]	HSP70	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
P11021	GR78_HUMAN	78 kDa Glucose-reguliertes Prote- in [Präkursor]	HSP70	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Q9UK02	Q9UK02	BiP-Protein [Fragment]	HSP70	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
P11142	HS7C_HU- MAN	Hitzeschock-verwandtes -71 kDa Protein	HSP70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q9Y4L1	OXRP_HUMAN	150 kDa Sauerstoff-reguliertes Protein [Präkursor]	HSP70	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Hinter- leg.Nr.	abgek. Be- zeichn.	Protein-Bezeichnung	Domäne	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Q96IS6	Q96IS6	ähnlich dem Hitzeschock verwand- ten 71-kDa-Protein	HSP70	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Cpn60_TCP1													
P10809	CH60_HUMAN	60 kDa Hitzeschock-Protein, Mit- ochondrien [Präkursor]	Cpn60_TCP1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
P17987	TCPA_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, alpha-Unter- einheit	Cpn60_TCP1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
P78371	TCPB_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, beta-Unter- einheit	Cpn60_TCP1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
P49368	TCPG_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, gamma-Unter- einheit	Cpn60_TCP1	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
P48643	TCPE_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, epsilon-Unter- ereinheit	Cpn60_TCP1	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
P40227	TCPZ_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, zeta-Unter- einheit	Cpn60_TCP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Q9BU08	Q9BU08	zu 96% homolog mit der Isoform von T-Komplex-Protein 1, epsilon- Untereinheit	Cpn60_TCP1	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-
DnaJ													
P31689	DJA1_HUMAN	DnaJ-Homolog-Unterfamilie A Mit- glied 1	DnaJ	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
O60884	DJA2_HUMAN	DnaJ-Homolog-Unterfamilie A Mit- glied 2	DnaJ (1J, 1CRdomain)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Q9UBS4	DJBB_HUMAN	DnaJ-Homolog-Unterfamilie B Mit- glied 11 [Präkursor]	DnaJ DnaJ_C	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Thioredoxin													
P07237	PDI_HUMAN	Protein-Disulfide-Isomerase [Prä- kursor]	2 Thioredoxin	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
P30101	PDA3_HUMAN	Protein-Disulfid-Isomerase A3 [Präkursor]	2 Thioredoxin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Q15084	PDA6_HUMAN	Protein-Disulfid-Isomerase A6 [Präkursor]	2 Thioredoxin	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
Pro_isomerase													
P05092	PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl-cis-trans- Isome- rase A	Pro_Isomerase	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-
TPR													

Hinter- leg.Nr.	abgek. Be- zeichn.	Protein-Bezeichnung	Domäne	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
P31948	IEFS_HUMAN	Stress-induziertes Phosphoprotein 1	9 TPR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P50502	ST13_HUMAN	Hsc70-interagierendes Protein	3 TPR	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Q02790	FKB4_HUMAN	FK506-bindendes Protein 4	2 FKBP_C 3 TPR	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
HSP20 P04792	HS27_HUMAN	Hitzeschock 27 kDa-Protein	HSP20	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
ERP29_C P30040	ER29_HUMAN	Endoplasmatisches Retikulum-Protein ERP29 [Präkursor]	ERP29_C	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
KE2 Q9UHV9	PFD2_HUMAN	Prefoldin-Untereinheit 2	KE2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Prefoldin Q15765	PFD3_HUMAN	Prefoldin-Untereinheit 3	Prefoldin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
DUF704 Q95433	AHA1_HUMAN	Aktivator von 90 kDa Hitzeschock-Protein ATPase-Homolog 1	DUF704	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
BAG Q95816	BAG2_HUMAN	molekularer Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie	BAG	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
GrpE Q9HAV7	GRE1_HUMAN	GrpE-Protein-Homolog 1, Mitochondrien [Präkursor]	GrpE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Dcps Q9Y2S5	Q9Y2S5	HSPC015	Dcps	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Tabelle 2. Theoretisches Molekulargewicht, theoretischer pI, beobachteter pI, Gesamtbewertung und übereinstimmende Peptide molekularer Chaperonen in Tumor-Zelllinien (theor.Mol.gew.: theoretisches Molekulargewicht, theoret. pI: theoretischer isoelektrischer Punkt).

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P07900	HS9A_HUMAN	Hitzeschock-Protein HSP90-alpha theoret. Mol.gew. (Da) = 84542 theoret. pI (pH) = 4,94	HCT 116	100	17	5,65
			A549	192	32	5,12
			A-673	86	17	5,77
			MCF-7	249 229 185	36 34 28	5,60 5,25 5,35
P08238	HS9B_HUMAN	Hitzeschock-Protein HSP90-beta theoret. Mol.gew. (Da) = 83133 theoret. pI (pH) = 4,97	Hela	150	27	5,50
			Saas-2	110	17	5,58
			Sk N SH	90	23	5,18
			HCT 116	153	28	5,40
			HL 60	107	20	5,71
			A-375	184 167	29 28	5,38 5,41
			Hela	116	19	5,65

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P14625	ENPL_HUMAN	Endoplasmin [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 92468 theoret. pI (pH) = 4,76	Saos-2	254	46	5,10
			SK-N-SH	296 68	41 20	5,08 5,10
			HCT 116	68	21	5,00
			A549	199	31	5,00
			HL-60	106 262	21 43	5,18 5,45
			A-375	323 146 203 134	49 30 38 27	5,00 5,15 5,00 5,02
			A-673	69	17	5,02
			MCF-7	74 161 282	15 29 44	5,10 5,25 5,30
P14625	ENPL_HUMAN	Endoplasmin [Präkursor]	Hela	266	41	4,90

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
Q12931	TRAL_HUMAN	Hitzeschock-Protein 75 kDa, Mitochondrien [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 80010 theoret. pI (pH) = 8,05	SK-N-SH CaOv-3 A549 A-375 A-673 MCF-7 Hela	120 195 253 236 295 121 294 209	33 40 47 43 44 25 43 38	6,25 6,20 6,18 6,40 6,30 6,35 6,40 6,50
Q9NTK6	Q9NTK6	88,1% Homolog der Isoform von HSP90-beta theoret. Mol.gew. (Da) = 84843 theoret. pI (pH) = 5,26	A-673	74 85	17 20	5,18 5,55
Q96GW1	Q96GW1	ähnlich dem Tumor-Rejection-Antigen (gp96) 1 theoret. Mol.gew. (Da) = 35449 theoret. pI (pH) = 4,62	Saos-2	69	15	4,80
Q92598	H105_HUMAN	Hitzeschock-Protein 105 kDa theoret. Mol.gew. (Da) = 96864 theoret. pI (pH) = 5,28	CaOv-3 A-673 MCF-7 Hela	101 77 142 67	21 18 25 20	5,33 5,45 5,48 5,43

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P08107	HS71_HUMAN	Hitzeschock 70 kDa-Protein 1 theoret. Mol.gew. (Da) = 70052 theoret. pI (pH) = 5,48	Saos-2	272	41	5,55
			HCT 116	209	33	5,60
			A549	105	22	5,60
			HL-60	285	38	5,60
			A-375	295	40	5,60
			A-673	84 98	17 19	5,60 5,55
			MCF-7	95	19	5,63
			Hela	349	45	5,60
P54652	HS72_HUMAN	Hitzeschock-verwandtes 70 kDa-Protein 2 theoret. Mol.gew. (Da) = 70020 theoret. pI (pH) = 5,56	SK-N-SH	82	21	5,64
P34932	HS74_HUMAN	Hitzeschock 70 kDa-Protein 4 theoret. Mol.gew. (Da) = 94299 theoret. pI (pH) = 5,18	SK-N-SH	213	39	5,25
			A549	149	32	5,27
			HL-60	189	35	5,25
			A-673	216	37	5,25

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P38646	GR75_HUMAN	Stress-70-Protein, Mitochondrien [Präkur- sor] theoret. Mol.gew. (Da) = 73680 theoret. pI (pH) = 5,87	Saos-2	169	31	5,60
			SK-N-SH	170 153	26 32	5,57 5,61
			HCT 116	174 256	36 41	5,52 5,61
			CaOv-3	177	28	5,50
			A549	278	43	5,55
P38646	GR75_HUMAN	Stress-70-Protein, Mitochondrien [Präkur- sor]	HL-60	275 123 385 168	42 24 50 30	5,60 5,65 5,60 5,55
			A-375	215 303 207 281 259 305	36 44 36 41 44 38	5,65 5,55 5,55 5,62 5,45 5,62
				189	28	5,05
			SK-N-SH	110	23	5,20
			HCT 116	133	26	5,05
P11021	GR78_HUMAN	78 kDa Glucose-reguliertes Protein [Präkur- sor] theoret. Mol.gew. (Da) = 72332 theoret. pI (pH) = 5,07	CaOv-3	232	41	5,13

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P11021	GR78_HUMAN	78 kDa-Glucose-reguliertes Protein [Präkur- sor]	A549	365 223	48 36	5,15 5,10
			HL-60	342 328	31 43	5,08 5,11
			A-375	389 350 368	49 47 46	5,08 5,11 5,12
			A-673	325 226 304	45 32 43	5,15 5,19 5,21
			Hela	153 119 362	28 24 45	5,50 4,90 5,10
Q9UK02	Q9UK02	BiP-Protein [Fragment] theoret. Mol.gew. (Da) = 70931 theoret. pI (pH) = 5,23	MCF-7	111 145	18 24	5,3 5,3
P11142	HS7C_HUMAN	Hitzeschock-verwandtes 71 kDa-Protein theoret. Mol.gew. (Da) = 70898 theoret. pI (pH) = 5,37	Saos-2	188 77 168	34 20 33	5,42 6,10 5,50
			SK-N-SH	144	30	5,35
			HCT 116	204	38	5,45
			CaOv-3	143 149 134	30 28 28	5,51 5,28 5,38
			A549	195 132 88	26 28 16	5,32 5,50 5,38
			HL-60	179 261 291 229	30 40 42 36	5,38 5,45 5,50 5,55

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P11142	HS7C_HUMAN	Hitzeschock-verwandtes 71 kDa-Protein	A-375	299 257 148 118 285	46 40 27 23 44	5,48 5,43 6,10 5,28 5,38
			A-673	170 173 187 124	30 32 33 23	5,95 5,65 5,40 5,58
			MCF-7	201 254	28 37	5,56 5,48
			Hela	85 158	21 27	5,90 5,40
Q9Y4L1	OXRP_HUMAN	150 kDa Sauerstoff-reguliertes Protein [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 111335 theoret. pI (pH) = 5,16	MCF-7	236 312	37 43	5,35 5,36
Q96IS6	Q96IS6	ähnlich dem Hitzeschock-verwandten 71-kDa- Protein theoret. Mol.gew. (Da) = 64602 theoret. pI (pH) = 5,36	HL-60	77	13	6,12

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P10809	CH60_HUMAN	60 kDa Hitzeschock-Protein, Mitochondrien [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 61054 theoret. pI (pH) = 5,70	SaOs-2	94	12	5,42
				201	40	5,35
				217	42	5,28
			SK-N-SH	109	27	5,48
				161	34	5,35
				89	17	5,28
P10809	CH60_HUMAN	60 kDa Hitzeschock-Protein, Mitochondrien [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 61054 theoret. pI (pH) = 5,70	HCT 116	223	39	5,45
				195	29	5,40
				200	39	5,32
			CaOv-3	229	35	5,37
				65	8	5,35
			A549	137	28	5,63
			HL-60	159	28	5,32
				421	48	5,40
				355	49	5,49
			A-375	123	24	5,49
P10809	CH60_HUMAN	60 kDa Hitzeschock-Protein, Mitochondrien [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 61054 theoret. Mol.gew.pI (pH) = 5,70		383	49	5,32
				459	49	5,40
				459	57	5,40
			A-673	203	29	5,38
				62	13	5,38
				311	44	5,43
P10809	CH60_HUMAN	60 kDa Hitzeschock-Protein, Mitochondrien [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 61054 theoret. Mol.gew.pI (pH) = 5,70	Hela	336	47	5,30
				439	56	5,40
				92	19	5,25

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P17987	TCPA_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, alpha-Untereinheit theoret. Mol.gew. (Da) = 60343 theoret. pI (pH) = 5,80	Saos-2	218 79	40 14	5,82 5,75
			SK-N-SH	148	28	5,83
			HCT 116	92	18	5,82
			CaOv-3	207	34	5,80
			A549	161	24	5,72
P17987	TCPA_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, alpha-Untereinheit	HL-60	292	44	5,83
			A-375	422	52	5,85
			MCF-7	233 206	31 31	5,88 5,79
			Hela	228	32	5,85

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P78371	TCPB_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, beta-Untereinheit theoret. Mol.gew. (Da) = 57488 theoret. pI (pH) = 6,01	Saas-2	69	21	6,10
			SK-N-SH	178 83	25 23	6,00 6,10
			HCT 116	195	35	6,12
			CaOv-3	148	28	6,08
			A549	158 73	31 19	6,02 6,02
			HL-60	87	24	6,13
P78371	TCPB_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, beta-Untereinheit	A-375	217	35	6,03
			A-673	194	32	6,05
			Hela	98	23	6,15

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P49368	TCPG_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, gamma-Untereinheit theoret. Mol.gew. (Da) = 60402 theoret. pI (pH) = 6,10	Saos-2	110	21	6,10
			SK-N-SH	84	15	6,10
			HCT 116	66	15	6,12
			A549	257 170	34 30	6,01 5,90
			HL-60	256	33	6,15
			A-375	237	34	6,12
P48643	TCPE_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, epsilon-Untereinheit theoret. Mol.gew. (Da) = 59671 theoret. pI (pH) = 5,45	Hela	106	20	6,15
			Saos-2	156	30	5,57
			HCT 116	107	20	5,50
			A549	127 111	25 23	5,40 5,48
			MCF-7	75	16	5,91
			Hela	204	35	5,54
P48643	TCPE_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, epsilon-Untereinheit				

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P40227	TCPZ_HUMAN	T-Komplex-Protein 1, zeta-Untereinheit theoret. Mol.gew. (Da) = 58024 theoret. pI (pH) = 6,24	Saos-2	160	32	6,29
			SK-N-SH	188	31	6,30
			HCT 116	141	26	6,37
			CaOv-3	90	15	6,15
			A549	185	31	6,20
			HL-60	238	35	6,36
			A-375	253	37	6,40
			A-673	181 198	31 33	6,20 6,35
			MCF-7	235	38	6,35
			Hela	155 327	29 43	6,30 6,40

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
Q9BU08	Q9BU08	zu 96% homolog mit der Isoform von T-Kom- plex-Protein 1, epsilon-Untereinheit theoret. Mol.gew. (Da) = 59468 theoret. pI (pH) = 5,45	SK-N-SH	77	17	5,79
				86	20	5,64
				133	29	5,60
			HCT 116	126	29	5,60
			A549	215 233	37 38	5,52 5,60
P31689	DJA1_HUMAN	DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 1 theoret. Mol.gew. (Da) = 44868 theoret. pI (pH) = 6,65	HL-60	275 197	38 29	5,60 5,65
			A-375	303	43	5,60
			A-673	117	21	5,60
			MCF-7	271	36	5,63
			A549	108	20	6,80
O60884	DJA2_HUMAN	DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 2 theoret. Mol.gew. (Da) = 45745 theoret. pI (pH) = 6,06	SK-N-SH	80	16	6,05
Q9UBS4	DJBB_HUMAN	DnaJ-Homolog-Unterfamilie B-Mitglied 11 [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 40513 theoret. pI (pH) = 5,81	SK-N-SH	85	16	6,00
			A549	97	14	6,02
			Hela	93	16	6,05

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P07237	PDI_HUMAN	Protein-Disulfid-Isomerase [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 57116 theoret. pI (pH) = 4,76	CaOva3	127	20	4,94
			A549	95	8	4,99
			HL-60	146 83	21 14	4,90 4,90
P30101	PDA3_HUMAN	Protein-Disulfid-Isomerase A3 [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 56782 theoret. pI (pH) = 5,98	Saos-2	112 321	17 44	5,73 5,63
			SK-N-SH	122 112 103	18 24 21	5,68 5,73 5,78
			HCT 116	132 189	24 32	5,78 5,73
			CaOv-3	158 120 146	28 24 23	5,77 5,72 5,66
			A549	321	44	5,70
P30101	PDA3_HUMAN	Protein-Disulfid-Isomerase A3 [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 56782 theoret. pI (pH) = 5,98	HL-60	339 197	41 25	5,74 5,74
			A-375	219 233 293	34 35 37	5,70 5,78 5,73
			A-673	169	25	5,80
			MCF-7	185	26	5,80

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
Q15084	PDA6_HUMAN	Protein-Disulfid-Isomerase-verwandtes- Protein 5 theoret. Mol.gew. (Da) = 48121 theoret. pI (pH) = 4,95	Saas-2	69	14	5,15
			A549	131	20	5,20
			HL-60	121	19	5,25
Q15084	PDA6_HUMAN	Protein-Disulfid-Isomerase-verwandtes- Protein 5	A-375	226 88	29 15	5,20 5,25
			A-673	130 93	20 15	5,25 5,22
			Hela	217	28	5,18
P05092	PPIA_HUMAN	Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A theoret. Mol.gew. (Da) = 17881 theoret. pI (pH) = 7,82	SK-N-SH	63	11	6,55
			A549	102 112	17 16	6,78 6,35
			HL-60	137	20	6,35
P31948	IEFS_HUMAN	Stress-induziertes Phosphoprotein 1 theoret. Mol.gew. (Da) = 62639 theoret. pI (pH) = 6,40	A-375	67	10	5,25
			A-673	68 143	10 18	6,77 7,70
			SK-N-SH	93 206	20 36	6,00 6,57
			HCT 116	253	38	6,30

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P31948	IEFS_HUMAN	Stress-induziertes Phosphoprotein 1 theoret. Mol.gew. (Da) = 62639 theoret. pI (pH) = 6,40	CaOv-3	150	27	6,34
			A549	180 455	29 55	6,52 6,38
			HL-60	185	26	6,70
			A-375	423 347	51 41	6,60 6,40
			A-673	114 338 198	20 50 30	6,20 6,35 6,65
			MCF-7	391 415 135	47 50 24	6,35 6,50 6,65
			HeLa	444 344 143	53 49 25	6,40 6,70 6,30
			HL-60	68	11	5,15
P50502	PPIA_HUMAN	Hsc70-interagierendes Protein theoret. Mol.gew. (Da) = 41331 theoret. pI (pH) = 5,18	A-375	93	18	5,19

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
Q02790	FKB4_HUMAN	FK506-bindendes Protein 4 theoret. Mol.gew. (Da) = 51673 theoret. pI (pH) = 5,35	SK-N-SH	87	15	5,53
			A549	197	27	5,40
			HL-60	171	27	5,55
			A-375	93 197	19 31	5,51 5,48
			MCF-7	127	21	5,62
P04792	HS27_HUMAN	Hitzeschock-27 kDa-Protein theoret. Mol.gew. (Da) = 22782 theoret. pI (pH) = 5,98	SK-N-SH	87	13	5,89
			HCT 116	68	8	5,65
			A549	130	14	5,60
			HL-60	91	13	5,95
			MCF-7	197 173 201 201	21 20 22 22	5,76 5,71 5,95 5,70
P04792	HS27_HUMAN	Hitzeschock-27 kDa-Protein theoret. Mol.gew. (Da) = 22782 theoret. pI (pH) = 5,98	Hela	160 168	18 18	5,65 6,00

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
P30040	ER29_HUMAN	Endoplasmatisches Retikulum-Protein ERp29 [Präkursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 28993 theoret. pI (pH) = 6,77	SK-N-SH A549 A-375 MCF-7 Hela	107 135 82 120 115 153 249	17 17 12 19 16 18 30	6,08 5,94 5,70 5,75 6,10 6,15 6,10
Q9UHV9	PFD2_HUMAN	Prefoldin-Untereinheit 2 theoret. Mol.gew. (Da) = 16647 theoret. pI (pH) = 6,20	SK-N-SH Hela	68 165	8 16	6,00 6,05
Q15765	PFD3_HUMAN	Prefoldin-Untereinheit 3 theoret. Mol.gew. (Da) = 21448 theoret. pI (pH) = 6,63	Hela	181	21	6,20
O95433	AHA1_HUMAN	Aktivator von 90 kDa Hitzeschock-Protein ATPase-Homolog 1 theoret. Mol.gew. (Da) = 38274 theoret. pI (pH) = 5,41	SK-N-SH Hela	86 75	17 12	5,52 5,54
O95816	BAG2_HUMAN	molekularer Chaperon-Regulator-2 der BAG- Familie theoret. Mol.gew. (Da) = 23771 theoret. pI (pH) = 6,25	A549 Hela	66 78	9 10	6,10 5,85
Q9HAV7	GRE1_HUMAN	GrpE-Protein-Homolog 1, Mitochondrien [Prä- kursor] theoret. Mol.gew. (Da) = 24279 theoret. pI (pH) = 8,24	A-673	166	20	5,90

Hin- terle- gungs- Nr.	abgekürzter Name	Protein-Name	Zell- linien	Gesamt- bewertung	überein- stimmende Peptide	beobach- teter pI
Q9Y2S5	Q9Y2S5	HSPC015 theoret. Mol.gew. (Da) = 38608 theoret. pI (pH) = 5,93	HL-60	179	22	5,90

Patentansprüche

1. Verfahren zur differentiellen Diagnose von Tumoren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Osteosarkom, Knochenmark-Neuroblastom, colorektalem Karzinom, Eierstock-Adenokarzinom, Lungen-Karzinom, akuter Promyelozyten-Leukämie, malignem Hautmelanom, Rhabdomyosarkom, Brustkrebs und Gebärmutterhals-Karzinom bei einem Menschen, umfassend die folgenden Schritte:
 - Vorsehen einer Probe einer Körperflüssigkeit oder einer Gewebeprobe eines Menschen,
 - Feststellen des Vorhandenseins von mindestens acht Proteinen ausgewählt aus der Gruppe der Protein-Familien, bestehend aus
 - der Hitzeschock-Protein-90-Familie, bestehend aus Hitzeschock-Protein HSP90-alpha, Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein - 75 kDa, 88,1 % Homolog der Isoform von HSP90-beta (DKFZ-p761K0511) und Tumor-Rejection-Antigen (gp96) 1,
 - der Hitzeschock-Protein-70-Familie, bestehend aus Hitzeschock-Protein 105 kDa, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Hitzeschock-verwandtem 70 kDa-Protein 2, Hitzeschock-70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-verwandtem Protein, BiP-Protein, Hitzeschock-verwandtes 71 kDa-Protein, 150 kDa-Sauerstoff-reguliertem Protein und Hitzeschock-70kDa-Protein 8,
 - der TCP-1/cpn60-Chaperonin-Familie, bestehend aus Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, und hypothetischem Protein, das zu 96% homolog ist mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit,
 - der DnaJ-Familie, bestehend aus DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 1, DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 2 und DnaJ-Homolog-Unterfamilie B-Mitglied 11 und
 - der Thioredoxin-Familie, bestehend aus Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase A3 und Protein-Disulfid-Isomerase A6,
 und ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Peptidyl-Prolylcistrans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Er-p29, Prefoldin-Untereinheit 2, Prefoldin-Untereinheit 3, Aktivator des 90 kDa-Hitzeschock-Protein-ATPase-Homologs 1, molekularem Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie, Mitochondrien-GrpE-Protein-Homolog 1 und HSPC015, und
 - Diagnostizieren
 - von Osteosarkom, wenn das Vorhandensein von Tumor-Rejection-Antigen (gp96) 1 in der Probe festgestellt wird,
 - von Knochenmark-Neuroblastom, wenn das Vorhandensein von DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 2 in der Probe festgestellt wird,
 - von colorektalem Karzinom, wenn das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP 90-alpha, Hitzeschock-Protein HSP 90-beta, Endoplasmin, Hitzeschock- 70 kDa-Protein 1, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1 alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96 % homolog mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit ist, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Stress-induziertem Phosphoprotein 1 und Hitzeschock-27 kDa-Protein in der Probe festgestellt wird,
 - von Eierstock-Adenokarzinom, wenn das Vorhandensein von Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-Protein 105 kDa, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-

- Untereinheit, Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase A3 und Stress-induziertem Phosphoprotein 1 in der Probe festgestellt wird,
- von Lungen-Karzinom, wenn das Vorhandensein von DnaJ-Homolog-Unterfamilie A-Mitglied 1 in der Probe festgestellt wird,
 - von akuter Promyelozyten-Leukämie, wenn das Vorhandensein von Hitzeschock-70 kDa-Protein 8 und/oder HSPC015 in der Probe festgestellt wird,
 - von malignem Hautmelanom, wenn das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock 70 kDa-Protein 1, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96% homolog ist mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Peptidyl-Prolylcistrans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4 und endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29 in der Probe festgestellt wird,
 - von Rhabdomyosarkom, wenn das Vorhandensein von 88,1 % Homolog der Isoform von HSP90-beta (DK-Fzp76IK0511) und/oder Mitochondrien-GrpE-Protein-Homolog 1 in der Probe festgestellt wird,
 - von Brustkrebs, wenn das Vorhandensein von BiP-Protein und/oder 150 kDa-Sauerstoff-reguliertem Protein in der Probe festgestellt wird, und
 - von Gebärmutterhals-Karzinom, wenn das Vorhandensein von Prefoldin-Untereinheit 3 in der Probe festgestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Vorhandensein des mindestens acht Proteine festgestellt wird mit einem Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Protein-Massenspektrometrie, Antikörperbindung, Gel-Elektrophorese, vorzugsweise zweidimensionale Gel-Elektrophorese, Array-Technologie, vorzugsweise unter Verwendung eines Antikörper-Arrays, oder Kombinationen davon.
 3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Vorhandensein der mindestens acht Proteine festgestellt wird durch Bestimmen der für die mindestens acht Proteine kodierenden mRNAs.
 4. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die für die mindestens acht Proteine kodierender mRNAs bestimmt werden mit einem Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Array-Technologie, vorzugsweise unter Verwendung eines DNA-Arrays, Nukleinsäure-Amplifikation, vorzugsweise reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, Hybridisierungstechniken und Kombinationen davon.
 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass Osteosarkom diagnostiziert wird, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein 90-beta, Endoplasmin, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, Protein-Disulfid-Isomerase A3 und Protein-Disulfid-Isomerase A6 in der Probe festgestellt wird.
 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass Knochenmark-Neuroblastom diagnostiziert wird, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-verwandtem 70 kDa-Protein 2, Hitzeschock-70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit,

T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96% homolog ist mit der Isoform von T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, Dna-J-Homolog-Unterfamilie B Mitglied 11, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Peptidylprolylcistrans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29, Prefoldin-Untereinheit 2 und Aktivator von 90 kDa-Hitzeschock-Protein AT-Pase-Homolog 1 in der Probe festgestellt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass Lungen-Karzinom diagnostiziert wird, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP 90-alpha, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Hitzeschock-70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien 60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1 alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96 % homolog mit der Isoform der T-Komplex-Protein 1 epsilon-Untereinheit ist, DnaJ-Homolog-Unterfamilie B-Mitglied 11, Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Peptidyl-Prolylcistrans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Reticulum-Protein Erp29 und molekularem Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie in der Probe festgestellt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass akute Promyelozyten-Leukämie diagnostiziert wird, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-beta, Endoplasmin, Hitzeschock- 70 kDa-Protein-1, Hitzeschock 70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-gamma-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96% homolog mit der Isoform von T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit ist, Protein-Disulfid-Isomerase, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4 und Hitzeschock-27 kDa-Protein in der Probe festgestellt wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass Rhabdomyosarkom diagnostiziert wird, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-alpha, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-Protein 105 kDa, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Hitzeschock-70 kDa-Protein 4, Mitochondrien-Stress-70-Protein, 78 kDa Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96 % homolog mit der Isoform von T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit ist, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Peptidyl-Prolylcistrans-Isomerase A und Stress-induziertem Phosphoprotein 1, in der Probe festgestellt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass Brustkrebs diagnostiziert wird, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90-alpha, Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, Hitzeschock-Protein 105 kDa, Hitzeschock-70 kDa-Protein 1, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, T-Komplex-Protein 1-alpha-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 beta-Untereinheit, hypothetischem Protein, das zu 96 % homolog mit der Isoform von T-Komplex-Protein 1-epsilon-Untereinheit ist, Protein-Disulfid-Isomerase A3, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, und endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29 in der Probe festgestellt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass Gebärmutterhals-Karzinom diagnostiziert wird, wenn weiters das Vorhandensein von Hitzeschock-Protein HSP90- α , Hitzeschock-Protein HSP90- β , Endoplasmin, Mitochondrien-Hitzeschock-Protein 75 kDa, 78 kDa-Glucose-reguliertem Protein, Hitzeschock-verwandtem 71 kDa-Protein, Mitochondrien-60 kDa-Hitzeschock-Protein, T-Komplex-Protein 1- α -Untereinheit, T-Komplex-Protein 1- β -Untereinheit, T-Komplex-Protein 1- γ -Untereinheit, T-Komplex-Protein 1- ϵ -Untereinheit, T-Komplex-Protein 1 β -Untereinheit, DnaJ-Homolog-Unterfamilie B-Mitglied 11, Protein-Disulfid-Isomerase A6, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29, Prefolding-Untereinheit 2, Aktivator von 90 kDa-Hitzeschock-Protein ATPase-Homolog 1 und molekularem Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie in der Probe festgestellt wird.
12. Set zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die mindestens acht Proteine ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus mindestens einer Proteinfamilie ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus der Hitzeschock-Protein-90-Familie, der Hitzeschock-Protein-70-Familie, der TCP- I/cpn60-Chaperonin-Familie, der DnaJ-Familie und der Thioredoxin-Familie, und/oder der Gruppe bestehend aus Peptidyl-Prolylcistrans-Isomerase A, Stress-induziertem Phosphoprotein 1, hsc70-interagierendem Protein, FK506-bindendem Protein 4, Hitzeschock-27 kDa-Protein, endoplasmatischem Retikulum-Protein Erp29, Prefoldin-Untereinheit 2, Prefoldin-Untereinheit 3, Aktivator des 90 kDa-Hitzeschock-Protein-ATPase-Homologs 1, molekularem Chaperon-Regulator-2 der BAG-Familie, Mitochondrien-GrpE-Protein-Homolog 1 und HSPC015, wobei das Set umfasst
 - einen Probenbehälter,
 - Mittel zur Detektion der mindestens acht Proteine, insbesondere Antikörper, welche die Proteine spezifisch erkennen, und gegebenenfalls
 - Mittel zum Bestimmen der Menge der detektierten Proteine.
13. Set nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Mittel zur Detektion der mindestens acht Proteine und die Mittel zum Bestimmen der Menge der detektierten mindestens acht Proteine konjugierte, vorzugsweise markierte, Antikörper, insbesondere radioaktiv oder Fluoreszenzmarkierte Antikörper sind.
14. Set nach Anspruch 12 oder 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Mittel zur Detektion der mindestens acht Proteine an einer festen Oberfläche immobilisiert sind.

Hierzu 10 Blatt Zeichnungen

Fig.1

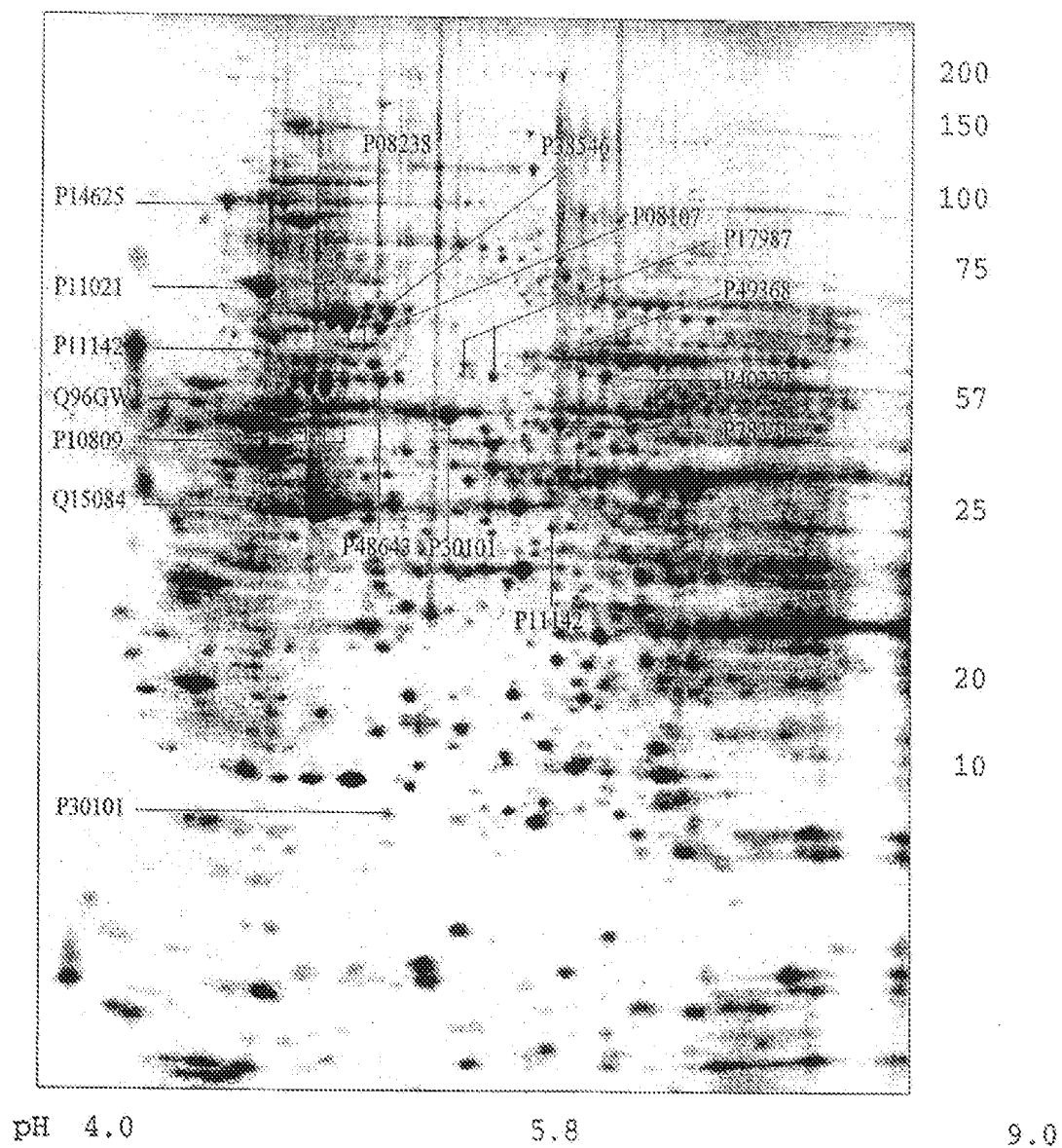


Fig.3

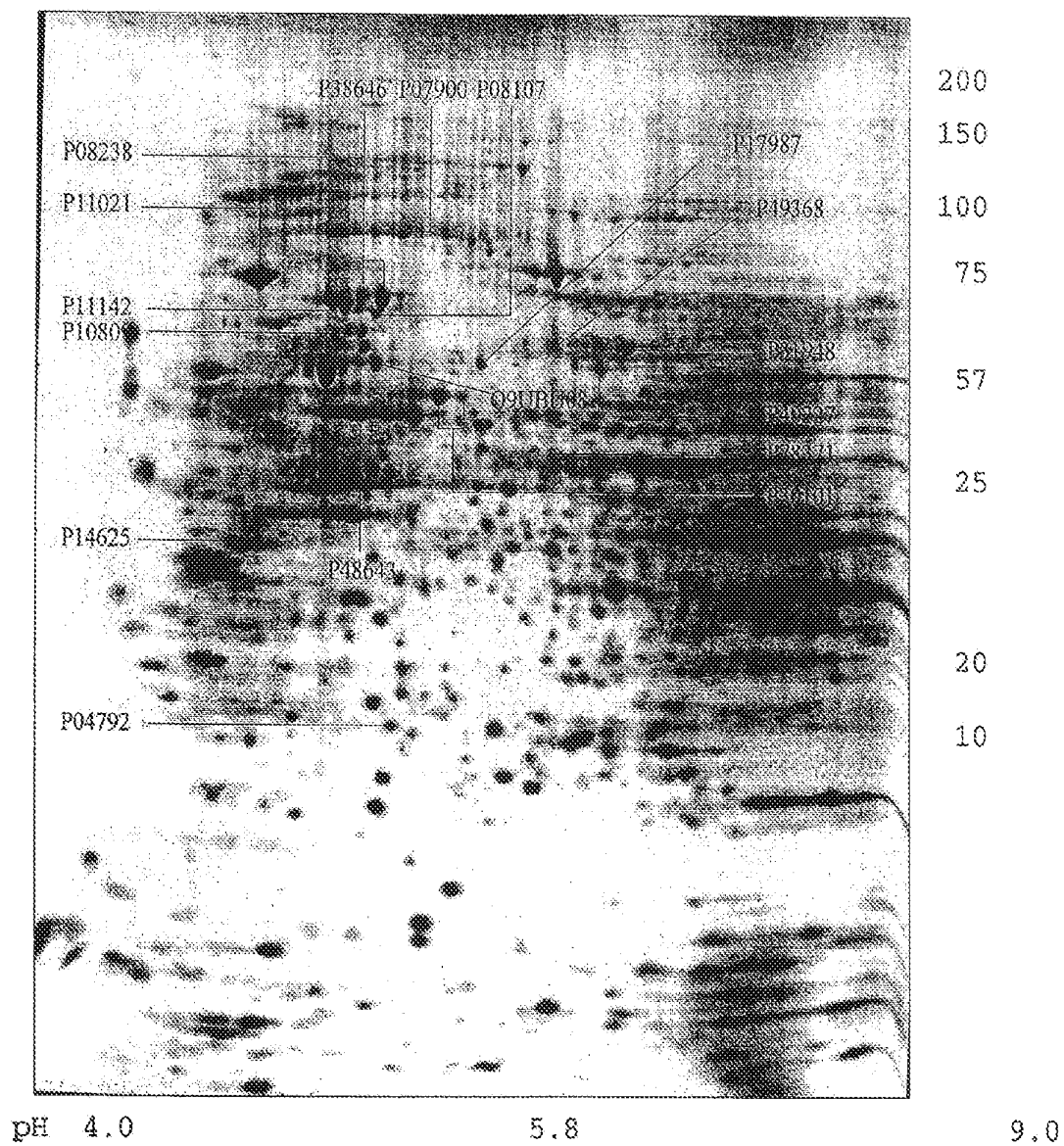


Fig.4

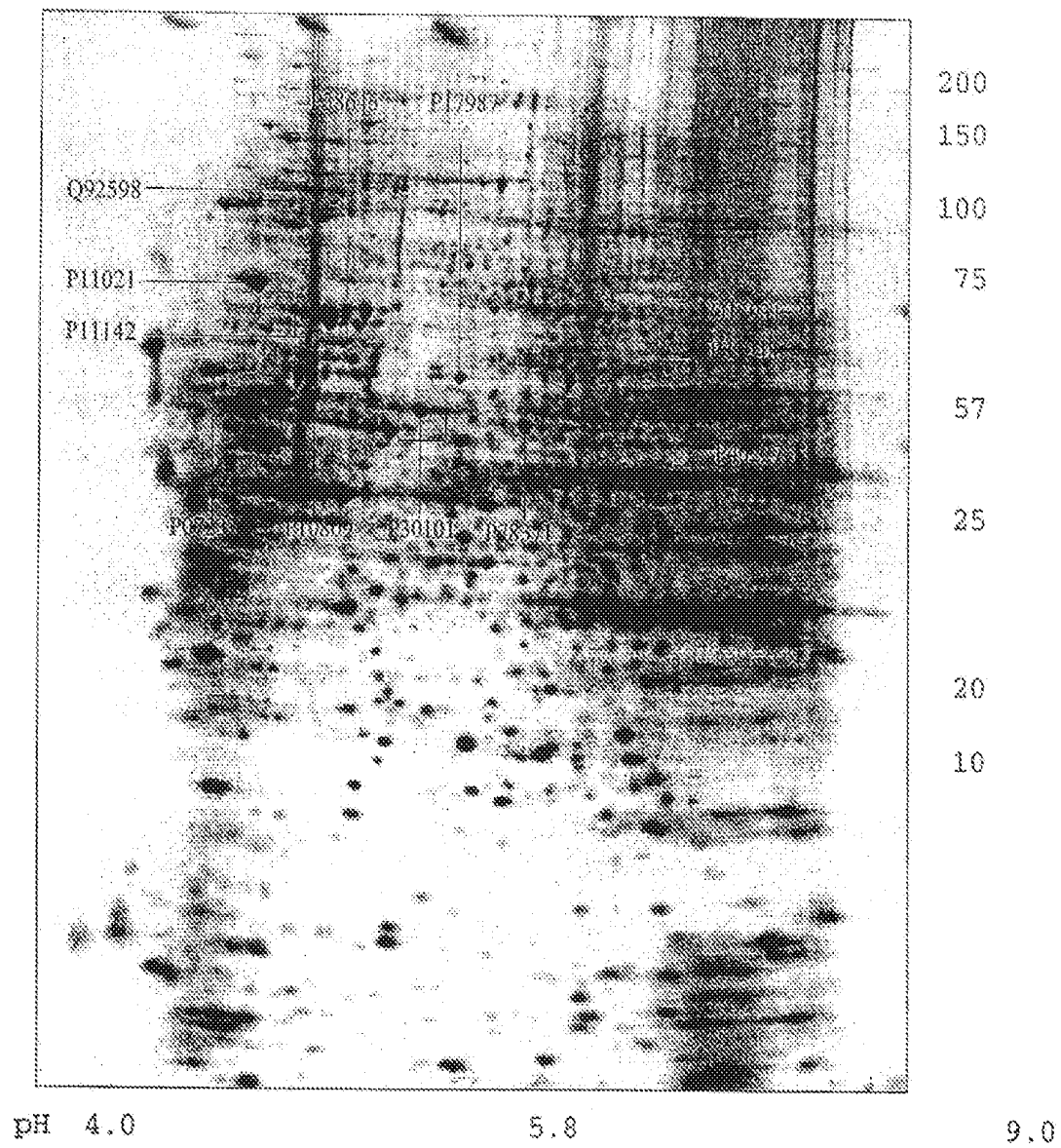


Fig.5

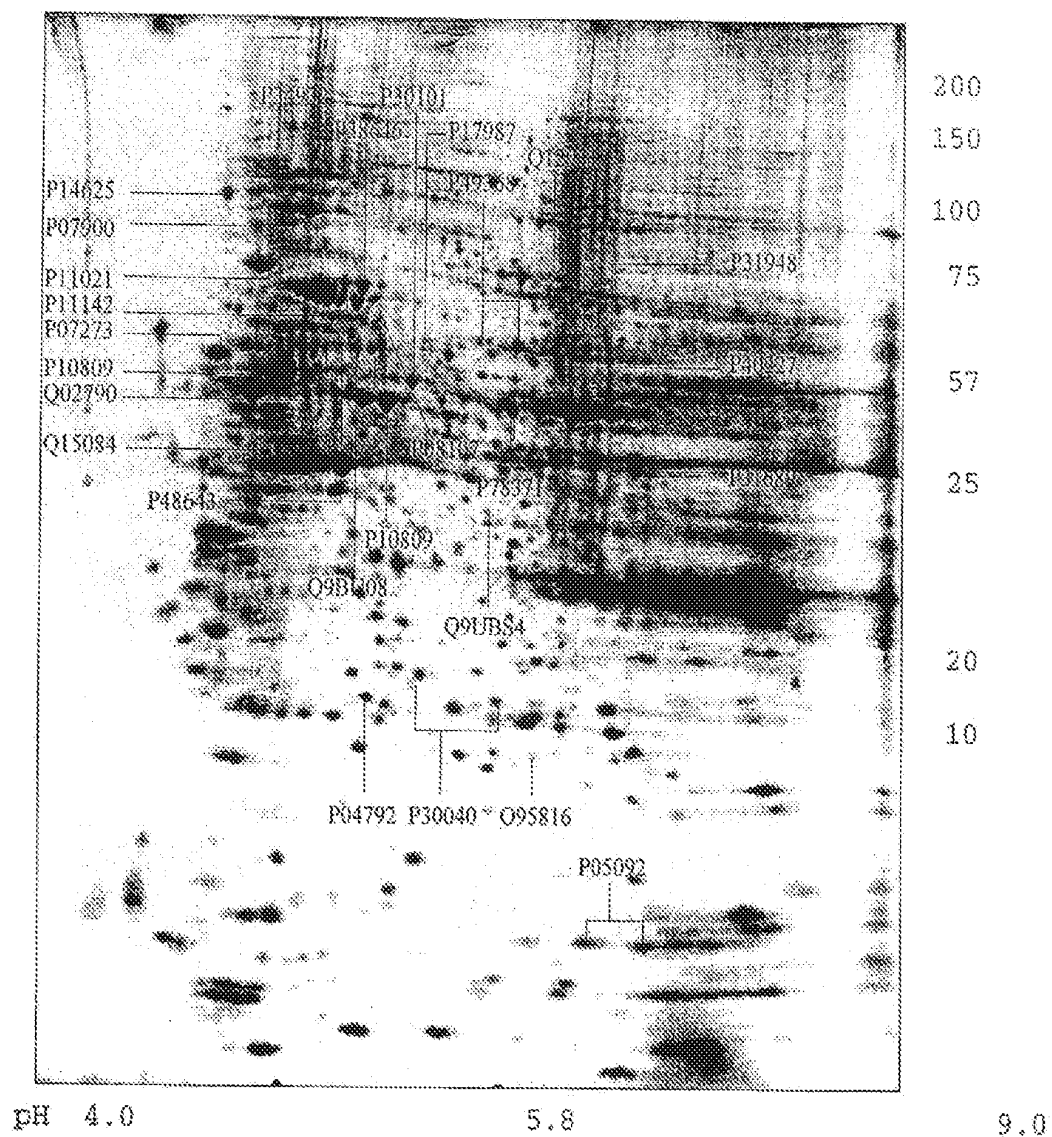
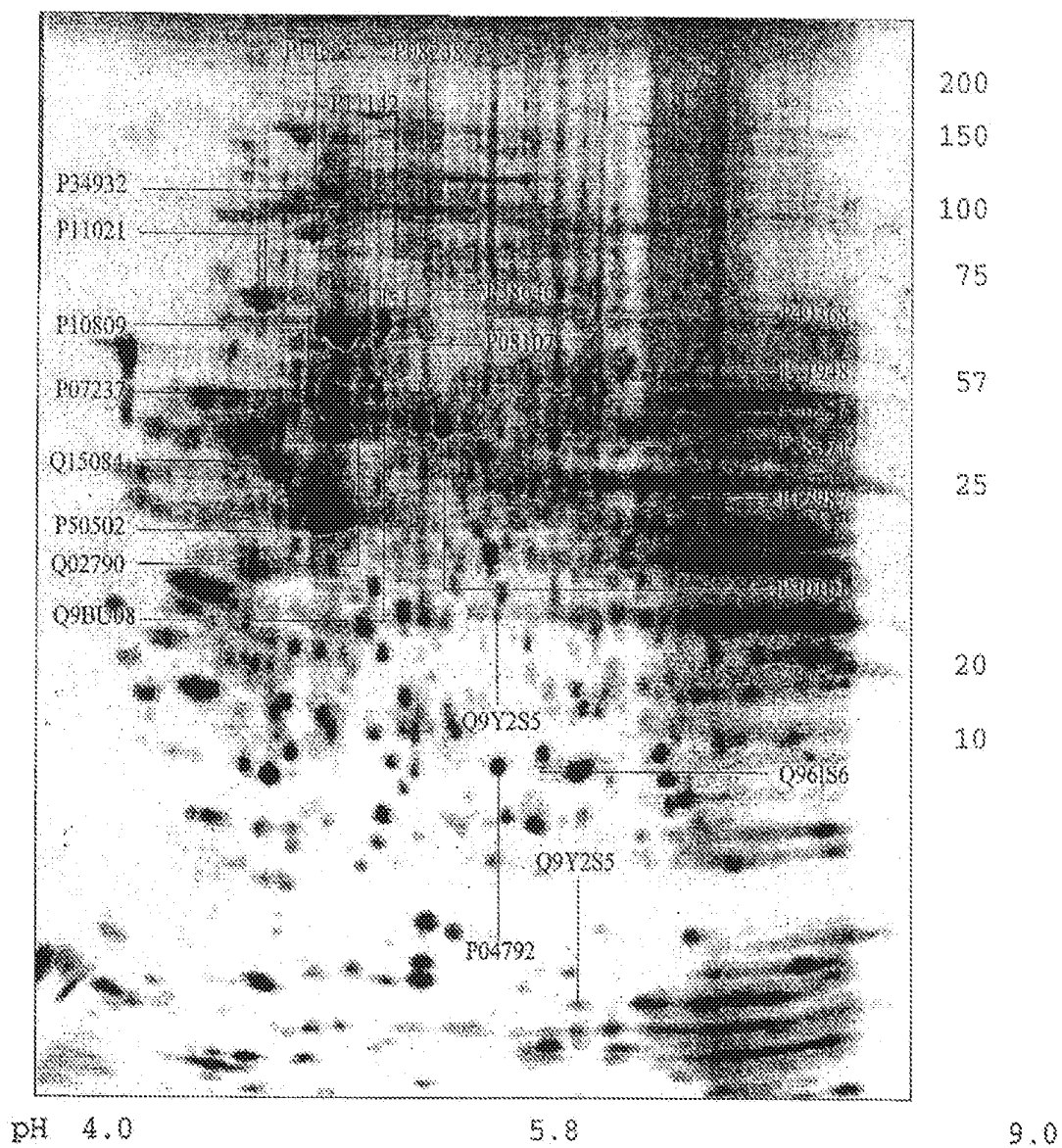


Fig. 6



P19845 P02238 P08105 Q12931
P11112 P49168
P38546
P11021
P10809 P38646 P30101
P14625 P10803
P02790 P38471 P40155
Q15084 P50502 P11142
P30040 P05092

9.0

Fig.9

