



**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

**FAKULTÄT FÜR MEDIZIN**

**Zeit- und dosisabhängige Auswirkungen der Bestrahlung auf die Expression  
von mHsp70 auf humanen Glioblastomzellen**

Helena Maria Fellingner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Gabriele Multhoff
2. Priv.- Doz. Dr. Friederike Liesche-Starnecker

Die Dissertation wurde am 08.02.2021 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.06.2021 angenommen.

„Die wunderbare Zumutung  
selbst denken dürfen zu müssen“

Meinen Eltern gewidmet

# I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis .....	I
II	Abkürzungsverzeichnis .....	4
III	Zielsetzung.....	6
1	Einleitung .....	7
1.1	Grundlagen der Onkologie .....	7
1.1.1	Eigenschaften von Tumorzellen.....	7
1.1.2	Tumormikroumgebung.....	13
1.1.3	Individualisierte Tumorthherapie .....	15
1.2	Das Immunsystem und seine Rolle in der Onkologie .....	17
1.2.1	Immunsystem: Funktion, Organisation und Mechanismen .....	17
1.2.2	Zellen des Immunsystems .....	18
1.2.3	Rolle des Immunsystems in der Onkologie: Immunediting .....	21
1.3	Grundlagen der Strahlentherapie in der Onkologie .....	22
1.4	Hitzeschockprotein 70 .....	23
1.4.1	Überblick.....	23
1.4.2	Aufbau und Funktion.....	24
1.4.3	Regulation.....	25
1.4.4	Immunmodulierende Funktion.....	25
1.4.5	Anti-apoptotische Funktion .....	26
1.4.6	Therapeutische Relevanz .....	28
1.5	Glioblastoma multiforme (GBM) .....	30
1.5.1	Epidemiologie des Glioblastoms .....	30
1.5.2	Histologie und Histopathologie des Glioblastoms .....	30
1.5.3	Diagnostik des Glioblastoms.....	31
1.5.4	Therapie des Glioblastoms .....	31
2	Material .....	34
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	34
2.2	Medien, Puffer und Lösungen .....	34
2.2.1	Zellkultur .....	34

2.2.2	FACS .....	34
2.3	Antikörper .....	35
2.4	Zelllinie .....	35
2.5	Verbrauchsmaterial .....	35
2.6	Geräte .....	36
3	Methoden .....	37
3.1	Zellkultur .....	37
3.1.1	Kultivierung der Zellen .....	37
3.1.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen .....	37
3.1.3	Aussaat der Zellen .....	38
3.1.4	Zellzahlbestimmung .....	38
3.2	Bestrahlung der Zellen .....	38
3.3	FACS-Analyse .....	39
3.3.1	Viabilität (PI-Exklusion) .....	40
3.3.2	Statistische Auswertung .....	40
4	Ergebnisse .....	42
4.1	Zellzahlentwicklung .....	42
4.2	Scheinbestrahlung 0 Gy (sham) .....	43
4.3	Oberflächenexpression Hsp70 nach Bestrahlung .....	44
4.3.1	Zeitabhängige Effekte .....	44
4.3.2	Dosisabhängige Effekte .....	47
4.3.3	Zusammenfassung zeit- und dosisabhängiger Effekte .....	50
5	Diskussion .....	53
5.1	Zusammenfassung Hauptergebnisse .....	53
5.1.1	Bedeutung der Hsp70-Proteine .....	53
5.1.2	Ionisierende Strahlung im Hinblick auf mHsp70 Expression .....	55
5.1.3	Hsp70 aus immunologischer Sicht .....	56
5.2	Zeit- und dosisabhängige Auswirkungen der Bestrahlung auf die Expression von mHsp70 auf humanen Glioblastomzellen .....	58
5.2.1	Niedrige mHsp70 Expression bei sham Bestrahlung .....	58
5.2.2	Strahlendosis 2 Gy/4 Gy: "late onset" und hoher Spitzenwert .....	59
5.2.3	Strahlendosis 6 Gy: „early onset“ und andauernde Überexpression .....	61

5.2.4	Dosisunabhängig: Absinken der Werte auf Ausgangswert .....	63
5.3	Ausblick und Einordnung der Arbeit .....	65
6	Zusammenfassung.....	67
7	Abbildungsverzeichnis .....	69
8	Tabellenverzeichnis .....	70
9	Literaturverzeichnis.....	71
10	Danksagung.....	85
11	Erklärung .....	86
12	Lebenslauf .....	87
13	Publikationen .....	87

## II Abkürzungsverzeichnis

MDSCs	<i>myeloid derived suppressor cell</i>
Apaf-1	<i>apoptosis protease activating factor- 1</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
ATP	<i>adenosintriphosphate</i>
Bax	<i>Bcl-associated X protein</i>
Bcl	<i>B cell lymphoma</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CSC	<i>cancer stem cell</i>
CTL	<i>cytotoxic T cell</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
DISC	<i>death inducing signal complex</i>
DMSO	<i>dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>desoxyribonucleinsäure</i>
EGF	<i>epithelial growth factor</i>
EMT	<i>epthelial-mesenchymal transition</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescent activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FSC	<i>forwardscatter</i>
GBM	<i>glioblastoma multiforme</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Gy	<i>gray</i>
HMGB1	<i>high mobility group protein B1</i>
HSE	<i>heat shock element</i>
HSF-1	<i>heat shock factor- 1</i>
Hsp70	<i>heat shock protein 70</i>
HSR	<i>heat shock response</i>
IFN- $\gamma$	<i>interferon gamma</i>
IL	<i>interleukin</i>
JNK	<i>c-Jun-N-terminal kinase</i>
KPS	<i>karnsofsky performance status</i>
kv	<i>kilovolt</i>
mA	<i>milli Ampere</i>
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miRNAs	<i>micro ribonucleine acid</i>
MMP9	<i>matrixmetalloprotease 9</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin kinase</i>
NBD	<i>nucleotide binding domain</i>
NK	<i>natural killer cells</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
PARP	<i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PI	<i>propodiumiodid</i>
PI3-Kinase	<i>phophoinositol-3-kinase</i>
PIP3	<i>phosphatidylinositol-3-phosphate</i>
PKB	<i>proteinkinase B</i>

proMMP-9.....	<i>pro-metallomatrixprotease</i>
PTEN.....	<i>phosphate and tensin homolog</i>
RB.....	<i>retinoblastoma gene</i>
RCT.....	<i>radiochemotherapy</i>
ROS.....	<i>reactive oxygen species</i>
RT.....	<i>room temperature</i>
SBD.....	<i>substrate binding domain</i>
SPIONs.....	<i>superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>
SSC.....	<i>sidescatter</i>
TGF.....	<i>transforming growth factor</i>
TGF $\beta$ .....	<i>tumor growth factor <math>\beta</math></i>
TNF- $\alpha$ .....	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
Tregs.....	<i>regulatory T cell</i>
TSP-1.....	<i>thrombospondin-1</i>
VEGF.....	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR.....	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO.....	<i>world health organisation</i>

### III Zielsetzung

Glioblastoma multiforme ist die häufigste und ebenso bösartigste Form der Hirntumore. Gleichzeitig ist es mit der schlechtesten 5-Jahres Überlebenschance aller menschlichen Tumore überhaupt assoziiert (Krex et al., 2007). Obwohl mittlerweile komplexe, ineinandergreifende Therapiekonzepte entwickelt wurden, die neben chirurgischen Eingriffen auch lokale Strahlen- sowie systemische Chemotherapien (u.a. Temozolomid) umfassen, liegt die mediane Überlebenszeit nach Diagnose immer noch nur bei 15-18 Monaten (Stupp et al., 2009). Gründe für das geringe Ansprechen auf die diversen Therapiekonzepte sind u.a. die hohe Zellheterogenität, das infiltrative Wachstum des Tumors und eine hohe Therapieresistenz, welche dem Glioblastom zu eigen ist (Cloughesy et al., 2014). In den Fokus aktueller Forschungsarbeiten treten deshalb nun immer mehr individualisierte Therapieansätze, die u.a. gezielt das körpereigene Immunsystem stimulieren und somit eine weitere Therapievariante bieten.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem komplexen Zusammenspiel zwischen Tumorzellen und Immunsystem und geht im Genaueren auf die Expression von membrangebundenem Hsp70 als Zielstruktur für den Angriff durch NK-Zellen auf humanen Glioblastomzellen nach Bestrahlung ein. Ziel meiner medizinisch/experimentellen Doktorarbeit war es, die zeit- und dosisabhängige Expression von Hsp70-Proteinen zu eruieren, um anhand dessen zielführende Aussagen zu anschließende Therapieschemata konzipieren zu können.

Zunächst wurden humane Glioblastomzellen der Zelllinie U87 aufgrund unterschiedlicher Verweildauer in Kultur nach Bestrahlung in darauf abgestimmter Dichte (variierend von 250.000 an Tag 1 bis 10.000 für Tag 7) ausgesät. Anschließend erfolgte die Bestrahlung mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen zwischen 0 bis 6 Gy. Nachfolgend wurde die tägliche Messung der Expression des membrangebundenen Hsp70 mittels FACS-Analyse unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 vorgenommen.



# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen der Onkologie

### 1.1.1 Eigenschaften von Tumorzellen

Tumorzellen unterscheiden sich in erheblichem Maße von normalen Zellen des menschlichen Körpers. Mithilfe tumorspezifischer Eigenschaften, den sogenannten „hallmarks of cancer“ wird es neoplastischen Zellen ermöglicht, sich den Regulierungsmechanismen von normalen Körperzellen zu entziehen und dadurch an Autarkie zu gewinnen. Diese besonderen Merkmale ermöglichen den Tumorzellen ein für sie typisches nahezu ungebremstes Wachstum und Metastasierungsverhalten (Hanahan & Weinberg, 2011). Um die Tumorbilogie in ihrer Gänze zu verstehen, die Diversität der neoplastischen Erkrankungen und die Komplexität von Tumorgewebe erfassen zu können, werden im Folgenden die einzelnen Merkmale, die zur Tumorentstehung beitragen, näher beleuchtet.

#### 1.1.1.1 Aufrechterhaltung proliferativer Signale

Zellen des normalen, nicht neoplastischen Gewebes sind darauf bedacht, ein Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und -untergang zu wahren, was mithilfe kontrollierter Produktion und Freisetzung von Wachstums- und Apoptose-induzierenden Faktoren erreicht wird. Damit wird auf Dauer eine Homöostase bezüglich Zellzahl, Gewebs-architektur und -funktion gewährleistet (Hanahan & Weinberg, 2011).

Tumorzellen sind in der Lage diese Mechanismen zu umgehen und somit ein ungebremstes Zellwachstum zu ermöglichen. Sie stellen tumorspezifische Wachstumsfaktoren her, reagieren mit tumoreigenen Rezeptoren darauf und stellen dadurch eine autarke Proliferation sicher. Auch Wachstumsfaktoren, die normale Zellen stimulieren werden ausgeschüttet, um ein geeignetes Tumormikromilieu herzustellen (Cheng et al., 2008).

Zusätzlich wird durch den Eingriff in zelleigene Signalkaskaden die Anzahl der Rezeptorproteine durch somatische Mutation auf den Zellen erhöht, um gesteigerte Wachstumsraten zu ermöglichen. Beispielhaft kann hier der B-Raf Signalweg angeführt werden, durch den der MAP-Kinase sowie der PI3-Kinase Signalweg

aktiviert werden und die Akt/PKB Kaskade initiiert wird. Beide Signalwege führen durch aktivierte Wachstumsrezeptoren zu einer kontinuierlichen Zellproliferation.

Auch negative „feedback“ Mechanismen spielen für die tumoreigene Proliferationsmaschinerie eine große Rolle. Physiologisch liegt die Aufgabe von Rückkopplungsmechanismen darin, bei zu hoher Produktion eine zusätzliche Signalauslösung zu verhindern. Tumorzellen versuchen diese Feedbackschleifen zu unterbinden und Proliferationssignale zu verstärken. Im PTEN-Signalweg führen Mutationen im PTEN-Gen entgegen seiner eigentlichen Wirkung der Tumorsuppression durch Verstärkung des PI3K-Signalwegs zu unkontrolliertem Wachstum und Tumorneubildung. Ein bekannter Vertreter dieser Rückkopplungsmechanismen ist die PTEN-Phosphatase, die als Gegenspieler der PI3-Kinase eigentlich deren Produkt, das PIP3 abbaut. Geht die antagonistische Wirkung durch eine „loss-of-function“ Mutation im PTEN-Gen verloren, führt dies zu einer Verstärkung des PI3K-Signalwegs, Wachstum und Tumorneubildung werden begünstigt (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### **1.1.1.2 Vermeiden von Tumorsuppression**

Es ist für Tumorzellen nicht nur von entscheidender Bedeutung proliferationsfördernde Wirkung aufrechtzuerhalten, sondern in gleichem Maße, Einflussgrößen, die die Proliferation stoppen könnten, zu verhindern. Innerhalb des Zellzyklus stellen sogenannte „gatekeeper“ durch ihre regulierende Funktion eine geordnete Zellhomöostase sicher. Wichtige Vertreter der Tumorsuppressorgene sind das Retinoblastom Gen (RB) und p53. Durch intra-, als auch extrazellulären Input entscheiden sie als zentrale Kontrollpunkte im Zellzyklus über Proliferation, Seneszenz oder Apoptose (Hanahan & Weinberg, 2011). In Abwesenheit oder bei Defekten dieser Gene fehlt deren Kontrollfunktion, entartete Zellen werden nicht als maligne erkannt, vermehren sich weiter und führen zu einem für Tumorzellen charakteristischen, ungeordneten Wachstum.

#### **1.1.1.3 Apoptoseresistenz**

In normalen Zellen wird das Apoptose-Programm durch physiologische Stressfaktoren, wie Hypoxämie, Hypo- und Hyperthermie, sich verändernde pH-Werte und Hypoglykämie getriggert. Beim Ablauf der Apoptose unterscheidet man

zwischen zwei grundsätzlichen Signalwegen: dem extrinsischen, bei welchem der Zelle über Fas-Rezeptoren auf extrazellulärem Weg ein Trigger vermittelt wird, und den intrinsischen, bei welchem aufgrund intrazellulärer Faktoren das Apoptose-Programm initiiert wird. Als Endpunkt besitzen beide Signalwege die Aktivierung der Caspase 8/9, welche eine erneute proteolytische Kaskade initiiert, um die Zelle vollständig abzutöten und die Phagozytose einzuleiten. Normalerweise besteht bei nicht malignen Zellen ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen. Apoptose-fördernde Proteine wie Bax und Bak befinden sich in einer festen Bindung mit Apoptose-inhibierenden Proteinen, welche zur Bcl-Familie gezählt werden (Adams & Cory, 2007). Durch die Wechselwirkung beider Partner wird die Zellhomöostase im Gleichgewicht gehalten. Lösen sich Bak und Bax aus dieser Bindung geht die Integrität der Mitochondrienmembran verloren, das pro-apoptotische Signalprotein Zytochrom c wird freigesetzt und eine proteolytische Kaskade aktiviert, welche als Endpunkt den Zelltod und die Phagozytose nach sich zieht.

Tumorzellen versuchen sich dem programmierten Zelltod zu entziehen, indem sie durch eine „loss-of-function“ Mutation des Tumorsuppressorgens p53 einen Checkpoint im Zellzyklus umgehen und somit uneingeschränktes Wachstum erreichen. Eine weitere Alternative gibt die Modulation auf Ebene der pro- und anti-apoptotischen Proteine: eine Erhöhung von Bcl, beziehungsweise eine verminderte Expression von Bax/Bak (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### **1.1.1.4 Telomerstabilität**

Normale, nicht maligne Zellen durchlaufen je nach Entität eine limitierte Anzahl an Zellzyklen, bevor sie entweder in den Zustand der Seneszenz übergehen, einem Ruhemodus, in dem keine Proliferation stattfindet oder in Apoptose gehen. Als wichtigster Trigger für beide Wege gilt die Länge der Telomere, jener Polynukleotidketten, die am Ende von Chromosomen lokalisiert sind und bei jeder Zellteilung um ein Stück verkürzt werden. Telomere schützen die Chromosomen vor End-zu-End Fusionen, welche unmittelbar zu einem Aneinanderheften mehrerer Chromosomen und zu instabilen Karyotypen führen und die Zelle in die Apoptose treiben. Sind die Telomere stark verkürzt, kann diese Schutzfunktion nicht mehr gewährleistet werden, weshalb die Telomerlänge als Proliferationslimitation angesehen werden kann.

Die für die Verlängerung der Telomere zuständige Polymerase ist die sogenannte Telomerase. Telomerasen fügen neue Nukleotidsequenzen an die Enden der Chromosomen hinzu und verhindern somit die progressive Telomerverkürzung. Der Übergang in die Seneszenz, beziehungsweise Apoptose wird dadurch deutlich hinausgezögert und die Lebenszeit einer Zelle erheblich verlängert. In normalen Zellen werden Telomerasen kaum exprimiert, wohingegen sie in Tumorzellen zumeist überexprimiert werden.

#### **1.1.1.5 Angiogenese**

Tumore, als schnellwachsende und hochproliferative Gewebe, benötigen für ihr Wachstum einerseits viel Energie und Sauerstoff, andererseits die Möglichkeit durch hohen Zellumsatz anfallende Stoffwechselendprodukte abzutransportieren. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, ist es für neoplastisches Gewebe deshalb unabdingbar ein weitläufiges Gefäßnetzwerk auszubilden, um eine optimale Versorgung sicherzustellen (Hanahan & Weinberg, 2011).

Physiologisch findet die Angiogenese in der Embryonalphase und auch postnatal statt, stellt danach jedoch ihre Aktivität ein und wird im adulten Körper nur für Wundheilungsprozesse oder Wachstumsvorgänge und während des weiblichen Zyklus in Gang gesetzt. In Tumorgeweben führen verschiedene Wachstumsfaktoren zum sogenannten „angiogenic switch“, wodurch Neovaskularisation und Gefäßproliferation wieder ermöglicht wird (Hanahan & Folkman, 1996).

Charakteristischerweise tragen Gefäße in neoplastischen Geweben typische Merkmale, die sie von normalen Blutgefäßen unterscheiden: es finden sich viele Gefäßverzweigungen, Konvolute, undichte Stellen und vergrößerte Gefäße, die zu einem unphysiologischen Blutfluss, Mikrohämmorrhagien und ungleichmäßiger Sauerstoff- und Nährstoffversorgung führen.

Auch die Angiogenese unterliegt einem Kräftemessen zwischen inhibierenden und aktivierenden Mechanismen: „endothelial growth factor-A“ (VEGF-A) ist der bekannteste Vertreter der Angiogenese-stimulierenden Faktoren. Getriggert wird seine Ausschüttung durch Hypoxie und onkogene Signalkaskaden, Zielrezeptoren sind drei verschiedene Tyrosinkinasen (VEGFR-1-3) (Ferrara, 2010). Sein Gegenspieler TSP-1 bindet ebenso an Transmembranrezeptoren endothelialer Zellen, setzt inhibierende Kaskaden in Gang und dient als endogener Inhibitor,

physiologischer Regulator der Angiogenese und intrinsische Barriere gegen ungesteuerte Gefäßproliferation (Kazerounian et al., 2008).

#### **1.1.1.6 Invasion und Metastasierung**

Invasion und Metastasierungsverhalten werden durch Alterationen begünstigt, welche sich typischerweise im Genom von Tumorzellen befinden und die Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix Kontakte beeinflussen. Die als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) beschriebenen Vorgänge umfassen neben dem Verlust der normalen Zellkontakte sowohl Änderungen der Zellarchitektur und Expression von Matrix-abbauenden Enzymen, als auch eine erhöhte Motilität und gesteigerte Apoptoseresistenz (Peinado et al., 2004). Genauer muss hier die Familie der Cadherine beleuchtet werden: E-Cadherine vermitteln durch ihre Adhäsionsfunktion an epitheliale Zellen einen geordneten Gewebsaufbau. Geht durch „loss-of-function“ Mutation die ursprüngliche Struktur der E-Cadherine verloren, werden Invasion und Metastasierung begünstigt. N-Cadherine treten typischerweise bei migrierenden Neuronen oder mesenchymalen Zellen während der Organogenese auf. Eine Überexpression dieser Proteine trägt zu einer erhöhten Zellmigration bei.

Invasion und Metastasierung sind hochkomplexe Prozesse, die in mehreren Stufen ablaufen. Beginnend mit den oben erwähnten Zellveränderungen folgen lokale Invasion, Intravasation, Übergang in das lymphatische und hämatogene System, Extravasation, das Ausbilden von Mikrometastasen und letztendlich der Übergang in makroskopische Tumore (Hanahan & Weinberg, 2011).

#### **1.1.1.7 Genominstabilität und Mutation**

In normalen Zellen werden Veränderungen der DNA rasch detektiert und repariert. Sogenannte „caretaker“-Gene codieren für Proteine, welche DNA-Schäden erkennen und Reparaturmechanismen in Gang setzen oder sogar selbst in den Reparaturvorgang eingebunden sind und mutagene Alterationen schon eliminieren, bevor Defekte am Genom entstehen (Negrini et al., 2010). Durch Aufrechterhaltung der Genomstabilität werden spontane Mutationen auf ein Minimum reduziert. Tumorzellen erhöhen durch Außerkräftsetzen der Reparaturmechanismen die Mutationsrate, beeinträchtigen die Genomstabilität und beschleunigen die Tumorprogression (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **1.1.1.8 Tumorfördernde Inflammation**

In nahezu jedem neoplastischen Gewebe finden sich Entzündungs- und Immunzellen. Diese tumorassoziierte Antwort des Körpers führt zu einem paradoxen Effekt: es werden bioaktive Moleküle, wie Wachstumsfaktoren, anti-apoptotische Faktoren, Angiogenese-stimulierende Proteine und andere Enzyme freigesetzt, die die epithelial-mesenchymale Transition, Invasion und Metastasierung fördern (DeNardo et al., 2010).

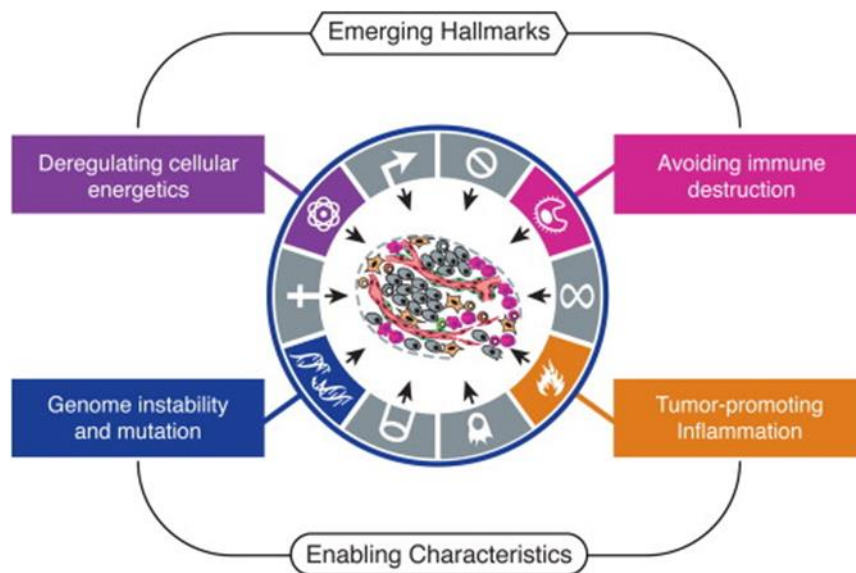
### **1.1.1.9 Änderung des Energiestoffwechsels**

Neoplastische Gewebe benötigen aufgrund ihrer hohen Proliferationsraten sehr viel Energie. In normalen Zellen erfolgt die Energiegewinnung unter aeroben Bedingungen über Glykolyse verbunden mit anfallendem Pyruvat, was im Folgenden in den Mitochondrien unter Gewinnung von ATP zu Acetyl-CoA abgebaut wird. Tumorzellen besitzen die Möglichkeit zwischen aeroben und anaeroben Stoffwechsel zu wechseln („metabolic switch“) (Vander Heiden et al., 2009). Die bei erhöhter Glykolyse anfallenden Metabolite können zu Nukleotiden, Aminosäuren und Fetten weiterverarbeitet werden, um im Folgenden für die Neubildung von Zellen genutzt zu werden. Pyruvat wird in Tumorzellen nicht in die Mitochondrien transportiert, sondern über Laktatdehydrogenase A zu Laktat abgebaut, das aus Tumorzellen ausgeschleust wird und das Tumorwachstum weiter stimuliert.

### **1.1.1.10 Umgehen des Immunsystems**

Das zelluläre und humorale Immunsystem übernimmt eine wichtige Barrierefunktion im Hinblick auf Tumorentstehung und -progression. Sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem trägt zur immunologischen Überwachung und zur Tumorabwehr bei. Tumorzellen können bestimmte „tumor escape“ Mechanismen einleiten, um der Erkennung durch Immunzellen zu entgehen. Unter hypoxischen Bedingungen exportieren Tumorzellen ATP in den Extrazellulärraum, wo nach Umwandlung durch die membrangebundenen Ektoenzyme CD39/CD73 freies Adenosin (ADO) gebildet wird. Durch Binden an Tumor- und Immunzellen wird eine Adenosin-getriggerte Signalkaskade ausgelöst, welche besonders die Wirkung von CD4+ T-Zellen, CD8+ T-Zellen, NK- und dendritischen Zellen negativ beeinflusst und die Freisetzung immunstimulierender Zytokine hemmt. Gleichzeitig werden regulatorische T-Zellen (Tregs) und „myeloid-derived suppressor cells“ (MDSCs)

aktiviert und die Polarisation in tumorassoziierte (TAM) M2 Makrophagen begünstigt. Darüber hinaus werden vermehrt immunsuppressive Zytokine sezerniert und sowohl Tumorprogression als auch Gefäßneubildung direkt gefördert (Vaupel & Multhoff, 2016).



**Abbildung 1:** Begünstigende Einflussfaktoren der Tumorneogenese (Hanahan & Weinberg, 2011)

## 1.1.2 Tumormikroumgebung

Tumore dürfen nicht als isolierte Gewebsneubildungen betrachtet werden, sondern müssen aufgrund ihrer intratumoralen Heterogenität unter Einbeziehung aller involvierten Zelltypen bewertet werden. Das unmittelbare Umfeld eines Tumors nimmt entscheidenden Einfluss auf die Karzinogenese, weshalb die beteiligten Zelltypen im Folgenden kurz behandelt werden.

### 1.1.2.1 Tumorstammzellen

Tumorstammzellen (CSCs) bilden das Herzstück eines jeden Tumors. Sie sind in der Lage genetisch homogene, phänotypisch allerdings höchst heterogene proliferierende Tumorzellen, auszubilden. CSCs besitzen die Fähigkeit im nativen Gewebe neue Tumore auszubilden und sind gleichzeitig durch ihre Heterogenität resistenter gegenüber gängigen Tumorthérapien (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **1.1.2.2 Endothelzellen**

Endothelzellen kleiden das Lumen von Gefäßen aus. Nach dem sogenannten „angiogenic switch“, also dem Übergang vom ruhenden in einen aktiven Zustand und die damit verbundene Angiogenese, spielen sie eine bedeutende Rolle in der Gefäßneubildung und -progression. Ohne Angiogenese ist das Wachstum von Tumoren limitiert (Hanahan & Weinberg, 2011).

### **1.1.2.3 Perizyten**

Perizyten sind spezialisierte, mesenchymale Zellen, die mit ihren fingerförmigen Ausläufern eine stabilisierende Schicht um Blutgefäße bilden, antiproliferative Signale aussenden, die vaskuläre Basalmembran synthetisieren und durch Freisetzen von VEGF die endotheliale Homöostase nicht nur im normalen, sondern auch im Tumorgewebe unterstützen (Hanahan & Weinberg, 2011).

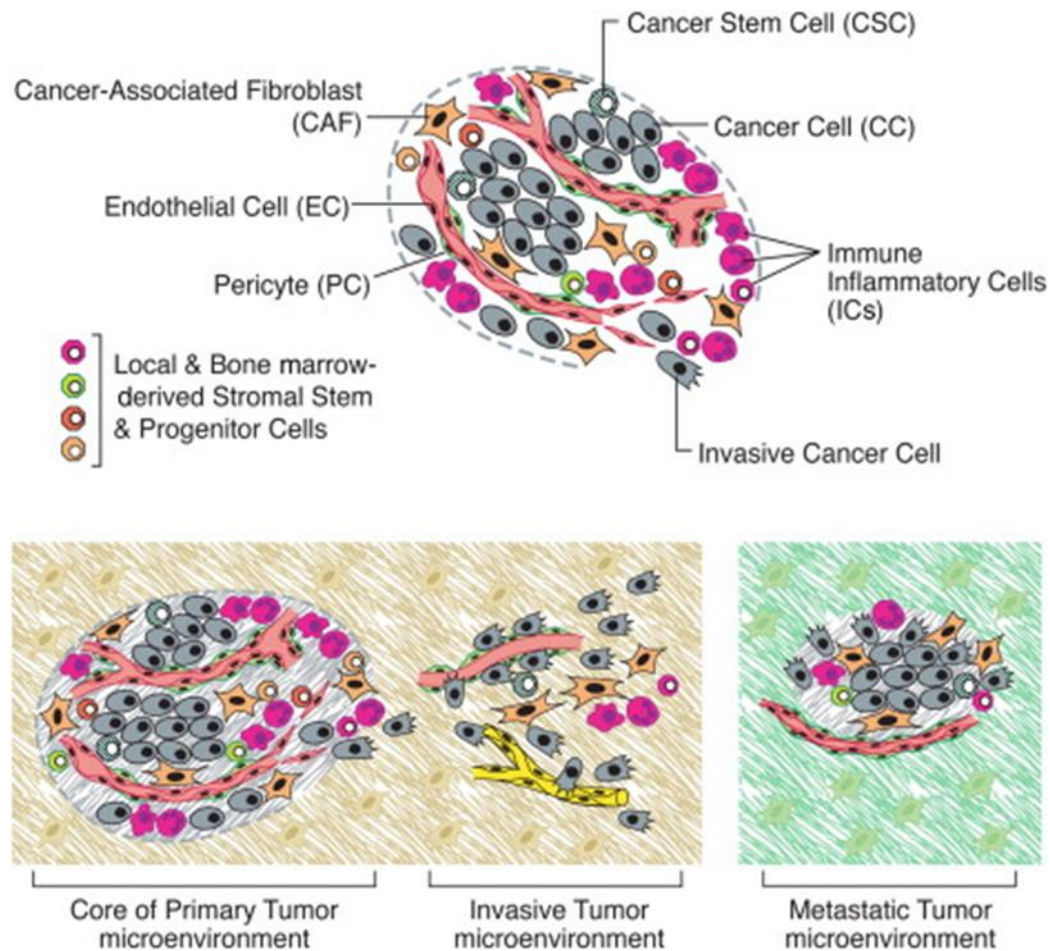
### **1.2.2.4 Zellen des Immunsystems**

Zu den tumorassoziierten Immunzellen zählen Makrophagen, Mastzellen, Neutrophile, B-, T- und NK-Zellen (Coffelt et al., 2010). Im Gegensatz zu ihrer Funktion im gesunden Gewebe, tragen sie im Tumorgewebe durch Freisetzung diverser Signalmoleküle zur Tumorprogression bei. Tumorfördernde Wirkung wird durch das Ausschütten von Wachstumsfaktor EGF, Angiogenese Faktor VEGF und FGF2, Chemokine, Zytokine und Matrix-abbauender Proteasen vermittelt (Qian & Pollard, 2010).

### **1.2.2.5 Tumorassoziierte Stromazellen**

Zu den tumorassoziierten Stromazellen zählen Fibroblasten, die die strukturelle Grundlage des epithelialen Tumorgewebes bilden und den Großteil des tumorösen Stromas ausmachen, sowie die Myofibroblasten. Diese enthalten kontraktile Aktin- und Myosinfilamente und sind in der Lage, extrazelluläre Matrixkomponenten zu sezernieren und damit ein für Tumorgewebe charakteristisches, desmoplastisches Stroma zu generieren (Hanahan & Weinberg, 2011). Des Weiteren finden sich Mesenchymal- und Progenitorzellen, die aus dem Knochenmark in Tumorgewebe migrieren und sich zu Stromazellen differenzieren (Bergfeld & DeClerck, 2010).





**Abbildung 2:** Tumormikroumgebung (Hanahan & Weinberg, 2011)

### 1.1.3 Individualisierte Tumorthherapie

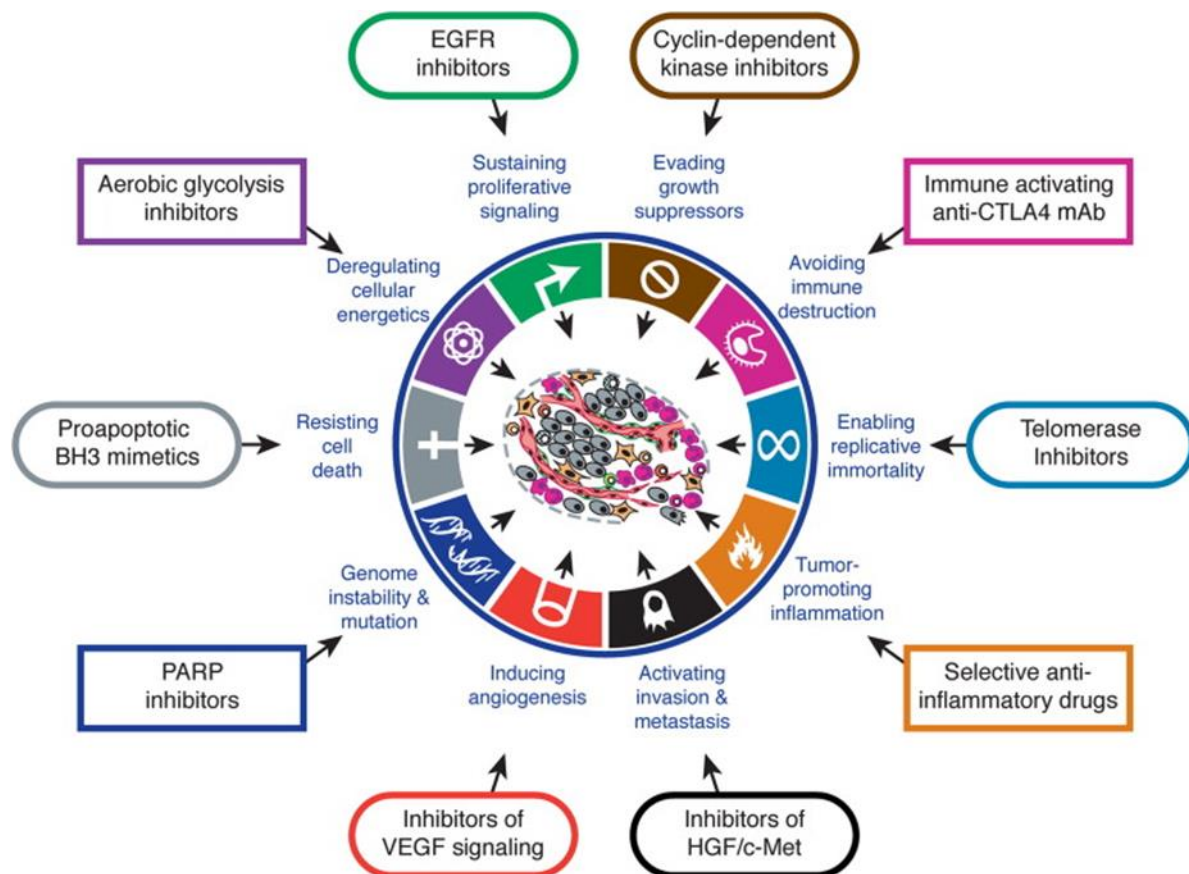
Mit Entdeckung der „hallmarks of cancer“ und dem damit einhergehenden umfassenden Einblick in die Tumorbilogie, wurde die Hoffnung geschürt, gezielt an tumorspezifischen Mechanismen anzusetzen, um die Tumorentstehung und -progression zu verhindern. Dieses als „targeted therapy“ bezeichnete Vorgehen umfasst unter anderem EGFR- und VEGF-Inhibitoren, anti-inflammatorische Substanzen, PARP und Telomerase-Inhibitoren, Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitoren und Therapeutika, die in den aeroben Glukosestoffwechsel der Zellen eingreifen (Hanahan & Weinberg, 2000).

Trotz hoher Spezifität und geringer unerwünschter systemischer Toxizität dieser Therapieform, zeigt die Klinik ein ernüchterndes Bild: Ansprechen auf „targeted therapy“ scheint nur vorübergehend und mit hohen Rezidivraten assoziiert zu sein (Hanahan & Weinberg, 2011). Zugrunde liegen komplexe Signalkaskaden, deren

Trigger nicht unikausal nachvollziehbar sind. Mehrere ineinandergreifende Mechanismen sind an der Ausbildung eines Tumormerkmals beteiligt, sodass die Inhibierung eines einzigen Signalwegs nicht zur kompletten Tumoreliminierung führen kann.

Therapieversagen und Therapieresistenz lassen sich auf die schnelle Reaktion auf veränderte äußere Einflüsse und Adaptionfähigkeit der Tumorzellen zurückführen. Aufgrund selektiven Drucks werden Tumorzellen zur Adaption gezwungen. Durch genetische Mutation, epigenetische Umprogrammierung oder Veränderung des umgebenden Stromas sind sie in der Lage sich an veränderte Situationen anzupassen. Tumorzellen sind nicht auf die Ausbildung eines „hallmark of cancer“ beschränkt, sondern können bei Inhibition eines Signalweges auf einen anderen umschwenken, so beispielsweise auf Inhibition der Angiogenese mit verstärkter Invasivität und erhöhtem Metastasierungsverhalten reagieren (Azam et al., 2010).

Um auf die Kompensations- und Anpassungsfähigkeit der Tumorzellen zu reagieren, sollte ein multimodales Therapieregime angewandt werden, welches an diversen Signalwegen ansetzt und in die hochkomplexe Regulationsmaschinerie der „hallmarks of cancer“ eingreift. Dies wird auch in Zukunft Bestand wissenschaftlicher Arbeit und Gegenstand der Forschung sein.



**Abbildung 3:** Therapeutische Zielstrukturen und deren klinische Korrelate bezogen auf tumorspezifische Charakteristika (Hanahan & Weinberg, 2011)

## 1.2 Das Immunsystem und seine Rolle in der Onkologie

Neben konventionellen Tumorthérapien wie Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie gewinnt die Immuntherapie, eine Therapieform unter Einbeziehen der körpereigenen Abwehr stark an Bedeutung. Im Folgenden werden deshalb die Grundzüge des Immunsystems und seine onkologische Relevanz kurz skizziert.

### 1.2.1 Immunsystem: Funktion, Organisation und Mechanismen

Das Immunsystem hat die Aufgabe den Körper gegen schädigende Wirkung pathogener Mikroorganismen, entarteten Zellen, Fremdproteinen und sonstigen Bedrohungen zu schützen (Lüllmann-Rauch, 2012). Hauptsäulen sind die adaptive und angeborene Immunabwehr, welche sich sowohl zellvermittelter als auch humoraler Mechanismen bedienen.

Das angeborene Immunsystem reagiert unspezifisch, dafür aber sehr schnell. Zu den humoralen Komponenten zählt sowohl das Komplementsystem, bei welchem durch Antikörperbindung Phagozytose und Lyse von Fremdmaterial stimuliert wird, als auch antimikrobielle Stoffe, welche in der Lage sind Bakterien und Pilze abzutöten. Vertreter der angeborenen Immunabwehr sind Neutrophile, Makrophagen, Eosinophile und NK-Zellen.

Die adaptive Abwehr reagiert höchst spezifisch, jedoch langsamer als das angeborene Immunsystem. Hauptakteure sind B- und T-Lymphozyten: B-Zellen übernehmen durch Sekretion von Antikörpern humorale Funktionen, T-Zellen unterstützen auf zellulärer Ebene als T-Helferzelle oder zytotoxische T-Zellen die Abwehr von körperfremden Zellen und Pathogenen (Lüllmann-Rauch, 2012).

## **1.2.2 Zellen des Immunsystems**

### **1.2.2.1 B-Zellen**

Durch Antigenpräsentation entstehen aus naiven B-Zellen nach klonaler Selektion, T-Zell Interaktion, Proliferationsvorgängen, Mutationen, erneuter Rezeptoraffinitätsprüfung und Differenzierung schließlich Plasmazellen. Diese sind als Effektorzellen in der Lage, Antikörper mit hoher Antigen-Affinität zu sezernieren. Ebenso entstehen in einer Sekundärantwort B-Gedächtniszellen, welche bei erneutem Antigenkontakt eine schnelle Immunantwort sichern (Lüllmann-Rauch, 2012).

### **1.2.2.2 Antigenpräsentierende Zellen (APC)**

Zu den Antigenpräsentierenden Zellen zählen neben dendritischen Zellen (DC) auch Makrophagen und B-Zellen. Sie nehmen Antigenfragmente durch Endozytose auf, spalten diese proteolytisch und präsentieren Peptide definierter Länge daraufhin auf MHC-Molekülen an ihrer Oberfläche. Peptidantigene, die auf MHC-II Molekülen präsentiert werden, aktivieren naive CD4+ Helfer T-Zellen, solche die auf MHC-I Molekülen präsentiert werden stimulieren naive CD8+ zytotoxische T-Zellen (Lüllmann-Rauch, 2012).

### 1.2.2.3 T-Zellen

Eine Antigenpräsentation auf MHC-I Molekülen führt zur Stimulation von zytotoxischen CD8+ Zellen (CTL), welche nach Freisetzung zytoplasmatischer Granula (Perforin und Granzym B) zur Zerstörung von Zielzellen und zur Aktivierung von Makrophagen durch IFN- $\gamma$  führen.

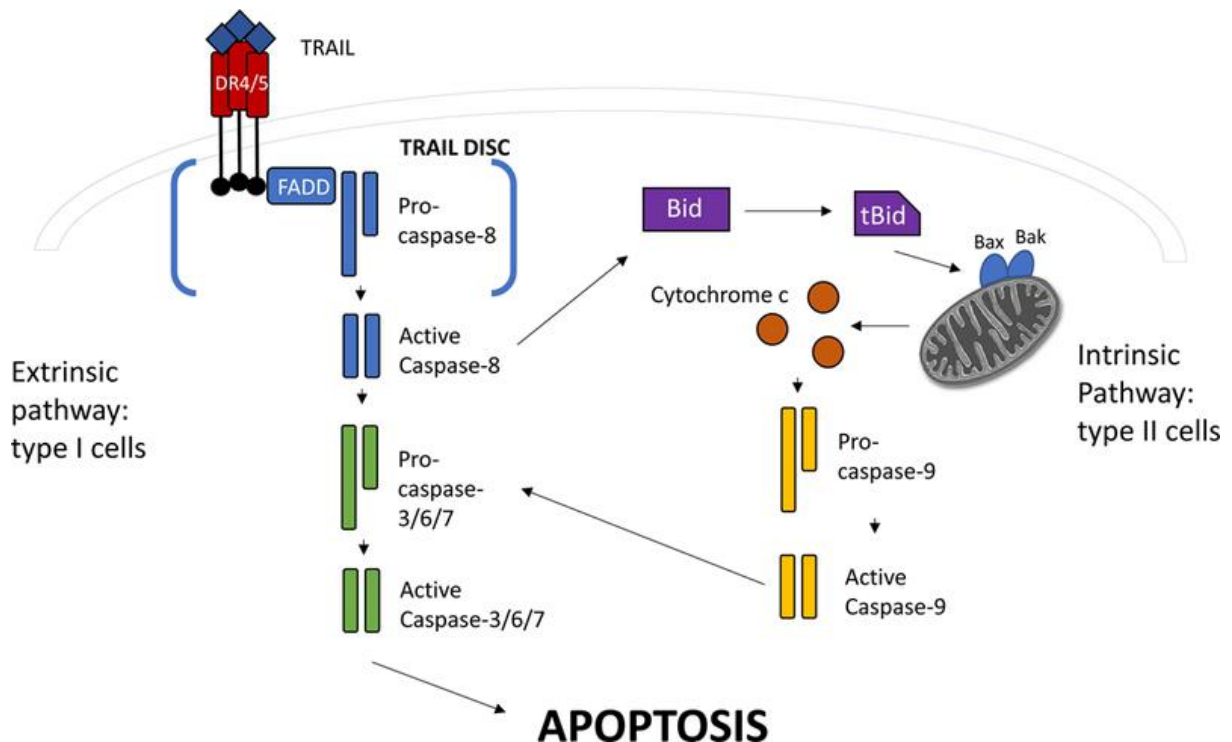
CD4+ T-Zellen können sich durch Antigenpräsentation via MHC-II und den Einfluss von Zytokinen entweder zu TH1, TH2, TH17 oder regulatorischen T-Zellen (Treg) differenzieren. Zytokine aus TH1-Zellen dienen der Aktivierung von CD8+ T-Zellen und NK-Zellen, sowie der Unterstützung von B-Zellen. TH2-Zellen unterstützen das Tumorstadium und aktivieren B-Zellen und Eosinophile. TH17-Zellen haben eine stark pro-inflammatorische Wirkung und unterstützen Neutrophile. Regulatorische T-Zellen sind in der Lage die immunsuppressiven Zytokine TGF $\beta$  und IL-10 herzustellen, haben starken Einfluss sowohl auf dendritische Zellen (DC) als auch auf Makrophagen und tragen erheblich zur Immunhomöostase bei (Lüllmann-Rauch, 2012).

### 1.2.2.4 NK-Zellen

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems, sie erkennen sowohl viral und bakteriell infizierte als auch neoplastische Zellen und verfügen über verschiedene Mechanismen, die zur Apoptose der Zielzelle führen. Induzierter Zelltod kann durch die Freisetzung von Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und T-Zell aktivierenden Chemokinen (RANTES, MIP1 $\alpha$  und MIP1 $\beta$ ) erfolgen, ebenso durch die Sekretion der in den zytoplasmatischen Granula enthaltenen Enzyme Perforin und Granzym B, welche die Permeabilität der Zellmembran steigern und Apoptose einleiten (Radons & Multhoff, 2005).

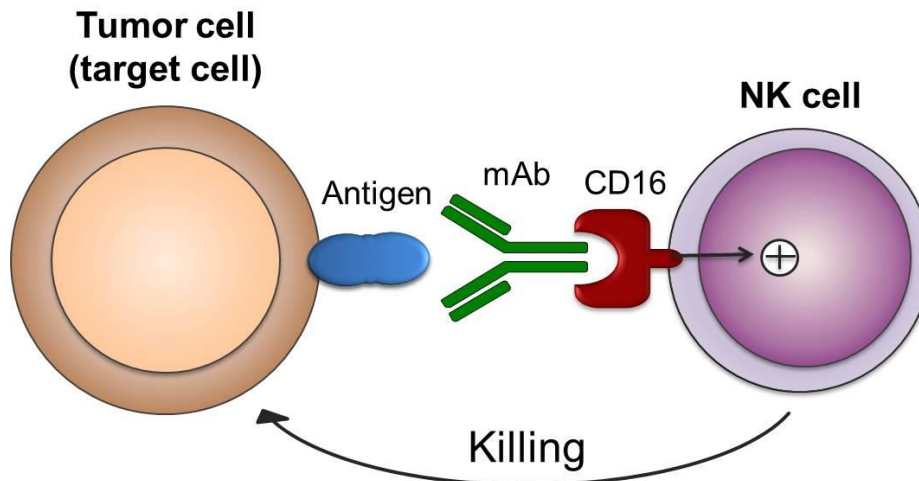
Neben ihrer Zytotoxizität durch Sekretion von zytoplasmatischen Granula sind NK-Zellen in der Lage, Apoptose durch „death receptor“ (DR) vermittelte Signalkaskaden zu induzieren. Unterschieden werden drei Rezeptor/Liganden Komplexe, welche sämtlich zur TNF-Überfamilie gehören und sich in ihren Abläufen nach Ligandenbindung ähneln: TNF in Verbindung mit TNF-Rezeptor 1 oder 2, FasL gebunden an CD95 (Apo-1/Fas) und TRAIL mit den Rezeptoren DR4/5 (Prager & Watzl, 2019). Die Ligandenbindung führt zur Bildung des „death inducing signal complex“ (DISC) bestehend aus einem Adapterprotein FADD (Fas-associated death domain protein) und Procaspase 8/10. Die proteolytische Autoaktivierung der

Initiatorcaspasen 8/10 führt in Typ1-Zellen zur direkten Aktivierung der Effektorcaspasen, in Typ2-Zellen ist hierfür ein positiver Verstärkungsmechanismus notwendig: Caspase 8 spaltet Bid in t-Bid, wodurch mitochondriale pro-apoptotische Faktoren (Zytochrom c, SMAC) freigesetzt werden und zur Bildung des Apoptosoms führen. Die darin enthaltene Caspase 9 führt zur Spaltung der Effektorcaspasen 3, 6, 7 (Wajant, 2002).



**Abbildung 4:** "death receptor" vermittelte Apoptose (Raff & El-Deiry, 2018)

Neben Degranulations- und Rezeptor-abhängigen Mechanismen können NK-Zellen Tumorzellen auch über eine antikörpervermittelte Zytotoxizität (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) zerstören. Hierbei wird antikörpervermittelt eine Verbindung zwischen Tumorzelle als „target cell“ und NK-Zelle als Effektorzelle hergestellt. NK-Zellen exprimieren den Oberflächenrezeptor CD16 (FcyRIII), der an das Fc-Fragment eines monoklonalen Antikörpers (mAB) der Immunglobulin G Familie (IgG) bindet. Das Fab-Fragment des mAB bindet an das auf der Tumorzelle exprimierte Antigen. Nach erfolgreicher Kopplung erfolgt die Aktivierung einer lytischen Signalkaskade und die Tumorzelle geht in Apoptose (Lo Nigro et al., 2019).



**Abbildung 5:** Der ADCC-Komplex: Antikörpervermittelte Bindung zwischen Zielzelle und Effektorzelle. Fc-Fragment bindet an CD16 der NK-Zelle, Fab-Fragment bindet an tumorspezifisches Antigen (Siernicka et al., 2019).

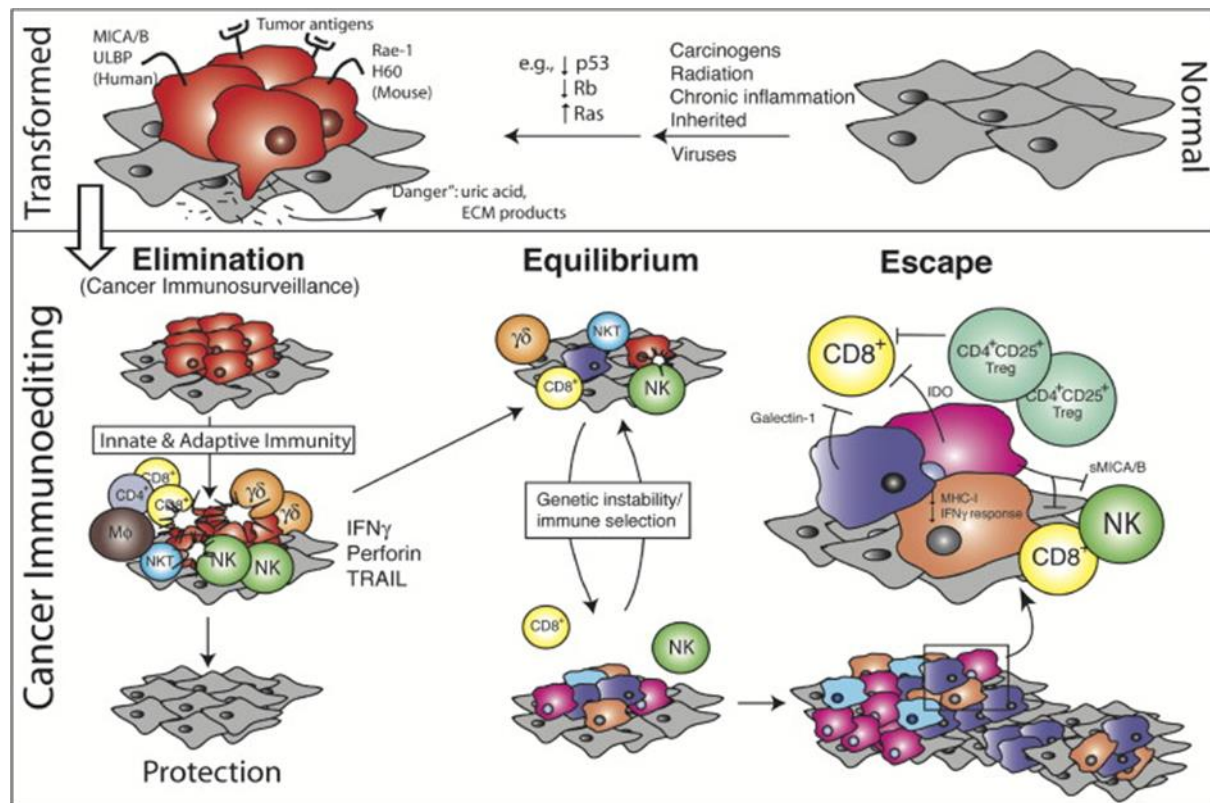
### 1.2.3 Rolle des Immunsystems in der Onkologie: Immunediting

Tumorentstehung und Immunsystem stehen in enger und komplexer Beziehung zueinander. Immunediting beschreibt den dynamischen Prozess, dem sowohl Tumor als auch Immunsystem im gemeinsamen Wechselspiel der Tumorgenese unterliegen (Dunn et al., 2004); er lässt sich in drei Phasen gliedern:

In der Eliminierungsphase oder Immunüberwachung („immune surveillance“) werden tumoreigene Antigene durch Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und das neoplastisch veränderte Gewebe infiltriert. Es wird IFN- $\gamma$  freigesetzt, welches ebenfalls zytotoxisch wirkt (Dunn et al., 2006). Die nekrotischen Tumorzellen werden von dendritischen Zellen aufgenommen, zersetzt und die prozessierten Peptidantigene werden auf MHC-I Molekülen präsentiert, was zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und über die oben genannten Prozesse (siehe CTL) zum Zelltod führt (Mittal et al., 2014). Das Immunsystem behält gegenüber den Tumorzellen die Überhand.

Die Gleichgewichtsphase ist dadurch gekennzeichnet, dass sich einige Tumorzellen, die im ersten Schritt nicht beseitigt werden konnten, durch Mutationen verändern, eine resistenter Subpopulation generieren und sich der Eliminierung durch Immunzellen im weiteren Verlauf entziehen (Dunn et al., 2004).

In der „immune escape“ Phase sind Tumorzellen in der Lage sich vollständig vor Immunzellen zu schützen und sich unbegrenzt weiter zu teilen. In der „escape“ Phase werden Tumore klinisch sichtbar (Mittal et al., 2014). Sämtliche Abwehrmechanismen des angeborenen oder erworbenen Immunsystems sind ausgeschaltet und greifen nicht mehr.



**Abbildung 6:** Tumorentstehung und Immunsystem: die drei Phasen des Immunediting (Dunn et al., 2004)

### 1.3 Grundlagen der Strahlentherapie in der Onkologie

Die Strahlentherapie bildet neben der Chirurgie und der Chemotherapie eine der Hauptsäulen in der Tumorthherapie. Sie kann alleinig oder in Kombination mit anderen Therapien, adjuvant oder neoadjuvant angewandt werden. Ionisierende Strahlen führen hauptsächlich durch Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite (ROS) (Kang et al., 2014) und anschließender Reaktion mit DNA-Bestandteilen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen, welche in Störungen der Zellfunktion und anschließender Apoptoseeinleitung resultieren (Van Der Kogel et al., 2009).



Ionisierende Strahlen induzieren Immuneffekte, indem stress-induzierte Antigene nach Bestrahlung und Zelltod vermehrt freigesetzt werden: Calreticulin, ATP und HMGB1 (high-mobility group protein B1) sind typische Marker, die nach dem immunologischen Zelltod freigesetzt werden und anschließend T-Zellen stimulieren können. Chemokine, wie CXCL9, CXCL10 und CXCL16, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  locken T-Zellen zum Tumor (Dunn et al., 2006). Des Weiteren werden durch Bestrahlung MHC-Moleküle, intrazelluläre Adhäsionsmoleküle und der Fas-Ligand verstärkt exprimiert, wodurch überlebende Tumorzellen für T-Zellen leichter erkennbar werden (Formenti & Demaria, 2013). Membrangebundenes Hsp70 gehört ebenfalls zu den stressinduzierbaren Molekülen, die nach Bestrahlung auf Tumorzellen erhöht exprimiert werden (Murakami et al., 2015) und deshalb als tumorspezifische Erkennungsstruktur für aktivierte NK-Zellen fungieren.

Aufgrund dieser neuen Daten ist zu erwarten, dass die Radiotherapie neben dem Hauptziel die Tumormasse zu verringern auch zu einer Stimulation des Immunsystems führen könnte.

## **1.4 Hitzeschockprotein 70**

Als Schlüsselement dieser Arbeit kommt dem Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) eine besondere Bedeutung zu. Im Folgenden werden deshalb dessen Aufbau, Regulation, Funktion und seine therapeutische Relevanz als immunmodulatorische Zielstruktur für NK-Zellen näher beleuchtet.

### **1.4.1 Überblick**

HSPs verdanken ihren Namen der zufälligen Entdeckung in *Drosophila melanogaster*, in welcher als Reaktion auf einen Hitzeschock eine vermehrte Expression von Genen beobachtet wurde, die für HSPs codieren. Zur HSP70 Familie zählen 13 verschiedene Mitglieder, welche sich in Expression, Lokalisation und Aminosäuresequenz unterscheiden (Radons, 2016). Das hauptstressinduzierbare Hsp70 ist sowohl intrazellulär als auch extrazellulär und membrangebunden auf Tumorzellen zu finden. In Normalzellen kommt Hsp70 nur intrazellulär nicht aber auf der Zellmembran vor (Radons & Multhoff, 2005).

Extrazelluläres Hsp70 kann als freies Protein von toten Zellen oder aber gebunden an Exosomen aktiv von lebenden Tumorzellen freigesetzt werden. Die genauen Mechanismen, die zur Freisetzung von Hsp70 führen, sind allerdings noch nicht vollständig verstanden (Radons, 2016).

Membrangebundenes Hsp70 findet sich - obwohl keine klassische Transmembran-Domäne vorhanden ist - bevorzugt auf Tumorzellen, nicht jedoch auf normalen Zellen (Radons & Multhoff, 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass Hsp70-Proteine für die Externalisierung bestimmte Bestandteile der Lipidmembran („lipid rafts“) von Tumorzellen nutzt (Vega et al., 2008). Unsere eigenen Vorarbeiten haben gezeigt, dass die tumorspezifische Lipidkomponente Globyltriaosylceramide (Gb3) mit Hsp70-Protein auch in künstlichen Lipidvesikeln interagieren kann (Multhoff et al., 2015). Durch Stressfaktoren wie Bestrahlung, Chemotherapie, Hypoxie oder Hyperthermie kann die Expression von membrangebundenem Hsp70 auf Tumorzellen noch weiter erhöht werden (Kleinjung et al., 2003).

### **1.4.2 Aufbau und Funktion**

Hsp70-Proteine bestehen aus einer N-terminalen „nucleotide binding domain“ (NBD), welche ATP bindet und hydrolisiert und einer C-terminalen „substrate binding domain“ (SBD), welche ungefaltete Polypeptide und Proteine bindet (Flaherty et al., 1990).

Hsp70-Proteine agieren typischerweise als molekulare Chaperone; sie fördern die richtige Proteinfaltung, unterstützen den Transport von neugebildeten Polypeptidketten und helfen beim Zusammenbau von Multiproteinkomplexen (Radons & Multhoff, 2005). Zudem haben sie intrazellulär eine stark anti-apoptotische Wirkung: Sie inhibieren die mitochondriale Translokation und Aktivierung von Bax und verhindern, dass Mitochondrien ihre Permeabilität erhöhen und pro-apoptotische Faktoren wie Zytochrom c ausschütten (Stankiewicz et al., 2005). Ebenso blockiert Hsp70 den Zusammenbau des Apoptose-fördernden Signalkomplex DISC (death inducing signal complex) (Guo et al., 2004), bindet den Apoptosefaktor Apaf-1 (apoptosis protease activating factor) und inhibiert die Caspase 3. Außerdem greift es durch Modifikation von JNK, MAPK, und ERK in weitere Apoptose-regulierende Signalwege ein (Radons, 2016). Invasion und

Metastasierungsverhalten werden durch erhöhte proMMP-9 Sekretion und MMP9-Aktivität erleichtert (Lee et al., 2006).

Im Hinblick auf die „hallmarks of cancer“ verstärkt intrazelluläres Hsp70 also sowohl Zellwachstum und Proliferation als auch die Resistenz gegenüber Apoptose, Zytostatika und Bestrahlung (Vega et al., 2008). Invasion und Metastasierungsverhalten werden begünstigt.

### **1.4.3 Regulation**

Die Expression von Hsp70 wird sowohl durch physiologische Stressfaktoren wie z.B. Hypoxie, Hypoglykämie und Hyperthermie, als auch durch von außen zugeführten Stressfaktoren, wie z.B. Chemo- oder Strahlentherapie stimuliert. Die daraufhin ablaufende „heat shock response“ (HSR) umschreibt Craig folgendermaßen:

„The HSR is an ancient and sophisticated cytoprotective mechanism to augment organismal survival and longevity in the face of proteotoxic stress from without and within“ (Craig, 1985).

Die Expression von Hsp70 wird hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert, als wichtigster Faktor gilt hierfür der HSF-1 (heat shock factor) (Pirkkala et al., 2001). Unter physiologischen Bedingungen liegt dieser gebunden an Hsp70 im Zytosol vor, bei Stressantwort wird durch Bindung an HSEs (heat shock elements) die Hsp70 Promotorregion aktiviert und dessen Transkription initiiert (Radons, 2016). Ein weiterer Weg die Hsp70 Expression zu triggern, bietet die mTOR (mammalian target of rapamycin kinase) Signalkaskade, welche durch direkte Phosphorylierung der HSF die Hsp70 Produktion in Gang setzt (Chou et al., 2012). Posttranskriptional kann die Hsp70 Expression durch microRNAs (miRNAs) reguliert werden (Radons, 2016). Das posttranslationale Processing von Hsp70-Proteinen ist Gegenstand aktueller Forschung.

### **1.4.4 Immunmodulierende Funktion**

Neben ihrer bereits oben genannten Funktion als molekulare Chaperone, kommt den Hsp70-Proteinen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung einer Immunantwort zu. Sie haben sowohl Einfluss auf das angeborene, als auch das erworbene Immunsystem:

in der Antigenpräsentation via MHC-Molekülen, als Chaperokine oder in der NK-Zell-vermittelten Immunantwort (Radons, 2016). Hauptaugenmerk wird im Folgenden auf die Funktionen des membrangebundenen Hsp70 gelegt.

Hsp70-Proteine wirken durch ihre Fähigkeit Antigene zu binden, stimulierend auf das erworbene Immunsystem. Hsp70/Peptid-Komplexe können durch Oberflächenrezeptoren an APCs gebunden werden und führen durch anschließende Kreuzpräsentation mit zytotoxischen T-Zellen zur T-Zellstimulation (Singh-Jasuja et al., 2000). Hsp70/Peptid-Komplexe können auch an Toll-like Rezeptoren (TLR) binden und dadurch die Reifung von APCs stimulieren, pro-inflammatorische Zytokine freisetzen (IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$ ) und die Expression von Ko-Faktoren wie CD80 und CD86 auf APCs initiieren (Pockley et al., 2008).

Weiter konnte gezeigt werden, dass membrangebundenes Hsp70 einen tumorspezifischen Angriffspunkt für NK-Zellen darstellt. An der Interaktion zwischen Hsp70 und NK-Zelle ist die Expression des C-type lectin Rezeptorkomplexes CD94/NKG2C beteiligt. Durch ihn kommt es nach Bindung zu einer Granzym B-vermittelten Apoptose der Tumorzellen: Binden NK-Zellen an Hsp70 exprimierende Tumorzellen, führt dies zu einer erhöhten CD94/NKG2C Expression. Die daraus resultierende, vermehrte Granzym B Produktion lässt die Zellmembran permeabel werden und erleichtert die Aufnahme von Granzym B (Radons & Multhoff, 2005).

#### **1.4.5 Anti-apoptotische Funktion**

Intrazellulär lokalisiertes Hsp70 führt entweder durch Blockade von apoptotischen Proteinen oder Stimulation von anti-apoptotischen Proteinen zur Apoptoseinhibition. Unterschieden werden der intrinsische vom extrinsischem Apoptoseweg (Kumar et al., 2016).

Die Aktivierung des intrinsischen Signalwegs resultiert in veränderter Wirkung der Bcl-2 Proteinfamilie. So werden entweder anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xL stimuliert oder pro-apoptotische Proteine wie Bax, Bcl-Xs und Bak inaktiviert, welche nachfolgend Zytochrom c freisetzen, zusammen mit Apaf-1 und Caspase 9 das Apoptosom bilden und durch Aktivierung der Caspase 3 die Tumorzellen in die Apoptose schicken würden (Beere et al., 2000). Proteine der Bcl-Familie werden auch durch das Tumorsuppressorgen p53 getriggert. Tumorzellen weisen veränderte

p53 Proteine auf, welche sich in einem stabilen Verbund mit Hsp70 befinden. Unter Stress-Bedingungen verhindert Hsp70 den Import von p53 und führt dadurch zu verringerten Apoptose- und erhöhten Überlebensraten geschädigter Zellen (Zylicz et al., 2001). Auch durch Eingreifen in den NF- $\kappa$ B Signalweg, mittels Inhibition der I $\kappa$ B- $\alpha$ -Kinase (IKK), kann Hsp70 zu einem Überlebensvorteil führen (Shanley et al., 2000).

Der extrinsische Signalweg wird durch Plasmamembranproteine aus der Familie der TNF-Rezeptoren vermittelt, welche zur Aktivierung der Caspase 8/10 im „death inducing signaling complex“ (DISC) führen und im Folgenden entweder direkt den ausführenden Caspasenkomplex (Caspase 3/6/7) aktivieren oder Bid in t-Bid spalten. (Muzio, 1998).

Neben Eingreifen in intrinsische und extrinsische Signalwege (siehe Abbildung 5), zählt zu den anti-apoptotischen Ansatzpunkten des Hsp70-Proteins auch die Interaktion mit Zytochrom c, die Aktivierung von Caspasen, die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen, das Entstehen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und die DNA-Fragmentierung. Knockdown von Hsp70 führt zu erhöhter Apoptoseneigung und verringertem Überleben kanzerogener Zellen (Gurbuxani et al., 2001). Erhöhte Hsp70-Werte gehen mit zytoprotektiven Effekten, schlechtem Ansprechen auf Chemo- und Strahlentherapie, erhöhter Kanzerogenität und schlechter Prognose einher (Kumar et al., 2016).

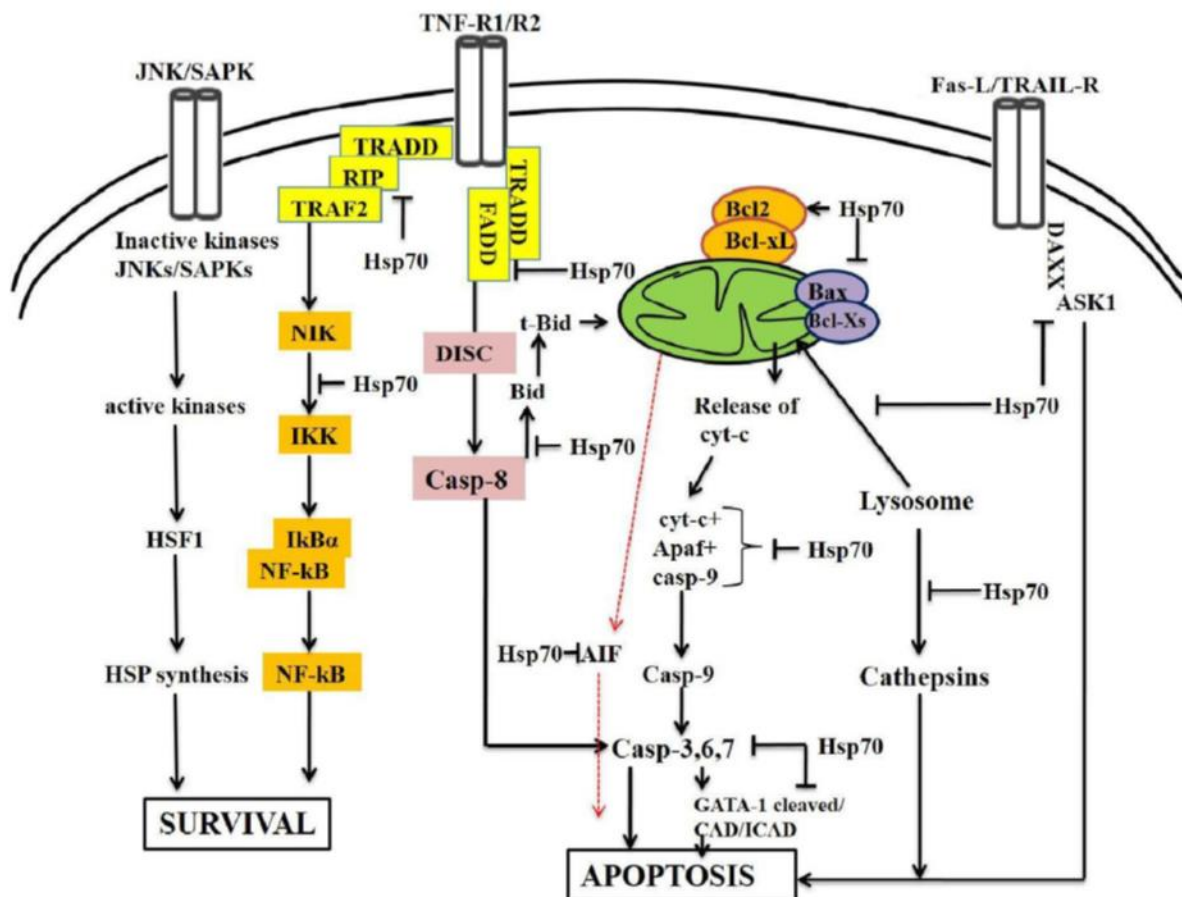
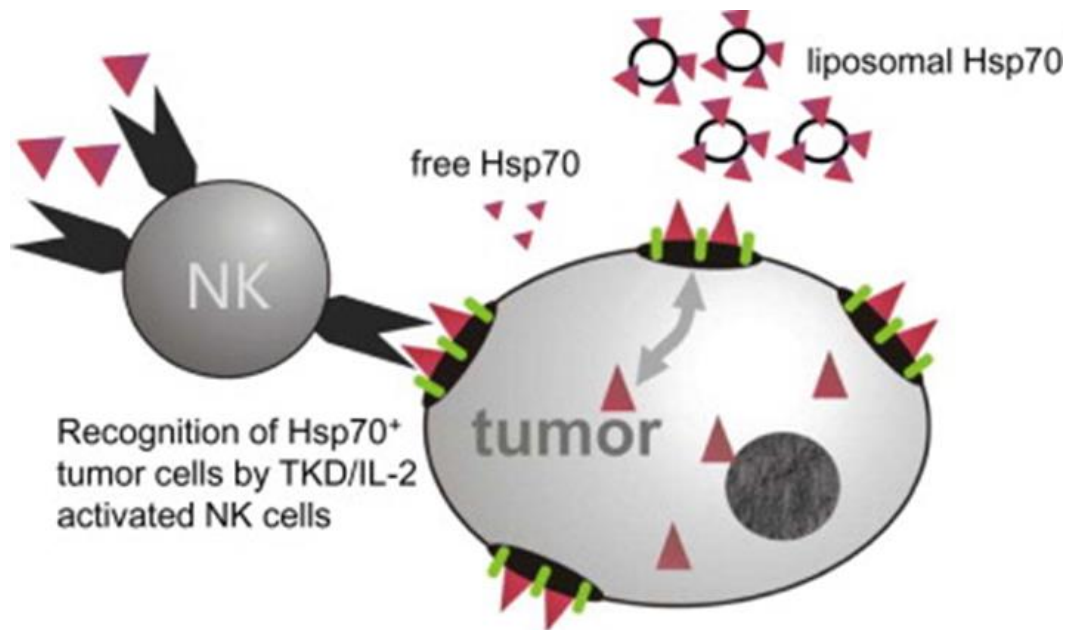


Abbildung 7: Anti-Apoptose Signalwege (Kumar et al., 2016)

### 1.4.6 Therapeutische Relevanz

Hsp70 wird durch zwei Hauptmerkmale zum geeigneten Angriffspunkt für spezifische Tumorthérapien: Zum einen wird Hsp70 nur auf der Zelloberfläche von Tumorzellen exprimiert, nicht jedoch auf normalen Zellen, wofür die veränderte Lipidkomposition der Zellmembran von Tumorzellen verantwortlich ist. Zum anderen können Hsp70-Proteine durch immunkompetente Effektorzellen erkannt werden. Native NK-Zellen werden durch Inkubation mit Hsp70 oder dem Hsp70-Peptid TKD gemeinsam mit niedrig dosiertem IL-2 (TKD/IL-2) und somit gegen Hsp70-exprimierende Tumorzellen spezifisch stimuliert. Die Stimulation mit TKD/IL-2 ist gleichzeitig mit einer erhöhten Expression des aktivierenden Oberflächenrezeptorkomplexes CD94/NKG2C assoziiert, was wiederum mit einer erhöhten Zytotoxizität der NK-Zellen einhergeht (Multhoff et al., 2015).



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der *ex vivo* mit TKD und IL-2 stimulierten NK-Zellen, welche das auf der Membran von Tumorzellen exprimierte mHsp70 spezifisch binden (Multhoff et al., 2015)

Ionisierende Strahlen führen durch Doppelstrangbrüche zum direkten Zelltod der Tumorzelle und zur Reduktion der Tumormasse, verschiedene immunologisch relevante Antigene, wie MHC-Moleküle, tumorassoziierte Antigene (z.B. CEA), Adhäsionsmoleküle (ICAM-1) oder der Apoptosefaktor Fas werden hochreguliert. Die Hsp70 Produktion wird erhöht und eine vermehrte Expression auf der Zellmembran von Tumorzellen induziert (Multhoff et al., 2015).

In Zusammenschau lassen diese Ergebnisse folgende Überlegung zu: Ein externer Stresstimulus in Form von Bestrahlung führt zur Erhöhung der membrangebundenen Hsp70 Expression, welche im Folgenden als therapeutisches „target“ für TKD/IL-2-stimulierte, Hsp70 spezifische NK-Zellen nutzbar gemacht werden kann und damit die Zytotoxizität der NK-Zellen erhöht.

## **1.5 Glioblastoma multiforme (GBM)**

Das Glioblastoma multiforme zählt zu den neuroepithelialen Tumoren und wird aufgrund seiner schlechten Prognose nach international empfohlener Gradeinteilung der WHO als Grad IV eingestuft. Glioblastome werden als embryonale, mesodermale, entdifferenzierte Gliome bezeichnet. Sie breiten sich bevorzugt im Marklager des Großhirns, seltener bilateral aus.

### **1.5.1 Epidemiologie des Glioblastoms**

Glioblastome stellen bei Erwachsenen den häufigsten intrinsischen Hirntumor dar. 90% aller Glioblastome sind primären Ursprungs, die restlichen 10% sekundär. Die jährliche Inzidenz liegt bei 2-3 pro 100.000, die Inzidenzrate bei Männern im Vergleich zu Frauen liegt bei 1,26:1 (Verdecchia et al., 2002). Kaukasier zeigen eine erhöhte Inzidenz (Urbańska et al., 2014).

### **1.5.2 Histologie und Histopathologie des Glioblastoms**

Glioblastome bestehen aus polymorphen, anaplastischen und anisokaryotischen Zellen. Diese zeigen sich polygonal bis spindelförmig, mit azidophilem Zytoplasma und unscharf begrenzten Zellgrenzen. Die Zellkerne sind oval, mit hyperchromen Chromatin und zentral oder perizentral gelegenen Nucleoli. Die Kern-Plasma Relation ist verschoben (Urbańska et al., 2014). Die Endothelzellen der Gefäße in Glioblastomen unterscheiden sich bezüglich ihrer Größe und Form von Endothelzellen normaler Gefäße, was zur Ausprägung von Hypoxie im Tumor führen kann (Linkous & Yazlovitskaya, 2011). Nekrotische Foci, umgeben von Pseudopallisaden sind typisch (Kleihues et al., 2002). Glioblastome zählen nach WHO- Klassifikation zu den Astrozytomen. Diese können sowohl histopathologisch als auch anhand molekularer Marker differenziert werden:

- Isozitat-Dehydrogenase 1 und/ oder -2 (IDH-1/-2)
- Kodeletion der Chromosomenteile 1p und 19q
- BRAF- Fusionsgen
- Methylierung des Promoters für die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)



Die histopathologischen und molekularen Merkmale tragen ausschlaggebende Rolle für nachfolgende Diagnostik und Therapie.

### **1.5.3 Diagnostik des Glioblastoms**

Als diagnostischer Goldstandard gilt das Magnetresonanz-Imaging (Urbańska et al., 2014). Erst eine histopathologische Untersuchung kann die definitive Diagnose sichern, wobei dafür eine stereotaktisch geführte Serienbiopsie basierend auf struktureller und metabolischer Bildgebung (MRT/PET) ein nebenwirkungsarmes und profiliertes Verfahren darstellt (Weller et al., 2017). Morphologische Diagnostik beruht auf dem von der WHO vorgegebenen Schema, einbeziehend Malignitätsgrad, Proliferationsindex und Überlebenszeit (Kleihues et al., 2002). Immunhistochemisch kann die Diagnose durch Anfärben von GFAP in Gliom Zellen gesichert werden. Erste klinische Symptome können sich abhängig von Ausdehnung, betroffener Hirnregion und Wachstumsmuster in unterschiedlichen neurologischen Ausfällen zeigen, wobei ein epileptischer Anfall die häufigste Manifestation darstellt.

### **1.5.4 Therapie des Glioblastoms**

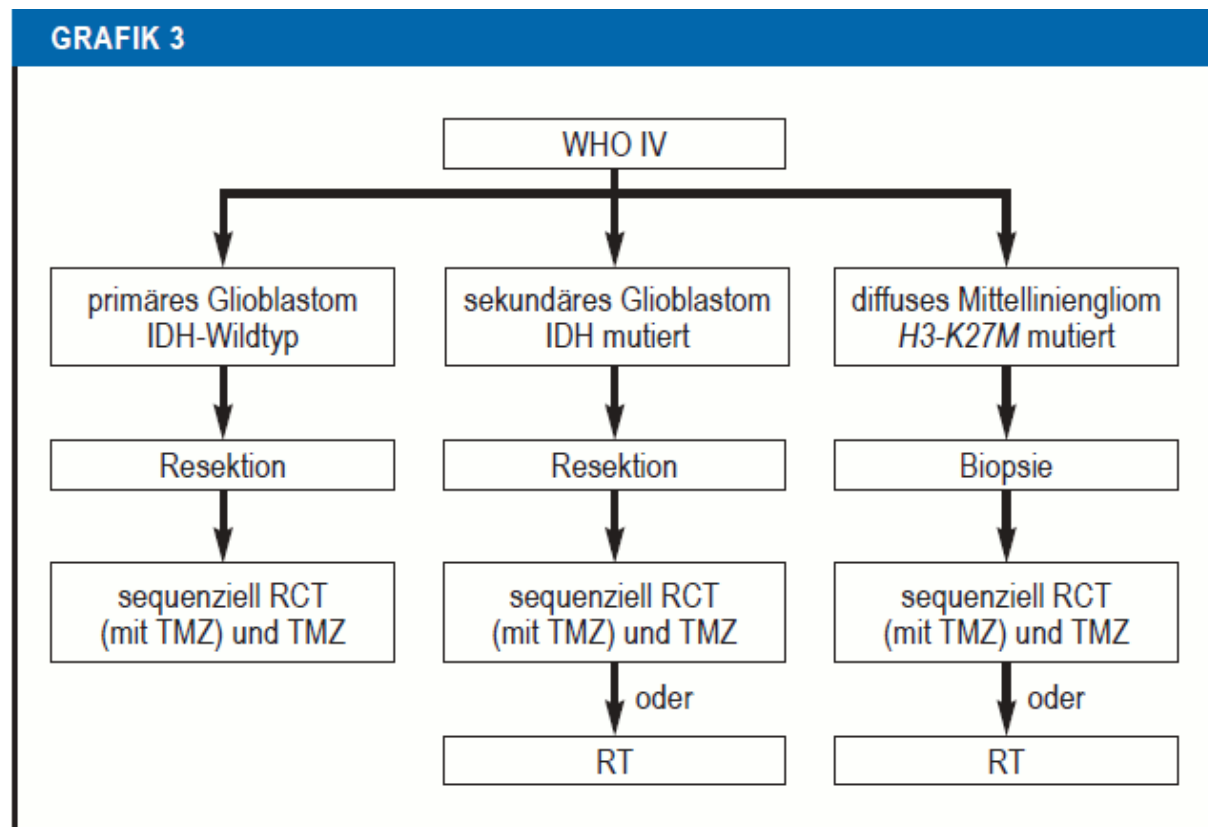
Für die Therapieentscheidung spielen neben Lage und Wachstum des Tumors, besonders die Ausprägung molekularer Marker eine bedeutende Rolle. In der Regel besteht die Behandlung eines Glioblastoms aus einer Kombination aus Resektion, Strahlentherapie und medikamentöser Tumortherapie, die Temozolamid beinhaltet (Stupp et al., 2009).

Obwohl Gliome nach WHO Grad IV primär nicht operativ kurativ zu behandeln sind, stellt die vollständige Entfernung, beziehungsweise eine Teilexstirpation von schrankengestörtem Gewebe eine geeignete Möglichkeit dar, eine Verlängerung des mittleren Gesamtüberlebens von 12 auf 15 Monaten zu erreichen (Pichlmeier et al., 2008). Intraoperative MRTs und der Einsatz von 5 ALA Fluoreszenz stellen nützliche Verfahren dar, um Glioblastom-Resektionen hinsichtlich ihrer Präzision zu optimieren (Stummer et al., 2006).

Die Bestrahlung bei malignen Gliomen erfolgt in der Regel perkutan und standardisiert mit 60 Gy, appliziert in Einzeldosen von 1,8-2,0 Gy an fünf Tagen pro Woche mit einer Behandlungszeit von fünf bis sechs Wochen, beginnend meist drei bis vier Wochen nach chirurgischem Eingriff (Rimas, 2019). Die IMRT (intensity-

modulated radiotherapy) und IGRT (image-guided radiotherapy) stellen geeignete Verfahren dar, um umliegende, nicht betroffene Hirnregionen zu schonen, hohe Präzision zu erreichen und unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren (Gzell et al., 2017).

Die medikamentöse Primärtherapie beim Glioblastom enthält als Standardtherapeutikum Temozolamid, welches als DNA-Alkylans die Blut-Hirn-Schranke überschreitet und therapeutisch relevante Konzentrationen in den erwünschten Hirnregionen erreicht (Rimas, 2019). Besonders starkes Ansprechen auf Temozolamid zeigen Glioblastome mit MGMT-Promoter Methylierung (Hegi et al., 2005). Das Standardtherapieregime nach dem sogenannten Stupp Schema umfasst tägliche Temozolamid Applikation ( $75 \text{ mg/m}^2 \times 20\text{-}29 \text{ d}$ ) gekoppelt mit Radiotherapie, gefolgt von 6 Zyklen Temozolamid Erhaltungstherapie ( $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2 \times 5/28 \text{ d}$ ) (Stupp et al., 2005). Das Gesamtüberleben liegt hier bei 15-18 Monaten (Stupp et al., 2009). Genaue Therapiealgorithmen nach integrierter molekularer Diagnose zeigt Abbildung 7.



**Abbildung 9:** Therapiealgorithmus der Gliome WHO IV nach integrierter Diagnose

IDH, Isozitrat Dehydrogenase; RCT, Radiochemotherapie; RT, Radiotherapie; TMZ, Temozolamid;  
WHO, Weltgesundheitsorganisation (Goldbrunner et al., 2018)

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

### 2.2 Medien, Puffer und Lösungen

#### 2.2.1 Zellkultur

Tabelle 1: Material Zellkultur

Material	Hersteller
FCS (Fetales Kälberserum)	Sigma
RPMI 1640	Sigma
DMSO	Sigma
Trypan Blau	Sigma
0,05% Trypsin/ EDTA	Sigma

#### 2.2.2 FACS

Tabelle 2: Material FACS

Material	Hersteller
PI (5 µg/ml PI in PBS)	
FACS Flow	BD Bioscience
FACS Rinse	BD Bioscience
FACS Clean	BD Bioscience

## 2.3 Antikörper

Tabelle 3: Material Antikörper

Material	Hersteller
IgG1-APC	BD Bioscience
Monoclonal Anti-HLA Class-I	Sigma
Monoclonal antibody cmHsp70.1	Multimmune GmbH

## 2.4 Zelllinie

Tabelle 4: Material Zelllinie

Material	Hersteller
U87 MG Cell Line (human)	Sigma

## 2.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Material Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
T25 cell culture Flask vent cap 25 cm <sup>2</sup>	Corning
T75 cell culture Flask vent cap 75 cm <sup>2</sup>	Corning
Zellschaber 24 cm	TPP
Pipette serolog. 1 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH
Pipette serolog. 5 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH
Pipette serolog. 10 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH
Pipette serolog. 25 mL, steril	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitzen: ep T.I.P.S. Standard 20-300 µl	Sardstedt
Pipettenspitzen: ep T.I.P.S. Standard 0,5	Sarstedt

-20 µl	
1,5 mL Reaktionsgefäße	Eppendorf
FACS Tubes	Corning
S Handschuh latex unsteril	Lohmann und Rauscher

## 2.6 Geräte

**Tabelle 6:** Material Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Bestrahlungsgerät Gulmay RS225A	Gulmay Medical
Brutschränke: Hera Cell	Hereaus
FACS Calibur Durchflusszytometrie	Becton Dickinson
Neubauer Zählkammer Tiefe 0,1 mm	NeoLab
Strippetor Ultra	Corning
Pipetten	Eppendorf
Sterilbank Hera Safe	Hereaus
Vortex Mixer	NeoLab
Tischzentrifuge Fresco17	Hereaus

### **3 Methoden**

#### **3.1 Zellkultur**

##### **3.1.1 Kultivierung der Zellen**

Die Glioblastom-Zelllinie U87 wurde in RPMI Vollmedium mit 10% FCS, 1% Sodumpyruvat, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle Zellen wurden in einem Heraeus-Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Die Zellkulturarbeit wurde an einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus, BDK) durchgeführt. Um einen Wachstumsstopp durch Kontaktinhibition zu vermeiden, wurden die Zellen in Abhängigkeit ihrer Verweildauer im Brutschrank in initial unterschiedlichen Zellzahlen ausgesät. Zum Ablösen der adhärenenten Glioblastomzellen wurde der Zellüberstand abgesaugt, die Zellen mit sterilen PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin/EDTA behandelt. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde Medium zugegeben, um die Protease Aktivität von Trypsin durch die im Serum des Mediums enthaltene Trypsin Inhibitoren unwirksam zu machen. Danach wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

##### **3.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Das Einfrieren von Zellen ermöglicht die Lagerung über einen längeren Zeitraum. Durch Verwendung von DMSO (Dimethylsulfoxid) im Medium wird die Bildung von Eiskristallen verhindert.  $1-2 \times 10^6$  Zellen wurden pelletiert (1200 rpm, 4 min, RT), in 1 ml Einfriermedium (Vollmedium mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Zunächst wurden die Röhrchen für 1 h in -20°C eingefroren, um im Folgenden dauerhaft bei -80°C gelagert zu werden. Beim Einfriervorgang sollten die Zellen stufenweise heruntergekühlt werden. Beim Auftauen ist zügig zu arbeiten, da sonst Zellschädigungen durch das zytotoxische DMSO drohen. Nach Entnahme aus der Kühlung wurden die Zellen im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, die Zellsuspension in ein mit 10 ml Vollmedium gefülltes Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 14 ml frisches Vollmedium aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät. 24 h nach Auftauen wurde bei den adhärenenten Zellen ein Wechsel des Mediums vorgenommen.

### 3.1.3 Aussaat der Zellen

Zellen zeigen in Kultur ein charakteristisches Wachstumsverhalten. Werden zu wenige Zellen ausgesät, fehlen wachstumsfördernde Faktoren und es kommt zum Zelltod. Befinden sich zu viele Zellen in Kultur, steigt die Konkurrenz um Nährstoffe, Zellen sterben ab und setzen wachstumshemmende Faktoren frei. Um die Wachstumseffekte der Zellen in Kultur über den definierten Zeitraum von 7 Tagen konstant zu halten, wurden die Zellen deshalb in unterschiedlichen Zelldichten ausgesät.

**Tabelle 7:** Zelldichte bei Aussaat

Zeitpunkt	Zelldichte
d 1-4	250.000
d 5	125.000
d 6	60.000
d 7	10.000

### 3.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellen [ml}^{-1}\text{]} = (\text{Zellzahl/Zahl der gezählten Großquadrate}) \times 10.000$$

Um tote Zellen von lebenden Zellen zu unterscheiden, wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet, der Zellen mit geschädigter Zellmembran blau anfärbt. Der Verdünnungsfaktor bei Verwendung von Trypanblau geht entsprechend in die Berechnung der Zellzahl ein.

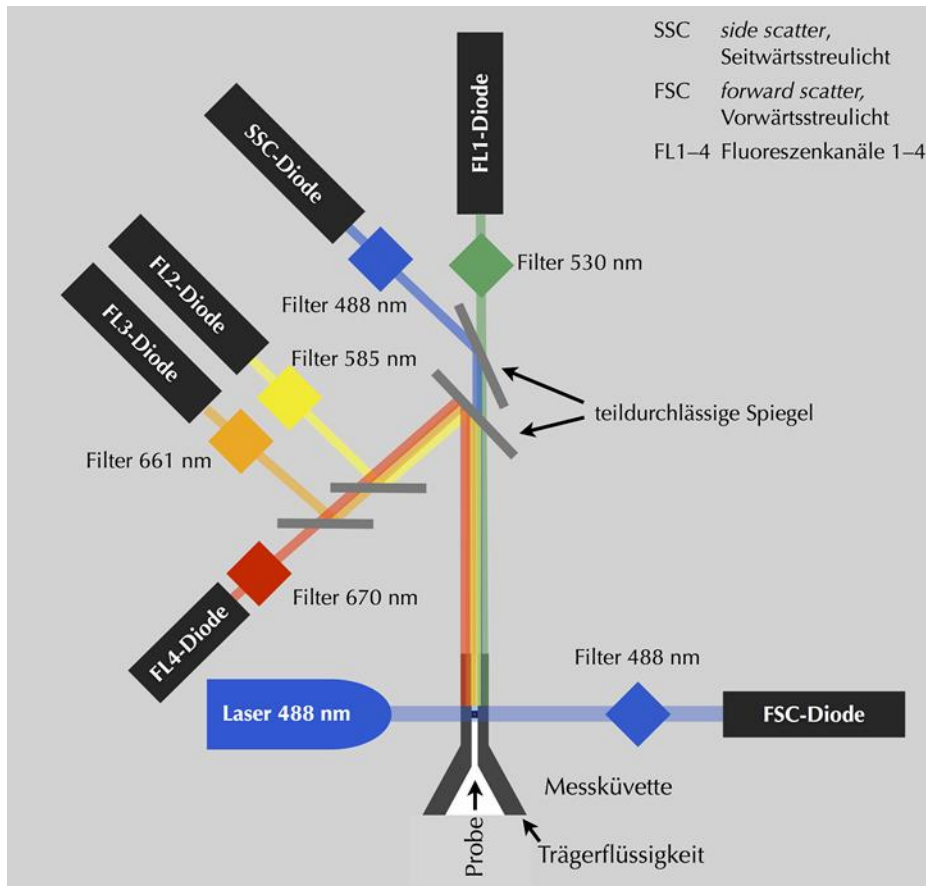
## 3.2 Bestrahlung der Zellen

Die Bestrahlung erfolgte durch das Gulmay RS225A device (Gulmay Medical, Camberly, UK) bei 200 kv, 15 mA, Filter 5 und Table 500, mit den Dosen 2 Gy für 2 min 14 sec, 4 Gy für 4 min 28 sec und 6 Gy für 6 min 42 sec.



### 3.3 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) oder Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften (Größe, Granularität, Oberflächenmerkmale) voneinander unterschieden werden können. Der Nachweis von auf der Zelloberfläche exprimierten Antigenen ist durch die Kopplung von Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen möglich. Durch Druckverhältnisse entsteht ein laminarer Probenstrom und die zu messenden Zellen fließen einzeln an einem Laserstrahl vorbei. Nachdem der Laser auf die Zellen auftrifft, wird sein Licht mittels unterschiedlicher Bestandteile im Probenstrom gestreut und über ein komplexes optisches System, bestehend aus Linsen, Spiegeln und Detektoren erfasst. Vorwärts gerichtetes Streulicht (forwardscatter, FSC) gibt Auskunft über die Zellgröße, seitwärts gerichtetes (sidescatter, SSC) über die Zellgranularität. Durch Markierung mit an Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper können Aussagen über die Oberflächenexpression bestimmter Antigene gemacht werden. Erfasst der Laser die markierten Zellen, werden die Farbstoffe angeregt und emittieren Licht in bestimmter Wellenlänge. Dieses wird durch das optische System des FACS-Geräts verarbeitet und gibt für jeden Farbstoff ein spezifisches Signal ab (Luttmann et al., 2014). Für die Auswertung können die Daten in Dotplots oder Histogrammen veranschaulicht werden. In Dotplots wird jedes gemessene Ereignis durch einen Punkt repräsentiert, im Histogramm wird die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Alle Messungen wurden mit dem FITC-markierten monoklonalen Antikörper cmHsp70.1, welcher spezifisch an membrangebundenes Hsp70 bindet, durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein FITC-markierter Isotyp-gematchter Antikörper eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde die MHC-Klasse-I Expression bestimmt.



**Abbildung 10:** Aufbau FACS

### 3.3.1 Viabilität (PI-Exklusion)

PI (Propidiumiodid) wirkt als Interkalator an doppelsträngiger DNA, sein Absorptionsmaximum liegt bei 490 nm, das Emissionsmaximum bei 635 nm (Luttmann et al., 2014). Normalbeschaffene Zellmembranen stellen eine Barriere für PI dar, apoptotische oder tote Zellen mit permeabler Zellmembran nehmen den Farbstoff auf. Der Zellkern wird angefärbt und die Fluoreszenz sichtbar, wodurch eine Differenzierung zwischen viablen und toten Zellen möglich wird.

### 3.3.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2016. Unter der Annahme einer Normalverteilung der Samples wurde ein Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben mit 95% Konfidenzintervall durchgeführt. Der entstehende p-Wert gibt Rückschlüsse auf das Signifikanzniveau.

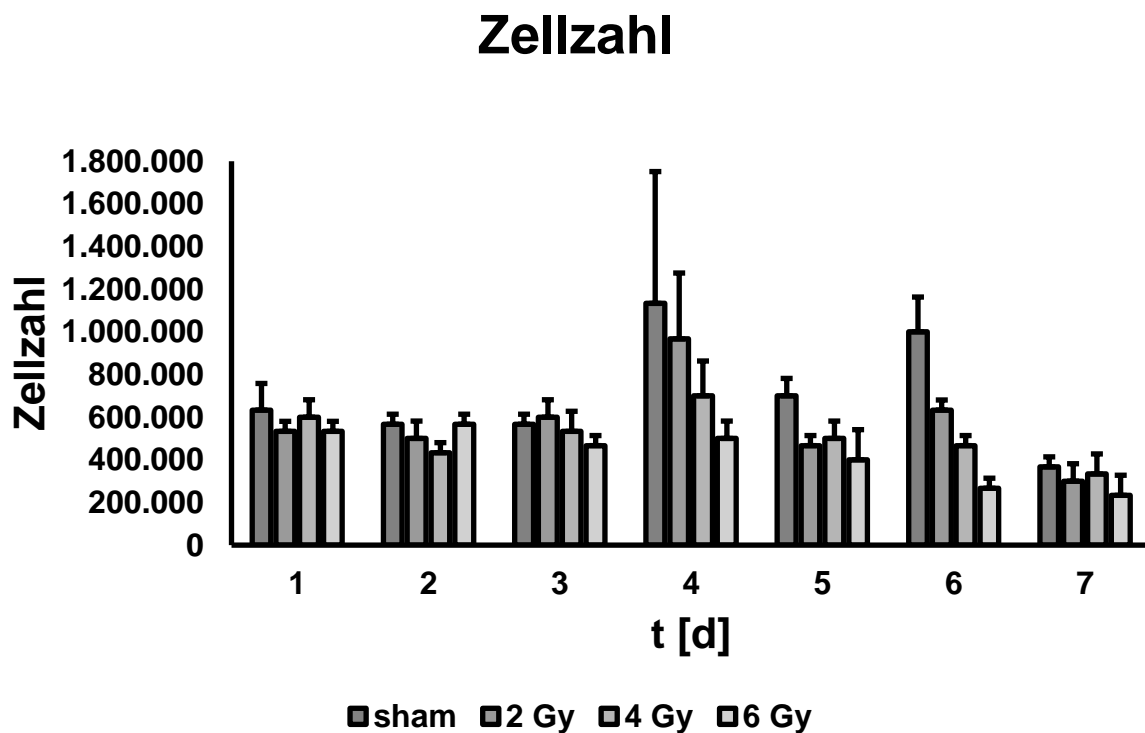
**Tabelle 8:** Signifikanzniveau

<b>Signifikanzniveau</b>	<b>Darstellung</b>
<b><math>p \leq 0,05</math></b>	* (signifikant)
<b><math>p \leq 0,01</math></b>	** (stark signifikant)
<b><math>p \leq 0,001</math></b>	*** (höchst signifikant)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellzahlentwicklung

Um Abweichungen in der Hsp70 Expression aufgrund unterschiedlicher Zelldichten zu vermeiden, wurden die Zellen initial mit unterschiedlichen Zellzahlen ausgesät (Tabelle 8: Zellzahldichte). Damit sollten die zu erwartenden Zellzahlveränderungen, die aus Bestrahlung (Verminderung der Zellzahl) und Verweildauer in Kultur (exponentieller Anstieg der Zellzahl) hervorgehen, ausgeglichen werden.



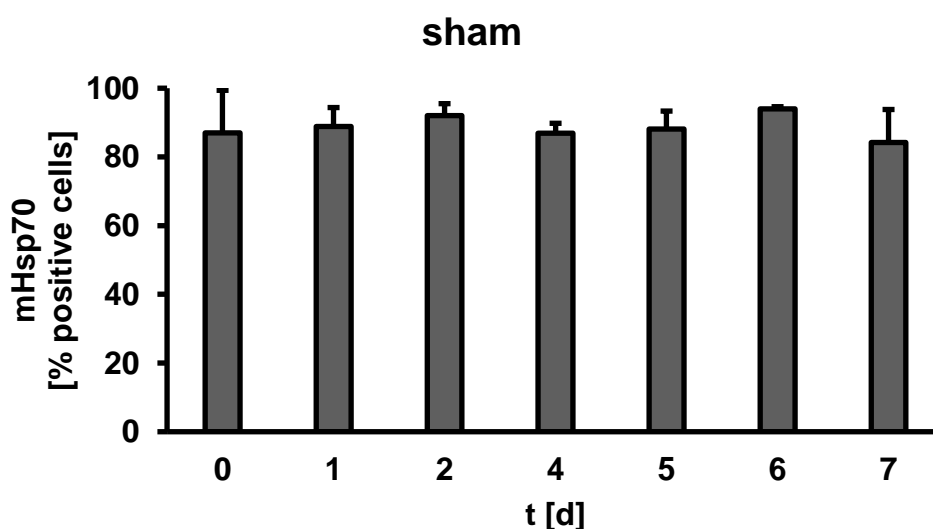
**Abbildung 11:** Zellzahl bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis (sham/ 2 Gy/4 Gy/6 Gy) im Zeitverlauf

Abb. 11 zeigt die Zellzahlen mit unterschiedlicher Bestrahlungsdosis zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Bis Tag 3 blieb die Zellzahl, unabhängig von der Bestrahlungsdosis konstant bei einem Mittelwert von  $544,444$ . Am Tag 4 wurde bei den sham bestrahlten Zellen eine Zellzahl von  $1,13 \times 10^6 \pm 618,24$ , bei 2 Gy  $0,96 \times 10^6 \pm 309,12$ , bei 4 Gy  $0,7 \times 10^6 \pm 163,29$  und bei 6 Gy  $0,5 \times 10^6 \pm 81,65$  gemessen. Tag 5 zeigte vergleichbare Zellzahlen wie an den Tagen 1-3. Am Tag 6 wurden folgende Zellzahlen gezählt: sham:  $1 \times 10^6 \pm 163,29$ , 2 Gy:  $0,63 \times 10^6 \pm 47,14$ , 4 Gy:

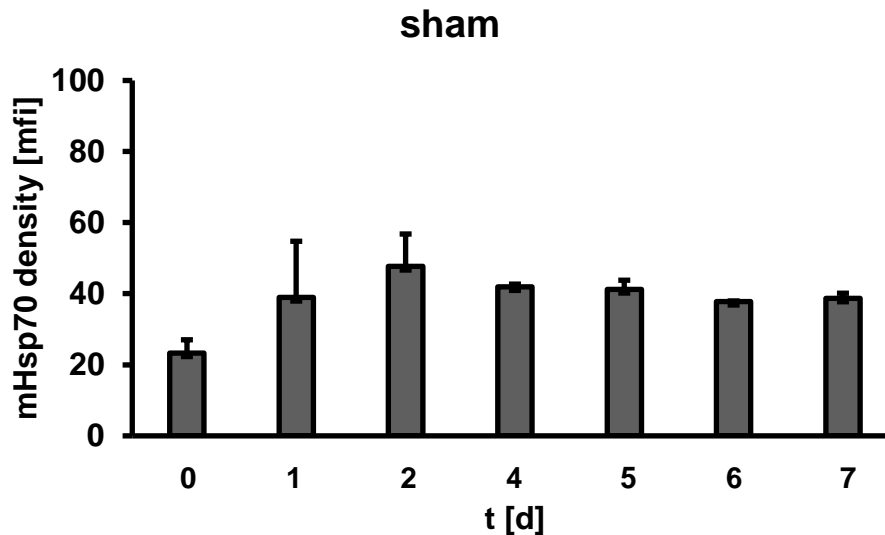
$0,46 \times 10^6 \pm 47,14$ , 6 Gy:  $0,26 \times 10^6 \pm 47,14$ . Am Tag 7 wurden bei der sham Bestrahlung  $0,36 \times 10^6 \pm 47,14$ , bei 2 Gy  $0,3 \times 10^6 \pm 81,65$ , bei 4 Gy  $0,33 \times 10^6 \pm 94,28$  und bei 6 Gy  $0,23 \times 10^6 \pm 94,28$  gemessen.

## 4.2 Scheinbestrahlung 0 Gy (sham)

Die Zellen, die mit 0 Gy Scheinbestrahlung (sham) behandelt wurden, waren den gleichen Bedingungen ausgesetzt, wie Zellen, die mit 2, 4 und 6 Gy bestrahlt wurden. Abweichungen der Werte, welche auf Temperaturänderungen, Ortswechsel und Mobilisierung in den Zellkulturflaschen zurückzuführen sind, sollten so vermieden werden. Veränderungen im Hsp70-Wert, die nicht auf die Bestrahlung zurückzuführen sind, sondern aus Zellkulturbedingungen hervorgehen, sollen durch dieses Vorgehen weitestgehend ausgeschlossen werden. Hsp70-Werte wurden ebenso wie bei den bestrahlten Zellen zu jedem Zeitpunkt d1-d7 gemessen. Diese dienen als Kontrolle und Referenzwerte für Wertschwankungen, die sich nach Bestrahlung ergeben. Alle Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander wiederholt ( $n=3$ ). Abbildung 12B zeigt die Hsp70 Expression nach Scheinbestrahlung (sham=0 Gy). Alle Werte liegen im Mittel um  $38,5121 \pm 6,9101$ . Der höchste Hsp70-Wert wird am Tag 2 erreicht ( $47,67 \pm 0,77$ ), der niedrigste Wert am Tag 0 ( $23,315 \pm 3,725$ ). Im Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben zeigte sich keine statistische Signifikanz zwischen den Werten der einzelnen Zeitpunkte ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 12A:** mHsp70 positive Zellen nach Scheinbestrahlung (sham) mit 0 Gy (Fellinger et al., 2020)



**Abbildung 12A:** mHsp70 positive Zellen nach Scheinbestrahlung (sham) mit 0 Gy (Fellinger et al., 2020)

### 4.3 Oberflächenexpression Hsp70 nach Bestrahlung

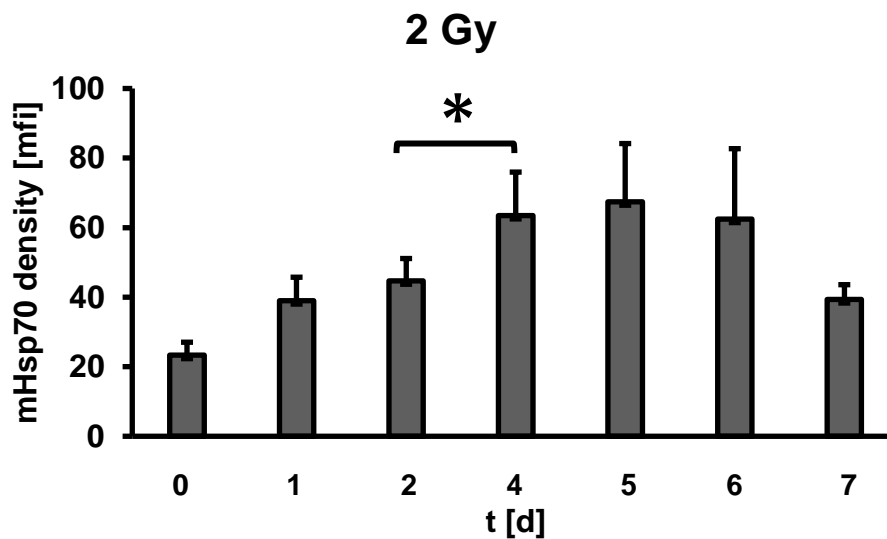
Durch Bestrahlung mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen (2 Gy, 4 Gy, 6 Gy) und Messung zu unterschiedlichen Zeitpunkten, ergaben sich sowohl zeit-, als auch dosisabhängige Veränderungen in den Hsp70-Werten. Diese werden im Folgenden zuerst separat voneinander, später in einer Zusammenschau präsentiert.

#### 4.3.1 Zeitabhängige Effekte

##### 4.3.1.1 Bestrahlungsdosis 2 Gy

Bei gleichbleibender Dosis von 2 Gy zeigten sich im Zeitverlauf deutliche Unterschiede in den Hsp70-Werten. Wie in Abbildung 13 deutlich wird, wurde der niedrigste Wert am Tag 0 (23,315 mfi  $\pm$  3,725) gemessen (Kontrolle, sham), stieg dann im Zeitverlauf über Tag 1 (39,01 mfi  $\pm$  6,724) und Tag 2 (44,71 mfi  $\pm$  6,4) kontinuierlich an, um nach Tag 4 (63,50 mfi  $\pm$  12,459) am Tag 5 mit 67,43 mfi  $\pm$  16,73 sein Maximum zu erreichen. Am Tag 6 nahm der gemessene Hsp70-Wert (62,44 mfi  $\pm$  20,24) ab, um sich am Tag 7 (39,31 mfi  $\pm$  4,27) dem Ausgangswert zu nähern. Im Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben zeigte sich zwischen

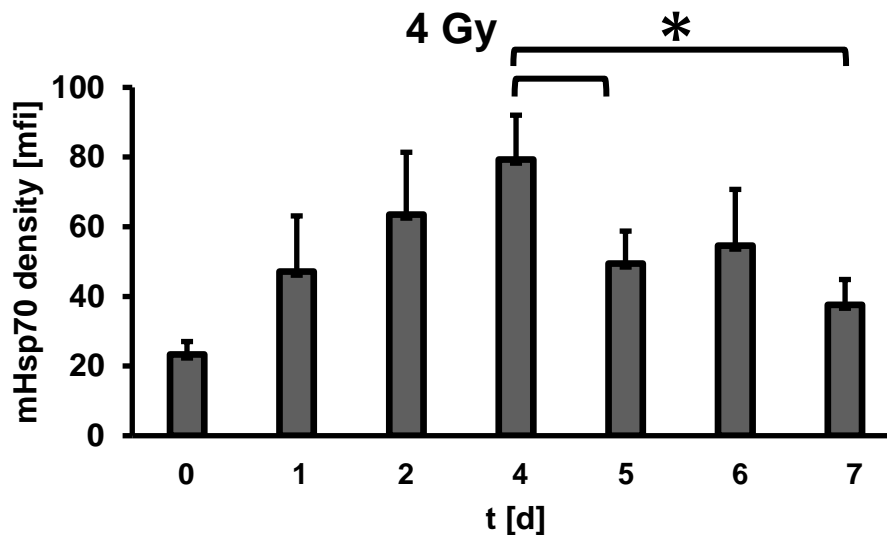
den am Tag 2 ( $44,71 \text{ mfi} \pm 6,4$ ) und Tag 4 ( $63,50 \text{ mfi} \pm 12,459$ ) gemessenen Hsp70-Werten mit  $p=0,029$  statistische Signifikanz.



**Abbildung 13:** mHsp70 Expression nach Bestrahlung mit 2 Gy (Fellinger et al., 2020)

#### 4.3.1.2 Bestrahlungsdosis 4 Gy

Bei gleichbleibender Bestrahlung mit 4 Gy ergaben sich im Zeitverlauf von Tag 1 bis Tag 7 deutliche Schwankungen in den Hsp70-Werten. Wie Abbildung 14 zeigt, stieg die Membran Hsp70 Intensität, gemessen in „mean fluorescence intensity (mfi) values“, ausgehend von der nicht bestrahlten Kontrolle d0 ( $23,315 \text{ mfi} \pm 3,725$ ) am Tag 1 mit  $47,09 \pm 16,01$  und Tag 2  $63,47 \pm 17,90$  bis zum maximalen Wert von  $79,25 \pm 12,76$  am Tag 4 an, um danach am Tag 5 mit  $49,43 \pm 9,32$  stark abzufallen, ausgehend davon am Tag 6 mit  $54,57 \pm 16,14$  wieder etwas zu steigen und am Tag 7 mit  $37,60 \pm 7,24$  weiter zu fallen. Die Werte von Tag 4 ( $79,25 \pm 12,76$ ) und Tag 5 ( $49,43 \pm 9,32$ ) zeigten im Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben mit  $p=0,048$  statistische Signifikanz. Ebenso die Werte von Tag 4 ( $79,25 \pm 12,76$ ) und Tag 7 ( $37,60 \pm 7,24$ ) mit  $p=0,017$ .



**Abbildung 14:** mHsp70 Expression nach Bestrahlung mit 4 Gy (Fellinger et al., 2020)

#### 4.3.1.3 Bestrahlungsdosis 6 Gy

Bei Bestrahlung mit 6 Gy ergaben sich im Zeitverlauf von Tag 1 bis Tag 7 deutliche Schwankungen in den Hsp70-Werten. Wie in Abbildung 15 erkenntlich wird, stieg die Membran Hsp70 Intensität, gemessen in „mean fluorescence intensity (mfi) values“, ausgehend von der nicht bestrahlten Kontrolle d0 (23,315 mfi ± 3,725) am Tag 1 auf 83,54 ± 14,22. Am Tag 2 wurde ein mfi von 82,54 ± 12,5 gemessen. Am Tag 4 sank der mfi auf 75,11 ± 7,73, am Tag 5 weiter auf 40,74 ± 8,08, am Tag 6 wurde ein durchschnittlicher mfi von 43,37 ± 15,67 gemessen, am Tag 7 40,02 ± 5,71. Statistische Signifikanz im Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben ergab sich zwischen den mfi Werten von Tag 0 und Tag 1 ( $p=0,019$ ), ebenso zwischen den mfi Werten von Tag 4 und 5 ( $p=0,032$ ).



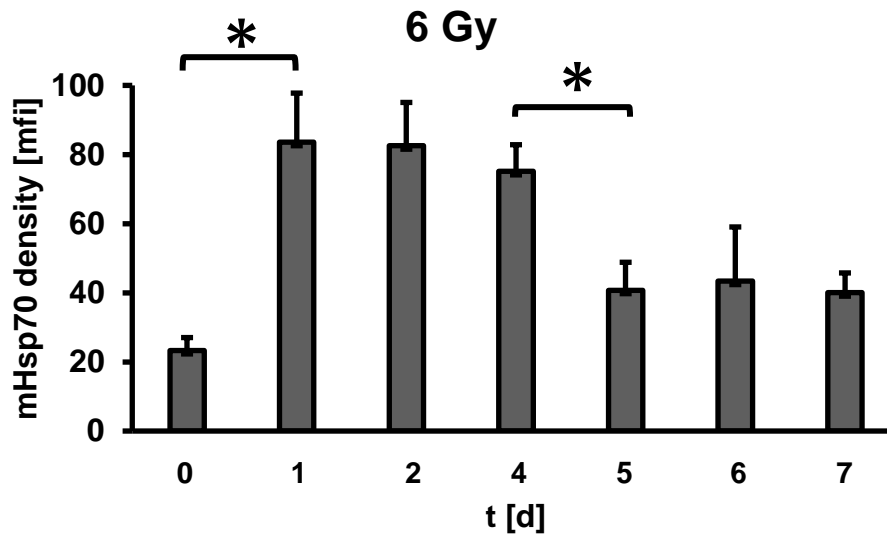


Abbildung 15: mHsp70 Expression nach Bestrahlung mit 6 Gy (Fellinger et al., 2020)

### 4.3.2 Dosisabhängige Effekte

#### 4.3.2.1 am Tag 1 (D1)

Abbildung 16 zeigt die gemessenen Hsp70-Werte in mfi am Tag 1. Verglichen wurde die Auswirkung der unterschiedlichen Bestrahlungsdosen sham, 4 Gy und 6 Gy. Unter sham Bestrahlung wurde ein Wert von  $38,93 \pm 15,82$  erreicht, unter 4 Gy  $47,09 \pm 16,01$  und 6 Gy  $83,54 \pm 14,22$ . Statistische Signifikanz zeigte sich zwischen den Hsp70-Werten bei sham und 4 Gy ( $p=0,0047$ ), sowie zwischen den Hsp70-Werten bei sham und 6 Gy ( $p=0,0071$ ).

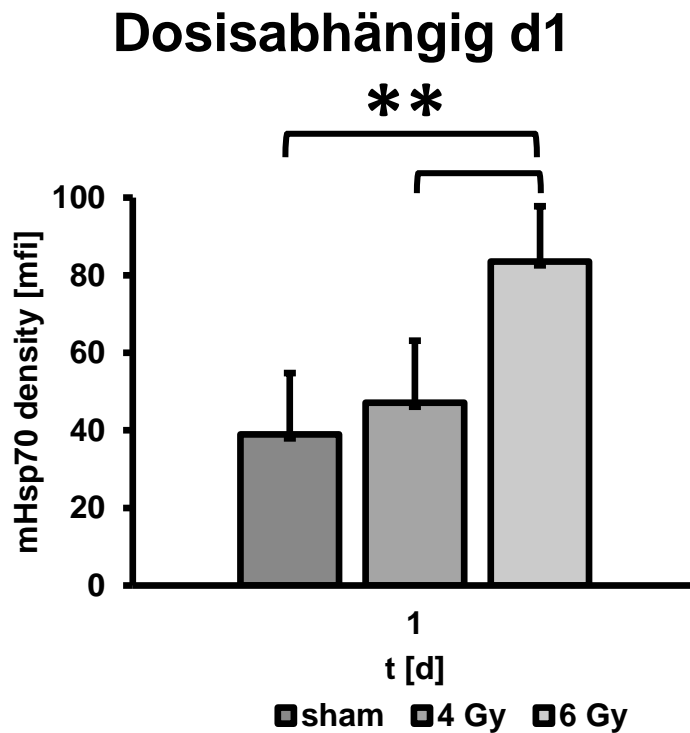


Abbildung 16: Dosisabhängige mHsp70 Expression am d1 (Fellinger et al., 2020)

#### 4.3.2.2 am Tag 4 (D4)

Abbildung 17 zeigt die gemessenen Hsp70-Werte in mfi am Tag 4. Verglichen wurde die Auswirkung der unterschiedlichen Bestrahlungsdosen sham, 4 Gy und 6 Gy. Unter sham Bestrahlung wurde ein Wert von  $41,92 \pm 0,77$  erreicht, bei 4 Gy  $79,25 \pm 12,76$  und unter 6 Gy  $75,11 \pm 7,73$ . Statistische Signifikanz zeigte sich zwischen den Hsp70-Werten bei sham und 4 Gy ( $p=0,026$ ), sowie zwischen den Hsp70-Werten bei sham und 6 Gy ( $p=0,015$ ).

## Dosisabhängig d4

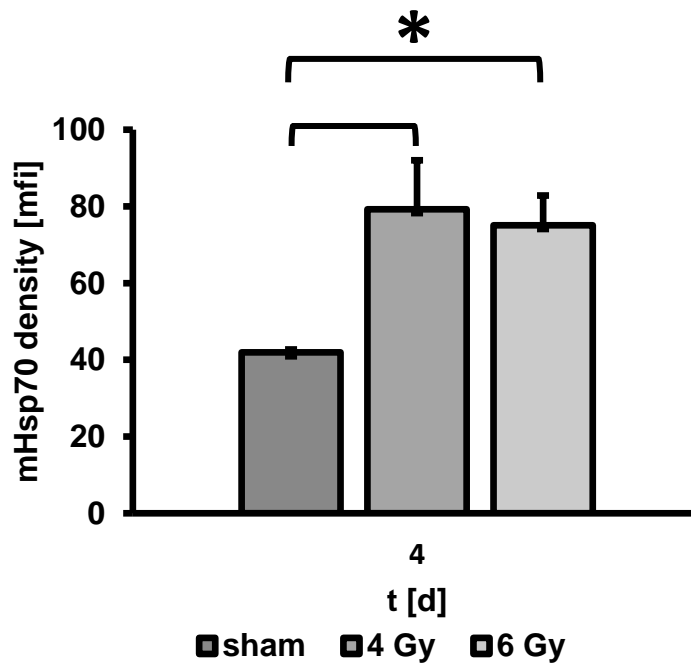


Abbildung 17: Dosisabhängige mHsp70 Expression am d4 (Fellinger et al., 2020)

### 4.3.2.3 am Tag 7 (D7)

Abbildung 18 zeigt die gemessenen Hsp70-Werte in mfi am Tag 7. Verglichen wurde die Auswirkung der unterschiedlichen Bestrahlungsdosen sham, 4 Gy und 6 Gy. Unter sham Bestrahlung wurde ein Wert von  $38,73 \pm 1,41$  erreicht, unter 4 Gy  $37,60 \pm 7,24$  und 6 Gy  $40,02 \pm 5,71$ . Aus den gemessenen Werten ergab sich keine statistische Signifikanz.

## Dosisabhängig d7

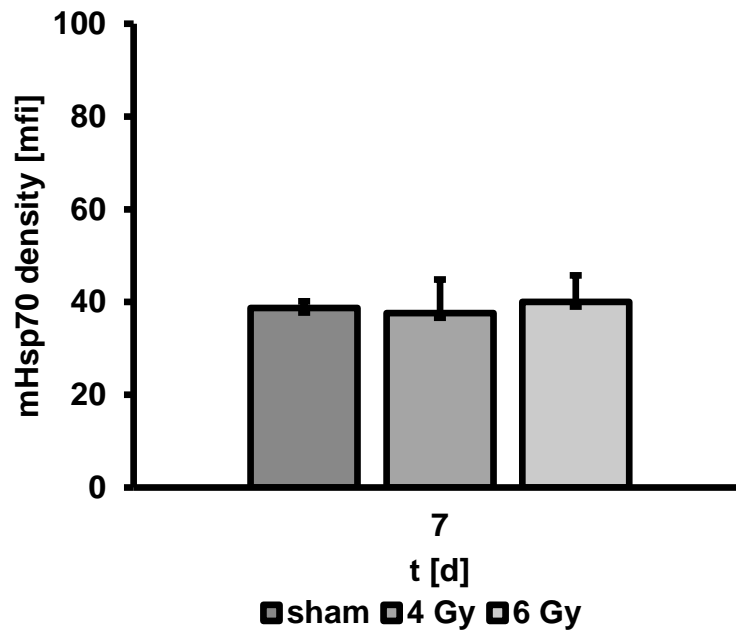


Abbildung 18: Dosisabhängige mHsp70 Expression am d7 (Fellinger et al., 2020)

### 4.3.3 Zusammenfassung zeit- und dosisabhängiger Effekte

## Zeitabhängige Effekte

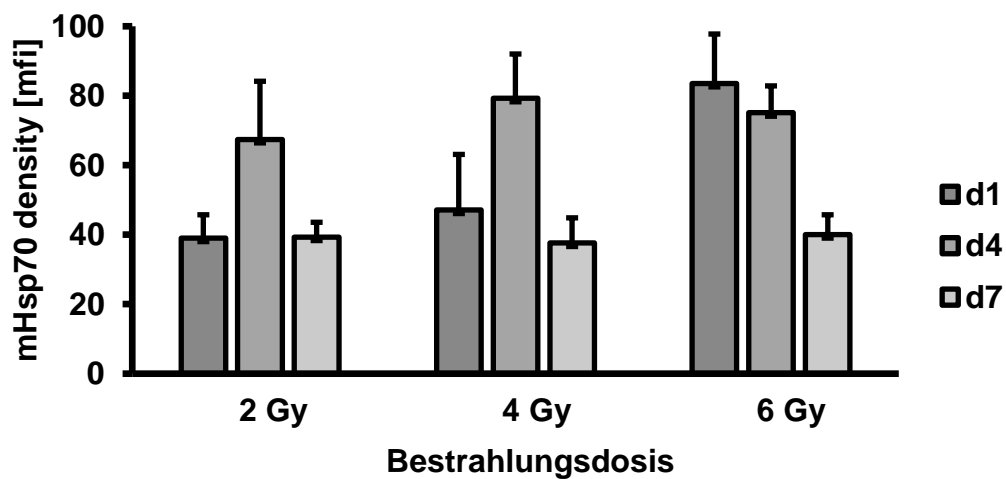


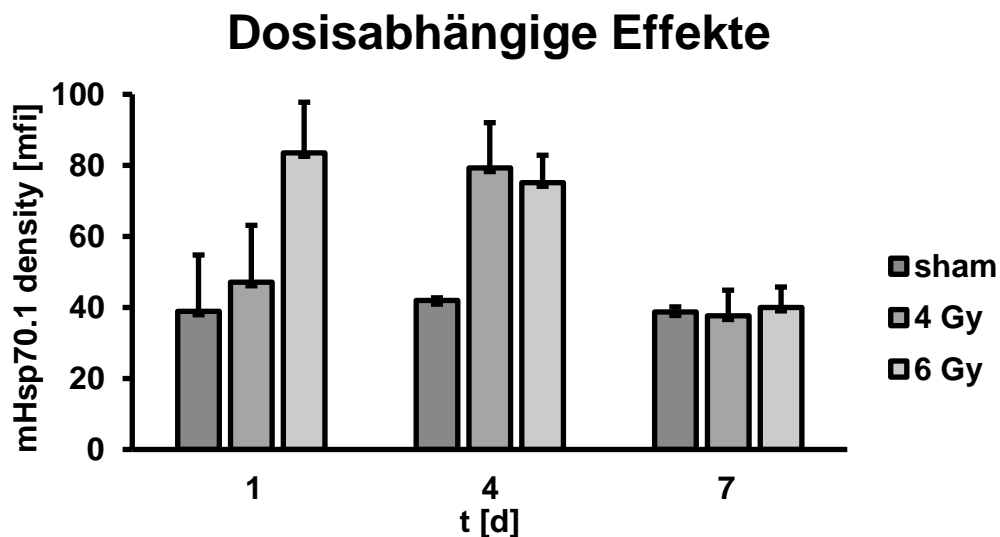
Abbildung 19: Zusammenschau der zeitabhängigen Effekte auf die mHsp70 Expression

Abbildung 19 zeigt die zeitabhängigen Effekte der Bestrahlung kurz nach Bestrahlung (d1), zu mittlerem Zeitpunkt der Beobachtungsperiode (d4) und zu Ende (d7).

Für Tag 1 stiegen die in mfi gemessenen Hsp70-Werte mit der Höhe der Bestrahlungsdosis von  $39,01 \pm 6,72$  bei 2 Gy über  $47,09 \pm 16,01$  bei 4 Gy zu  $83,54 \pm 14,22$  bei 6 Gy an.

Für Tag 4 ergaben sich folgende Hsp70-Werte:  $67,43 \pm 16,73$  bei 2 Gy, mit  $79,25 \pm 12,76$  bei 4 Gy ein leichter Anstieg und mit  $75,11 \pm 7,73$  bei 6 Gy ein leichter Abfall.

Am Tag 7 wurde bei der Bestrahlung mit 2 Gy  $39,31 \pm 4,27$  gemessen, bei 4 Gy  $37,60 \pm 7,24$ , bei 6 Gy  $40,02 \pm 5,71$ .



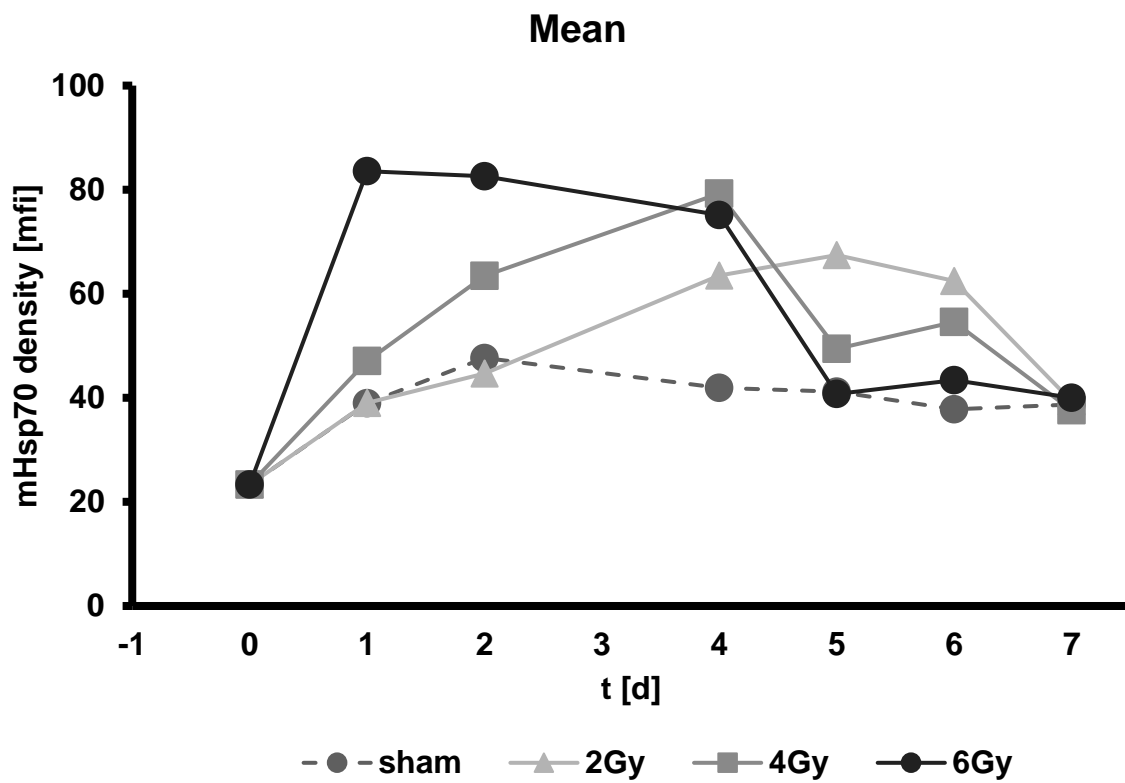
**Abbildung 20:** Zusammenschau der dosisabhängigen Effekte auf die mHsp70 Expression

Abbildung 20 zeigt die dosisabhängigen Effekte der Bestrahlung wiederum zu Beginn (d1), Mitte (d4) und Ende (d7) der Beobachtungsperiode.

Unter sham Bestrahlung zeigten sich folgende, fast gleichbleibende Hsp70-Werte: am Tag 1  $38,93 \pm 15,82$ , am Tag 4  $41,92 \pm 0,77$  und am Tag 7  $38,73 \pm 1,41$ .

Bei Bestrahlung mit 4 Gy wurde am Tag 1 ein Hsp70-Wert von  $47,09 \pm 16,01$  gemessen, am Tag 4  $79,25 \pm 12,76$  und am Tag 7  $37,60 \pm 7,24$ .

Bei Bestrahlung mit 6 Gy wurde am Tag 1 ein Hsp70-Wert von  $83,54 \pm 14,22$  gemessen, am Tag 4  $75,11 \pm 7,73$  und am Tag 6  $40,02 \pm 5,71$ .



**Abbildung 21:** Zusammenfassung der zeit- und dosisabhängigen Effekte auf die mHsp70 Expression (Fellinger et al., 2020)

Betrachtet man zeit- und dosisabhängige Effekte in der Zusammenschau (Abb. 21) wird deutlich, dass mit unterschiedlicher Bestrahlungsdosis der jeweils maximal gemessene Hsp70-Wert zu unterschiedlichen Zeitpunkten erreicht wird. Bei Bestrahlung mit 2 Gy wurde der Höchstwert am Tag 5 gemessen ( $67,43 \pm 16,70$ ). Bei Bestrahlung mit 4 Gy wurde der maximal gemessene Hsp70-Wert am Tag 4 erreicht ( $79,25 \pm 12,76$ ). Wurden die Glioblastomzellen U87 mit 6 Gy bestrahlt, wurde der Maximalwert am Tag 1 gemessen ( $83,52 \pm 14,22$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Zusammenfassung Hauptergebnisse

In der Annahme, dass humane Glioblastomzellen nach Bestrahlung im Sinne einer Stressantwort vermehrt membrangebundenes Hsp70 auf ihrer Oberfläche exprimieren und sich daraus ein therapeutisches Fenster für nachfolgende Immuntherapien mit Hsp70 reaktiven NK-Zellen ergeben kann, wurde diese Hypothese mittels FACS-Analyse unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 anhand der malignen Gliom-Zelllinie U87 *in vitro* untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich abhängig von Zeit in Kultur und Strahlendosis eine unterschiedliche Kinetik der Hsp70 Expression entwickelt. Der prozentuale Anteil der Hsp70 positiven Zellen blieb konstant, aber die Dichte der Hsp70 Expression, die sich aus dem „mean fluorescence intensity“ Wert ergibt, zeigte signifikante Veränderungen. Im Vergleich zur sham behandelten Kontrolle und zu unbehandelten Kontrollzellen (Daten sind nicht gezeigt) zeigte sich bei Bestrahlung mit geringer Dosis (2 Gy) ein langsamer, jedoch stetiger Anstieg der Hsp70-Expressionsdichte mit weicher Kurvenzeichnung und nach Erreichen des Maximalwerts ebenso ein langsames Absinken der Hsp70-Werte. Wurden die Zellen mit höheren Dosen bestrahlt (4 Gy), wurde der Höchstwert der Hsp70 Expression rascher und früher erreicht. Noch höhere Strahlendosen (6 Gy) führten zu einem fulminanten Anstieg der Hsp70 Expression bereits 24 h nach Bestrahlung mit Ausbildung einer für 72 h anhaltenden Plateauphase. Unabhängig von der Bestrahlungsintensität zeigte sich nach Tag 7 ein Rückgang der Hsp70 Expression auf Werte, die mit den Kontrollwerten bei sham-Bestrahlung vergleichbar sind.

#### 5.1.1 Bedeutung der Hsp70-Proteine

Hsp70 kann in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten vorkommen, intrazellulär sowie extrazellulär, membrangebunden und/oder lysosomal/endosomal. Die Translokation des Hsp70-Proteins auf die Plasmamembran verläuft über einen nicht-klassischen, ER/Golgi-unabhängigen Transportweg (Multhoff et al., 2011), genaue Mechanismen werden jedoch nach wie vor kontrovers diskutiert, da einheitliche Sekretionssignale noch immer Gegenstand aktueller Forschung sind. Neben Hsp70 ohne Membrantranslokationsdomäne, finden sich auch andere

Moleküle, wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und HMGB-1, die ebenfalls ohne gerichtete Sekretion auf der Plasmamembran von Tumorzellen erscheinen (Nickel & Seedorf, 2008). Schilling et al. konnte in ihren Untersuchungen zeigen, dass sich Hsp70-Proteine besonders nach Strahlen- und Hypoxie-induziertem Stress in Kombination mit Phosphatidylserin (PS) auf der Plasmamembran von Tumorzellen finden, nicht jedoch auf korrespondierendem Normalgewebe (Schilling et al., 2009). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung erhebliche Auswirkung auf die Organisation der Doppellipidschicht der Tumorzellen und ebenso auf die Interaktion der Hsp70-Proteine mit unterschiedlichen Lipidkomponenten haben. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe Multhoff zeigen, dass Hsp70 an der Zellmembran unter physiologischen Bedingungen mit der „lipid raft“ Komponente Globyltriaosylceramid (Gb3) auf der Zelloberfläche von Tumorzellen vergesellschaftet vorliegt, wohingegen nach Stresseinwirkung Hsp70 mit PS, das sich außerhalb von „lipid rafts“ in der Zellmembran befindet, interagiert (Multhoff et al., 2015).

Eine Interaktion von Hsp70 mit lysosomalen Membranen geht mit einer gesteigerten Stabilisierung dieser Membranen und demzufolge einer erhöhten Resistenz der Tumorzellen gegenüber äußeren Stressfaktoren wie z.B. Bestrahlung einher (Petersen et al., 2010). Erhöhte Hsp70-Werte korrelieren mit Tumorprogression, voranschreitender Metastasierung, sowie Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie (Aghdassi et al., 2007). Ebenso geht eine erhöhte Hsp70 Expression im Zellinneren mit Vorgängen einher, welche die zelluläre Apoptose verhindern: die Translokation des pro-apoptotischen Bax-Moleküls wird inhibiert, TNF $\alpha$  induzierte Apoptose wird durch Komplexbildung verhindert, Apoptosesignalwege über Caspase-3, Caspase-9 und Apaf-1 werden gestört. Insgesamt wirken erhöhte Hsp70-Werte im Zellinneren zellprotektiv und anti-apoptotisch (Jäättelä et al., 1998).

Eine besondere Rolle spielt das membrangebundene Hsp70-Molekül: Zum einen trägt die Lokalisation von Hsp70-Molekülen in lysosomalen Membranen von Tumorzellen zur Stabilität dieser bei, wirkt also protektiv vor Apoptose-induzierenden Mechanismen (Nylandsted et al., 2004). Zum anderen konnte Multhoff et al. bereits 1995 nach Untersuchung mehrerer hundert Tumorbiopsien zeigen, dass membrangebundenes Hsp70 lediglich auf der Plasmamembran von Tumorzellen, nicht jedoch auf den korrespondierenden Normalgeweben exprimiert wird (Multhoff et



al., 1995). Dies geht mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe um Ferrarini einher, welche darlegen konnte, dass die Expression von weiteren Vertretern der HSP Familien (Hsp70 und Hsp90) lediglich auf Tumorzellen, nicht aber auf normalen Zellen detektiert werden konnte (Ferrarini et al., 1992). Auch Hantschel et al. konnten durch Screening unterschiedlicher Tumorbiopsien diverser Entitäten zeigen, dass die Lokalisation von Hsp70 auf den Zelloberflächen höchst tumorspezifisch ist (Hantschel et al., 2000). Ionisierende Strahlung induziert die zytosolische Expression von Hsp70 in normalen, wie auch Tumorzellen. Unterschiede in der Lipidzusammensetzung der Plasmamembran machen es jedoch nur Tumorzellen möglich das vorher im Zytosol gebildete Hsp70 auch in die Zellmembran zu transportieren und es membrangebunden zu präsentieren (M. Gehrman et al., 2005). Funktionell fungiert Membran-Hsp70 als tumorspezifisches Erkennungsmolekül, dessen Expression nach Stress, z.B. Radiotherapie noch weiter verstärkt wird.

### **5.1.2 Ionisierende Strahlung im Hinblick auf mHsp70 Expression**

Die Radiotherapie spielt eine entscheidende Rolle in der Behandlung von Tumorerkrankungen, sei es als alleinige Therapieform oder in Kombination mit chirurgischen Eingriffen, Chemotherapie und/oder Immuntherapie. Trotzdem ist das klinische Ansprechen der Tumorzellen auf Strahlentherapie nicht immer optimal: strahlenresistente Zellklone der ursprünglichen Tumorzellen bilden - ganz im Sinne des „survival of the fittest“- zellprotektive Mechanismen aus, um die Zelle vor weiteren Schäden zu bewahren. Zugrunde liegt unter anderem eine Hochregulation des Hsp70-Proteins, welches als Stressreaktion auf unterschiedliche Einflüsse wie ionisierende Strahlung, Hitze, Hypoxie oder Nahrungsknappheit vermehrt produziert und exprimiert wird (Daugaard et al., 2007). Lange Zeit wurde die therapeutische Anwendung ionisierender Strahlung lediglich aufgrund ihrer lokal einsetzbaren, zytotoxischen Wirkung zur Reduktion und Kontrolle des Tumorwachstums gerechtfertigt. Dosis und angewandte Fraktionierung bestimmen die Wirkung der Radiotherapie, die von inflammatorischen Veränderungen bis hin zu unterschiedlichen Arten des Zelltodes reichen (Golden et al., 2012). Zusätzlich zu der direkten zellschädigenden Wirkung, die ionisierende Strahlen erzeugen, werden ebenso nichtbeabsichtigte abscopale Effekte beschrieben, welche zu einer T- und

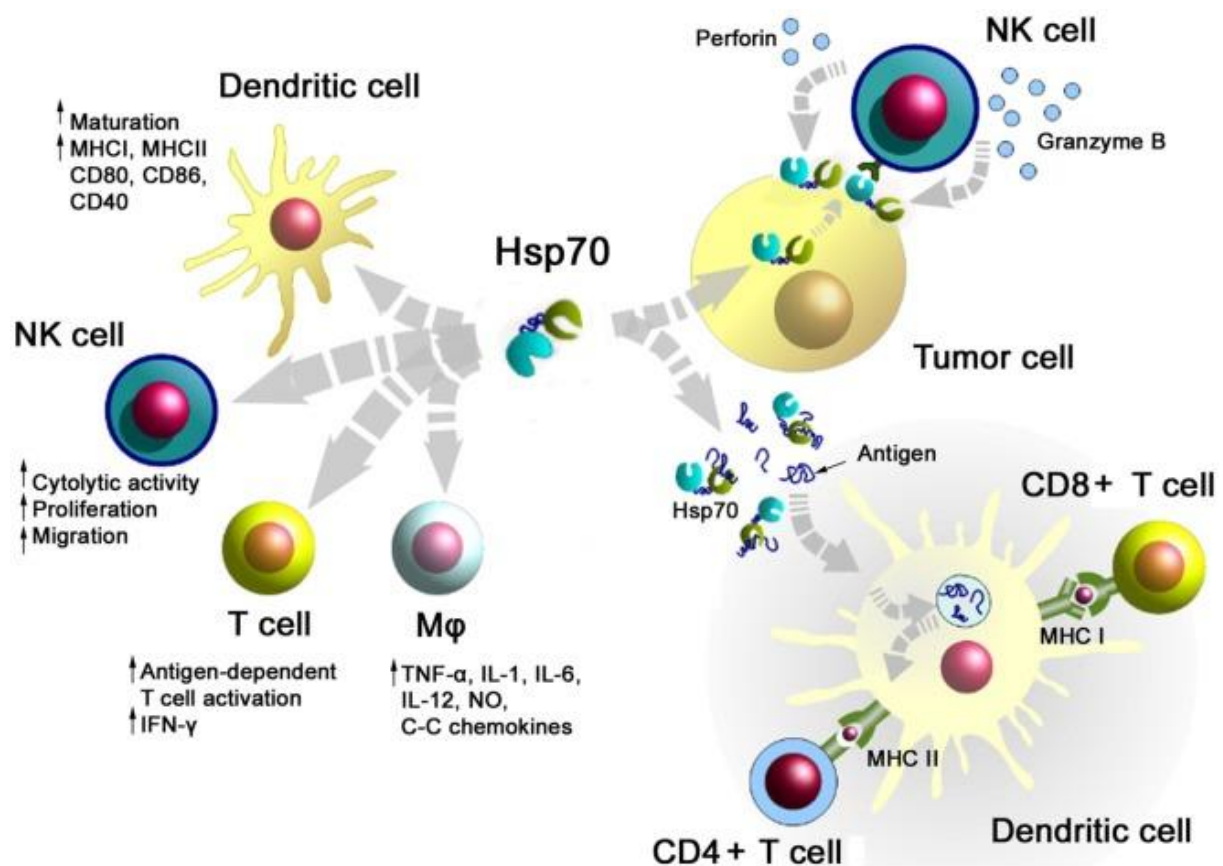
NK-Zellen vermittelten Immunantwort führen können (Wattenberg et al., 2014; Multhoff et al., 2015). Weiterhin belegen zahlreiche Daten experimenteller Studien mittlerweile auch, dass der Radiotherapie neben ihrer rein zytotoxischen Wirkung eine immunstimulatorische Wirkung zukommt (Formenti & Demaria, 2013). Vor allem die Beziehung zwischen strahleninduziertem, immunologischem Zelltod und der sich daraus ergebenden Möglichkeit der Antigen-Präsentation via DC's, um tumorspezifische T-Zellen zu aktivieren, spielt eine tragende und zukunftssträchtige Rolle. Ebenso darf nicht vernachlässigt werden, dass Tumorzellen, welche mit einer sublethalen Dosis bestrahlt werden, ihre Anfälligkeit und Affinität gegenüber Immuneffektoren verstärken (Hodge et al., 2012).

Auf diese Effekte zielt die Überlegung meiner Promotionsarbeit ab, welche die Hauptaufgabe der Radiotherapie, neben primären Vorteilen, wie Wachstumskontrolle, Metastasierungsstopp und lokaler Verringerung der Tumormasse, darin sieht, die Expression von Hsp70-Proteinen auf den nach Bestrahlung noch lebenden Zellen zu erhöhen. Da lediglich Tumorzellen in der Lage sind Hsp70 an die Membran zu transportieren und dort zu präsentieren, dient das membrangebundene Hsp70 als tumorspezifisches Antigen und die Radiotherapie als geeigneter Verstärker.

### **5.1.3 Hsp70 aus immunologischer Sicht**

Unter der Annahme, dass durch vorangegangene Radiotherapie die Expression von membrangebundenem Hsp70 erhöht wurde und dieses Phänomen nur auf Tumorzellen zu beobachten ist, nicht jedoch auf korrespondierendem Normalgewebe (Vega et al., 2008; Multhoff et al., 1997), lässt dies die Schlussfolgerung zu, dass membrangebundenes Hsp70 als tumorspezifischer Biomarker angesehen werden kann, dessen Expression nach Therapie noch verstärkt wird. Eine wichtige Rolle in der Hsp70-vermittelten Immuntherapie spielen neben den Hsp70-präsentierenden Tumorzellen, die mit TKD/IL-2 vorstimulierten NK-Zellen, welche Membran-Hsp70-positive Tumorzellen spezifisch erkennen und durch die Freisetzung von Granzym B und Perforin Apoptose initiieren (Moretta et al., 2005). Sowohl in *in vitro* (Multhoff et al., 2001), als auch in *in vivo* (Multhoff et al., 2006) Studien konnte bereits gezeigt werden, dass bestrahlte Tumorzellen mit erhöhter Hsp70 Membranexpression von aktivierten NK-Zellen signifikant besser lysiert werden als unbestrahlte Tumorzellen

mit niedrigerer Membran-Hsp70 Expression (Multhoff et al., 2015). Neben ihrer Funktion als Zielprotein für aktivierte NK-Zellen, können membrangebundene Hsp70-Proteine auch andere immunologische Effekte erzeugen: so können immunogene Tumorpeptide gebunden und durch Kreuzpräsentation auf MHC-Molekülen das adaptive Immunsystem stimulieren (Srivastava et al., 1998) oder NK-Zellen sowie T-Zellen als Vertreter des angeborenen Immunsystems aktivieren (Rubner et al., 2014; Tosti et al., 2014). Abbildung 22 zeigt einen genauen Überblick über die immunomodulatorischen Funktionen des Hsp70-Proteins.



**Abbildung 22:** Immunmodulatorische Funktionen des Hsp70-Proteins (Multhoff et al., 2016)

Neben seinen bereits genannten Funktionen als klassisches Chaperon, welches die Präsentation und die Prozessierung von Tumorantigenen erleichtert und seiner Wirkweise als Zytokin, welches sowohl die angeborene, als auch die erworbene Immunantwort steuert (Elsner et al., 2007), zeigt exogen zugeführtes Hsp70 auch ein therapeutisches Potential als Adjuvant in der Antitumor-Immunität (Shevtsov et al., 2014). Präklinische Studien konnten bereits belegen, dass im Ratten-Glioblastom

Modell exogen zugeführtes Hsp70 sowohl zu einer signifikanten Inhibierung der Tumorprogression führte als auch mit einer erhöhten Zytotoxizität von NK- und T-Zellen einherging (Multhoff et al., 2016). Überzeugende Ergebnisse lieferte unter anderen die Arbeitsgruppe um Rafiee, welche nach Transfektion mit Hsp70.1 Gen Transfers in Maus-Tumorzellen eine komplette CD4+ und CD8+ vermittelte Tumoreradikation erzielen konnte (Rafiee et al., 2001). Aufbauend auf diesen Ergebnissen koppelte unsere Arbeitsgruppe Hsp70-Proteine auf sogenannte Nanocarrier, wie zB. Superparamagnetische Eisenoxid Nanopartikel (SPIONs), welche in der Lage sind Tumorzellen abzutöten und immunogene Tumorbestandteile zu DC's zu transportieren, um tumorspezifische CD8+ zytotoxische T-Zell Antworten in Glioblastompatienten zu stimulieren (Shevtsov et al., 2015). Bis jetzt zeigen mehrere klinische Untersuchungen, dass die exogene, intratumorale Applikation von Hsp70 entweder alleinig oder in Kombination mit anderen Therapiemöglichkeiten eine Antitumor-Immunität triggern kann (Maeda et al., 2015).

## **5.2 Zeit- und dosisabhängige Auswirkungen der Bestrahlung auf die Expression von mHsp70 auf humanen Glioblastomzellen**

Ausgehend von den oben genannten Ergebnissen zu ionisierender Bestrahlung und Expression des Hsp70-Proteins auf der Plasmamembran von Tumorzellen aus vorangegangenen Untersuchungen und bereitstehender Literatur, war es nun Gegenstand dieser medizinisch/experimentellen Doktorarbeit, herauszufinden, bei welcher Dosis und welchem Zeitpunkt nach Bestrahlung die mHsp70 Expression auf humanen Glioblastomzellen am höchsten ist. Die Zellen wurden dafür je nach Intensität der Bestrahlung und Verweildauer in Kultur in unterschiedlichen Dichten ausgesät, um zu gewährleisten, dass zu jedem Zeitpunkt, unabhängig von der Bestrahlungsdosis die Zellzahl konstant ist. Darauffolgend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten (sham, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy) behandelt und die mHsp70 Expression via FACS-Analyse gemessen.

### **5.2.1 Niedrige mHsp70 Expression bei sham Bestrahlung**

Bei sham Bestrahlung wurden die Zellen de facto nicht bestrahlt, jedoch allen Einflüssen (Ortswechsel, Temperaturunterschied, Mobilisierungsgefahr) ausgesetzt,

welchen auch die später tatsächlich bestrahlten Zellen ausgesetzt waren. Somit können die Hsp70-Werte dieser Zellen als Kontrolle eingesetzt werden und Umgebungs- und Zelldichte-abhängige Effekte auf die Hsp70 Expression weitgehend ausgeschlossen werden. Wie in vorausgegangenen Untersuchungen bereits gezeigt, war die Membran-Hsp70 Expression auf unbestrahlten Glioblastomzellen geringer als auf bestrahlten Glioblastomzellen (Kleinjung et al., 2003). Ebenso zeigen frühere Untersuchungen, dass ionisierende Strahlung bei sublethalen Dosen die Synthese von Hsp70 im Zytosol auch bei normalen Zellen stimuliert, jedoch nur Tumorzellen aufgrund einer tumorspezifischen Lipidzusammensetzung der Plasmamembran in der Lage sind Hsp70 aus dem Zytosol an die Plasmamembran zu translozieren (Multhoff et al., 2015). Ähnliche Ergebnisse konnten von Murakami et al. erhoben werden, welche die mHsp70 Konzentration bei verschiedenen Tumorzelllinien zuerst unter „non-stressed conditions“, darauffolgend nach Bestrahlung unterschiedlicher Intensitäten mittels Western Blot bestimmte. Hier konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle erhebliche Unterschiede in der Expression des membrangebundenen Hsp70 zu sehen waren (Murakami et al., 2015).

### **5.2.2 Strahlendosis 2 Gy/4 Gy: “late onset” und hoher Spitzenwert**

Bei geringer Strahlendosis von 2 Gy zeigte sich ein stetiger Anstieg der mHsp70 Expression bis zu einem Maximalwert um Tag 5, welcher bereits am Tag 6 wieder abfiel und sich den unbestrahlten Kontrollwerten näherte. Bei der höheren Dosis von 4 Gy zeigte sich ein rascher Anstieg mit einem Maximalwert am Tag 4 und sofort wieder abfallenden Werten. Am Tag 7 wurden Werte der unbestrahlten Kontrolle erreicht. Ähnliche Befunde belegte unter anderen die Arbeitsgruppe um Diller, welche zeigen konnte, dass die Expression von Hsp70-Proteinen einer bestimmten Kinetik unterliegt. Hierbei wurden Endothelzellen (bovine aortic endothelial cells) thermischen Stress ausgesetzt, die Messungen innerhalb eines Zeitfensters von 48 h durchgeführt und das zytosolische Hsp70 bestimmt. Die Erkenntnisse gehen mit den kinetischen Besonderheiten einher, welche bei unseren Messungen der mHsp70-Werte beobachtet werden konnten. Die Expression gilt verstärkt als Reaktion auf erhöhten, aber nicht letalen Stress, die Höhe der Überexpression ist proportional zur Intensität des zugeführten Stresses und die erhöhte Regulation der Stressproteine ist

ein vorübergehendes Phänomen (Diller, 2006). Es muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass die von Diller erhobenen Daten nur bedingt auf die mHsp70-Werte von Glioblastomzellen zutreffen, da anders als bei Endothelzellen eine abweichende, tumorzellspezifische Lipidkomposition der Plasmamembran vorliegt durch welche der Transport und die Externalisierung von Hsp70 möglich wird (M. Gehrman et al., 2005). Auch untersuchte die Gruppe um Diller nur einen Zeitraum von 48 h, um Zelldichteeffekte ausschließen zu können. Ziel meiner Arbeit war es, die Kinetik der Hsp70 Expression über einen möglichst langen Zeitraum zu untersuchen. Um Zelldichteeffekte auszuschließen, wurden unterschiedliche Zellzahlen zu Beginn der Tests ausgesät. Bei den Experimenten, die auf 7 Tage angelegt waren, wurde die Zellzahl so optimiert, dass es weder zu einer zu hohen noch zu einer zu geringen Zelldichte während der Kulturzeit kommt. Beides würde erheblichen Einfluss auf die Interaktionen der Zellen untereinander und somit auch auf die Expression von Stressproteinen nehmen. Sowohl eine zu hohe als auch eine zu niedrige Zellzahl könnte Veränderungen in der Expression von mHsp70 herbeiführen. Nicht auszuschließen ist also, dass durch die hohe Zelldichte an den ersten Tagen die Zellen auch aufgrund von Zelldichteeffekten und Nahrungsknappheit in eine Stresssituation geraten, demzufolge mehr Hsp70 synthetisieren und deshalb die Peaks um Tag 4 und 5 erreicht wurden. Diese Überlegungen gehen mit den Erkenntnissen einher, welche neben Hitze und ionisierender Strahlung auch Nahrungsknappheit als Ursache für die Hochregulation der Hsp70 Expression benennen und bereits durch weitere Arbeitsgruppen bestätigt wurden (Multhoff et al., 1999; Sharma et al., 2010). Ebenso muss in die Überlegungen miteinbezogen werden, dass ionisierende Strahlen hauptsächlich durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Kang et al., 2014) und anschließender Reaktion mit der DNA zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen, welche in Störungen der Zellfunktion, Mutation oder Apoptose resultieren (Van Der Kogel, 2009). Interessante Untersuchungen dazu wurde bereits von Paolini et al. durchgeführt, welche zeigen konnten, dass Glioblastomzellen der Linie U87 nach Bestrahlung sowohl vermehrt in Apoptose gehen als auch strahleninduziert vermehrt Hsp70 produzieren (Paolini et al., 2011). So zeigten sich gleichbleibende zytosolische Werte nach 0 Gy und 2 Gy, jedoch massiv erhöhte Hsp70-Werte nach Bestrahlung mit 4 Gy, was die Vermutung zulässt, dass erst ab einer bestimmten Strahlenintensität die Tumorzellen tatsächlich

in einen Schutzmodus übergehen und Reparaturmechanismen im Sinne der Hsp70 Produktion in Gang gesetzt werden.

Ebenso ist zu bemerken, dass lediglich durch die Messung der Membran-Hsp70 Expression nicht die vollständige Synthese und Expression der Hsp70-Proteine wiedergegeben werden kann. Neben der Detektion der membrangebundenen Moleküle via FACS-Analyse und der Quantifizierung der intrazellulären, extrazellulären und lysosomal, bzw. endosomal synthetisierten und gespeicherten Hsp70-Proteine, wäre die Ausweitung der Methodik auf weitere Glioblastomzelllinien nötig. Erst dann könnte die vollständige zelluläre Reaktion auf subletale Stressdosen vollständig erfasst und genaue Aussagen zur Kinetik der Hsp70-Proteine vorgenommen werden.

### **5.2.3 Strahlendosis 6 Gy: „early onset“ und andauernde Überexpression**

Bei Bestrahlung mit 6 Gy zeigte sich anders als bei den niedrigeren Bestrahlungsdosen ein rascher und fulminanter Anstieg der Hsp70-Werte bereits 24 h nach Bestrahlung mit einer anschließend 72 h dauernden Plateauphase. Darauffolgender Abfall der Hsp70-Werte bis Tag 7 auf annähernd sham-Werte gehen mit den Messergebnissen bei 2 Gy und 4 Gy einher. Die Höhe der Bestrahlungsdosis scheint direkten Einfluss auf die zeitliche Expression der Membran-Hsp70-Proteine zu haben. Unsere Ergebnisse lassen die Überlegung zu, dass bei Bestrahlung mit geringeren Dosen (2 Gy/4 Gy) eine unzureichende Stressreaktion ausgelöst wird, welche nicht zu einer Überexpression von Hsp70 führt. Durch die erhöhte Strahlenintensität bei 6 Gy könnte nun die Schwelle zur sofortigen Einleitung von Reparatur- und Schutzmechanismen bereits 24 h nach Bestrahlung erreicht worden sein. Calini konnte in seinen Untersuchungen von C3H 10T1/2 Zellen zeigen, dass lediglich bei höheren Dosen von 5-10 Gy eine Induktion der Hsp70-Synthese stattfindet, nicht jedoch bei niedrigeren Dosen. Ebenso legte er dar, dass die maximale Induktion der Hsp70-Synthese stark mit der Bestrahlungsdosis korreliert und eine höhere Dosis mit einer stärkeren Expression einhergeht (Calini et al., 2003). Diese Befunde stimmen mit Dillers Ergebnissen überein, dass die Höhe der Überexpression mit der Intensität des zugeführten Stresses korreliert und die starke

Expression von Stressproteinen ein vorübergehendes Phänomen ist, das mit einer Zeitkonstante einhergeht, die über mehrere Tage andauern kann (Diller, 2006). Dies könnte sowohl die 72 h andauernde Plateauphase, in der sich die mit 6 Gy bestrahlten Zellen befinden, als auch deren Fehlen bei Bestrahlung mit 2 Gy und 4 Gy erklären.

Die Arbeitsgruppe um Murakami konnte weiterhin zeigen, dass die mHsp70 Expression bei 4T1 KD Zellen nach Bestrahlung mit 6 Gy signifikant stieg, bei schwächerer Bestrahlung mit 4 Gy zwar ein ähnlicher Trend zu beobachten war, die Werte aber keine statistische Signifikanz erreichten (Murakami et al., 2015).

Durch die in der Literatur und durch eigene Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse könnte nun angenommen werden, dass die Expression der mHsp70-Proteine mit der Stressintensität korreliert. Dies würde bedeuten, dass die Expression von Hsp70 direkt mit der Stressintensität ansteigt. Die Synthese und Kinetik der Hsp70-Moleküle scheint jedoch einem Sättigungseffekt zu unterliegen und an Limitationen gebunden zu sein. So untersuchte die Arbeitsgruppe um Pasi zwei Glioblastom-Zelllinien (T98G und U251), bestrahlte sie mit unterschiedlichen Dosen (0 Gy/2 Gy/4 Gy/8 Gy/10 Gy) und quantifizierte danach das intra- und extrazelluläre Hsp70. Die Tumorzellen reagieren nach strahleninduziertem Stress mit einem graduellen Anstieg des intrazellulären Hsp70, welches mit der Stärke der Bestrahlungsdosis bis 8 Gy korreliert, dieser Zusammenhang ist jedoch bei noch höheren Dosen von 10 Gy nicht mehr zu beobachten. Nach hohen Dosen (8 Gy/10 Gy) wurde eine Externalisierung von Hsp70 messbar, ähnlich wie sie bei apoptotischem Zelltod oder starken Stresseinflüssen der Fall ist (Pasi et al., 2014). Die Arbeitsgruppe um Rylander konnte in einer PC3 Prostatakrebszellstudie durch den Vergleich von „cell viability“ und Hsp70 Expression zeigen, dass bei Tumorzellen, die zu starken Stressbedingungen ausgesetzt sind, die Hsp70 Expression stark abfiel, da der extreme Zellschaden nicht mehr durch eine Überexpression von Hsp70 und zelleigenen Reparaturmechanismen kompensierbar war (Rylander et al., 2005). Diese Ergebnisse gehen mit meinen Überlegungen einher, dass bei zu hohen Strahlenintensitäten die daraus resultierende zelluläre Schädigung zu groß ist und zelleigene Schutzmechanismen wie die Synthese von Hsp70 nicht mehr greifen. Ebenso zeigen sie, dass Hsp70 besonders in seiner externalisierten Form ein Warnsignal darstellt, welches nach schweren Zellschäden,



wie sie beispielsweise bei zu hoher Bestrahlungsintensität auftreten, vermehrt exprimiert wird (Pockley & Henderson, 2018).

Um die gesamte zelluläre Reaktion auf Stresssituationen im Hinblick auf die Wirkweise von Hsp70 bewerten zu können und die Mechanismen, die zur Expression von Hsp70 führen, zu entschlüsseln, wäre es von Vorteil, intrazelluläres, extrazelluläres und membrangebundenes Hsp70 nicht getrennt voneinander zu untersuchen, sondern alle auftretenden Formen des Stressproteins in Zusammenschau zu betrachten (Pasi et al., 2014). Dafür könnten Untersuchungen mittels lipHsp70ELISA für die Quantifizierung des lipidgebundenen und freien Hsp70 in Serum und Plasma, R+D ELISA für freigesetztes Hsp70 im Überstand von Zelllysaten und immunhistochemische Analysen für die Detektion des intrazellulären Hsp70 erfolgen.

Ebenso darf nicht vergessen werden, dass mit der Betrachtung einer einzigen Glioblastom-Zelllinie keine Rückschlüsse auf alle Glioblastome gezogen werden dürfen, zumal die U87-Tumorzellen im Vergleich zu anderen Glioblastom-Zelllinien als äußerst radio- und chemoresistent gelten (Paolini et al., 2011). Hilfreich wäre es also, bereits beschriebene Versuchsdurchführung mit weiteren Glioblastom-Zelllinien, wie LN18, T98G, U373, A172 durchzuführen, um die erhobenen Daten in ihrer Signifikanz zu stärken.

#### **5.2.4 Dosisunabhängig: Absinken der Werte auf Ausgangswert**

Dosisunabhängig konnte am Tag 7 ein Absinken der Hsp70-Werte auf die Ausgangswerte der sham behandelten Kontrolle nachgewiesen werden. Der gleiche Endpunkt am Tag 7 scheint also unabhängig von der Bestrahlungsintensität und dem daraus resultierenden zellulären Schaden beobachtbar zu sein. Denkbar wäre, dass durch die strahleninduzierte Hochregulation von Hsp70 zellprotektive Funktionen, Reparaturmechanismen und anti-apoptotische Kaskaden initiiert wurden, die Zelle vor einwirkenden Stressfaktoren erfolgreich geschützt wurde und nun Immunität gegenüber neuauftretenden, schädigenden Umwelteinflüssen trägt. Diese Überlegung und unsere Datenlage würde implizieren, dass die Zelle nach starkem Stress mehrere Tage im Sinne einer Hsp70 Überexpression mit der induzierten Stresssituation ringt, nach einer Plateauphase jedoch in eine Erholungsphase eintritt

und auf die Ausgangswerte der unbestrahlten Kontrolle zurückfällt. Nach unseren Erkenntnissen wäre Tag 7 der „final recoveryday“, an dem die Hsp70-Werte der Tumorzellen, unabhängig von der zugeführten Strahlenintensität auf ein gemeinsames Level abfallen.

Diller beschrieb in seiner Arbeit, dass die Kinetik der Hsp70 Expression mit einem wachsenden Anstieg bis zu einem Maximalwert beginnt, gefolgt von einer vorübergehenden Periode mit erhöhten Werten und anschließendem Abfall zu Ausgangswerten. Die Überexpression ist also ein temporäres Phänomen (Diller, 2006).

Ebenso wurde bereits gezeigt, dass mHsp70 positive Tumorzellen, also solche, die bereits Stresssituationen ausgesetzt waren, besser vor ionisierender Strahlung geschützt sind als die korrespondierenden mHsp70 negativen Tumorzellen (Nylandsted et al., 2004). Die Arbeit von Murakami zeigte, dass das klonogene Überleben der Zellen in Tumorzelllinien mit niedriger mHsp70 Expression signifikant niedriger ausfiel, als in vergleichbaren Linien mit höheren mHsp70-Werten (Murakami et al., 2015). Patienten mit mHsp70 positiven Tumoren zeigten ein signifikant verringertes Gesamtüberleben als Patienten mit Hsp70 negativen Kolorektal-, Magen- und Plattenepithelkarzinomen (Pfister et al., 2007). Die Ergebnisse stimmen also darin überein, dass eine Überexpression von mHsp70 mit einem Überlebensvorteil und zellprotektiver, anti-apoptotischer Wirkung einhergeht, welcher diverse Mechanismen zu Grunde liegen können: Hsp70-Proteine inhibieren die mitochondriale Translokation, dadurch die Aktivierung von Bax und verhindern so, dass Mitochondrien ihre Permeabilität erhöhen und pro-apoptotische Faktoren wie Zytochrom c ausschütten (Stankiewicz et al., 2005). Ebenso blockiert Hsp70 den Zusammenbau des Apoptose-fördernden Signalkomplex DISC (Guo et al., 2004), bindet den Apoptosefaktor Apaf-1 und inhibiert Caspase 3. Hsp70 greift durch Modifikation von JNK, MAPK, und ERK in weitere Apoptose-regulierende Signalwege ein (Radons, 2016).

In Anlehnung an die Evolutionstheorie und dem „survival of the fittest“ wäre weiterhin denkbar, dass Tumorzellen, welche durch Bestrahlung in eine akute Stresssituation versetzt wurden und darauf mit einer zellprotektiven Überexpression von Hsp70 reagieren, eine hochresistente Generation an Hsp70 positiven Zellklonen

hinterlassen. Grund für die dennoch niedrigen mHsp70-Werte am Ende der Beobachtungsperiode könnte die Annahme sein, dass Hsp70 nicht membrangebunden vorliegt, sondern aufgrund fehlender akuter Stresseinwirkung intrazellulär oder in Endosomen speichert und deshalb durch die FACS-Methode, welche nur für membrangebundenes Hsp70 sensitiv ist, nicht messbar ist. Hierfür wäre es dann von Vorteil dieser Überlegung mit weiterführender Methodik auf den Grund zu gehen und besonders durch Quantifizierung des extra- und intrazellulären, bzw. endosomalen Hsp70 zu stützen. Strahlenresistenten Zellklone wurden bereits bei Murakami erwähnt (Murakami et al., 2015), ebenso bei Untersuchungen von Gehrman, welcher membrangebundenem Hsp70 starke Schutzfunktion gegenüber strahleninduzierten Effekten zuschrieb (Gehrman et al., 2015). Auch Formenti beschreibt in Arbeiten, dass Tumorzellen, die nicht vollständig eliminiert, jedoch starkem Stress ausgesetzt wurden, überleben und durch genetische Instabilität eine neue, sehr resistente Generation von Zellen generiert, welche sämtliche Merkmale, welche sich zuvor als schützend und anti-apoptotisch bewährt haben, tragen (Formenti & Demaria, 2013).

### **5.3 Ausblick und Einordnung der Arbeit**

Die zielgerichtete Induktion der Hsp70 Expression legt auf elegante und attraktive Art und Weise dar, wie zelleigene Schutz- und Reparaturmechanismen vice versa für tumorspezifische Therapiestrategien nutzbar gemacht werden können. Die in dieser medizinisch/experimentellen Doktorarbeit und bereits früher *in vitro* erhobenen Daten zu mHsp70 Expression nach Bestrahlung (Multhoff et al., 2001), sowie die Erkenntnisse zu immunmodulatorischen Funktionen (Multhoff et al., 2016) legen den Grundstein für ein vielfältiges Anwendungsspektrum auch im klinischen Alltag. So konnte die Verträglichkeit und Sicherheit der Anwendung mit *ex vivo* TKD/IL-2 stimulierten, analogen NK-Zellen bereits in einer Phase I Studie an Patienten mit metastasierendem kolorektalem Karzinom erfolgreich getestet werden. Basierend auf vielversprechenden Ergebnissen aus Phase I (Krause, 2004), befindet sich diese klinische Studie seit 2015 in Phase II. Ziel der Studie ist es, herauszuarbeiten, ob durch eine adjuvante Behandlung mit TKD+IL-2 aktivierten NK-Zellen nach Cisplatin gekoppelter Radiochemotherapie (RCT) im Vergleich zu alleiniger

Radiochemotherapie ein positives Resultat bezogen auf Überlebenszeit, Lebensqualität und Toxizität erreicht werden kann (Specht et al., 2015).

Weitere klinische Untersuchungen konnten zeigen, dass die intratumorale Applikation von Hsp70, sei es als alleinige Therapiemaßnahme oder in Kombination mit anderen Therapieregimen, Antitumor-Immunität in Patienten stimulieren kann. Klinische Effizienz wurde bei Patienten mit intrakraniellen Neoplasien erwiesen, welche zusätzlich zum chirurgischen Eingriff mit rekombinantem Hsp70 behandelt wurden. Von 12 Patienten mit intrakraniellen Neoplasien im Spätstadium zeigte ein Patient komplette Tumorremission, einhergehend mit verstärkter T-Zell-vermittelten Immunantwort und Reduktion der immunsuppressiven Treg Zellen, ein weiterer Patient zeigte partielle Remission (Shevtsov et al., 2014).

Zusammengenommen könnten diese klinischen Studien und die sich daraus profilierende multimodale, tumorspezifische Therapie basierend auf Hsp70-Proteinen als Zielstruktur für stimulierte NK-Zellen in Kombination mit Radio- und Chemotherapie signifikante Bedeutung in der zukünftigen Behandlung fortgeschrittener Tumorerkrankungen tragen.

## 6 Zusammenfassung

Die klinische Relevanz und schwere Behandelbarkeit, ebenso die eingeschränkten Therapieoptionen und schlechte Prognose rücken das Glioblastoma multiforme nach wie vor in den Mittelpunkt aktueller Forschung. Vielversprechende Erkenntnisse zu immunmodulierenden Eigenschaften von Hsp70, besonders mit gekoppelter Radiotherapie, machen dieses zum geeigneten Angriffspunkt für tumorspezifische Therapieformen. Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, die zeit- und dosisabhängigen Auswirkungen ionisierender Strahlung auf die Expression des membrangebundenen Hsp70 auf humanen Glioblastomzellen zu erfassen.

Hierfür wurde die humane Glioblastom-Zelllinie U87 je nach Verweildauer in Kultur und Bestrahlungsdosis zu unterschiedlichen Dichten ausgesät und in Zellkultur gehalten. Die Zellen wurden im Folgenden mit unterschiedlichen Intensitäten (2 Gy, 4 Gy, 6 Gy) bestrahlt und die mHsp70 Expression über einen definierten Zeitraum (d1-d7) mittels Durchflusszytometrie (FACS) unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers cmHsp70.1 gemessen.

In der vorliegenden medizinisch/experimentellen Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass sich abhängig von Zeit in Kultur und Strahlendosis eine polymorphe Kinetik der Hsp70 Expression entwickelt. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zeigte sich bei Bestrahlung mit geringer Dosis (2 Gy) ein langsamer, jedoch stetiger Anstieg der Hsp70-Werte mit weicher Kurvenzeichnung und nach Erreichen des Maximalwerts ein langsames Absinken der Hsp70-Werte. Wurden die Tumorzellen mit höheren Dosen bestrahlt (4 Gy), wurde der Maximalwert der Hsp70 Expression rascher und früher erreicht. Noch höhere Strahlendosen (6 Gy) führten zu einem fulminanten Anstieg der Hsp70 Expression bereits 24 h nach Bestrahlung mit Ausbildung einer 72 h andauernden Plateauphase. Unabhängig von der Bestrahlungsintensität zeigte sich am Tag 7 ein Rückgang der mHsp70 Expression auf Werte, die mit den Kontrollwerten bei sham-Bestrahlung vergleichbar sind, aber höher sind als am Tag 0. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass sich das optimale therapeutische Fenster für mHsp70 spezifische, NK-Zell vermittelte Immuntherapien mit einer Bestrahlung von 6 Gy in den ersten 72 h nach Strahlenintervention befinden könnte.

Die *in vitro* erhobenen Daten bedürfen neben Überprüfung durch Ausweitung der Untersuchungen auf weitere Glioblastom-Zelllinien und weitreichenderer Methodik

zur Detektion des intra- und extrazellulären Hsp70, ebenso die Translation *in vivo*, um klinische Relevanz und Signifikanz belegen zu können.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Begünstigende Einflussfaktoren der Tumorneogenese (Hanahan & Weinberg, 2011) .....	13
<b>Abbildung 2:</b> Tumormikroumgebung (Hanahan & Weinberg, 2011).....	15
<b>Abbildung 3:</b> Therapeutische Zielstrukturen und deren klinische Korrelate bezogen auf tumorspezifische Charakteristika (Hanahan & Weinberg, 2011) .....	17
<b>Abbildung 4:</b> "death receptor" vermittelte Apoptose (Ralff & El-Deiry, 2018) .....	20
<b>Abbildung 5:</b> Der ADCC-Komplex: Antikörpervermittelte Bindung zwischen Zielzelle und Effektorzelle. Fc-Fragment bindet an CD16 der NK-Zelle, Fab-Fragment bindet an tumorspezifisches Antigen (Siernicka et al., 2019).....	21
<b>Abbildung 6:</b> Tumorentstehung und Immunsystem: die drei Phasen des Immunediting (Dunn et al., 2004) .	22
<b>Abbildung 7:</b> Anti-Apoptose Signalwege (Kumar et al., 2016).....	28
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung der ex vivo mit TKD und IL-2 stimulierten NK-Zellen, welche das auf der Membran von Tumorzellen exprimierte mHsp70 spezifisch binden (Multhoff et al., 2015).....	29
<b>Abbildung 9:</b> Therapiealgorithmus der Gliome WHO IV nach integrierter Diagnose .....	32
<b>Abbildung 10:</b> Aufbau FACS.....	40
<b>Abbildung 11:</b> Zellzahl bei unterschiedlicher Bestrahlungsdosis (sham/ 2 Gy/4 Gy/6 Gy) im Zeitverlauf .....	42
<b>Abbildung 12A:</b> mHsp70 positive Zellen nach Scheinbestrahlung (sham) mit 0 Gy (Fellinger et al., 2020) ....	43
<b>Abbildung 12B:</b> mHsp70 Expression nach Scheinbestrahlung (sham) mit 0 Gy (Fellinger et al., 2020).....	43
<b>Abbildung 13:</b> mHsp70 Expression nach Bestrahlung mit 2 Gy (Fellinger et al., 2020).....	45
<b>Abbildung 14:</b> mHsp70 Expression nach Bestrahlung mit 4 Gy (Fellinger et al., 2020).....	46
<b>Abbildung 15:</b> mHsp70 Expression nach Bestrahlung mit 6 Gy (Fellinger et al., 2020).....	47
<b>Abbildung 16:</b> Dosisabhängige mHsp70 Expression am d1 (Fellinger et al., 2020) .....	48
<b>Abbildung 17:</b> Dosisabhängige mHsp70 Expression am d4 (Fellinger et al., 2020) .....	49
<b>Abbildung 18:</b> Dosisabhängige mHsp70 Expression am d7 (Fellinger et al., 2020) .....	50
<b>Abbildung 19:</b> Zusammenschau der zeitabhängigen Effekte auf die mHsp70 Expression.....	50
<b>Abbildung 20:</b> Zusammenschau der dosisabhängigen Effekte auf die mHsp70 Expression .....	51
<b>Abbildung 21:</b> Zusammenfassung der zeit- und dosisabhängigen Effekte auf die mHsp70 Expression (Fellinger et al., 2020).....	52
<b>Abbildung 22:</b> Immunmodulatorische Funktionen des Hsp70-Proteins (Multhoff et al., 2016) .....	57

## 8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Material Zellkultur</i> .....	34
<i>Tabelle 2: Material FACS</i> .....	34
<i>Tabelle 3: Material Antikörper</i> .....	35
<i>Tabelle 4: Material Zelliinie</i> .....	35
<i>Tabelle 5: Material Verbrauchsmaterial</i> .....	35
<i>Tabelle 6: Material Geräte</i> .....	36
<i>Tabelle 7: Zelldichte bei Aussaat</i> .....	38
<i>Tabelle 8: Signifikanzniveau</i> .....	41



## 9 Literaturverzeichnis

- Adams, J. M., & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9), 1324–1337. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210220>
- Aghdassi, A., Phillips, P., Dudeja, V., Dhaulakhandi, D., Sharif, R., Dawra, R., Lerch, M., Saluja, A. (2007). Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research*, 67(2), 616–625. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1567>
- Azam, F., Mehta, S., & Harris, A. L. (2010). Mechanisms of resistance to antiangiogenesis therapy. *European Journal of Cancer*, 46(8), 1323–1332. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.020>
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Marimoto, R., Cohen, G., Green, D. R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nature Cell Biology*, 2(8), 469–475. <https://doi.org/10.1038/35019501>
- Bergfeld, S. A., & DeClerck, Y. A. (2010). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 249–261. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9222-7>
- Botzler, C., Ellwart, J., Günther, W., Eissner, G., & Multhoff, G. (1999). Synergistic effects of heat and ET-18-OCH<sub>3</sub> on membrane expression of hsp70 and lysis of leukemic K562 cells. *Experimental Hematology*, 27(3), 470–478.
- Calini, V., Urani, C., & Camatini, M. (2003). Overexpression of HSP70 is induced by ionizing radiation in C3H 10T1/2 cells and protects from DNA damage. *Toxicology in Vitro*, 17(5–6), 561–566. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(03\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00116-4)
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., & Moses, H. L. (2008). Transforming Growth Factor- Signaling-Deficient Fibroblasts Enhance Hepatocyte Growth Factor Signaling in Mammary Carcinoma Cells to Promote Scattering and Invasion. *Molecular Cancer Research*, 6(10), 1521–1533. <https://doi.org/10.1158/1541->

7786.MCR-07-2203

- Chou, S.-D., Prince, T., Gong, J., & Calderwood, S. K. (2012). mTOR Is Essential for the Proteotoxic Stress Response, HSF1 Activation and Heat Shock Protein Synthesis. *PLoS ONE*, 7(6), e39679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039679>
- Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K., & Mischel, P. S. (2014). Glioblastoma: From Molecular Pathology to Targeted Treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9(1), 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130324>
- Coffelt, S. B., Lewis, C. E., Naldini, L., Brown, J. M., Ferrara, N., & De Palma, M. (2010). Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *The American Journal of Pathology*, 176(4), 1564–1576. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090786>
- Craig, E. A. (1985). The Stress Response: Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress. *Science*, 230(4727), 800–801. <https://doi.org/10.1126/science.230.4727.800-a>
- Daugaard, M., Rohde, M., & Jäättelä, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.05.039>
- DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 309–316. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9223-6>
- Diller, K. R. (2006). Stress Protein Expression Kinetics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8(1), 403–424. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.7.060804.100449>
- Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 836–848. <https://doi.org/10.1038/nri1961>

- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- Elsner, L., Muppala, V., Gehrmann, M., Lozano, J., Malzahn, D., Bickeböller, H., Brunner, E., Zientkowska, M., Herrmann, T., Walter, L., Alves, F., Multhoff, G., Dressel, R. (2007). The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(8), 5523–5533.
- Fellinger, H., Stangl, S., Hernandez Schnelzer, A., Schwab, M., Di Genio, T., Pieper, M., Werner, C., Shevtsov, M., Haller, B., & Multhoff, G. (2020). Time- and Dose-Dependent Effects of Ionizing Irradiation on the Membrane Expression of Hsp70 on Glioma Cells. *Cells*, 9(4), 912. <https://doi.org/10.3390/cells9040912>
- Ferrarini, M., Heltai, S., Zocchi, M. R., & Rugarli, C. (1992). Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *International Journal of Cancer*, 51(4), 613–619.
- Flaherty, K. M., DeLuca-Flaherty, C., & McKay, D. B. (1990). Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346(6285), 623–628. <https://doi.org/10.1038/346623a0>
- Formenti, S. C., & Demaria, S. (2013). Combining Radiotherapy and Cancer Immunotherapy: A Paradigm Shift. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 105(4), 256–265. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs629>
- Gehrmann, M. K., Kimm, M. A., Stangl, S., Schmid, T. E., Noël, P. B., Rummeny, E. J., & Multhoff, G. (2015). Imaging of Hsp70-positive tumors with cmHsp70.1 antibody-conjugated gold nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 5687–5700. <https://doi.org/10.2147/IJN.S87174>
- Gehrmann, M. K., Marienhagen, J., Eichholtz-Wirth, H., Fritz, E., Ellwart, J., Jäättelä, M., Zilch, T., Multhoff, G. (2005). Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death and Differentiation*, 12(1), 38–51. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401510>

- Goldbrunner, R., Ruge, M., Kocher, M., Lucas, C. W., Galldiks, N., Grau, S. (2018). Behandlung von Gliomen im Erwachsenenalter. *Deutsches Arzteblatt International*, 115(20–21), 356–364. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2018.0356>
- Golden, E. B., Pellicciotta, I., Demaria, S., Barcellos-Hoff, M. H., & Formenti, S. C. (2012). The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Frontiers in Oncology*, 2, 88. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00088>
- Guo, F., Sigua, C., Bali, P., George, P., Fiskus, W., Scuto, A., Annavarapu, S., Mouttaki, A., Sondarva, G., Wei, S., Wu, J., Djeu, J., Bhalla, K. (2004). Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood*, 105(3), 1246–1255. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-05-2041>
- Gurbuxani, S., Bruey, J. M., Fromentin, A., Larmonier, N., Parcellier, A., Jäättelä, M., Martin F., Solary E., Garrido, C. (2001). Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene*, 20(51), 7478–7485. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204948>
- Gzell, C., Back, M., Wheeler, H., Bailey, D., & Foote, M. (2017). Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. *Clinical Oncology*, 29(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2016.09.015>
- Hanahan, D., & Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), 353–364.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hantschel, M., Pfister, K., Jordan, A., Scholz, R., Andreesen, R., Schmitz, G., Schmetzer H., Hiddemann W., Multhoff, G. (2000). Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients. *Cell Stress & Chaperones*, 5(5), 438–442.
- Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M.,

- Kros, J., Hainfellner, J., Mason, W., Mariani, L., Stupp, R. (2005). *MGMT* Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Hodge, J. W., Ardiani, A., Farsaci, B., Kwilas, A. R., & Gameiro, S. R. (2012). The Tipping Point for Combination Therapy: Cancer Vaccines With Radiation, Chemotherapy, or Targeted Small Molecule Inhibitors. *Seminars in Oncology*, 39(3), 323–339. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2012.02.006>
- Jäättelä, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., & Egeblad, M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *The EMBO Journal*, 17(21), 6124–6134. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.21.6124>
- Kang, K. A., Lee, H. C., Lee, J.-J., Hong, M.-N., Park, M.-J., Lee, Y.-S., Choi, H.-D., Kim, N., Ko, Y.-G., Lee, J.-S. (2014). Effects of combined radiofrequency radiation exposure on levels of reactive oxygen species in neuronal cells. *Journal of Radiation Research*, 55(2), 265–276. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrt116>
- Kazerounian, S., Yee, K. O., & Lawler, J. (2008). Thrombospondins: from structure to therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(5), 700–712. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7486-z>
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., & Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61(3), 215–225; discussion 226-9.
- Kleinjung, T., Arndt, O., Feldmann, H. J., Bockmühl, U., Gehrman, M., Zilch, T., Pfister, K., Schönberger, J., Marienhagen, J., Eilles, C., Rossbacher, L., Multhoff, G. (2003). Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy-a target for natural killer (NK) cells. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 57(3), 820–826.
- Krause, S. W. (2004). Treatment of Colon and Lung Cancer Patients with ex Vivo Heat Shock Protein 70-Peptide-Activated, Autologous Natural Killer Cells: A Clinical Phase I Trial. *Clinical Cancer Research*, 10(11), 3699–3707. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0683>

- Krex, D., Klink, B., Hartmann, C., Von Deimling, A., Pietsch, T., Simon, M., Sabel, M., Steinbach, J., Heese, O., Reifenberger, G., Weller, M., Schackert, G. (2007). Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*, *130*(10), 2596–2606. <https://doi.org/10.1093/brain/awm204>
- Kumar, S., Stokes, J., Singh, U. P., Scissum Gunn, K., Acharya, A., Manne, U., & Mishra, M. (2016). Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Letters*, *374*(1), 156–166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.056>
- Lee, K.-J., Kim, Y. M., Kim, D. Y., Jeoung, D., Han, K., Lee, S.-T., Lee, Y., Park, K., Park, J., Kim, D., Hahn, J.-H. (2006). Release of heat shock protein 70 (Hsp70) and the effects of extracellular Hsp70 on matrix metalloproteinase-9 expression in human monocytic U937 cells. *Experimental & Molecular Medicine*, *38*(4), 364–374. <https://doi.org/10.1038/emm.2006.43>
- Linkous, A. G., & Yazlovitskaya, E. M. (2011). Angiogenesis in glioblastoma multiforme: navigating the maze. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *11*(8), 712–718.
- Lo Nigro, C., Macagno, M., Sangiolo, D., Bertolaccini, L., Aglietta, M., & Merlano, M. C. (2019). NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Annals of Translational Medicine*, *7*(5), 105–105. <https://doi.org/10.21037/atm.2019.01.42>
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). *Taschenlehrbuch Histologie : 10 Tabellen* (pp. 119–132, 413-422,631). Thieme. Retrieved from <https://portal.dnb.de/opac.htm?method=showFullRecord&currentResultId=%22lüllmann%22+and+%22rauch%22%26any&currentPosition=2>
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2014). *Der Experimentator: Immunologie*. 2, 77-102. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-41899-0>
- Maeda, Y., Yoshimura, K., Matsui, H., Shindo, Y., Tamesa, T., Tokumitsu, Y., Hashimoto, N., Tokuhisa, Y., Sakamoto, K., Sakai, K., Suehiro, Y., Hinoda, Y., Tamada, K., Yoshino, S., Hazama, S., Oka, M. (2015). Dendritic cells transfected with heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with

- hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: a phase 1 dose escalation clinical trial. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 64(8), 1047–1056. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1709-1>
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Vitale, M., Mingari, M. C., & Moretta, A. (2005). Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunology Letters*, 100(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.07.004>
- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Müller, E., Meier, T., Wilmanns, W., & Issels, R. D. (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *International Journal of Cancer*, 61(2), 272–279.
- Multhoff, G., & Hightower, L. E. (2011). Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress & Chaperones*, 16(3), 251–255. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0247-1>
- Multhoff, G., Pfister, K., Gehrman, M., Hantschel, M., Gross, C., Hafner, M., & Hiddemann, W. (2001). A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress & Chaperones*, 6(4), 337. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2001\)006<0337:AMHPSN>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2001)006<0337:AMHPSN>2.0.CO;2)
- Multhoff, G., Pockley, A. G., Schmid, T. E., & Schilling, D. (2015). The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. *Cancer Letters*, 368(2), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.013>
- Murakami, N., Kühnel, A., Schmid, T. E., Ilicic, K., Stangl, S., Braun, I. S., Gehrman, M., Molls, M., Itami, J., Multhoff, G. (2015). Role of membrane Hsp70 in radiation sensitivity of tumor cells. *Radiation Oncology*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0461-1>

- Muzio, M. (1998). Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, 28(3), 141–147.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(3), 220–228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Nickel, W., & Seedorf, M. (2008). Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24(1), 287–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175320>
- Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Høyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., Jäättelä, M. (2004). Heat Shock Protein 70 Promotes Cell Survival by Inhibiting Lysosomal Membrane Permeabilization. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(4), 425–435. <https://doi.org/10.1084/jem.20040531>
- Paolini, A., Pasi, F., Facoetti, A., Mazzini, G., Corbella, F., Di Liberto, R., & Nano, R. (2011). Cell death forms and HSP70 expression in U87 cells after ionizing radiation and/or chemotherapy. *Anticancer Research*, 31(11), 3727–3731. <https://doi.org/31/11/3727> [pii]
- Pasi, F., Paolini, A., Nano, R., Di Liberto, R., & Capelli, E. (2014). Effects of single or combined treatments with radiation and chemotherapy on survival and danger signals expression in glioblastoma cell lines. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/453497>
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.-J., Fusenig, N., Nieto, M. A., & Cano, A. (2004). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *Journal of Cell Science*, 117(13), 2827–2839. <https://doi.org/10.1242/jcs.01145>
- Petersen, N. H. T., Kirkegaard, T., Olsen, O. D., & Jäättelä, M. (2010). Connecting Hsp70, sphingolipid metabolism and lysosomal stability. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(12), 2305–2309. <https://doi.org/10.4161/cc.9.12.12052>
- Pfister, K., Radons, J., Busch, R., Tidball, J. G., Pfeifer, M., Freitag, L., Feldmann, H.,



- Milani, V., Issels, R., Multhoff, G. (2007). Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer*, *110*(4), 926–935. <https://doi.org/10.1002/cncr.22864>
- Pichlmeier, U., Bink, A., Schackert, G., Stummer, W., & ALA Glioma Study Group. (2008). Resection and survival in glioblastoma multiforme: An RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients. *Neuro-Oncology*, *10*(6), 1025–1034. <https://doi.org/10.1215/15228517-2008-052>
- Pirkkala, L., Nykänen, P., & Sistonen, L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*(7), 1118–1131.
- Pockley, A. G., & Henderson, B. (2018). Extracellular cell stress (heat shock) proteins—immune responses and disease: an overview. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *373*(1738), 20160522. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0522>
- Pockley, A. G., Muthana, M., & Calderwood, S. K. (2008). The dual immunoregulatory roles of stress proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *33*(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.10.005>
- Prager, I., & Watzl, C. (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*, *105*(6), 1319–1329. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>
- Qian, B.-Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, *141*(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014>
- Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress and Chaperones*, *21*(3), 379–404. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0676-6>
- Radons, J., & Multhoff, G. (2005). Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exercise Immunology Review*, *11*, 17–33.

- Rafiee, M., Kanwar, J. R., Berg, R. W., Lehnert, K., Lisowska, K., & Krissansen, G. W. (2001). Induction of systemic antitumor immunity by gene transfer of mammalian heat shock protein 70.1 into tumors in situ. *Cancer Gene Therapy*, 8(12), 974–981. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700395>
- Ralff, M. D., & El-Deiry, W. S. (2018). TRAIL pathway targeting therapeutics. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*, 3(3), 197–204. <https://doi.org/10.1080/23808993.2018.1476062>
- Rimas V. L., Wainwright, D., Ladomersky, E., Sachdev, S., Sonabend, A., Stupp, R., (2019). Newly Diagnosed Glioblastoma: A Review on Clinical Management.
- Rubner, Y., Muth, C., Strnad, A., Derer, A., Sieber, R., Buslei, R., Frey, B., Fietkau, R., Gaipl, U. S. (2014). Fractionated radiotherapy is the main stimulus for the induction of cell death and of Hsp70 release of p53 mutated glioblastoma cell lines. *Radiation Oncology (London, England)*, 9(1), 89. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-9-89>
- Rylander, M. N., Feng, Y., Bass, J., & Diller, K. R. (2005). Thermally Induced Injury and Heat-Shock Protein Expression in Cells and Tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066(1), 222–242. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.009>
- Schilling, D., Gehrman, M., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, A. G., Abend, M., Molls, M., Multhoff, G. (2009). Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells. *The FASEB Journal*, 23(8), 2467–2477. <https://doi.org/10.1096/fj.08-125229>
- Shanley, T. P., Ryan, M. A., Eaves-Pyles, T., & Wong, H. R. (2000). Heat shock inhibits phosphorylation of I-kappaBalpha. *Shock (Augusta, Ga.)*, 14(4), 447–450.
- Sharma, S., Singh, R., Kaur, M., & Kaur, G. (2010). Late-onset dietary restriction compensates for age-related increase in oxidative stress and alterations of HSP 70 and synapsin 1 protein levels in male Wistar rats. *Biogerontology*, 11(2), 197–209. <https://doi.org/10.1007/s10522-009-9240-4>
- Shevtsov, M. A., Komarova, E. Y., Meshalkina, D. A., Bychkova, N. V., Aksenov, N.

- D., Abkin, S. V, Margulis, B. A., Guzhova, I. V. (2014). Exogenously delivered heat shock protein 70 displaces its endogenous analogue and sensitizes cancer cells to lymphocytes-mediated cytotoxicity. *Oncotarget*, 5(10), 3101–3114. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1820>
- Shevtsov, M. A., Nikolaev, B. P., Ryzhov, V. A., Yakovleva, L. Y., Marchenko, Y. Y., Parr, M. A., Rolich, V. I., Mikhrina, A. L., Dobrodumov, A. V., Pitkin, E., Multhoff, G. (2015). Ionizing radiation improves glioma-specific targeting of superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with cmHsp70.1 monoclonal antibodies (SPION-cmHsp70.1). *Nanoscale*, 7(48), 20652–20664. <https://doi.org/10.1039/c5nr06521f>
- Shevtsov, M. A., Kim, A., Samochernych, A., Romanova, I., Margulis, B., Yakovenko, I., Ischenko, A., Khachatryan, W., Guzhova, I. (2014). Pilot study of intratumoral injection of recombinant heat shock protein 70 in the treatment of malignant brain tumors in children. *OncoTargets and Therapy*, 7, 1071. <https://doi.org/10.2147/OTT.S62764>
- Shevtsov, M. A., & Multhoff, G. (2016). Heat shock protein-Peptide and HSP-based immunotherapies for the treatment of cancer. *Frontiers in Immunology*, 7(APR), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00171>
- Siernicka M., Firczuk M., Winiarska M. (2019). NK-cells applications in immuno-oncology [Webpage]. Retrieved from <http://www.stream.wum.edu.pl/en/knowledge-base/96-nk-cells-applications-in-immuno-oncology> on 29.05.2019
- Singh-Jasuja, H., Toes, R. E., Spee, P., Münz, C., Hilf, N., Schoenberger, S. P., Ricciardi-Castagnoli, P., Neefjes, J., Rammensee, H. G., Arnold-Schild, D., Schild, H. (2000). Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(11), 1965–1974.
- Specht, H. M., Ahrens, N., Blankenstein, C., Duell, T., Fietkau, R., Gaipl, U. S., Günther, C., Gunther, S., Habl, G., Hautmann, H., Hautmann, M., Huber, R., Molls, M., Offner, R., Rödel, C., Rödel, F., Schütz, M., Combs, S. E., Multhoff, G. (2015). Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Peptide Activated Natural Killer (NK)

- Cells for the Treatment of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) after Radiochemotherapy (RCTx) – From Preclinical Studies to a Clinical Phase II Trial. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00162>
- Srivastava, P. K., Menoret, A., Basu, S., Binder, R. J., & McQuade, K. L. (1998). Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity*, 8(6), 657–665.
- Stangl, S., Wortmann, A., Guertler, U., & Multhoff, G. (2006). Control of metastasized pancreatic carcinomas in SCID/beige mice with human IL-2/TKD-activated NK cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(10), 6270–6276.
- Stankiewicz, A. R., Lachapelle, G., Foo, C. P. Z., Radicioni, S. M., & Mosser, D. D. (2005). Hsp70 Inhibits Heat-induced Apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38729–38739. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509497200>
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O. D., Zanella, F., Reulen, H.-J., & ALA-Glioma Study Group. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet. Oncology*, 7(5), 392–401. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70665-9)
- Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Mirimanoff, R., National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet Oncology*, 10(5), 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R., Ludwin, S., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R., National Cancer Institute of Canada Clinical

- Trials Group. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Tosti, G., Cocorocchio, E., Pennacchioli, E., Ferrucci, P. F., Testori, A., & Martinoli, C. (2014). Heat-shock proteins-based immunotherapy for advanced melanoma in the era of target therapies and immunomodulating agents. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 14(7), 955–967. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.902928>
- Urbańska, K., Sokołowska, J., Szmidt, M., & Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*, 18(5), 307–312. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.40559>
- Van Der Kogel, A., Joiner M., Steel G. (2009). Introduction: the significance of radiobiology and radiotherapy for cancer treatment. *Basic Clinical Radiobiology*, 4, 1-10
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vaupel, P., & Multhoff, G. (2016). Adenosine can thwart antitumor immune responses elicited by radiotherapy. *Strahlentherapie Und Onkologie*, 192(5), 279–287. <https://doi.org/10.1007/s00066-016-0948-1>
- Vega, V. L., Rodríguez-Silva, M., Frey, T., Gehrmann, M., Diaz, J. C., Steinem, C., Multhoff, G., Arispe, N., De Maio, A. (2008). Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(6), 4299–4307. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.4299>
- Verdecchia, A., Angelis, G. De, & Capocaccia, R. (2002). Estimation and projections of cancer prevalence from cancer registry data. *Statistics in Medicine*, 21(22), 3511–3526. <https://doi.org/10.1002/sim.1304>
- Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science*,

296,1635–6. <https://doi.org/10.1126/science.1071553>

- Wattenberg, M. M., Fahim, A., Ahmed, M. M., & Hodge, J. W. (2014). Unlocking the combination: potentiation of radiation-induced antitumor responses with immunotherapy. *Radiation Research*, *182*(2), 126–138. <https://doi.org/10.1667/RR13374.1>
- Weller, M., van den Bent, M., Tonn, J. C., Stupp, R., Preusser, M., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Henriksson, R., Rhun, E., Balana, C., Chinot, O., Bendszus, M., Reijneveld, J., Dhermain, F., French, P., Marosi, C., Watts, C., Oberg, I., Pilkington, G., Baumert, B., Taphoorn, M., Hegi, M., Westphal, M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Wick, W., European Association for Neuro-Oncology (EANO) Task Force on Gliomas. (2017). European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *The Lancet Oncology*, *18*(6), e315–e329. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30194-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30194-8)
- Zylicz, M., King, F. W., & Wawrzynow, A. (2001). New Embo Members' Review: Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *The EMBO Journal*, *20*(17), 4634–4638. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4634>

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professor Doktor Gabriele Multhoff, die mir über die Jahre hinweg mit ihrem umfangreichen Fachwissen mit Rat und Tat zur Seite stand und mich auf dem Weg zur fertigen Arbeit immer wieder neue Aspekte und Ansätze entdecken ließ. Auf konstruktive Kritik, ein offenes Ohr und neue Denkanstöße konnte ich mich zu jeder Zeit verlassen.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer Doktor Stefan Stangl bedanken, der mir mit seiner fachlichen und praktischen Kompetenz stets eine große Hilfe war und mich durch zielführende Diskussionen und anhaltende Hilfestellung begleitet und unterstützt hat.

Ein Dank geht auch an Doktor Wolfgang Sievert, Ramona Töppel, Christopher Diederichs und Maxim Shevtsov, welche nie müde wurden, fachliche und organisatorische Fragen mit mir zu besprechen.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern Angelika und Johann Fellingner, die mich auf meinem Weg durch das Studium begleitet haben und stets wunderbare Vorbilder für mich waren. Großer Dank gilt auch meiner Schwester Eva für ihre unermüdliche Stärkung und Motivation, sowie das allzeit offene Ohr für meine Gedanken.

## 11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

München, Datum

---

Name



## 12 Lebenslauf

## 13 Publikationen

# Chapter 22

## **Immunohistochemical and Flow Cytometric Analysis of Intracellular and Membrane-Bound Hsp70, as a Putative Biomarker of Glioblastoma Multiforme, Using the cmHsp70.1 Monoclonal Antibody**

**Stefan Stangl, Gemma A. Foulds, Helena Fellingner, Geoffrey J. Pilkington, A. Graham Pockley, and Gabriele Multhoff**

### **Abstract**

The major stress-inducible 70 kDa heat shock (stress) protein 70 (Hsp70) is frequently overexpressed in highly aggressive tumor cells and thus might serve as a tumor-specific biomarker of aggressive disease. We have previously shown that, in contrast to normal cells, tumor cells present Hsp70 on their plasma membrane. In order to elucidate the role of intracellular and membrane-bound Hsp70 as a potential tumor biomarker in glioblastoma multiforme, herein, we describe protocols for the staining of cytosolic Hsp70 in tumor formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) sections using immunohistochemistry, and for plasma membrane-bound Hsp70 by multi-parametric flow cytometry using the cmHsp70.1 monoclonal antibody (mAb).

**Key words** Intracellular and membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Glioblastoma multiforme, Formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) sections, Immunohistochemistry, Flow cytometry, Hsp70 antibody epitope

---

### **1 Introduction**

Although great progress in the treatment of many cancers has been achieved, glioblastoma multiforme (GBM) remains a debilitating and life-threatening disease. Comprising nearly 75% of all the cases, glioblastoma is the most frequent primary malignant tumor of the central nervous system (CNS) and continues to be associated with very poor long-term survival and the worst prognosis of all glial brain tumors (gliomas). Despite improvements in the treatment of glioblastoma using advanced neurosurgical techniques and radiation therapy, there remains no effective cure for this tumor [1]. The average life-expectancy after diagnosis is less than 1 year, and fewer than 10% of patients survive longer than 5 years after diagnosis, even

after total tumor resection [1–3]. Administration of the alkylating chemotherapeutic agent Temozolomide (TMZ) only increases median survival rates to approximately 15 months [4–11]. Death from glioblastoma is due to a rapid, aggressive local infiltration of glioblastoma cells in the brain. Moreover, a high genetic tumor heterogeneity can mediate resistance to radio(chemo)therapy. An inherent or acquired resistance to radio(chemo)therapy drastically reduces life expectancy. It is therefore essential to have reliable tumor biomarkers that can identify patients who are likely to acquire resistance to TMZ at an early time point.

The major stress-inducible 70 kDa heat shock (stress) protein Hsp70 is frequently overexpressed in the cytosol for a large variety of different tumor cells and elevated cytosolic Hsp70 levels are often associated with therapy resistance. Therefore, we propose Hsp70 as a potential biomarker of disease in GBM.

Using a unique monoclonal antibody (mAb, cmHsp70.1), the Multhoff laboratory made the seminal discovery that, in addition to its cytosolic localization, Hsp70 is also selectively expressed on the plasma membrane of tumor cells (but not normal tissue) [12–14]. The same laboratory also showed that the expression density of membrane Hsp70 on a broad profile of cancer cell lines is further increased *in vitro* by standard treatments such as radio(chemo)therapy [15, 16] where it also can confer therapy resistance. Furthermore, membrane Hsp70 is more highly expressed on metastatic disease than its corresponding primary tumor [17], and its expression is associated with an unfavorable prognosis and a reduced overall survival for some tumors [18]. An ongoing screening program of over 1500 patients with various solid tumors in the Multhoff laboratory reveals that more than 50% of all the patients have membrane Hsp70 positive tumors, as identified by flow cytometric analysis of isolated viable tumor cells using the cmHsp70.1 mAb.

These findings indicate that membrane-bound Hsp70 might act as a universal, selective tumor-specific marker of “aggressive” disease. Therefore, it is of importance that, apart from cytosolic Hsp70 levels also the membrane status of Hsp70 should be determined to describe a tumor. Furthermore, membrane-bound Hsp70 also could act as a tumor-specific therapeutic target which enables the development of new approaches for the treatment of GBM such as cell-based therapies. A number of preclinical studies have shown the capacity of *ex vivo* activated (low-dose IL-2 plus a 14-mer Hsp70-derived peptide, IL-2/TKD) activated NK cells to target a range of cancer cell types expressing the membrane form of Hsp70 [12, 13, 19–24]. Studies have also demonstrated that this cytotoxic effect is manifested by the release and uptake of granzyme B into target cells via membrane Hsp70 [25]. The clinical safety and tolerability of IL-2/TKD activated NK cells has been demonstrated in a Phase I clinical trial [26], and its efficacy for the treatment of patients with

non-small cell lung carcinoma after radiochemotherapy is currently being assessed in a multi-center Phase II clinical trial [27].

We have also previously reported that recombinant human granzyme B binds to membrane Hsp70 on cancer cells and that its subsequent uptake, which results in the selective killing of membrane Hsp70 expressing cells and tumors, occurs via an Hsp70-mediated endocytosis process that is independent of perforin [17, 28]. Taken together, these findings make membrane Hsp70 an excellent and broadly-applicable molecule on which to develop a portfolio of new immunotherapeutics based on ex vivo IL-2/TKD activated NK cells [21, 22, 24, 26, 27, 29], human recombinant granzyme B [17, 25, 28], or Hsp70-targeting antibodies. The membrane-Hsp70-specific antibody (cmHsp70.1) itself can induce antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) [14], or can be used for a targeted delivery of therapeutics in the form of antibody-drug conjugates (ADCs) or as a therapeutic "cargo" delivered by nanoparticles.

Membrane Hsp70 has also been used as a basis for the development of innovative imaging platforms for tumor detection and outcome monitoring which employ the cmHsp70.1 monoclonal antibody or a 14-mer tumor penetrating peptide (TPP) [15, 30–32].

Given the established association between membrane Hsp70 expression and disease aggressiveness, and the portfolio of therapeutic approaches that are being developed to target tumors expressing membrane Hsp70, techniques for determining the membrane Hsp70 expression by human glioblastoma tissue, and cell lines derived from primary glioblastomas have been established using the cmHsp70.1 mAb. These immunohistochemical and flow cytometry-based approaches are described herein.

---

## 2 Materials

### 2.1 Patient-Derived Glioblastoma Multiforme Cell Lines

The human, low passage glioblastoma (UP007, UP029, and SEBTA027) and brain metastatic lung carcinoma (SEBTA028) cell lines were established in culture at the University of Portsmouth from biopsy tissue obtained at Kings College Hospital London under ethics permission, 11/SC/0048. All the cell lines were cultured in the DMEM growth medium supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS).

1. UP-007 was derived obtained from a 71 year old treatment naive male de novo GBM patient with wild-type IDH1.
2. UP-029 was derived from a 66 year old treatment naive female de novo GBM patient with wild-type IDH1 and IDH2.

310 Stefan Stangl et al.

3. **SEBTA-027** was derived from a 59 year old female with recurrent GBM in the right parieto-occipital region, with sarcomatous elements, grade IV, wild-type IDH1, unmethylated MGMT, and a 40% Ki67 labeling in dex and who had previously received radiotherapy and Temozolomide chemotherapy.
4. **SEBTA-028** was derived from a 52 year old male with brain metastatic lung carcinoma in the right temporal-occipital-parietal region.

### **2.2 Patient- and Preclinical Model-Derived Paraffin-Embedded Tissue**

The diagnosis of glioblastoma multiforme was based on hematoxylin/eosin staining of FFPE sections (2  $\mu$ m) of two patients with glioblastoma multiforme WHO stage IV. Additionally, sections (2  $\mu$ m) of orthotopically implanted GL261 mouse glioblastoma were used for the analysis. Ethical approval for access to patient tissue was obtained from the local ethical committee of the Technische Universität München, and informed consent was provided.

### **2.3 cmHsp70.1 Anti-Hsp70 Monoclonal Antibody (mAb)**

The cmHsp70.1 monoclonal antibody (mAb, multimune GmbH, Munich, Germany), which selectively binds to membrane Hsp70 on tumor cells, was generated by immunization of mice with the 14-mer peptide TKDNNLLGRFELSG, termed "TKD," comprising amino acids 450–461 (aa<sub>450-461</sub>) in the C terminus of the inducible Hsp70. Since the human and murine "TKD" sequences only differ in one amino acid (TKDNNLLGRFELSG; mouse TRDNNLLGRFELSG) [33], and the minimal antibody epitope (NNLLGRF) is identical among different species [14], the human cmHsp70.1 mAb shows cross-reactivity for human, mouse, canine, and feline tumors.

The "TKD" sequence that is exposed to the extracellular milieu of tumors resides in the C-terminally localized oligomerization domain which is part of the substrate binding domain of the Hsp70 molecule [34]. In contrast to other commercially available Hsp70 antibodies, the cmHsp70.1 mAb uniquely identifies the membrane form of Hsp70 on viable human and mouse tumor cells not only in vitro but also in vivo in tumor-bearing mice [30].

In contrast to the cmHsp70.1 mAb, other commercially available mouse antibodies directed against Hsp70 fail to stain the surface of viable tumor cells.

### **2.4 Immunohistochemistry (IHC)**

#### **2.4.1 Deparaffinization Reagents**

1. Xylene.
2. Ethanol absolute 100% v/v.
3. Ethanol 96% v/v.
4. Ethanol 70% v/v.
5. Ethanol 50% v/v.
6. H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>.

#### 2.4.2 Target Retrieval and Staining Reagents

1. Target retrieval solution:  $1\times/H_2O_{dd}$ ,  $0.5\times H_2O_{dd}$  (DAKO cat #: S1699).
2. Peroxidase blocking solution: 3% v/v  $H_2O_2$ /0.1% w/v sodium azide/Phosphate-buffered saline (PBS).
3. Protein blocking solution: 5% v/v rabbit serum/antibody diluent (DAKO REAL antibody diluent, cat #: S2022).
4. Phosphate-buffered saline (PBS).
5. Murine IgG1 anti-Hsp70 monoclonal antibody cmHsp70.1: working solution 1: 500 in antibody diluent (multimmune GmbH, Munich).
6. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse polyclonal antibody: DAKO EnVision + system HRP-conjugated rabbit anti-mouse polyclonal antibody.
7. DAB (3,3'-diaminobenzidine): DAKO liquid DAB+ Substrate and Chromogen System.

#### 2.5 Flow Cytometry

1. Cells of interest.
2. Fc receptor (FcR)-blocking immunoglobulin (Ig; e.g., normal rat IgG) solution, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  or specific Fc blocking reagents that are suitable for use in the species of interest.
3. Carboxyfluorescein or FITC-conjugated cmHsp70.1 IgG1 murine anti-Hsp70 monoclonal antibody (multimmune GmbH).
4. Carboxyfluorescein or FITC-conjugated IgG1 murine monoclonal antibody to Hsp70 (clone C92F3A, StressMarq Biosciences Inc. *see* Subheading 4).
5. Appropriately conjugated murine immunoglobulin (Ig) isotype controls.
6. Phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.1% w/v sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) and bovine serum albumin (BSA) (PAB; *see* recipe below).
7. Nuclear/membrane integrity (viability) staining compound dissolved in PBS: 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PI [alternative options include 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  7-AAD, 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TO-PRO-3 (Molecular Probes), or 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PY(G)]—*see* Subheading 4.

#### 2.5.1 PBS, pH 7.2, Supplemented with Sodium Azide ( $\text{NaN}_3$ ) and Fetal Bovine Serum (FBS)

1. Dulbecco's PBS,  $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free (e.g., Life Technologies), containing:
2. 0.1% (w/v) sodium azide.
3. 10% (w/v) fetal bovine serum (FBS).
4. Adjust pH to 7.2 using 1 N NaOH or 1 N HCl.
5. Filter solution through 0.22  $\mu\text{m}$  membrane.
6. Store up to 1 month at 4 °C.

312 Stefan Stangl et al.

7. EDTA (1 mM) can be added to reduce cellular aggregation.

**CAUTION:** Always keep cells and reagents at 4 °C. Be extremely careful when handling sodium azide.

### 3 Methods

#### 3.1 Immunohistochemistry (IHC)

IHC must be performed on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue sections (2 µm) using a rabbit anti-mouse polyclonal antibody staining kit (DAKO). In brief, tissue sections were boiled by microwaving for 30 min in target retrieval buffer (DAKO) to unmask the epitope. Between each of the following incubation steps, sections were washed in PBS (Sigma). Nonspecific binding must be blocked in a protein blocking solution for 60 min. Slides must be incubated overnight at 4 °C with cmHsp70.1 mAb (multimmune GmbH) or with a corresponding IgG control (Sigma). After washing, the sections are incubated with the HRP-conjugated anti-mouse polyclonal antibody, followed by the DAB chromogen reaction to detect the binding of the primary antibody. Nuclei are counterstained with hematoxylin and sections embedded in embedding medium.

##### 3.1.1 Rehydration

1. Xylene I & II	2 × 15 min
2. Ethanol absolute I & II	2 × 10 min
3. Ethanol 96%	2 × 5 min
4. Ethanol 70%	1 × 5 min
5. Ethanol 50%	1 × 5 min
6. H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1 × 5 min

##### 3.1.2 Target Retrieval and Staining

1. Target retrieval solution	1 × 30 min boiling (microwave)
2. Cooling down period	1 × 10 min in target retrieval solution
3. H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	1 × 2 min
4. Marking of the section with a hydrophobic pen	
5. Peroxidase blocking solution	1 × 30 min
6. H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	3 × 5 min
7. Protein blocking solution	1 × 60 min

(continued)

8. PBS	2 × 5 min
9. cmHsp70.1 mAb (1:500)	Overnight (4 °C)
10. PBS	2 × 5 min
11. Envision + System HRP Labelled anti-mouse polymer	1 × 30 min (RT)
12. PBS	1 × 5 min
13. Dab	1 × 4 min
14. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 × 5 min
15. Counterstain with hematoxylin	1 × 30 s
16. Rinse with warm tap water	1 × 5 min

### 3.1.3 Dehydration and Embedding

1. Ethanol 50%	1 × 5 min
2. Ethanol 70%	1 × 5 min
3. Ethanol 96% II & II	2 × 5 min
4. Ethanol absolute III & IV	2 × 5 min
5. Xylene III & IV	2 × 10 min
6. Embedding (Eukitt)	

**CAUTION:** Keep the time of the chromogen reaction exactly at 4 min and use sections of the same thickness (2 µm) in order to be able to compare staining intensities of different experiments. Always run reference sections with a defined staining intensity as an internal control.

### 3.1.4 Scoring Criteria of IHC Using cmHsp70.1 mAb

The staining intensity must be analyzed semi-quantitatively within the tumor area. The staining intensity of tumor cells is graded into different scores: normal (+), intermediate (++), strong (+++). Normal tissues are graded as weak (+/-). The localization of the staining (cytosolic, nuclear) as well as the percentage of positively stained cells must be considered. The scoring must be performed by at least two independent researchers.

### 3.2 Flow Cytometry

1. Prepare single-cell suspensions of tumor cells in ice-cold PBS supplemented with 10% (v/v) FBS (PBS/FBS).
2. Dispense  $1 \times 10^5$  cells into microcentrifuge tubes.
3. Pellet the cells by centrifugation for 5 min at  $500 \times g$ , 4 °C.

314 Stefan Stangl et al.

4. Remove the supernatant by vacuum aspiration.
5. Add 4  $\mu$ l ice-cold cmHsp70.1 mAb (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) to the pellet containing approximately 50  $\mu$ l PBS/FBS, resuspend and vortex the tubes slightly.
6. Incubate the tubes for 30 min on ice and wash in ice-cold PBS/FBS.
7. Resuspend the cell pellet in 300  $\mu$ l PBS/FBS.
8. Add 3  $\mu$ l PI to tube (*Alternatively, add 4  $\mu$ l 7-AAD, 4  $\mu$ l TO-PRO-3, or 5  $\mu$ l PY(G).*)
9. Incubate the cells on ice for 5 min.
10. Analyze the cells using a flow cytometer immediately thereafter.
11. Keep samples on ice during analysis.
12. Prolonged periods before analyzing them are generally not recommended.

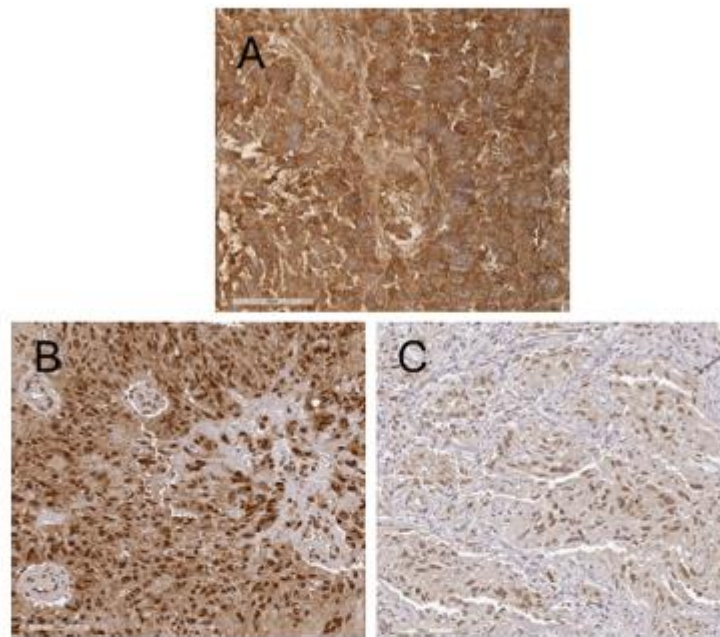
---

#### 4 Notes

##### 4.1 Immunohistochemistry (IHC) Scoring

Every nucleated human cell type expresses the stress-inducible Hsp70 at low levels in the cytosol, whereas the membrane-bound form of Hsp70 appears to be restricted to tumor cells. Given that the cmHsp70.1 antibody can stain both, the membrane-bound and cytosolic forms of Hsp70 and that approximately 70%–90% of the total Hsp70 is residing intracellularly, it is nearly impossible to distinguish between the membrane-bound and cytosolic localizations of Hsp70 by IHC. Therefore, membrane-bound Hsp70 must be determined by flow cytometry of viable cells with intact plasma membranes, whereas cytosolic Hsp70 can be determined by IHC. It is well known that highly aggressive tumor cells show a higher expression density and a different subcellular localization of Hsp70 compared to normal cells. Therefore, the intensity and the subcellular distribution (cytosol, membrane, nucleus) of Hsp70 can be considered tumor-specific characteristics. Since no human cell type is completely negative for cytosolic Hsp70, different Hsp70 staining intensities rather than Hsp70 negative and Hsp70 positive phenotypes can be distinguished. For a comparable scoring of different staining intensities in different IHC staining procedures, it is key to run control sections (tumor and normal tissue sections) as a reference. The thickness of the sections must be exactly 2  $\mu$ m to be able to correctly score different staining intensities. Apart from the staining intensity, many glioblastomas show a heterogeneous staining pattern within the tumor tissue. Therefore, it is also necessary to determine the percentage of the field which shows a certain staining intensity. Finally, the subcellular distribution of the Hsp70





**Fig. 1** Representative immunohistochemical (IHC) staining patterns of sections (2  $\mu\text{m}$ ) of GL261 mouse glioblastoma (a), human glioblastoma multiforme WHO grade IV (b, c) with cmHsp70.1 mAb. Staining intensity scores are as follows: A: +++, B: +++, C: +. Panel A shows a typical cytosolic staining pattern, panels B and C show representative examples of a cytosolic and nuclear staining pattern

staining also needs to be considered. Figure 1 provides a typical example of strong and weak staining intensity in the nucleus and the cytosol in the tumor of a single patient with GBM.

#### 4.2 Flow Cytometry

The inclusion of the IgG1 murine monoclonal antibody to Hsp70 (clone C92F3A, StressMarq Biosciences Inc) in the staining protocol is essential to determine the amount of Hsp70 which is bound to receptors such as TLRs or scavenger receptors on the cell surface of tumor cells. This antibody does not stain the confirmation of lipid bound Hsp70 in the plasma membrane of tumor cells.

Although cell viability should routinely be assessed in all flow cytometric analyses, as nonviable cells and debris can nonspecifically take up and bind probes and antibodies and so must be excluded from phenotypic analysis, it is particularly essential for the specific analysis of membrane Hsp70 expression by flow cytometry, as cells

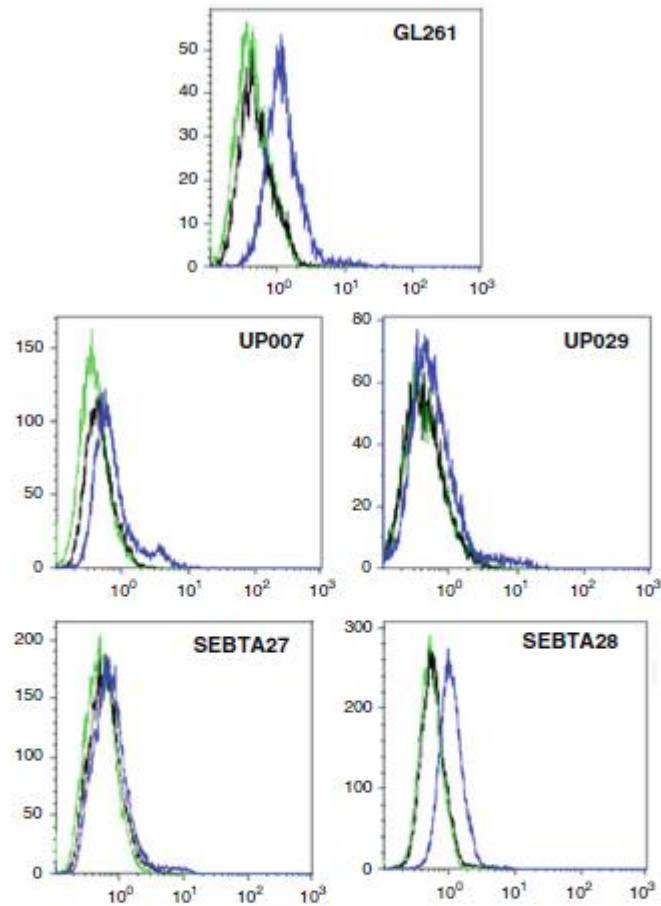
having a compromised cell membrane will be highly positive for intracellular Hsp70 expression. Nonviable cells might also exhibit a higher level of autofluorescence and/ or release DNA which can promote cell clumping and aggregation. Cell aggregation can be inhibited by including a small amount of DNase in the staining solution, and nonviable cells can be excluded from the analysis using viability stains.

The viability of cultured cells can be quite low, however cell death during sample processing can be minimized by performing all cell preparations and staining procedures (including wash steps) at 4 °C or on ice and in the presence of bovine serum albumin (BSA) or heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). Cells should be analyzed in a flow cytometer as soon as possible. **Cells should not be fixed when analyzing the expression of membrane Hsp70.**

The best method for excluding dead cells from data analysis is to use a vital DNA dye in all the samples. Although some of the more common vital dyes used in multicolor analyses are propidium iodide (PI), 7-aminoactinomycin D (7-AAD), TO-PRO-3, and pyronin Y(G) [PY(G)], a range of options are now available from commercial suppliers. A note of caution is that dyes such as PI and 7-AAD can be taken up into viable cells over time, and so these stains should be added immediately prior to analysis.

The relatively broad emission spectrum of 7-AAD can result in spectral overlap into other detectors and require considerable compensation in large multi-parameter panels. It is also quite a "dim" fluorescent molecule.

The far-red viability dye DRAQ7™ (Biostat Ltd., UK) can be used in similar settings to PI and 7-AAD. A particularly useful feature of DRAQ7™ is that its dual excitation characteristics allow multibeam excitation and the exclusion of dead (DRAQ7+) cells without "consuming" what could be a vital additional fluorescent channel. Figure 2 provides a panel of typical flow cytometry results of membrane Hsp70 expression in patient-derived cancer cell lines.



**Fig. 2** Representative flow cytometric histograms illustrating membrane Hsp70 expression by a panel of patient-derived cell lines, as described in the main body of the text. GL261 tumors were induced via intracranial injection of methylcholanthrene followed by serial intracranial and subcutaneous transplantations of tumor fragments into syngeneic C57BL/6 mice. *Green*—unstained control; *black*—stained using the C92F3A clone mAb; *blue*—stained using the cmHsp70.1 clone mAb

### Acknowledgments

Gabriele Multhoff is supported by grants of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB8 24/2; DFG INST95/980-1 FUGG, INST411/37-1 FUGG), the DFG Cluster of Excellence: Munich-Centre for Advanced Photonics (MAP), the Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMBF Innovative Therapies,

318 Stefan Stangl et al.

01GU0823; Kompetenzverbund Strahlenforschung 02NUK038A), EU-CELLEUROPE (315963) and the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group, Munich (DKTK-ROG).

The John van Geest Cancer Research Centre is supported by funding from the John and Lucille van Geest Foundation, Nottingham Trent University, the European Regional Development Fund (ERDF) via the Healthcare and Bioscience iNET, as delivered by Medilink East Midlands, UK and the Headcase Cancer Trust.

The University of Portsmouth Brain Tumour Research Centre is core funded by Brain Tumour Research.

## References

- Burton EC, Prados MD (2000) Malignant gliomas. *Curr Treat Options in Oncol* 1 (5):459–468
- Nieder C, Grosu AL, Molls M (2000) A comparison of treatment results for recurrent malignant gliomas. *Cancer Treat Rev* 26 (6):397–409
- Dazzi C, Carillo A, Giannini M, Del Duca M, Giovanis P, Fiorentini G, Leoni M, Rosti G, Turci D, Tienghi A, Vertogen B, Zumaglini F, De Giorgi U, Marangolo M (2000) A sequential chemo-radiotherapeutic treatment for patients with malignant gliomas: a phase II pilot study. *Anticancer Res* 20(1B):515–518
- Barrié M, Couprie C, Dufour H, Figarella-Branger D, Muracciole X, Hoang-Xuan K, Braguer D, Martin PM, Peragut JC, Grisoli F, Chinot O (2005) Temozolomide in combination with BCNU before and after radiotherapy in patients with inoperable newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Ann Oncol: Off J Eur Soc Med Oncol/ESMO* 16 (7):1177–1184
- Combs SE, Gutwein S, Thilmann C, Debus J, Schulz-Ertner D (2005) Reirradiation of recurrent WHO grade III astrocytomas using fractionated stereotactic radiotherapy (FSRT). *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al]* 181 (12):768–773
- Combs SE, Thilmann C, Edler L, Debus J, Schulz-Ertner D (2005) Efficacy of fractionated stereotactic reirradiation in recurrent gliomas: long-term results in 172 patients treated in a single institution. *J Clin Oncol: Off J Am Soc Clin Oncol* 23(34):8863–8869
- Combs SE, Wagner J, Bischof M, Welzel T, Wagner F, Debus J, Schulz-Ertner D (2008) Postoperative treatment of primary glioblastoma multiforme with radiation and concomitant temozolomide in elderly patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 70(4):987–992
- Combs SE, Wagner J, Bischof M, Welzel T, Edler L, Rausch R, Wagner F, Zabel-du Bois A, Debus J, Schulz-Ertner D (2008) Radiochemotherapy in patients with primary glioblastoma comparing two temozolomide dose regimens. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71(4):999–1005
- Frenay M, Lebrun C, Lonjon M, Bondiau PY, Chatel M (2000) Up-front chemotherapy with fotemustine (F)/cisplatin (CDDP)/etoposide (VP16) regimen in the treatment of 33 non-removable glioblastomas. *Eur J Cancer* 36(8):1026–1031
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Radiotherapy and Chemotherapy Working Group, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):987–996
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10 (5):459–466


12. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Eissner G, Issels R (1995) CD3<sup>-</sup> large granular lymphocytes recognize a heat-inducible immunogenic determinant associated with the 72-kDa heat shock protein on human sarcoma cells. *Blood* 86:1374-1382
13. Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Müller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD (1995) A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer* 61:272-279
14. Stangl S, Gehrman M, Riegger J, Kahls K, Riederer I, Sievert W, Hube K, Mocikat R, Dressel R, Kremmer E, Pockley AG, Friedrich L, Vigh I, Skerra A, Multhoff G (2011) Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2):733-738
15. Gehrman M, Stangl S, Foulds GA, Oellinger R, Breuringer S, Rad R, Pockley AG, Multhoff G (2014) Tumor imaging and targeting potential of an hsp70-derived 14-mer peptide. *PLoS One* 9(8):e105344
16. Gehrman M, Pfister K, Hutzler P, Gastpar R, Margulis B, Multhoff G (2002) Effects of anti-cytoplasmic agents on cytoplasmic and membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) levels. *Biol Chem* 383:1715-1725
17. Gehrman M, Stangl S, Kirschner A, Foulds GA, Sievert W, Doss BT, Walch A, Pockley AG, Multhoff G (2012) Immunotherapeutic targeting of membrane hsp70-expressing tumors using recombinant human granzyme B. *PLoS One* 7(7):e41341
18. Pfister K, Radons J, Busch R, Tidball JG, Pfeifer M, Freitag L, Feldmann HJ, Milani V, Issels R, Multhoff G (2007) Patient survival by Hsp70 membrane phenotype: association with different routes of metastasis. *Cancer* 110:926-935
19. Multhoff G, Botzler C, Jennen L, Schmidt J, Ellwart J, Issels R (1997) Heat shock protein 72 on tumor cells: a recognition structure for natural killer cells. *J Immunol* 158:4341-4350
20. Multhoff G, Hightower LE (2011) Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress Chaperones* 16(3):251-255
21. Multhoff G, Pfister K, Gehrman M, Hantschel M, Gross C, Hafner M, Hiddemann W (2001) A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress Chaperones* 6(4):337-344
22. Multhoff G, Pfister K, Botzler C, Jordan A, Scholz R, Schmetzer H, Burgstahler R, Hiddemann W (2000) Adoptive transfer of human natural killer cells in mice with severe combined immunodeficiency inhibits growth of Hsp70-expressing tumors. *Int J Cancer* 88:791-797
23. Gross C, Hansch D, Gastpar R, Multhoff G (2003) Interaction of heat shock protein 70 peptide with NK cells involves the NK receptor CD94. *Biol Chem* 384:267-279
24. Gross C, Holler E, Stangl S, Dickinson A, Pockley AG, Asca AA, Mallappa N, Multhoff G (2008) An Hsp70 peptide initiates NK cell killing of leukemic blasts after stem cell transplantation. *Leuk Res* 32(4):527-534
25. Gross C, Koelch W, DeMaio A, Arispe N, Multhoff G (2003) Cell surface-bound heat shock protein 70 (Hsp70) mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J Biol Chem* 278(42):41173-41181
26. Krause SW, Gastpar R, Andreesen R, Gross C, Ullrich H, Thonigs G, Pfister K, Multhoff G (2004) Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin Cancer Res* 10:3699-3707
27. Specht HM, Ahrens N, Blankenstein C, Duell T, Fietkau R, Gaipl US, Gunther C, Gunther S, Habl G, Hautmann H, Hautmann M, Huber RM, Molls M, Offner R, Rodel C, Rodel F, Schutz M, Combs SE, Multhoff G (2015) Heat shock protein 70 (Hsp70) peptide activated natural killer (NK) cells for the treatment of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) after Radiochemotherapy (RCTx) - from preclinical studies to a clinical phase II trial. *Front Immunol* 6:162
28. Gehrman M, Doss BT, Wagner M, Zetzlitz KA, Kontermann RE, Foulds G, Pockley AG, Multhoff G (2011) A novel expression and purification system for the production of enzymatic and biologically active human granzyme B. *J Immunol Methods* 371(1-2):8-17
29. Milani V, Stangl S, Issels R, Gehrman M, Wagner B, Hube K, Mayr D, Hiddemann W, Molls M, Multhoff G (2009) Anti-tumor activity of patient-derived NK cells after cell-based immunotherapy--a case report. *J Transl Med* 7:50
30. Stangl S, Gehrman M, Dressel R, Alves F, Dullin C, Themelis G, Ntziachristos V, Staebelin E, Walch A, Winkelmann I, Multhoff G (2010) *In vivo* imaging of CT26 mouse tumors by using cmHsp70.1 monoclonal antibody. *J Cell Mol Med* 15(4):874-887

320 Stefan Stangl et al.

31. Stangl S, Varga J, Freysoldt B, Trajkovic-Arsic M, Siveke JT, Greten FR, Ntziachristos V, Multhoff G (2014) Selective *in vivo* imaging of syngenic, spontaneous, and xenograft tumors using a novel tumor cell-specific hsp70 peptide-based probe. *Cancer Res* 74 (23):6903–6912
32. Gehrman MK, Kimm MA, Stangl S, Schmid TE, Noel PB, Rummeny EJ, Multhoff G (2015) Imaging of Hsp70-positive tumors with cmHsp70.1 antibody-conjugated gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 10:5687–5700
33. Zhang H, Liu R, Huang W (2007) A 14-mer peptide from HSP70 protein is the critical epitope which enhances NK activity against tumor cells *in vivo*. *Immunol Investig* 36(3):233–246
34. Fouchaq B, Benaroudj N, Ebel C, Ladjimi MM (1999) Oligomerization of the 17-kDa peptide-binding domain of the molecular chaperone HSC70. *Eur J Biochem* 259 (1–2):379–384

Article

## Time- and Dose-Dependent Effects of Ionizing Irradiation on the Membrane Expression of Hsp70 on Glioma Cells

Helena Fellinger <sup>1</sup> , Stefan Stangl <sup>1</sup>, Alicia Hernandez Schnelzer <sup>1</sup>, Melissa Schwab <sup>1</sup>, Tommaso Di Genio <sup>1</sup>, Marija Pieper <sup>1</sup>, Caroline Werner <sup>1</sup>, Maxim Shevtsov <sup>1,2,3</sup>, Bernhard Haller <sup>4</sup> and Gabriele Multhoff <sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Radiation Immuno-Oncology Group, Center for Translational Cancer Research (TranslaTUM), School of medicine, Technical University of Munich (TUM), 81675 Munich, Germany; skygallery@web.de (H.F.); Stefan.stangl@tum.de (S.S.); Alicia.hernandez@tum.de (A.H.S.); Melissa.schwab@tum.de (M.S.); tommasodigenio@hotmail.it (T.D.G.); Marija.pieper@tum.de (M.P.); c.werner@tum.de (C.W.); Maxim.shevtsov@tum.de (M.S.)

<sup>2</sup> Institute of the Russian Academy of Sciences (RAS), 194064 St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 197022 St. Petersburg, Russia

<sup>4</sup> Institute of Medical Informatics, Statistics and Epidemiology, Technical University of Munich (TUM), 81675 Munich, Germany; Bernhard.haller@tum.de

<sup>5</sup> Department of Radiation Oncology, School of Medicine, Technical University of Munich (TUM), 81675 Munich, Germany

\* Correspondence: gabriele.multhoff@tum.de; Tel.: +49-89-4140-4514

Received: 24 March 2020; Accepted: 7 April 2020; Published: 8 April 2020



**Abstract:** The major stress-inducible protein Hsp70 (HSPA1A) is overexpressed in the cytosol of many highly aggressive tumor cells including glioblastoma multiforme and presented on their plasma membrane. Depending on its intracellular or membrane localization, Hsp70 either promotes tumor growth or serves as a target for natural killer (NK) cells. The kinetics of the membrane Hsp70 (mHsp70) density on human glioma cells (U87) was studied after different irradiation doses to define the optimal therapeutic window for Hsp70-targeting NK cells. To maintain the cells in the exponential growth phase during a cultivation period of 7 days, different initial cell counts were seeded. Although cytosolic Hsp70 levels remained unchanged on days 4 and 7 after a sublethal irradiation with 2, 4 and 6 Gy, a dose of 2 Gy resulted in an upregulated mHsp70 density in U87 cells which peaked on day 4 and started to decline on day 7. Higher radiation doses (4 Gy, 6 Gy) resulted in an earlier and more rapid onset of the mHsp70 expression on days 2 and 1, respectively, followed by a decline on day 5. Membrane Hsp70 levels were higher on cells in G2/M than in G1; however, an irradiation-induced cell cycle arrest on days 4 and 7 was not associated with an increase in the mHsp70 density. Extracellular Hsp70 concentrations in the supernatant of irradiated cells were significantly higher than sham (0 Gy) irradiated cells on days 4 and 7, but not on day 1. Functionally, elevated mHsp70 densities were associated with a significantly better lysis by Hsp70-targeting NK cells. In summary, the kinetics of changes in the mHsp70 density upon irradiation on tumor cells is time- and dose-dependent.

**Keywords:** radiotherapy; glioblastoma; membrane Hsp70; dose- and time-kinetics; NK cell-based therapy

### 1. Introduction

The therapeutic application of ionizing radiation, either alone or in combination with surgery and chemotherapy, plays a pivotal role in the treatment of solid tumors. Ionizing radiation elicits its

cytotoxic activity against tumor cells by causing DNA single- and double-strand breaks, predominantly mediated and fixed by reactive oxygen species (ROS). Although the major goal of irradiation is to achieve local tumor control and a decreased dissemination by reducing the viable tumor mass, also immunostimulatory effects have been assigned to ionizing radiation [1,2]. However, it remains to be elucidated which dose and radiation regimen is optimal to induce anti-tumor immune effects. Herein, cytosolic, extracellular and plasma membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) [3,4] was studied in highly aggressive glioblastoma cells as a radiation-inducible target for natural killer (NK) cells.

Besides its intracellular chaperoning functions, which include assisting the correct folding of proteins, the assembly of nascent polypeptides, the prevention of protein aggregation and thereby controlling cellular protein homeostasis, members of the HSP70 family fulfil various cytoprotective tasks under physiological conditions and upon environmental stress [3]. An up-regulated Hsp70 expression enhances the viability of tumor cells by fostering protein damage repair and impairing apoptotic pathways [5]. By stimulating the overexpression of anti-apoptotic proteins (Bcl-2/Bcl-xL), downregulating pro-apoptotic Bax, Bcl-Xs and Bak or blocking tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis and formation of the death-inducing signaling complex with death receptors DR4 and DR5 [5], cytosolic Hsp70 promotes tumor cell survival, protects against apoptosis and promotes tumor progression [6].

A large variety of stress factors including hypoxia and reoxygenation, heavy metals, glucose deprivation and cytotoxic drugs can induce the Hsp70 expression and stimulate antigen release and danger signal expression [6,7].

In contrast to intracellular Hsp70, extracellular and mHsp70 play a pivotal role in stimulating both adaptive and innate immune responses and thereby initiating protective anti-tumor immunity [8]. By its exclusive expression on the plasma membrane of tumor cells [9], mHsp70 provides a tumor-specific target for Hsp70-specific, activated NK cells [10]. Therefore, increasing the density of mHsp70 on tumor cells by irradiation combined with a mHsp70-targeting NK cell-based immunotherapy might provide a novel strategy to improve clinical outcome and extend overall survival of patients with advanced tumors [11–13]. Herein, we were interested to identify the optimal radiation dose and time point for an up-regulated mHsp70 density as a target for NK cells on highly aggressive glioblastoma cells.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell Line and Culture Conditions

The epithelial human glioblastoma cell line U87 MG (ATCC HTB-14, MGMT<sup>-</sup>) and the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 (ATCC HB-8065) were grown in complete growth medium, consisting of Dulbecco's Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Steinheim Germany) supplemented with 10% *v/v* heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich), 1% antibiotics (10,000 IU/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, Sigma-Aldrich), L-glutamine (Sigma-Aldrich), MEM non-essential amino acid solution 100× (Sigma-Aldrich) and sodium pyruvate (Sigma-Aldrich). The epithelial human cervix carcinoma cell line HeLa (ATCC CCL-2) was grown in complete growth medium, consisting of RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Germany) supplemented with 10% *v/v* heat inactivated FCS (Sigma-Aldrich), 1% antibiotics (10,000 IU/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, Sigma-Aldrich), L-glutamine (Sigma-Aldrich) and sodium pyruvate (Sigma-Aldrich). After reaching confluency, adherent growing tumor cells were trypsinized for 2 min at 37 °C in trypsin ethylene diamine-tetra-acetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich). Single cell suspensions with different cell counts were seeded in 15 mL supplemented medium in T-75 ventilated culture flasks. Tumor cells were routinely checked for mycoplasma contamination.



## 2.2. Irradiation

Tumor cells were irradiated with a single dose of 0 (sham), 2, 4 and 6 Gy using the Gulmay RS225A irradiation machine (Gulmay Medical Ltd., Camberley, UK) at a dose rate of 0.90 Gy/min (15 mA, 200 keV) or were kept untreated.

## 2.3. Flow Cytometry and Cell Cycle Analysis

Single cell suspensions of sham (0 Gy) irradiated and irradiated cells ( $0.4 \times 10^6$  cells per vial) were collected at different time-points after radiation. After a washing step in phosphate-buffered saline (PBS)/10% *v/v* fetal calf serum (FCS), cells were incubated either with fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse monoclonal antibody (mAb) specific for mHsp70 (cmHsp70.1, IgG1, multimune GmbH, Munich, Germany) or with an isotype-matched FITC-labeled control antibody on ice in the dark for 30 min. Only viable cells (propidium iodide negative cells) were gated, and the proportion of positively stained cells and mean fluorescence intensity (mfi) values were analyzed on a FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Germany). The mfi is a relative value of the total fluorescence intensity of cmHsp70.1-FITC antibody stained, viable cells subtracted by the intensity of the signal intensity obtained after staining of the cells with an isotype-matched IgG1-FITC control antibody. Fluorescence data were analyzed and plotted by using CellQuest software (BD Biosciences, Heidelberg, Germany).

For a concomitant analysis of the mHsp70 expression during the cell cycle, viable cells which have been stained with cmHsp70.1 mAb were washed and fixed in 2% *w/v* paraformaldehyde (PFA) and then ice-cold methanol (70% *v/v*). After rehydration, cells were suspended in 500  $\mu$ L propidium iodide/RNase staining solution (Sigma/Aldrich), incubated for 60 min at room temperature and analyzed on a FACSCalibur™ flow cytometer, as described above.

## 2.4. Immunocytochemistry (ICC)

Cells were grown on poly-L-lysine-coated glass slides. On days 4 and 7 after irradiation with 0 (sham) and 4 Gy, cells were stained with FITC-labeled cmHsp70.1 monoclonal antibody (multimune GmbH, Munich) on ice for 30 min. After antibody incubation, cells were washed in ice-cold PBS and fixed in 3.7% *w/v* PFA in PBS (pH 7.4). Nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Fluorescence images were taken with an AxioImager M2 microscope, equipped with a 100 $\times$  oil immersion objective (Carl Zeiss Microscope, Jena, Germany) at a resolution of 2048  $\times$  2048 pixels. To avoid potential cross-interferences of the different fluorophores, images for FITC and DAPI were acquired using a sequential image recording mode.

## 2.5. Hsp70 lipELISA

Levels of extracellular Hsp70 in the supernatant of sham irradiated and irradiated U87 cells on days 1, 4 and 7 were determined using the lipHsp70 ELISA, as described elsewhere [14]. The measured values of extracellular Hsp70 were normalized to  $1 \times 10^6$  viable tumor cells.

## 2.6. Europium Assay

The lytic activity of human NK cells cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% *v/v* heat inactivated fetal calf serum (FCS), 1% antibiotics (10,000 IU/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin), L-glutamine, sodium pyruvate and Hsp70 peptide TKD (2  $\mu$ g/mL) and IL-2 (100 IU/mL) at a cell density of  $5 \times 10^6$  peripheral blood lymphocytes (PBL) for 4 days against sham (0 Gy) and 4 Gy irradiated tumor cells was determined at different effector-to-target (E:T) ratios ranging from 50:1 to 3:1 using a standard 3.5 h Europium assay. The tumor cells were washed twice with fresh medium before the assay

starts to exclude the presence of extracellular Hsp70 during the assay. Mean values of an experiment in triplicates are shown. The specific lysis was calculated according to Equation (1):

$$\text{Specific Lysis} = \frac{\text{Experimental Release} - \text{Spontaneous Release}}{\text{Maximum Release} - \text{Spontaneous Release}} \quad (1)$$

### 2.7. Statistical Analysis

Each sample was measured in at least three independent experiments. Means and standard deviations are presented for quantitative data. Analysis of variance (ANOVA) was used for comparisons of group means. If the global null hypothesis of all group means being equal could be rejected on a significance level of  $\alpha = 5\%$ , pairwise group comparisons were conducted by *t*-tests. For these pairwise comparisons, standard deviations were pooled over all groups, and Bonferroni correction was applied to account for multiple testing. A two-way ANOVA was used to assess the impact of radiation dose on the specific lysis at different E:T ratios by fitting a model including main effects and their interaction term to the data. A significance level of 5% was used.

## 3. Results

### 3.1. Membrane Hsp70 Expression Remains Stable During a Culture Period of 7 Days

To maintain cells in the exponential growth phase during a culture period of 7 days, different tumor cell counts were seeded. For a culture period of 1–4 days  $0.25 \times 10^6$  cells, for 5 days  $0.125 \times 10^6$  cells, for 6 days  $0.06 \times 10^6$  cells and for 7 days  $0.01 \times 10^6$  cells were seeded on day 0. Representative data for mHsp70 expression on U87 cells during a period of 7 days after sham irradiation (0 Gy) are summarized in Figure 1. No significant differences in the percentage of positively stained cells (Figure 1A;  $F(6,14) = 0.526$ ,  $p = 0.780$ ) and mean fluorescence intensity (mfi) (Figure 1B;  $F(6,14) = 2.202$ ,  $p = 0.105$ ) were detected over a 7 day culture period. The slightly lower mHsp70 density on day 0 could be attributed to the very short incubation period of 5 h after trypsin treatment and seeding.

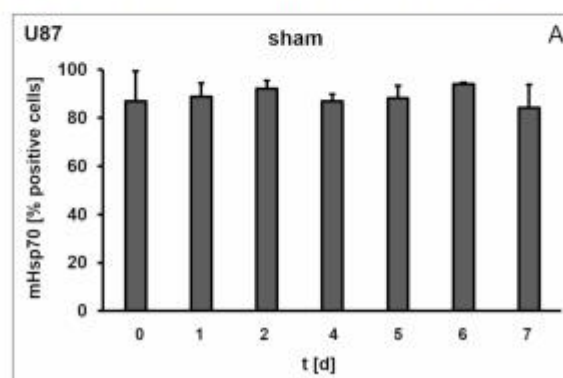
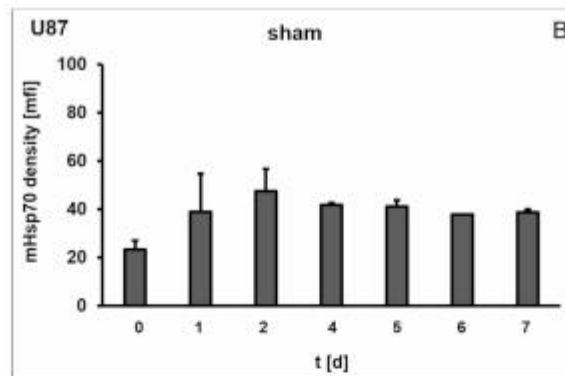


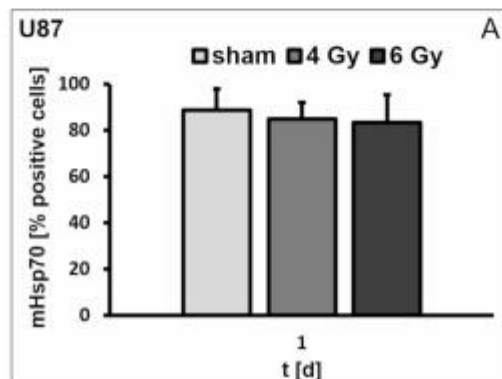
Figure 1. Cont.



**Figure 1.** Percentage (A) and mean fluorescence intensity (mfi) (B) of mHsp70-positive U87 glioblastoma cells after sham irradiation (0 Gy) on days 0, 1, 2, 4, 5, 6 and 7. Bars represent the mean value and the corresponding standard deviation (SD) of  $n = 3$  independent experiments. ANOVA was used to compare data across all days.

### 3.2. Irradiation Induces an Increase in the Mhsp70 Density on Different Tumor Cell Lines

Although the percentage of mHsp70-positive cells remained unaltered on U87 (Figure 2A), HeLa (Figure 2B) and HepG2 (Figure 2C) cells on day 1 after sham (0 Gy), 4 and 6 Gy irradiation, the mHsp70 density differed significantly upon radiation. A radiation dose of 6 Gy nearly doubled the mean fluorescence intensity (mfi) in all three tumor cell lines. In U87 cells the mfi increased from  $38.9 \pm 15.8$  (sham) to  $47.1 \pm 16.0$  after irradiation with 4 Gy and to  $83.5 \pm 14.2$  after irradiation with 6 Gy, on day 1 (Figure 2D;  $F(2,6) = 4.77$ ,  $p = 0.058$ ). In HeLa cells the mfi increased from  $9.2 \pm 1.9$  (sham) to  $15.7 \pm 0.8$  ( $p = 0.04$ ) and  $20.6 \pm 6.8$  ( $p = 0.03$ ) after irradiation with 4 and 6 Gy, respectively (Figure 2E), and in HepG2 the mfi increased from  $13.9 \pm 2.7$  to  $22.0 \pm 2.6$  ( $p = 0.04$ ) after 4 Gy and to  $22.3 \pm 4.6$  (Figure 2F) after 6 Gy, on day 1. The mHsp70 density on sham treated and completely untreated control cells was identical (data not shown). Cell viability of all tumor cell lines was not affected by radiation doses ranging from 2 to 6 Gy.



**Figure 2.** Cont.

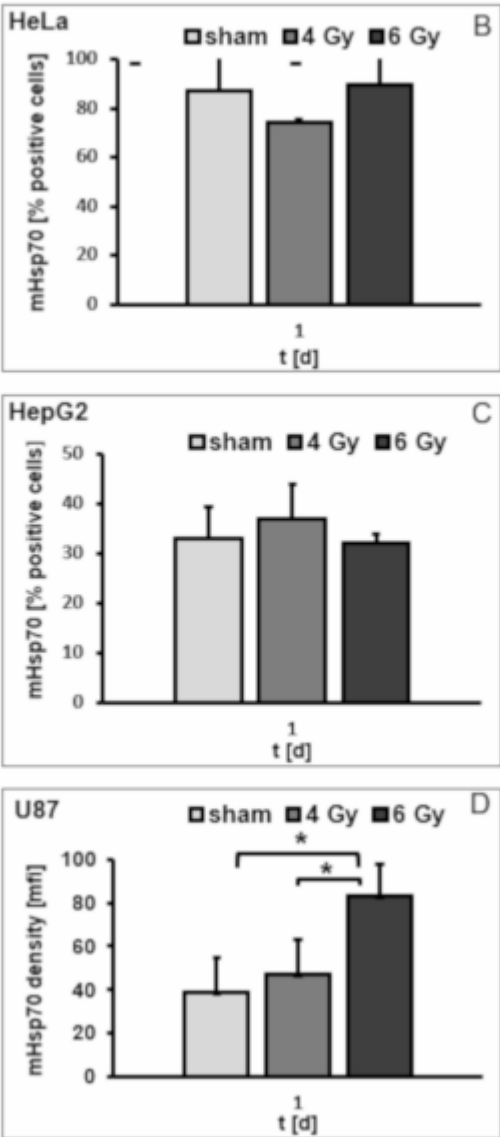
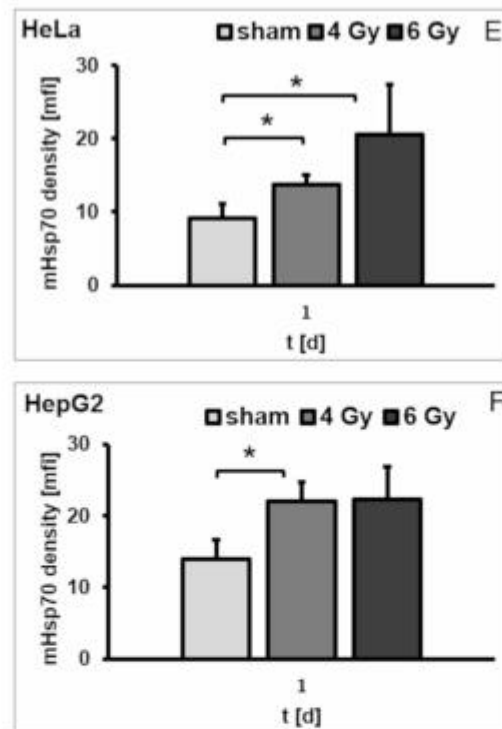


Figure 2. Cont.



**Figure 2.** Percentage of mHsp70-positive U87 (A), HeLa (B) and HepG2 (C) cells on day 1 after irradiation with 0 (sham), 4 and 6 Gy. Mean fluorescence intensity (mfi) of mHsp70 expression on U87 (D), HeLa (E) and HepG2 (F) cells on day 1 after irradiation with 0 (sham), 4 and 6 Gy. Bars represent the mean value and the corresponding standard deviation (SD) of  $n = 3$  (U87),  $n = 4$  (HeLa), and  $n = 3$  (HepG2) independent experiments. For comparison of different irradiation doses, ANOVA has been conducted followed by pairwise *t*-tests (with Bonferroni correction). Significance (sham vs. different irradiation doses on day 1, after Bonferroni correction): \*  $p \leq 0.05$ .

### 3.3. Irradiation-Induced Upregulation of mHsp70 Is Time-Dependent

A comparison of the mHsp70 densities on days 4 and 7 after irradiation with 4 and 6 Gy revealed that mfi values on day 4 remained significantly upregulated, but dropped on day 7 after radiation in HeLa (Figure 3A) and U87 (Figure 3B) cells. The mfi of sham (0 Gy) treated HeLa cells was  $7.9 \pm 1.3$  compared to  $14.8 \pm 3.0$  and  $18.6 \pm 3.1$  after radiation with 4 and 6 Gy on day 4 (Figure 3A;  $p = 0.05$ ). The mfi of sham (0 Gy) treated U87 cells was  $41.9 \pm 0.8$  compared to  $79.3 \pm 12.8$  and  $75.1 \pm 7.7$  after radiation with 4 Gy ( $p = 0.02$ ) and 6 Gy ( $p = 0.03$ ) on day 4 (Figure 3B;  $F(2,6) = 11.24$ ,  $p = 0.009$ ). Significant differences were observed between sham and 4 Gy and between sham and 6 Gy irradiated cells, whereas no statistically significance was observed between 4 and 6 Gy irradiated HeLa (Figure 3A) and U87 cells (Figure 3B). On day 7 after irradiation, the mfi of sham treated HeLa cells remained at  $9.2 \pm 1.4$ , but that of 4 and 6 Gy irradiated cells dropped to  $12.4 \pm 1.0$  and  $17.5 \pm 1.7$ , respectively, on day 7 (Figure 3A). In line with these results, the mfi of sham treated U87 cells

remained at  $38.73 \pm 1.41$ , but that of 4 and 6 Gy irradiated cells dropped to  $37.60 \pm 7.24$  and  $40.02 \pm 5.71$ , respectively, on day 7 (Figure 3B;  $F(2,6) = 0.1003$ ,  $p = 0.91$ ). No significant differences in the mfi were observed in the differently irradiated U87 cells on day 7 (Figure 3B). The upregulated mHsp70 density on day 4 and the downregulation of mHsp70 on day 7 after irradiation with 4 Gy was confirmed by immunocytochemistry (ICC) (Figure 3C). In contrast to the mHsp70 expression, the cytosolic Hsp70 content in U87 cells remained unaltered upon irradiation with 2, 4 and also 6 Gy, as determined by Western blot (Figure 3D) and intracellular Hsp70 staining on days 4 and 7 (Figure 3E). Similar results were observed with HeLa cells (data not shown).

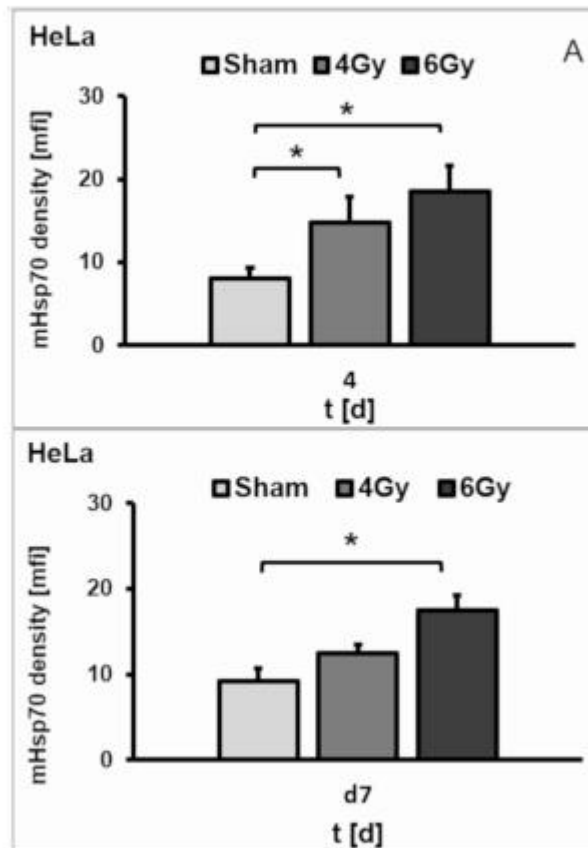


Figure 3. Cont.

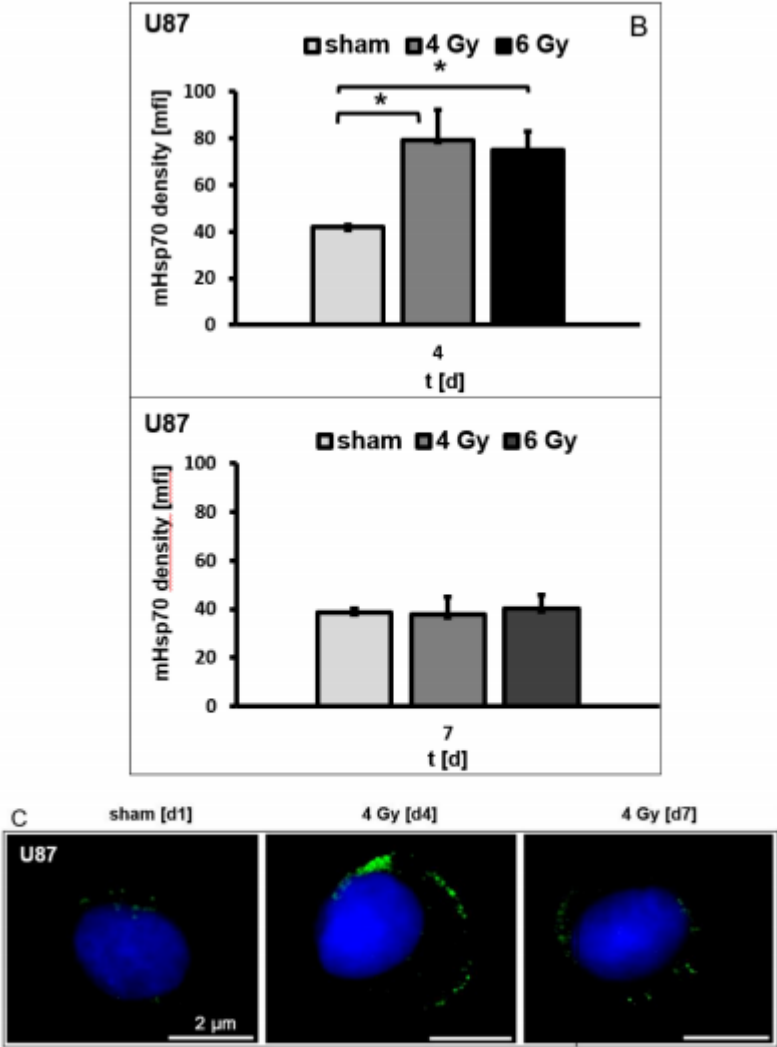
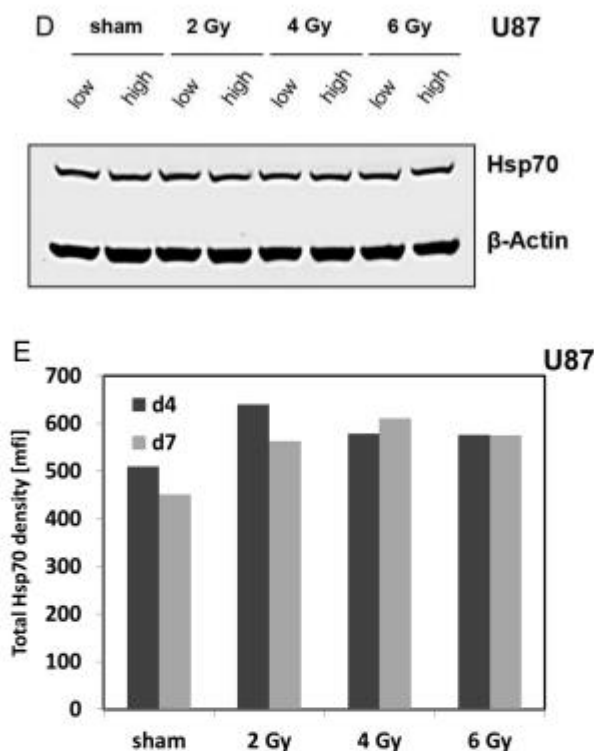


Figure 3. Cont.



**Figure 3.** Mean fluorescence intensity (mfi) of mHsp70 expression in HeLa (A) and U87 (B) cells after sham (0 Gy), 4 and 6 Gy irradiation on days 4 and 7. Bars represent the mean values and the corresponding standard deviation (SD) of  $n = 3$  independent experiments. Significance (sham vs. different irradiation doses on day 4): \*  $p \leq 0.05$  (after Bonferroni correction). Comparison of different doses (sham 0, 4, 6 Gy) were performed by pairwise *t*-tests with pooled SD and Bonferroni correction for multiple testing. An upregulation of the mHsp70 expression density upon irradiation with 4 Gy on day 4 and a downregulation of the mHsp70 expression on day 7 shown by immunocytochemistry (ICC) in U87 cells (C). Cytosolic Hsp70 expression was determined by Western blot analysis (D) and intracellular Hsp70 staining (E) in U87 cells after sham (0 Gy), 4 and 6 Gy irradiation on days 4 and 7.  $\beta$ -actin staining served as a loading control. Data show one representative experiment out of two independent experiments with similar results.

### 3.4. Irradiation-Induced Effects on the mHsp70 Density Are Dose- and Time-Dependent

The previous results indicated clear differences in the mHsp70 density on U87 cells that depend on the recovery time after irradiation. Figure 4 summarizes dose- and time-dependent effects on the mHsp70 density. Although mfi values for sham (0 Gy) treated cells did not differ significantly over a period of 7 days when different initial cell counts were seeded (Figure 1B), an exposure to 2 Gy induced a progressive slow increase in mfi values from day 0 up to a maximum value of  $67.4 \pm 16.7$  on day 5 that decreased to  $39.3 \pm 4.3$  on day 7 (Figure 4A;  $F(6,14) = 3.8952$ ,  $p = 0.017$ ). Cells that have been irradiated with a higher dose (4 Gy) reached the maximum mfi value ( $79.3 \pm 12.8$ ;  $p \leq 0.05$ ) by day 4



(Figure 4B;  $F(6,14) = 3.916$ ,  $p = 0.016$ ); however, the drop in the mfi values thereafter occurred more rapidly than after irradiation with 2 Gy. Following an irradiation with 6 Gy, mHsp70 expression density was significantly increased already on day 1 compared to sham (0 Gy) irradiated cells ( $23.3 \pm 3.7$  versus  $83.6 \pm 14.2$ ;  $p \leq 0.05$ ), persisted for 3 days and dropped on day 5 (Figure 4C;  $F(6,14) = 10.70$ ,  $p = 0.0002$ ). In Figure 4A–C, mfi values differing significantly ( $p \leq 0.05$ ) from the value on day 0 at each individual irradiation dose (2, 4, 6 Gy) using a pairwise comparison *t*-test with pooled SD marked with an asterisk. A comparison of all time points (day 0 to day 7) and all radiation doses (0, 2, 4, 6 Gy) reflects the different dose- and time-kinetics of the mHsp70 densities in U87 cells (Figure 4D).

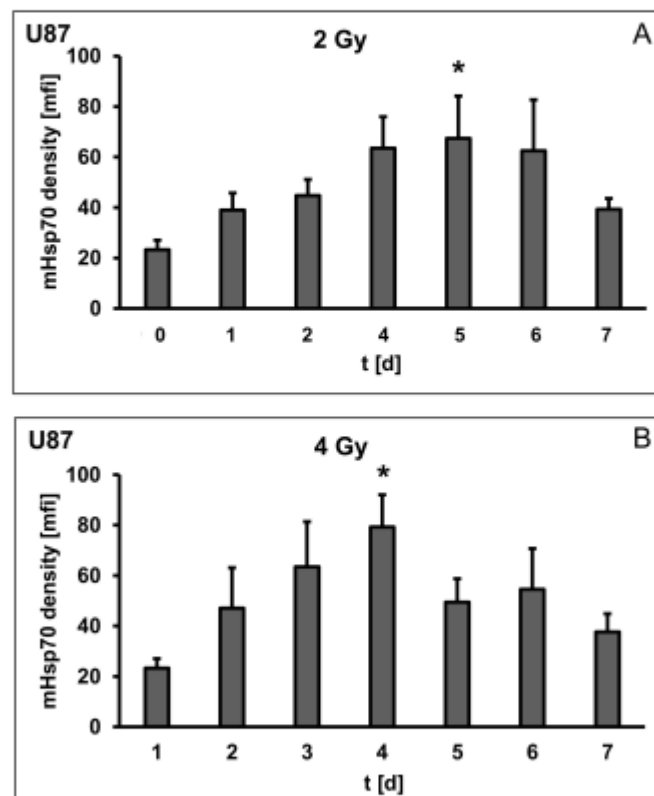
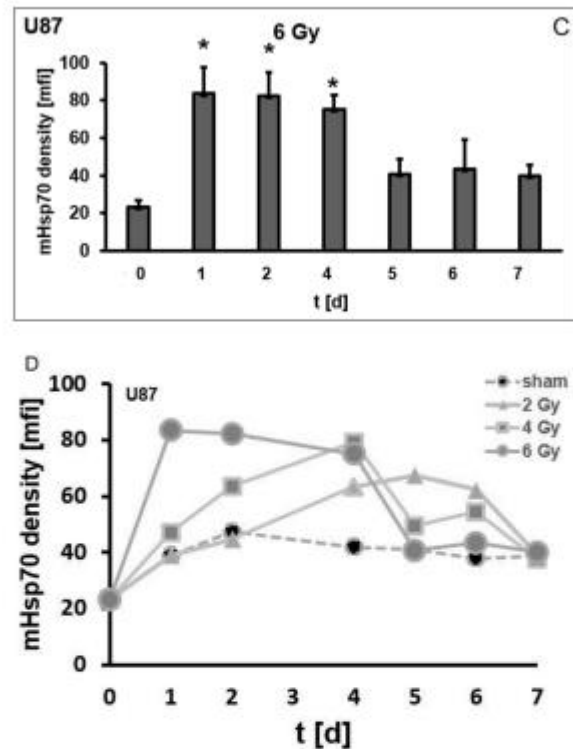


Figure 4. Cont.



**Figure 4.** Dose- and time-dependent radiation effects on the mean fluorescence intensity (mf) of mHsp70 on U87 human glioblastoma cells over 7 days with different radiation doses (2 Gy (A), 4 Gy (B), 6 Gy (C)). Bars represent the mean values and the corresponding standard deviation (SD) of  $n = 3$  independent experiments. Significance (comparison of one dose on different days): \*  $p \leq 0.05$ . For comparison of different days at a single dose ANOVA has been conducted. Comparisons to sham (0 Gy) treated cells were performed by pairwise *t*-tests with pooled SD and Bonferroni correction for multiple testing. (D) Summary of the kinetics of the mHsp70 density after sham (0 Gy), 2, 4, 6 Gy over a period of 7 days. For a better clarity, statistical significance was only shown in Figure 4A–C, but not in Figure 4D.

### 3.5. Irradiation-Induced Cell Cycle Arrest and Its Impact on the mHsp70 Density

On day 4 ( $F(3,24) = 64.83$ ,  $p < 0.001$ ) and on day 7 ( $F(3,24) = 4.232$ ,  $p = 0.016$ ) after irradiation with 2, 4 and 6 Gy, a dose-dependent cell cycle arrest in G2/M was observed in U87 cells (Figure 5A). A concomitant analysis of the mHsp70 density with the cell cycle revealed higher mHsp70 densities in G2/M compared to G1 in sham (0 Gy) and irradiated (2, 4, 6 Gy) tumor cells (Figure 5B). However, the mHsp70 density appeared not to be associated with the irradiation-induced G2/M arrest since a higher proportion of cells in G2/M on day 7 was not associated with a further increase in the mHsp70 density. An assessment of extracellular Hsp70 concentrations normalized to  $1 \times 10^6$  viable tumor cells showed significantly increased values on days 4 and 7 after an irradiation with 4 and 6 Gy compared

to sham irradiated cells ( $p \leq 0.05$ ), whereas on day 1 no significant increase in extracellular Hsp70 in the cell culture supernatant was detected (Figure 5C).

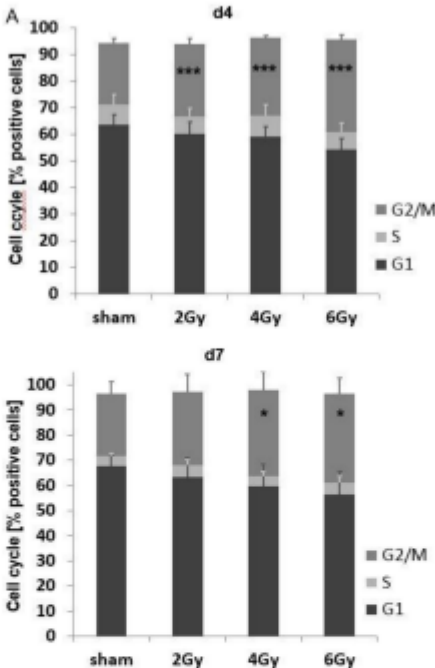


Figure 5. Cont.

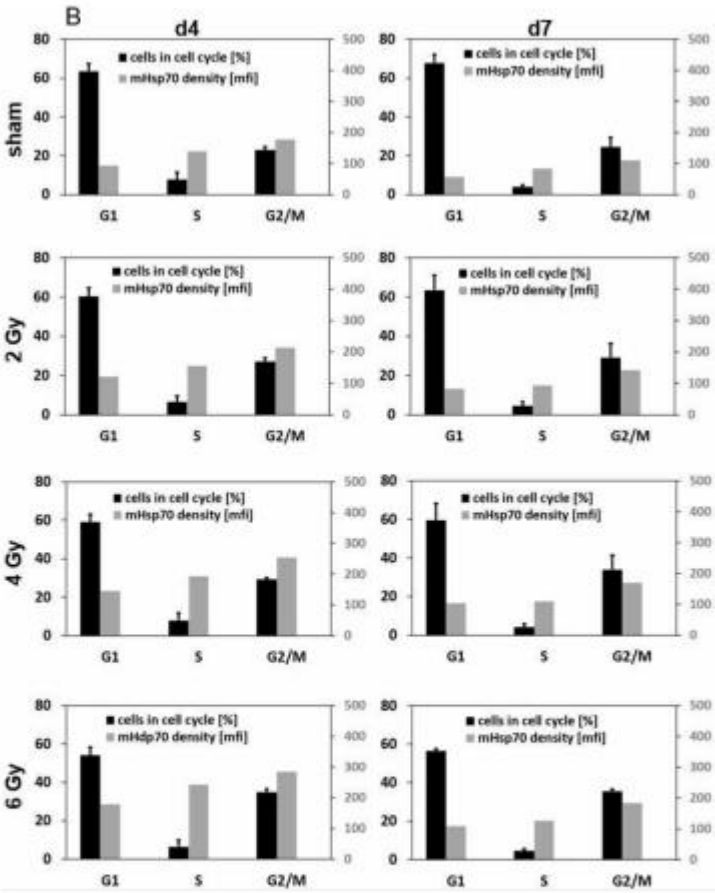


Figure 5. Cont.

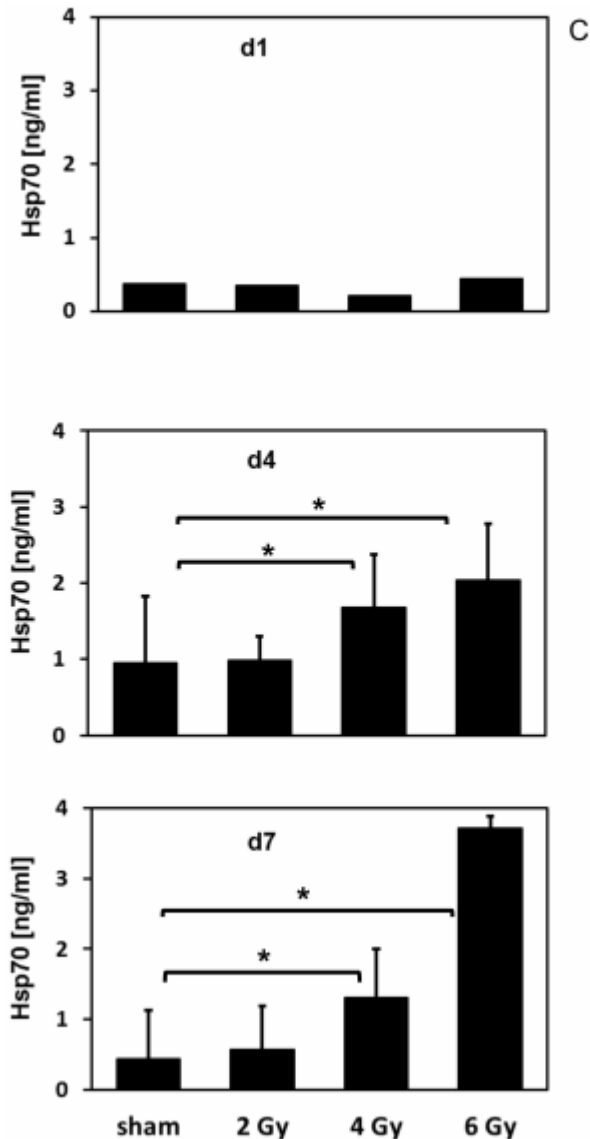


Figure 5. Comparative analysis of the cell cycle (G0, S, G2/M) in U87 cells after sham (0 Gy), 2, 4 and 6 Gy irradiation on days 4 and 7: \*  $p \leq 0.05$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$  (A). For comparison of different cell cycle phases

ANOVA has been used. Differences in the G2/M phase were analyzed by pairwise *t*-tests with pooled SD and Bonferroni correction for multiple testing. Comparative analysis of the mHsp70 expression in the different cell cycle phases (G0, S, G2/M) in U87 cells on days 4 and 7 after sham (0 Gy), 2, 4 and 6 Gy irradiation (B). Comparative analysis of extracellular Hsp70 concentrations in the supernatant of U87 cells on days 1, 4 and 7 after sham (0 Gy), 2, 4 and 6 Gy irradiation (C). The data were normalized to a defined number of  $1 \times 10^6$  cells viable cells. Data represent the mean values and the corresponding standard deviation (SD) of  $n = 3$  independent experiments. Significance (sham vs. all different irradiation doses): \*  $p \leq 0.05$ . For comparisons of extracellular Hsp70 levels, pairwise *t*-tests with pooled SD and Bonferroni correction were performed.

### 3.6. Increased mHsp70 Expression Density Is Associated with an Increased Sensitivity to Lysis Mediated by TKD/IL-2-Activated NK Cells

The density of mHsp70 expression plays a crucial role in the recognition of tumor cells by Hsp70-peptide TKD/IL-2-activated NK cells, but not by cytotoxic CD8-positive T lymphocytes, as previously demonstrated [15]. Therefore, the cytolytic activity of Hsp70-targeting NK cells against sham (0 Gy) and irradiated (4 Gy) tumor cells was tested. The increase in the mHsp70 density of tumor cells on day 4 after irradiation that were used in the cytotoxicity assay is illustrated in Figure 6A. The lysis of irradiated (4 Gy) tumor cells by TKD/IL-2-activated NK cells is significantly higher than that of sham (0 Gy) irradiated cells at E:T ratios ranging from 50:1 to 3:1 (Figure 6B;  $F(1,4) = 8.11$ ,  $p = 0.00004$ ).

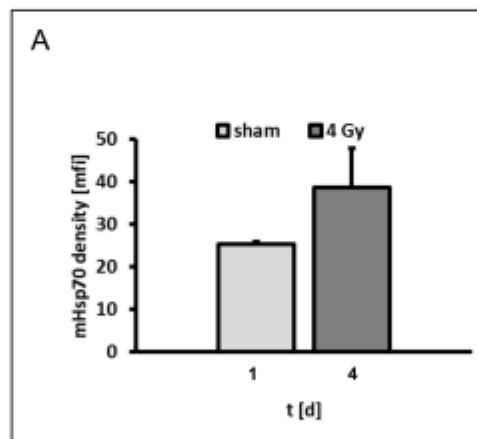
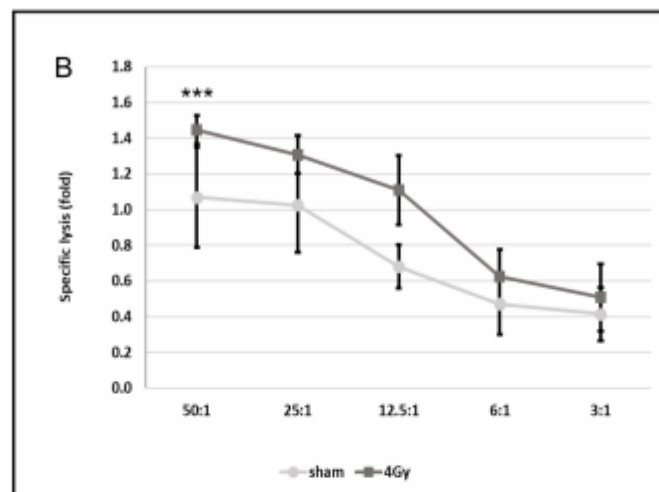


Figure 6. Cont.



**Figure 6.** Comparative analysis of the cytolytic activity of TKD/IL-2-activated natural killer (NK) cells targeting mHsp70-positive tumor cells. Sham (0 Gy) and 4 Gy irradiated tumor cells on day 4 were used as target cells. (A) mHsp70 mean fluorescence intensity (mfi) on sham (0 Gy) and 4 Gy irradiated tumor target cells. The results represent mean values and the corresponding standard deviation (SD) of  $n = 2$  independent experiments. The Welch two sample *t*-test was used. (B) Lytic activity of NK cells against sham (0 Gy) and 4 Gy irradiated tumor target cells. The effector to target (E:T) ratios range from 50:1 to 3:1. The results represent mean values and the corresponding standard deviation (SD) of  $n = 2$  independent experiments in triplicate. Significance (lysis of sham vs. 4 Gy irradiated target cells): \*\*\*  $p \leq 0.001$ . Two-way ANOVA were used to compare lysis at different E:T ratios against tumor cells after different irradiation (sham (0 Gy) vs. 4 Gy).

#### 4. Discussion

Compared to normal cells, highly aggressive tumor cells frequently exhibit higher cytosolic Hsp70 levels, which are further upregulated upon a variety of different environmental stress factors [7]. Intracellularly, Hsp70 ensures correct protein folding and transport [3] and interferes with both intrinsic and extrinsic apoptosis pathways to avoid cell death and thereby foster tumor cell survival [5]. Apart from its cytosolic localization, Hsp70 can be actively released in lipid microvesicles, such as exosomes [13,16–18], and Hsp70 is also expressed on the plasma membrane of tumor cells [19]. While cytosolic Hsp70 is mainly responsible for maintaining protein homeostasis and protection against programmed cell death [3,5], mHsp70 mediates dual functions: on the one hand it stabilizes lysosomal and plasma membranes and thereby also can prevent apoptosis [20,21], on the other hand, it provides a tumor-specific target for NK cells that have been pre-activated with Hsp70 plus low-dose IL-2 [8,15]. The specific membrane localization of Hsp70 on tumor cells can be explained by an interaction of Hsp70 with tumor-specific lipid compounds such as globyltriaosylceramide Gb3 [22]. In vitro lipid copellation assays revealed that recombinant Hsp70 specifically interacts with the tumor-specific lipid raft component globyltriaosylceramid Gb3 [22] or with the non-raft lipid compound phosphatidylserine (PS), which translocates to the outer plasma membrane leaflet upon environmental stress [23]. Since mHsp70 has been found to serve as a target for Hsp70-peptide TKD/IL-2-activated NK cells in vitro [24] and in vivo [25], time- and dose-dependent effects of irradiation with respect to the mHsp70 density on different human tumor cell lines were studied.

The relevance of mHsp70 as a target for C-type lectin receptor CD94-positive NK cells [14] has previously been demonstrated in isogenic tumor cell systems which express differential levels of mHsp70, but identical cytosolic Hsp70 levels, and by Hsp70 antibody blocking studies [21]. A better understanding of the mHsp70 kinetics following irradiation might help to identify an optimal therapeutic window for combination therapies consisting of ionizing irradiation and Hsp70-targeting NK cell-based immune therapies.

Glioblastoma multiforme (GBM) the most common malignant neoplasia of the brain in adults is associated with a high mortality. Despite multimodal treatment strategies consisting of surgery, radiotherapy and systemic chemotherapy using temozolomide [26], the median survival remains poor (15–18 months) and recurrence rates are high. Its intratumoral heterogeneity, concerning genetic alterations and morphology, as well as the infiltrative growth and diffuse dissemination into the brain parenchyma often limit a successful treatment of GBM. Therefore, there is a high medical need for innovative treatment strategies for GBM. The mHsp70 density as a potential target for NK cells was measured in the highly radiation-resistant human glioblastoma cell line U87 and two other tumor cell lines at different time points after irradiation with doses ranging from 2 to 6 Gy. In a previous study, we demonstrated that a high mHsp70 expression was also found on primary glioblastoma cells without isocitrate-dehydrogenase 1 (IDH-1) mutation, whereas secondary glioblastoma with IDH-1 mutation and low-grade anaplastic gliomas exhibited a lower mHsp70 density. The O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) status appeared to be not associated with the mHsp70 expression [27]. Regarding these results, we hypothesize that the MGMT-negative glioblastoma cell line U87 might serve as a model for highly aggressive, mHsp70-positive primary glioblastomas without IDH-1 mutation.

To maintain cells in the exponential growth phase, tumor cells were seeded at different cell densities, which were adapted to the different culture periods. In sham as well as non-treated tumor cells, the proportion of mHsp70-positive cells remained at nearly 100% with a relatively low density over the whole culture period of 7 days. These findings are in line with previous results obtained with other tumor types such as epithelial tumor cells of the head and neck area [28].

Environmental stress, including irradiation, can cause an up-regulation of the mHsp70 density on tumor cells [10,20]. Herein, we have shown for the first time that the kinetics of the mHsp70 expression is dependent on the irradiation dose, but not on the cytosolic Hsp70 levels. While the maximum mHsp70 expression is reached only on day 5 after an irradiation with 2 Gy, the peak mHsp70 expression is detected already on day 1 after irradiation with 6 Gy. This means that low-dose irradiation might be associated with a later onset of the mHsp70 expression compared to high-dose irradiation. These findings are in accordance to results of Diller et al. [29] who showed that the kinetics of the heat shock protein synthesis are transient and proportional to the applied stress.

Synthesis and expression of Hsp70 is often dependent on dose- and time-dependent factors; therefore, cytoprotective repair mechanisms that depend on the anti-apoptotic molecular chaperone Hsp70 in U87 cells are also related to the applied stress [29]. Our findings indicate that a high, but yet non-lethal, irradiation dose of 6 Gy induces an early onset of the mHsp70 expression after 1 day with a sustained overexpression that persists for 3 days, whereas lower irradiation doses induce a slower up-regulation in U87 cells.

In an effort to define the optimal timing for the application of ex vivo stimulated mHsp70-targeting NK cells [24] after radiotherapy, it is important to determine the maximum density of mHsp70 on tumor cells. In the case of U87 cells, an irradiation dose between 4 and 6 Gy might be optimal to achieve a fast and long-lasting upregulation of the mHsp70 expression in vitro. However, future preclinical studies using fractionated irradiation protocols are needed to define the optimal irradiation dose that is suitable for an in vivo application of mHsp70-targeting immune cell-based therapies. Interestingly, in highly radiation-resistant U87 cells [29], none of the applied radiation doses caused an upregulation in intracellular Hsp70 levels. This finding might suggest that anti-apoptotic pathways that are predominantly regulated by cytosolic Hsp70 might not be initiated in U87 cells up to a radiation dose of 6 Gy. Furthermore, these data indicate that the radiation-induced translocation of Hsp70



from the cytosol to the plasma membrane is not dependent on *de novo* Hsp70 synthesis. An ER–Golgi pathway could also be ruled out for the translocation of Hsp70 from the cytosol to the plasma membrane, since inhibitors of classical protein transport pathways like monensin, brefeldin A, tunicamycin and thapsigargin neither affected mHsp70 expression nor exosomal release [30]. It is more likely that non-classical vesicular transport pathways [29] that appear to be inducible by non-lethal irradiation might enable mHsp70 translocation and release, since we observed an increase in extracellular Hsp70 on days 4 and 7 after irradiation with 4 and 6 Gy. Moreover, a radiation-induced cell cycle arrest appeared to be not associated with mHsp70 transport.

There is strong evidence that lethal stress which drastically harms tumor cell survival cannot be compensated by cytoprotective repair mechanisms that include the cytosolic overexpression of Hsp70 [31,32]. After lethal stress, Hsp70 can be externalized by dying tumor cells as a danger-associated molecular pattern (DAMP) with the capacity to initiate anti-tumor immune responses [1,2,33]. Hsp70-chaperoned tumor peptides can induce CD8-positive T cell mediated immune responses after cross-presentation of immunogenic tumor antigens on MHC class I molecules [34], whereas peptide-free Hsp70 in the context of pro-inflammatory cytokines, such as IL-2, can augment the cytolytic and migratory capacity of NK cells that recognize and kill remaining therapy-resistant mHsp70-positive tumor cells [16,21]. Herein, we could show that upon sub-lethal irradiation with 4 and 6 Gy, extracellular Hsp70 concentrations started to increase on days 4 and 7. As to whether elevated extracellular Hsp70 levels are able to further stimulate NK cell mediated immunity *in vivo* remains to be determined in preclinical models.

In summary, the applied radiation dose- and time-kinetics play a critical role in optimizing radiation-induced effects by increasing the density of mHsp70 expression on the surface of surviving residual tumor cells as a target for immune cells. Membrane-bound Hsp70 plays a crucial role in stimulating the innate and adaptive immune system as it is selectively expressed on the cell surface of tumor, but not normal cells [35], and therefore serves as a tumor-specific recognition structure [13]. We could show that Hsp70-targeting NK cells are capable to specifically recognize and kill tumor cells presenting Hsp70 on their plasma membrane most likely via granzyme B mediated apoptosis [36].

## 5. Conclusions

In contrast to intracellular Hsp70, extracellular and mHsp70 play key roles in stimulating both adaptive and innate immune responses and thereby might provide protective anti-tumor immunity [8]. By its exclusive expression on the surface of tumor cells, but not normal cells [9], mHsp70 serves as a tumor-specific target for activated NK cells [10]. In this study we present evidence that the radiation dose plays a pivotal role on the kinetics of the mHsp70 density of human glioblastoma cells. Low-dose irradiation is associated with a later onset of the mHsp70 expression compared to higher irradiation doses. Therefore, hypofractionated irradiation schemes with higher doses might be beneficial for generating an extended therapeutic window for mHsp70-targeting immunotherapies.

**Author Contributions:** Conceptualization, writing reviewing editing, funding acquisition, supervision G.M., Funding acquisition, S.S., methodology, software, data validation B.H., writing original draft, H.F., data acquisition and analyses H.F., S.S., A.H.S., M.S. (Melissa Schwab), T.D.G. M.P., C.W., M.S. (Maxim Shevtsov). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG (SFB824/3, INST 411/36FUGG, INST 95/980-1FUGG, STA1520/1-1), BMBF (01GU823, 02NUK038A), BMWi (ZF4320102CS7, ZF4320104A)8), DKTK and Russian Foundation for Basic Research (19-08-0024).

**Acknowledgments:** We thank Anett Lange for excellent editorial assistance.

**Conflicts of Interest:** Gabriele Multhoff declares a conflict of interest with respect to multimmune GmbH. The company did not have a role in the results or the interpretation of the results but provided the antibody cmHsp70.1. All other authors declare no conflicts of interest.

## References

- Formenti, S.C.; Demaria, S. Combining radiotherapy and cancer immunotherapy: A paradigm shift. *J. Natl. Cancer Inst.* **2013**, *105*, 256–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pasi, F.; Paolini, A.; Nano, R.; Di Liberto, R.; Capelli, E. Effects of single or combined treatments with radiation and chemotherapy on survival and danger signals expression in glioblastoma cell lines. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 453497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Radons, J. The human Hsp70 family of chaperones: Where do we stand? *Cell Stress Chaperones* **2016**, *21*, 379–404. [[PubMed](#)]
- Multhoff, G.; Hightower, L.E. Distinguishing integral and receptor-bound heat shock protein 70 (Hsp70) on the cell surface by Hsp70-specific antibodies. *Cell Stress Chaperones* **2011**, *16*, 251–255. [[CrossRef](#)]
- Beere, H.M.; Wolf, B.B.; Cain, K.; Mosser, D.D.; Mahboubi, A.; Kuwana, T.; Taylor, P.; Morimoto, R.I.; Cohen, G.M.; Green, D.R. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 469–475. [[CrossRef](#)]
- Kumar, S.; Stokes, J., 3rd; Singh, U.P.; Scisum Gunn, K.; Acharya, A.; Manne, U.; Mishra, M. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer Lett.* **2016**, *374*, 156–166. [[CrossRef](#)]
- Craig, E.A. The stress response: Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. *Science* **1985**, *230*, 800–801. [[CrossRef](#)]
- Shevtsov, M.; Multhoff, G. Heat shock protein-peptide and hsp-based immunotherapies for the treatment of cancer. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 171. [[CrossRef](#)]
- Radons, J.; Multhoff, G. Immunostimulatory functions of membrane-bound and exported heat shock protein 70. *Exerc. Immunol. Rev.* **2005**, *11*, 17–33.
- Multhoff, G.; Pockley, A.G.; Schmid, T.E.; Schilling, D. The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. *Cancer Lett.* **2015**, *356*, 179–184. [[CrossRef](#)]
- Kokowski, K.; Stangl, S.; Seier, S.; Hildebrandt, M.; Vaupel, P.; Multhoff, G. Radiochemotherapy combined with NK cell transfer followed by second-line PD-1 inhibition in a patient with NSCLC stage IIIb inducing long-term tumor control: A case study. *Strahlenther. Onkol.* **2019**, *195*, 352–361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schmid, T.E.; Multhoff, G. Radiation-induced stress proteins—The role of heat shock proteins (HSP) in anti-tumor responses. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 1765–1770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Multhoff, G. Heat shock protein 70 (Hsp70): Membrane location, export and immunological relevance. *Methods* **2007**, *43*, 229–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Breuninger, S.; Ertl, J.; Knappe, C.; Gunther, S.; Regel, I.; Rödel, F.; Gaip, U.S.; Thorsteinsdottir, J.; Giannitrapani, L.; Dickinson, A.M.; et al. Quantitative analysis of liposomal Hsp70 in the blood of tumor patients using a novel lipHsp70 ELISA. *J. Clin. Cell. Immunol.* **2014**, *5*, 515. [[CrossRef](#)]
- Multhoff, G.; Mizzen, L.; Winchester, C.C.; Milner, C.M.; Wenk, S.; Eissner, G.; Kampinga, H.H.; Laumbacher, B.; Johnson, J. Heat shock protein 70 (Hsp70) stimulates proliferation and cytolytic activity of natural killer cells. *Exp. Hematol.* **1999**, *27*, 1627–1636. [[CrossRef](#)]
- Gastpar, R.; Gehrman, M.; Bausero, M.A.; Asea, A.; Gross, C.; Schroeder, J.A.; Multhoff, G. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5238–5247. [[CrossRef](#)]
- Ireland, H.E.; Leoni, F.; Altaie, O.; Birch, C.S.; Coleman, R.C.; Hunter-Lavin, C.; Williams, J.H. Measuring the secretion of heat shock proteins from cells. *Methods* **2007**, *43*, 176–183. [[CrossRef](#)]
- Vega, V.L.; Rodriguez-Silva, M.; Frey, T.; Gehrman, M.; Diaz, J.C.; Steinem, C.; Multhoff, G.; Arispe, N.; De Maio, A. Hsp70 translocates into the plasma membrane after stress and is released into the extracellular environment in a membrane-associated form that activates macrophages. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 4299–4307. [[CrossRef](#)]
- Hantschel, M.; Pfister, K.; Jordan, A.; Scholz, R.; Andreesen, R.; Schmitz, G.; Schmetzer, H.; Hiddemann, W.; Multhoff, G. Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukaemic patients. *Cell Stress Chaperones* **2000**, *5*, 438–442. [[CrossRef](#)]
- Murakami, N.; Kühnel, A.; Schmid, T.E.; Ilicic, K.; Stangl, S.; Braun, I.S.; Gehrman, M.; Molls, M.; Itami, J.; Multhoff, G. Role of membrane Hsp70 in radiation sensitivity of tumor cells. *Radiat. Oncol.* **2015**, *10*, 149. [[CrossRef](#)]

21. Gehrman, M.; Marienhagen, J.; Eichholtz-Wirth, H.; Fritz, E.; Ellwart, J.; Jaattela, M.; Zilch, T.; Multhoff, G. Dual function of membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70), Bag-4, and Hsp40: Protection against radiation-induced effects and target structure for natural killer cells. *Cell Death Differ.* **2005**, *12*, 38–51. [[CrossRef](#)]
22. Gehrman, M.; Liebisch, G.; Schmitz, G.; Anderson, R.; Steinem, C.; DeMaio, A.; Pockley, A.G.; Multhoff, G. Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PONE* **2008**, *3*, e1925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Schilling, D.; Gehrman, M.; Steinem, C.; De, M.A.; Pockley, A.G.; Abend, M.; Molls, M.; Multhoff, G. Binding of heat shock protein 70 to extracellular phosphatidylserine promotes killing of normoxic and hypoxic tumor cells. *FASEB J.* **2009**, *23*, 2467–2477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Multhoff, G.; Pfister, K.; Gehrman, M.; Hantschel, M.; Gross, C.; Hafner, M.; Hiddemann, W. A 14-mer Hsp70 peptide stimulates natural killer (NK) cell activity. *Cell Stress Chaperones* **2001**, *6*, 337–344. [[CrossRef](#)]
25. Stangl, S.; Wortmann, A.; Guertler, U.; Multhoff, G. Control of metastasized pancreatic carcinomas in scid/beige mice with human IL-2/TKD-activated NK cells. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 6270–6276. [[CrossRef](#)]
26. Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; Van Den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 459–466. [[CrossRef](#)]
27. Thorsteinsdottir, J.; Stangl, S.; Fu, P.; Guo, K.; Albrecht, V.; Eigenbrod, S.; Erl, J.; Gehrman, M.; Tonn, J.-C.; Multhoff, G.; et al. Overexpression of cytosolic, plasma membrane bound and extracellular heat shock protein 70 (Hsp70) in primary glioblastomas. *J. Neurooncol.* **2017**, *135*, 443–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Kleinjung, T.; Arndt, O.; Feldmann, H.J.; Bockmühl, U.; Gehrman, M.; Zilch, T.; Pfister, K.; Schönberger, J.; Marienhagen, J.; Elles, C.; et al. Heat shock protein 70 (Hsp70) membrane expression on head-and-neck cancer biopsy—a target for natural killer (NK) cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2003**, *57*, 820–826. [[CrossRef](#)]
29. Diller, K.R. Stress protein expression kinetics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 403–424. [[CrossRef](#)]
30. Bausero, M.A.; Gastpar, R.; Multhoff, G.; Asea, A. Alternative mechanism by which IFN- $\gamma$  enhances tumor recognition: Active release of Hsp72. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 2900–2912. [[CrossRef](#)]
31. Paolini, A.; Pasi, F.; Facchetti, A.; Mazzini, G.; Corbella, E.; Di Liberto, R.; Nano, R. Cell death forms and Hsp70 expression in U87 cells after ionizing radiation and/or chemotherapy. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 3727–3731. [[PubMed](#)]
32. Rylander, M.N.; Feng, Y.; Bass, J.; Diller, K.R. Thermally induced injury and heat-shock protein expression in cells and tissues. *Ann. N Y Acad. Sci.* **2005**, *1066*, 222–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pockley, A.G.; Henderson, B. Extracellular cell stress (heat shock) proteins-immune responses and disease: An overview. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2018**, *373*, 20160522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Srivastava, P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: Chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 395–425. [[CrossRef](#)]
35. Multhoff, G.; Botzler, C.; Wiesnet, M.; Müller, E.; Meier, T.; Wilmanns, W.; Issels, R.D. A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (Hsp72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int. J. Cancer* **1995**, *61*, 272–279. [[CrossRef](#)]
36. Gross, C.; Koelch, W.; Arispe, N.; DeMaio, A.; Multhoff, G. Cell surface-bound Hsp70 mediates perforin-independent apoptosis by specific binding and uptake of granzyme B. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 41173–41181. [[CrossRef](#)]

