

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Hitzeschockprotein 70 als tumorspezifischer Biomarker in  
menschlichen Kopf-Hals-Xenograftumoren**

Michael Edgar Rudolf Liebhardt

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer\*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr. Gabriele Multhoff

2. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

Die Dissertation wurde am 12.08.2021 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 05.01.2022 angenommen.

*Für meine lieben Eltern.*

*“We shall go on to the end, we shall fight in France, we shall fight on the seas and oceans, we shall fight with growing confidence and growing strength in the air, we shall defend our island, whatever the cost may be, we shall fight on the beaches, we shall fight on the landing grounds, we shall fight in the fields and in the streets, we shall fight in the hills we shall never surrender...”*

*Winston Churchill*

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1 Geschichte der Hitzeschockproteine.....	6
1.2 Hitzeschockprotein 70-Familie.....	6
1.3 Intrazelluläres Hitzeschockprotein 70.....	9
1.4 Extrazelluläres und membrangebundenes Hitzeschockprotein 70.....	12
1.5 Tumornekrose und -hypoxie.....	16
2. Zielsetzung.....	18
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Materialverzeichnis.....	19
3.2 Experimentübersicht.....	20
3.3 Zellkultur.....	22
3.4 Mäuse.....	23
3.5 Ganzkörperbestrahlung.....	23
3.6 Tumortransplantation.....	24
3.6.1 Tumorzelltransplantation.....	25
3.6.2 Tumorgewebetransplantation.....	25
3.7 Ultraschallmessung.....	25
3.8 Tumor- und Beinbestrahlung.....	26
3.9 Tumorexplantation und Plasmagewinnung.....	27
3.10 Histologie.....	27
3.10.1 Mikrotomie.....	28
3.10.2 Färbung.....	28
3.10.2.1 Immunfluoreszenzfärbung.....	28
3.10.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	29
3.10.3 Mikroskopie.....	30
3.10.3.1 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	30

3.10.3.2 Hellfeldmikroskopie .....	31
3.10.4 Bildbearbeitung und -auswertung.....	32
3.11 Enzyme-linked immunosorbent Assay .....	33
3.12 Statistische Analysen .....	34
4. Ergebnisse.....	36
4.1 Tumornekrose/-hypoxie und Tumolvolumen/-bestrahlung.....	36
4.2 Hitzeschockprotein 70 und Tumolvolumen/-bestrahlung.....	39
5. Diskussion .....	44
6. Zusammenfassung .....	47
7. Abkürzungsverzeichnis.....	48
8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	51
9. Literaturverzeichnis.....	53
10. Danksagung .....	65
11. Anhang .....	66
11.1 Publikation .....	66
11.2 Lebenslauf .....	66

## 1. Einleitung

### 1.1 Geschichte der Hitzeschockproteine

Ritossa entdeckte die hitzeabhängige Transkription einiger Gene in *Drosophila melanogaster* (Ritossa 1962, 1996). Diese Transkription konnte auch durch Infektion, Nahrungsmangel, Strahlung und Toxine ausgelöst werden (Ashburner 1970). Schließlich wurden die korrespondierenden Proteine (insbesondere ein 70 kDa Protein), die man „Hitzeschock-“ oder „Zellstressproteine“ nannte, identifiziert (Mirault et al. 1977; Moran et al. 1978; Tissières et al. 1974). Diese Proteine waren nicht nur in *Drosophila melanogaster*, sondern auch in weiteren Lebewesen vorhanden (Johnston et al. 1980; Key et al. 1981; Tilly et al. 1983). Es bestand eine Homologie der Hitzeschockproteine in den verschiedenen Spezies (Bardwell und Craig 1984). Man konnte feststellen, dass die Aufgabe der Hitzeschockproteine darin bestand stressbedingt denaturierte Proteine zu entfalten (Ananthan, Goldberg und Voellmy 1986; Hemmingsen et al. 1988; Hightower 1980; Pelham 1984). In diesem Zusammenhang entstand der Begriff der „Chaperone“. Zudem stellte sich heraus, dass Hitzeschockproteine auch stressunabhängig Proteine entfalten und weitere Aufgaben wie Proteintransport zwischen Zellorganellen, Stabilisierung von Zellorganellen und Kontrolle regulatorischer Proteine besitzen (Bukau, Weissman und Horwich 2006; Hartl 1996; Jäättelä 1999; Lindquist und Craig 1988). Daher wurde der Begriff des „Housekeeping“ geprägt. In der Folge konnte man Hitzeschockproteine auch im Extrazellulärraum (Hightower und Guidon 1989; Pockley et al. 1999; Pockley, Shepherd und Corton 1998) und der Zellmembran finden (Multhoff et al. 1995; Multhoff und Hightower 1996) und es verdeutlichte sich, dass sie eine enorme Bedeutung für Physiologie und Pathologie besitzen (Ciocca und Calderwood 2005; Pockley, Henderson und Multhoff 2014; Qu et al. 2015).

### 1.2 Hitzeschockprotein 70-Familie

Durch die fortlaufende Entdeckung neuer Hitzeschockproteine wurde eine einheitliche Nomenklatur und Einteilung notwendig. Dies erfolgte zunächst für die Hsp70 (Hitzeschockprotein 70)-Familie (Tavaria et al. 1996). Schließlich wurden auch die

## 1. Einleitung

anderen 5 Hitzeschockproteinfamilien integriert, so dass derzeit folgende Nomenklatur und Einteilung gilt: Hsp110 (HSPH (Hitzeschockprotein H), 4 Mitglieder), Hsp90 (HSPC, 5), Hsp70 (HSPA, 13), Hsp40 (DNAJ), ca. 40), kleine Hsp (HSPB, 11), Hsp60/10 (HSPD/E, 2) und CCT (Chaperonin Containing Tailless Complex Polypeptide, 9) (Kampinga et al. 2009). Die 13 Proteine der Hsp70-Familie entstammen einem Multigenkomplex, welcher 17 Gene und 30 Pseudogene umfasst (Brocchieri et al. 2008). Die Hsp70-Familie ist in allen Lebewesen vorhanden, umfasst die meistkonservierten Proteine der Evolution und wird daher für Verwandtschaftsanalysen benutzt (Gupta und Singh 1994; Hunt und Morimoto 1985). Die Hsp70-Familie existierte in ähnlicher Form bereits in der Urzelle „LUCA“ (Last Universal Common Ancestor, (Glansdorff 2000)). Die Gliederung der humanen Hsp70-Familie zeigt Tab. 1.

Gen-name	Protein-name	alte Namen	Lokalisation	Chromosom	Homologie HSPA1A (% As)	Stressinduzierbarkeit	Gewebeexpression
<i>HSPA1A</i>	HSPA1A	Hsp70-1, Hsp 70-1a, Hsp72	Zy, Nu, Zm, Ex	6	100	ja	ubiquitär
<i>HSPA1B</i>	HSPA1B	Hsp70-1, Hsp70-1b, Hsp70-2	Zy, Nu, Ex	6	99	ja	ubiquitär
<i>HSPA1L</i>	HSPA1L	Hsp70-1L, Hum70t	Zy, Nu	6	91	nein	Hoden
<i>HSPA2</i>	HSPA2	Hsp70.2	Zy, Nu, Zm, Ex	14	84	nein	Gehirn, Hoden
<i>HSPA5</i>	HSPA5	Hsp70-5, Bip, Grp78	ER, Ex	9	64	nein	ubiquitär
<i>HSPA6</i>	HSPA6	Hsp70-6, Hsp70B'	Zy, Ex	1	85	ja	Blutzellen
<i>HSPA7</i>	HSPA7	Hsp70-7, Hsp70B	Ex	1	gering	nein	?
<i>HSPA8</i>	HSPA8	Hsp70-8, Hsc70, Hsp71, Hsp73	Zy, Nu, Zm, Ex	1	86	nein	ubiquitär
<i>HSPA9</i>	HSPA9	Hsp70-9, Mot, Grp75, MtHsp70	Mi, Nu	5	52	nein	ubiquitär
<i>HSPA12A</i>	HSPA12A	Hsp70-12A	Zy, Ex	10	gering	nein	Gehirn, Muskel, Niere
<i>HSPA12B</i>	HSPA12B	Hsp70-12B	Zy, Ex	20	gering	nein	Herz, Leber, Muskel
<i>HSPA13</i>	HSPA13	Hsp70-13	ER, Ex, Mi	21	gering	nein	ubiquitär
<i>HSPA14</i>	HSPA14	Hsp70-14	Zy, Zm	10	gering	ja	dendritische Zellen

Tab. 1: Gliederung der humanen Hsp70-Familie. As=Aminosäuresequenz, Bip=Binding Immunoglobulin Protein, ER=endoplasmatisches Retikulum, Ex=Exosomen, Grp=Glucose-related Protein, Hsc= Heat Shock Cognate, Hum=Human, Mi=Mikrosomen, Mot=Mortalin, Mt=Mitochondrial, Nu=Nucleus, Zm=Zellmembran, Zy=Zytosol (geändert nach Radons 2016).

Aus Tab. 1. ist folgendes zu entnehmen bzw. zu ergänzen: Die Vertreter der Hsp70-Familie unterscheiden sich im Wesentlichen bezüglich Lokalisation, Aminosäuresequenz, Stressinduzierbarkeit und Gewebeexpression. HSPA1A und HSPA1B sind die mit Abstand bekanntesten und meistuntersuchten Proteine der Familie und werden in den folgenden Kapiteln ausführlich besprochen. HSPA1L und HSPA2 spielen nur im Gehirn und Hoden eine Rolle (Daugaard et al. 2007). HSPA5 ist der Housekeeper des endoplasmatischen Retikulums (Munro and Pelham 1986), welches es mit einer Lokalisationssequenz erreicht und dort mit einer Retentionssequenz verbleibt (Munro and Pelham 1987). HSPA6 wird nur in Blutzellen stressinduzierbar exprimiert (Leung et al. 1990). HSPA7 galt lange als Pseudogen mit hoher Homologie zu HSPA6 (Leung et al. 1992; Parsian et al. 2000), neue Untersuchungen deuten jedoch auf ein echtes Gen hin (Brocchieri et al. 2008). HSPA8 stellt den zytosolischen Housekeeper dar (Dwornczak und Mirault 1987). Selbige Aufgabe wird im Mitochondrium durch HSPA9 übernommen, wobei dieses Kompartiment ähnlich wie bei HSPA5 durch eine Lokalisationssequenz betreten wird (Mizzen et al. 1989). HSPA12A, HSPA12B, HSPA13 und HSPA14 gelten als neuere und noch weitgehend unbekannte Mitglieder der Familie, wobei HSP12A und HSP12B eine atypische ATPase-Domäne (Adenosintriphosphat) besitzen (Han et al. 2003). Im Gegensatz dazu zeigen die anderen Hitzeschockproteine im Wesentlichen folgenden Aufbau: N-terminale Nukleotidbindedomäne (ATPase, konserviert), Mittelregion, Substratbindedomäne (konserviert), C-terminale Region mit EEVD (E=Glutamat, V=Valin, D=Aspartat)-Motiv (variabel) zur Bindung von weiteren Hitzeschockproteinen und Cochaperonen (Bukau, Weissman und Horwich 2006; Hartl 1996) (Abb. 1).



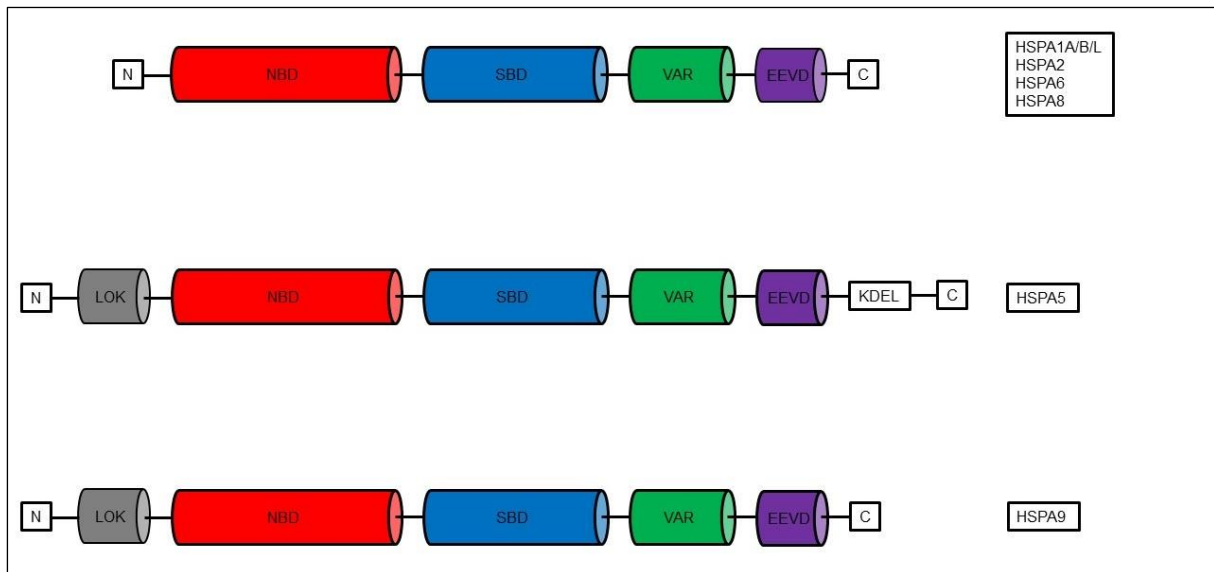


Abb. 1: Struktur der Hitzeschockprotein 70-Familie. EEVD=EEVD (E=Glutamat, V=Valin, D=Aspartat)-Motiv, HSP=Hitzeschockprotein, KDEL=KDEL (K=Lysin, D=Aspartat, E=Glutamat, L=Leucin)-Retentionssequenz des ER, LOK=Lokalisationssequenz des ER, NBD=Nukleotidbindedomäne, SBD=Substratbindedomäne, VAR=variable Region (geändert nach Daugaard et al. 2007).

### 1.3 Intrazelluläres Hitzeschockprotein 70

HSPA1A (Hsp70-1a) und HSPA1B (Hsp70-1b) sind die wichtigsten stressinduzierbaren Proteine der Hsp70-Familie, unterscheiden sich nur durch 2 Aminosäuren (damit gegenseitig austauschbar und unter Hsp70-1 zusammengefasst) und ihre Genloci sind direkt benachbart auf Chromosom 6 anzutreffen (Milner und Campbell 1990; Wu, Hunt und Morimoto 1985). Im Folgenden werden beide Proteine unter Hsp70 zusammengefasst. Die Expression von Hsp70 erfolgt in allen Geweben und übersteigt dort die der anderen Proteine der Hsp70-Familie deutlich, wobei das Protein im Zytosol und Nucleus anzutreffen ist (Daugaard et al. 2007). Es folgt dem klassischen Aufbau der Hsp70-Familie und besteht aus einer 44 kDa Nukleotidbindedomäne und einer 28 kDa Substratbindedomäne (Flaherty, DeLuca-Flaherty und McKay 1990; Zhu et al. 1996). Zellen mit Hsp70-Knockout sind lebensfähig, aber sehr stressanfällig (Daugaard et al. 2007)

Die Hauptaufgabe von intrazellulärem Hsp70 ist die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase (Proteostase) durch Verhinderung der Aggregation (Proteotoxizität) von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen (Bukau, Weissman und Horwich 2006; Hartl 1996; Jäättelä 1999). Dies erreicht Hsp70 durch seine Proteinentfaltungsfähigkeit („Unfoldase“) (Sharma et al. 2010). Hsp70 übernimmt

zudem weitere bereits unter 1.1.1 aufgeführte Aufgaben. Die Entfaltung von nicht korrekt gefalteten Proteinen gelingt in einem ATP-abhängigen Chaperonzyklus mit Hilfe von Cochaperonen (Bukau, Weissman und Horwich 2006; Hartl 1996; Radons 2016): Die Cochaperone Hsp40 und Hip (Hsp70-interacting Protein) bringen ein entsprechendes Substrat zu Hsp70, welches ATP gebunden hat. Es kommt zur substratinduzierten ATP-Hydrolyse, die eine Konformationsänderung von Hsp70 bewirkt. Dadurch wird das Protein entfaltet. Die Entfaltung kann durch das Cochaperon CHIP (Carboxy Terminus of Hsp70-interacting Protein) blockiert und damit eine Degradation des Proteins eingeleitet werden. Über das Cochaperon Hop (Hsp70/Hsp90-organizing Protein) kann das entfaltete Protein an Hsp90 („Holdase“) weitergeleitet werden. Nukleotidaustauschfaktoren wie BAG-1 (Bcl2 Associated Athanogene) und HspB1 (Heat shock Protein Family B Member 1) tauschen ADP (Adenosindiphosphat) gegen ATP aus, so dass es erneut zu einer Konformationsänderung von Hsp70 kommt. Das dadurch freigesetzte entfaltete Protein kann nun gefaltet oder erneut an Hsp70 gebunden werden.

Unter stressfreien Bedingungen wird Hsp70 nur gering und Zellzyklus abhängig über Bindestellen für klassische Transkriptionsfaktoren exprimiert (Greene et al. 1987; Milarski und Morimoto 1986). Unter Stress erfolgt die massive Synthesesteigerung im Rahmen eines evolutionär konservierten Abwehrmechanismus, der „Heat Shock Response“, welche in erster Linie ein transkriptionssteuernder Mechanismus ist, so dass posttranskriptionelle oder -translationale Regulationen fast keine Rolle spielen (Craig 1985; Lindquist 1986; Morimoto 2011; Shamovsky und Nudler 2008). Entscheidende Transkriptionsfaktoren sind die „Heat Shock Factors“ (HSF), insbesondere HSF-1 (Åkerfelt, Morimoto und Sistonen 2010; Fujimoto und Nakai 2010; Pirkkala, Nykänen und Sistonen 2001). Normalerweise liegt HSF-1 als Monomer gebunden an Hsp90 im Zytosol vor, durch Stress löst sich Hsp90, HSF-1 bildet Homotrimere und wandert in den Nucleus (Åkerfelt, Morimoto und Sistonen 2010; Zou et al. 1998). HSF-1 bindet schließlich an spezielle Stellen, die „Heat Shock Elements“, der DNA oberhalb des Hsp70-Promotors (Anckar und Sistonen 2007; Milner und Campbell 1990). Die Regulation von HSF-1 selbst erfolgt überwiegend auf Level der Aktivierung (Anckar and Sistonen 2011). In Tumorzellen ist zum einen die Synthese von Hsp70 ohne HSF-1 über STAT1/3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 1/3), NF-IL6 (Nuclear Factor Interleukin 6) oder C/EBP (CCAAT/enhancer Binding Protein) möglich, zum anderen kann dort HSF-1 direkt

durch mTORC (Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) oder Sirtuin-1 aktiviert werden (Chou et al. 2012; Westerheide et al. 2009). HSF-1 ist in der Lage ein Hitzeschock unabhängiges tumorigenes Transkriptionsprogramm in Gang zu setzen (Mendillo et al. 2012). Dabei kann nicht nur die Tumorzelle selbst, sondern auch das Tumorstroma maßgeblich beeinflusst werden (Scherz-Shouval et al. 2014).

An verschiedenen Stellen ist Hsp70-1 antiapoptotisch wirksam: Es blockiert die mitochondriale Translokation von Bax (Stankiewicz et al. 2005), inhibiert den Zusammenbau des DISC (Death-inducing Signaling Complex) (Guo et al. 2005), verhindert die Anlagerung von Procaspase 9 an das Apaf-1-Apoptosom (Apoptotic Protease Activating Factor 1) (Beere et al. 2000) und antagonisiert AIF (Apoptosis-inducing Factor) (Ravagnan et al. 2001). Hsp70 kann zudem Caspase 3 sowie die proliferationsfördernden Kinasen JNK (c-Jun N-terminal Kinase), MAPK (Mitogen-activated Protein Kinase) und ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) regulieren (Gabai et al. 1997; Lee, Lee und Seo 2005) und den Abbau von ASK-1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) über Proteasomen fördern (Gao et al. 2010). Entscheidend ist auch die Stabilisierung der lysosomalen Membran (Gyrd-Hansen, Nylandsted und Jäättelä 2004; Nylandsted et al. 2004). Hsp70 ist nicht nur in der Lage Apoptose zu unterdrücken, sondern kann auch Seneszenz verhindern (Yaglom, Gabai und Sherman 2007). Zudem greift es über MMP-2/9 (Matrixmetalloproteinase-2/9) in die Transition von Epithel zu Mesenchym ein (Lee et al. 2006). Die zentrale Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer Of Activated B-Cells) und HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ ) sowie der Zellzyklusregulator p21 werden durch Hsp70-1 beeinflusst (Colvin et al. 2014). Hsp70-1 unterstützt auch DNA-Reperatur (Kotoglou et al. 2009). Die Aufgaben von Hsp70 in malignen Tumoren (ohne Chaperonfunktion) gibt Abb. 2 wieder.

Es ist bereits an intrazellulärem Hsp70 zu erkennen, dass es sich um ein „Moonlighting Protein“ mit diversen Funktionen handelt (Campbell und Scanes 1995; Jeffery 2018).

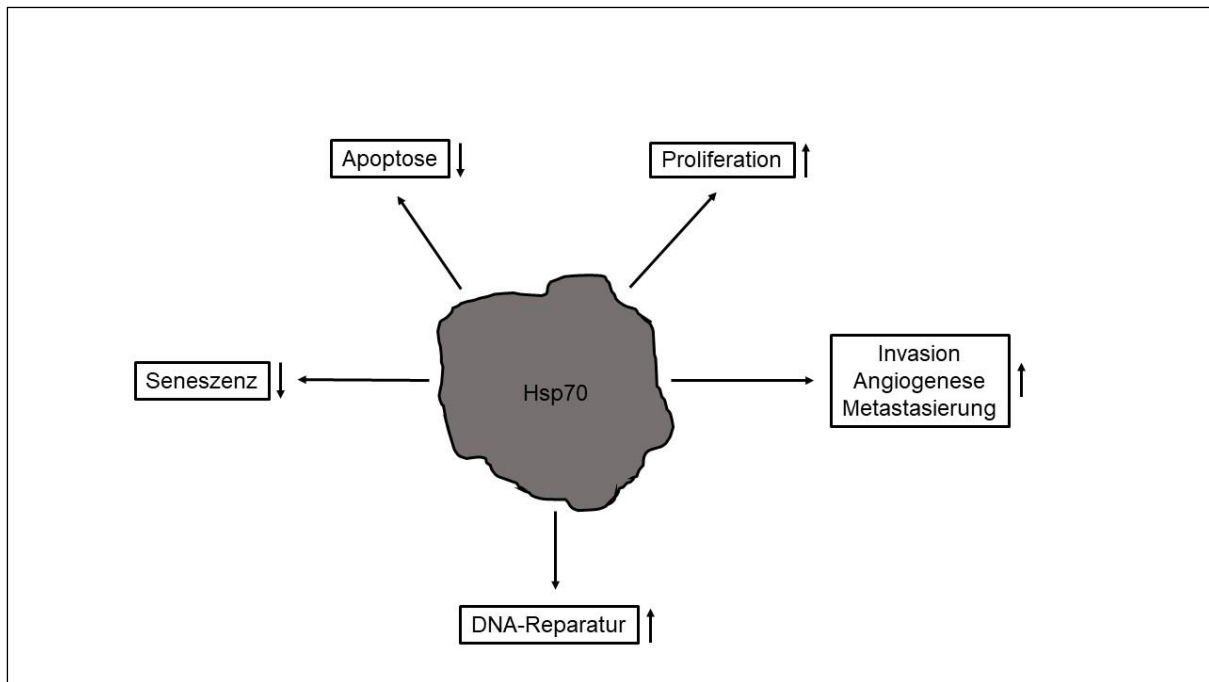


Abb. 2: Aufgaben von Hsp70 in malignen Tumoren (ohne Chaperonfunktion).

### 1.4 Extrazelluläres und membrangebundenes Hitzeschockprotein 70

Hsp70 wurde 1986 erstmalig extrazellulär an Tintenfischgliazellen festgestellt (Tytell, Greenberg und Lasek 1986). Weitere Mitglieder der Hsp70-Familie konnten kurz darauf an Rattenembryonenzellen detektiert werden, wobei die Freisetzung aktiv und nicht über den klassischen sekretorischen Weg erfolgt (Hightower und Guidon 1989). Im Verlauf wurde Hsp70 im Blut gesunder menschlicher Individuen nachgewiesen (Pockley, Shepherd und Corton 1998). Inzwischen ist das extrazelluläre Vorkommen der Hsp70-Familie im Blut sowohl bei Gesunden als auch bei Kranken gut bekannt (Pockley, Henderson und Multhoff 2014). Da Hsp70 eine Sequenz für den klassischen Sekretionsweg fehlt, bleibt der Mechanismus der Freisetzung aus der Zelle kontrovers diskutiert. Die Freisetzung kann über Exosomen (Bausero et al. 2005; Gastpar et al. 2005; Lancaster und Febbraio 2005), Lysosomen (Gyrd-Hansen, Nylandsted und Jäättelä 2004; Mambula und Calderwood 2006), cholesterinreiche Mikrodomänen (Broquet et al. 2003), sekretory-like Granula (Evdonin et al. 2006), Ubiquitin abhängigen Transport (Evdonin et al. 2004) oder passiv bei Nekrose (Basu et al. 2000) erfolgen. Eine nicht-klassische Sekretion ist auch bei wichtigen anderen extrazellulären Proteinen wie FGF-1/2 (Fibroblast Growth Factor-1/2) und IL-1 (Interleukin-1) bekannt (Chimini und Rubartelli 2005). Extrazellulär liegt Hsp70 als

freies Protein oder assoziiert mit antigenen Peptiden bzw. Exosomen vor (Bausero et al. 2005; Gastpar et al. 2005; Lancaster und Febbraio 2005; Vega et al. 2008).

Erhöhte (+) oder erniedrigte (-) Hsp70 Werte im Blut zeigen sich bei einer Vielzahl von physiologischen Vorgängen und Krankheiten: Alter (-), Sport (+), Schwangerschaft (-), Adipositas (+), Asthma (+), Carotisstenose und pAVK (+), COPD (+), Diabetes mellitus (+), Hepatitis (+), KHK (-), Infektion und Sepsis (+), Niereninsuffizienz (+), OP/Trauma (+), Präeklampsie (+) (Pockley et al. 2014; Qu et al. 2015).

Extrazelluläres Hsp70 erfüllt im Immunsystem eine duale immunoregulatorische Rolle, da es sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken kann. Dabei ist Hsp70 an der Kreuzpräsentation von immunogenen Peptiden über den MHC (Major Histocompatibility Complex) beteiligt, interagiert wie ein Zytokin mit Immunzellen („Chaperokin“) und dient als Zielstruktur von NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) (Arnold-Schild et al. 1999; Asea et al. 2000; Henderson und Pockley 2010; Multhoff und Radons 2012; Pockley, Muthana und Calderwood 2008) (Abb. 3). Die Vermutung, dass die proinflammatorische Rolle durch bakterielle Endotoxinkontamination hervorgerufen wird (Gao und Tsan 2003), ist mittlerweile widerlegt (Henderson et al. 2010). Seine beiden unterschiedlichen Wirkungen entfaltet Hsp70 durch Bindung an dendritische Zellen, Makrophagen und Monozyten, wobei hier viele Mechanismen noch unverstanden sind (Calderwood, Gong und Murshid 2016). Hsp70 benutzt für die Interaktion mit oben genannten Immunzellen folgende Rezeptoren: Scavenger-Rezeptoren (LOX-1 (Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1), SREC-1 (Scavenger Receptor Expressed By Endothelial Cells-I), FEEL-1 (Fasciclin, EGF-like, Laminin-type EGF-like And Link Domain-containing Scavenger Receptor-1), LDL-Rezeptor (Low-density Lipoprotein) (LRP1 (Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1)/CD91 (Cluster Of Differentiation 91)), Siglec-5/14-Rezeptoren (Sialic Acid-binding Immunoglobulin-like Lectin-5/14) und Toll-like-Rezeptoren (TLR-2,4) (Basu et al. 2001; Binder, Vatner und Srivastava 2004; Fong et al. 2015; Thériault, Adachi und Calderwood 2006).

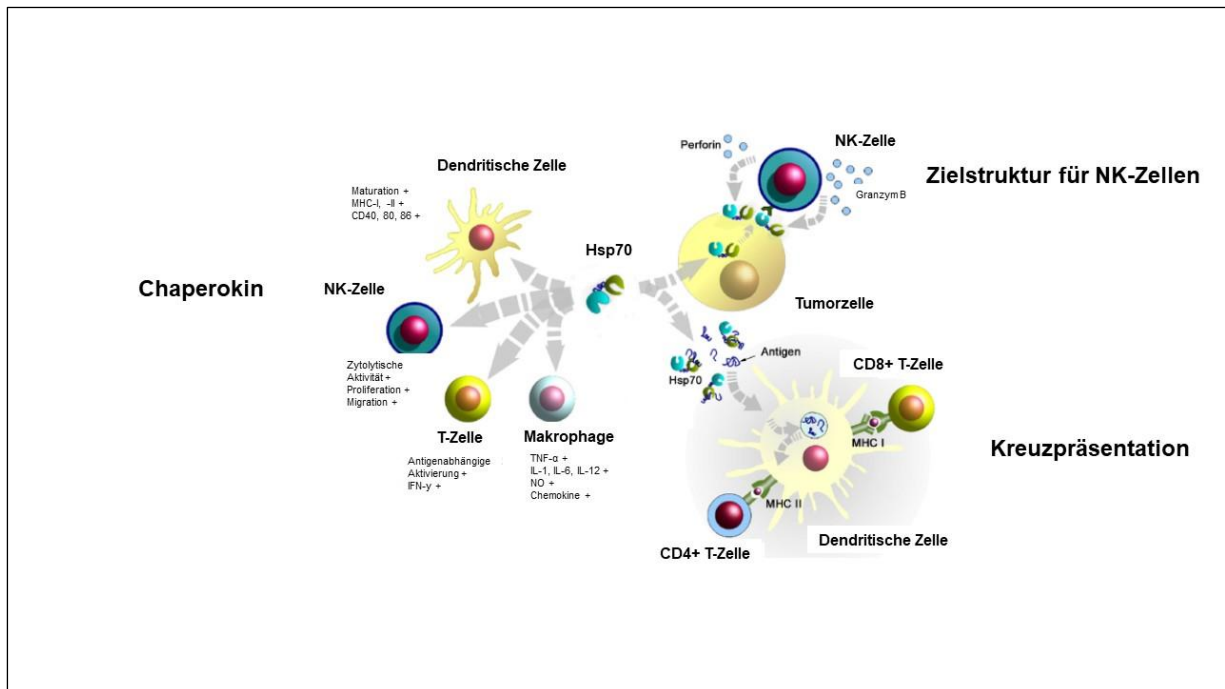


Abb. 3: Immunregulatorische Rolle von Hsp70. CD=Cluster Of Differentiation, Hsp70=Hitzeschockprotein 70, IFN=Interferon, IL=Interleukin, MHC=Major Histocompatibility Complex, NK-Zelle=natürliche Killerzelle, TNF- $\alpha$ =Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , NO=Stickstoffoxid (geändert nach Shevtsov und Multhoff 2016).

Bei malignen Tumoren ist Hsp70 überwiegend überexprimiert, die Expression korreliert mit Proliferation und Aggressivität des Tumors sowie Stadium und Prognose der Erkrankung bei kolorektalem Karzinom, Endometriumkarzinom, hepatozellulärem Karzinom, Lungenkarzinom, Mammakarzinom, Melanom, Mundhöhlenkarzinom, Ovarkarzinom und Prostatakarzinom (Calderwood et al. 2006; Ciocca und Calderwood 2005). Zudem zeigen sich die Blutwerte von Hsp70 bei sehr vielen malignen Tumoren erhöht, so dass Hsp70 ein potentieller Biomarker darstellt (Pockley et al. 2014). Generell ist die aktive Freisetzung von Hsp70 aus lebenden Tumorzellen viel höher als die passive Freisetzung aus nekrotischen Zellen (Mambula et al. 2007). Erhöhte Blutwerte von Hsp70 bestehen bei kolorektalem Karzinom (Kocsis et al. 2010), Leukämie (Yeh et al. 2009, 2010) Lungenkarzinom (Balázs et al. 2017; Gunther et al. 2015; Zimmermann et al. 2012), hepatozellulärem Karzinom (Gehrmann et al. 2014), Pankreaskarzinom (Dutta et al. 2012) und Prostatakarzinom (Abe et al. 2004). Interessanterweise kann man durch die Hsp70-Blutwerte zwischen Pankreaskarzinom (++) und Pankreatitis (+) sowie hepatozellulärem Karzinom (++) und Hepatitis (+) differenzieren (Dutta et al. 2012; Gehrmann et al. 2014).

Hsp70 kann zudem in der Zellmembran vorliegen. Wie bereits bei extrazellulärem Hsp70 erwähnt stellt sich die Frage nach dem Transport in die Membran ohne den klassischen sekretorischen Weg. Membrangebundenes Hsp70 (mHsp70) kommt nur bei Tumorzellen, aber nie bei gesunden Zellen vor (Multhoff et al. 1995; Multhoff und Hightower 1996). Es kann dort nur durch den spezifischen Antikörper cmHsp70.1 detektiert werden (Stangl et al. 2011). Insgesamt sind ca. 50% aller malignen Tumoren membranpositiv, wobei sich zeigt, dass die Metastasen generell höhere mHsp70-Werte besitzen als der Primärtumor (Gehrmann et al. 2002, 2012). Ca. 15-20 % des gesamten Hsp70 der Tumoren liegt als mHsp70 vor, wobei in der Zellmembran eine Assoziation mit Gb3 (Globotriaosylceramid 3) und PS (Phosphatidylserin) besteht (Gehrmann et al. 2008; Vega et al. 2008). Dabei dient mHsp70 auch der Membranstabilisierung (Horváth et al. 2008). Membranpositive Tumoren sind deutlich resistenter gegenüber Strahlen- und Chemotherapie, wobei beide Therapien die Membranpositivität sogar noch erhöhen (Gehrmann et al. 2002; Gehrmann et al. 2008; Schmid und Multhoff 2012). Da mHsp70 als Zielstruktur von NK-Zellen fungiert, ist die Prognose bei manchen membranpositiven dennoch besser als bei membrannegativen Tumoren (Pfister et al. 2007).

In Anbetracht der großen Bedeutung von Hsp70 im Bereich der malignen Tumoren sind vielfältige diagnostische und therapeutische Ansätze erfolgt, diese sind aber noch nicht in regelhafter klinischer Anwendung (Radons 2016). Es liegen mehrere Hsp70-Inhibitoren wie PES (Phenylethylsulfonamid) (Leu et al. 2009); Peptide (ADD70 (AIF-derived Decoy For Hsp70), A8, A17) (Rérole et al. 2011; Schmitt et al. 2003); ATP-Analoga (Ver-155008) (Schlecht et al. 2013); Imidazole (Apoptozol) (Williams et al. 2008); und Spergualinderivate (15-Deoxyspergualin) (Brodsky 1999) vor. Keiner der Inhibitoren hat sich klinisch durchgesetzt (Radons 2016). Selbiges gilt für den Versuch einer Vakzine aus Tumorprotein und Hsp70 (Ciocca et al. 2012). Als weiterer Ansatz wird die Tötung von membranpositiven Tumorzellen über aktivierte NK-Zellen und Granzym B verfolgt (Gehrmann et al. 2005; Gross et al. 2003; Kleinjung et al. 2003; Multhoff et al. 1999, 2001). Eine Phase-I-Studie wurde erfolgreich abgeschlossen, eine Phase-II-Studie ist derzeit laufend (Krause et al. 2004; Specht et al. 2015). Eine antikörpervermittelte Tötung von membranpositiven Tumorzellen ist durch den Antikörper cmHsp70.1 möglich (Stangl et al. 2011). Ein großer Fokus liegt derzeit auf dem Gebiet der magnetischen Nanopartikel (MNP), insbesondere der superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikel (SPION) (Faraji, Yamini und Rezaee

2010; Petri-Fink und Hofmann 2007). SPION können konjugiert mit Hsp70 oder dem Antikörper cmHsp70.1 diagnostisch wie auch therapeutisch („Theranostics“) nach Magnetfeldanwendung gegen maligne Tumoren eingesetzt werden (Deatsch und Evans 2014; Shevtsov et al. 2014; Shevtsov et al. 2015 a; Shevtsov et al. 2015 b). Auch Goldnanopartikel (AuNP) sind in Verbindung mit dem Antikörper cmHsp70.1 zur Tumordetektion in Erprobung (Gehrmann et al. 2015). Künftig könnte auch eine Konjugation mit Chemotherapeutika durchgeführt werden (Cui et al. 2016).

### **1.5 Tumornekrose und -hypoxie**

Tumornekrose und Tumorphypoxie spielen eine große Rolle in der Biologie, Behandlung und Prognose von Tumoren (Vaupel und Mayer 2007).

Als Formen des Zelltods sind zum einen Apoptose und zum anderen Nekrose bekannt. Im Rahmen der Apoptose kommt es nach tödlichem extrinsischem oder intrinsischem Stimulus kontrolliert und programmiert über die Aktivierung von Caspasen zur Fragmentierung der Zelle in apoptotische Körper, die von Immunzellen phagozytiert werden, wobei keine Entzündungsreaktion entsteht. Im Rahmen der Nekrose erfolgt das Sterben der Zelle unkontrolliert, so dass es zur Zellmembranruptur mit folgender Entzündungsreaktion durch Immunzellen kommt (Galluzzi et al. 2018; Kerr, Wyllie und Currie 1972; Zong und Thompson 2006). Inzwischen ist eine kontrolliert und programmiert ablaufende Sonderform der Nekrose, die Nekroptose, entdeckt worden. Die Nekroptose ist abhängig von der Aktivierung von RIPK1/3 (Receptor Interacting Protein Kinase 1/3) und MLKL (Mixed Lineage Kinase Domain-Like Pseudokinase) (Galluzzi und Kroemer 2008; Holler et al. 2000). Bei Tumoren scheint die Nekroptose den Hauptteil der Nekrose auszumachen, wobei sowohl eine tumorfördernde wie auch eine tumorsupprimierende Rolle vorzuliegen scheint (Jiao et al. 2018; Liu und Jiao 2020).

Tumorphypoxie ist eine charakteristische Eigenschaft von ca. 50-60 % der lokal fortgeschrittenen Tumoren und definiert als Tumorareal mit einem  $pO_2$  (Sauerstoffpartialdruck) unter 10 mmHg (Vaupel, Höckel und Mayer 2007; Vaupel, Mayer und Höckel 2004). Es werden eine akute und eine chronische Form unterschieden. Die chronische Tumorphypoxie wurde von Thomlinson und Gray erstbeschrieben. Die Ursache ist eine Limitation der  $O_2$ -Diffusion aus Gefäßen in den Tumor (Thomlinson und Gray 1955). Die akute Tumorphypoxie wurde von Brown



erstbeschrieben und von Chaplin et al. experimentell bestätigt. Der Grund ist die schwankende Perfusion des Tumors (Brown 1979; Chaplin, Durand und Olive 1986). Es besteht ein großer Unterschied zwischen chronischer und akuter Tumorhypoxie hinsichtlich der Ursachen und deren biologischer und klinischer Konsequenzen (Bayer et al. 2011). Inzwischen wurde eine weitere Form der Tumorhypoxie, die fluktuierende Hypoxie ergänzt (Dewhirst 2009). Die Detektion von Tumorhypoxie kann mit unterschiedlichen Techniken wie fMRT (funktionelle Magnetresonanztomographie), Immunfluoreszenz, O<sub>2</sub>-Mikroelektroden, PET (Positronenemissionstomographie) erfolgen (Astner et al. 2010; Maffei et al. 2011 a; Maffei et al. 2011 b; Magat et al. 2010; Vaupel, Höckel und Mayer 2007; Wang et al. 2009). Einerseits führt Tumorhypoxie durch Energiemangel zu reduzierter Proliferation und zum Absterben der meisten Tumorzellen. Andererseits kommt es zu Genom- und Proteomänderungen einer Tumorzellminderheit mit der Folge eines aggressiveren Phänotyps, welcher zu Tumorprogression, Metastasierung und einer schlechten Prognose führt. Diese Doppelrolle ist als Janus-Gesicht der Tumorhypoxie bekannt (Vaupel und Mayer 2007). Zudem führt Tumorhypoxie auch zu reduzierter Wirksamkeit von Chemo-, Radio- und Immuntherapie (Vaupel 2009). Die Genom- und Proteomänderungen werden hypoxieabhängig durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  gesteuert (Semenza 2002).

## 2. Zielsetzung

Zum Zeitpunkt dieser Arbeit bestanden Publikation über erhöhte Blutwerte von Hsp70 bei malignen Tumoren im Tiermodell und am Menschen. Obwohl dieser Nachweis bei verschiedenen Tumorentitäten gelang, konnte eine Korrelation des Blutwertes mit dem Tumolvolumen noch nicht erbracht werden. Diese Korrelation nachzuweisen war das Ziel dieser Arbeit. Um menschliche Tumoren im Mausmodell untersuchen zu können, wurden menschliche Kopf-Hals-Tumoren in immunsupprimierte Mäuse transplantiert (Xenografttumoren). Durch Ultraschallmessungen konnte das Tumolvolumen überwacht werden. Nach Erreichen definierter Größen (in einigen Versuchsgruppen teilweise oder komplett rückläufiges Tumolvolumen nach Bestrahlung) wurden die Tumoren explantiert und Blut gewonnen. Im Blutplasma wurde durch ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Hsp70 bestimmt. Die Tumoren wurden gefroren, geschnitten und immunfluoreszenz- bzw. HE (Hämatoxylin/Eosin)-gefärbt. Mit Immunfluoreszenzmikroskopie und Hellfeldmikroskopie konnten Tumornekrose und Tumorphoxie ermittelt werden. Damit sollte ein Einfluss der beiden Parameter auf Hsp70 im Blutplasma ausgeschlossen werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Materialverzeichnis

<b>Name</b>	<b>Art</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor 594	Antikörper	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Aqueous Mount	Einbettmedium	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Atipamezol	Narkosemittelantagonist	Pfizer, New York, NY, USA
Axiocam MRc 5	Kamera	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Axioskop 2 plus	Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
AxioVision 4.7	Software	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Azeton	Chemikalie	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
BBD6220	Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ciprofloxacin	Antibiotikum	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Crl:NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup>	Mäuse	Charles River, Burlington, MA, USA
Dako Fluorescent	Einbettmedium	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser	Deckgläser	Gehard Menzel, Braunschweig, Deutschland
DMEM	Chemikalie	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMSO	Chemikalie	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DPBS	Chemikalie	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DuoSet IC Human/Mouse/Rat Total HSP70	ELISA-Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Elasto-Gel	Pflaster	Velo Medizinprodukte, Sengenthal, Deutschland
EL808	ELISA-Lesegerät	Bio Tek, Winooski, VT, USA
Eosin	Chemikalie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Chemikalie	Merck, Darmstadt, Deutschland
FaDu	Zellen	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
FCS	Chemikalie	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fentanyl	Narkosemittel	Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland
Flumazenil	Narkosemittelantagonist	Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland
Ketamin	Narkosemittel	Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland

### 3. Material und Methoden

Hämatoxylin	Chemikalie	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Chemikalie	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hoechst 33342	Perfusionsmarker	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isofluran	Narkosemittel	Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA
Loqig 5	Ultraschallgerät	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK
MEC 13.3	Antikörper	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Medetomidin	Narkosemittel	Pfizer, New York, NY, USA
HM 500 O	Mikrotom	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Midazolam	Narkosemittel	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
NaCl	Chemikalie	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Naloxon	Narkosemittelantagonist	Inresa Arzneimittel, Freiburg, Deutschland
NEAA	Chemikalie	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
SuperFrost Ultra Plus	Objekträger	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland
PAD	Chemikalie	AbD Serotec, Oxford, UK
Photoshop Creative Suite 4 Extended	Software	Adobe Systems, San Jose, CA, USA
Pimonidazol	Hypoxiemarker	Hypoxyprobe, Burlington, MA, USA
PowerPoint 2010	Software	Microsoft, Redmond, WA, USA
P/S	Antibiotikum	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RS225A	Bestrahlungsgerät	Gulmay, Byfleet, UK
SPSS 20	Software	IBM, Armonk, NY, USA
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Einbettmedium	Sakura Finetek, Alphen an den Rijn, Niederlande
Trilogy	Bestrahlungsgerät	Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA
Trypsin	Enzym	PAN Biotech, Aidenbach, Germany
T162	Zellkulturflasche	Corning, New York, NY, USA
4.3.11.3	Antikörper	Hypoxyprobe, Burlington, MA, USA

Tab. 2: Materialverzeichnis. Angegeben sind Name, Art und Hersteller der Materialien.

### 3.2. Experimentübersicht

Im Vorversuch (Abb. 4) wurden Crl:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>-Mäuse einer 4 Gy-Ganzkörperbestrahlung unterzogen. Danach konnten FaDu-Tumorzellen

### 3. Material und Methoden

---

transplantiert werden. Diese waren durch eine Zellkultur gewonnen worden. Unter Überwachung der Tumorgroße durch Ultraschallmessungen erreichten die Tumoren ein Volumen von 0,32 cm<sup>3</sup>. Nach der Explantation mussten sie in 1 mm<sup>3</sup>-Tumorstücke zerteilt werden, welche im Hauptversuch verwendet wurden.

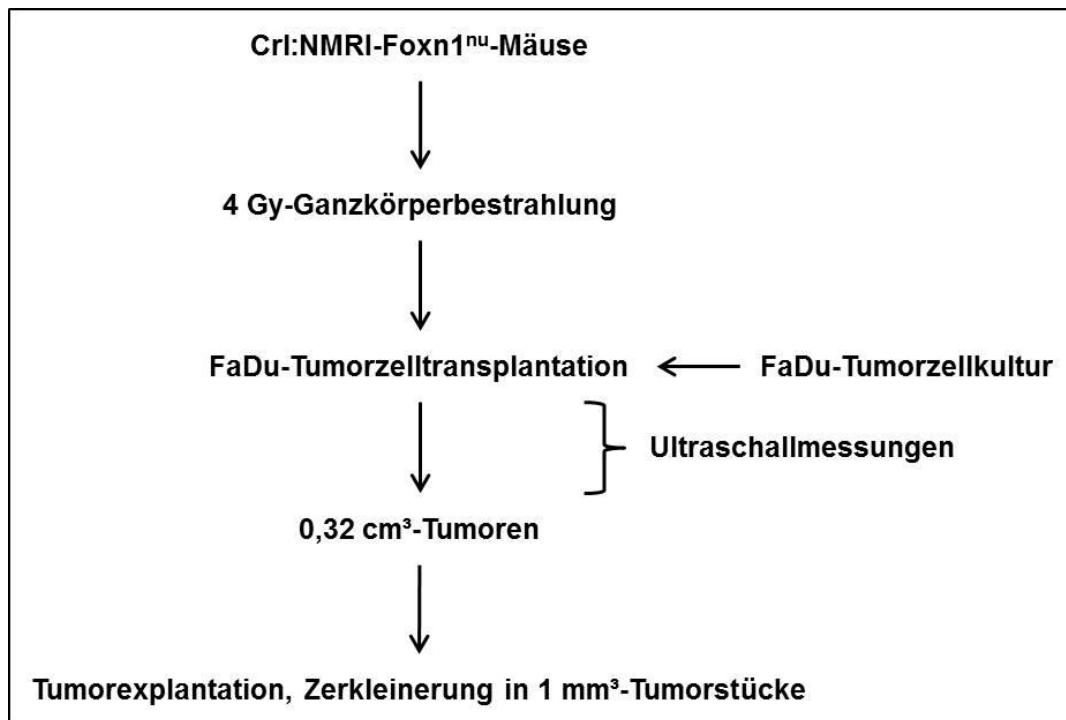


Abb. 4: Struktur des Vorversuchs.

Im Hauptversuch (Abb. 5) wurden CrI:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>-Mäuse ebenfalls einer 4 Gy-Ganzkörperbestrahlung unterzogen. Im Anschluss konnte die Tumorgewebetransplantation mit den aus dem Vorversuch gewonnenen Tumorstücken durchgeführt werden. In Abhängigkeit von der Tumorgroße, welche wieder durch Ultraschallmessungen kontrolliert wurde, entstanden zunächst 5 verschiedene Versuchsgruppen: 0,01 cm<sup>3</sup>-, 0,04 cm<sup>3</sup>-, 0,16 cm<sup>3</sup>-, 0,32 cm<sup>3</sup>- und 0,64 cm<sup>3</sup>-Tumoren. Nach einer 30-Gy-Tumorbestrahlung der 0,32 cm<sup>3</sup>-Tumoren konnten 3 weitere Gruppen gebildet werden: 24 h nach Bestrahlung, ½ Ausgangsvolumen (0,16 cm<sup>3</sup>) und lokale Kontrolle (0 cm<sup>3</sup>). Als Kontrollgruppen dienten Mäuse ohne Ganzkörper-, mit Ganzkörper- und mit Ganzkörper- sowie 30 Gy-Beinbestrahlung. Jede Versuchs- oder Kontrollgruppe bestand aus 4-5 Mäusen. Am Versuchsende wurden vorhandene Tumoren explantiert und durch Immunfluoreszenzfärbung auf Hypoxie untersucht. Dafür war die Bestimmung der Nekrose durch HE-Färbung erforderlich. Zudem konnte Blutplasma gewonnen werden, welches durch ELISA auf Hsp70 analysiert wurde.

### 3. Material und Methoden

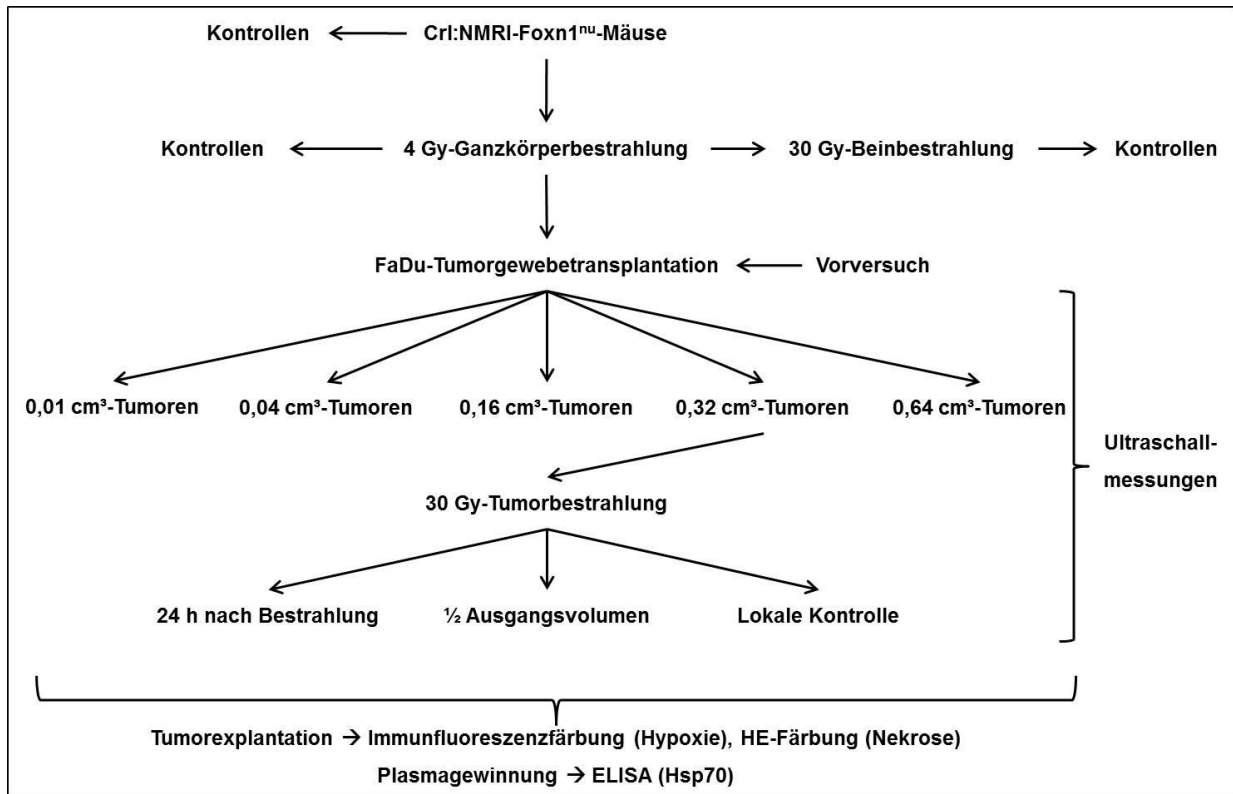


Abb. 5: Struktur des Hauptversuchs.

#### 3.3. Zellkultur

Für die Zellkultur wurden ausschließlich FaDu-Zellen, welche einem humanen Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx entstammen, verwendet. Die Zellen konnten aus einer laufenden Kultivierung in Passage 25 übernommen werden. Als Medium wurde in T162-Zellkulturflaschen 40 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 4,5 mg/ml Glucose, Glutamin, Pyruvat), welches mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum), 2 % HEPES (Hydroxylethylpiperazinylethansulfonsäure), 1 % NEAA (Non-essential Amino Acids) und 1 % P/S (Penicillin/Streptomycin) versetzt worden war, benutzt. Nach 3 d im BBD6220-Inkubator (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 95 % Raumluft/5 % CO<sub>2</sub>) erreichten die Zellen eine Konfluenz von 90 %, so dass sie passagiert werden konnten. Nachdem das Medium entfernt worden war, wurden die verbliebenen Zellen 2x mit 15 ml DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered Saline, ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub>) gewaschen, durch 3 ml Trypsin während einer erneuten Inkubation von 5 min abgelöst und mit 11 ml Medium resuspendiert. In der Neubauer-Zählkammer ergaben sich ca. 7,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/14 ml Medium. Nun wurde 5 min zentrifugiert (4 °C, 500 g), das

### 3. Material und Methoden

---

Medium verworfen und die Zellen in 750 µl DPBS (4 °C) aufgenommen. Diese Suspension wurde sofort auf Eis gelagert.

#### 3.4. Mäuse

Für alle Tierversuche wurden Mäuse (Abb. 6), deren exakte Bezeichnung Crl:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup> lautet, verwendet. Sie besitzen im Gen des Transkriptionsfaktors FOXP1 (Forkhead Box Protein N1) eine Mutation, die durch eine fehlerhafte Entwicklung des embryonalen Ektoderms zur mangelhaften Keratinisierung des Haarschafts und fehlenden Anlage des Thymus führt. Daher sind diese Mäuse haarlos und immundefizient. Die Immunschwäche ist durch das Fehlen reifer T-Zellen (Thymus) bedingt, wobei B-Zellen (Bone marrow, Bursa fabricii) in normaler und NK-Zellen sogar in kompensatorisch erhöhter Anzahl vorliegen. Die reduzierte Immunkompetenz bedingt eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber fakultativ pathogenen Bakterien und Viren, erlaubt aber die Implantation von Xenografttumoren durch eine abgeschwächte Abstoßungsreaktion. Die Haltung der Mäuse (weiblich, zu Beginn 7-10 Wochen alt, 18-25 g schwer) erfolgte unter sterilen Bedingungen (Käfige mit abgeschlossener Luftzirkulation, 26 °C, 50-60 % Luftfeuchtigkeit, 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus mit Licht an um 6 Uhr, handelsübliches Nagetierfutter und Wasser frei verfügbar) im ZPF (Zentrum für präklinische Forschung) am Klinikum Rechts der Isar der Technischen Universität München. Alle Mausversuche erfolgten nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern (Gz.55.2-1-54-2532-135-11) in Übereinstimmung mit den geltenden Tierschutzbestimmungen.



Abb. 6: Crl:NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>-Maus. Diese Mäuse sind aufgrund einer Mutation im Gen eines Transkriptionsfaktors haarlos und immundefizient.

#### 3.5. Ganzkörperbestrahlung

### 3. Material und Methoden

---

Um das Risiko einer Abstoßungsreaktion durch das residuale Immunsystem zu senken, wurden die Mäuse 3 d vor der Tumortransplantation einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen. Insgesamt ergab sich dadurch eine Erfolgsquote der Transplantationen von ca. 90 %. Die Bestrahlung erfolgte am RS225A-Bestrahlungsgerät in einem in unserem Labor entwickelten Bestrahlungskäfig (Abb. 7). Die Positionierung der Mäuse (maximal 5) unter einem ca. 5 cm hohen Einsatz stellte durch die Einschränkung der vertikalen Bewegungsmöglichkeit eine homogene Dosisverteilung sicher. Zudem garantierte der aufliegende Filterdeckel sterile Bedingungen. Die Bestrahlung wurde mit 4 Gy (1 Gy/min, 4 min 12 s, 200 kV/15 mA Röntgenstrahlung) durchgeführt. Das danach weiter erhöhte Infektionsrisiko erforderte die Verabreichung des Antibiotikums Ciprofloxacin (40 mg/l Trinkwasser) bis zum Versuchsende.

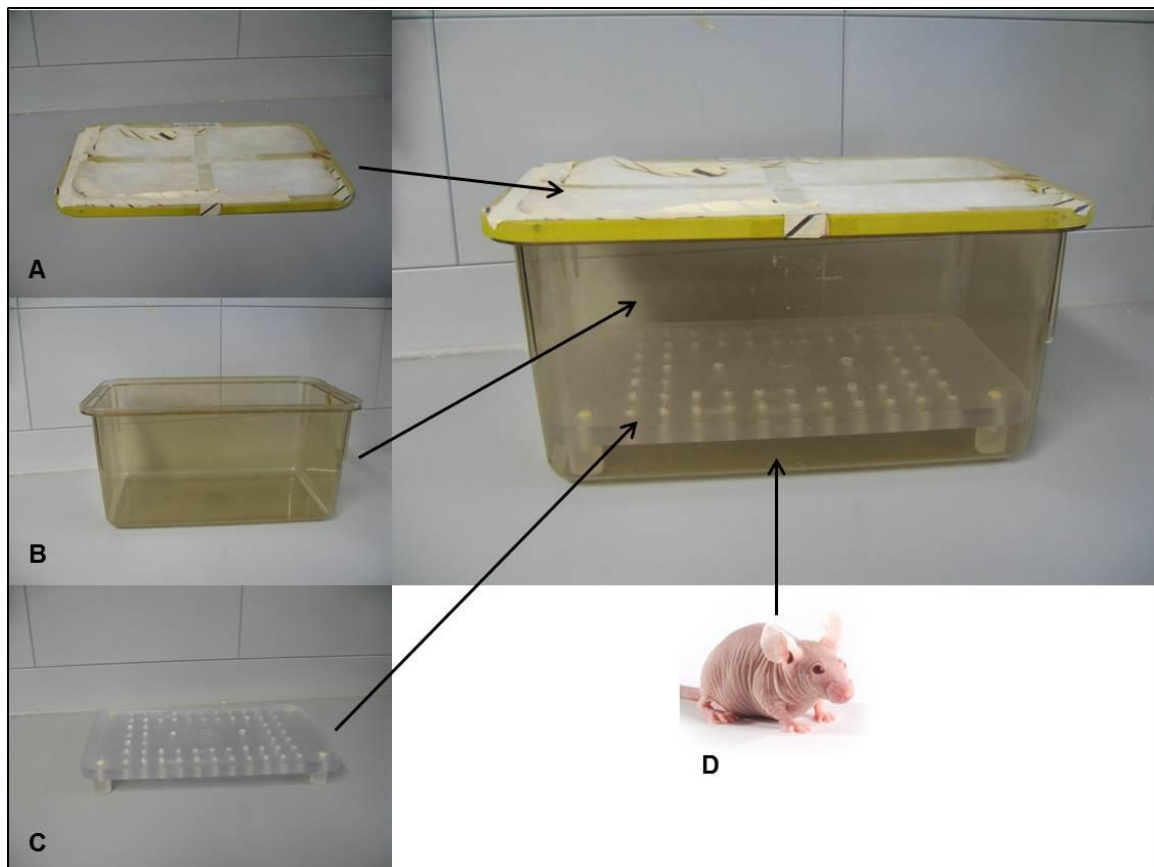


Abb. 7: Bestrahlungskäfig für die Ganzkörperbestrahlung. Der Käfig (B) ist mit einem Filterdeckel (A) und einem Einsatz (C), unter welchem die Mäuse (D) positioniert wurden, versehen. Der Filterdeckel sorgte für sterile Bedingungen, der Einsatz ermöglichte eine homogene Dosisverteilung.

### 3.6. Tumortransplantation



#### 3.6.1. Tumorzelltransplantation

Die Tumorzelltransplantation wurde 3 d nach der Ganzkörperbestrahlung durchgeführt. Nach Narkotisierung der Mäuse durch die intramuskuläre Gabe von MMF (Medetomidin, Midazolam, Fentanyl) (Tab. 3) erfolgte die subkutane Injektion von 100 µl Tumorzellsuspension ( $1 \times 10^6$  Zellen) in die rechte Axilla. Zur Antagonisierung der Narkose wurde intramuskulär AFN (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon) (Tab. 3) verabreicht. Bei Erreichen der Zielgröße konnten die Mäuse getötet und die Tumoren explantiert werden. Unter Entfernung nekrotischer Anteile wurden ca. 1 mm<sup>3</sup> große Tumorstücke gebildet, welche in DMEM (mit 10 % FCS, 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid), 1 % NEAA, 1 % P/S) eingebettet, für 1 d bei -80 °C in einer Box mit 100 % Isopropanol und schließlich bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert werden konnten.

Narkosemittel MMF		Antagonist AFN	
Substanz	Dosierung (µg/g Körpergewicht)	Substanz	Dosierung (µg/g Körpergewicht)
<b>Medetomidin</b>	0,5	<b>Atipamezol</b>	2,5
<b>Midazolam</b>	5	<b>Flumazenil</b>	0,5
<b>Fentanyl</b>	0,05	<b>Naloxon</b>	1,2

Tab. 3: Zusammensetzung von Narkosemittel und Antagonist für die Tumorzelltransplantation. Dargestellt sind die Einzelsubstanzen mit Dosierung für das Narkosemittel MMF (Medetomidin, Midazolam, Fentanyl) und den entsprechenden Antagonisten AFN (Atipamezol, Flumazenil, Naloxon).

#### 3.6.2. Tumorgewebetransplantation

Die Tumorgewebetransplantation fand 3 d nach der Ganzkörperbestrahlung statt. Narkotisierung und Antagonisierung wurden wie bei der Tumorzelltransplantation durchgeführt. Nach Auftauen in DPBS konnten die ca. 1 mm<sup>3</sup> großen Tumorstücke subkutan am rechten Hinterbein implantiert werden.

#### 3.7. Ultraschallmessung

Die Bestimmung des Tumolvolumens durch Ultraschall (Abb. 8) erfolgte an einem Logiq 5-Ultraschallgerät. Jeder Tumor wurde vom Beginn des Wachstums bis zur

### 3. Material und Methoden

---

Explantation mindestens 2 x/Woche gemessen (Sektorschallkopf, 11 Mhz, 2 orthogonale Ebenen). Das Volumen konnte nach der Formel für Rotationsellipsoide ( $V=L \times B \times T \times \pi/6$ ) berechnet werden.

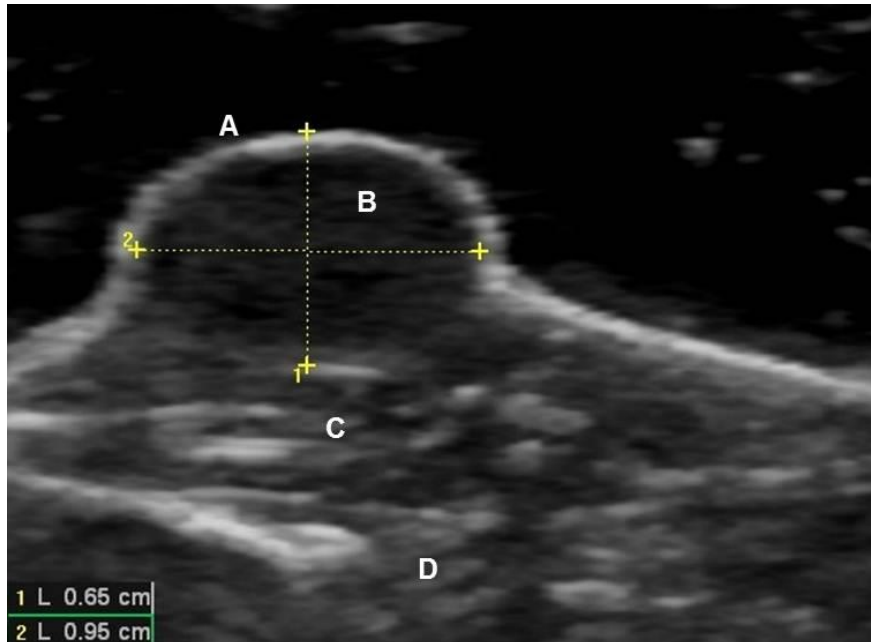


Abb. 8: Ultraschallaufnahme eines Tumors. Der Tumor (B) liegt direkt unter der Haut (A) im subkutanen Gewebe (C) vor der Muskulatur (D). In dieser Ebene sind Tiefe (1) und Länge (2) bestimmt worden.

#### 3.8. Tumor- und Beinbestrahlung

Nach Narkotisierung durch die intramuskuläre Gabe eines Narkosemittels bestehend aus Ketamin (80 µg/g Körpergewicht) und Midazolam (5 µg/g Körpergewicht) erfolgte die Positionierung der Mäuse im Bestrahlungskäfig (Abb. 9), welcher einem gewöhnlichen Haltungskäfig mit Deckel und Gitter für Wasser und Futter entsprach. Dabei mussten die Mäuse so gelagert werden, dass sich die Tumoren bzw. die Beine in einem am Boden des Käfigs markierten, 1,5 x 1,5 cm großen Feld befanden. Für die Fixierung wurden Elasto-Gel-Pflaster verwendet, da diese auch eine homogene Dosisverteilung ermöglichten. Für die Bestrahlung mit 30 Gy (6 Gy/min, 5 min, 6 MV Photonenstrahlung) wurde ein Trilogy-Bestrahlungsgerät verwendet.

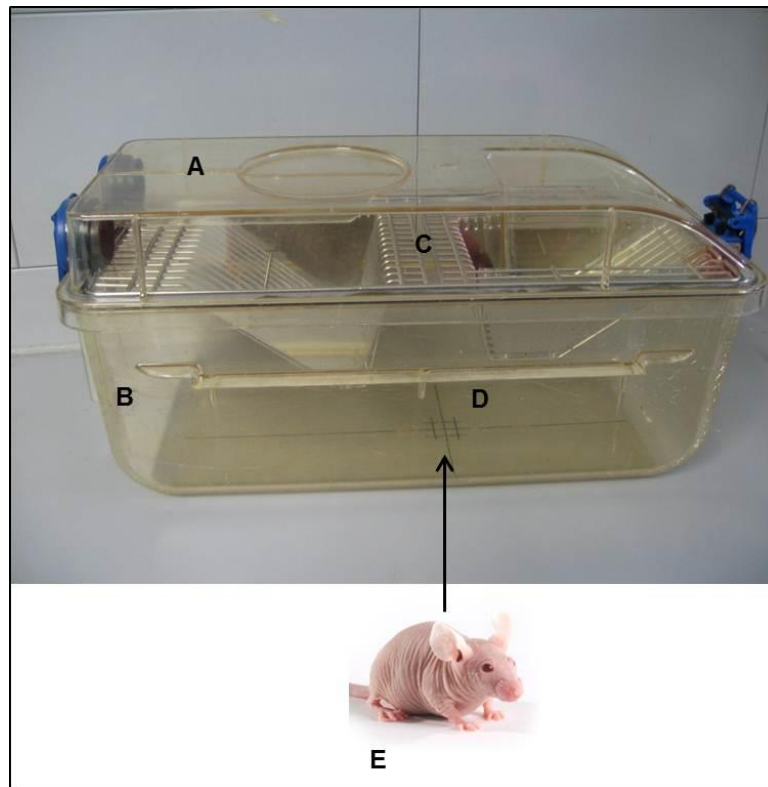


Abb. 9: Bestrahlungskäfig für die Tumor- und Beinbestrahlung. Der Käfig (B) entspricht einem gewöhnlichen Haltungskäfig mit Deckel (A) und Gitter für Wasser und Futter (C). Am Boden befindet sich ein 1,5 x 1,5 cm großes Feld (D), in welchem die Mäuse (E) so gelagert wurden, dass nur die Tumoren oder die Beine bestrahlt werden konnten.

#### 3.9. Tumorexplantation und Plasmagewinnung

Nach Verabreichung von 50  $\mu$ l des Hypoxiemarkers Pimonidazol (100  $\mu$ g/g Körpergewicht, verdünnt in NaCl, 2 h prä mortal, intraperitoneal) und 50  $\mu$ l des Perfusionsmarkers Hoechst 33342 (15  $\mu$ g/g Körpergewicht, verdünnt in NaCl, 1 min prä mortal, intravenös) wurden die Mäuse mit Isofluran narkotisiert und das Blut aus dem orbitalen Sinus entnommen. Nach 1 min auf Eis wurden die verwendeten Plasmaröhrchen 15 min zentrifugiert (4 °C, 1500 g). Aus dem den Überstand bildenden Blutplasma konnten Aliquots mit 50  $\mu$ l gebildet werden, welche bei -80 °C eingefroren wurden. Die Tumoren wurden nach Entfernung von Haut, subkutanem Gewebe und Muskel in einem Stück geborgen, in Tissue-Tek O.C.T. Compound Medium eingebettet und bei -80 °C gelagert.

#### 3.10. Histologie

#### 3.10.1. Mikrotomie

Das Schneiden der Tumoren wurde bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  am HM 500 O-Mikrotom durchgeführt. Hierfür wurde bei allen Tumoren ein einheitliches Schnittschema (Abb. 10) verwendet. Zunächst wurden die oberen und unteren 10 % der Tumoren verworfen. Die verbliebenen mittleren 80 % wurden dann in 5 gleichmäßig verteilte Blöcke zerteilt. Jeder dieser Blöcke bestand aus 5 unmittelbar benachbarten Schnitten mit einer Dicke von  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Insgesamt konnten dadurch 25 Schnitte pro Tumor auf SupraFrost Ultra Plus-Objekträgern ( $75 \times 25 \times 1\text{ mm}$ ) platziert werden, welche bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden.

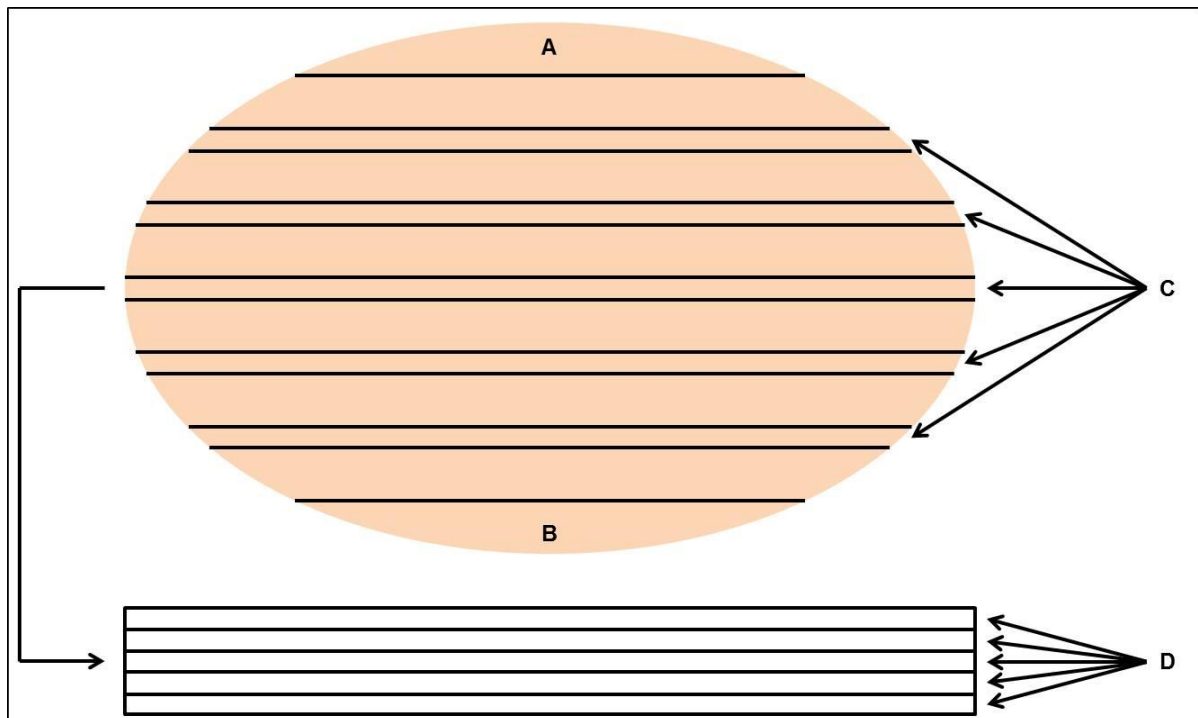


Abb. 10: Schnittschema der Tumoren. Nach Verwerfen des obersten (A) und untersten Abschnitts (B) der Tumoren wurde der verbliebene Rest in 5 Blöcke (C) mit jeweils 5 Schnitten (D) à  $10\text{ }\mu\text{m}$  zerteilt.

#### 3.10.2. Färbung

##### 3.10.2.1. Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach einem bestimmten Schema (Tab. 4) an 5 aus verschiedenen Blöcken stammenden Schnitten pro Tumor. Der Nachweis von

### 3. Material und Methoden

---

Hypoxie und Gefäßen gelang durch Anfärbung von Pimonidazol bzw. CD31 durch entsprechende Antikörper.

Schritt	Durchführung
1. Auftauen und Trocknen	5 min Abzug
2. Fixieren	10 min Azeton (4 °C)
3. Rehydrieren und Trocknen	10 min DPBS auf Rüttler (45 x/min), Papiertuch
4. Anfärben des hypoxischen Gewebes	4.3.11.3-Ak (=Anti-Pimonidazol-Antikörper), FITC-gelabelt (Fluoresceinisothiocyanat), aus der Maus, 50 µl, 1:50 verdünnt in PAD, Inkubation 1 h bei 37 °C in Dunkelheit
5. Waschen und Trocknen	10 min, DPBS, Papiertuch
6. Anfärben der Gefäße (I)	MEC 13.3-Ak (=Anti-CD31-Ak), aus der Ratte, gegen Maus, 50 µl, 1:100 verdünnt in PAD, Inkubation 1 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit
7. Waschen und Trocknen	10 min DPBS, Papiertuch
8. Anfärben der Gefäße (II)	Alexa Fluor 594-Ak (=Anti-anti-CD31-Ak), Alexa Fluor 594-gelabelt, aus der Ziege, gegen Ratte, 50 µl, 1:200 verdünnt in DPBS, Inkubation 1 h bei 37 °C in Dunkelheit
9. Waschen und Trocknen	10 min DPBS, Papiertuch
10. Einbetten	1 Tropfen Dako Fluorescent-Einbettmedium
11. Eindecken	Aufsetzen des Deckglases (20 x 20 x 0,13-0,16 mm)
12. Lagerung	4 °C

Tab. 4: Schema der Immunfluoreszenzfärbung. Hypoxie und Gefäße in den Tumoren wurden über Antikörper gegen Pimonidazol bzw. CD31 detektiert.

#### 3.10.2.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) wurden die bereits immunfluoreszenzgefärbten Schnitte nach erfolgter Mikroskopie verwendet. Auch diese Färbung fand nach einem festen Schema (Tab. 5) statt. Vitales Gewebe wurde durch Hämatoxylin, nekrotisches Gewebe durch Eosin markiert.

Schritt	Durchführung
1. Entfernung des Deckglases	12 h Einlegen in Wasser
2. Waschen und Trocknen	10 min DPBS, Papiertuch
3. Färbung des vitalen Gewebes	1 min Hematoxylin
4. Waschen	3,5 min Wasser
5. Färbung des nekrotischen Gewebes	2 min Eosin (mit 1 Tropfen 100 %ige Essigsäure)
6. Waschen und Trocknen	10 min DPBS, Papiertuch
7. Einbetten	1 Tropfen Aqueous-Einbettmedium
8. Eindecken	Aufsetzen des Deckglases (20 x 20 x 0,13-0,16 mm)
9. Lagerung	4 °C

Tab. 5: Schema der HE-Färbung. Vitales und nekrotisches Gewebe in den Tumoren wurden durch Hämatoxylin bzw. Eosin detektiert.

#### 3.10.3. Mikroskopie

##### 3.10.3.1. Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie der immunfluoreszenzgefärbten Schnitte wurde am Axioskop 2 plus-Mikroskop mit einer AxioCam MRc 5-Kamera durchgeführt. Als Programm für die Aufnahme und Bearbeitung der mikroskopischen Bilder wurde AxioVision 4.7 verwendet. Nach manueller Definition seiner Grenzen erfolgte die automatische Aufnahme des Tumors. Dabei wurde der Tumor in einem kammartigen Muster unter Aufnahme von unmittelbar benachbarten Einzelbildern (10 x Vergrößerung, schwarz-weiß, 646 x 484 Bildpunkte) durchfahren. Die Zusammensetzung der Einzelbilder zu einem Summenbild gelang durch das MosaiX-Modul. Insgesamt musste der Tumor 3 x mit unterschiedlichen Einstellungen durchfahren werden. Der 1. Durchlauf mit einer Belichtungszeit von 150 ms und passendem Filter identifizierte die Perfusion über Hoechst 33342 (Exzitation: 360 nm, Emission: 460 nm → blaue Fluoreszenz, Farbuweisung: blau). Der 2. Durchlauf mit einer Belichtungszeit von 400 ms und passendem Filter gab die Hypoxie über FITC (Exzitation: 495 nm, Emission: 521 nm → grüne Fluoreszenz, Farbuweisung: grün) zu erkennen. Der 3. Durchlauf mit einer Belichtungszeit von 700 ms und passendem Filter markierte die Gefäße über Alexa Fluor 594 (Exzitation: 590 nm, Emission 617 nm → rote Fluoreszenz, Farbuweisung rot). Durch Übereinanderlegen der Summenbilder, Bearbeitung von Helligkeit und Kontrast sowie Zuschneiden entstand schließlich das Gesamtbild (Abb. 11).

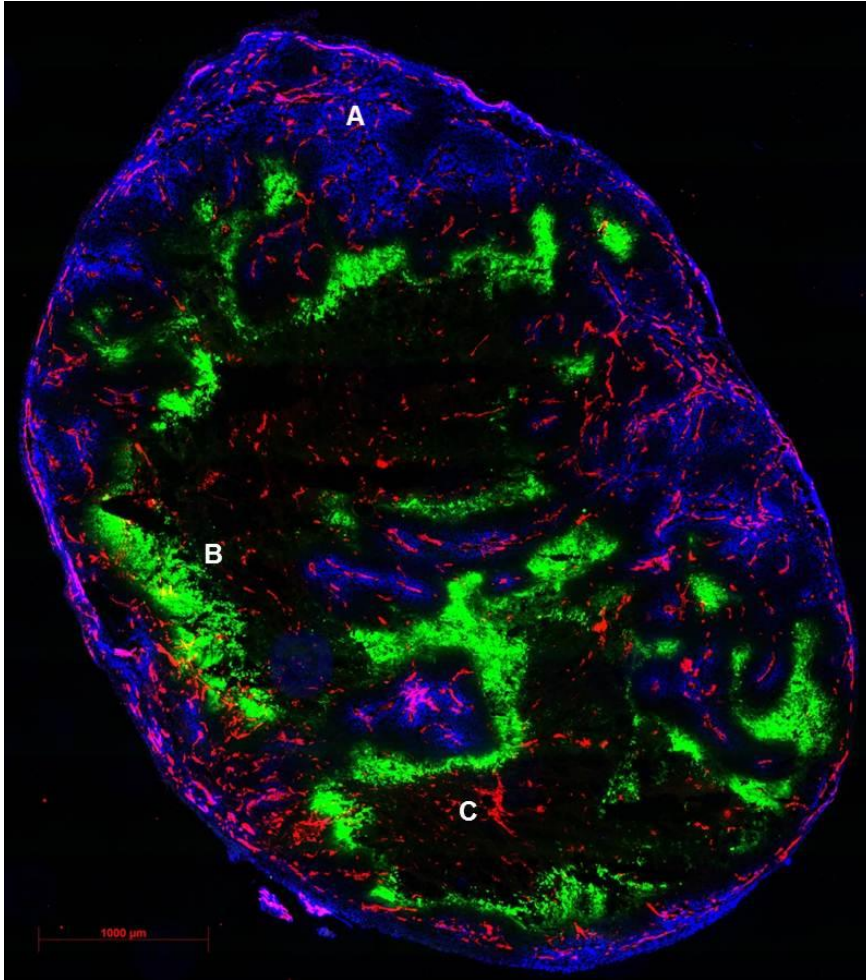


Abb. 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Tumors. Durch die verschiedenen Fluorochrome sind Perfusion (A, blau), Hypoxie (B, grün) und Gefäße (C, rot/violett) zu erkennen.

#### 3.10.3.2. Hellfeldmikroskopie

Die Mikroskopie der HE-gefärbten Schnitte wurde bis auf folgende Unterschiede wie die Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Die Einzelbilder konnten farbig mit 860 x 644 Bildpunkten aufgenommen werden. Insgesamt war nur ein Durchlauf mit einer Belichtungszeit von 20 ms und ohne Filter erforderlich um im Gesamtbild (Abb. 12) vitales Gewebe über Hämatoxylin (blau) und nekrotisches Gewebe über Eosin (rot) zu identifizieren.

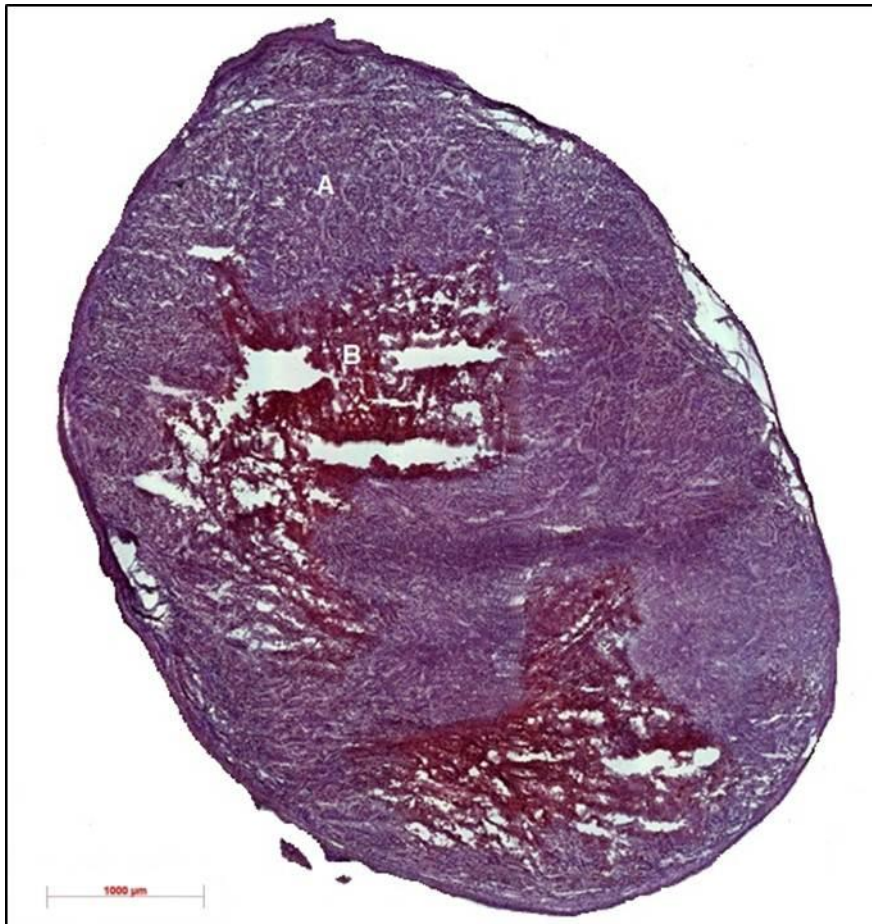


Abb. 12: Hellschattmikroskopische Aufnahme eines Tumors. Vitales Gewebe (A, blau) ist deutlich von nekrotischem Gewebe (B, rot) abgrenzbar.

#### 3.10.4. Bildbearbeitung und -auswertung

In den immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden durch Vergleich mit den entsprechenden hellfeldmikroskopischen Aufnahmen 2 verschiedene Masken (Abb. 13) erstellt. Dafür wurde das Freihandformwerkzeug in PowerPoint 2010 verwendet. Die rote Maske begrenzte das gesamte Tumorgewebe, die weiße Maske bedeckte das nekrotische Gewebe. Dann wurde mit Photoshop Creative Suite 4 Extended weitergearbeitet. Mit dem Schnellauswahlwerkzeug konnte der Bereich innerhalb der roten Maske (gesamtes Tumorgewebe) und die Bereiche der weißen Masken (nekrotisches Gewebe) ausgewählt werden. Über das Farbauswahlwerkzeug gelang die Auswahl der grünen Bereiche (hypoxisches Tumorgewebe). Jeder Auswahl schloss sich die Berechnung der Anzahl der Bildpunkte an. Dadurch erhielt man die Größe des gesamten, nekrotischen, vitalen (gesamtes Tumorgewebe – nekrotisches Tumorgewebe) und hypoxischen Tumorgewebes sowie die nekrotische (nekrotisches



Tumorgewebe / gesamtes Tumorgewebe) und hypoxische Fraktion (hypoxisches Tumorgewebe / vitales Tumorgewebe).

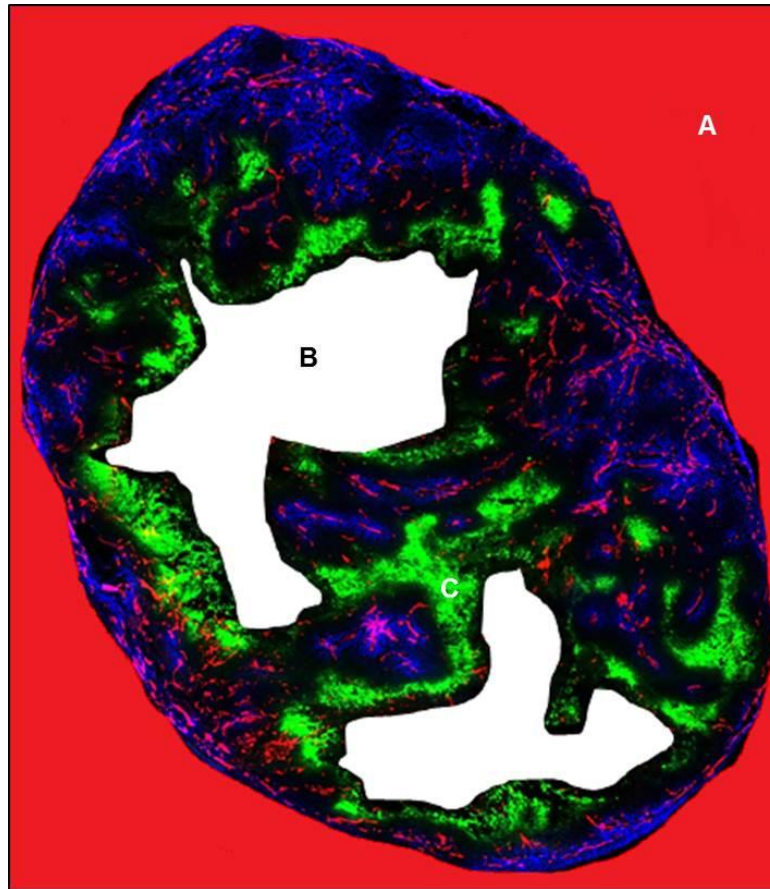


Abb. 13: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Tumors mit Masken. Die rote Maske (A) begrenzte das gesamte Tumorgewebe, die weiße Maske (B) das nekrotische Tumorgewebe. Im unbedeckten vitalen Tumorgewebe ist das hypoxische Tumorgewebe (C) zu erkennen.

#### 3.11. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Bestimmung der Hsp70-Konzentration im Blutplasma der Mäuse erfolgte durch ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) (Abb. 14) mit dem DuoSet IC Human/Mouse/Rat Total HSP70-Kit nach Herstellerangaben. 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden mit dem Fängerantikörper gegen Hsp70 bedeckt (12 h, Raumtemperatur). Nachdem gewaschen (3 x, Waschpuffer), geblockt (Blockpuffer, 1,5 h Inkubator (27 °C, Raumluftfeuchtigkeit, 100 % Raumluft)) und erneut gewaschen worden war, konnte das Plasma aufgetragen werden (2 h Inkubator). Nach abermaligem Waschen wurde der biotinylierte Detektionsantikörper gegen Hsp70 appliziert (2 h Inkubator) und wieder abgewaschen. Dem Zugabe von mit

### 3. Material und Methoden

Meerrettichperoxidase konjugiertem Streptavidin (2 h Inkubator) und einem letzten Waschschrift folgte das Hinzufügen einer Substratlösung aus TMB (Tetramethylbenzidin) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wasserstoffperoxid, 20 min Inkubator). Zum Beenden der Farbreaktion wurde eine Stopplösung aus  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Schwefelsäure) verwendet. Die Messung der optischen Dichte gelang bei 450 nm am EL808-ELISA-Lesegerät.

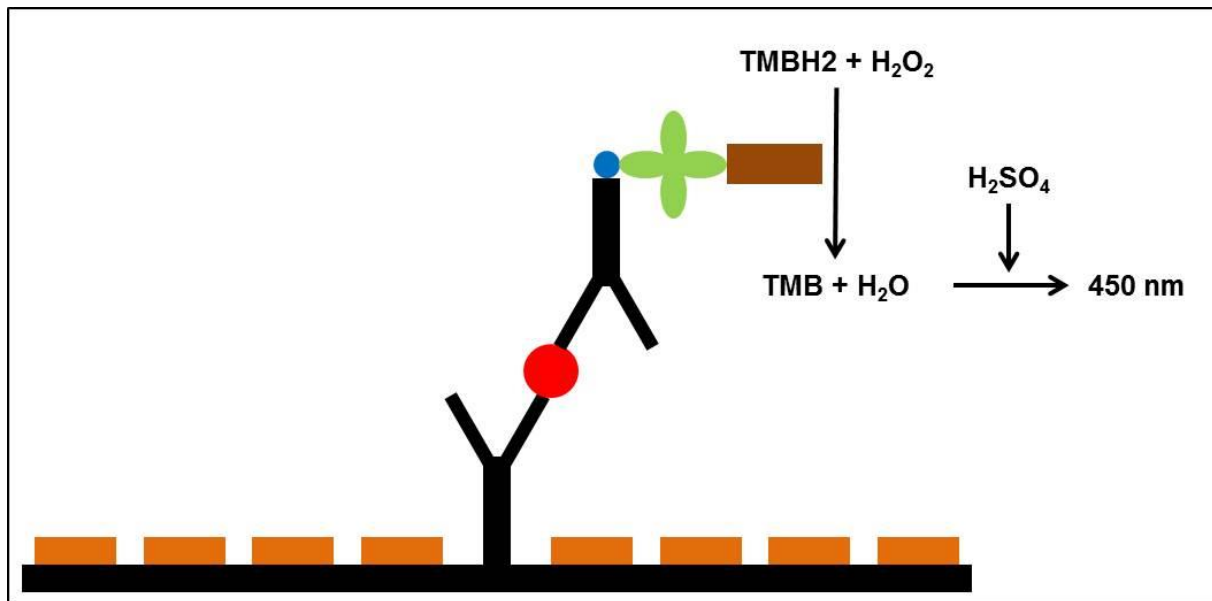


Abb. 14: Schema des Hsp70-ELISA. Auf der Mikrotiterplatte (schwarz) sitzt der Fängerantikörper gegen Hsp70 (schwarz). Unbenötigte Bindungsstellen der Platte sind durch Blockproteine (hellbraun) geschützt. Hsp70 (rot) ist vom Fänger- wie auch vom Detektionsantikörper (schwarz) gebunden. Letzterer ist an seinem konstanten Teil mit Biotin (blau) versehen, an welches mit Meerrettichperoxidase (dunkelbraun) konjugiertes Streptavidin (grün) bindet. Die Peroxidase katalysiert mit Hilfe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wasserstoffperoxid) die Farbreaktion von TMBH2 zu TMB (Tetramethylbenzidin). Nach Stoppen der Reaktion durch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Schwefelsäure) kann die Messung der optischen Dichte bei 450 nm erfolgen.

#### 3.12. Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung wurde SPSS 20 (Statistical Package For The Social Sciences 20) verwendet. Sämtliche Daten, bis auf die Korrelationsanalysen bei welchen Einzelwerten verwendet wurden, sind als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Für die Korrelationsanalyse zwischen den Variablen wurde über eine lineare Regression der Pearson-Koeffizient ( $r$ ) errechnet. Die statistische Signifikanz konnte durch den Student's T-Test für unverbundene Stichproben in Abhängigkeit des

### 3. Material und Methoden

---

Levene-Tests ermittelt werden. Dabei wurden unterschiedliche Signifikanzniveaus in Abhängigkeit des p-Werts (Tab. 6) verwendet.

<b>Signifikanzniveau</b>	<b>p-Wert</b>
nicht signifikant (n. s.)	$0,05 < p$
signifikant (*)	$0,01 < p \leq 0,05$
hoch signifikant (**)	$0,001 < p \leq 0,01$
höchst signifikant (***)	$p \leq 0,001$

Tab. 6: Signifikanzniveaus in Abhängigkeit des p-Werts. Ab einem p-Wert  $\leq 0,05$  wurden Zusammenhänge als statistisch signifikant betrachtet. Für diese Zusammenhänge erfolgte eine weitere Aufteilung in 3 Gruppen in Abhängigkeit des p-Werts.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Tumornekrose/-hypoxie und Tumorvolumen/-bestrahlung

Zwischen Tumorvolumen und Tumornekrose (nekrotischer Fraktion) zeigte sich ein Zusammenhang (Abb. 15). Mit steigendem Tumorvolumen erhöhte sich die nekrotische Fraktion. Im Bereich der kleineren Tumoren fiel diese Erhöhung geringer aus, während sie sich im Bereich der größeren Tumoren deutlicher zeigte. Die nekrotische Fraktion der 0,04 cm<sup>3</sup>-Tumoren lag bei 13,09 %. Bei den 0,16 cm<sup>3</sup>-Tumoren betrug sie 14,51 % und bei 0,32 cm<sup>3</sup>-Tumoren 19,34 %. Deutlich erhöht war die nekrotische Fraktion bei den 0,64 cm<sup>3</sup>-Tumoren mit 37,58 %. Nur im Vergleich der 0,04 cm<sup>3</sup>- mit den 0,64 cm<sup>3</sup>-Tumoren zeigte sich der Unterschied in der nekrotischen Fraktion signifikant ( $p < 0,001$ ).

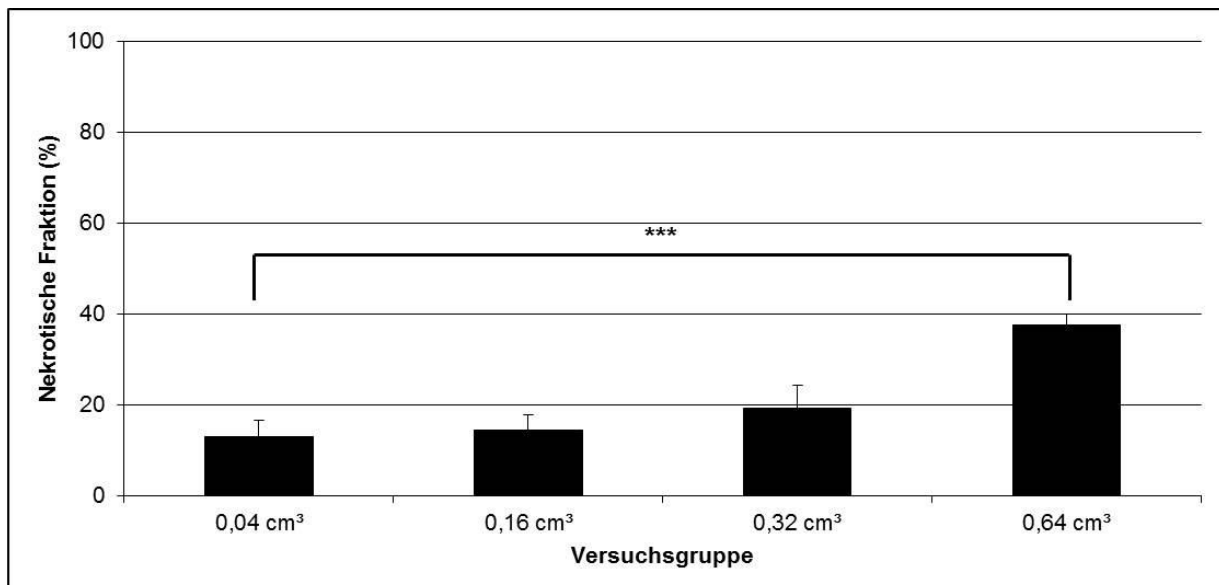


Abb. 15: Zusammenhang zwischen Tumorvolumen und Tumornekrose (nekrotische Fraktion). Dargestellt sind Mittelwerte ( $n=5$ ) mit Standardfehler. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Zwischen Tumorbestrahlung und nekrotischer Fraktion ließ sich ebenfalls ein Zusammenhang erkennen (Abb. 16). 24 h nach 30 Gy-Bestrahlung von 0,32 cm<sup>3</sup> Tumoren erhöhte sich die nekrotische Fraktion von 19,34 auf 28,46 %. Nach 30 Gy-Bestrahlung und 50 %iger Tumorkontrolle zeigte sich die nekrotische Fraktion mit 57,65 % noch deutlicher gestiegen. Über alle Tumorguppen konnte im Vergleich von apikalen, zentralen und basalen Tumorschnitten kein bestimmtes Muster der

## 4. Ergebnisse

---

Verteilung der Nekrose in den Tumoren ermittelt werden. Zudem konnte keine signifikante Korrelation zwischen Tumornekrose und Plasma-Hsp70 festgestellt werden ( $r=0,18$ ;  $p=0,44$ ).

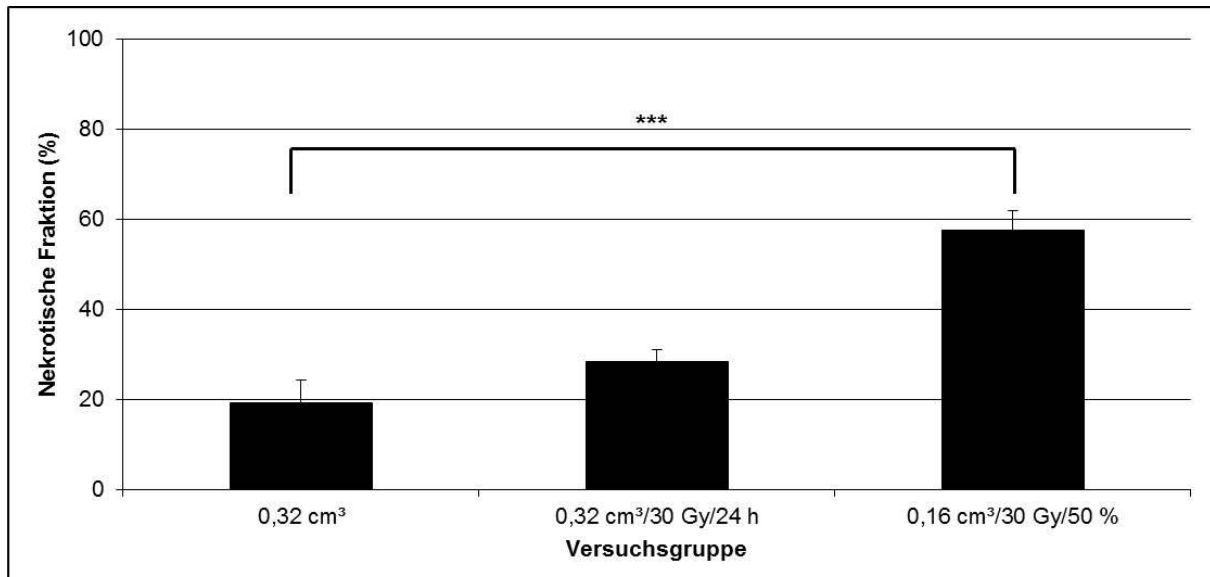


Abb. 16: Zusammenhang zwischen Tumorbestrahlung und Tumornekrose (nekrotische Fraktion). Dargestellt sind Mittelwerte ( $n=5$ ) mit Standardfehler. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Zwischen Tumorumfang und Tumorrhypoxie (hypoxischer Fraktion) zeigte sich ein Zusammenhang (Abb. 17). Die hypoxische Fraktion blieb über alle Tumorguppen mit ca. 8 bis 10 % nahezu konstant. Signifikante Unterschiede der 0,16 cm<sup>3</sup>-, 0,32 cm<sup>3</sup>- oder 0,64 cm<sup>3</sup>-Tumoren gegenüber der 0,04 cm<sup>3</sup>-Tumoren konnten nicht festgestellt werden ( $p=0,99$ ,  $0,72$ ,  $0,59$ ). Für die einzelnen Tumoren innerhalb der Tumorguppen ergaben sich teils erhebliche Unterschiede der hypoxischen Fraktion.

## 4. Ergebnisse

---

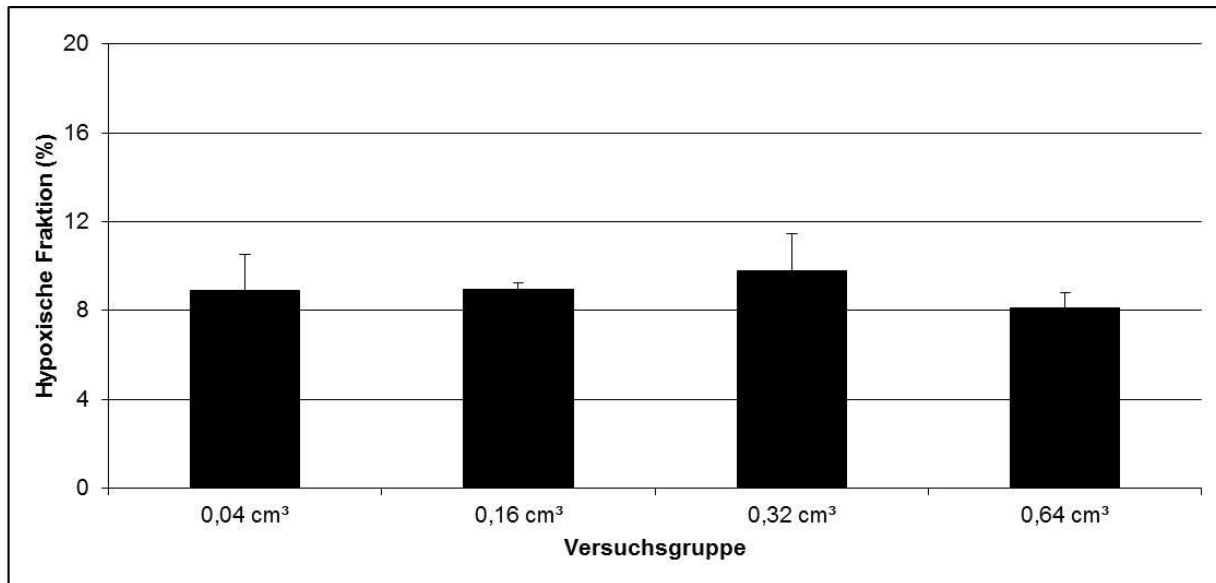


Abb. 17: Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und Tumorhypoxie (hypoxische Fraktion). Dargestellt sind Mittelwerte (n=5) mit Standardfehler.

Zwischen Tumorbestrahlung und hypoxischer Fraktion ließ sich ebenfalls ein Zusammenhang erkennen (Abb. 18). Nach 30 Gy-Bestrahlung von 0,32 cm<sup>3</sup>-Tumoren sank die hypoxische Fraktion von 9,79 auf 8,98 %. Dieses Absinken war nicht signifikant ( $p=0,66$ ). Nach 30 Gy-Bestrahlung und 50 %iger Tumorkontrolle ging die hypoxische Fraktion auf 2,33 % zurück. Dieser Rückgang war signifikant ( $p\leq 0,001$ ). Über alle Tumorgruppen konnte im Vergleich von apikalen, zentralen und basalen Tumorschnitten kein bestimmtes Muster der Verteilung der Hypoxie in den Tumoren ermittelt werden. Zudem konnte keine signifikante Korrelation zwischen Tumorhypoxie und Plasma-Hsp70 ermittelt werden ( $r=0,19$ ;  $p=0,43$ ).

## 4. Ergebnisse

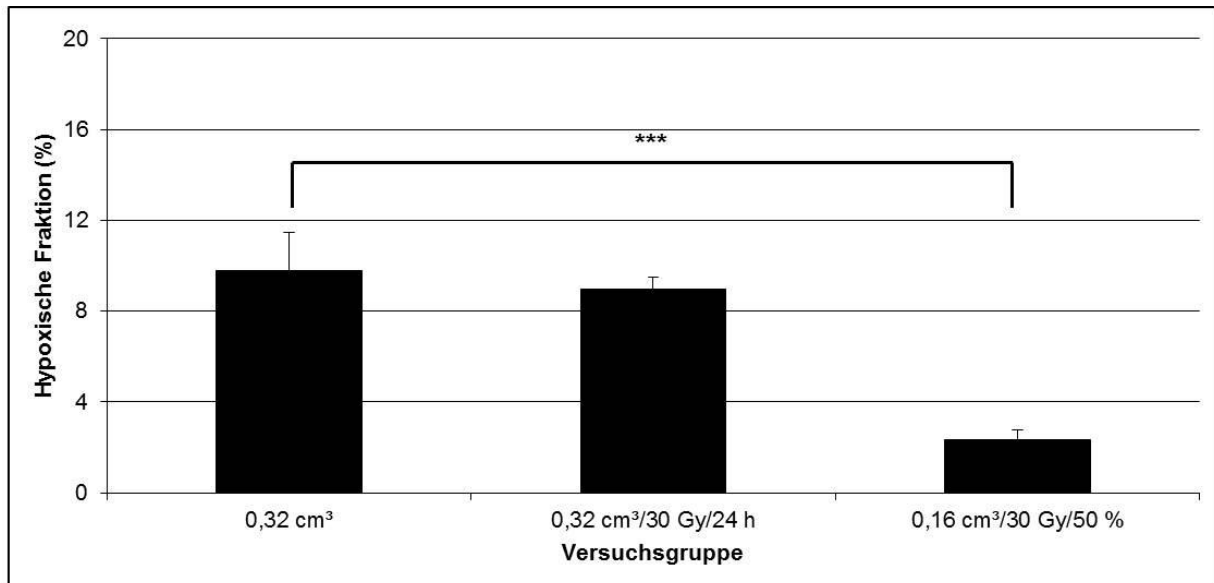


Abb. 18: Zusammenhang zwischen Tumorbestrahlung und Tumorhypoxie (hypoxische Fraktion). Dargestellt sind Mittelwerte (n=5) mit Standardfehler. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 4.2. Hitzeschockprotein 70 und Tumolvolumen/-bestrahlung

Zwischen Tumolvolumen und Plasma-Hsp70 konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden (Abb. 19). Im Vergleich der Kontrollgruppen mit und ohne 4 Gy-Ganzkörperbestrahlung zeigte sich eine leichte Erhöhung des Plasma-Hsp70 von 4,31 auf 4,74 ng/ml nach 4 Gy-Ganzkörperbestrahlung. Die Erhöhung erwies sich als nicht signifikant ( $p=0,435$ ). Mit steigendem Tumolvolumen erhöhte sich das Plasma-Hsp70. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit 4 Gy-Ganzkörperbestrahlung war der Anstieg des Plasma-Hsp70 in allen Tumorgruppen signifikant (0,04 cm<sup>3</sup>: 5,89 ng/ml,  $p=0,042$ ; 0,16 cm<sup>3</sup>: 7,69 ng/ml,  $p=0,022$ ; 0,32 cm<sup>3</sup>: 8,96 ng/ml,  $p=0,003$ ; 0,64 cm<sup>3</sup>: 9,34 ng/ml,  $p=0,002$ ).

## 4. Ergebnisse

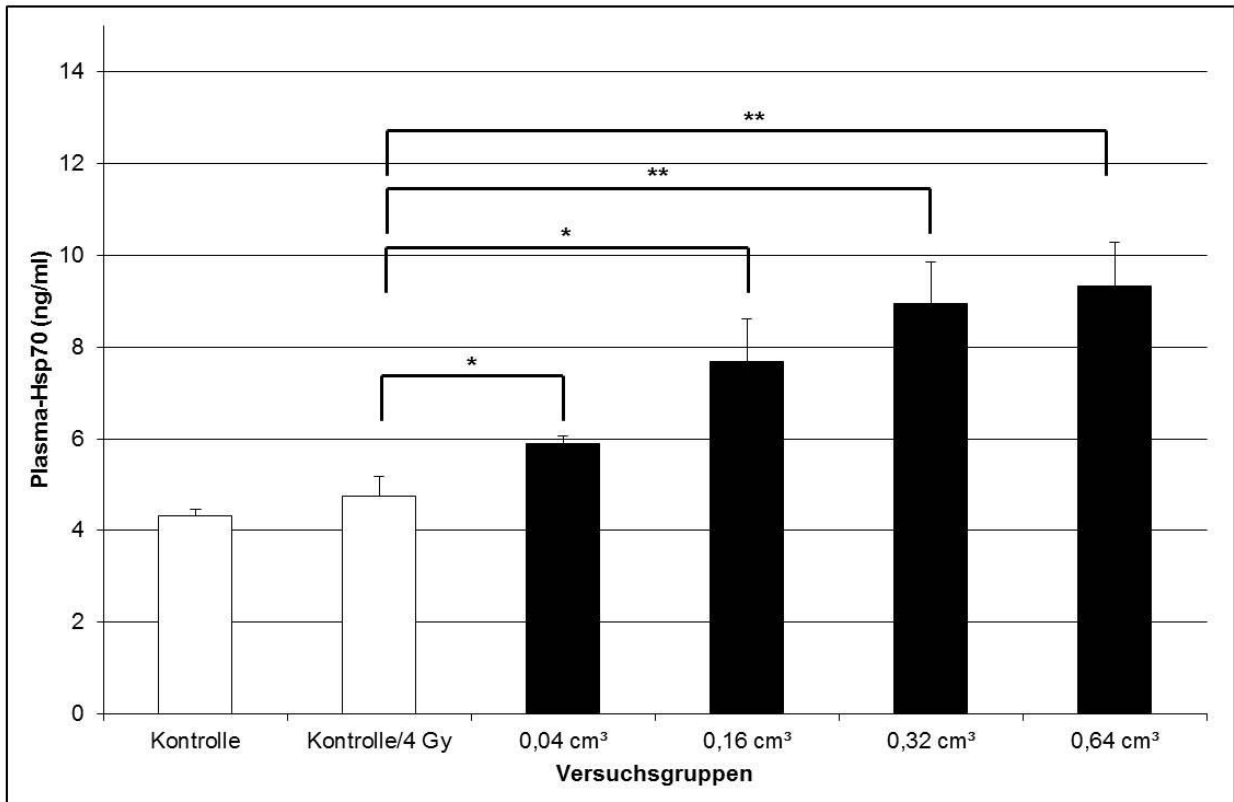


Abb. 19: Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und Plasma-Hsp70 der Kontroll- und Tumorgruppen. Dargestellt sind Mittelwerte (n=5) mit Standardfehler. \*  $0,01 < p \leq 0,05$ , \*\*  $0,001 < p \leq 0,01$ .

Innerhalb der volumengroßen Tumorgruppen ließen sich größere Schwankungen des Plasma-Hsp70 feststellen als in den volumenkleinen Tumorgruppen. Das zeigt sich bei der Darstellung von Tumolvolumen und Plasma-Hsp70 der einzelnen Kontrollen und Tumoren (Abb. 20). Dennoch bestätigte sich eine sehr gute, signifikante Korrelation ( $r=0,708$ ,  $p < 0,001$ ). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen Plasma-Hsp70 und der Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren ermittelt werden ( $r=0,192$ ,  $p=0,420$ ).



## 4. Ergebnisse

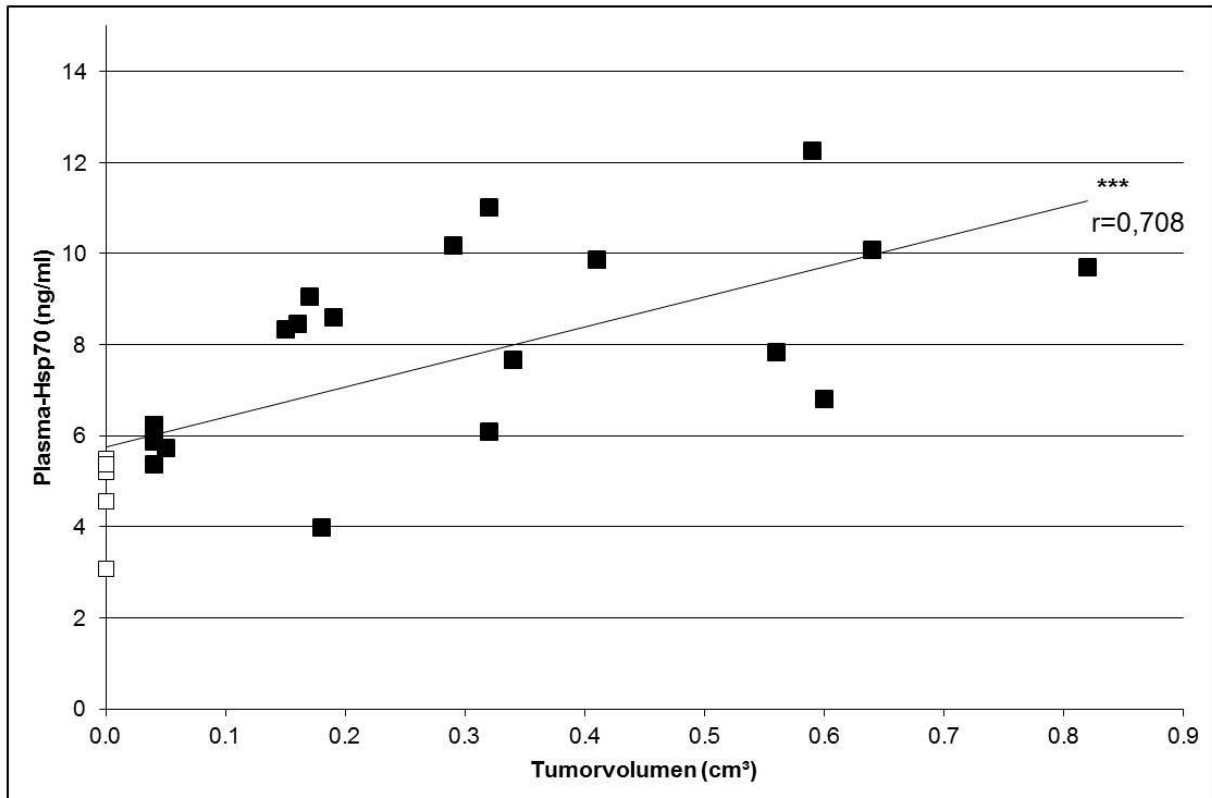


Abb. 20: Zusammenhang zwischen Tumorzvolumen und Plasma-Hsp70 der einzelnen Kontrollen (weiß) und Tumoren (schwarz). Dargestellt sind Einzelwerte. \*\*\*  $p \leq 0,001$ ,  $r$ =Pearson-Koeffizient.

Zwischen Tumorbestrahlung und Plasma-Hsp70 bestand ebenfalls ein Zusammenhang (Abb. 21). Im Vergleich der Kontrollen mit 4 Gy-Ganzkörper- mit oder ohne 30 Gy-Beinbestrahlung zeigte sich ein geringer Anstieg des Plasma-Hsp70 von 4,74 auf 5,54 ng/ml ohne Signifikanz ( $p=0,159$ ). Der Vergleich der 0,32 cm<sup>3</sup>-Tumoren mit gleich großen Tumoren 24 h nach 30 Gy-Tumorbestrahlung ergab eine nur unwesentliche Erhöhung des Plasma-Hsp70 von 8,96 auf ca. 9,49 ng/ml, welche nicht signifikant war ( $p=0,599$ ). Der Vergleich der Kontrollen mit 4 Gy-Ganzkörper- und 30 Gy-Beinbestrahlung mit den 0,32 cm<sup>3</sup>-Tumoren 24 h nach Bestrahlung zeigte eine deutliche Erhöhung des Plasma-Hsp70 von 5,54 ng/ml auf 9,49 ng/ml, welcher signifikant war ( $p < 0,001$ ). Deutlich fielen die Ergebnisse bei Gegenüberstellung der Gruppe der 0,32 cm<sup>3</sup>-Tumoren 24 h nach Bestrahlung mit den Gruppen nach 50 %iger bzw. 100 %iger Tumorkontrolle aus. Dabei sank das Plasma-Hsp70 von 9,49 über 7,06 auf 4,89 ng/ml. Dabei erwies sich das Absinken jeweils als signifikant (0,16 cm<sup>3</sup>/30 Gy/50 %:  $p < 0,001$ ; 0 cm<sup>3</sup>/30 Gy/100 %:  $p < 0,001$ ). Letztlich wurde nach Rückgang der Tumoren wieder der Plasma-Hsp70-Wert der Kontrollen erreicht.

## 4. Ergebnisse

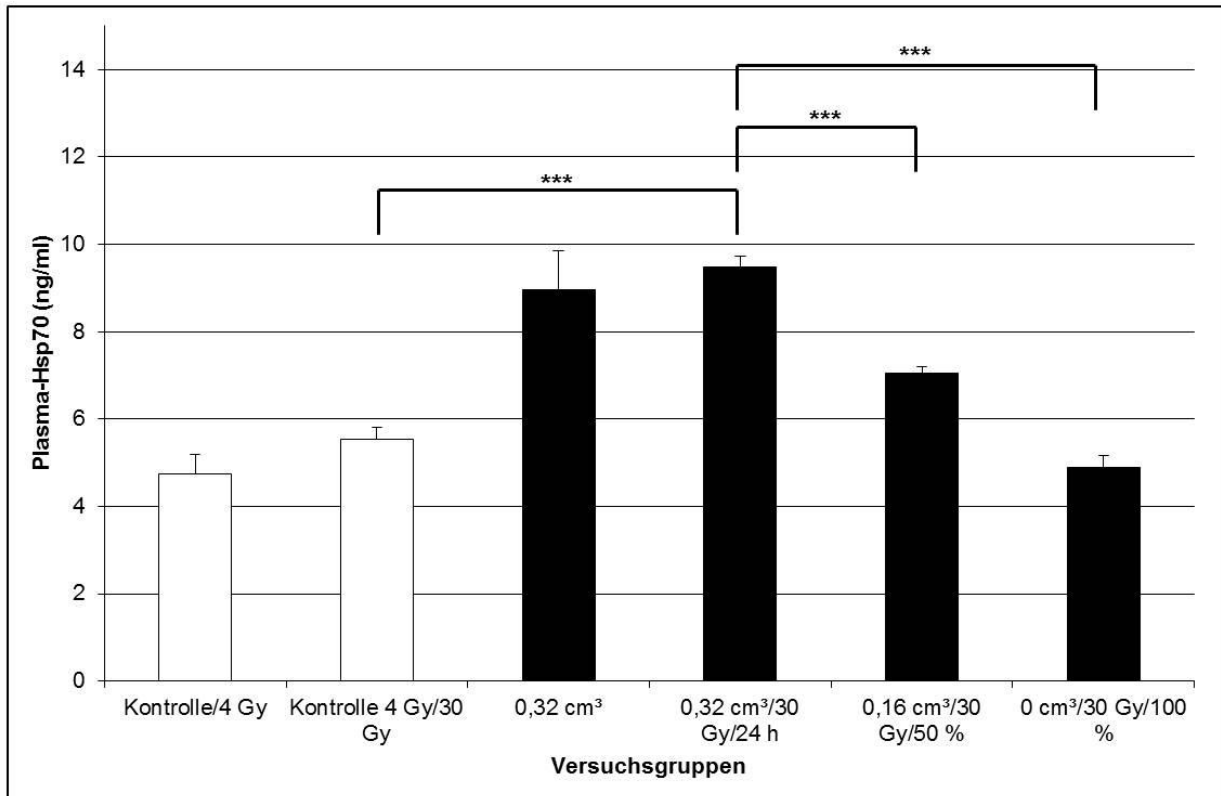


Abb. 21: Zusammenhang zwischen Tumorbestrahlung und Plasma-Hsp70. Dargestellt sind Mittelwerte (n=5) mit Standardfehler. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Zusammenfassend konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden (Abb. 20): 1. Plasma-Hsp70 korreliert mit Tumolvolumen und ist weder durch Tumorbestrahlung, hypoxische oder nekrotische Fraktion beeinflusst. 2. Die hypoxische Fraktion korreliert nicht mit Tumolvolumen, wohl aber mit Tumorbestrahlung. 3. Die nekrotische Fraktion korreliert mit Tumolvolumen und Tumorbestrahlung.

## 4. Ergebnisse

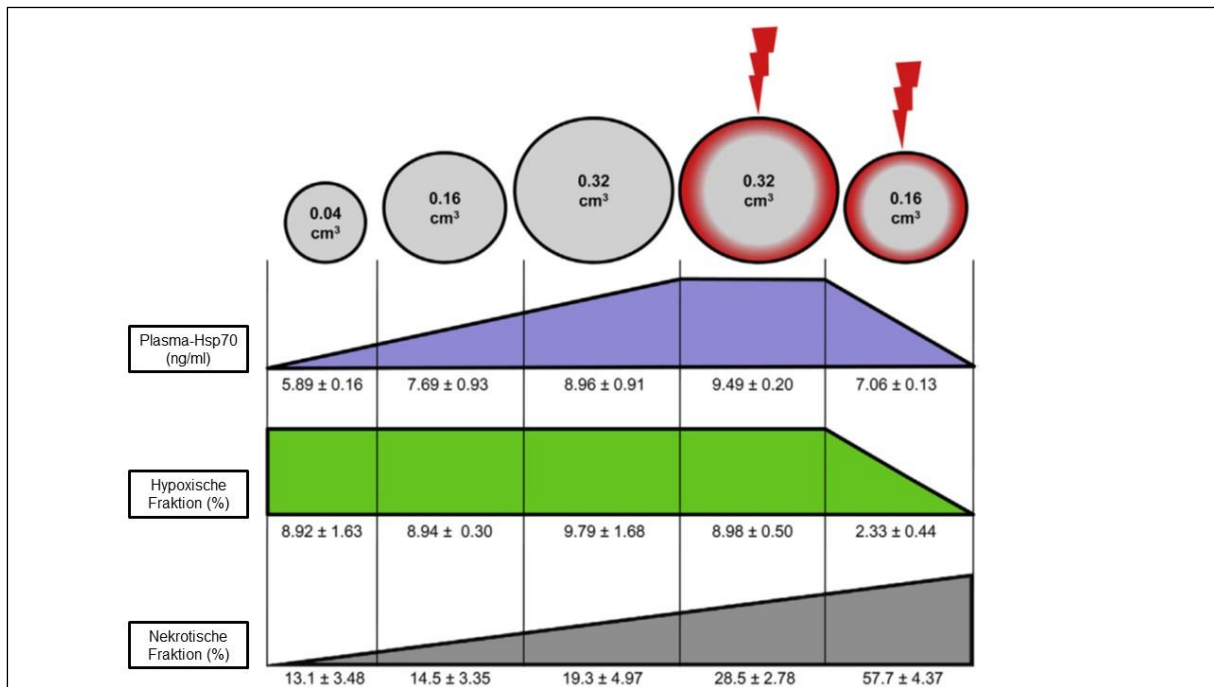


Abb. 22: Zusammenhang zwischen Tumornekrose (nekrotische Fraktion), Tumorphypoxie (hypoxische Fraktion) bzw. Plasma-Hsp70 und Tumolvolumen bzw. -bestrahlung. Dargestellt sind Mittelwerte (n=5) mit Standardfehler (geändert nach Bayer et al. 2014).

### 5. Diskussion

Meine Ergebnisse zeigen eine Korrelation zwischen Hsp70-Blutwerten und Tumolvolumen im humanen Kopf-Hals-Xenografftumormodell der Maus. Diese Korrelation besteht während des Tumorwachstums und der Tumorschrumpfung nach Bestrahlung. Analog zu unseren Daten am Tiermodell wurde festgestellt, dass bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren ein höherer Hsp70-Blutwert vorliegt als bei Gesunden, dieser Wert mit dem Tumolvolumen korreliert und daher nach Bestrahlung und Operation sank. Dabei konnten bei Tumoren mit starker Hsp70-Membranpositivität höhere Hsp70-Blutwerte festgestellt werden (Gehrmann et al. 2014). Auch Kleinjung et al. konnten an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren eine hohe Membranpositivität von 73% nachweisen (Kleinjung et al. 2003). Dies erklärt auch meine relativ hohen Hsp70-Blutwerte bei Tumoren, da die Membranpositivität der humanen FaDu-Xenografftumoren über 90% betrug. Da ich bereits einen signifikant erhöhten Blutwert von Hsp70 bei sehr kleinen Tumoren von 0,04 cm<sup>3</sup> nachgewiesen habe, könnte Hsp70 möglicherweise als früher Biomarker einer Tumorerkrankung eingesetzt werden. Breuninger et al. stellten ebenfalls erhöhte Hsp70-Blutwerte bei Patienten mit Glioblastom, Kopf-Hals-Tumoren, Kolonkarzinom, Leukämie und Pankreaskarzinom fest (Breuninger et al. 2014). Eine Korrelation mit dem Tumolvolumen wurde aber nicht untersucht. Zu bemerken ist, dass für diese Arbeit ein spezieller ELISA (lipHsp70), welcher durch den cmHsp70.1 Antikörper liposomales (exosomales) Hsp70 entdeckt, verwendet wurde. Dieser lipHsp70-ELISA detektiert freies Hsp70 vergleichbar zu konventionellen ELISAs, exosomales Hsp70 aber 10 x besser. Abschließend konnte in dieser Arbeit festgehalten werden, dass die Hsp70-Werte im Plasma und Serum vergleichbar sind. Gunther et al. konnten bei Patienten mit NSCLC (Non-small Cell Lung Cancer) ebenfalls eine Korrelation zwischen Hsp70-Blutwerten und dem Tumolvolumen herstellen (Gunther et al. 2015). In dieser Arbeit wurde ebenfalls der lipHsp70-ELISA verwendet. Mit einem konventionellen ELISA zeigten Zimmermann et al. an Patienten, dass eine Korrelation zwischen Hsp70-Blutwerten und der Erkrankung an NSCLC besteht, wobei keine Korrelation zum Stadium der Erkrankung gelang (Zimmermann et al. 2012). Unsere Arbeitsgruppe konnte darlegen, dass Mäuse mit Pankreaskarzinom erhöhte Hsp70-Blutwerte aufweisen (Bayer et al. 2014). Selbiges konnten Dutta et al. und Abe et al. an Patienten

mit Pankreaskarzinom bzw. Prostatakarzinom ermitteln (Abe et al. 2004; Dutta et al. 2012). Anhand der Hsp70-Blutwerte konnte in der Arbeit von Dutta et al. zwischen Gesunden, Patienten mit chronischer Pankreatitis und Patienten mit Pankreaskarzinom differenziert werden. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Gehrman et al., die herausfanden, dass Hsp70-Blutwerte bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom höher sind als bei Patienten mit chronischer Hepatitis (Gehrman et al. 2014). Yeh et al. fanden auch eine Korrelation zwischen Hsp70-Blutwerten und Tumolvolumen bei Leukämie, während Kocsis et al. erhöhte Hsp70-Blutwerte bei kolorektalen Tumoren feststellen konnten. In beiden Arbeiten waren erhöhte Hsp70-Blutwerte mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Kocsis et al. 2010; Yeh et al. 2010). Interessant ist auch der Ansatz Hsp70-Blutwerte als Monitoring von Hsp90-Inhibitoren zu verwenden (Induktion der Hsp70-Expression durch Hsp90-Inhibition) (Dakappagari et al. 2010).

Widersprüchliche Ergebnisse zeigen sich für Hsp70-Autoantikörperblutwerte als Biomarker bei Tumoren. Fujita et al. beschrieben erhöhte Hsp70-Autoantikörperblutwerte bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren, wobei in der selben Arbeit kein Unterschied zu den Gesunden bei Magenkarzinom und kolorektalem Karzinom festgestellt werden konnte (Fujita et al. 2008). Gehrman et al. konnten keine Korrelation zwischen Tumolvolumen und Hsp70-Autoantikörperblutwerten an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren festhalten (Gehrman et al. 2014).

Des Weiteren zeigen meine Ergebnisse, dass kein signifikanter Einfluss der Bein-, Ganzkörper- oder Tumorbestrahlung auf die Hsp70-Blutwerte besteht. Der jeweils geringe nicht signifikante Anstieg der Hsp70-Blutwerte nach Bestrahlung könnte durch sterbende Zellen entstanden sein. Im Gegensatz dazu konnten Hurwitz et al. eine signifikante Steigerung der Blutwerte von Hsp70 nach Ganzkörperbestrahlung von Mäusen mit Prostatakarzinom feststellen (Hurwitz et al. 2010).

Das von mir benutzte humane FaDu-Xenograftmodell der Maus wird häufig benutzt um die Resultate einer Strahlentherapie zu verfolgen (Baumann et al. 1994).

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, dass die Hsp70-Blutwerte nicht durch Tumornekrose oder Tumorphoxie beeinflusst werden. Maftai et al. zeigten im identischen Tumormodell bei ähnlichem Tumolvolumen ( $0,16\text{cm}^3$ - $0,48\text{cm}^3$ ) vergleichbare Werte der nekrotischen Fraktion der Tumoren (30%-55%) (Maftai et al. 2012). Zudem erarbeiteten Maftai et al. in diesem Tumormodell bei kleinerem Tumolvolumen ( $0,16$ ) und anderem Bestrahlungsmodus (fraktioniert) vergleichbare

Werte der nekrotischen Fraktion der Tumoren vor und nach Bestrahlung (9% gegenüber 35%) (Maftei, Bayer, et al. 2011). Im Gegensatz zu mir ermittelten Maftei et al. bei steigendem Tumolvolumen (0,16 cm<sup>3</sup>-0,48cm<sup>3</sup>) fallende Werte der hypoxischen Fraktion der Tumoren (60%-40%) (Maftei et al. 2012). Trotz oben erwähntem, modifizierten Tumolvolumen und Bestrahlungsmodus konnten von Maftei et al. ähnliche Werte der hypoxischen Fraktion der Tumoren vor und nach Bestrahlung ermittelt werden (36%-21%). Die Vergleiche mit Maftei et al. bestätigen, dass meine Ermittlung der Tumornekrose und Tumorphoxie zuverlässig ist. Zudem ist zu beachten, dass Hsp70 in deutlich höherem Maße aktiv von lebenden Tumorzellen als passiv aus nekrotischem Gewebe in das Blut abgegeben wird (Mambula et al. 2007). Da Hsp70 in vielen Tumoren überexprimiert ist und von Tumorzellen aktiv sezerniert wird, ist zu erwarten, dass Hsp70 als Biomarker im Blut vieler Tumoren nachweisbar ist (Ciocca and Calderwood 2005; Pockley et al. 2014). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erschienene Publikation ist die erste Arbeit die einen Zusammenhang zwischen Hsp70-Blutwerten und dem Tumolvolumen eines soliden Tumors am Beispiel von Kopf-Hals-Tumoren beschreibt (Bayer et al. 2014). Weitere Studien mit mehr Patienten müssen zeigen, ob Hsp70 als Biomarker zur Diagnosestellung und Verlaufskontrolle unter Therapie bei Tumoren herangezogen werden kann und eine klare Differenzierung zu Gesunden möglich ist (Pockley und Henderson 2018).

### 6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es eine Korrelation zwischen Tumorzellen und Plasma-Hsp70 am Mausmodell mit menschlichen Kopf-Hals-Xenografttumoren festzustellen. Diese Korrelation konnte gezeigt werden. Mit steigendem Tumorzellen erhöhte sich auch Plasma-Hsp70. Ein Einfluss der nötigen Ganzkörperbestrahlung der Mäuse auf die Plasma-Hsp70 konnte ausgeschlossen werden. Mit sinkendem Tumorzellen durch Tumorzellen erniedrigte sich ebenfalls Plasma-Hsp70. Das erreichte nach vollständigem Tumorzellen wieder das Niveau der Kontrollen. Ein Einfluss der Tumorzellen an sich auf Plasma-Hsp70 konnte ausgeschlossen werden. Da sowohl Tumorzellen als auch Tumorzellen Plasma-Hsp70 beeinflussen können, wurden diese Parameter auch untersucht. Es konnte ermittelt werden, dass sich die Tumorzellen mit steigendem Tumorzellen und durch Tumorzellen erhöht. Es zeigte sich, dass die Tumorzellen bei steigendem Tumorzellen gleich bleibt und durch Tumorzellen abnimmt. Eine Beeinflussung von Plasma-Hsp70 durch Tumorzellen oder Tumorzellen bestand nicht. Plasma-Hsp70 kann daher als tumorspezifischer Biomarker von menschlichen Kopf-Hals-Xenografttumoren verwendet werden. Weitere klinische Studien sind erforderlich um diese Erkenntnis zu einer möglichen klinischen Anwendung zu führen.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ADD70	AIF-Derived Decoy For Hsp70
ADP	Adenosindiphosphat
AFN	Atipamezol, Flumazenil, Naloxon
AIF	Apoptosis-inducing Factor
Ak	Antikörper
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
As	Aminosäure
ASK-1	Apoptosis Signal-regulating Kinase-1
ATP	Adenosintriphosphat
AuNP	Goldnanopartikel
BAG-1	BCL2-associated Athanogene
BIP	Binding Immunoglobulin Protein
B-Zelle	“Bone marrow”, “Bursa fabricii”
CCT	Chaperonin Containing Tailless Complex Polypeptide
CD91	Cluster Of Differentiation 91
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CHIP	Carboxy Terminus Of Hsp70-interacting Protein
FOXP1	Forkhead Box Protein N1
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DISC	Death-inducing Signaling Complex
DPBS	Dulbecco’s Phosphate-buffered Saline
EEVD	E=Glutamat, V=Valin, D=Aspartat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
Ex	Exosomen
FCS	Fetal Calf Serum
FEEL-1	Fasciclin, EGF-like, Laminin-type EGF-like and Link Domain-containing Scavenger Receptor-1
FITC	Fluoresceinisothiocyanat



## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

FGF-1/2	Fibroblast Growth Factor-1/2
Gb3	Globotriaosylceramid
GRP	Glucose-related Protein
HE	Hämatoxylin/Eosin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$
Hip	Hsp70-interacting Protein
Hop	Hsp70/Hsp90-organizing Protein
Hsc	Heat Shock Cognate
HSF	Heat Shock Factor
Hsp/HSP	Hitzeschockprotein
HSPB1	Heat Shock Protein Family B Member 1
Hum	Human
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin-1
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KDEL	K=Lysin, D=Aspartat, E=Glutamat, L=Leucin
LDL	Low-density Lipoprotein
lipHsp70	Liposomales Hsp70
LOK	Lokalisationssequenz
LOX-1	Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1
LRP1	Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1
LUCA	last universal common ancestor
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
mHsp70	Membrangebundenes Hsp70
Mi	Mikrosomen
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domain-like Pseudokinase
MMF	Medetomidin, Midazolam, Fentanyl
MMP-2/9	Matrixmetalloproteinase-2/9

## 7. Abkürzungsverzeichnis

---

MNP	Magnetische Nanopartikel
Mot	Mortalin
Mt	Mitochondrial
mTORC	Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
NBD	Nukleotidbindedomäne
NEAA	Non-essential Amino Acids
NO	Stickstoffoxid
NF-IL6	Nuclear Factor Interleukin 6
NF-κB	Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer Of Activated B-cells
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NSCLC	Non-small Cell Lung Cancer
Nu	Nucleus
PES	Phenylethylsulfonamid
PET	Positronenemissionstomographie
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PS	Phosphatidylserin
P/S	Penicillin/Streptomycin
RIPK1/3	Receptor Interacting Protein Kinase1/3
SBD	Substratbindedomäne
SIGLEC	Sialic Acid-binding Immunoglobulin-like Lectin
SPION	Supraparamagnetische Eisenoxidnanopartikel
SPSS 20	Statistical Package For The Social Sciences 20
SREC-I	Scavenger Receptor Expressed By Endothelial Cells
STAT1/3	Signal Transducer And Activator Of Transcription 1/3
TMB	Tetramethylbenzidin
TLR-2/4	Toll-like Receptor-2/4
T-Zelle	“Thymus”
VAR	Variabel
Zm	Zellmembran
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung
Zy	Zytosol

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung/Tabelle</b>	<b>Name</b>	<b>Seite</b>
Tab. 1	Gliederung der humanen Hsp70-Familie	7
Abb. 1	Struktur der Hitzeschockprotein 70-Familie	9
Abb. 2	Aufgaben von Hsp70 in malignen Tumoren (ohne Chaperonfunktion)	12
Abb. 3	Immunoregulatorische Rolle von Hsp70	14
Tab. 2	Materialverzeichnis	18
Abb. 4	Struktur des Vorversuchs	20
Abb. 5	Struktur des Hauptversuchs	21
Abb. 6	CrI:NMRI-Foxn1 <sup>nu</sup> -Maus	22
Abb. 7	Bestrahlungskäfig für die Ganzkörperbestrahlung	23
Tab. 3	Zusammensetzung von Narkosemittel und Antagonist für die Tumorzelltransplantation	24
Abb. 8	Ultraschallaufnahme eines Tumors	25
Abb. 9	Bestrahlungskäfig für die Tumor- und Beinbestrahlung	26
Abb. 10	Schnittschema der Tumoren	27
Tab. 4	Schema der Immunfluoreszenzfärbung	28
Tab. 5	Schema der HE-Färbung	28
Abb. 11	Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Tumors	30
Abb. 12	Hellfeldmikroskopische Aufnahme eines Tumors	31
Abb. 13	Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Tumors mit Masken	32
Abb. 14	Schema des Hsp70-ELISA	33
Tab. 6	Signifikanzniveaus in Abhängigkeit des p-Werts	34
Abb. 15	Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und Tumornekrose (nekrotische Fraktion)	35
Abb. 16	Zusammenhang zwischen Tumorbestrahlung und Tumornekrose (nekrotische Fraktion)	36
Abb. 17	Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und Tumorhypoxie (hypoxische Fraktion)	37
Abb. 18	Zusammenhang zwischen Tumorbestrahlung und Tumorhypoxie (hypoxische Fraktion)	38
Abb. 19	Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und Plasma-Hsp70 der Kontroll- und Tumorguppen	39
Abb. 20	Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und Plasma-Hsp70 der einzelnen Kontrollen und Tumoren	40
Abb. 21	Zusammenhang zwischen Tumorbestrahlung und Plasma-Hsp70	41

## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

---

Abb. 22	Zusammenhang zwischen Tumornekrose (nekrotischer Fraktion), Tumorhypoxie (hypoxische Fraktion) bzw. Plasma-Hsp70 und Tumolvolumen bzw. -bestrahlung	42
---------	---	----

## 9. Literaturverzeichnis

- Abe, Miyako, Judith B. Manola, William K. Oh, Diane L. Parslow, Daniel J. George, Carolyn L. Austin, and Philip W. Kantoff. 2004. "Plasma Levels of Heat Shock Protein 70 in Patients with Prostate Cancer: A Potential Biomarker for Prostate Cancer." *Clinical Prostate Cancer*.
- Åkerfelt, Malin, Richard I. Morimoto, and Lea Sistonen. 2010. "Heat Shock Factors: Integrators of Cell Stress, Development and Lifespan." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.
- Ananthan, Jayakumar, Alfred L. Goldberg, and Richard Voellmy. 1986. "Abnormal Proteins Serve as Eukaryotic Stress Signals and Trigger the Activation of Heat Shock Genes." *Science*.
- Anckar, Julius, and Lea Sistonen. 2007. "Heat Shock Factor 1 as a Coordinator of Stress and Developmental Pathways." *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
- Anckar, Julius, and Lea Sistonen. 2011. "Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease." *Annual Review of Biochemistry*.
- Arnold-Schild, Danièle, Daniel Hanau, Danièle Spehner, Claudia Schmid, Hans Georg Rammensee, Henri De La Salle, and Hansjörg Schild. 1999. "Cutting Edge: Receptor-Mediated Endocytosis of Heat Shock Proteins by Professional Antigen-Presenting Cells." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Asea, Alexzander, Stine Kathrein Kraeft, Evelyn A. Kurt-Jones, Mary Ann Stevenson, Lan Bo Chen, Robert W. Finberg, Gloria C. Koo, and Stuart K. Calderwood. 2000. "HSP70 Stimulates Cytokine Production through a CD 14-Dependant Pathway, Demonstrating Its Dual Role as a Chaperone and Cytokine." *Nature Medicine*.
- Ashburner, Michael. 1970. "Patterns of Puffing Activity in the Salivary Gland Chromosomes of Drosophila - V. Responses to Environmental Treatments." *Chromosoma*.
- Astner, S. T., K. Shi, P. Vaupel, and M. Molls. 2010. "Imaging of Tumor Physiology: Impacts on Clinical Radiation Oncology." *Experimental Oncology*.
- Balázs, Madaras, Horváth Zsolt, Gráf László, Gálffy Gabriella, Tamási Lilla, Ostoros Gyula, Döme Balázs, Mórocz Éva, Bártfai Zoltán, Prohászka Zoltán, and Kocsis Judit. 2017. "Serum Heat Shock Protein 70, as a Potential Biomarker for Small Cell Lung Cancer." *Pathology and Oncology Research*.
- Bardwell, J. C. A., and E. A. Craig. 1984. "Major Heat Shock Gene of Drosophila and the Escherichia Coli Heat-Inducible DnaK Gene Are Homologous." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Basu, Sreyashi, Robert J. Binder, Thirumalai Ramalingam, and Pramod K. Srivastava. 2001. "CD91 Is a Common Receptor for Heat Shock Proteins Gp96, Hsp90, Hsp70, and Calreticulin." *Immunity*.
- Basu, Sreyashi, Robert J. Binder, Ryuichiro Suto, Kirstin M. Anderson, and Pramod K. Srivastava. 2000. "Necrotic but Not Apoptotic Cell Death Releases Heat Shock Proteins, Which Deliver a Partial Maturation Signal to Dendritic Cells and Activate the NF-KB Pathway." *International Immunology*.

- Baumann, Michael, Cordula Liertz, Heinz Baisch, Thomas Wiegel, Jörn Lorenzen, and Hartmut Arps. 1994. "Impact of Overall Treatment Time of Fractionated Irradiation on Local Control of Human FaDu Squamous Cell Carcinoma in Nude Mice." *Radiotherapy and Oncology*.
- Bausero, Maria A., Robert Gastpar, Gabriele Multhoff, and Alexzander Asea. 2005. "Alternative Mechanism by Which IFN- $\gamma$  Enhances Tumor Recognition: Active Release of Heat Shock Protein 72." *The Journal of Immunology*.
- Bayer, C., M. E. Liebhardt, T. E. Schmid, M. Trajkovic-Arsic, K. Hube, H. M. Specht, D. Schilling, M. Gehrmann, S. Stangl, J. T. Siveke, J. J. Wilkens, and G. Multhoff. 2014. "Validation of Heat Shock Protein 70 as a Tumor-Specific Biomarker for Monitoring the Outcome of Radiation Therapy in Tumor Mouse Models." *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 88(3).
- Bayer, Christine, Kuangyu Shi, Sabrina T. Astner, Constantin Alin Maftai, and Peter Vaupel. 2011. "Acute versus Chronic Hypoxia: Why a Simplified Classification Is Simply Not Enough." *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*.
- Beere, Helen M., Beni B. Wolf, Kelvin Cain, Dick D. Mosser, Artin Mahboubi, Tomomi Kuwana, Pankaj Tailor, Richard I. Morimoto, Gerald M. Cohen, and Douglas R. Green. 2000. "Heat-Shock Protein 70 Inhibits Apoptosis by Preventing Recruitment of Procaspase-9 to the Apaf-1 Apoptosome." *Nature Cell Biology*.
- Binder, R. J., R. Vatner, and Pramod Srivastava. 2004. "The Heat-Shock Protein Receptors: Some Answers and More Questions." *Tissue Antigens*.
- Breuninger, Stephanie, and Janina Erl. 2014. "Quantitative Analysis of Liposomal Heat Shock Protein 70 (Hsp70) in the Blood of Tumor Patients Using a Novel LipHsp70 ELISA." *Journal of Clinical & Cellular Immunology*.
- Brocchieri, Luciano, Everly Conway De Macario, and Alberto J. L. Macario. 2008. "Hsp70 Genes in the Human Genome: Conservation and Differentiation Patterns Predict a Wide Array of Overlapping and Specialized Functions." *BMC Evolutionary Biology*.
- Brodsky, Jeffrey L. 1999. "Selectivity of the Molecular Chaperone-Specific Immunosuppressive Agent 15-Deoxyspergualin. Modulation of HSC70 ATPase Activity without Compromising DnaJ Chaperone Interactions." *Biochemical Pharmacology*.
- Broquet, Alexis H., Ginette Thomas, Joëlle Masliah, Germain Trugnan, and Maria Bachelet. 2003. "Expression of the Molecular Chaperone Hsp70 in Detergent-Resistant Microdomains Correlates with Its Membrane Delivery and Release." *Journal of Biological Chemistry*.
- Brown, J. M. 1979. "Evidence for Acutely Hypoxic Cells in Mouse Tumours, and a Possible Mechanism of Reoxygenation." *British Journal of Radiology*.
- Bukau, Bernd, Jonathan Weissman, and Arthur Horwich. 2006. "Molecular Chaperones and Protein Quality Control." *Cell*.
- Calderwood, Stuart K., Jianlin Gong, and Ayesha Murshid. 2016. "Extracellular HSPs: The Complicated Roles of Extracellular HSPs in Immunity." *Frontiers in Immunology*.
- Calderwood, Stuart K., Md Abdul Khaleque, Douglas B. Sawyer, and Daniel R. Ciocca. 2006. "Heat Shock Proteins in Cancer: Chaperones of Tumorigenesis." *Trends in Biochemical Sciences*.
- Campbell, R. M., and C. G. Scanes. 1995. "Endocrine Peptides 'moonlighting' as

Immune Modulators: Roles for Somatostatin and GH-Releasing Factor.” *Journal of Endocrinology*.

Chaplin, D. J., R. E. Durand, and P. L. Olive. 1986. “Acute Hypoxia in Tumors: Implications for Modifiers of Radiation Effects.” *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*.

Chimini, Giovanna, and Anna Rubartelli. 2005. “Novel Pathways of Protein Secretion.” in *Molecular Chaperones and Cell Signalling*.

Chou, Shihuh Dih, Thomas Prince, Jianlin Gong, and Stuart K. Calderwood. 2012. “MTOR Is Essential for the Proteotoxic Stress Response, HSF1 Activation and Heat Shock Protein Synthesis.” *PloS One*.

Ciocca, D. R., N. Cayado-Gutierrez, M. Maccioni, and F. D. Cuello-Carrion. 2012. “Heat Shock Proteins (HSPs) Based Anti-Cancer Vaccines.” *Current Molecular Medicine*.

Ciocca, Daniel R., and Stuart K. Calderwood. 2005. “Heat Shock Proteins in Cancer: Diagnostic, Prognostic, Predictive, and Treatment Implications.” *Cell Stress and Chaperones*.

Colvin, Teresa A., Vladimir L. Gabai, Jianlin Gong, Stuart K. Calderwood, Hu Li, Suryaram Gummuluru, Olga N. Matchuk, Svetlana G. Smirnova, Nina V. Orlova, Irina A. Zamulaeva, Mikel Garcia-Marcos, Xiaokai Li, Z. T. Young, Jennifer N. Rauch, Jason E. Gestwicki, Shinichi Takayama, and Michael Y. Sherman. 2014. “Hsp70-Bag3 Interactions Regulate Cancer-Related Signaling Networks.” *Cancer Research*.

Craig, E. A. 1985. “The Stress Response: Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress.” *Science*.

Cui, Yanna, Meng Zhang, Feng Zeng, Hongyue Jin, Qin Xu, and Yongzhuo Huang. 2016. “Dual-Targeting Magnetic PLGA Nanoparticles for Codelivery of Paclitaxel and Curcumin for Brain Tumor Therapy.” *ACS Applied Materials and Interfaces*.

Dakappagari, Naveen, Laura Neely, Shabnam Tangri, Karen Lundgren, Lori Hipolito, Annalee Estrellado, Francis Burrows, and Hong Zhang. 2010. “An Investigation into the Potential Use of Serum Hsp70 as a Novel Tumour Biomarker for Hsp90 Inhibitors.” *Biomarkers*.

Daugaard, Mads, Mikkel Rohde, and Marja Jäättelä. 2007. “The Heat Shock Protein 70 Family: Highly Homologous Proteins with Overlapping and Distinct Functions.” *FEBS Letters*.

Deatsch, Alison E., and Benjamin A. Evans. 2014. “Heating Efficiency in Magnetic Nanoparticle Hyperthermia.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*.

Dewhirst, Mark W. 2009. “Relationships between Cycling Hypoxia, HIF-1, Angiogenesis and Oxidative Stress.” *Radiation Research*.

Dutta, Sudhir K., Mohit Girotra, Montish Singla, Anand Dutta, F. Otis Stephen, Padmanabhan P. Nair, and Nipun B. Merchant. 2012. “Serum HSP70: A Novel Biomarker for Early Detection of Pancreatic Cancer.” *Pancreas*.

Dworniczak, Bernd, and Marc Edouard Mirault. 1987. “Structure and Expression of a Human Gene Coding for a 71 Kd Heat Shock ‘cognate’ Protein.” *Nucleic Acids Research*.

Evdonin, Anton L., Irina V. Guzhova, Boris A. Margulis, and Natalia D. Medvedeva. 2004. “Phospholipase c Inhibitor, U73122, Stimulates Release of Hsp-70 Stress Protein

from A431 Human Carcinoma Cells.” *Cancer Cell International*.

Evdonin, Anton L., Marina G. Martynova, Olga A. Bystrova, Irina V. Guzhova, Boris A. Margulis, and Natalia D. Medvedeva. 2006. “The Release of Hsp70 from A431 Carcinoma Cells Is Mediated by Secretory-like Granules.” *European Journal of Cell Biology*.

Faraji, M., Y. Yamini, and M. Rezaee. 2010. “Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications.” *Journal of the Iranian Chemical Society*.

Flaherty, Kevin M., Camilla DeLuca-Flaherty, and David B. McKay. 1990. “Three-Dimensional Structure of the ATPase Fragment of a 70K Heat-Shock Cognate Protein.” *Nature*.

Fong, Jerry J., Karthik Sreedhara, Liwen Deng, Nissi M. Varki, Takashi Angata, Qinglian Liu, Victor Nizet, and Ajit Varki. 2015. “Immunomodulatory Activity of Extracellular Hsp70 Mediated via Paired Receptors Siglec-5 and Siglec-14.” *The EMBO Journal*.

Fujimoto, Mitsuaki, and Akira Nakai. 2010. “The Heat Shock Factor Family and Adaptation to Proteotoxic Stress.” *FEBS Journal*.

Fujita, Yoshihisa, Toyofumi Nakanishi, Yoshiharu Miyamoto, Masako Hiramatsu, Hideaki Mabuchi, Akiko Miyamoto, Akira Shimizu, Takayuki Takubo, and Nobuhiko Tanigawa. 2008. “Proteomics-Based Identification of Autoantibody against Heat Shock Protein 70 as a Diagnostic Marker in Esophageal Squamous Cell Carcinoma.” *Cancer Letters*.

Gabai, Vladimir L., Anatoli B. Meriin, Dick D. Mosser, A. W. Caron, Sophia Rits, Victor I. Shifrin, and Michael Y. Sherman. 1997. “Hsp70 Prevents Activation of Stress Kinases: A Novel Pathway of Cellular Thermotolerance.” *Journal of Biological Chemistry*.

Galluzzi, Lorenzo, and Guido Kroemer. 2008. “Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis.” *Cell*.

Galluzzi, Lorenzo, Ilio Vitale, Stuart A. Aaronson, John M. Abrams, Dieter Adam, Patrizia Agostinis, Emad S. Alnemri, Lucia Altucci, Ivano Amelio, David W. Andrews, Margherita Annicchiarico-Petruzzelli, Alexey V. Antonov, Eli Arama, Eric H. Baehrecke, Nikolai A. Barlev, Nicolas G. Bazan, Francesca Bernassola, Mathieu J. M. Bertrand, Katuscia Bianchi, Mikhail V. Blagosklonny, Klas Blomgren, Christoph Borner, Patricia Boya, Catherine Brenner, Michelangelo Campanella, Eleonora Candi, Didac Carmona-Gutierrez, Francesco Cecconi, Francis K. M. Chan, Navdeep S. Chandel, Emily H. Cheng, Jerry E. Chipuk, John A. Cidlowski, Aaron Ciechanover, Gerald M. Cohen, Marcus Conrad, Juan R. Cubillos-Ruiz, Peter E. Czabotar, Vincenzo D’Angiolella, Ted M. Dawson, Valina L. Dawson, Vincenzo De Laurenzi, Ruggero De Maria, Klaus Michael Debatin, Ralph J. Deberardinis, Mohanish Deshmukh, Nicola Di Daniele, Francesco Di Virgilio, Vishva M. Dixit, Scott J. Dixon, Colin S. Duckett, Brian D. Dynlacht, Wafik S. El-Deiry, John W. Elrod, Gian Maria Fimia, Simone Fulda, Ana J. García-Sáez, Abhishek D. Garg, Carmen Garrido, Eviropidis Gavathiotis, Pierre Golstein, Eyal Gottlieb, Douglas R. Green, Lloyd A. Greene, Hinrich Gronemeyer, Atan Gross, Gyorgy Hajnoczky, J. Marie Hardwick, Isaac S. Harris, Michael O. Hengartner, Claudio Hetz, Hidenori Ichijo, Marja Jäättelä, Bertrand Joseph, Philipp J. Jost, Philippe P. Juin, William J. Kaiser, Michael Karin, Thomas Kaufmann, Oliver Kepp, Adi Kimchi, Richard N. Kitsis, Daniel J. Klionsky, Richard A. Knight, Sharad Kumar, Sam W. Lee,



John J. Lemasters, Beth Levine, Andreas Linkermann, Stuart A. Lipton, Richard A. Lockshin, Carlos López-Otín, Scott W. Lowe, Tom Luedde, Enrico Lugli, Marion MacFarlane, Frank Madeo, Michal Malewicz, Walter Malorni, Gwenola Manic, Jean Christophe Marine, Seamus J. Martin, Jean Claude Martinou, Jan Paul Medema, Patrick Mehlen, Pascal Meier, Sonia Melino, Edward A. Miao, Jeffery D. Molkenkin, Ute M. Moll, Cristina Muñoz-Pinedo, Shigekazu Nagata, Gabriel Nuñez, Andrew Oberst, Moshe Oren, Michael Overholtzer, Michele Pagano, Theocharis Panaretakis, Manolis Pasparakis, Josef M. Penninger, David M. Pereira, Shazib Pervaiz, Marcus E. Peter, Mauro Piacentini, Paolo Pinton, Jochen H. M. Prehn, Hamsa Puthalakath, Gabriel A. Rabinovich, Markus Rehm, Rosario Rizzuto, Cecilia M. P. Rodrigues, David C. Rubinsztein, Thomas Rudel, Kevin M. Ryan, Emre Sayan, Luca Scorrano, Feng Shao, Yufang Shi, John Silke, Hans Uwe Simon, Antonella Sistigu, Brent R. Stockwell, Andreas Strasser, Gyorgy Szabadkai, Stephen W. G. Tait, Daolin Tang, Nektarios Tavernarakis, Andrew Thorburn, Yoshihide Tsujimoto, Boris Turk, Tom Vanden Berghe, Peter Vandenabeele, Matthew G. Vander Heiden, Andreas Villunger, Herbert W. Virgin, Karen H. Vousden, Domagoj Vucic, Erwin F. Wagner, Henning Walczak, David Wallach, Ying Wang, James A. Wells, Will Wood, Junying Yuan, Zahra Zakeri, Boris Zhivotovsky, Laurence Zitvogel, Gerry Melino, and Guido Kroemer. 2018. "Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the NCCD 2018." *Cell Death and Differentiation*.

Gao, Baochong, and Min Fu Tsan. 2003. "Endotoxin Contamination in Recombinant Human Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Preparation Is Responsible for the Induction of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Release by Murine Macrophages." *Journal of Biological Chemistry*.

Gao, Yanhong, Cui Han, Huang Huang, Yinqiang Xin, Yimiao Xu, Lan Luo, and Zhimin Yin. 2010. "Heat Shock Protein 70 Together with Its Co-Chaperone CHIP Inhibits TNF- $\alpha$  Induced Apoptosis by Promoting Proteasomal Degradation of Apoptosis Signal-Regulating Kinase1." *Apoptosis*.

Gastpar, Robert, Mathias Gehrmann, Maria A. Bausero, Alexzander Asea, Catharina Gross, Josef A. Schroeder, and Gabriele Multhoff. 2005. "Heat Shock Protein 70 Surface-Positive Tumor Exosomes Stimulate Migratory and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells." *Cancer Research*.

Gehrmann, M., J. Marienhagen, H. Eichholtz-Wirth, E. Fritz, J. Ellwart, M. Jäättelä, T. Zilch, and Gabriele Multhoff. 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*.

Gehrmann, Mathias, Melchiorre Cervello, Giuseppe Montalto, Francesco Cappello, Alessandro Gulino, Clemens Knappe, Hanno M. Specht, and Gabriele Multhoff. 2014. "Heat Shock Protein 70 Serum Levels Differ Significantly in Patients with Chronic Hepatitis, Liver Cirrhosis, and Hepatocellular Carcinoma." *Frontiers in Immunology*.

Gehrmann, Mathias K., Melanie A. Kimm, Stefan Stangl, Thomas E. Schmid, Peter B. Noël, Ernst J. Rummeny, and Gabriele Multhoff. 2015. "Imaging of Hsp70-Positive Tumors with CmHsp70.1 Antibody-Conjugated Gold Nanoparticles." *International Journal of Nanomedicine*.

Gehrmann, Mathias, Gerhard Liebisch, Gerd Schmitz, Robin Anderson, Claudia Steinem, Antonio De Maio, Graham Pockley, and Gabriele Multhoff. 2008. "Tumor-Specific Hsp70 Plasma Membrane Localization Is Enabled by the Glycosphingolipid Gb3." *PLoS ONE*.

- Gehrmann, Mathias, Jürgen Radons, Michael Molls, and Gabriele Multhoff. 2008. "The Therapeutic Implications of Clinically Applied Modifiers of Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Expression by Tumor Cells." *Cell Stress and Chaperones*.
- Gehrmann, Mathias, Hanno M. Specht, Christine Bayer, Markus Brandstetter, Barbara Chizzali, Marciana Duma, Stephanie Breuninger, Kathrin Hube, Sophie Lehnerer, Valerie van Phi, Eva Sage, Thomas E. Schmid, Michael Sedelmayr, Daniela Schilling, Wolfgang Sievert, Stefan Stangl, and Gabriele Multhoff. 2014. "Hsp70 - A Biomarker for Tumor Detection and Monitoring of Outcome of Radiation Therapy in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck." *Radiation Oncology*.
- Gehrmann, Mathias, Stefan Stangl, Andreas Kirschner, Gemma A. Foulds, Wolfgang Sievert, Brigitte T. Doß, Axel Walch, Alan G. Pockley, and Gabriele Multhoff. 2012. "Immunotherapeutic Targeting of Membrane Hsp70-Expressing Tumors Using Recombinant Human Granzyme B." *PLoS ONE*.
- Gehrmann, Matthias, Karin Pfister, Peter Hutzler, Robert Gastpar, Boris Margulis, and Gabriele Multhoff. 2002. "Effects of Antineoplastic Agents on Cytoplasmic and Membrane-Bound Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Levels." *Biological Chemistry*.
- Glansdorff, N. 2000. "About the Last Common Ancestor, the Universal Life-Tree and Lateral Gene Transfer: A Reappraisal." *Molecular Microbiology*.
- Greene, J. M., Z. Larin, I. C. Taylor, H. Prentice, K. A. Gwinn, and R. E. Kingston. 1987. "Multiple Basal Elements of a Human Hsp70 Promoter Function Differently in Human and Rodent Cell Lines." *Molecular and Cellular Biology*.
- Gross, Catharina, Walter Koelch, Antonio DeMaio, Nelson Arispe, and Gabriele Multhoff. 2003. "Cell Surface-Bound Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Mediates Perforin-Independent Apoptosis by Specific Binding and Uptake of Granzyme B." *Journal of Biological Chemistry*.
- Gunther, Sophie, Christian Ostheimer, Stefan Stangl, Hanno M. Specht, Petra Mozes, Moritz Jesinghaus, Dirk Vordermark, Stephanie E. Combs, Friedhelm Peltz, Max P. Jung, and Gabriele Multhoff. 2015. "Correlation of Hsp70 Serum Levels with Gross Tumor Volume and Composition of Lymphocyte Subpopulations in Patients with Squamous Cell and Adeno Non-Small Cell Lung Cancer." *Frontiers in Immunology*.
- Guo, Fei, Celia Sigua, Purva Bali, Prince George, Warren Fiskus, Anna Scuto, Srinivas Annavarapu, Abdelmoughite Mouttaki, Gautam Sondarva, Sheng Wei, Jie Wu, Julie Djeu, and Kapil Bhalla. 2005. "Mechanistic Role of Heat Shock Protein 70 in Bcr-Abl-Mediated Resistance to Apoptosis in Human Acute Leukemia Cells." *Blood*.
- Gupta, Radhey S., and Bhag Singh. 1994. "Phylogenetic Analysis of 70 KD Heat Shock Protein Sequences Suggests a Chimeric Origin for the Eukaryotic Cell Nucleus." *Current Biology*.
- Gyrd-Hansen, Mads, Jesper Nylandsted, and Marja Jäättelä. 2004. "Heat Shock Protein 70 Promotes Cancer Cell Viability by Safeguarding Lysosomal Integrity." *Cell Cycle*.
- Han, Zhihua, Quynh A. Truong, Shirley Park, and Jan L. Breslow. 2003. "Two Hsp70 Family Members Expressed in Atherosclerotic Lesions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Hartl, F. Ulrich. 1996. "Molecular Chaperones in Cellular Protein Folding." *Nature*.
- Hemmingsen, Sean M., Carol Woolford, Saskia M. Van Der Vies, Kit Tilly, David T. Dennis, Costa P. Georgopoulos, Roger W. Hendrix, and R. John Ellis. 1988.

“Homologous Plant and Bacterial Proteins Chaperone Oligomeric Protein Assembly.” *Nature*.

Henderson, Brian, Stuart K. Calderwood, Anthony R. M. Coates, Irun Cohen, Willem Van Eden, Thomas Lehner, and A. Graham Pockley. 2010. “Caught with Their PAMPs down? The Extracellular Signalling Actions of Molecular Chaperones Are Not Due to Microbial Contaminants.” *Cell Stress and Chaperones*.

Henderson, Brian, and A. Graham Pockley. 2010. “Molecular Chaperones and Protein-Folding Catalysts as Intercellular Signaling Regulators in Immunity and Inflammation.” *Journal of Leukocyte Biology*.

Hightower, Lawrence E. 1980. “Cultured Animal Cells Exposed to Amino Acid Analogues or Puromycin Rapidly Synthesize Several Polypeptides.” *Journal of Cellular Physiology*.

Hightower, Lawrence E., and Peter T. Guidon. 1989. “Selective Release from Cultured Mammalian Cells of Heat-shock (Stress) Proteins That Resemble Glia-axon Transfer Proteins.” *Journal of Cellular Physiology*.

Holler, Nils, Rossana Zaru, Olivier Micheau, Margot Thome, Antoine Attinger, Salvatore Valitutti, Jean Luc Bodmer, Pascal Schneider, Brian Seed, and Jürg Tschopp. 2000. “Fas Triggers an Alternative, Caspase-8-Independent Cell Death Pathway Using the Kinase RIP as Effector Molecule.” *Nature Immunology*.

Horváth, Ibolya, Gabriele Multhoff, Alois Sonnleitner, and László Vígh. 2008. “Membrane-Associated Stress Proteins: More than Simply Chaperones.” *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*.

Hunt, C., and R. I. Morimoto. 1985. “Conserved Features of Eukaryotic Hsp70 Genes Revealed by Comparison with the Nucleotide Sequence of Human Hsp70.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Hurwitz, Mark D., Punit Kaur, Ganachari M. Nagaraja, Maria A. Bausero, Judith Manola, and Alexzander Asea. 2010. “Radiation Therapy Induces Circulating Serum Hsp72 in Patients with Prostate Cancer.” *Radiotherapy and Oncology*.

Jäättelä, Marja. 1999. “Heat Shock Proteins as Cellular Lifeguards.” *Annals of Medicine*.

Jeffery, Constance J. 2018. “Protein Moonlighting: What Is It, and Why Is It Important?” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.

Jiao, Delong, Zhenyu Cai, Swati Choksi, Dan Ma, Moran Choe, Hyung Joon Kwon, Jin Young Baik, Brian G. Rowan, Chengyu Liu, and Zheng Gang Liu. 2018. “Necroptosis of Tumor Cells Leads to Tumor Necrosis and Promotes Tumor Metastasis.” *Cell Research*.

Johnston, D., H. Oppermann, J. Jackson, and W. Levinson. 1980. “Induction of Four Proteins in Chick Embryo Cells by Sodium Arsenite.” *Journal of Biological Chemistry*.

Kampinga, Harm H., Jurre Hageman, Michel J. Vos, Hiroshi Kubota, Robert M. Tanguay, Elspeth A. Bruford, Michael E. Cheetham, Bin Chen, and Lawrence E. Hightower. 2009. “Guidelines for the Nomenclature of the Human Heat Shock Proteins.” *Cell Stress and Chaperones*.

Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. “Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics.” *British Journal of Cancer*.

- Key, J. L., C. Y. Lin, and Y. M. Chen. 1981. "Heat Shock Proteins of Higher Plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Kleinjung, Tobias, Olaf Arndt, Horst Jürgen Feldmann, Ulrike Bockmühl, Mathias Gehrman, Tanja Zilch, Karin Pfister, Johannes Schönberger, Jörg Marienhagen, Christoph Eilles, Lydia Rossbacher, and Gabriele Multhoff. 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*.
- Kocsis, Judit, Balázs Madaras, Éva Katalin Tóth, George Füst, and Zoltán Prohászka. 2010. "Serum Level of Soluble 70-KD Heat Shock Protein Is Associated with High Mortality in Patients with Colorectal Cancer without Distant Metastasis." *Cell Stress and Chaperones*.
- Kotoglou, Polychronis, Alexandras Kalaitzakis, Patra Vezyraki, Theodore Tzavaras, Lampros K. Michalis, Françoise Dantzer, Jae U. Jung, and Charalampos Angelidis. 2009. "Hsp70 Translocates to the Nuclei and Nucleoli, Binds to XRCC1 and PARP-1, and Protects HeLa Cells from Single-Strand DNA Breaks." *Cell Stress and Chaperones*.
- Krause, Stefan W., Robert Gastpar, Reinhard Andreesen, Catharina Gross, Heidrun Ullrich, Gerald Thonigs, Karin Pfister, and Gabriele Multhoff. 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*.
- Lancaster, Graeme I., and Mark A. Febbraio. 2005. "Exosome-Dependent Trafficking of HSP70: A Novel Secretory Pathway for Cellular Stress Proteins." *Journal of Biological Chemistry*.
- Lee, Jae Seon, Je Jung Lee, and Jeong Sun Seo. 2005. "HSP70 Deficiency Results in Activation of C-Jun N-Terminal Kinase, Extracellular Signal-Regulated Kinase, and Caspase-3 in Hyperosmolarity-Induced Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry*.
- Lee, Kyoung Jin, Mih Kim Yoo, Young Kim Dae, Dooil Jeoung, Kyuhyung Han, Seung Taek Lee, Yun Sil Lee, Han Park Kyeong, Hyun Park Jeong, Joong Kim Dae, and Jang Hee Hahn. 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 and Molecular Medicine*.
- Leu, J. I. J., Julia Pimkina, Amanda Frank, Maureen E. Murphy, and Donna L. George. 2009. "A Small Molecule Inhibitor of Inducible Heat Shock Protein 70." *Molecular Cell*.
- Leung, T. K. C., M. Y. Rajendran, C. Monfries, C. Hall, and L. Lim. 1990. "The Human Heat-Shock Protein Family: Expression of a Novel Heat-Inducible HSP70 (HSP70B') and Isolation of Its cDNA and Genomic DNA." *Biochemical Journal*.
- Leung, Thomas K. C., Christine Hall, Meera Rajendran, Nigel K. Spurr, and Louis Lim. 1992. "The Human Heat-Shock Genes HSPA6 and HSPA7 Are Both Expressed and Localize to Chromosome 1." *Genomics*.
- Lindquist, S. 1986. "The Heat-Shock Response." *Annual Review of Biochemistry*.
- Lindquist, S., and E. A. Craig. 1988. "The Heat-Shock Proteins." *Annual Review of Genetics*.
- Liu, Zheng Gang, and Delong Jiao. 2020. "Necroptosis, Tumor Necrosis and Tumorigenesis." *Cell Stress*.
- Maftai, C. A., C. Bayer, K. Shi, and P. Vaupel. 2012. "Intra-and Intertumor Heterogeneities in Total, Chronic, and Acute Hypoxia in Xenografted Squamous Cell

Carcinomas: Detection and Quantification Using (Immuno-)Fluorescence Techniques." *Strahlentherapie Und Onkologie*.

Maftei, Constantin Alin, Christine Bayer, Kuangyu Shi, Sabrina T. Astner, and Peter Vaupel. 2011. "Changes in the Fraction of Total Hypoxia and Hypoxia Subtypes in Human Squamous Cell Carcinomas upon Fractionated Irradiation: Evaluation Using Pattern Recognition in Microcirculatory Supply Units." *Radiotherapy and Oncology*.

Maftei, Constantin Alin, Kuangyu Shi, Christine Bayer, Sabrina T. Astner, and Peter Vaupel. 2011. "Comparison of (Immuno-)Fluorescence Data with Serial [18F]Fmiso PET/CT Imaging for Assessment of Chronic and Acute Hypoxia in Head and Neck Cancers." *Radiotherapy and Oncology*.

Magat, J., B. F. Jordan, G. O. Cron, and B. Gallez. 2010. "Noninvasive Mapping of Spontaneous Fluctuations in Tumor Oxygenation Using 19F MRI." *Medical Physics*.

Mambula, Salamatu S., and Stuart K. Calderwood. 2006. "Heat Shock Protein 70 Is Secreted from Tumor Cells by a Nonclassical Pathway Involving Lysosomal Endosomes." *The Journal of Immunology*.

Mambula, Salamatu S., Mary Ann Stevenson, Kishiko Ogawa, and Stuart K. Calderwood. 2007. "Mechanisms for Hsp70 Secretion: Crossing Membranes without a Leader." *Methods*.

Mendillo, Marc L., Sandro Santagata, Martina Koeva, George W. Bell, Rong Hu, Rulla M. Tamimi, Ernest Fraenkel, Tan A. Ince, Luke Whitesell, and Susan Lindquist. 2012. "HSF1 Drives a Transcriptional Program Distinct from Heat Shock to Support Highly Malignant Human Cancers." *Cell*.

Milarski, K. L., and R. I. Morimoto. 1986. "Expression of Human HSP70 during the Synthetic Phase of the Cell Cycle." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

Milner, Caroline M., and R. Duncan Campbell. 1990. "Structure and Expression of the Three MHC-Linked HSP70 Genes." *Immunogenetics*.

Mirault, M. E., M. Goldschmidt-Clermont, L. Moran, A. P. Arrigo, and A. Tissières. 1977. "The Effect of Heat Shock on Gene Expression in *Drosophila Melanogaster*." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.

Mizzen, L. A., C. Chang, J. I. Garrels, and W. J. Welch. 1989. "Identification, Characterization, and Purification of Two Mammalian Stress Proteins Present in Mitochondria, Grp 75, a Member of the Hsp 70 Family and Hsp 58, a Homolog of the Bacterial GroEL Protein." *Journal of Biological Chemistry*.

Moran, L., M. E. Mirault, A. P. Arrigo, M. Goldschmidt-Clermont, and A. Tissières. 1978. "Heat Shock of *Drosophila Melanogaster* Induces the Synthesis of New Messenger RNAs and Proteins." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*.

Morimoto, Richard I. 2011. "The Heat Shock Response: Systems Biology of Proteotoxic Stress in Aging and Disease." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.

Multhoff, G., K. Pfister, M. Gehrman, M. Hantschel, C. Gross, M. Hafner, and W. Hiddemann. 2001. "A 14-Mer Hsp70 Peptide Stimulates Natural Killer (NK) Cell Activity." *Cell Stress and Chaperones*.

Multhoff, Gabriele, Claus Botzler, Marion Wiesnet, Eva Müller, Thomas Meier, Wolfgang Wilmanns, and Rolf D. Issels. 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*.

Multhoff, Gabriele, and Lawrence E. Hightower. 1996. "Cell Surface Expression of Heat Shock Proteins and the Immune Response." *Cell Stress and Chaperones*.

Multhoff, Gabriele, Lee Mizzen, Christopher C. Winchester, Caroline M. Milner, Susanne Wenk, Guenther Eissner, Harm H. Kampinga, Barbara Laumbacher, and Judith Johnson. 1999. "Heat Shock Protein 70 (Hsp70) Stimulates Proliferation and Cytolytic Activity of Natural Killer Cells." *Experimental Hematology*.

Multhoff, Gabriele, and Jürgen Radons. 2012. "Radiation, Inflammation, and Immune Responses in Cancer." *Frontiers in Oncology*.

Munro, Sean, and Hugh R. B. Pelham. 1986. "An Hsp70-like Protein in the ER: Identity with the 78 Kd Glucose-Regulated Protein and Immunoglobulin Heavy Chain Binding Protein." *Cell*.

Munro, Sean, and Hugh R. B. Pelham. 1987. "A C-Terminal Signal Prevents Secretion of Luminal ER Proteins." *Cell*.

Nylandsted, Jesper, Mads Gyrd-Hansen, Agnieszka Danielewicz, Nicole Fehrenbacher, Ulrik Lademann, Maria Høyer-Hansen, Ekkehard Weber, Gabriele Multhoff, Mikkel Rohde, and Marja Jäättelä. 2004. "Heat Shock Protein 70 Promotes Cell Survival by Inhibiting Lysosomal Membrane Permeabilization." *Journal of Experimental Medicine*.

Parsian, A. J., J. E. Sheren, T. Y. Tao, P. C. Goswami, R. Malyapa, R. Van Rheeden, M. S. Watson, and C. R. Hunt. 2000. "The Human Hsp70B Gene at the HSPA7 Locus of Chromosome 1 Is Transcribed but Non-Functional." *Biochimica et Biophysica Acta*.

Pelham, H. R. 1984. "Hsp70 Accelerates the Recovery of Nucleolar Morphology after Heat Shock." *The EMBO Journal*.

Petri-Fink, Alke, and Heinrich Hofmann. 2007. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): From Synthesis to in Vivo Studies - A Summary of the Synthesis, Characterization, in Vitro, and in Vivo Investigations of SPIONs with Particular Focus on Surface and Colloidal Properties." *IEEE Transactions on Nanobioscience*.

Pfister, Karin, Jürgen Radons, Raymonde Busch, James G. Tidball, Michael Pfeifer, Lutz Freitag, Horst Jürgen Feldmann, Valeria Milani, Rolf Issels, and Gabriele Multhoff. 2007. "Patient Survival by Hsp70 Membrane Phenotype: Association with Different Routes of Metastasis." *Cancer*.

Pirkkala, Lila, Päivi Nykänen, and Lea Sistonen. 2001. "Roles of the Heat Shock Transcription Factors in Regulation of the Heat Shock Response and Beyond." *The FASEB Journal*.

Pockley, A. G., J. Shepherd, and J. M. Corton. 1998. "Detection of Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and Anti-Hsp70 Antibodies in the Serum of Normal Individuals." *Immunological Investigations*.

Pockley, A. Graham, Julie Bulmer, Brenka M. Hanks, and Barbara H. Wright. 1999. "Identification of Human Heat Shock Protein 60 (Hsp60) and Anti-Hsp60 Antibodies in the Peripheral Circulation of Normal Individuals." *Cell Stress and Chaperones*.

Pockley, A. Graham, and Brian Henderson. 2018. "Extracellular Cell Stress (Heat Shock) Proteins—Immune Responses and Disease: An Overview." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*.

---

- Pockley, A. Graham, Brian Henderson, and Gabriele Multhoff. 2014. "Extracellular Cell Stress Proteins as Biomarkers of Human Disease." *Biochemical Society Transactions*.
- Pockley, Alan Graham, Munitta Muthana, and Stuart K. Calderwood. 2008. "The Dual Immunoregulatory Roles of Stress Proteins." *Trends in Biochemical Sciences*.
- Qu, Baoge, Yiguo Jia, Yuanxun Liu, Hui Wang, Guangying Ren, and Hong Wang. 2015. "The Detection and Role of Heat Shock Protein 70 in Various Nondisease Conditions and Disease Conditions: A Literature Review." *Cell Stress and Chaperones*.
- Radons, Jürgen. 2016. "The Human HSP70 Family of Chaperones: Where Do We Stand?" *Cell Stress and Chaperones*.
- Ravagnan, Luigi, Sandeep Gurbuxani, Santos A. Susin, Carine Maise, Eric Daugas, Naoufal Zamzami, Tak Mak, Marja Jäättelä, Josef M. Penninger, Carmen Garrido, and Guido Kroemer. 2001. "Heat-Shock Protein 70 Antagonizes Apoptosis-Inducing Factor." *Nature Cell Biology*.
- Rérole, Anne Laure, Jessica Gobbo, Aurelie De Thonel, Elise Schmitt, Jean Paul Pais De Barros, Arlette Hammann, David Lanneau, Eric Fourmaux, Oleg Deminov, Olivier Micheau, Laurent Lagrost, Pierre Colas, Guido Kroemer, and Carmen Garrido. 2011. "Peptides and Aptamers Targeting HSP70: A Novel Approach for Anticancer Chemotherapy." *Cancer Research*.
- Ritossa, F. 1962. "A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila*." *Experientia*.
- Ritossa, F. 1996. "Discovery of the Heat Shock Response." *Cell Stress & Chaperones*.
- Scherz-Shouval, Ruth, Sandro Santagata, Marc L. Mendillo, Lynette M. Sholl, Irit Ben-Aharon, Andrew H. Beck, Dora Dias-Santagata, Martina Koeva, Salomon M. Stemmer, Luke Whitesell, and Susan Lindquist. 2014. "The Reprogramming of Tumor Stroma by HSF1 Is a Potent Enabler of Malignancy." *Cell*.
- Schlecht, Rainer, Sebastian R. Scholz, Heike Dahmen, Ansgar Wegener, Christian Sirrenberg, Djordje Musil, Joerg Bomke, Hans Michael Eggenweiler, Matthias P. Mayer, and Bernd Bukau. 2013. "Functional Analysis of Hsp70 Inhibitors." *PLoS ONE*.
- Schmid, T. E., and G. Multhoff. 2012. "Radiation-Induced Stress Proteins - the Role of Heat Shock Proteins (HSP) in Anti- Tumor Responses." *Current Medicinal Chemistry*.
- Schmitt, Elise, Arnaud Parcellier, Sandeep Gurbuxani, Celine Cande, Arlette Hammann, Maria Celia Morales, Clayton R. Hunt, David J. Dix, Romano T. Kroemer, Fabrizio Giordanetto, Marja Jäättelä, Josef M. Penninger, Alena Pance, Guido Kroemer, and Carmen Garrido. 2003. "Chemosensitization by a Non-Apoptogenic Heat Shock Protein 70-Binding Apoptosis-Inducing Factor Mutant." *Cancer Research*.
- Semenza, Gregg L. 2002. "HIF-1 and Tumor Progression: Pathophysiology and Therapeutics." *Trends in Molecular Medicine*.
- Shamovsky, I., and E. Nudler. 2008. "New Insights into the Mechanism of Heat Shock Response Activation." *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Sharma, Sandeep K., Paolo De Los Rios, Philipp Christen, Ariel Lustig, and Pierre Goloubinoff. 2010. "The Kinetic Parameters and Energy Cost of the Hsp70 Chaperone as a Polypeptide Unfoldase." *Nature Chemical Biology*.
- Shevtsov, Maxim A., Boris P. Nikolaev, Vyacheslav A. Ryzhov, Ludmila Y. Yakovleva, Yaroslav Y. Marchenko, Marina A. Parr, Valerij I. Rolich, Anastasiya L. Mikhrina,

- Anatolii V. Dobrodumov, Emil Pitkin, and Gabriele Multhoff. 2015. "Ionizing Radiation Improves Glioma-Specific Targeting of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Conjugated with CmHsp70.1 Monoclonal Antibodies (SPION-CmHsp70.1)." *Nanoscale*.
- Shevtsov, Maxim A., Boris P. Nikolaev, Liudmila Y. Yakovleva, Marina A. Parr, Yaroslav Y. Marchenko, Igor Eliseev, Anatolii V. Dobrodumov, Olga Zlobina, Alexander Zhakhov, Alexander M. Ischenko, Emil Pitkin, and Gabriele Multhoff. 2015. "70-KDa Heat Shock Protein Coated Magnetic Nanocarriers as a Nanovaccine for Induction of Anti-Tumor Immune Response in Experimental Glioma." *Journal of Controlled Release*.
- Shevtsov, Maxim A., Ludmila Y. Yakovleva, Boris P. Nikolaev, Yaroslav Y. Marchenko, Anatolii V. Dobrodumov, Kirill V. Onokhin, Yana S. Onokhina, Sergey A. Selkov, Anastasiia L. Mikhrina, Irina V. Guzhova, Marina G. Martynova, Olga A. Bystrova, Alexander M. Ischenko, and Boris A. Margulis. 2014. "Tumor Targeting Using Magnetic Nanoparticle Hsp70 Conjugate in a Model of C6 Glioma." *Neuro-Oncology*.
- Shevtsov, Maxim, and Gabriele Multhoff. 2016. "Heat Shock Protein-Peptide and HSP-Based Immunotherapies for the Treatment of Cancer." *Frontiers in Immunology*.
- Specht, Hanno M., Norbert Ahrens, Christiane Blankenstein, Thomas Duell, Rainer Fietkau, Udo S. Gaipl, Christine Günther, Sophie Gunther, Gregor Habl, Hubert Hautmann, Matthias Hautmann, Rudolf M. Huber, Michael Molls, Robert Offner, Claus Rödel, Franz Rödel, Martin Schuetz, Stephanie E. Combs, and Gabriele Multhoff. 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*.
- Stangl, Stefan, Mathias Gehrman, Julia Riegger, Kristin Kuhs, Isabelle Riederer, Wolfgang Sievert, Kathrin Hube, Ralph Mocikat, Ralf Dressel, Elisabeth Kremmer, Alan G. Pockley, Lars Friedrich, Laszlo Vigh, Arne Skerra, and Gabriele Multhoff. 2011. "Targeting Membrane Heat-Shock Protein 70 (Hsp70) on Tumors by CmHsp70.1 Antibody." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Stankiewicz, Adam R., Guillaume Lachapelle, Cheryl P. Z. Foo, Stefanie M. Radicioni, and Dick D. Mosser. 2005. "Hsp70 Inhibits Heat-Induced Apoptosis Upstream of Mitochondria by Preventing Bax Translocation." *Journal of Biological Chemistry*.
- Tavaria, Michael, Tim Gabriele, Ismail Kola, and Robin L. Anderson. 1996. "A Hitchhiker's Guide to the Human Hsp70 Family." *Cell Stress and Chaperones*.
- Thériault, Jimmy R., Hideki Adachi, and Stuart K. Calderwood. 2006. "Role of Scavenger Receptors in the Binding and Internalization of Heat Shock Protein 70." *The Journal of Immunology*.
- Thomlinson, R. H., and L. H. Gray. 1955. "The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy." *British Journal of Cancer*.
- Tilly, Kit, Niki McKittrick, Maciej Zylicz, and Costa Georgopoulos. 1983. "The DnaK Protein Modulates the Heat-Shock Response of Escherichia Coli." *Cell*.
- Tissières, Alfred, Herschel K. Mitchell, and Ursula M. Tracy. 1974. "Protein Synthesis in Salivary Glands of Drosophila Melanogaster: Relation to Chromosome Puffs." *Journal of Molecular Biology*.



- Tytell, M., S. G. Greenberg, and R. J. Lasek. 1986. "Heat Shock-like Protein Is Transferred from Glia to Axon." *Brain Research*.
- Vaupel, Peter. 2009. "Physiological Mechanisms of Treatment Resistance."
- Vaupel, Peter, Michael Höckel, and Arnulf Mayer. 2007. "Detection and Characterization of Tumor Hypoxia Using PO<sub>2</sub> Histograms." *Antioxidants and Redox Signaling*.
- Vaupel, Peter, and Arnulf Mayer. 2007. "Hypoxia in Cancer: Significance and Impact on Clinical Outcome." *Cancer and Metastasis Reviews*.
- Vaupel, Peter, Arnulf Mayer, and Michael Höckel. 2004. "Tumor Hypoxia and Malignant Progression." *Methods in Enzymology*.
- Vega, Virginia L., Monica Rodríguez-Silva, Tiffany Frey, Mathias Gehrman, Juan Carlos Diaz, Claudia Steinem, Gabriele Multhoff, Nelson Arispe, and Antonio De Maio. 2008. "Hsp70 Translocates into the Plasma Membrane after Stress and Is Released into the Extracellular Environment in a Membrane-Associated Form That Activates Macrophages." *The Journal of Immunology*.
- Wang, Kelin, Ellen Yorke, Sadek A. Nehme, John L. Humm, and C. Clifton Ling. 2009. "Modeling Acute and Chronic Hypoxia Using Serial Images of 18F-FMISO PET." *Medical Physics*.
- Westerheide, Sandy D., Julius Anckar, Stanley M. Stevens, Lea Sistonen, and Richard I. Morimoto. 2009. "Stress-Inducible Regulation of Heat Shock Factor 1 by the Deacetylase SIRT." *Science*.
- Williams, Darren R., Sung Kyun Ko, Sungjin Park, Myung Ryul Lee, and Injae Shin. 2008. "An Apoptosis-Inducing Small Molecule That Binds to Heat Shock Protein 70." *Angewandte Chemie - International Edition*.
- Wu, B., C. Hunt, and R. Morimoto. 1985. "Structure and Expression of the Human Gene Encoding Major Heat Shock Protein HSP70." *Molecular and Cellular Biology*.
- Yaglom, Julia A., Vladimir L. Gabai, and Michael Y. Sherman. 2007. "High Levels of Heat Shock Protein Hsp72 in Cancer Cells Suppress Default Senescence Pathways." *Cancer Research*.
- Yeh, Chen Hsiung, Richard Tseng, Alison Hannah, Zeev Estrov, Elihu Estey, Hagop Kantarjian, and Maher Albitar. 2010. "Clinical Correlation of Circulating Heat Shock Protein 70 in Acute Leukemia." *Leukemia Research*.
- Yeh, Chen Hsiung, Richard Tseng, Zhong Zhang, Jorge Cortes, Susan O'Brien, Francis Giles, Alison Hannah, Zeev Estrov, Michael Keating, Hagop Kantarjian, and Maher Albitar. 2009. "Circulating Heat Shock Protein 70 and Progression in Patients with Chronic Myeloid Leukemia." *Leukemia Research*.
- Zhu, Xiaotian, Xun Zhao, William F. Burkholder, Alexander Gragerov, Craig M. Ogata, Max E. Gottesman, and Wayne A. Hendrickson. 1996. "Structural Analysis of Substrate Binding by the Molecular Chaperone DnaK." *Science*.
- Zimmermann, Matthias, Stefanie Nickl, Christopher Lambers, Stefan Hacker, Andreas Mitterbauer, Konrad Hoetzenecker, Anita Rozsas, Gyula Ostoros, Viktoria Laszlo, Helmut Hofbauer, Ferenc Renyi-Vamos, Walter Klepetko, Balazs Dome, and Hendrik Jan Ankersmit. 2012. "Discrimination of Clinical Stages in Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Serum HSP27 and HSP70: A Multi-Institutional Case-Control Study." *Clinica Chimica Acta*.

Zong, Wei Xing, and Craig B. Thompson. 2006. "Necrotic Death as a Cell Fate." *Genes and Development*.

Zou, Jiangying, Yongle Guo, Toumy Guettouche, David F. Smith, and Richard Voellmy. 1998. "Repression of Heat Shock Transcription Factor HSF1 Activation by HSP90 (HSP90 Complex) That Forms a Stress-Sensitive Complex with HSF1." *Cell*.

### 10. Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt Christine Bayer und Constantin Maftai für die hervorragende Betreuung während der gesamten Doktorarbeit. Sie waren mir jederzeit und in allen Belangen kompetente und vor allem herzliche Ansprechpartner. Dank ihnen konnte ich über das gesamte Jahr hinweg sehr großen Spaß an der Arbeit im Labor gewinnen und mich hervorragend in das Team integrieren. Ohne euch wäre diese Doktorarbeit sicher nicht möglich gewesen. Was ihr für mich getan habt werde ich euch nicht vergessen! Zudem möchte ich Mathias Gehrman, Daniela Schilling, Thomas Schmid, Stefan Stangl und Jan Jakob Wilkens meinen Dank aussprechen. Sie haben mir auch mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Abschließend möchte ich mich natürlich bei meiner Arbeitsgruppenleiterin Gabriele Multhoff bedanken. Ihr verdanke ich, dass sie mich in ihr Team aufgenommen hat und mir dieses Thema anvertraut hat. Obwohl sie nicht meine direkte Betreuerin war, konnte ich sie problemlos alles Fragen was mir so auf dem Herzen lag und für alles hatte sie auch eine Antwort parat. Zudem hat sie sich die Mühe gemacht diese Doktorarbeit zu korrigieren. Ihre wissenschaftlich strenge, aber herzliche Art habe ich sehr zu schätzen gelernt. Nicht umsonst ist sie im Bereich der Hitzeschockproteine eine der weltweit führenden Forschungspersönlichkeiten! Vielen Dank an alle!

Euer,

Michael Liebhardt

## 11. Anhang

### 11.1 Publikation

Im Rahmen der Doktorarbeit ist folgende Publikation erschienen:

Bayer, C., M. E. Liebhardt, T. E. Schmid, M. Trajkovic-Arsic, K. Hube, H. M. Specht, D. Schilling, M. Gehrman, S. Stangl, J. T. Siveke, J. J. Wilkens, and G. Multhoff. 2014. "Validation of Heat Shock Protein 70 as a Tumor-Specific Biomarker for Monitoring the Outcome of Radiation Therapy in Tumor Mouse Models." *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 88(3).

### 11.2 Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

Geburtsdatum, -ort: 14.5.85, München

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Sprachen: deutsch (Muttersprache), englisch (fließend), französisch (Grundkenntnisse)

Konfession: römisch-katholisch

Private Interessen: Sport, Motorsport (Auto, Motorrad)

#### Klinischer Werdegang:

04/21 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

09/20 Zusatzbezeichnung Manuelle Medizin

08/20 Oberarzt (selbe Institution)

07/19 Funktionsoberarzt (selbe Institution)

07/19 Fachkunde Strahlenschutz

04/19 Facharzt

11/17 Dienstplanverantwortliche Person

03/16 Advanced Trauma Life Support (ATLS)-Provider

03/15 Prüfarzt

02/15-07/19 Assistentensprecher

02/13-04/19 Assistenzarzt Zentrum für Orthopädie, Unfallchirurgie und Sportmedizin München Klinik Bogenhausen (zuvor Städtisches Klinikum München Bogenhausen)

### Mitgliedschaften:

05/20 Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie (DGOU)

05/18 Gesellschaft für Arthroskopie und Gelenkchirurgie (AGA)

### Ausbildung:

12/11 Approbation als Arzt

10/07-10/11 Studium der Humanmedizin an der Technischen Universität München, Abschluss der zweiten ärztlichen Prüfung (Staatsexamen, Note „sehr gut“ (1,5))

10/05-10/07 Studium der Humanmedizin an der Technischen und der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abschluss der ersten ärztlichen Prüfung (Physikum, Note „sehr gut“ (1,5))

09/96-06/05 Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen, Abschluss der allgemeinen Hochschulreife (Note „sehr gut“ (1,4))

09/92-07/96 Grundschule Joseph-Maria-Lutz und der Grundschule Niederscheyern Pfaffenhofen, Übertritt auf das Gymnasium (Note „sehr gut“ (1,0))