

Hsp70 und Lymphozytensubpopulationen als Biomarker in diffusen Gliomen des Erwachsenentyps WHO-Grad 2 und 3

Philipp Christian Lennartz

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen
Universität München zur Erlangung eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Florian Eyer

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Gabriele Multhoff
2. apl. Prof. Dr. Friederike Schmidt-Graf
3. Prof. A. Graham Pockley, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 31.01.2025 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Medicine and Health am 19.06.2025 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Verwendete Abkürzungen	5
2. Zusammenfassung und Abstract	8
2.1 Zusammenfassung	8
2.2 Abstract	9
3. Einleitung	11
3.1 Hsp70	11
3.2 WHO-Klassifikation der diffusen Gliome des Erwachsenentyps	14
3.3 Epidemiologie	15
3.4 Risikofaktoren	16
3.5 Diagnosestellung nach dem Behandlungskonzept des Klinikums rechts der Isar	17
3.6 Therapie nach dem Behandlungskonzept des Klinikums rechts der Isar	17
3.7 Prognose	18
4. Material und Methoden	19
4.1 Patientenkollektiv	19
4.2 Studiendesign	20
4.3 Immunhistochemische Bestimmung der IDH1 R132H Punktmutation	22
4.4 Messung des zirkulierenden freien und membrangebundenen Hsp70 mit dem Hsp70-exo ELISA	23
4.5 Messung des zirkulierenden freien Hsp70 mit dem R&D Systems DuoSet® ELISA (R&D Systems/Bio-Techne, Deutschland)	25
4.6 Isolation von Patientenexosomen aus Vollblutproben	26
4.7 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Patientenexosomen	27
4.8 Immunhistochemische Färbung des intrazellulären Hsp70 an Tumorschnitten	28
4.9 Durchflusszytometrische Untersuchung der membrangebundenen Hsp70-Expression von Oligodendrogliom- und Astrozytomzellen	29

4.10 Immunphänotypisierung der peripheren Lymphozyten mittels Multiparameter-Durchflusszytometrie.....	32
4.11 Statistische Auswertung.....	39
5. Ergebnisse.....	43
5.1 Gesamtüberleben der Patienten.....	44
5.2 Hsp70 Konzentration im peripheren Plasma und Serum von Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten	45
5.3 Charakterisierung von Patientenexosomen.....	48
5.4 Intrazelluläre und oberflächliche Hsp70 Expression in Gewebeschnitten und einzelnen Tumorzellen	51
5.5 Immunphänotypisierung peripherer Lymphozytensubpopulationen im Blut von Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten.....	53
5.5.1 Lymphozyten.....	54
5.5.2 B-Zellen.....	56
5.5.3 T-Zellen	58
5.5.4 Regulatorische T-Zellen	62
5.5.5 NK-Zellen	64
5.6 Korrelation peripherer Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} Konzentrationen und den Frequenzen verschiedener Lymphozytensubpopulationen in Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten.....	68
5.6.1 T-Zellen	70
5.6.2 NK-Zellen	73
5.7 Korrelation verschiedener Lymphozytensubpopulationen und dem Gesamtüberleben von Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten.....	80
5.8 Zeitliche Dynamik der peripheren Hsp70 Konzentration von Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten	82
6. Diskussion	84
7. Referenzen	90
8. Abbildungsverzeichnis	104

9. Tabellenverzeichnis	108
10. Danksagung	109
11. Appendix	110
11.1 Patienteninformation und Einwilligungserklärung	110
11.2 Publikation	115

1. Verwendete Abkürzungen

ADP: Adenosindiphosphat

AIF: Apoptosis-Inducing Factor (Apoptose induzierender Faktor)

Apaf-1: Apoptotic protease activating factor 1 (Apoptotische Protease aktivierender Faktor 1)

APC: Allophycocyanin

ATP: Adenosintriphosphat

ATRX: Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gene (Gen, welches zuerst in Patienten des Alpha-Thalassämie-X-chromosomale Intelligenzminderung-Syndroms identifiziert wurde)

BAX: Bcl-2-Associated X protein (Bcl-2-assoziiertes X Protein)

BSA: Bovine Serum Albumine (Bovines Serumalbumin)

CAR: Chimeric Antigen Receptor (Chimärer Antigenrezeptor)

CCNU: Chlorethyl-Cyclohexyl-Nitroso-Urea, entspricht Lumostin

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-Associated Protein 4 (Zytotoxische T-Lymphozyten assoziiertes Protein 4)

ddH₂O: Double Distilled H₂O (Doppelt destilliertes Wasser)

CD: Cluster of Differentiation (Unterscheidungsgruppen)

CDKN2A/B: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B (Zyklus-abhängiger Kinaseinhibitor 2A/B)

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Antikörperbasiertes, enzymatisches Immunadsorptionsverfahren)

F-18-FET-PET: ¹⁸F-Fluorethylthymosin- Positronenemissionstomografie

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting (Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter)

FBS: Fetal Bovine Serum (Fetales Kälberserum)

FFPE: Formalin Fixated Paraffin Embedded (Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet)

FITC: Fluoreszin Isothiozyanat

FLAIR: Fluid-Attenuated Inversion Recovery (MRT-Sequenz mit Unterdrückung des Flüssigkeitssignals)

FSC: Forward Scatter (Vorwärtsstreuung)

GITR: Glucocorticoid-Induced TNF Receptor (Glucocorticoid-induzierter TNF-Rezeptor)

Gy: Gray
 HRP: Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
 HLA: Humanes Leukozytenantigen
 Hsp: Heat shock protein (Hitzeschockprotein)
 IL: Interleukin
 IDH: Isozitatdehydrogenase
 K_D : Dissoziationskonstante
 KOF: Körperoberfläche
 MGMT: O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
 MRT: Magnetresonanztomographie
 MST: Microscale Thermophoresis (Microscale Thermophorese)
 NBD: Nukleotidbindungsdomäne
 NK-Zellen: Natural Killer Cells (Natürliche Killerzellen)
 NKG2D: Natural Killer Group 2D (Natürliche Killer Gruppe 2D)
 NKT-Zellen: Natural Killer T-Cells (Natürliche Killer-T-Zellen)
 One-way ANOVA: One-way (einfaktorielle) analysis of variance
 PBS: Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
 PD-1/PD-L1: Programmed Cell Death Protein(-Ligand)-1
 PE: Phycoerythrin
 PCV: Procarbazin, CCNU (Lumostin), Vincristin
 PEB: PBS, EDTA, BSA
 PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein
 RANO: Response Assessment in Neuro-Oncology (Radiologische Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens von Hirntumoren)
 ROS: Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
 RT: Radiotherapie
 SBD: Substratbindungsdomäne
 SSC: Side Scatter (Seitwärtsstreuung)
 TERT: Telomerase Reverse Transcriptase (Telomerase Reverse Transkriptase)
 TGF β : Tumor Growth Factor Beta (Tumor Wachstumsfaktor Beta)
 TKD: Hsp70-Peptid TKDNNLLGRFELSG; Aminosäuren 450-463
 TMZ: Temozolomid
 TNF: Tumor Necrosis Factor (Tumor Nekrose Faktor)
 TUM: Technische Universität München

WHO: World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

ZNS: Zentrales Nervensystem (Englisch: CNS, Central Nervous System)

7AAD: 7-Amino-Aktinomycin D

2. Zusammenfassung und Abstract

2.1 Zusammenfassung

Das haupt-stressinduzierbare Hitzeschockprotein Hsp70 wird in fast allen Zellkompartimenten exprimiert und hält eine Vielzahl physiologischer Funktionen inne. Als Chaperon ist Hsp70 sowohl an der Faltung naszierender Proteine als auch an der Kontrolle fehlgefalteter Proteine und der Auflösung von Proteinaggregaten beteiligt. Zelluläre Stressoren, wie reaktive Sauerstoffspezies und Hypoxie, steigern die Hsp70 Expression. Da erhöhter Proteinsynthesebedarf, die Bildung von mutierten Proteinen und hoher zellulärer Stress typisch für Tumorzellen sind, zeichnen sich diese durch eine hohe Hsp70 Expression aus. Dabei ist die Expression von Hsp70 auf der Zellmembran eine tumorspezifische Eigenschaft. Auch in Glioblastomen konnte eine gesteigerte Hsp70 Konzentration im Tumorgewebe und peripheren Plasma nachgewiesen werden. Membrangebundenes und extrazelluläres Hsp70 spielt auch eine wichtige Rolle in der lymphozytären Tumorabwehr. NK-Zellen können über die TKD-Aminosäuresequenz von löslichem Hsp70 gegen membrangebundenes Hsp70 sensibilisiert werden und lösen schlussendlich an Hsp70 membranpositiven Tumorzellen Granzym B vermittelte Apoptose aus.

Diese Arbeit untersucht die Veränderungen der Hsp70 Expression und dessen Einfluss auf den Immunphänotyp von WHO-Grad 2 und 3 Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten. WHO-Grad 2 und 3 Gliome zeigen ein weniger aggressives Wachstum und eine bessere Prognose als Glioblastome, wobei Hsp70 und dessen immunologische Wirkung im Kontext dieser Tumoren noch nicht gut verstanden sind. Daher habe ich die Konzentration des freien und membrangebundenen Hsp70 im peripheren Plasma von Gliompatienten mit dem Hsp70-exo ELISA gemessen, wobei keine der Kohorten im Vergleich zu der Gesunderkohorte signifikant erhöhte Hsp70 Werte aufwies. Möglicherweise führen der geringere nekrotische Zelluntergang und die weitgehend intakte Blut-Hirn-Schranke zu niedrigeren peripheren Hsp70 Konzentrationen, die nur bedingt Rückschlüsse auf das Tumorgeschehen zulassen. Ich konnte aus dem Blut derselben Patienten Hsp70 membranpositive Exosomen isolieren, die einen großen Teil des gemessenen zirkulierenden Hsp70 ausmachten und das Potenzial haben, die Spezifität von Hsp70

als Tumormarker in Zukunft zu erhöhen. In Bezug auf den Immunphänotyp zeigten die Patienten tendenziell reduzierte Lymphozytenfrequenzen und erhöhte Frequenzen der regulatorischen T-Zellen als Ausdruck von Immunsuppression durch das Tumorgeschehen. Es zeigten sich auch Unterschiede des Immunphänotyps von Patientengruppen mit hohen und niedrigen peripheren Hsp70 Werten. WHO-Grad 3 Gliompatienten mit hohen peripheren Hsp70 Konzentrationen hatten gegenüber Patienten mit niedrigen Hsp70 Konzentrationen signifikant erhöhte NK-Zellfrequenzen. Zusätzlich zeigten WHO-Grad 3 Astrozytompatienten einen erhöhten Anteil von CD56^{bright} NK-Zellen, als möglichen Hinweis auf gesteigerten NK-Zell-Bedarf im Tumorgewebe, der durch Rekrutierung von NK-Zellen aus lymphatischen Geweben gedeckt wird. WHO-Grad 3 Gliompatienten mit hohen NK-Zellfrequenzen zeigten nur ein marginal verbessertes Gesamtüberleben, was auf eine geringe antiproliferative Aktivität der NK-Zellen aufgrund des stark immunsuppressiven Tumorumfelds hindeuten könnte. WHO-Grad 2 Gliompatienten mit niedrigen peripheren Hsp70 Werten zeigten reduzierte T-Helferzellfrequenzen, nicht aber Patienten mit hohem peripheren Hsp70. Möglicherweise kann Hsp70 der Depletion von T-Helferzellen in dieser Patientengruppe entgegenwirken. Diese Arbeit verbessert das Verständnis von Hsp70 und dem Immunphänotyp als neuartige diagnostische und prognostische Biomarker in WHO-Grad 2 und 3 Gliompatienten.

2.2 Abstract

The major stress-inducible heat shock protein Hsp70 is expressed in most subcellular compartments and performs a plethora of physiological functions. As a chaperone, Hsp70 participates in the folding of nascent proteins as well as in controlling misfolded proteins and eliminating protein aggregates. Cellular Stress, in the form of reactive oxygen species and hypoxia, increases the expression of Hsp70. Since increased demand for protein synthesis, the production of mutated proteins and high intracellular stress are common in tumor cells, these cells exhibit high levels of Hsp70. The expression of Hsp70 on the cellular membrane is a property specific to tumor cells. As such, tumor tissues and the peripheral plasma of glioblastoma patients show elevated Hsp70 concentrations. Additionally, membrane bound and extracellular Hsp70 is known to play a crucial role in the antitumoral response of

lymphocytes. The TKD amino acid sequence of soluble Hsp70 sensitizes NK-cells towards membrane bound Hsp70, and these NK-cells can subsequently induce granzyme B mediated apoptosis in Hsp70 membrane positive tumor cells.

This study examines changes in Hsp70 expression and its implications on the immune phenotype of WHO grade 2 and 3 oligodendroglioma and astrocytoma patients. WHO grade 2 and 3 gliomas show less aggressive growth and have a better prognosis than glioblastomas, however Hsp70 and its immunological effects are poorly understood in these tumors. Therefore, I measured the concentration of free and membrane bound Hsp70 in the peripheral plasma of glioma patients using the Hsp70-exo ELISA, wherein none of the tumor groups exhibited significantly elevated levels of Hsp70 compared to the healthy cohort. Less necrotic cell death and an intact blood brain barrier may be factors reducing the peripheral Hsp70 levels, that are subsequently no longer reflective of the tumor presence. I was however able to isolate Hsp70 membrane positive exosomes from the blood of these patients. Exosomal Hsp70 made up a large fraction of the total circulating Hsp70 and may potentially improve the specificity of Hsp70 as a tumor marker in future studies. Regarding the immune phenotype, the patients showed slightly reduced frequencies of overall lymphocytes and slightly increased frequencies of regulatory T cells as an expression of immune suppression by the tumors. The immune phenotype also differed between patients with high and low peripheral Hsp70 concentrations. WHO grade 3 glioma patients with high levels of Hsp70 had significantly elevated NK cell frequencies compared to patients with low levels of Hsp70. Additionally, WHO grade 3 astrocytoma patients showed an elevated share of CD56^{bright} NK cells, possibly reflective of increased recruitment of NK cells from lymphatic tissues to counteract increased demand for NK cells within the tumor. WHO grade 3 glioma patients with high NK cell frequencies showed only a marginally improved overall survival, which could indicate low antiproliferative activity of the NK cells due to the highly immunosuppressive tumor microenvironment. Reduced frequencies of T helper cells were only seen in WHO grade 2 glioma patients with low levels of peripheral Hsp70, which could indicate that Hsp70 helps prevent the depletion of T helper cells in these patients. This study improves our understanding of Hsp70 and the immune phenotype as novel diagnostic and prognostic biomarkers in WHO grade 2 and 3 glioma patients.

3. Einleitung

„Liquid Biopsy“, die Untersuchung von peripherem Blut auf Tumorbestandteile und molekulare Tumormarker, gewinnt anstelle der Biopsie aus solidem Tumorgewebe immer weiter an klinischer Relevanz (Tamai et al., 2023). Als minimalinvasives Verfahren zeichnet es sich durch hohe Akzeptanz von Patienten, technisch einfache Materialgewinnung und weite Verbreitung im klinischen Umfeld aus. Dennoch beruht die Diagnosestellung von Hirntumoren weiterhin vor allem auf bildgebenden Verfahren mit anschließender histologischer Untersuchung von reseziertem Tumorgewebe (Delgado-Martín & Medina, 2020; Louis et al., 2021; Silantyev et al., 2019). Durch die intrakranielle Lokalisation und hohe Heterogenität des Tumorgewebes von Gliomen gestaltet sich die Identifizierung von geeigneten Entnahmestellen für die Gewinnung von repräsentativem Gewebe, ohne die Verwendung von hoch spezialisierten Untersuchungen wie Aminosäuren-PET-MRT Bildgebungen, oft schwierig (Harat et al., 2023). Biomarker im peripheren Blut haben daher für Gliompatienten besonderes Potenzial, die Diagnosestellung und Prognoseeinschätzung zu verbessern, um schlussendlich personalisierte Therapieentscheidungen treffen zu können. Das hoch konservierte, haupt-stressinduzierbare 72kD Hitzeschockprotein Hsp70 stellt einen vielversprechenden, peripher messbaren Kandidaten als neuartigen Biomarker für diese Patienten dar. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich das zirkulierende freie und membrangebundene Hsp70 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und in unregelmäßigen Follow-up Untersuchungen von Patienten mit WHO-Grad 2 und 3 Gliomen gemessen und hinsichtlich der peripheren Lymphozytensubpopulationen und klinischen Präsentation der Patienten untersucht.

3.1 Hsp70

Das haupt-stressinduzierbare 72kD Hitzeschockprotein Hsp70 ist ein hoch konserviertes Protein, welches ubiquitär exprimiert wird und vielfältige physiologische Funktionen innehält. Als Chaperon ist Hsp70 an der Faltung von über 10-20 % der de-Novo synthetisierten Proteine beteiligt (Mayer & Bukau, 2005). Hsp70 wird auf der Membran des endoplasmatischen Retikulums exprimiert, wo es den Transport von

Proteinen zwischen intrazellulären Kompartimenten erleichtert und Proteine auf deren richtige Faltung kontrolliert (Bukau et al., 2006; Kroeger et al., 2012; Radons, 2016). Im Zytoplasma fördert Hsp70 die Rückkehr fehlgefalteter Proteine in ihre native Form (Mattoo & Goloubinoff, 2014; Mayer & Bukau, 2005; Radons, 2016). Dadurch verringert Hsp70 die Bildung von Proteinaggregaten und kann diese zusätzlich in lösliche Formen zurückführen (Mattoo et al., 2013; Radons, 2016).

Grundlegend binden Substratproteine auf molekularer Ebene vorrangig an die Substratbindungsdomäne (SBD) des Hsp70 (**Abbildung 1**), welche mögliche Substrate mit niedriger Affinität und hohem Umsatz bindet, solange ATP an der Nukleotidbindungsdomäne (NBD) gebunden ist (Radons, 2016; Rosenzweig et al., 2019). Wird das ATP zu ADP dephosphoryliert, erhöht sich die Affinität zum Substrat, wodurch Konformationsveränderungen, wie die Rückkehr zur nativen Faltung, ausgelöst werden können (Radons, 2016; Rosenzweig et al., 2019). Im Anschluss wird das ATP an der Nukleotidbindungsdomäne durch Nukleotidaustauschfaktoren wiederhergestellt und das Substrat freigesetzt (Radons, 2016; Rosenzweig et al., 2019). Zahlreiche Interaktionen mit anderen Proteinen wie Hsp40, insbesondere im Bereich der Nukleotidbindungsdomäne und dem EEVD-Motiv, erweitern das Substratspektrum für Hsp70 und modulieren dessen Funktion (Johnson et al., 2022; Rosenzweig et al., 2019).

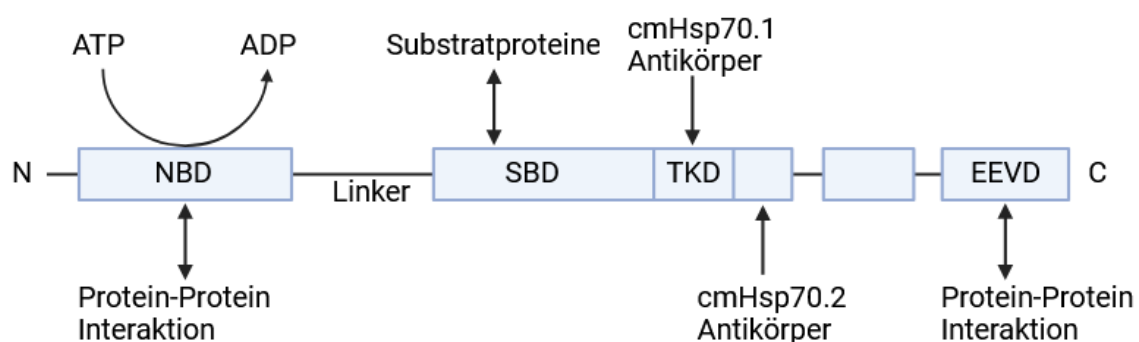


Abbildung 1: Schematische Darstellung des haupt-stressinduzierbaren Hitzeschockproteins Hsp70A1A (Hsp70) (Johnson et al., 2022; Radons, 2016; Rosenzweig et al., 2019; Werner et al., 2021). Erstellt mit Biorender.

Die Funktionen von Hsp70 in der Kontrolle von Proteinveränderungen führen dazu, dass die Hsp70 Expression durch eine Vielzahl zellulärer Stressoren reaktiv erhöht

wird. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erhöhen die Expression von Hsp70, welches den Schaden durch oxidierte Proteine reduziert, deren Abbau fördert und die Expression von antioxidativen Enzymen steigert (Khomenko et al., 2007; H. Zhang et al., 2022). Hypoxie steigert ebenfalls die Bildung von Hsp70, welches hypoxische Schäden reduzieren kann (Huang et al., 2009; Li et al., 2019; K. Zhang et al., 2009). Zusätzlich führen Veränderungen des Nährstoff- und Energieangebots über Verschiebung der Proteinhomöostase zu Veränderungen der Hsp70 Expression (Atkin et al., 2021; Moura et al., 2018).

Da viele dieser Stressoren in Tumorzellen gesteigert vorkommen, hat erhöhtes Hsp70 großes Potenzial als neuartiger Tumormarker und konnte bereits in einer Vielzahl von Tumorerkrankungen, wie Lungenkarzinomen (Gunther et al., 2015; Seier et al., 2022), hepatozellulären Karzinomen (B. Wang et al., 2021; Z. Wang et al., 2015) und Glioblastomen (Lobinger et al., 2021) nachgewiesen werden. Neben den ubiquitären Stressoren konnten tumorspezifische Veränderungen, die zu erhöhter Hsp70 Expression führen, identifiziert werden. Hierzu gehört das Vorhandensein von mutierten Proteinen, deren Aggregation und destabilisierende Wirkungen durch Hsp70 abgepuffert werden können (King et al., 2001; Mayer & Bukau, 2005). Speziell in Gliomen können IDH-Mutationen die Ansammlung von ROS und Onkometaboliten wie (D)2-Hydroxyglutarat begünstigen (Alzial et al., 2022). Zudem steigert Hsp70 die Apoptoseresistenz durch Hemmung verschiedener apoptotischer Faktoren wie BAX, Apaf-1 oder AIF (Mosser et al., 1997; Murphy, 2013; Roufayel & Kadry, 2019). Dadurch werden apoptotische Signalwege unterdrückt, die unter physiologischen Bedingungen zur Cytochrom C Freisetzung, Caspasenaktivierung und schlussendlich zum Zelltod der Tumorzellen führen würden (Mosser et al., 1997; Murphy, 2013; Roufayel & Kadry, 2019). Außerdem inhibiert Hsp70 sowohl die p53 abhängige als auch p53 unabhängige Tumorseneszenz (Murphy, 2013). Letztlich stabilisiert Hsp70 lysosomale Membranen, die die tumoröse Autophagie ermöglichen und eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des TME spielen (Murphy, 2013; Xia et al., 2021). Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen erhöhter Expression von Hsp70 im Rahmen von Tumorerkrankungen gegenüber anderen Erkrankungen und Inflammationen ist die Lokalisation von Hsp70 auf der Zellmembran, welches spezifisch für Tumorzellen ist (Gehrmann et al., 2008; Multhoff et al., 1995).

Obwohl die Überexpression von Hsp70 das Tumorstadium begünstigen kann, hat Hsp70 auch antineoplastische Eigenschaften. NK-Zellen können über die TKD-Aminosäuresequenz von löslichem Hsp70 (**Abbildung 1**) in der Gegenwart von IL-2 gegen membrangebundenes Hsp70 sensibilisiert werden und anschließend an Hsp70 membranpositiven Tumorzellen Granzym B vermittelte Apoptose induzieren (Multhoff et al., 2020).

Da freies Hsp70 in einer Vielzahl von Erkrankungen und Belastungssituationen erhöht sein kann (Radons, 2016), erhöht die Messung von tumorspezifischen membrangebundenem Hsp70 möglicherweise die Spezifität von Hsp70 als Biomarker für Tumorerkrankungen (Gehrmann et al., 2008; Multhoff et al., 1995). Die Verwendung des Hsp70-exo ELISA ermöglicht die Messung von sowohl freiem als auch membrangebundenem Hsp70 (Werner et al., 2021). Die Antikörper cmHsp70.1 (N-L-L-G-R-F-E-L; Aminosäuren 454-461, **Abbildung 1**) und cmHsp70.2 (A-G-G-P-G-P-G-G-F-G; Aminosäuren 614-623, **Abbildung 1**) sind spezifisch für das stressinduzierbare Hitzeschockprotein Hsp70 (Werner et al., 2021). Dadurch ist die Messung von tumorspezifischem membrangebundenem Hsp70 an Exosomen als peripheres Abbild der tumorösen Zelloberfläche möglich (Multhoff et al., 1995; Werner et al., 2021).

3.2 WHO-Klassifikation der diffusen Gliome des Erwachsenentyps

Die Einteilung der Tumoren des zentralen Nervensystems ist komplex und unterliegt durch die Entwicklung neuer diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Möglichkeiten stetigem Wandel. Insbesondere werden molekularbiologische Tumorcharakteristika gegenüber histologischen Merkmalen hinsichtlich der Prognose und Therapieentscheidungen immer relevanter (Byun & Park, 2022). Für diese Arbeit wurden Proben von Patienten mit diffus infiltrierenden Gliomen des Erwachsenentyps des WHO-Grades 2 und 3, mit oligodendroglialer und astrozytärer Histologie, aus der Abteilung für Neurologie des Klinikums rechts der Isar, TUM, verwendet. Es wurde für die Einteilung der Patientenkohorten nach Möglichkeit die WHO-CNS5 (2021) Klassifikation verwendet.

Hiernach sind diffuse Oligodendrogliome durch eine IDH-Mutation und 1p/19q-Kodeletion charakterisiert. Zusätzlich findet sich eine TERT-Mutation und kein nukleärer ATRX-Verlust. Diffuse Astrozytome sind durch eine IDH-Mutation ohne 1p/19q-Kodeletion charakterisiert. Liegt ein IDH-Wildtyp vor, werden Astrozytome seit 2021 nach der WHO-CNS5 Klassifikation dem WHO-Grad 4 zugeordnet. Zusätzlich zeigen Astrozytome meist ein Verlust der nukleären ATRX. Anhand histopathologischer Kriterien werden die Gliome dann dem WHO-Grad 2 oder 3 zugeordnet. (Weller et al., 2021)

Der CDKN2A/B Status wurde im Klinikum rechts der Isar erst ab 2020 untersucht und daher bei den eingeschlossenen Patienten nicht bestimmt, wodurch eine zweifelsfreie Zuordnung aller Patienten nach der neuen Klassifikation nicht möglich ist. Dies stellt eine Limitation dieser Arbeit dar. Genauere Informationen über die eingeschlossenen Patienten können Abschnitt 4.1 Patientenkollektiv entnommen werden.

3.3 Epidemiologie

Maligne Tumoren des zentralen Nervensystems sind insgesamt seltene Tumoren. Im Jahr 2020 machten sie in Deutschland etwa 1,4 % aller Krebsneuerkrankungen bei Frauen und 1,6 % bei Männern aus, was 3.250 Neuerkrankungen bei Frauen und 4.080 bei Männern entspricht. Im selben Jahr sind bei Frauen 2.585 und bei Männern 3.427 Sterbefälle an diesen Tumoren aufgetreten. Insgesamt ist sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität in den letzten fünf Jahren weitgehend unverändert. Den größten Anteil der diffusen Gliome des Erwachsenentyps stellen die WHO-Grad 4 Glioblastome dar, wohingegen diffuse Oligodendrogliome und Astrozytome zusammen etwa 15 % der Tumoren des zentralen Nervensystems ausmachen. (Ronckers et al., 2023)

Aufgrund der niedrigen Fallzahlen sind Aussagen über die Epidemiologie der einzelnen WHO-Grade und histologischen Subtypen in Deutschland schwierig. In den USA waren im Zeitraum von 2018 bis 2020 etwa 3,2 % der diffusen Gliome

WHO-Grad 2 Astrozytome, 3,6 % WHO-Grad 3 Astrozytome, 3,6 % WHO-Grad 2 Oligodendrogliome und 2,5 % WHO-Grad 3 Oligodendrogliome (Ostrom et al., 2023). Die jeweiligen Inzidenzraten pro 100.000 Einwohner betrugen 0,13 für WHO-Grad 2 Astrozytome, 0,15 für WHO-Grad 3 Astrozytome, 0,15 für WHO-Grad 2 Oligodendrogliome und 0,09 für WHO-Grad 3 Oligodendrogliome (Ostrom et al., 2023). Das mediane Erkrankungsalter für Oligodendrogliome (WHO-Grad 2 und 3) liegt bei etwa 45 Jahren (Ostrom et al., 2023; Tonn et al., 2006) und für Astrozytome (WHO-Grad 2 und 3) bei 37 Jahren (Gaillard, 2024; Molinaro et al., 2019; Ostrom et al., 2023). Gliome sind meist intrakraniell im Kortex lokalisiert, wobei der Frontallappen am häufigsten betroffen ist (Larjavaara et al., 2007).

3.4 Risikofaktoren

Die ätiologischen Faktoren, die zur Entstehung von glialen Tumoren führen, sind Gegenstand aktueller Forschung. Als gesicherter Risikofaktor gilt Strahlenbelastung, insbesondere im Kindesalter und in therapeutischer Dosis, wie im Rahmen der Strahlentherapie von Hypophysenadenomen (Hamblin et al., 2022). Zusätzlich treten unter 5 % aller Gliome im Rahmen von genetischen Krankheitsbildern wie neurokutanen Syndromen, Li-Fraumeni Syndrom, Lynch Syndrom oder familiärer adenomatöser Polyposis auf (Goodenberger & Jenkins, 2012). Bei etwa 5-10 % der Patienten zeigt sich eine familiäre Häufung (Hofer et al., 2021). Das Erkrankungsrisiko Verwandter ersten Grades von Betroffenen ist etwa verdoppelt, wobei bislang keine eindeutigen genetischen Risikovarianten identifiziert wurden und eine polygene Veranlagung angenommen wird (Hofer et al., 2021; Malmer et al., 1999; Robertson et al., 2010). Die Geschlechterverteilung zwischen Frauen und Männern liegt etwa bei 1/1,5 (Ostrom et al., 2018, 2023). Zusätzlich sind Menschen Europäischer oder Nordamerikanischer Herkunft etwas häufiger betroffen (Bondy et al., 2008).

3.5 Diagnosestellung nach dem Behandlungskonzept des Klinikums rechts der Isar

Bei anamnestischem Verdacht auf eine intrakranielle Raumforderung, insbesondere bei Neuauftreten epileptischer Anfälle, wurde eine Magnetresonanztomografie mit T1 Sequenz (nativ und mit Gadolinium Kontrastmittel), eine T2 FLAIR Sequenz und eine diffusionsgewichtete Sequenz durchgeführt (Law et al., 2003; Ringel et al., 2017, 2021; Weller et al., 2021). Gegebenenfalls wurde ein F-18-FET-PET-MRT zur Darstellung des Aminosäurenstoffwechsels ergänzt, um metabolisch besonders aktive Tumorbereiche für Probenentnahmen zu identifizieren.

Elektroenzephalografische Untersuchungen wurden gegebenenfalls ergänzt, um die Epileptogenität der Tumoren zu untersuchen. Wenn sich durch die bildgebenden Verfahren der Verdacht auf ein Gliom erhärtete, wurde die Resektabilität des Tumors anhand der Befundgröße, Lokalisation und Allgemeinzustand der Patienten, gemessen an klinischen Scores wie dem Karnofsky Index, festgelegt. Operable Befunde wurden unter Funktionserhalt maximal reseziert und inoperable Befunde biopsiert. In beiden Fällen wurde das entnommene Gewebe hinsichtlich Veränderungen der IDH, TERT, Histon 3 (H3) -K27M, MGMT, 1p/19q-Kodeletion und ATRX untersucht und die Patienten in einem interdisziplinären Tumorboard vorgestellt. (Ringel et al., 2017, 2021)

3.6 Therapie nach dem Behandlungskonzept des Klinikums rechts der Isar

Alle operablen Gliome wurden unter Funktionserhalt maximal reseziert. WHO-Grad 2 Oligodendrogliompatienten mit den prognostisch günstigen Faktoren Alter <40 Jahre, keine Mittellinienüberschreitung, Tumor <6 cm, kein postoperativer Tumorrest oder Tumorwachstum und Fehlen neurologischer Defizite konnten nach der Operation nach individueller Abwägung einem „watch and wait“ Programm zugeführt werden. Andernfalls erhielten die Oligodendrogliompatienten Radiotherapie von 50,4 bis 54 Gy (1,8 Gy pro Tag 5x wöchentlich), gefolgt von sequenzieller Chemotherapie mit PC(V) (Tag 1 CCNU 110 mg/qm KOF, Tag 8-21 Procarbazin 100 mg, gegebenenfalls Tag 8+29 Vincristin 2 mg intravenös, Wiederholung alle 6-8 Wochen) für 4-6 Zyklen 4

Wochen nach Abschluss der Bestrahlung. Astrozytompatienten erhielten nach Tumorresektion Radiotherapie von 50,4 bis 54 Gy (1,8 Gy pro Tag 5x wöchentlich) und sequenzielle Chemotherapie mit Temozolomid (konkomitant zur Strahlentherapie Tag 1-42 75 mg/qm KOF, 4 Wochen nach Abschluss der Bestrahlung 6 Zyklen 150-200 mg/qm KOF für 5 Tage, gefolgt von 23 Tagen ohne Behandlung). Alternativ erhielten diese Patienten bei gutem Allgemeinzustand Chemotherapie mit PC(V) analog zu dem Schema der Oligodendrogliompatienten. Bei entsprechendem Risikoprofil wurde bei allen Patienten aufgrund der Toxizität und fraglicher Wirksamkeit auf die Gabe von Vincristin verzichtet. Wenn indiziert erhielten alle Patienten symptomatische Therapie, insbesondere Dexamethason bei postoperativer oder post-radiotherapeutischer intrakranieller Schwellung und Antiepileptika bei epileptischen Anfällen. Das Therapieansprechen wurde radiologisch anhand der RANO-Kriterien beurteilt (Wen et al., 2010). Die Therapiekonzepte der eingeschlossenen Patienten sind in **Tabelle 1** zusammengefasst. (Ringel et al., 2017, 2021)

3.7 Prognose

Die Prognose hängt von einer Vielzahl patienten-, therapie- und tumorbezogener Faktoren ab. Molekulargenetisch wird vor allem eine IDH-Mutation in Kombination mit einer 1p/19q-Kodeletion als prognostisch günstig in Hinblick auf das Therapieansprechen angesehen (Bell et al., 2020; Cairncross et al., 2013; Shin et al., 2020; van den Bent et al., 2021). Die Prognose der WHO-Grad 2 Patienten ist besser als die der WHO-Grad 3 Patienten (Reuss et al., 2015). Das Gesamtüberleben der eingeschlossenen Patienten ist in **Abbildung 6** dargestellt.

4. Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Diese Arbeit wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München (TUM, 324/15s), genehmigt. Schriftliches Einverständnis wurde von allen eingeschlossenen Patienten und Gesundspendern eingeholt (11.1 Patienteninformation und Einwilligungserklärung), bevor EDTA- und Serumblutproben in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki in der Abteilung für Neurologie im Klinikum rechts der Isar, TUM, abgenommen wurden. Insgesamt wurden Proben von 45 WHO-Grad 2 und 3 Gliompatienten zwischen 2015 und 2019 abgenommen. Bei 5 dieser Patienten wurde ein WHO-Grad 2 Oligodendrogliom (n=5), bei 9 ein WHO-Grad 2 Astrozytom (n=9), bei 15 ein WHO-Grad 3 Oligodendrogliom (n=15) und bei 16 ein WHO-Grad 3 Astrozytom (n=16) diagnostiziert. Benigne Tumoren, WHO-Grad 1 Tumoren, ZNS-Metastasen und WHO-Grad 4 Glioblastome wurden ausgeschlossen. Das Geschlechterverhältnis (f/m) betrug insgesamt 17/28, vergleichbar mit dem erwarteten Verhältnis von 1/1,5 (Ostrom et al., 2018, 2023). Weitere Angaben können **Tabelle 1** entnommen werden.

Parameter	WHO-Grad 2 Gliome		WHO-Grad 3 Gliome	
Tumorhistologie	Oligodendro- gliom	Astro- zytom	Oligodendro- gliom	Astro- zytom
Anzahl Patienten (n)	5	9	15	16
Geschlecht (f/m)	1/4	3/6	6/9	7/9
Altersverteilung (Jahre)	23-55	24-51	29-75	29-81
Medianes Alter (Jahre)	41	33	54	49
Hsp70-exo ELISA (n)	4	8	10	13
R&D Systems DuoSet® ELISA (n)	-	7	-	5
Immunphänotypisierung (n)	5	8	13	15
Durchflusszytometrie des	-	4	-	2

membrangebundenen Hsp70 (n)				
Therapieregime	Maximale Resektion + RT + sequenziell PC(V)* oder ggf. Watch and Wait bei günstigen Faktoren**	Maximale Resektion + RT + sequenziell TMZ, PC(V)* alternativ möglich	Maximale Resektion + RT + sequenziell PC(V)*	Maximale Resektion + RT + sequenziell oder simultan TMZ, bei gutem AZ PC(V)* alternativ möglich

Tabelle 1: Patienteneigenschaften und angewandte Therapieregime. Verwendete Abkürzungen: RT, Radiotherapie (50,4 bis 54Gy, 1,8 Gy pro Tag 5x wöchentlich); PCV, Procarbazin, CCNU, Vincristin; TMZ, Temozolomid. *PCV gegebenenfalls ohne Vincristin, durch Toxizität bei entsprechendem Risikoprofil, **Günstige Faktoren: Alter <40 Jahre, keine Mittellinienüberschreitung, Tumor <6 cm, kein postoperativer Tumorrest oder Tumorwachstum, keine neurologischen Defizite. Details zu den Therapieregimen können Abschnitt 3.6 Therapie nach dem Behandlungskonzept des Klinikums rechts der Isar entnommen werden. (Lennartz et al., 2023)

4.2 Studiendesign

Hsp70 stellt einen vielversprechenden Kandidaten als diagnostischen und prognostischen Tumormarker dar, der in membrangebundener Form spezifisch für Tumorerkrankungen ist (Gehrmann et al., 2008; Multhoff et al., 1995). Daher habe ich die Plasmakonzentrationen des freien und membrangebundenen Hsp70 von Patientenproben mit dem Hsp70-exo ELISA zum initialen Diagnosezeitpunkt (t=0) gemessen. Zum Vergleich wurden Messwerte des freien Hsp70, gemessen mit dem R&D Systems DuoSet® ELISA, von Dominik Lobinger zur Verfügung gestellt (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021). Um den Einfluss der exosomalen Hsp70-Fraktion auf das Messergebnis der beiden ELISA-Methoden zu untersuchen,

habe ich exemplarisch Patientenexosomen aus peripherem Blut isoliert und in Bezug auf Hsp70 charakterisiert. Das Exosomen-depletierte Medium, welches im Zuge dessen entsteht, habe ich mit dem Hsp70-exo ELISA auf eine mögliche Reduktion der Hsp70 Konzentration im Vergleich zum Plasma untersucht. Die Verteilung des Hsp70 im Tumorgewebe wurde mit einer Immunhistochemischen Färbung dargestellt (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021). Die Expression von Hsp70 auf der Tumorzellmembran wurde zusätzlich mittels Durchflusszytometrie untersucht, diese Daten wurden von Mathias Pilz zur Verfügung gestellt (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021).

Tumorerkrankungen können erheblichen Einfluss auf die Immunkompetenz betroffener Patienten haben, wobei unklar ist, wie sich das in Gliomen manifestiert, die durch ihre Lokalisation innerhalb der Blut-Hirn-Schranke eine besondere immunologische Stellung einnehmen (Muldoon et al., 2013; Y. Wang et al., 2021). Um dies zu untersuchen, habe ich venöse Vollblutproben der Gliompatienten durchflusszytometrisch immunphänotypisiert, um die relativen Frequenzen verschiedener Lymphozytensubpopulationen zu bestimmen. Hsp70 besitzt immunmodulatorische Eigenschaften, wobei insbesondere die TKD-Sequenz als Stimulus für NK-Zellen angesehen wird (Gastpar et al., 2004; Hromadnikova et al., 2016). Um diese Eigenschaft in Gliompatienten zu untersuchen, habe ich die Patienten in Gruppen mit niedrigem und hohem zirkulierenden Hsp70 (Hsp70^{low}/Hsp70^{high}) eingeteilt und die peripheren Lymphozytenfrequenzen der Gruppen miteinander verglichen. Anschließend habe ich untersucht, ob bestimmte Ausprägungen mancher Lymphozytensubpopulationen oder die Hsp70-Plasmakonzentration bei Diagnosestellung prognostische Implikationen für die Gliompatienten haben. Dafür wurden die Patientenkohorten in Gruppen mit hoher und niedriger Frequenz der jeweiligen Lymphozytensubpopulation oder hoher und niedriger Hsp70-Plasmakonzentration eingeteilt und deren Gesamtüberleben verglichen.

Die Anzahl der Proben (n), die mit der jeweiligen Methode untersucht wurden, kann **Tabelle 1** entnommen werden. Die Verteilung der Patienten auf die wichtigsten Methoden ist im CONSORT Diagramm (**Abbildung 2**) zusammengefasst. Die Wiedervorstellung der Patienten zur Entnahme von Follow-up-Proben erfolgte in

unregelmäßigen Zeitabständen. Diese Proben habe ich mit dem Hsp70-exo ELISA auf das freie und membrangebundene Hsp70 im peripheren Plasma untersucht.

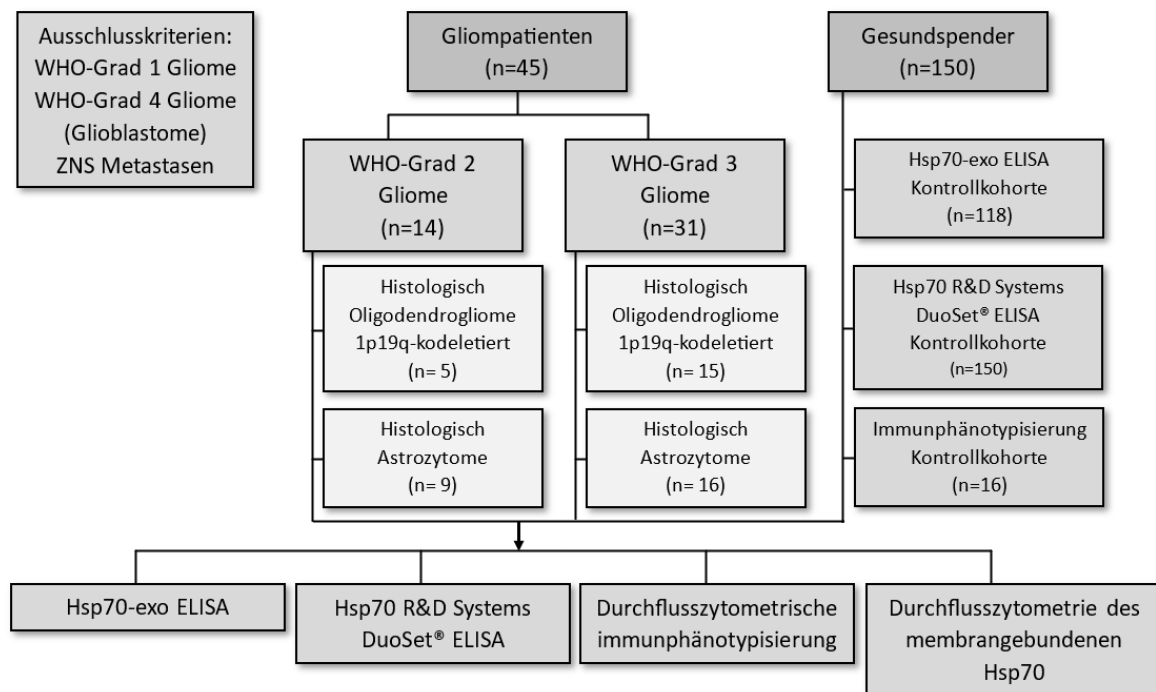


Abbildung 2: CONSORT-Diagramm des Studiendesigns. (Lennartz et al., 2023)

4.3 Immunhistochemische Bestimmung der IDH1 R132H Punktmutation

Der IDH-Mutationsstatus der Gliompatienten wurde auf die IDH1 R132 Punktmutation in der Abteilung für Neuropathologie des Klinikums rechts der Isar, TUM, untersucht. Hierfür wurden Bereiche von FFPE-Tumorschnitten mit hoher Tumorlast mit IDH1 Antikörpern (Ref. DIA-H09-L RTU, Dianova, Deutschland) in einem Ventana Benchmark XT Färber (Ventana Medical Systems (Roche), Schweiz) gefärbt. Tumorschnitte mit granulärer zytosolischer Anfärbung wurden als IDH-mutiert gewertet. Im Falle von unklaren Befunden wurden IDH1 und IDH2 sequenziert. (Lennartz et al., 2023)

4.4 Messung des zirkulierenden freien und membrangebundenen Hsp70 mit dem Hsp70-exo ELISA

Das freie und membrangebundene Hsp70 im peripheren Plasma der Tumorpatienten habe ich mit dem Hsp70-exo ELISA gemessen. Hierfür wurden EDTA-Vollblutproben zur Plasmagewinnung für 15 Minuten bei 1.500 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das so gewonnene Plasma wurde aliquotiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -80 °C aufbewahrt. Zur Hsp70 Messung wurden 96-Well „Nunc MaxiSorp“ Platten (Ref. 442404, Thermo Fisher) über Nacht mit dem cmHsp70.2 Antikörper (Multimmune, Deutschland) in einer Konzentration von 1 µg/ml in Natrium-Karbonat Puffer beschichtet. Am Folgetag wurde verbleibende Beschichtungsantikörperlösung durch Invertieren der Platten und anschließendem Waschen mit 250 µl Waschlösung (0,05 % Tween (Ref. P1379, Sigma-Aldrich) in PBS (Ref. D8537, Sigma-Aldrich)) entfernt. Parallel dazu wurden die zu untersuchenden gefrorenen Plasmaaliquots langsam auf Eis aufgetaut. Zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindung wurde den Platten anschließend 250 µl Block-Puffer „Liquid Plate Sealer“ (Ref. 163500, Candor Bioscience) hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Invertieren der Platten wurde der Block-Puffer entfernt und die Platten mit 250 µl Waschlösung gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl „StabilZyme Select Stabilizer“ Stabilisierungslösung (Ref. SZ03, Surmodics) sowie zwei Acht-Punkt-Standardreihen mit Hsp70 Konzentrationen von 0 bis 100 ng/ml in die Wells der Platten pipettiert. Dann wurde den Wells, in welche 100 µl der Stabilisierungslösung pipettiert wurden, 25 µl der Plasmaproben in Paaren sowie Kontrollen mit bekannten Hsp70 Konzentrationen hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Invertieren der Platten und dreimaligem Waschen mit 250 µl der Waschlösung wurde den Wells der Biotin-konjugierte Detektionsantikörper cmHsp70.1 (Multimmune, Deutschland) in einer Konzentration von 200 ng/ml in „HRP-Protector“ Schutzlösung (Ref. 322500, Candor Bioscience) hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Invertieren und dreimaligen Waschen der Platten mit 250 µl Waschlösung wurde den Wells 100 µl Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin (Ref. 2.8.1.1-36, Senova) in einer Konzentration von 57 ng/ml in „HRP-Protector“ Schutzlösung (Ref. 322500, Candor Bioscience) hinzugefügt. Die Platten wurden so

für 30 Minuten unter lichtgeschützten Bedingungen bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die Substratlösung „BioFX TMB Super Sensitive One Component HRP Microwell Substrate“ (Ref. TMBS-1000-01, Surmodics) langsam auf Raumtemperatur erwärmt. Die Platten wurden nun erneut dreimal mit 250 µl Waschlösung gewaschen und den Wells 100 µl der Substratlösung hinzugefügt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation unter lichtgeschützten Bedingungen wurde die Farbreaktion durch Hinzugabe von 50 µl 2 N H₂SO₄ beendet und die optische Dichte der Proben in einem „VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader“ (PerkinElmer, Vereinigte Staaten) Plattenleser gemessen. Die Hsp70-Konzentration der Proben wurde anschließend unter Zuhilfenahme der Acht-Punkt-Standardkurven und Berücksichtigung der Verdünnung berechnet. (Lennartz et al., 2023)

Reagenz	Referenznummer	Herstellerfirma
ELISA Platten: Nunc MaxiSorp® flat-bottom 96 well plate	442404	Thermo Fisher, Vereinigte Staaten
Waschlösung: TWEEN® 20 (Polyethylenglykolsorbitanmonolaurat)	P1379	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	D8537	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten
Block-Puffer: Liquid Plate Sealer	163500	Candor Bioscience, Deutschland
Stabilisierungslösung: StabilZyme Select Stabilizer	SZ03	Surmodics, Vereinigte Staaten
Peroxidase Schutzlösung: HRP-Protector	322500	Candor Bioscience, Deutschland
Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin: Streptavidin-PolyHRP40	2.8.1.1-36	Senova, Deutschland
Substratlösung: BioFX TMB Super Sensitive One Component HRP Microwell Substrate	TMBS-1000-01	Surmodics, Vereinigte Staaten

Tabelle 2: Reagenzien des Hsp70-exo ELISA.

Antikörper	Herstellerfirma
cmHsp70.2	Multimmune, Deutschland
cmHsp70.1	Multimmune, Deutschland

Tabelle 3: Monoklonale Antikörper des Hsp70-exo ELISA.

4.5 Messung des zirkulierenden freien Hsp70 mit dem R&D Systems DuoSet® ELISA (R&D Systems/Bio-Techne, Deutschland)

Das freie Hsp70 im peripheren Serum der Tumorpatienten wurde mit dem R&D Systems DuoSet® ELISA (R&D Systems/Bio-Techne, Deutschland) von Dominik Lobinger bestimmt. Zusammenfassend wurden hierfür Serum-Röhrchen mit Patientenblut für mindestens 10 Minuten koaguliert und das Blutkoagel entfernt. Das restliche Blut wurde für 10 Minuten bei 800 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und jeweils 180 µl des Überstandes aliquotiert. Das so gewonnene Serum wurde bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt. Aus anderen Studien ist bekannt, dass die Verwendung von Serumproben anstelle von Plasmaproben keinen Einfluss auf das Messergebnis dieses ELISA hat (Werner et al., 2021). Die Serumproben wurden dann nach langsamen Auftauen auf Eis nach dem Protokoll des Herstellers R&D Systems/Bio-Techne bearbeitet und die optische Dichte mit einem „VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader“ (PerkinElmer, Vereinigte Staaten) Plattenleser gemessen. Die verwendeten Antikörper können **Tabelle 4** entnommen werden. Da Serumproben an Stelle von Zellkulturüberständen verwendet wurden, wurde die Verdünnung angepasst, um innerhalb des vom Hersteller angegebenen Messbereichs von 125 bis 8.000 pg/ml zu bleiben. Weitere Informationen können dem Herstellerprotokoll und Publikationen wie Lobinger et al., 2021 entnommen werden. (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021)

Antikörper	Charge-Nummer	Referenznummer	Herstellerfirma
Human HSP70 Capture Antibody	KIY0319071	841680	R&D Systems (Bio-Techne), Vereinigte Staaten
Human HSP70 Detection Antibody	UCS1419071	841681	R&D Systems (Bio-Techne), Vereinigte Staaten

Tabelle 4: Monoklonale Antikörper des R&D Systems DuoSet® ELISA. (Lobinger et al., 2021)

4.6 Isolation von Patientenexosomen aus Vollblutproben

Die Isolation von Exosomen aus Vollblutproben mittels differentieller Ultrazentrifugation und anschließender durchflusszytometrischer Charakterisierung mit Untersuchung auf membrangebundenes Hsp70 mit dem cmHsp70.1 Antikörper (Multimmune, Deutschland), habe ich in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Hierfür habe ich EDTA-Vollblutproben von ausgewählten Patienten zur Plasmagewinnung für 15 Minuten bei 1.500 g bei 4 °C zentrifugiert und den Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Patientenplasma im Verhältnis 1:1 mit PBS (Ref. D8537, Sigma-Aldrich) verdünnt und für 20 Minuten bei 2.000 g bei 4 °C zentrifugiert, um Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 45 Minuten bei 12.000 g bei 4 °C zur Entfernung anderer Vesikel. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,22 µm gefiltert. Anschließend folgte die Ultrazentrifugation in einer Optima L-100XP Zentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Deutschland) der Proben für 2 Stunden bei 100.000 g bei 4 °C. Der Überstand wurde abgetragen und als Exosomen-befreites Medium unter sterilen Bedingungen bei -80 °C aufbewahrt und anschließend unter Berücksichtigung der Verdünnung mit dem Hsp70-exo ELISA untersucht (4.4 Messung des zirkulierenden freien und membrangebundenen Hsp70 mit dem Hsp70-exo ELISA). Das Pellet wurde umgehend, wie in Abschnitt 4.7 beschrieben, resuspendiert und weiter untersucht oder ebenfalls unter sterilen Bedingungen bei -80 °C aufbewahrt. (Lennartz et al., 2023)

4.7 Durchflusszytometrische Charakterisierung von Patientenexosomen

Die mittels Ultrazentrifugation gewonnen Patientenexosomen (4.6 Isolation von Patientenexosomen aus Vollblutproben) wurden in 100 µl PEB (PBS (Ref. D8537, Sigma-Aldrich) + 5 nM EDTA (Ref. AM9260G, Thermo Fisher) + 0,5 % BSA (Ref. A7030, Sigma-Aldrich)) mechanisch resuspendiert und in neue Reagenzgläser überführt. Anschließend wurden die Fluoreszenz-konjugierten monoklonalen Antikörper cmHsp70.1-FITC (Multimmune, Deutschland), CD9-VioBlue® (Ref. 130-118-867, Miltenyi Biotec) und CD81-PE (Ref. 130-118-481, Miltenyi Biotec) hinzugefügt. Weitere Details der Antikörper können **Tabelle 6** entnommen werden. Danach wurden die Proben mit den Antikörpern lichtgeschützt und unter leichter Bewegung auf einem Plattenschüttler für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden die so vorbereiteten Exosomen durchflusszytometrisch mit einem MACSQuant® Analyzer (Miltenyi Biotec, Deutschland) untersucht und mit der Software FlowJo 10 ausgewertet. Monoklonale IgG1 Isotyp-Kontrollantikörper (Ref. 130-113-449, 454, 450, BD Biosciences, siehe **Tabelle 6**) wurden als Kontrollen verwendet. (Lennartz et al., 2023)

Reagenz	Referenznummer	Herstellerfirma
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	D8537	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten
EDTA (Ambion® 0,5 M EDTA)	AM9260G	Thermo Fisher, Vereinigte Staaten
Bovines Serumalbumin (BSA)	A7030	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten

Tabelle 5: Reagenzien der durchflusszytometrischen Exosomencharakterisierung.

Antikörper	Klon	Referenznummer	Herstellerfirma
cmHsp70.1-FITC	-	-	Multimmune, Deutschland
CD9-VioBlue®	REA1071	130-118-867	Miltenyi Biotec, Deutschland
CD81-PE	REA513	130-118-481	Miltenyi Biotec, Deutschland
IgG1-FITC	REA293	130-113-449	Miltenyi Biotec, Deutschland
IgG1-VioBlue®	REA293	130-113-454	Miltenyi Biotec, Deutschland
IgG1-PE	REA293	130-113-450	Miltenyi Biotec, Deutschland

Tabelle 6: Monoklonale Antikörper der durchflusszytometrischen Exosomencharakterisierung.

4.8 Immunhistochemische Färbung des intrazellulären Hsp70 an Tumorschnitten

Die immunhistochemische Färbung des intrazellulären Hsp70 wurde von Dominik Lobinger durchgeführt (Lobinger et al., 2021). In Kürze wurden hierfür 3 µm dicke Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete Schnitte (FFPE-Schnitte) von Gliomen aus der Abteilung für Neuropathologie des Klinikums rechts der Isar, TUM, zur Verfügung gestellt. Nach Paraffinentfernung und Rehydratation in Xylol (Ref. 9713.1, ROTH) und absteigenden Ethanolkonzentrationen (96-50 % v/v, Ref. 27687, Fische), wurden die Schnitte für 30 Minuten auf 60 °C erhitzt. Darauf folgte ein Waschschriff sowie Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 5 % v/v Hasenserum in Verdünnungslösung (Ref. S1699, Dako). Die Schnitte wurden dann über Nacht mit dem monoklonalen Antikörper cmHsp70.1 (Multimmune, Deutschland) in einer Konzentration von 4,8 µg/ml bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschriff wurde ein HRP-markierter Sekundärantikörper (Ref. K4001, Dako) sowie Diaminobenzidin-Chromogen (Ref. K3468, Dako) für 5 Minuten hinzugegeben. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin und Eosin (Ref. T865.2, ROTH) gegengefärbt und die Schnitte mit

Xylol (Ref. 9713.3, ROTH) und aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (Ref. 27687, Fischar) entwässert. Weitere Details zu dieser Methode können Publikationen wie Lobinger et al., 2021 entnommen werden. (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021)

Reagenz	Referenznummer	Herstellerfirma
Xylol	9713.3	ROTH, Deutschland
Ethanol: EtOH 96 %	27687	Fischar, Deutschland
Antikörperverdünnungslösung: Dako Target Retrieval Solution	S1699	Dako, Vereinigte Staaten
Sekundärantikörper: Envision + System HRP labelled polymer Anti-mouse	K4001	Dako, Vereinigte Staaten
Diaminobenzidin-Chromogen (DAB+ Chromogen Solution)	K3468	Dako, Vereinigte Staaten
Hämatoxylin- und Eosinfärbung	T865.2	ROTH, Deutschland

Tabelle 7: Reagenzien der immunhistochemischen Hsp70 Färbung. (Lobinger et al., 2021)

Antikörper	Herstellerfirma
cmHsp70.1	Multimmune, Deutschland

Tabelle 8: Antikörper der immunhistochemischen Hsp70 Färbung. (Lobinger et al., 2021)

4.9 Durchflusszytometrische Untersuchung der membrangebundenen Hsp70-Expression von Oligodendrogliom- und Astrozytomzellen

Die durchflusszytometrische Untersuchung des membrangebundenen Hsp70 von Oligodendrogliom- und Astrozytomzellen wurde von Mathias Pilz durchgeführt. In Kürze wurde hierfür frisch aspiriertes Tumormaterial aus der Abteilung für Neurochirurgie des Klinikums rechts der Isar, TUM, zur Verfügung gestellt. Das

Tumormaterial wurde für 8 Minuten einem Verdauungsmedium (EDTA 2 mM (Ref. AM9260G, Thermo-Fisher), L-Cystein 5 mM (Ref. 168149, Sigma-Aldrich), Papain 5 U/ml (Ref. 1495005, Sigma-Aldrich)) ausgesetzt und durch ein steriles Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm forciert. Die so gewonnene Einzelzellsuspension wurde in PBS (Ref. D8537, Sigma-Aldrich) 10 % v/v FBS (Ref. F7524, Sigma-Aldrich) resuspendiert und mit den Antikörpern IgG1-FITC (Ref. 345815, BD Biosciences), IgG1-APC (Ref. MG105, Thermo Fisher), CD45-APC (Ref. MHCD4505, Thermo Fisher) und cmHsp70.1 (Multimmune, Deutschland) sowie pan-HLA Klasse I FITC (Ref. SAB4700639, Sigma-Aldrich) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zwei Waschvorgängen wurde 7AAD (Ref. 559925, BD Biosciences) hinzugefügt. Die Zellen wurden dann auf ihr Streuungs- und Fluoreszenzverhalten in einem FACSCalibur™-Durchflusszytometer (BD Biosciences, Vereinigte Staaten) durchflusszytometrisch untersucht. Nur 7AAD und CD45 negative Zellen wurden in berücksichtigt. Die pan-HLA Klasse I Färbung diente als positive Kontrolle und die IgG1 Kontrollantikörper als negative Kontrolle. Es wurden 100.000 Ereignisse pro Messung aufgezeichnet. Weitere Details zu dieser Methode können Publikationen wie Lennartz et al., 2023 und Lobinger et al., 2021 entnommen werden. (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021)

Reagenz	Referenznummer	Herstellerfirma
EDTA (Ambion® 0,5 M EDTA)	AM9260G	Thermo Fisher, Vereinigte Staaten
L-Cystein	168149	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten
Papain	1495005	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten
Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	D8537	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten
Fetales Kälberserum (FBS)	F7524	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten
7AAD	559925	BD Biosciences, Deutschland

Tabelle 9: Reagenzien der durchflusszytometrischen Untersuchung des membrangebundenen Hsp70 von Tumorzellen.

Antikörper	Klon	Referenznummer	Herstellerfirma
IgG1-FITC	X40	345815	BD Biosciences, Vereinigte Staaten
IgG1-APC	Class I (ASR)	MG105	Thermo Fisher, Vereinigte Staaten
CD45-APC	HI30	MHCD4505	Thermo Fisher, Vereinigte Staaten
cmHsp70.1	-	-	Multimmune, Deutschland
Anti-HLA Klasse I-FITC	W6/32	SAB4700639	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten

Tabelle 10: Monoklonale Antikörper der durchflusszytometrischen Untersuchung des membrangebundenen Hsp70 von Tumorzellen.

4.10 Immunphänotypisierung der peripheren Lymphozyten mittels Multiparameter-Durchflusszytometrie

Die Lymphozyten im peripheren Vollblut der Gliompatienten habe ich mittels multiparameter-Durchflusszytometrie immunphänotypisiert. Hierfür wurden EDTA-Blutproben aus der Abteilung für Neurologie des Klinikums rechts der Isar, TUM, zur Verfügung gestellt. Diese Proben wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und binnen 24 Stunden nach Erhalt untersucht. Zunächst wurde jeweils 100 µl EDTA-Blut in 14 Reagenzgläser pipettiert. Daraufhin wurden den Reagenzgläsern unterschiedliche fluoreszenzmarkierte Antikörper hinzugefügt. Weitere Details zu den Antikörpern können **Tabelle 12** entnommen werden. Das entsprechende Pipettierschema kann **Tabelle 13** entnommen werden. Die Isotypen IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-PerCP und IgG1-APC wurden als Kontrollantikörper verwendet. Blut und Antikörper wurden dann für 15 Minuten unter lichtgeschützten Bedingungen inkubiert. Nach Hinzugabe von 2 ml 10 % FACS-Puffer (PBS (Ref. D8537, Sigma-Aldrich) mit 10 % FBS (Ref. F7524, Sigma-Aldrich)) in jedes der Reagenzgläser wurden die Proben für 5 Minuten bei 500 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lyse der Erythrozyten wurde den Proben 2 ml Lyse-Puffer (1:10 in ddH₂O verdünnte „FACS™ Lysing Solution“, Ref. 349202, BD Biosciences) hinzugefügt und für 10 Minuten belassen. Der Lyse-Puffer wurde mittels Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 500 g bei Raumtemperatur und Verwerfen des Überstandes entfernt. Es folgte die Hinzugabe von 3 ml FACS-Puffer und die erneute Zentrifugation der Proben 5 Minuten bei 500 g bei Raumtemperatur. Nach Verwerfen des Überstandes wurde den Reagenzgläsern 1-11 300 µl FACS-Puffer hinzugefügt und das Streu- und Fluoreszenzverhalten der Zellen dieser Proben in einem Durchflusszytometer (FACSCalibur™, BD Biosciences, Vereinigte Staaten) untersucht.

Mit den Proben der Reagenzgläser 12-14 wurde eine Färbung der regulatorischen T-Zellen durchgeführt. Hierfür wurde den wie beschrieben vorbehandelten Proben zunächst 2 ml Puffer A (1:10 in ddH₂O verdünnte Komponente A, Ref: 51-9005451, BD Biosciences) für 10 Minuten zur Fixierung hinzugegeben. Der Puffer A wurde mittels Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 500 g bei Raumtemperatur und

Verwerfen des Überstandes entfernt. Es folgte die Hinzugabe von 3 ml FACS-Puffer und erneute Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 500 g bei Raumtemperatur mit Verwerfen des Überstandes. Dann wurde den Proben 0,5 ml Puffer C (1:50 in Puffer A verdünnte Komponente B, Ref: 51-9005450, BD Biosciences) für 30 Minuten zur Permeabilisierung hinzugegeben. Der Puffer C wurde mittels Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 500 g bei Raumtemperatur und Verwerfen des Überstandes entfernt. Es folgte die Hinzugabe von 2 ml FACS-Puffer und erneute Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 500 g bei Raumtemperatur mit Verwerfen des Überstandes. Nun folgte die Hinzugabe des Fluoreszenzantikörpers FoxP3-PE und des Kontrollantikörper IgG1-PE (siehe **Tabelle 13**) und Inkubation unter lichtgeschützten Bedingungen für 30 Minuten. Nach zweimaliger Hinzugabe von 2 ml FACS-Puffer und Zentrifugation der Proben für 5 Minuten bei 500 g bei Raumtemperatur mit Verwerfen des Überstandes wurden 200 µl FACS-Puffer hinzugefügt und das Streu- und Fluoreszenzverhalten der Zellen dieser Proben in einem Durchflusszytometer (FACSCalibur™, BD Biosciences, Vereinigte Staaten) untersucht. Die Daten wurden mit der Software „FlowJo 10“ nach den Gating-Strategien, dargestellt in **Abbildung 3**, **Abbildung 4** und **Abbildung 5**, ausgewertet. In jeder Messung wurden 50.000 Ereignisse registriert. (Lennartz et al., 2023)

Reagenz	Referenznummer	Herstellerfirma
Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	D8537	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten
Fetales Kälberserum (FBS)	F7524	Sigma-Aldrich, Vereinigte Staaten
Lyse-Puffer: FACS™ Lysing Solution	349202	BD Biosciences, Vereinigte Staaten
Komponente A: Human FoxP3 Buffer A	51-9005451	BD Biosciences, Vereinigte Staaten
Komponente B: Human FoxP3 Buffer B	51-9005450	BD Biosciences, Vereinigte Staaten

Tabelle 11: Reagenzien der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung.

Antikörper	Klon	Referenznummer	Herstellerfirma
Kontroll-Antikörper	-	-	-
IgG1-FITC	X40	345815	BD Biosciences, Deutschland
IgG1-PE	X40	345816	BD Biosciences, Deutschland
IgG1-PerCP	X40	345817	BD Biosciences, Deutschland
IgG1-APC (Mouse IgG1 APC Conjugate)	Class I (ASR)	MG105	Thermo Fisher, Vereinigte Staaten
B-, T- und NK- Zellfärbung	-	-	-
CD94-FITC (FITC Mouse Anti-Human CD94)	HP-3D9 (RUO)	555888	BD Biosciences, Deutschland
CD56-FITC	NCAM16.2	345811	BD Biosciences, Deutschland
CD4-FITC (FITC Mouse Anti- Human CD4)	RPA-T4 (RUO)	555346	BD Biosciences, Deutschland
CD8-FITC (FITC Mouse Anti- Human CD8)	RPA-T8 (RUO)	555366	BD Biosciences, Deutschland
CD56-PE	NCAM16.2	345812	BD Biosciences, Deutschland
CD19-PE (PE Mouse Anti- Human CD19)	HIB19 (RUO)	555413	BD Biosciences, Deutschland
CD16-PE (PE Mouse Anti- Human CD16)	3G8 (RUO)	555407	BD Biosciences, Deutschland
NKG2D-PE (anti-hNKG2D PE Conjugated Mouse)	149810	FAB139P	R&D Systems/ Bio-Techne, Deutschland

Nkp30-PE (CD337)	Z25	IM3709	Beckman Coulter, Vereinigte Staaten
NKp46-PE (CD335)	BAB281	IM3711	Beckman Coulter, Vereinigte Staaten
CD8-PE (PE Mouse Anti-Human CD8)	RPA-T8 (RUO)	555367	BD Biosciences, Deutschland
CD3-PerCP	SK7	345766	BD Biosciences, Deutschland
CD45-APC (Human CD45 APC Conjugate)	HI30	MHCD4505	Thermo Fisher, Deutschland
CD69-APC	L78 (RUO)	555367	BD Biosciences, Deutschland
CD56-APC (APC Mouse Anti-Human CD56)	B159 (RUO)	555518	BD Biosciences, Deutschland
CD25-APC	2A3 (CE/IVD)	340907	BD Biosciences, Deutschland
Färbung der regulatorischen T-Zellen	-	-	-
FoxP3-PE (PE Mouse anti-Human FoxP3)	259D/C7 (RUO)	349202	BD Biosciences, Deutschland

Tabelle 12: Fluoreszenzantikörper der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung.

Antikörper	Reagenzgläser	Volumen (µl)
Kontroll-Antikörper	-	-
IgG1-FITC	1,12	5
IgG1-PE	1	5
IgG1-PerCP	1,12	5
IgG1-APC (Mouse IgG1 APC Conjugate)	1,12	1

B-, T- und NK-Zellfärbung	-	-
CD94-FITC (FITC Mouse Anti-Human CD94)	2, 8-10	5
CD56-FITC	3-7	5
CD4-FITC (FITC Mouse Anti-Human CD4)	11, 13	20
CD8-FITC (FITC Mouse Anti-Human CD8)	14	20
CD56-PE	2	5
CD19-PE (PE Mouse Anti-Human CD19)	3	20
CD16-PE (PE Mouse Anti-Human CD16)	4	10
NKG2D-PE (anti-hNKG2D PE Conjugated Mouse)	5, 8	10
Nkp30-PE (CD337)	6, 9	10
NKp46-PE (CD335)	7, 10	10
CD8-PE (PE Mouse Anti-Human CD8)	11	20
CD3-PerCP	2-11, 13-14	10
CD45-APC (Human CD45 APC Conjugate)	2-4, 11	1
CD69-APC	5-7	5
CD56-APC (APC Mouse Anti-Human CD56)	8-10	10
CD25-APC	13-14	5
Färbung der regulatorischen T-Zellen*	-	-
IgG1-PE	12	5
FoxP3-PE (PE Mouse anti-Human FoxP3)	13-14	20

Tabelle 13: Pipettierschema der Antikörper der Durchflusszytometrie. *Die Hinzugabe dieser Antikörper erfolgte erst nach Permeabilisierung der Zellen (siehe Abschnitt 4.10).

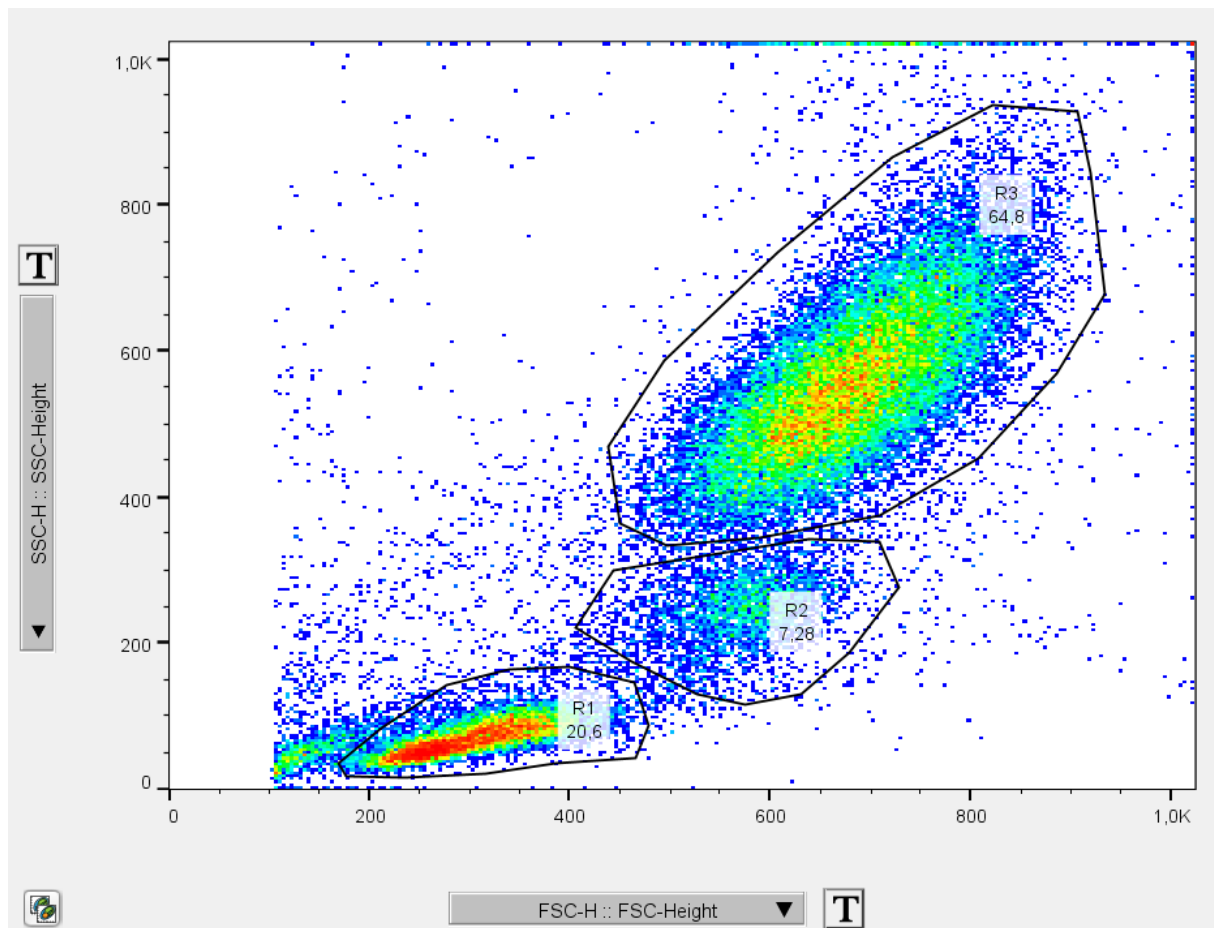


Abbildung 3: Beispielhaftes Gating der Lymphozyten eines Grad 3 Astrozytompatienten. R1: Lymphozyten, R2: Monozyten, R3 Granulozyten.

Zunächst wurden die peripheren Leukozyten nach ihrer Granularität, gemessen an ihrer Seitwärtsstreuung (Side Scatter, SSC) und ihrer Größe, gemessen an ihrer Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC) in Lymphozyten (R1), Monozyten (R2) und Granulozyten (R3) eingeteilt (**Abbildung 3**). Die mit Fluoreszenzantikörpern markierten Lymphozyten (R1) wurden über ihr Fluoreszenzverhalten weiter charakterisiert.

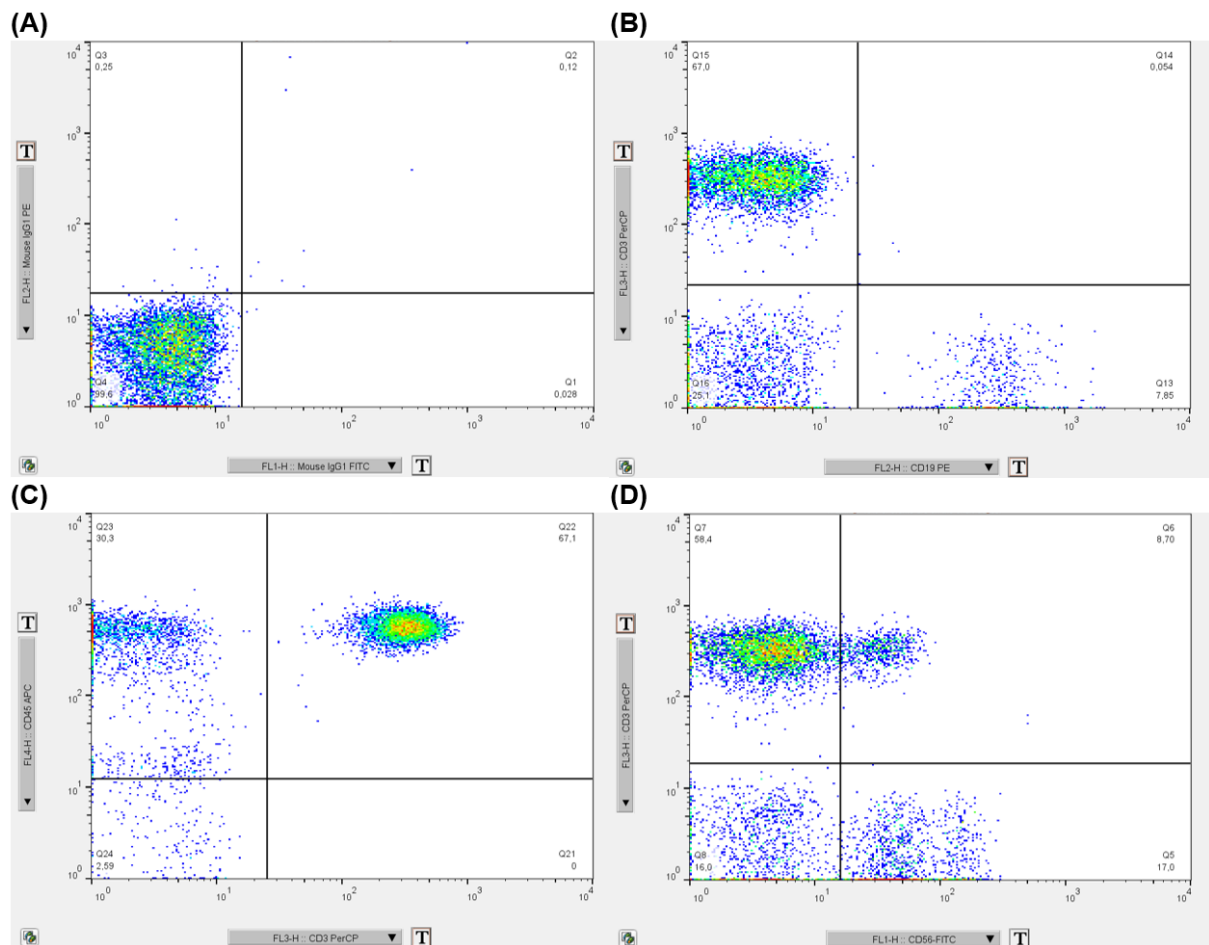


Abbildung 4: Beispielhaftes Gating der **(A)** Isotypen-Kontrolle, **(B)** CD19+/CD3- B-Zellen, **(C)** CD3+/CD45+ T-Zellen und **(D)** CD56+/CD3- NK-Zellen eines Grad 3 Oligodendrogliompatienten.

Das Gating der Lymphozytensubpopulationen wurde anhand der Isotyp-Kontrollen festgelegt und anschließend auf die mit Fluoreszenzantikörpern markierten Lymphozyten angewendet (**Abbildung 4**). Die angegebenen relativen Frequenzen beziehen sich auf den Anteil der jeweiligen Subpopulation an den Lymphozyten insgesamt (R1, **Abbildung 3**), mit Ausnahme der Lymphozyten (Anteil aller Leukozyten) und der CD56^{bright} NK-Zellen (Anteil der CD56+/CD3- NK-Zellen, **Abbildung 5**).

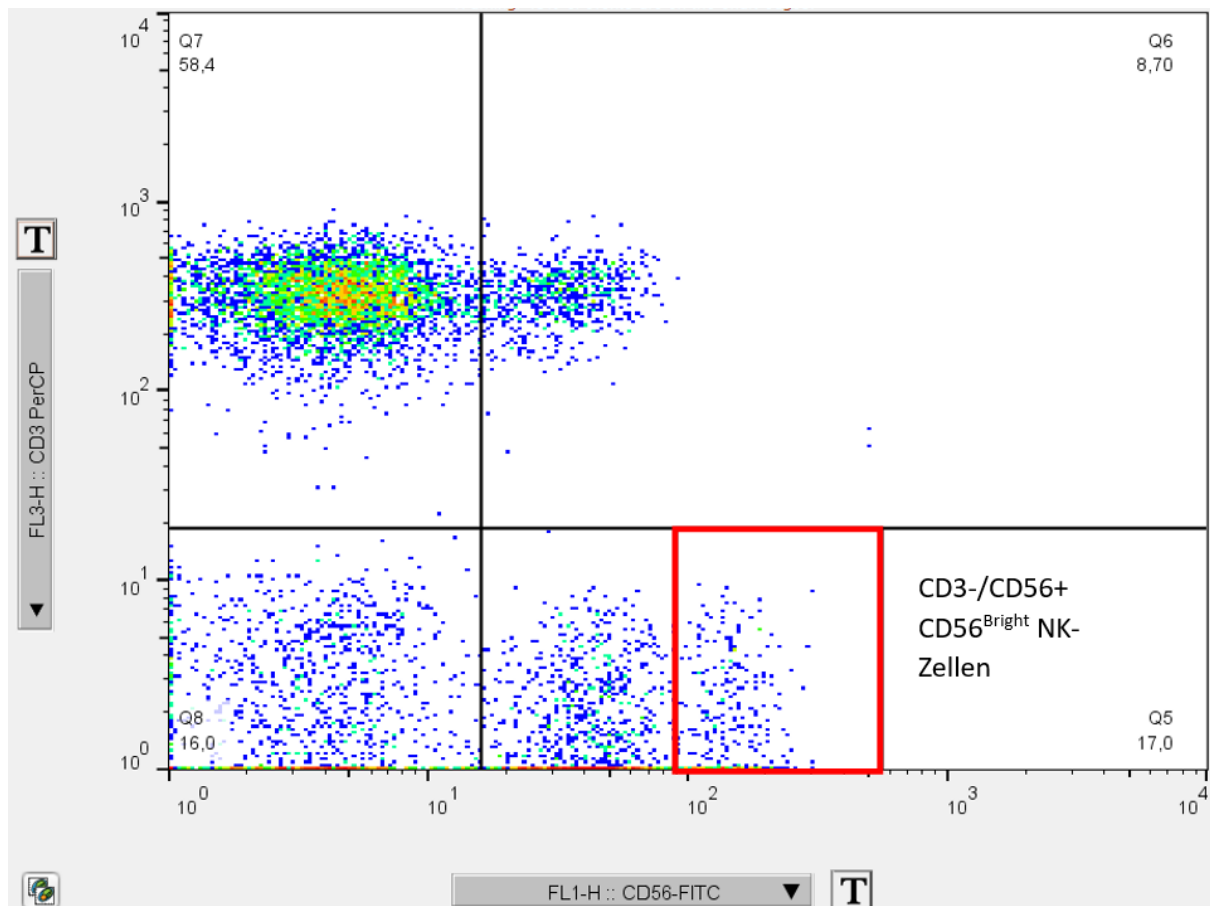


Abbildung 5: Beispielhaftes Gating der CD56^{bright} Untergruppe der CD56+/CD3- NK-Zellen eines Grad 3 Oligodendrogliompatienten.

Die CD56^{bright} NK-Zellen sind eine Untergruppe der CD56+/CD3- NK-Zellen, welche sich durch ihre hohe CD56 Expression von den restlichen CD56+/CD3- (CD56^{dim}) NK-Zellen abhebt. Das Gating dieser Lymphozytenpopulation erfolgte wie in **Abbildung 5** dargestellt. Angaben der Frequenz dieser Untergruppe beziehen sich auf ihren Anteil der CD56+/CD3- NK-Zellen.

4.11 Statistische Auswertung

Jegliche statistische Auswertung habe ich mit dem Programm „GraphPad Prism 10“ durchgeführt. Normalverteilung der Daten wurde mit einem Shapiro-Wilk Test (Alphafehler=0,05) getestet. Im Falle einer wahrscheinlichen Normalverteilung ($p > 0,05$ im Shapiro-Wilk Test) wurden die entsprechenden Gruppen mit einem One-way ANOVA Test für multiple Vergleiche verglichen, andernfalls mit einem Kruskal-Wallis Test, wobei alle Gruppen miteinander verglichen wurden. Der Vergleich der

Hsp70-Membranexpression zwischen Grad 3 Oligodendrogliomzellen und Grad 3 Astrozytomzellen (**Abbildung 11**) wurde mit einem Mann-Whitney Test durchgeführt. Kaplan-Meier Kurven wurden mit einem Log-Rank Test verglichen (**Abbildung 6** und **Abbildung 21**). Welcher Test angewandt wurde, kann der **Tabelle 14** und den entsprechenden Abbildungen entnommen werden. Alle statistisch signifikanten Ergebnisse sind in der **Tabelle 14** zusammengefasst. Unterschiede wurden bei den folgenden p-Werten als signifikant angegeben: nicht signifikant, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Statistisch signifikante Ergebnisse	
Abbildung	Verglichene Gruppen und verwendeter statistischer Test
5.5 Immunphäotypisierung peripherer Lymphozytensubpopulationen im Blut von Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten	
% Lymphozyten Abbildung 12	Gesundspender vs. Astrozytom Grad 3 One-way ANOVA * $p = 0,0322$
% CD3+/CD4+ T-Helferzellen Abbildung 14.B	Gesundspender vs. Oligodendrogliom Grad 2 One-way ANOVA * $p = 0,0126$
% CD56+/CD3+ NKT-Zellen Abbildung 14.D	Gesundspender vs. Oligodendrogliom Grad 2 Kruskal-Wallis Test * $p = 0,0206$ Oligodendrogliom Grad 2 vs. Astrozytom Grad 2 Kruskal-Wallis Test * $p = 0,0422$ Oligodendrogliom Grad 2 vs. Astrozytom Grad 3 Kruskal-Wallis Test ** $p = 0,0057$
% CD69/CD3+ T-Zellen Abbildung 14.E	Gesundspender vs. Oligodendrogliom Grad 3 Kruskal-Wallis Test * $p = 0,0279$
% CD4+/FoxP3+/CD25+ regulatorische T Zellen Abbildung 15.A	Gesundspender vs. Oligodendrogliom Grad 2 One-way ANOVA ** $p = 0,0043$
% CD8+/FoxP3+/CD25+ regulatorische T Zellen Abbildung 15.B	Gesundspender vs. Oligodendrogliom Grad 3 Kruskal-Wallis Test ** $p = 0,0083$
% CD56 ^{bright} NK-Zellen	Gesundspender vs. Astrozytom Grad 3

Abbildung 16.B	Kruskal-Wallis Test * p=0,0120
% CD56+/CD69+ NK-Zellen Abbildung 16.C	Gesundspender vs. Astrozytom Grad 3 Kruskal-Wallis Test ** p=0,0085 Oligodendrogliom Grad 2 vs. Astrozytom Grad 3 Kruskal Wallis Test * p=0,0353
% CD56+/CD94+ NK-Zellen Abbildung 16.D	Oligodendrogliom Grad 2 vs. Astrozytom Grad 3 One-way ANOVA * p=0,0175
% NKG2D+/CD3- NK-Zellen Abbildung 16.E	Oligodendrogliom Grad 2 vs. Astrozytom Grad 3 Kruskal-Wallis Test * p=0,0242
% Nkp30+/CD3- NK-Zellen Abbildung 16.F	Oligodendrogliom Grad 2 vs. Astrozytom Grad 3 Kruskal-Wallis Test * p=0,0242 Astrozytom Grad 2 vs. Astrozytom Grad 3 Kruskal-Wallis Test ** p=0,0026
% Nkp46+/CD3- NK-Zellen Abbildung 16.G	Oligodendrogliom Grad 2 vs. Astrozytom Grad 3 One-way ANOVA * p=0,0133 Astrozytom Grad 2 vs. Astrozytom Grad 3 One-way ANOVA ** p=0,0074
5.6 Korrelation peripherer Hsp70^{low}/Hsp70^{high} Konzentrationen und den Frequenzen verschiedener Lymphozytensubpopulationen in Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten	
% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} CD4+/CD3+ T-Zellen Abbildung 17	Gesundspender vs. Grad 2 Hsp70 ^{low} One-way ANOVA *** p=0,0002 Grad 2 Hsp70 ^{low} vs. Grad 2 Hsp70 ^{high} One-way ANOVA ** p=0,0069 Grad 2 Hsp70 ^{low} vs. Grad 3 Hsp70 ^{low} One-way ANOVA * p= 0,0303 Grad 2 Hsp70 ^{low} vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} One-way ANOVA * p=0,0387
% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} CD3- /CD56+ NK-Zellen Abbildung 19.A	Grad 2 Hsp70 ^{high} vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} Kruskal-Wallis Test * p=0,0251 Grad 3 Hsp70 ^{low} vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} Kruskal-Wallis Test * p=0,0283

% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} CD56+/CD69+ NK-Zellen Abbildung 19.C	Gesundspender vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} Kruskal-Wallis Test ** p=0,0031
% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} CD56+/CD94+ NK-Zellen Abbildung 19.D	Gesundspender vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} One-way ANOVA ** p=0,0091 Grad 2 Hsp70 ^{high} vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} One-way ANOVA * p=0,0284
% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} NKp30+/CD3- NK-Zellen Abbildung 19.F	Gesundspender vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} One-way ANOVA * p=0,0436 Grad 2 Hsp70 ^{low} vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} One-way ANOVA * p=0,0260 Grad 2 Hsp70 ^{high} vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} One-way ANOVA * p=0,0316
% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} NKp46+/CD3- NK-Zellen Abbildung 19.G	Grad 2 Hsp70 ^{low} vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} One-way ANOVA * p=0,0282 Grad 2 Hsp70 ^{high} vs. Grad 3 Hsp70 ^{high} One-way ANOVA * p=0,0187
% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} CD3- /CD56+ NK-Zellen Abbildung 20.A	Grad 3 Oligodendrogliome Hsp70 ^{low} vs. Grad 3 Oligodendrogliome Hsp70 ^{high} One-way ANOVA * p=0,0336
% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} CD56 ^{bright} NK-Zellen Abbildung 20.B	Gesundspender vs. Grad 3 Astrozytome Hsp70 ^{high} Kruskal-Wallis Test * p=0,0369
% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} CD56+/CD69+ NK-Zellen Abbildung 20.C	Gesundspender vs. Grad 3 Oligodendrogliome Hsp70 ^{high} Kruskal-Wallis Test * p=0,0462
% Hsp70 ^{low} /Hsp70 ^{high} CD56+/CD94+ NK-Zellen Abbildung 20.D	Gesundspender vs. Grad 3 Oligodendrogliome Hsp70 ^{low} One-way ANOVA * p=0,0171

Tabelle 14: Zusammenfassung der statistisch signifikanten Ergebnisse.

5. Ergebnisse

Die angewendeten Methoden können Abschnitt 4. Material und Methoden entnommen werden. Zusammenfassend wurden EDTA- und Serumblutproben Therapie-naiven Patienten zum Zeitpunkt der initialen Diagnosestellung der jeweiligen Gliomerkrankung entnommen ($t=0$). Das freie und membrangebundene Hsp70 im Plasma dieser Proben wurde mit dem Hsp70-exo ELISA gemessen. Das freie Hsp70 im Serum wurde mit dem R&D Systems DuoSet® ELISA bestimmt. Zusätzlich wurden Exosomen aus dem Vollblut ausgewählter Patienten isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Die Hsp70 Konzentration des dabei entstehendem Exosomen-depletierten Überstandes wurde mit dem Hsp70-exo ELISA gemessen. Das Tumorgewebe wurde exemplarisch immunhistochemisch gefärbt und Tumorzellen auf membrangebundenes Hsp70 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Vollblutproben wurden mittels Durchflusszytometrie immunphänotypisiert und die Lymphozytenfrequenzen wurden mit den peripheren Hsp70 Konzentrationen ($\text{Hsp70}^{\text{low}}/\text{Hsp70}^{\text{high}}$) korreliert. Das Gesamtüberleben wurde mit der Hsp70 Konzentration und ausgewählten Lymphozytenfrequenzen korreliert. Zuletzt wurden Follow-up-Proben mit dem Hsp70-exo ELISA auf das freie und membrangebundene zirkulierende Hsp70 untersucht.

Die verwendeten Box-Plots zeigen den Median, 25./75. Perzentile und 5./95. Perzentile. Die im Fließtext in Klammern angegebene Spannweite bezieht sich auf die 25./75. Perzentilen. Die Anzahl der Proben, die mit der jeweiligen Untersuchungsmethode untersucht wurden, kann den entsprechenden Abbildungen und **Tabelle 1** entnommen werden.

5.1 Gesamtüberleben der Patienten

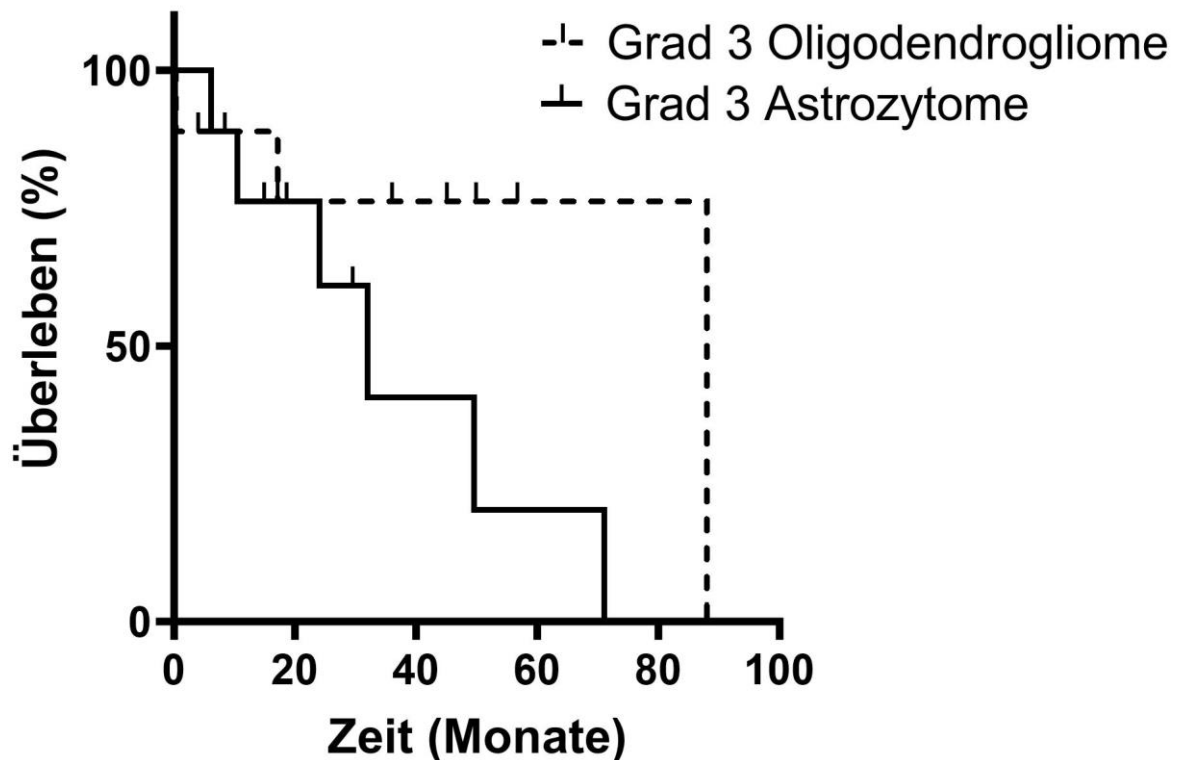


Abbildung 6: Kaplan-Meier Kurven des Gesamtüberlebens der Grad 3 Oligodendrogliom- (n=15) und Astrozytompatienten (n=16) in Monaten nach der Erstdiagnose der Tumorerkrankung. (Lennartz et al., 2023)

Zur weiteren Charakterisierung der eingeschlossenen Patienten habe ich das Gesamtüberleben der Patienten, basierend auf klinischen Daten der Abteilung für Neurologie des Klinikum rechts der Isar, TUM, erhoben. Die eingeschlossenen Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=15) hatten ein medianes Gesamtüberleben von 88 Monaten und die Grad 3 Astrozytompatienten (n=16) ein medianes Gesamtüberleben von 32 Monaten (**Abbildung 6**). Der Beobachtungszeitraum für alle eingeschlossenen Patienten lag zwischen 2015 und 2023. (Lennartz et al., 2023)

Das Gesamtüberleben der Patientenkohorten ist mit dem Gesamtüberleben von Gliompatienten in anderen klinischen Studien vergleichbar (Dong et al., 2016; Reuss et al., 2015; Shin et al., 2020).

Von den eingeschlossenen Grad 2 Oligodendrogliom- und Astrozytomentpatienten ist in dem Beobachtungszeitraum (2015 bis 2023) kein Todesfall erfasst worden.

5.2 Hsp70 Konzentration im peripheren Plasma und Serum von Oligodendrogliom- und Astrozytomentpatienten

Die Hsp70 Konzentration im peripheren Blut von Gliomentpatienten wurde in Plasma- oder Serumproben mit dem Hsp70-exo ELISA (**Abbildung 7**) und dem R&D Systems DuoSet® ELISA (**Abbildung 8**) bestimmt.

Der Hsp70-exo ELISA wurde für die Hsp70-Bestimmung im Plasma zum Diagnosezeitpunkt von 118 Gesundspendern (n=118), 4 Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten (n=4), 8 Grad 2 Astrozytomentpatienten (n=8), 10 Grad 3 Oligodendrogliomentpatienten (n=10) und 13 Grad 3 Astrozytomentpatienten (n=13) verwendet (**Abbildung 7**). Der R&D Systems DuoSet® ELISA wurde für die Hsp70-Bestimmung im Serum zum Diagnosezeitpunkt von 150 Gesundspendern (n=150), 7 Grad 3 Oligodendrogliomentpatienten (n=7) und 5 Grad 3 Astrozytomentpatienten (n=5), wobei diese Daten von Dominik Lobinger zur Verfügung gestellt wurden (**Abbildung 8**) (Lobinger et al., 2021). In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Plasma oder Serum keinen Einfluss auf das Messergebnis hat (Werner et al., 2021).

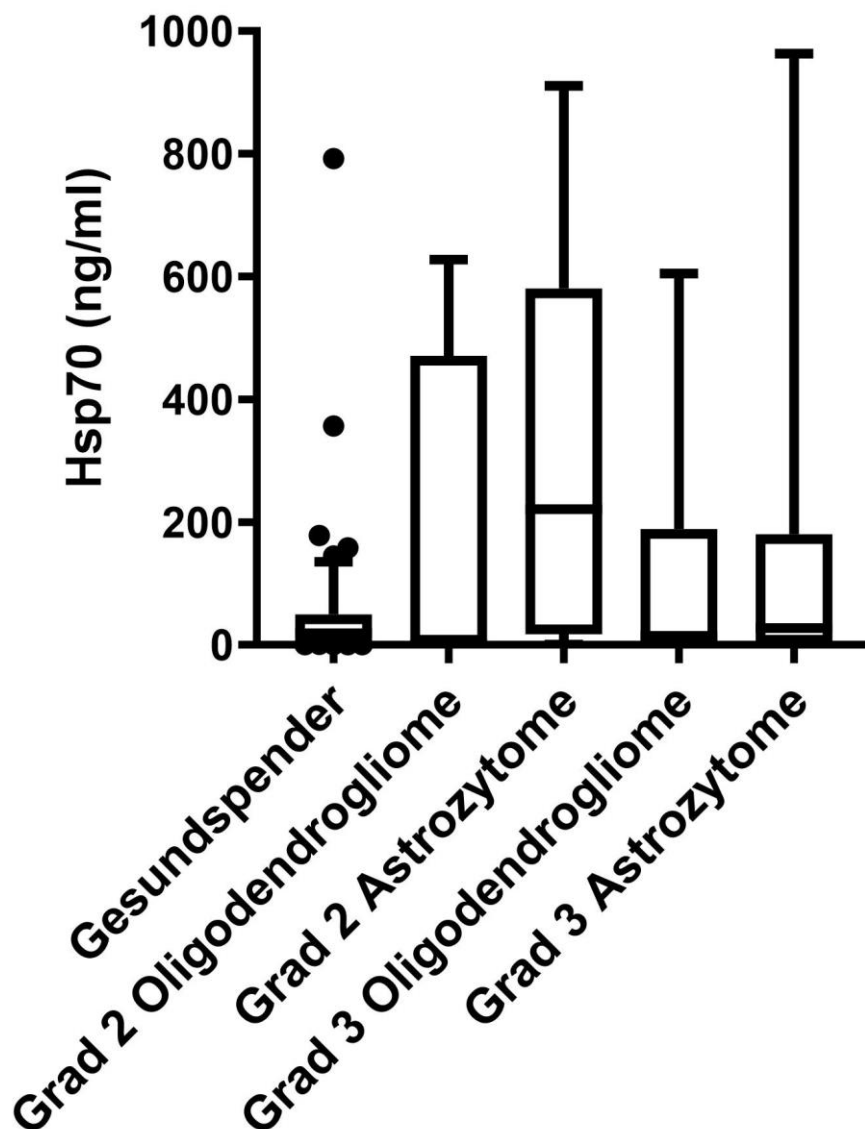


Abbildung 7: Konzentration (ng/ml) des freien und membrangebundenen Hsp70 im Plasma von Gesundspendern (n=118), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=4), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=10) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=13), gemessen mit dem Hsp70-exo ELISA. Die Gruppen wurden mit einem Kruskal-Wallis Test verglichen. (Lennartz et al., 2023)

Die Konzentration des freien und membrangebundenen Hsp70, gemessen mit dem Hsp70-exo ELISA, unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gesundspendern und den eingeschlossenen Gliompatienten (**Abbildung 7**). Die Gesundspender (n=118) zeigten eine mediane Hsp70 Plasmakonzentration von 18,9 ng/ml (4,7-49,4 ng/ml), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=4) 0,8 ng/ml (0,2-470,9 ng/ml), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 221,2 ng/ml (17,4-580,6 ng/ml), Grad 3

Oligodendrogliompatienten (n=10) 4,8 ng/ml (0,0-188,9 ng/ml) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=13) 27,5 ng/ml (0,0-180,0 ng/ml). (Lennartz et al., 2023)

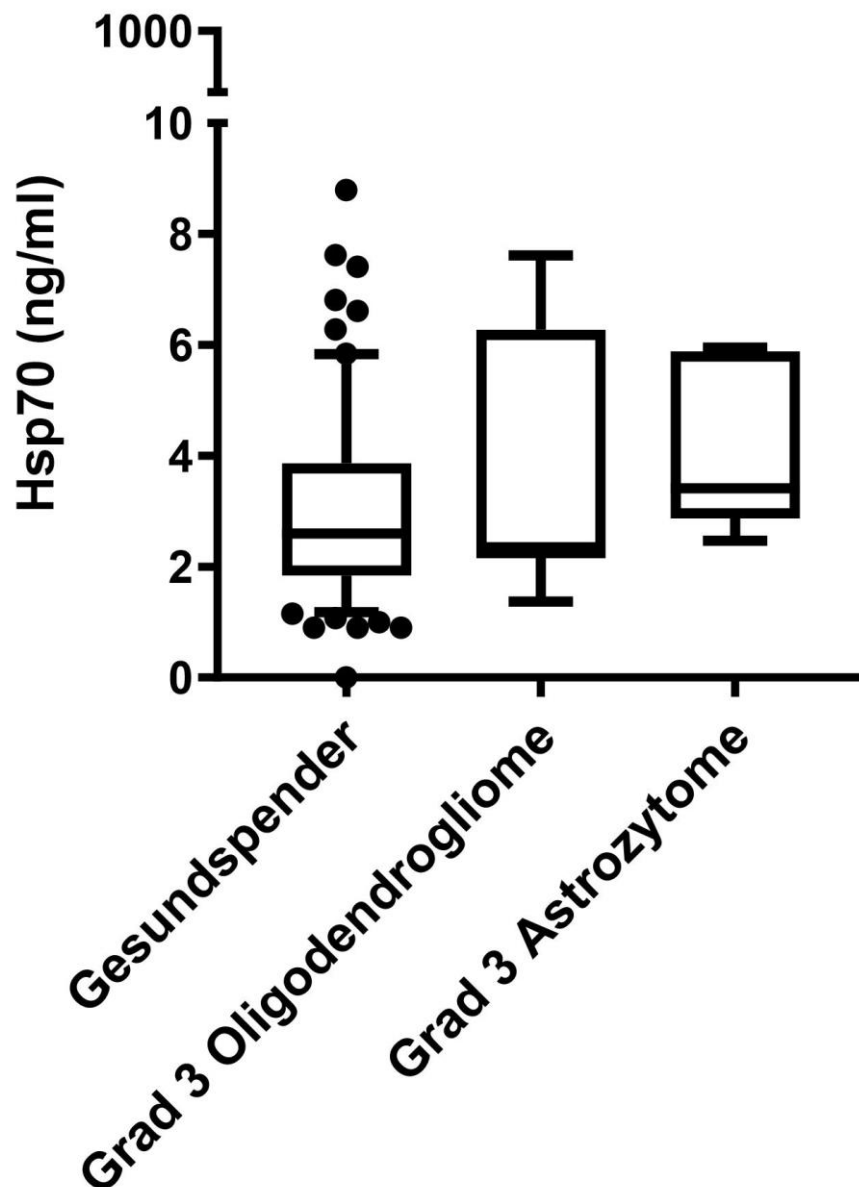


Abbildung 8: Konzentration (ng/ml) des freien Hsp70 im Serum von Gesundspendern (n=150), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=7) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=5), gemessen mit dem R&D Systems DuoSet® ELISA. Die dargestellten Daten wurden von Dominik Lobinger erhoben. Die Gruppen wurden mit einem Kruskal-Wallis Test verglichen. (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021)

Die Messung der freien Hsp70 Konzentration in Serumproben von Gliompatienten mit dem R&D Systems DuoSet® ELISA (**Abbildung 8**) ergab insgesamt niedrigere

Werte als die Messung mit dem Hsp70-exo ELISA (**Abbildung 7**). Auch hier unterscheiden sich keine der untersuchten Gruppen signifikant voneinander. Die Gesundspender (n=150) zeigten eine mediane Hsp70 Konzentration von 2,6 ng/ml (1,8-3,9 ng/ml), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=7) 2,4 ng/ml (2,2-6,3 ng/ml) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=5) 3,4 ng/ml (2,9-5,9 ng/ml). (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021)

5.3 Charakterisierung von Patientenexosomen

Um das Vorhandensein von Hsp70 membranpositiven extrazellulären Vesikeln zu sichern, die möglicherweise einen Anteil der Messunterschiede der beiden ELISA-Methoden bilden, habe ich in ausgewählten Proben Patientenexosomen isoliert und in Bezug auf Hsp70 charakterisiert (**Abbildung 9**).

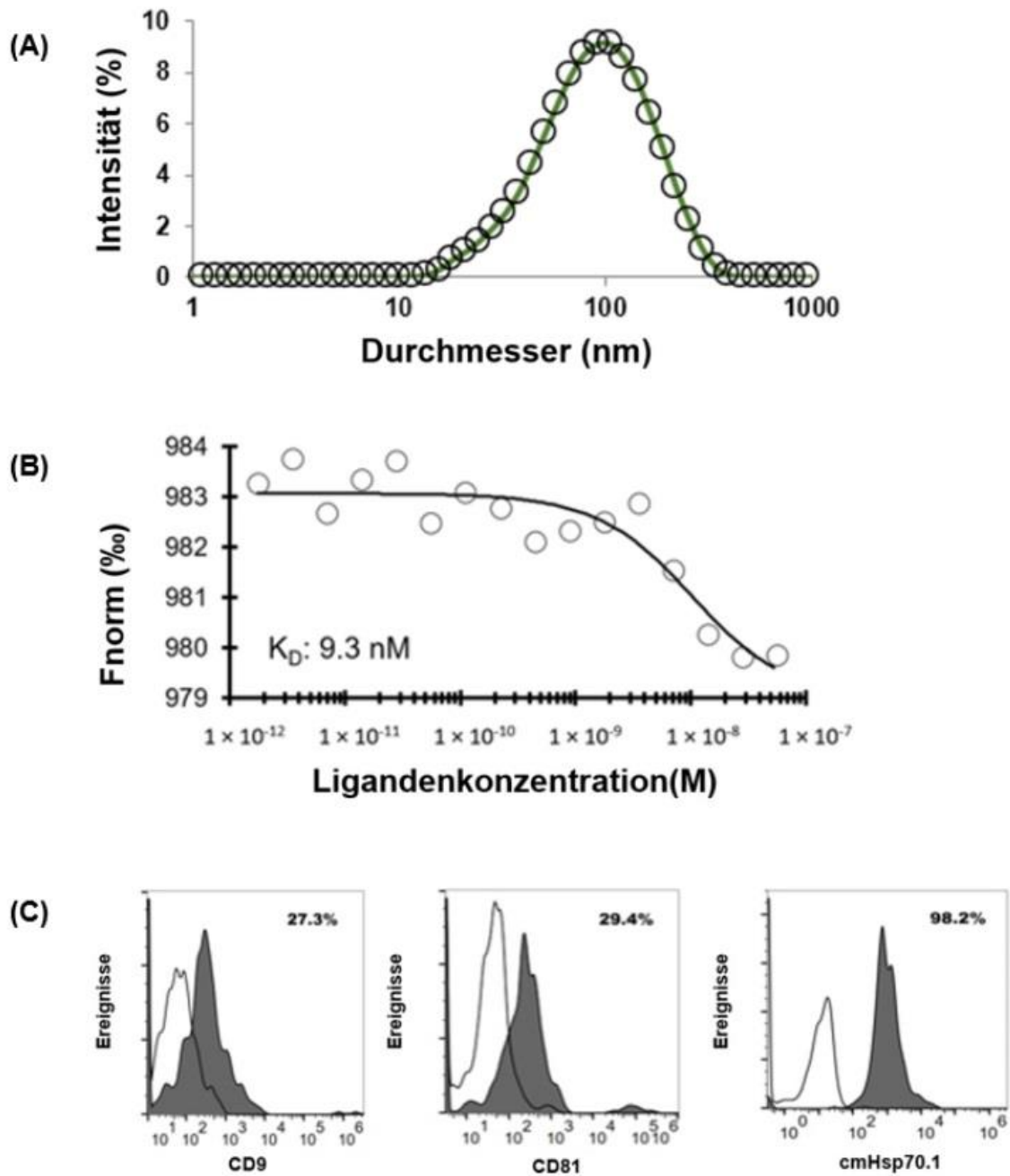


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der Charakteristika isolierter extrazellulärer Vesikel eines Grad 3 Astrozytompatienten. **(A)** Größenverteilung der extrazellulären Vesikel, **(B)** Bindungsaffinität (K_D) der extrazellulären Vesikel zu dem cmHsp70.1 Antikörper und **(C)** Membranpositivität von den Exosomen-typischen Oberflächenmarkern CD9, CD81 und cmHsp70.1. (Lennartz et al., 2023)

Die mittels Ultrazentrifugation isolierten extrazellulären Vesikel dieses Grad 3 Astrozytompatienten zeigten eine für Exosomen charakteristische Größenverteilung mit einem typischen Durchmesser von etwa 100 nm (**Abbildung 9.A**), gemessen durch dynamische Lichtstreuung (dynamic light scattering) mit einem Zetasizer (Malvern, Vereinigtes Königreich) mit einem Brechungsindex von 1.38 und einer Absorption von 0.01. Die Vesikel zeigten eine Bindungsaffinität zu dem cmHsp70.1 Antikörper von 9,3 K_D (**Abbildung 9.B**), gemessen durch microscale thermophoresis (MST) mit einem NanoTemper® Monolith NT.115 Gerät (NanoTemper Technologies GmbH, Deutschland). Im FACS zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Kurven für die Exosomen-typischen Oberflächenmarker CD9, CD81 und cmHsp70.1, mit einer Oberflächenpositivität von 27,3 % für CD9, 29,4 % für CD81 und 98,2 % für cmHsp70.1 (**Abbildung 9.C**). (Lennartz et al., 2023)

Zusätzlich wurde die Hsp70 Konzentration des unbehandelten Plasmas und des Exosomen-depletierten Überstandes dieses Patienten mit dem Hsp70-exo ELISA gemessen. Dieser Patient zeigte eine Konzentration von 129,5 ng/ml Hsp70 im Plasma und 14,8 ng/ml im Exosomen-depletierten Überstand (nach Einberechnung der entsprechenden Verdünnung). Dies könnte darauf hinweisen, dass membrangebundenes exosomales Hsp70 in diesem Patienten einen Großteil des zirkulierenden Hsp70 darstellte. (Lennartz et al., 2023)

5.4 Intrazelluläre und oberflächliche Hsp70 Expression in Gewebeschnitten und einzelnen Tumorzellen

Um die Verteilung von Hsp70 im Gliomgewebe exemplarisch darzustellen, wurde eine immunhistochemische Färbung eines Schnittes eines Grad 3 Glioms mit dem cmHsp70 Antikörper von Dominik Lobinger angefertigt. Hierbei zeigte sich eine dominant nukleäre Anfärbung der Tumorzellen (**Abbildung 10**).

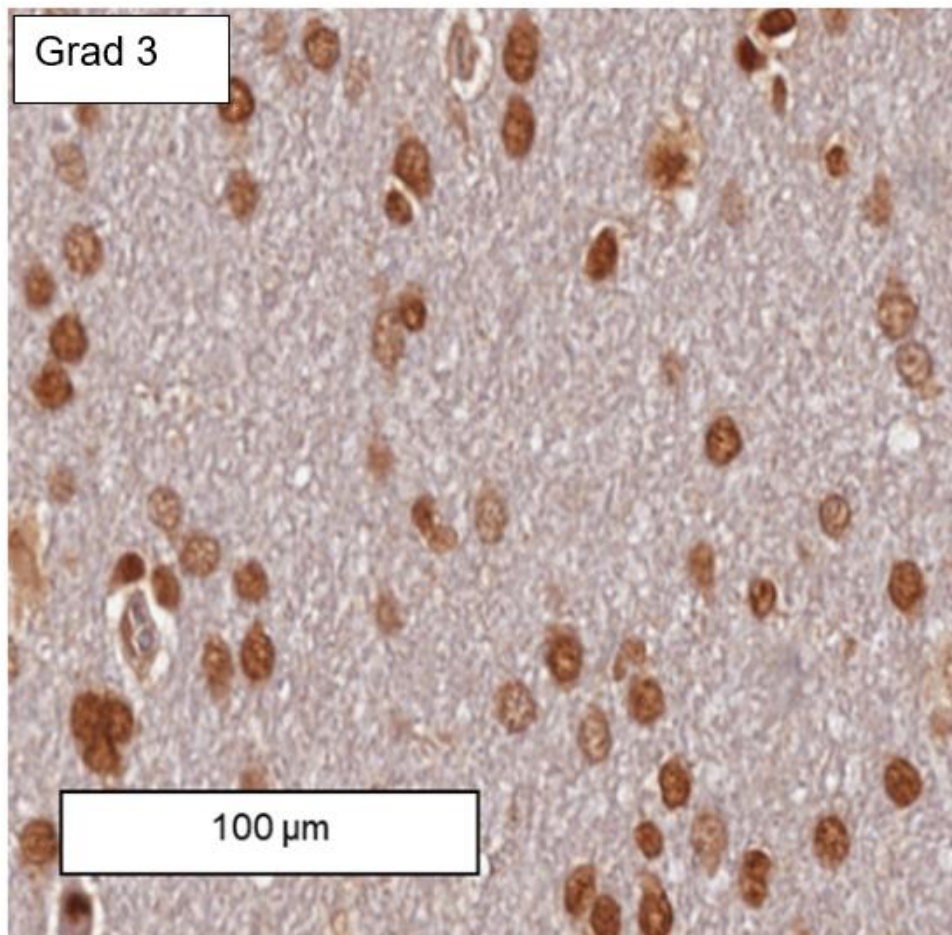


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung des intrazellulären Hsp70 eines Grad 3 Hirntumorschnittes mit dem cmHsp70.1 Antikörper. Der angezeigte Maßstab entspricht 100µm. Die Färbung wurde von Dominik Lobinger durchgeführt. (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021)

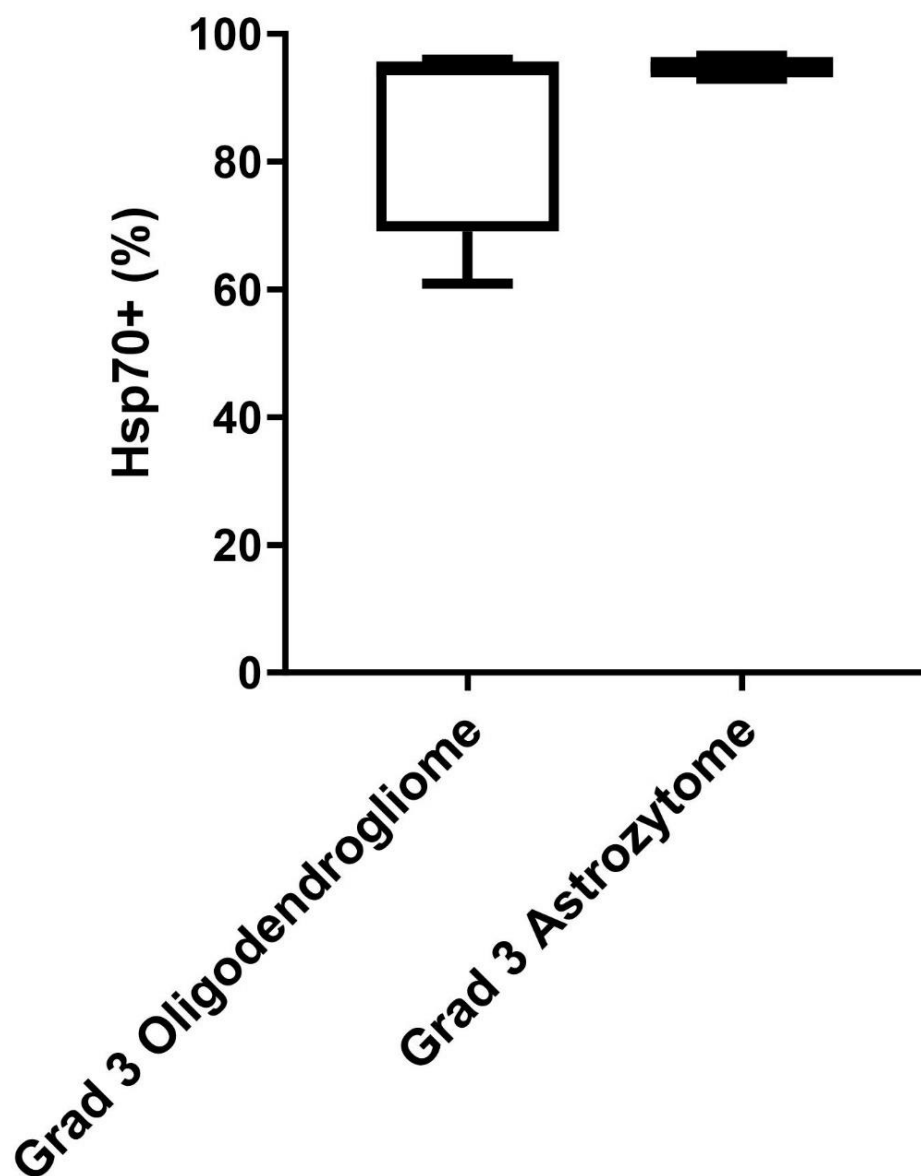


Abbildung 11: Membranexpression von Hsp70 an Tumorzellen von Grad 3 Oligodendrogliom (n=4) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=2). Die dargestellten Daten wurden von Mathias Pilz erhoben. Die Gruppen wurden mit einem Mann-Whitney Test verglichen. (Lennartz et al., 2023)

Die Membranexpression von Hsp70 an Tumorzellen von Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des cmHsp70.1 Antikörpers von Mathias Pilz bestimmt (**Abbildung 11**). Tumorzellen von Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=4) zeigten eine mediane Hsp70-Membranpositivität von 94,3 % (69,1-95,6 %) und Tumorzellen von Grad 3 Astrozytompatienten (n=2) zeigten eine mediane Hsp70-Membranpositivität von 94,8

% (93,0-96,6 %). Diese beiden Gruppen unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander. Die medianen Membranpositivitäten von 94,3 % beziehungsweise 94,8 % sind allerdings höher als exemplarische Werte von isolierten Glioblastomzellen (64,7 %), U87MG Glioblastomzellen (61,5 %) und nicht-tumorösen Astrozyten (1,7 %) (Lennartz et al., 2023).

5.5 Immunphänotypisierung peripherer Lymphozytensubpopulationen im Blut von Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten

Vollblutproben der Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten (n=41) wurden mittels multiparameter-Durchflusszytometrie auf die relativen Frequenzen der folgenden Lymphozytensubpopulationen untersucht: Lymphozyten insgesamt, CD3-/CD19+ B-Lymphozyten, CD3+/CD45+ T-Lymphozyten, CD4+/CD3+ T-Helferzellen, CD8+/CD3+ zytotoxische T-Zellen, CD56+/CD3+ NK-T-Zellen (natürliche Killer T-Zellen), CD69+/CD3+ T-Zellen, CD94+/CD3+ T-Zellen, NKG2D+/CD3+ T-Zellen, CD4+/FoxP3+/CD25+ regulatorische T-Zellen, CD8+/FoxP3+/CD25+ regulatorische T-Zellen, CD56+/CD3- NK-Zellen (natürliche Killerzellen), CD56^{bright} NK-Zellen (CD3-/CD56+ NK-Zellen mit hoher CD56 Expression), CD69+/CD56+ NK-Zellen, CD94+/CD56+ NK-Zellen, NKG2D NK-Zellen, Nkp30/CD3- NK-Zellen und Nkp46/CD3- NK-Zellen (Lennartz et al., 2023).

5.5.1 Lymphozyten

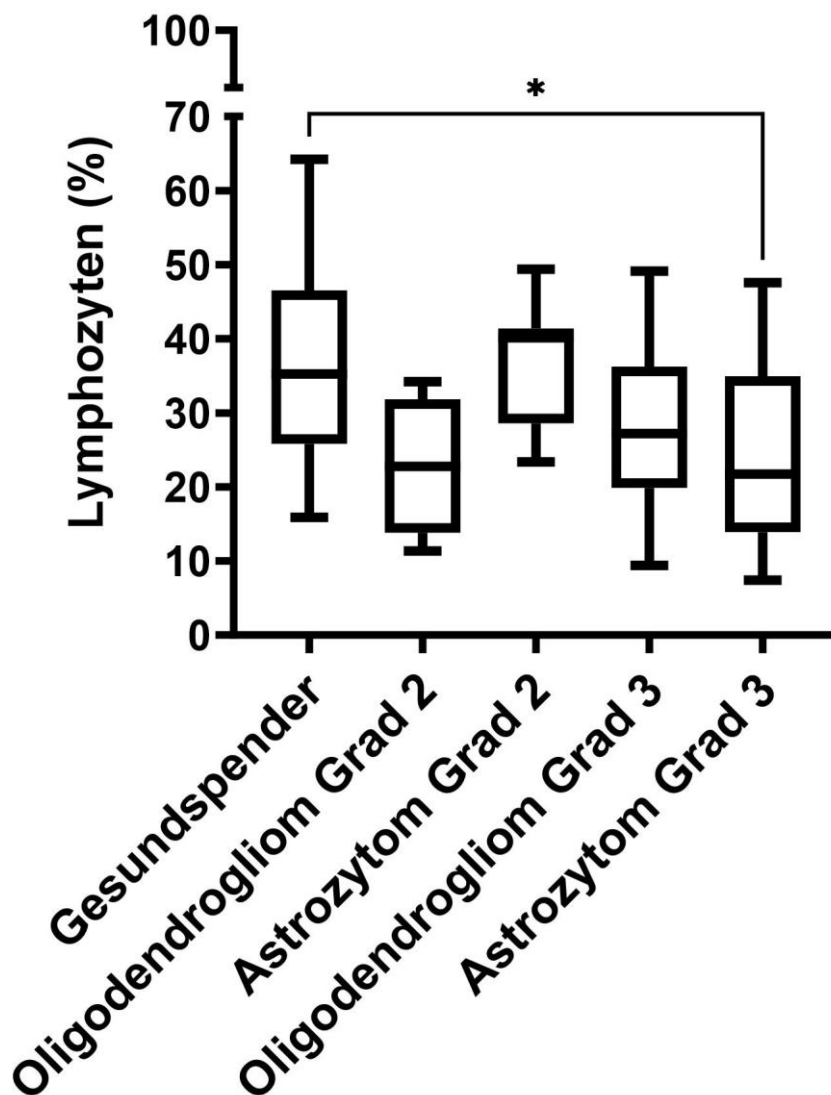


Abbildung 12: Relativer Anteil (%) der Lymphozyten an den gesamten peripheren Leukozyten im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15). Statistisch signifikante Ergebnisse * $p < 0,05$. Die Gruppen wurden mit einem one-way ANOVA verglichen.

Der relative Anteil der Lymphozyten an den gesamten peripheren Leukozyten, bestimmt anhand des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts (FSC/SSC) in der Durchflusszytometrie, ist in Grad 3 Astrozytompatienten im Vergleich zu den

Gesundspendern signifikant erniedrigt (* $p < 0,05$, **Abbildung 12**). Auch die WHO-Grad 2 und 3 Oligodendrogliompatienten zeigten im Vergleich zu den Gesundspendern tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant, reduzierte Lymphozytenfrequenzen. Zwischen den Tumorkohorten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gesundspender ($n=16$) zeigten eine mediane Lymphozytenfrequenz von 35,3 % (25,8-46,6 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten ($n=5$) 22,8 % (13,8-31,9 %), Grad 2 Astrozytompatienten ($n=8$) 40,1 % (28,6-41,4 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten ($n=13$) 27,2 % (19,9-36,2 %) und Grad 3 Astrozytompatienten ($n=15$) 21,7 % (13,9-35,0 %).

5.5.2 B-Zellen

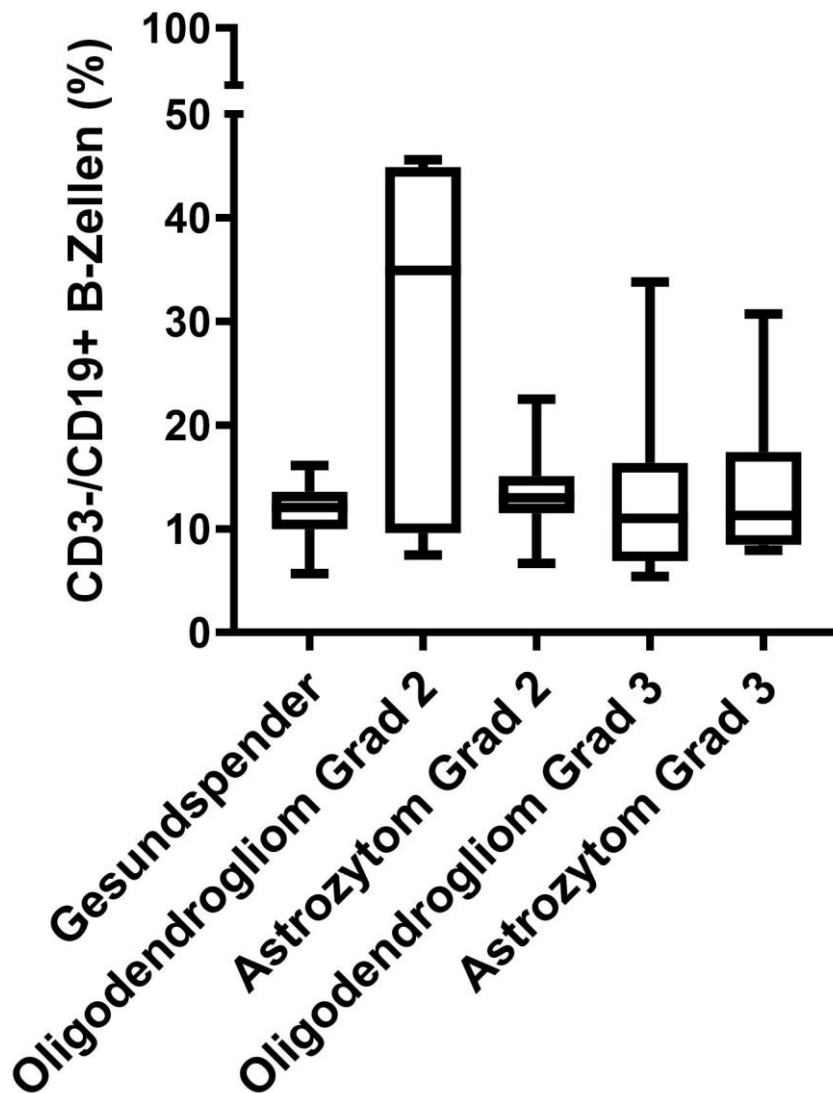
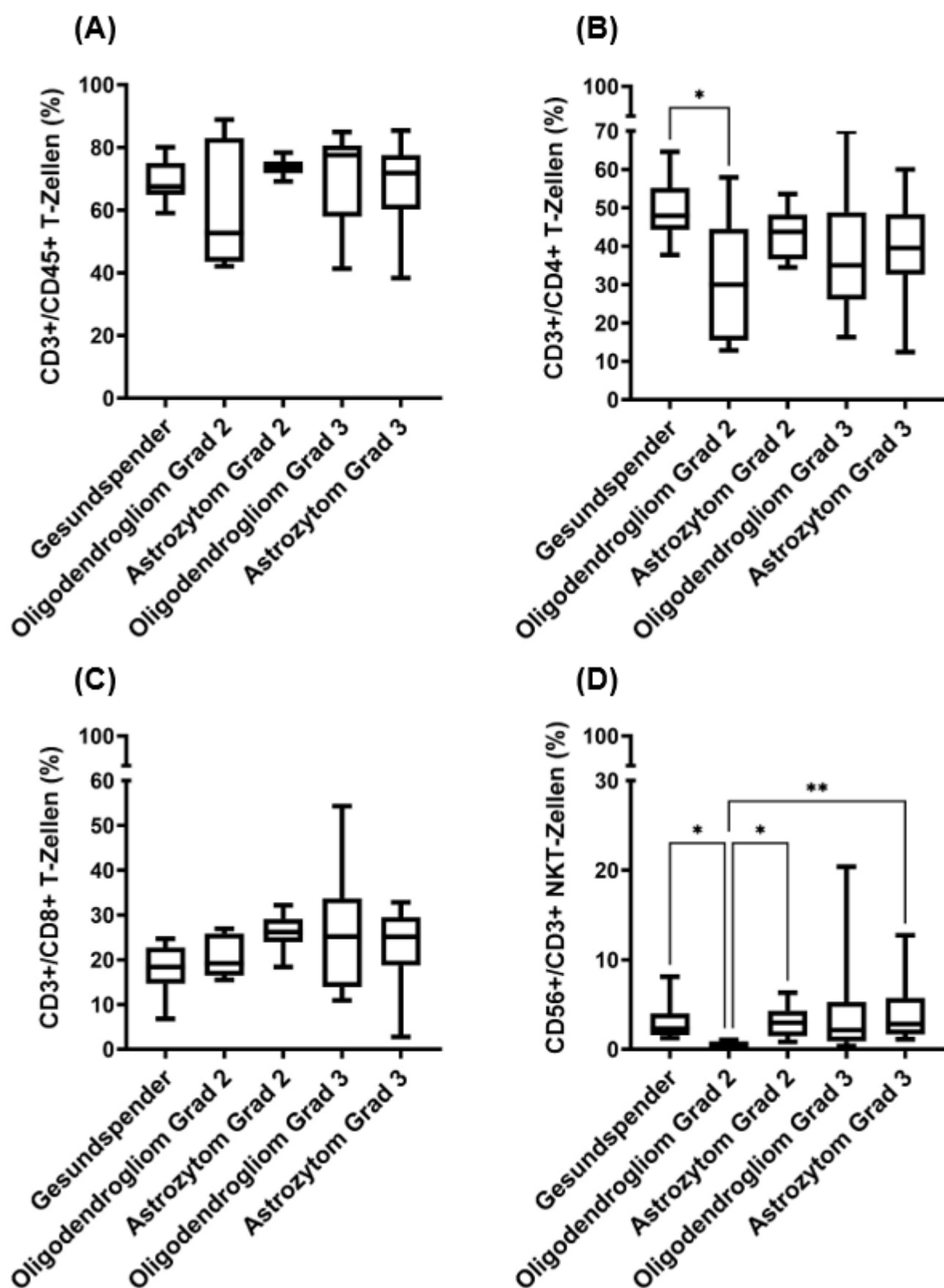


Abbildung 13: Relativer Anteil (%) der CD3-/CD19+ B-Zellen im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15). Die Gruppen wurden mit einem Kruskal-Wallis Test verglichen.

Der relative Anteil der CD3-/CD19+ B-Zellen unterscheidet sich nicht statistisch signifikant zwischen den Gesundspendern und den untersuchten Tumorkohorten (**Abbildung 13**). Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane CD3-/CD19+ B-Zellfrequenz von 12,1 % (10,0-13,6 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5)

34,9 % (9,6-44,9 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 13,0 % (11,5-15,1 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 11,0 % (6,9-16,4 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 11,3 % (8,5-17,4 %).

5.5.3 T-Zellen



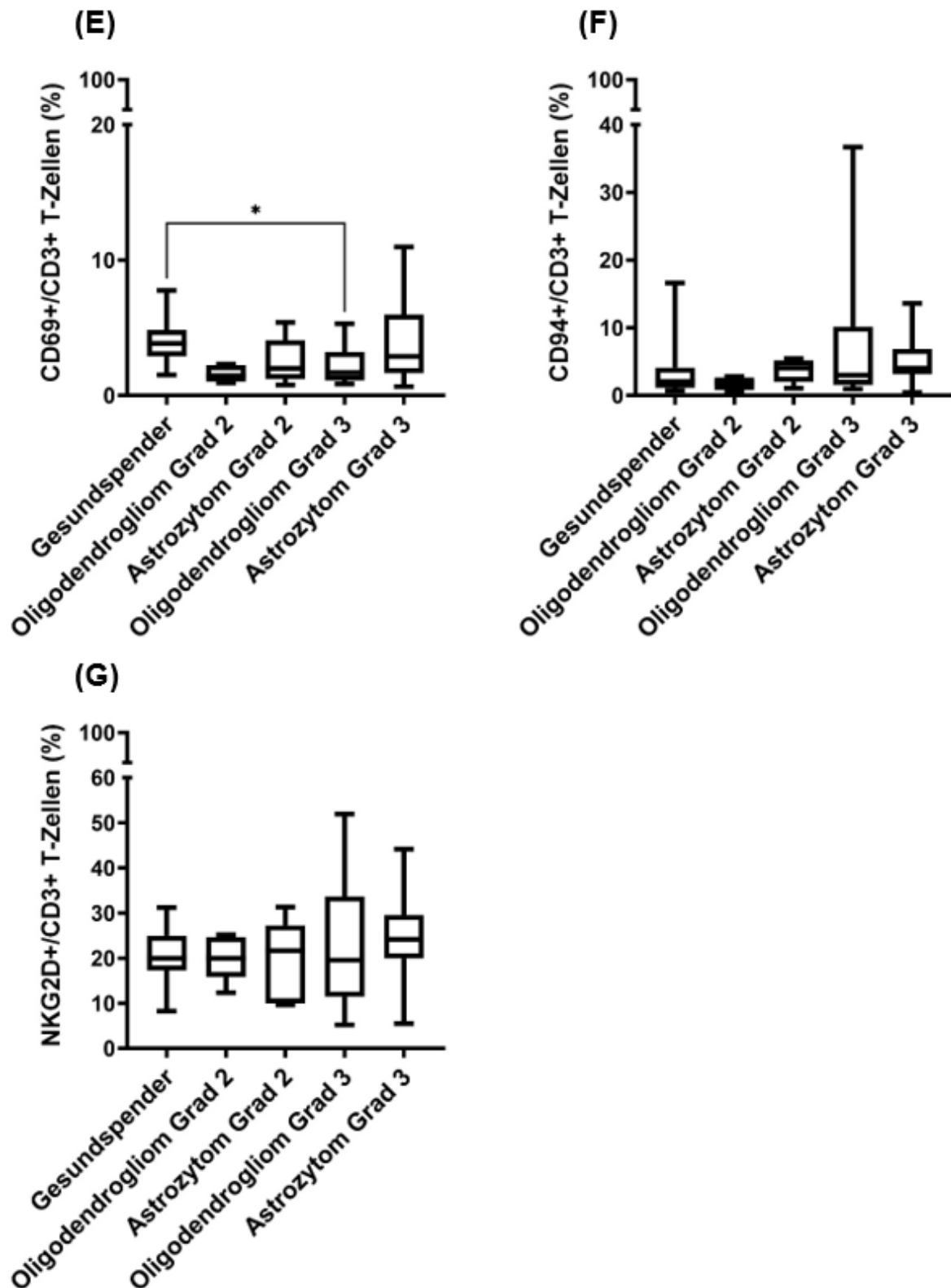


Abbildung 14: Relativer Anteil (%) der T-Zellpopulationen im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15). **(A)** CD3+/CD45+ T-Lymphozyten (One-way ANOVA), **(B)** CD3+/CD4+ T-Helferzellen (One-way ANOVA), **(C)** CD3+/CD8+ zytotoxische T-

Zellen (One-way ANOVA), **(D)** CD56+/CD3+ NKT-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(E)** CD69+/CD3+ T-Zellen (Kruskal-Wallis Test, Astrozytom Grad 3 n=14), **(F)** CD94+/CD3+ T-Zellen (Kruskal-Wallis Test, Oligodendrogliom Grad 2 n=4) und **(G)** NKG2D+/CD3+ T-Zellen (One-way ANOVA). Statistisch signifikante Unterschiede: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (Lennartz et al., 2023)

Der relative Anteil der CD3+/CD45+ T-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gesundspendern und den Tumorkohorten (**Abbildung 14.A**). Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane CD3+/CD45+ T-Zellfrequenz von 67,5 % (64,9-75,0 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5) 52,7 % (43,5-83,1 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 73,4 % (71,8-75,5 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 77,6 % (58,0-80,6 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 71,8 % (60,2-77,5 %).

Der relative Anteil der CD4+/CD3+ T-Helferzellen ist in Grad 2 Oligodendrogliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern signifikant erniedrigt (* $p < 0,05$, **Abbildung 14.B**). Auch die anderen Tumorguppen zeigten im Vergleich zu den Gesundspendern tendenziell reduzierte Frequenzen der CD4+/CD3+ T-Helferzellen, die allerdings keine statistische Signifikanz erreichten. Zwischen den Tumorkohorten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Hier zeigten die Gesundspender (n=16) eine mediane CD4+/CD3+ T-Helferzellfrequenz von 47,9 % (44,3-55,2 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5) 30,0 % (15,4-44,5 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 43,8 % (36,6-48,3 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 35,0 % (26,1-48,9 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 39,5 % (32,6-48,3 %). (Lennartz et al., 2023)

Der relative Anteil der CD8+/CD3+ zytotoxischen T-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gesundspendern und den untersuchten Tumorkohorten (**Abbildung 14.C**). Die Gesundspender (n=16) zeigten hier eine mediane CD8+/CD3+ T-Zellfrequenz von 18,4 % (14,6-22,7 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5) 19,2 % (16,5-25,8 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 26,2 % (23,9-29,1 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 25,2 % (13,9-33,7 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 25,1 % (18,7-29,5 %). (Lennartz et al., 2023)

Der relative Anteil der CD56+/CD3+ NKT-Zellen ist in Grad 2 Oligodendrogliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern (* $p < 0,05$), den Grad 2 Astrozytompatienten (* $p < 0,05$) und den Grad 3 Astrozytompatienten (** $p < 0,01$, **Abbildung 14.D**) signifikant erniedrigt. Die anderen Tumorkohorten zeigten keine signifikanten Unterschiede untereinander oder im Vergleich zu der Gesundspenderkohorte. Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane NKT-Zellfrequenz von 2,3 % (1,6-4,0 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5) 0,5 % (0,2-0,9 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 3,0 % (1,5-4,3 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 2,1 % (0,9-5,3 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 2,8 % (1,6-5,7 %).

Der relative Anteil der CD69+/CD3+ T-Zellen ist in Grad 3 Oligodendrogliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern signifikant erniedrigt (* $p < 0,05$, **Abbildung 14.E**). Die anderen Tumorkohorten zeigten keine signifikanten Unterschiede untereinander oder im Vergleich zu der Gesundspenderkohorte. Hier zeigten die Gesundspender eine mediane CD69+/CD3+ T-Zellfrequenz von 3,8 % (2,9-4,8 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5) 1,4 % (1,0-2,2 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 2,0 % (1,2-4,1 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 1,7 % (1,1-3,2 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=14) 2,9 % (1,7-6,0 %). Eine der Proben der Grad 3 Astrozytompatienten war nicht auswertbar und wurde von den Daten entfernt (n=14).

Der relative Anteil der CD94+/CD3+ T-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gesundspendern und den untersuchten Tumorkohorten (**Abbildung 14.F**). Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane CD94+/CD3+ T-Zellfrequenz von 2,0 % (1,2-4,1 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=4) 1,8 % (0,8-2,6 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 4,0 % (2,0-5,2 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 3,0 % (1,5-10,2 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 4,0 % (3,1-6,9 %). Eine der Proben der Grad 2 Oligodendrogliompatienten war nicht auswertbar und wurde von den Daten entfernt (n=4).

Auch der relative Anteil der NKG2D+/CD3+ T-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gesundspendern und den untersuchten Tumorkohorten (**Abbildung 14.G**). Hier zeigten die Gesundspender (n=16) eine mediane NKG2D+/CD3+ T-Zellfrequenz von 20,0 % (17,3-25,0 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5) 20,0 % (15,9-24,7 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 21,7 % (9,9-27,3 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 19,6 % (11,5-33,7 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 24,1 % (20,0-29,6 %).

5.5.4 Regulatorische T-Zellen

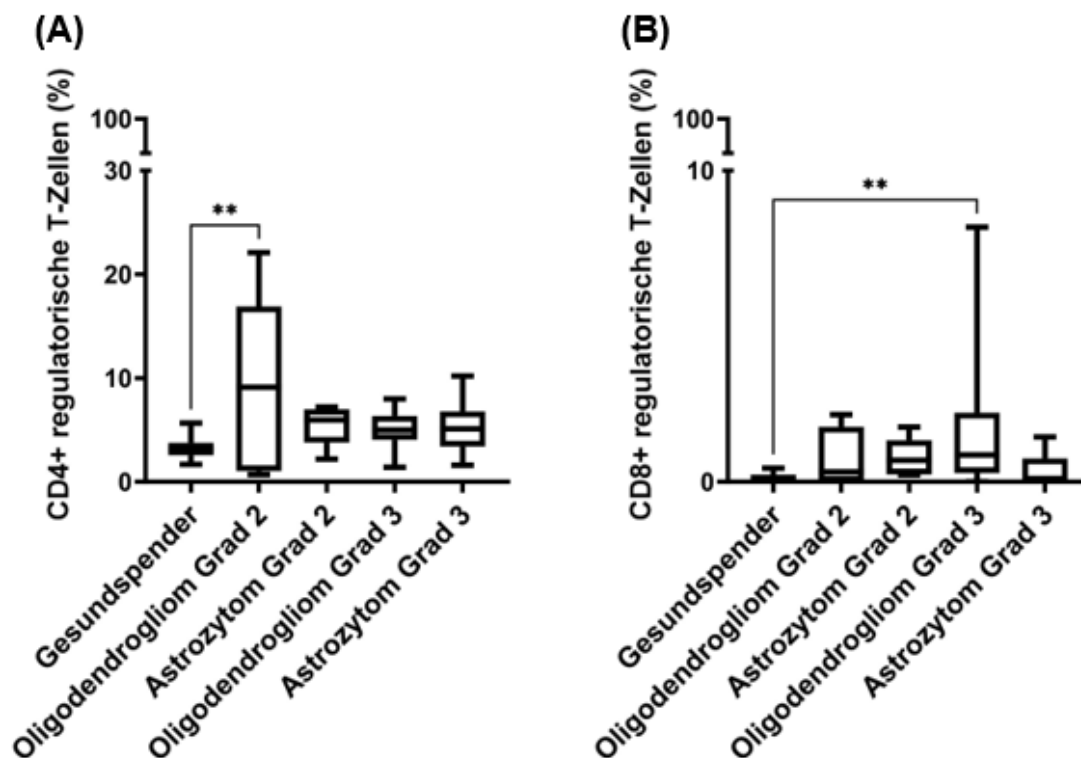
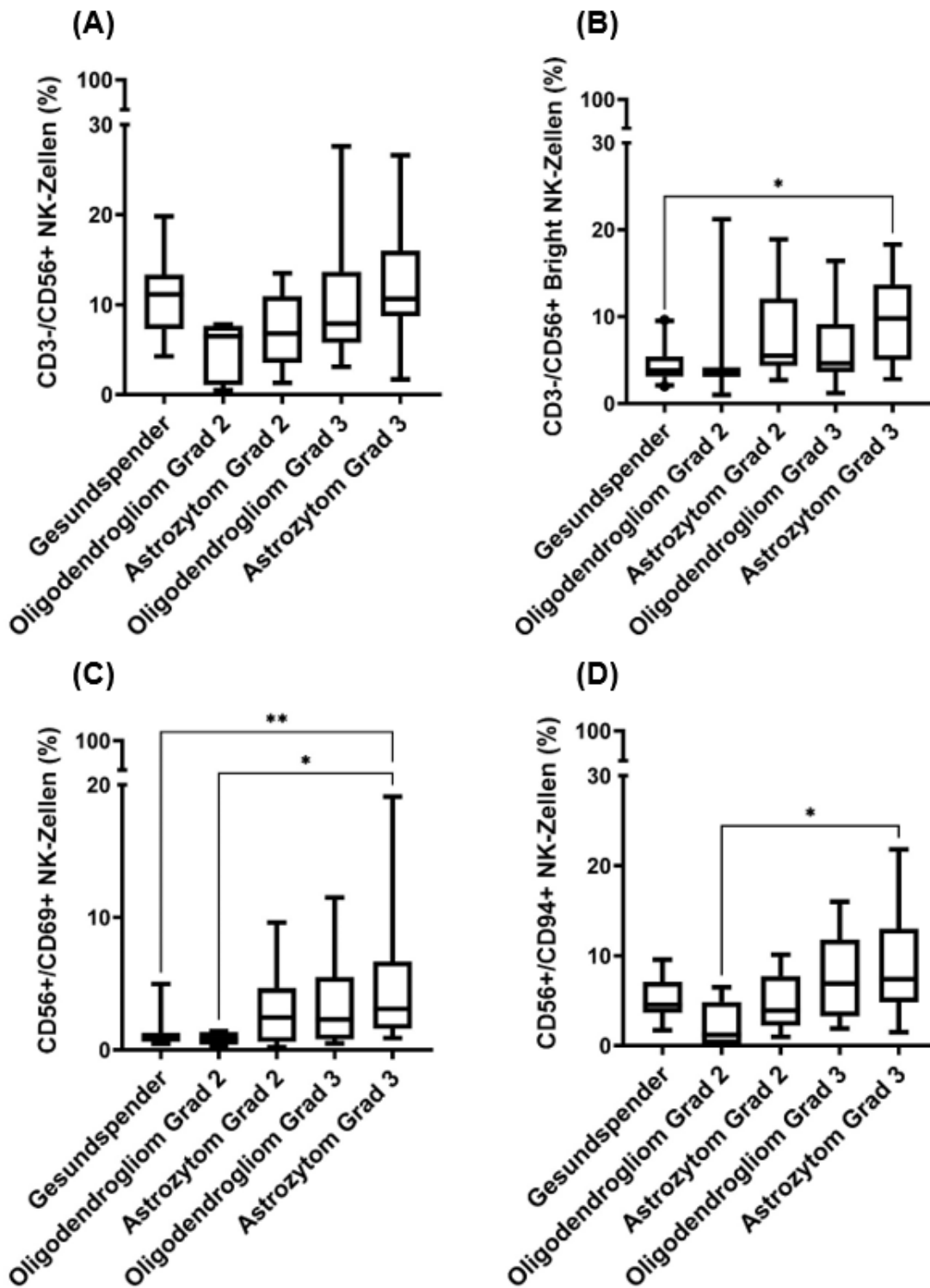


Abbildung 15: Relativer Anteil (%) der CD4+ und CD8+ regulatorischen T-Zellpopulationen im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15). **(A)** CD4+/FoxP3+/CD25+ regulatorische T-Zellen (One-way ANOVA) und **(B)** CD8+/FoxP3+/CD25+ regulatorische T-Zellen (Kruskal-Wallis Test, Grad 3 Oligodendrogliom n=12). Statistisch signifikante Ergebnisse: ** p<0,01.

Der relative Anteil der CD4+/FoxP3+/CD25+ regulatorischen T-Zellen ist in Grad 2 Oligodendrogliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern signifikant erhöht (** $p < 0,01$, **Abbildung 15.A**). Auch die anderen Tumorguppen zeigten im Vergleich zu den Gesundspendern tendenziell erhöhte Frequenzen der CD4+/FoxP3+/CD25+ regulatorischen T-Zellen, die allerdings keine statistische Signifikanz erreichten. Zwischen den Tumorkohorten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Gesundspender ($n=16$) zeigten eine mediane Frequenz der CD4+/FoxP3+/CD25+ regulatorischen T-Zellen von 3,1 % (2,6-3,8 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten ($n=5$) 9,1 % (1,1-16,9 %), Grad 2 Astrozytompatienten ($n=8$) 6,0 % (3,8-7,0 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten ($n=13$) 5,0 % (4,1-6,4 %) und Grad 3 Astrozytompatienten ($n=15$) 5,1 % (3,4-6,8 %).

Der relative Anteil der CD8+/FoxP3+/CD25+ regulatorischen T-Zellen ist in Grad 3 Oligodendrogliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern signifikant erhöht (** $p < 0,01$, **Abbildung 15.B**). Auch die anderen Tumorguppen zeigten im Vergleich zu den Gesundspendern tendenziell erhöhte Frequenzen der CD8+/FoxP3+/CD25+ regulatorischen T-Zellen, die allerdings keine statistische Signifikanz erreichten. Zwischen den Tumorkohorten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Hier zeigten die Gesundspender ($n=16$) eine mediane CD8+/FoxP3+/CD25+ T-Zellfrequenz von 0,1 % (0,0-0,2 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten ($n=5$) 0,3 % (0,0-1,8 %), Grad 2 Astrozytompatienten ($n=8$) 0,7 % (0,2-1,3 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten ($n=12$) 0,9 % (0,3-2,2 %) und Grad 3 Astrozytompatienten ($n=15$) 0,1 % (0,0-0,8 %). Eine der Vollblutproben der Grad 3 Oligodendrogliompatienten war nicht auswertbar und wurde von den Daten entfernt ($n=12$).

5.5.5 NK-Zellen



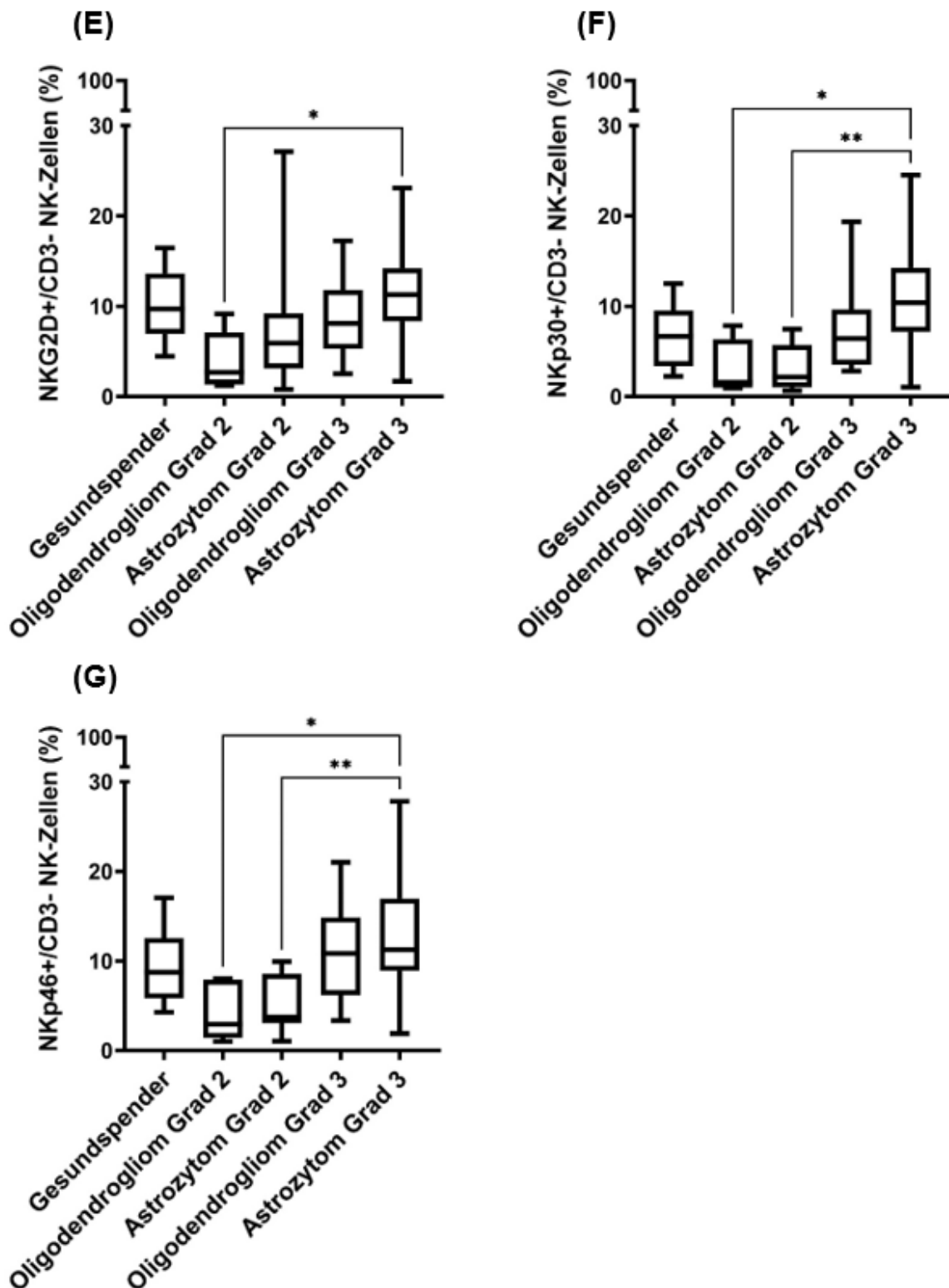


Abbildung 16: Relativer Anteil (%) der NK-Zellpopulationen im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15). **(A)** CD3-/CD56+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(B)**

CD56^{bright} NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test, Gesundspender n=23, Oligodendrogliom Grad 2 n=3, Astrozytom Grad 2 n=7, Oligodendrogliom Grad 3 n=13, Astrozytom Grad 3 n=15), **(C)** CD56+/CD69+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(D)** CD56+/CD94+ NK-Zellen (One-way ANOVA), **(E)** NKG2D+/CD3- NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(F)** NKp30+/CD3- NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test) und **(G)** NKp46+/CD3- NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test). Statistisch signifikante Unterschiede: * p<0,05, ** p<0,01. (Lennartz et al., 2023)

Der relative Anteil der CD3-/CD56+ NK-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gesundspendern und den untersuchten Tumorkohorten (**Abbildung 16.A**). Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane Frequenz der CD3-/CD56+ NK-Zellen von 11,1 % (7,3-13,3 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5) 6,5 % (1,1-7,7 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 6,8 % (3,5-11,0 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 7,9 % (5,8-13,7 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 10,7 % (8,7-16,0 %). (Lennartz et al., 2023)

Der relative Anteil der CD56^{bright} NK-Zellen ist in Grad 3 Astrozytompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern signifikant erhöht (* p<0,05, **Abbildung 16.B**). Die anderen Tumorkohorten zeigten keine signifikanten Unterschiede untereinander oder im Vergleich zu der Gesundspenderekohorte. Die Gesundspender (n=23) zeigten hier eine mediane Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen von 3,8 % (3,1-5,4 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=3) 3,6 % (1,0-21,2 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=7) 5,5 % (4,3-12,1 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 4,6 % (3,6-9,2 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 9,8 % (5,0-13,7 %).

Der relative Anteil der CD56+/CD69+ NK-Zellen ist in Grad 3 Astrozytompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern (** p<0,01) und den Grad 2 Oligodendrogliompatienten (* p<0,05, **Abbildung 16.C**) signifikant erhöht. Die anderen Tumorkohorten zeigten keine signifikanten Unterschiede untereinander oder im Vergleich zu der Gesundspenderekohorte. Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane CD56+/CD69+ NK-Zellfrequenz von 0,9 % (0,6-1,3 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5) 0,8 % (0,4-1,4 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 2,5 % (0,6-4,7 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 2,3 % (0,8-5,5 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 3,1 % (1,6-6,7 %). (Lennartz et al., 2023)

Auch der relative Anteil der CD56+/CD94+ NK-Zellen ist in Grad 3 Astrozytomentpatienten im Vergleich zu den Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten (* $p < 0,05$, **Abbildung 16.D**) signifikant erhöht. Die anderen Tumorkohorten zeigten keine signifikanten Unterschiede untereinander oder im Vergleich zu der Gesunderpenderkohorte. Hier zeigten die Gesunderpender ($n=16$) eine mediane Frequenz der CD56+/CD94+ NK-Zellen von 4,5 % (3,6-7,1 %), die Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten ($n=5$) 1,2 % (0,2-4,9 %), die Grad 2 Astrozytomentpatienten ($n=8$) 3,9 % (2,2-7,7 %), die Grad 3 Oligodendrogliomentpatienten ($n=13$) 6,9 % (3,3-11,8 %) und die Grad 3 Astrozytomentpatienten ($n=15$) 7,4 % (4,8-13,0 %). (Lennartz et al., 2023)

Ein ähnliches Bild zeigt sich im relativen Anteil der NKG2D+/CD3- NK-Zellen, die in Grad 3 Astrozytomentpatienten im Vergleich zu den Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten (* $p < 0,05$, **Abbildung 16.E**) signifikant erhöht sind. Auch hier zeigten die anderen Tumorkohorten keine signifikanten Unterschiede untereinander oder im Vergleich zu der Gesunderpenderkohorte. Die Gesunderpender ($n=16$) zeigten eine mediane Frequenz der NKG2D+/CD3- NK-Zellen von 9,7 % (7,0-13,6 %), Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten ($n=5$) 2,7 % (1,3-7,1 %), Grad 2 Astrozytomentpatienten ($n=8$) 5,9 % (3,1-9,2 %), Grad 3 Oligodendrogliomentpatienten ($n=13$) 8,1 % (5,3-11,8 %) und Grad 3 Astrozytomentpatienten ($n=15$) 11,3 % (8,3-14,2 %).

Auch der relative Anteil der NKp30+/CD3- NK-Zellen ist in Grad 3 Astrozytomentpatienten im Vergleich zu den Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten (* $p < 0,05$) und den Grad 2 Astrozytomentpatienten (** $p < 0,01$, **Abbildung 16.F**) signifikant erhöht. Auch hier zeigten die anderen Tumorkohorten keine signifikanten Unterschiede untereinander oder im Vergleich mit der Gesunderpenderkohorte. Die Gesunderpender ($n=16$) zeigten eine mediane Frequenz der NKp30+/CD3- NK-Zellen von 6,7 % (3,4-9,5 %), Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten ($n=5$) 1,6 % (1,0-6,4 %), Grad 2 Astrozytomentpatienten ($n=8$) 2,2 % (1,0-5,7 %), Grad 3 Oligodendrogliomentpatienten ($n=13$) 6,4 % (3,5-9,7 %) und Grad 3 Astrozytomentpatienten ($n=15$) 10,4 % (7,2-14,3 %).

Zuletzt ist auch der relative Anteil der NKp46+/CD3- NK-Zellen in Grad 3 Astrozytompatienten im Vergleich zu den Grad 2 Oligodendrogliompatienten (* $p < 0,05$) und den Grad 2 Astrozytompatienten (** $p < 0,01$, **Abbildung 16.G**) signifikant erhöht. Auch hier zeigten die anderen Tumorkohorten keine signifikanten Unterschiede untereinander oder im Vergleich zu der Gesundspenderkohorte. Hier zeigten die Gesundspender (n=16) eine mediane NKp46+/CD3- NK-Zellfrequenz von 8,7 % (5,8-12,6 %), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5) 2,9 % (1,4-7,9 %), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8) 3,7 % (3,1-8,5 %), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) 10,9 % (6,2-14,9 %) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15) 11,3 % (8,9-17,0 %).

Insgesamt zeigten alle NK-Zellsubpopulationen einen Trend von niedrigerer Frequenz in Grad 2 Oligodendrogliompatienten, etwas höher in Grad 2 Astrozytompatienten, noch höher in Grad 3 Oligodendrogliompatienten und der höchsten Frequenz in Grad 3 Astrozytompatienten (**Abbildung 16.A-G**).

5.6 Korrelation peripherer Hsp70^{low}/Hsp70^{high} Konzentrationen und den Frequenzen verschiedener Lymphozytensubpopulationen in Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten

Um mögliche Zusammenhänge zwischen der peripheren Hsp70 Konzentration und der Zusammensetzung der Lymphozytensubpopulationen zu untersuchen, wurden die Tumorpatienten in eine Gruppe mit niedrigen peripheren Hsp70 Werten (Hsp70^{low}) und eine Gruppe mit hohen Hsp70 Werten (Hsp70^{high}) eingeteilt. Der Cut-Off-Wert, um festzulegen, ob die Patienten der Hsp70^{low} oder Hsp70^{high} Gruppe zugeteilt wurden, entspricht der medianen Hsp70 Konzentration der jeweiligen Gruppe. Grad 2 Gliompatienten mit einer Hsp70 Konzentration von 69,5 ng/ml oder weniger wurden der Hsp70^{low} Gruppe zugeordnet (n=5, 3 Oligodendrogliompatienten und 2 Astrozytompatienten) und Grad 2 Gliompatienten mit einer Hsp70 Konzentration über 69,5 ng/ml der Hsp70^{high} Gruppe (n=4, 1 Oligodendrogliompatient und 3 Astrozytompatienten). Grad 3 Gliompatienten mit einer Hsp70 Konzentration von unter 29,8 ng/ml wurden der Hsp70^{low} Gruppe zugeordnet (n=11, 5 Oligodendrogliompatienten und 6 Astrozytompatienten) und Grad 3 Gliompatienten

mit einer Hsp70-Konzentration über 29,8 ng/ml der Hsp70^{high} Gruppe (n=11, 4 Oligodendrogliompatienten und 7 Oligodendrogliompatienten). Diese Cut-Off-Werte bilden die Grundlage für **Abbildung 17** und **Abbildung 19**. (Lennartz et al., 2023)

Die Grad 3 Gliompatienten wurden zusätzlich innerhalb ihrer histologischen Untergruppe (Oligodendrogliom oder Astrozytom) in Hsp70^{low} und Hsp70^{high} eingeteilt um zu untersuchen, ob mögliche Unterschiede auf eine bestimmte histologische Tumorentität zurückzuführen sind. Der Cut-Off-Wert wurde ebenfalls anhand der medianen Hsp70-Plasmakonzentration der jeweiligen Gruppe festgelegt. Grad 3 Oligodendrogliompatienten mit einer Hsp70 Konzentration von 14,2 ng/ml oder weniger wurden der Hsp70^{low} Gruppe zugeordnet (n=5) und Grad 3 Oligodendrogliompatienten mit einer Hsp70 Konzentration über 14,2 ng/ml der Hsp70^{high} Gruppe (n=4). Grad 3 Astrozytompatienten mit einer Hsp70 Konzentration von 33,8 ng/ml oder weniger wurden der Hsp70^{low} Gruppe zugeordnet (n=7) und Grad 3 Astrozytompatienten mit einer Hsp70-Konzentration über 33,8 ng/ml der Hsp70^{high} Gruppe (n=6). Diese Cut-Off-Werte bilden die Grundlage für **Abbildung 18** und **Abbildung 20**. Die zum Vergleich dargestellte Gesundspenderkohorte unterscheidet sich nicht zwischen den Abbildungen. Auf eine weitere Unterteilung der Grad 2 Patienten wurde aufgrund niedriger Fallzahlen verzichtet. Die verwendeten statistischen Tests können **Tabelle 14** und den jeweiligen Abbildungen entnommen werden.

Relevante Unterschiede zwischen den Hsp70^{low} und Hsp70^{high} Gliompatienten zeigten sich in den folgenden Lymphozytensubpopulationen:
CD4+/CD3+ T-Helferzellen, CD3-/CD56+ NK-Zellen, CD56^{bright} NK-Zellen, CD56+/CD69+ NK-Zellen, CD56+/CD94+ NK-Zellen, NKG2D+/CD3- NK-Zellen, NKp30+/CD3- NK-Zellen und NKp46+/CD3- NK-Zellen.

5.6.1 T-Zellen

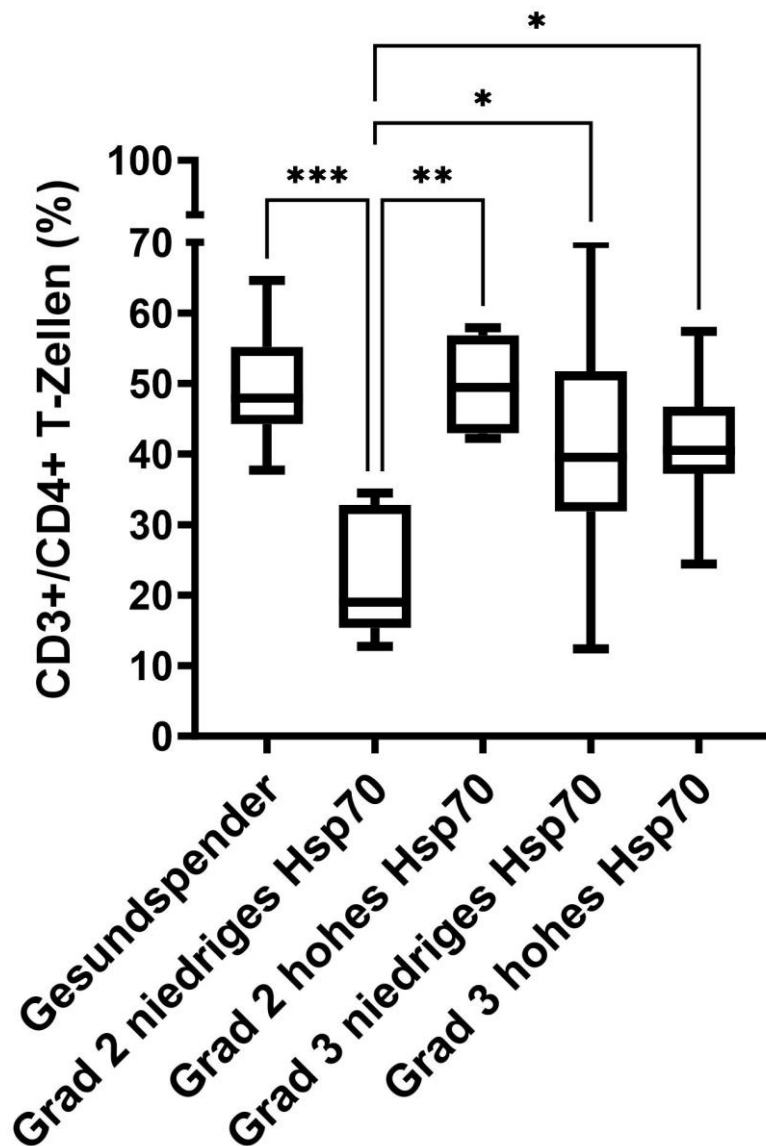


Abbildung 17: Korrelation der Hsp70 Plasmaspiegel und der relativen Frequenz (%) der CD3+/CD4+ T-Helferzellen in Gesundspendern (n=16), Grad 2 Gliompatienten (Hsp70^{low} n=5, Hsp70^{high} n=4) und Grad 3 Gliompatienten (Hsp70^{low} n=11, Hsp70^{high} n=11). Statistisch signifikante Ergebnisse: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. Die Gruppen wurden mit einem One-way ANOVA verglichen.

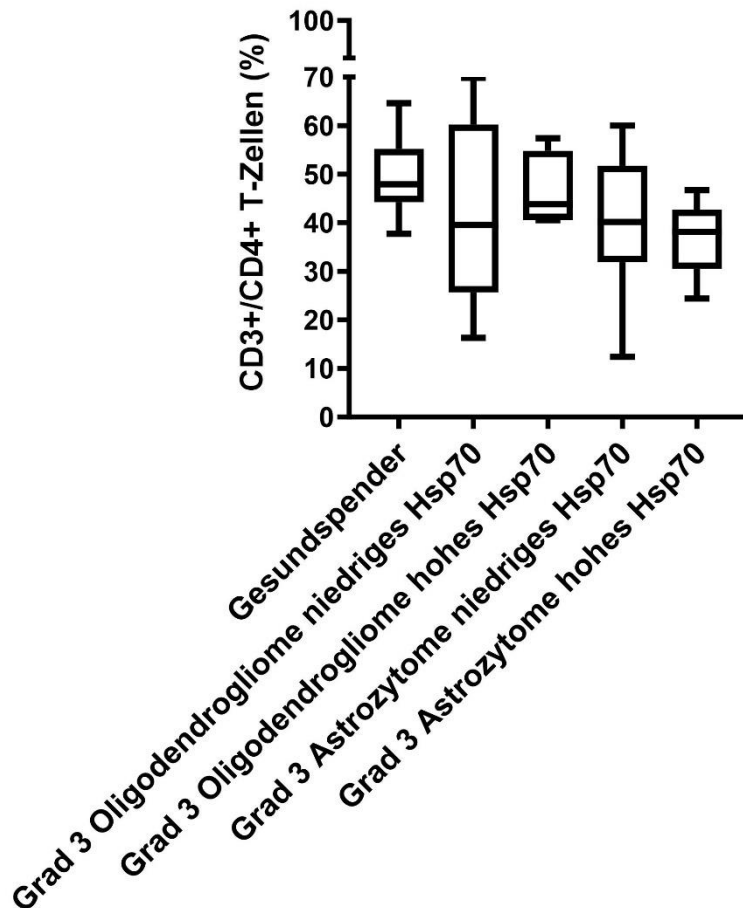
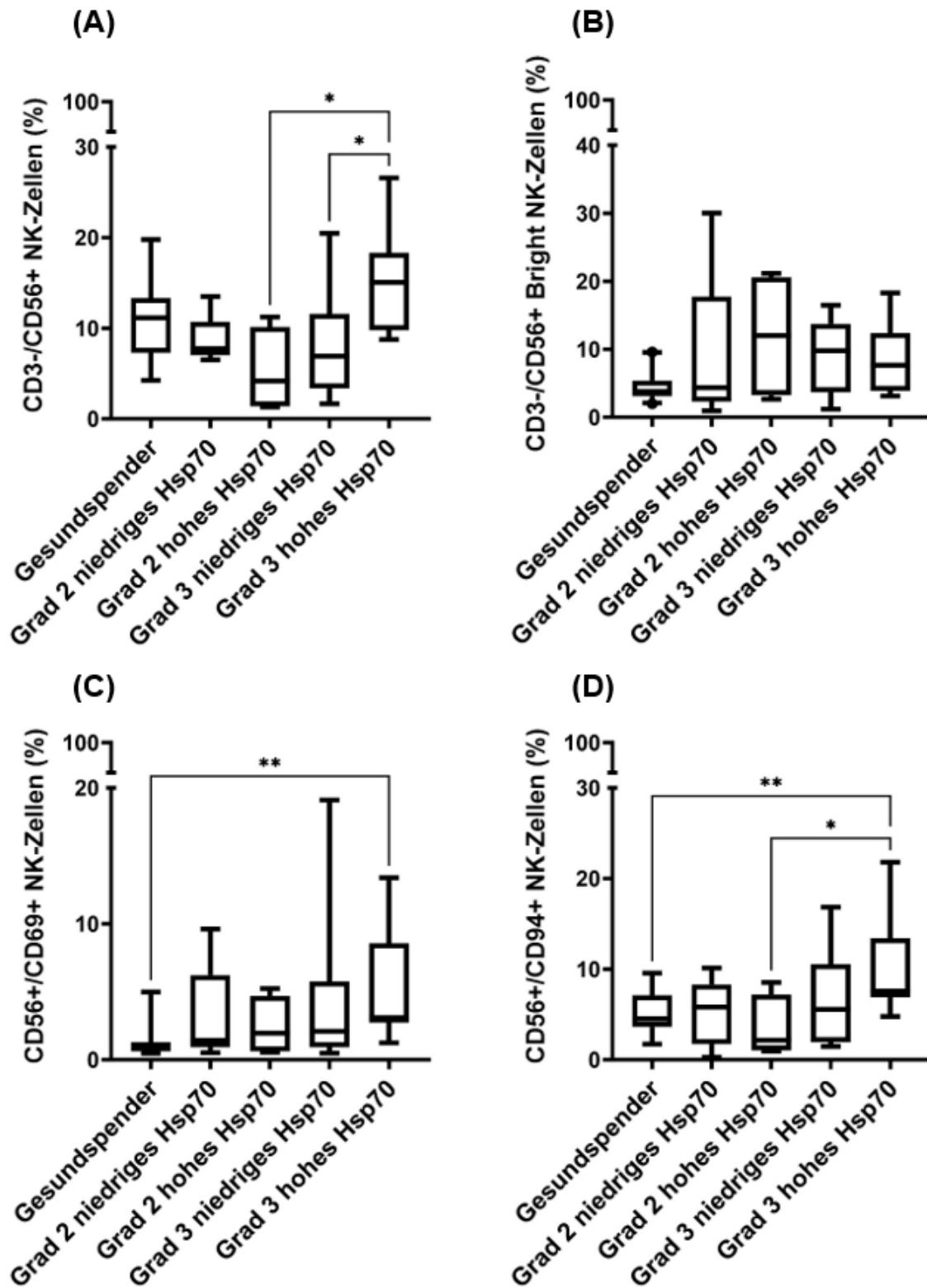


Abbildung 18: Korrelation der Hsp70 Plasmaspiegel und der relativen Frequenz (%) der CD3+/CD4+ T-Helferzellen in Gesundspendern (n=16), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (Hsp70^{low} n=5, Hsp70^{high} n=4) und Grad 3 Astrozytomentpatienten (Hsp70^{low} n=7, Hsp70^{high} n=6). Die Gruppen wurden mit einem One-way ANOVA verglichen.

Der relative Anteil der CD3+/CD4+ T-Helferzellen ist in Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten im Vergleich zu Gesundspendern (***) p<0,001), Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (** p<0,01), Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (* p<0,05) und Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten (* p<0,05, **Abbildung 17**) signifikant reduziert. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Hsp70^{low}/Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten und Hsp70^{low}/Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytomentpatienten (**Abbildung 18**). Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane CD3+/CD4+ T-Helferzellfrequenz von 47,9 % (44,3-55,2 %), Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (n=5) 19,0 % (15,4-32,8 %), Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (n=4) 49,4 % (43,0-56,8 %), Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 39,6 % (31,9-51,8 %) und Hsp70^{high} Grad 3

Gliompatienten (n=11) 40,6 % (37,2-46,7 %) (**Abbildung 17**). Unter Berücksichtigung der Tumorhistologie zeigte sich eine mediane CD3+/CD4+ T-Helferzellfrequenz von 39,6 % (25,7-60,2 %) in den Hsp70^{low} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=5), 43,8 % (40,6-54,8 %) in den Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=4), 40,2 % (31,9-51,8 %) in den Hsp70^{low} Grad 3 Astrozytompatienten (n=7) und 38,1 % (30,5-42,7 %) in den Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten (n=6, **Abbildung 18**). Die Gesundspendergruppe unterscheidet sich nicht zwischen den Abbildungen.

5.6.2 NK-Zellen



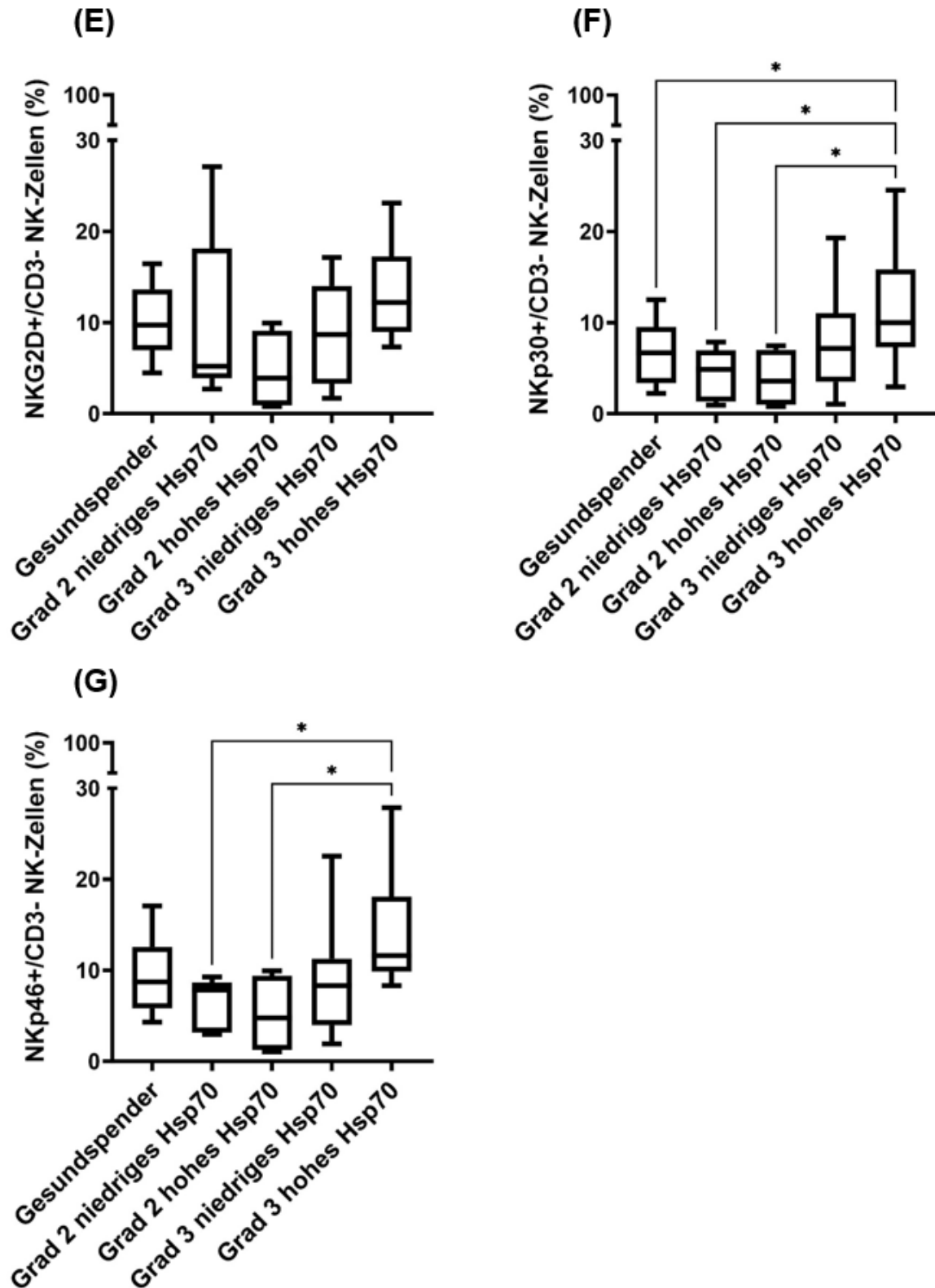
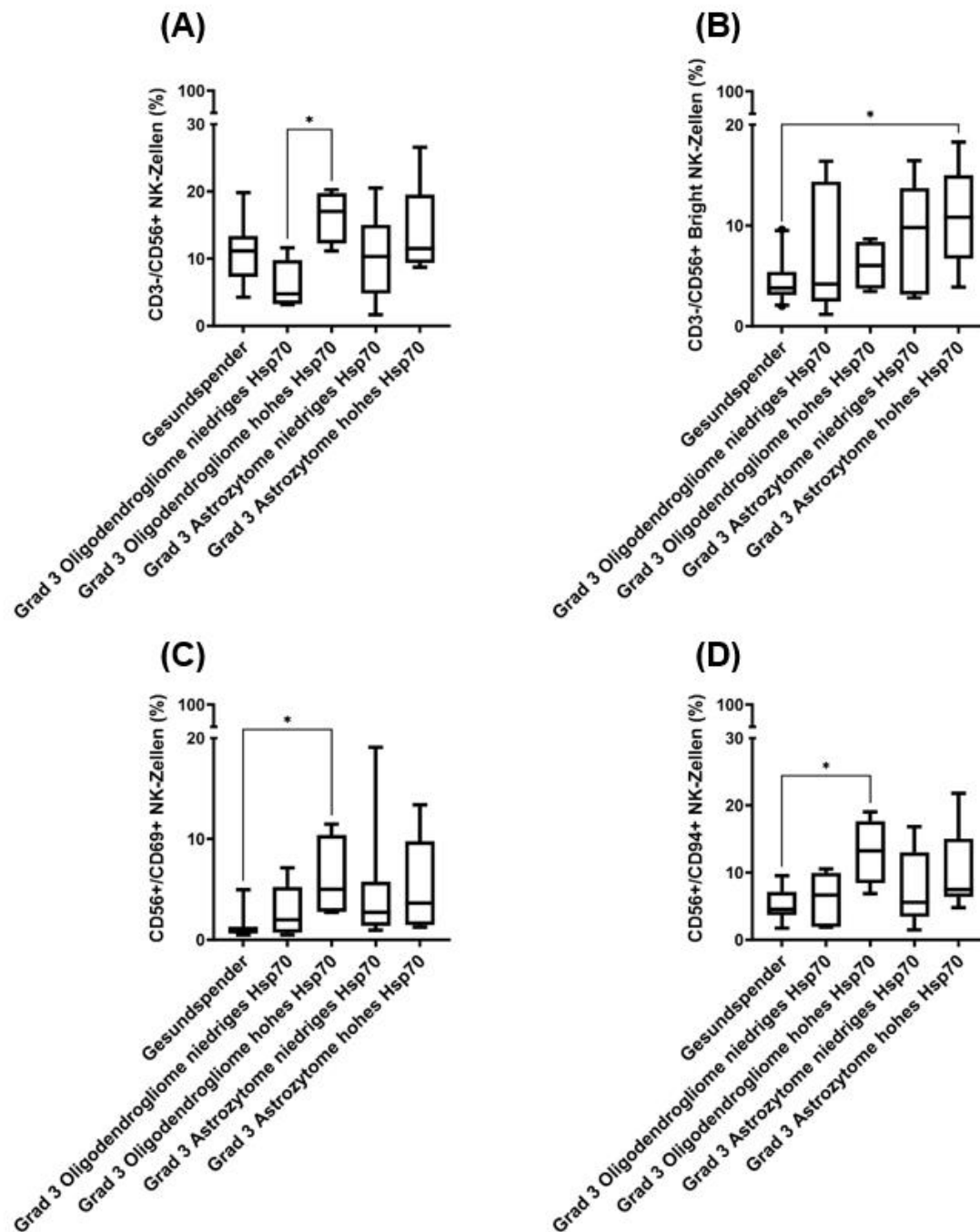


Abbildung 19: Korrelation der Hsp70 Plasmaspiegel und der relativen Frequenz (%) der untersuchten NK-Zellpopulationen in Gesundspendern (n=16), Grad 2 Gliompatienten (Hsp70^{low} n=5, Hsp70^{high} n=4) und Grad 3 Gliompatienten (Hsp70^{low} n=11, Hsp70^{high} n=11). **(A)** CD3-/CD56+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(B)**

CD56^{bright} NK-Zellen (Gesundspender n=23, Kruskal-Wallis Test), **(C)** CD56+/CD69+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(D)** CD56+/CD94+ NK-Zellen (One-way ANOVA), **(E)** NKG2D+/CD3- NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(F)** NKp30+/CD3- NK-Zellen (One-way ANOVA) und **(G)** NKp46+/CD3- NK-Zellen (One-way ANOVA). Statistisch signifikante Ergebnisse: * p<0,05, ** p<0,01. (Lennartz et al., 2023)



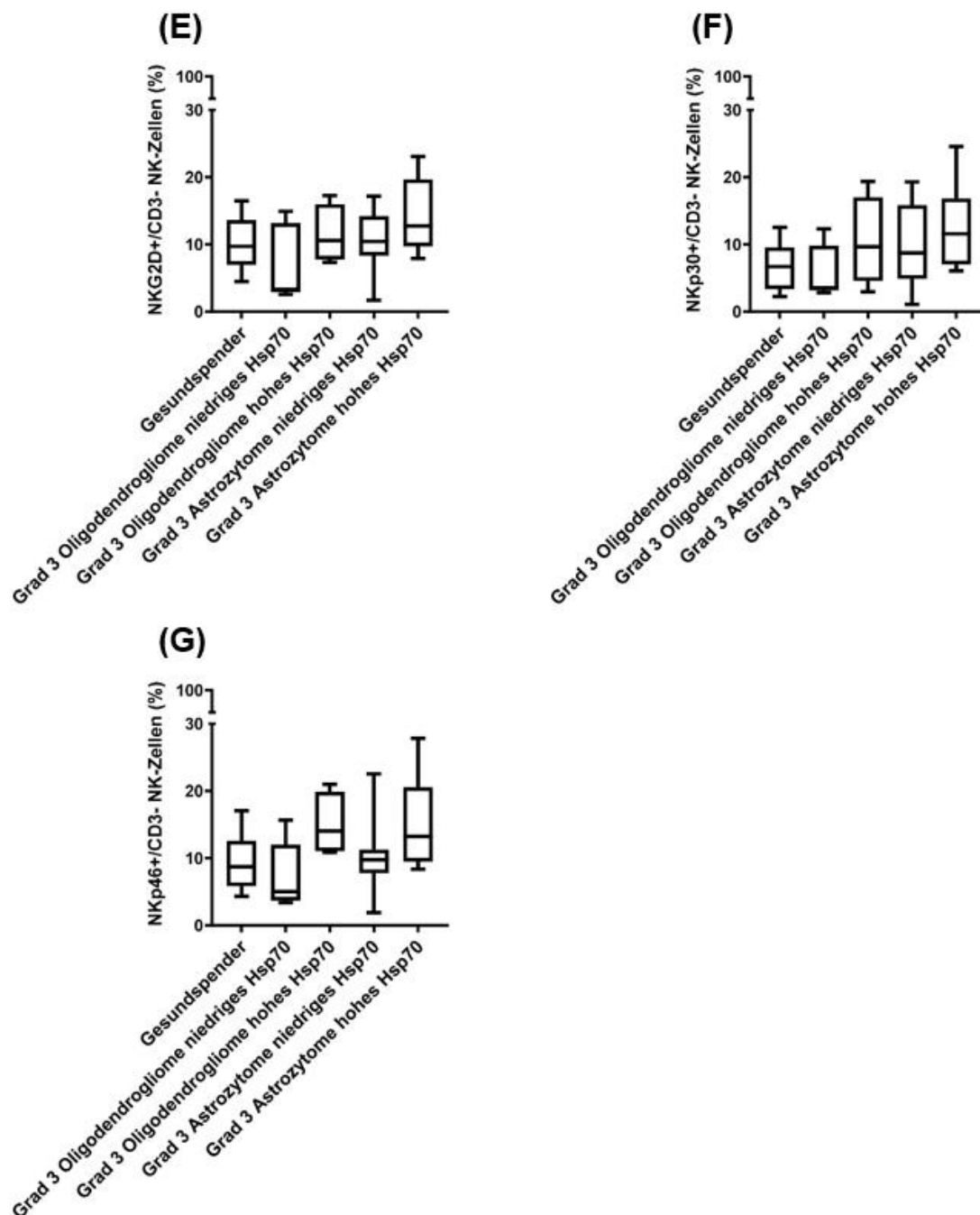


Abbildung 20: Korrelation der Hsp70 Plasmaspiegel und der relativen Frequenz (%) der untersuchten NK-Zellpopulationen in Gesundspendern (n=16), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (Hsp70^{low} n=5, Hsp70^{high} n=4) und Grad 3 Astrozytompatienten (Hsp70^{low} n=7, Hsp70^{high} n=6). **(A)** CD3-/CD56+ NK-Zellen (One-way ANOVA), **(B)** CD56^{bright} NK-Zellen (Gesundspender n=23, Kruskal-Wallis Test), **(C)** CD56+/CD69+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(D)** CD56+/CD94+ NK-Zellen (One-way ANOVA), **(E)** NKG2D+/CD3- NK-Zellen (One-way ANOVA), **(F)** NKp30+/CD3- NK-Zellen (One-way ANOVA) und **(G)** NKp46+/CD3- NK-Zellen (One-

way ANOVA). Statistisch signifikante Ergebnisse: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (Lennartz et al., 2023)

Der relative Anteil der CD3-/CD56+ NK-Zellen ist in Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten im Vergleich zu Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (* $p < 0,05$) und Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (* $p < 0,05$) signifikant erhöht (**Abbildung 19.A**). Unter Berücksichtigung der histologischen Subtypen der Tumoren ist der relative Anteil der CD3-/CD56+ NK-Zellen in Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten im Vergleich zu Hsp70^{low} Grad 3 Oligodendrogliompatienten signifikant erhöht (* $p < 0,05$), nicht aber zwischen Hsp70^{low} und Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten (**Abbildung 20.A**). Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane CD3-/CD56+ NK-Zellfrequenz von 11,1 % (7,3-13,3 %), Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (n=5) 7,8 % (7,0-10,7 %), Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (n=4) 4,2 % (1,4-10,1 %), Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 6,9 % (3,4-11,6 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 15,1 % (9,8-18,3 %) (**Abbildung 19.A**). Unter Berücksichtigung der Tumorphistologie zeigte sich eine mediane CD3-/CD56+ NK-Zellfrequenz von 4,7 % (3,3-9,8 %) in den Hsp70^{low} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=5), 17,0 % (12,3-19,8 %) in den Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten Hsp70 (n=4), 10,3 % (4,8-15,0 %) in den Hsp70^{low} Grad 3 Astrozytompatienten (n=7) und 11,5 % (9,3-19,5 %) in den Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten (n=6, **Abbildung 20.A**). Die Gesundspendergruppe unterscheidet sich nicht zwischen den Abbildungen. (Lennartz et al., 2023)

Der relative Anteil der CD56^{bright} NK-Zellen an den CD3-/CD56+ NK-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gesundspendern und den untersuchten Grad 2 oder Grad 3 Tumorpatienten mit hohem und niedrigem Hsp70 (**Abbildung 19.B**). Allerdings zeigte sich nach weiterer histologischer Einteilung eine signifikante Erhöhung der CD56^{bright} NK-Zellen in Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern (* $p < 0,05$), nicht aber in Hsp70^{low} Grad 3 Astrozytompatienten (**Abbildung 20.B**). Die Gesundspender (n=23) zeigten eine mediane Frequenz der CD56^{bright} NK-Zellen von 3,8 % (3,1-5,4 %), Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (n=5) 4,3 % (2,3-17,8 %), Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (n=4) 12,0 % (3,3-20,6 %), Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 9,8 % (3,7-13,7 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 7,7 % (3,9-12,4 %)

(Abbildung 19.B). Nach histologischer Einteilung zeigten Hsp70^{low} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=5) eine mediane CD56^{bright} NK-Zellfrequenz von 4,2 % (2,4-14,4 %), Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=4) 6,0 % (3,7-8,4 %), Hsp70^{low} Grad 3 Astrozytompatienten (n=7) 9,8 % (3,1-13,7 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten (n=6) 10,8 % (6,7-15,0 %) **(Abbildung 20.B).**

Der relative Anteil der CD56+/CD69+ NK-Zellen ist in Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern signifikant erhöht (** p<0,01, **Abbildung 19.C**). Unter Berücksichtigung der Tumorphistologie zeigten ausschließlich die Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern signifikant erhöhte CD56+/CD69+ NK-Zellfrequenzen (* p<0,05, **Abbildung 20.C**). Hier zeigten die Gesundspender (n=16) eine mediane CD56+/CD69+ NK-Zellfrequenz von 0,9 % (0,6-1,3 %), Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (n=5) 1,4 % (0,9-6,2 %), Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (n=4) 2,0 % (0,6-4,7 %), Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 2,1 % (0,9-5,8 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 3,1 % (2,7-8,6 %) **(Abbildung 19.C)**. Nach histologischer Einteilung zeigten die Hsp70^{low} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=5) eine mediane CD56+/CD69+ NK-Zellfrequenz von 2,0 % (0,7-5,2 %), Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=4) 5,0 % (2,8-10,4 %), Hsp70^{low} Grad 3 Astrozytompatienten (n=7) 2,7 % (1,4-5,8 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten (n=6) 3,6 % (1,5-9,8 %) **(Abbildung 20.C)**. (Lennartz et al., 2023)

Der relative Anteil der CD56+/CD94+ NK-Zellen verhält sich den CD56+/CD69+ NK-Zellen ähnlich. Dieser ist in Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern (** p<0,01) und den Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (* p<0,05) signifikant erhöht **(Abbildung 19.D)**. Unter Berücksichtigung der Tumorphistologie zeigten wieder ausschließlich die Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern eine signifikant erhöhte CD56+/CD94+ NK-Zellfrequenz (* p<0,05, **Abbildung 20.D**). Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane Frequenz von 4,5 % (3,6-7,1 %), Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (n=5) 5,8 % (1,7-8,3 %), Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (n=4) 2,2 % (1,0-7,2 %), Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 5,6 % (2,0-10,5 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 7,5 % (6,9-13,4 %) **(Abbildung 19.D)**. Nach histologischer

Einteilung zeigten die Hsp70^{low} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=5) eine mediane Frequenz von 6,7 % (1,9-10,0 %), Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=4) 13,3 % (8,4-17,6 %), Hsp70^{low} Grad 3 Astrozytompatienten (n=7) 5,6 % (3,4-13,0 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten (n=6) 7,5 % (6,4-15,1 %) (**Abbildung 20.D**). (Lennartz et al., 2023)

Der relative Anteil der NKG2D+/CD3- NK-Zellen unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Gesundspendern und den untersuchten Grad 2 oder Grad 3 Tumorpatienten mit hohem und niedrigem Hsp70 (**Abbildung 19.E**). Auch nach weiterer histologischer Einteilung der Kohorten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abbildung 20.E**). Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane NKG2D+/CD3- NK-Zellfrequenz von 9,7 % (7,0-13,6 %), Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (n=5) 5,2 % (3,9-18,1 %), Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (n=4) 3,9 % (0,9-9,1 %), Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 8,7 % (3,3-14,0 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 12,2 % (8,9-17,3 %) (**Abbildung 19.E**). Nach histologischer Einteilung zeigten die Hsp70^{low} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=5) eine mediane Frequenz von 3,3 % (2,9-13,2 %), Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=4) 10,6 % (7,7-16,0 %), Hsp70^{low} Grad 3 Astrozytompatienten (n=7) 10,4 % (8,3-14,2 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten (n=6) 12,7 % (9,7-19,7 %) (**Abbildung 20.E**).

Der relative Anteil der NKp30+/CD3- NK-Zellen ist in Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten im Vergleich zu den Gesundspendern (* p<0,05), Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (* p<0,05) und Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (* p<0,05) signifikant erhöht (**Abbildung 19.F**). Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Hsp70^{low}/ Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten und Astrozytompatienten (**Abbildung 20.F**). Die Gesundspender (n=16) zeigten eine mediane NKp30+/CD3- NK-Zellfrequenz von 6,7 % (3,4-9,5 %), Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (n=5) 4,9 % (1,3-7,0 %), Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (n=4) 3,6 % (1,0-7,0), Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 7,2 % (3,5-11,1 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 10,0 % (7,3-15,9 %) (**Abbildung 19.F**). Nach histologischer Einteilung zeigten die Hsp70^{low} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=5) eine mediane Frequenz von 3,5 % (3,2-9,8 %), Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=4) 9,7 % (4,5-

17,0 %), Hsp70^{low} Grad 3 Astrozytompatienten (n=7) 8,7 % (4,9-15,9 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten (n=6) 11,6 % (7,0-16,8 %) (**Abbildung 20.F**).

Der relative Anteil der NKp46+/CD3- NK-Zellen ist in Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten im Vergleich zu Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (* p<0,05) und Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (* p<0,05) signifikant erhöht (**Abbildung 19.G**). Dabei zeigte sich erneut kein signifikanter Unterschied zwischen den Hsp70^{low}/Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten und Astrozytompatienten (**Abbildung 20.G**). Hier zeigten die Gesundspender (n=16) eine mediane NKp46+/CD3- NK-Zellfrequenz von 8,7 % (5,8-12,6 %), Hsp70^{low} Grad 2 Gliompatienten (n=5) 7,8 % (3,1-8,6 %), Hsp70^{high} Grad 2 Gliompatienten (n=4) 4,8 % (1,2-9,4 %), Hsp70^{low} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 8,3 % (4,0-11,3 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Gliompatienten (n=11) 11,6 % (9,8-18,1 %) (**Abbildung 19.F**). Nach histologischer Einteilung zeigten die Hsp70^{low} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=5) eine mediane Frequenz von 5,0 % (3,7-12,0 %), Hsp70^{high} Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=4) 14,0 % (11,0-19,9 %), Hsp70^{low} Grad 3 Astrozytompatienten (n=7) 9,8 % (7,8-11,3 %) und Hsp70^{high} Grad 3 Astrozytompatienten (n=6) 13,3 % (9,5-20,5 %) (**Abbildung 20.F**).

5.7 Korrelation verschiedener Lymphozytensubpopulationen und dem Gesamtüberleben von Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten

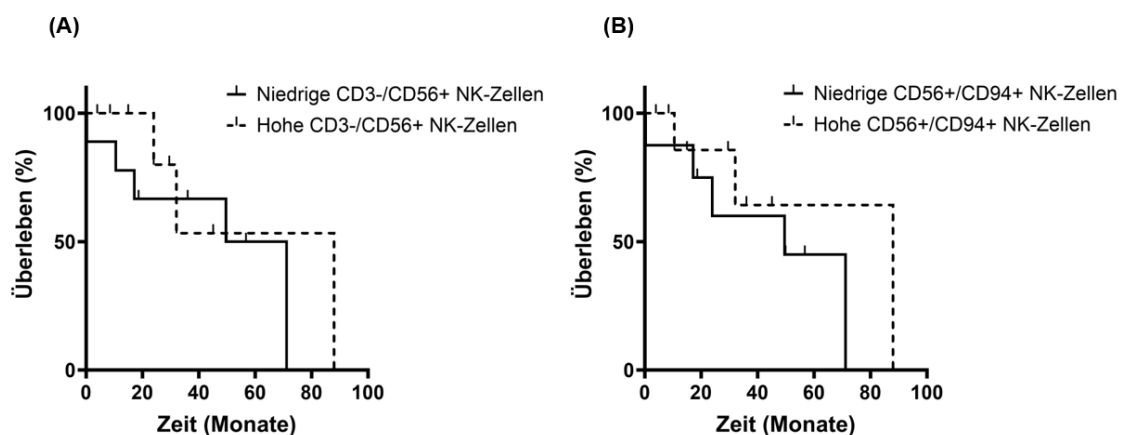


Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurven des Gesamtüberlebens von Grad 3 Gliompatienten mit niedrigen (n=14) und hohen (n=14) NK-Zellfrequenzen

bestimmter NK-Zellsubpopulationen. **(A)** CD3-/CD56+ NK-Zellen (Log-Rank Test) und **(B)** CD56+/CD94+ NK-Zellen (Log-Rank Test). (Lennartz et al., 2023)

Die eingeschlossenen Grad 3 Gliompatienten wurden in Gruppen mit niedrigen und hohen Frequenzen bestimmter Lymphozytensubpopulationen unterteilt, um Zusammenhänge zwischen der Frequenz dieser Lymphozyten und dem Gesamtüberleben der Patienten zu untersuchen. Dargestellt ist das Überleben der Grad 3 Patienten mit niedrigen und hohen CD3-/CD56+ sowie CD56+/CD94+ NK-Zellen. Der Cut-off-Wert, nach welchem die Patienten der niedrigen oder hohen CD3-/CD56+ beziehungsweise CD56+/CD94+ NK-Zell-Gruppe zugeordnet wurden, entspricht der medianen Lymphozytenfrequenz der entsprechenden Subpopulation.

In der Untergruppe der CD3-/CD56+ NK-Zellen wurden Grad 3 Gliompatienten mit einer Frequenz unter 10,0 % (n=14; 8 Oligodendrogliompatienten und 6 Astrozytompatienten) der niedrigen NK-Zell Gruppe und Patienten mit einer Frequenz über 10,0 % der hohen NK-Zell Gruppe (n=14, 5 Oligodendrogliompatienten und 9 Astrozytompatienten) zugeordnet. Die Patienten mit einer niedrigen CD3-/CD56+ Frequenz hatten ein medianes Überleben von 60 Monaten und die Patienten mit einer hohen Frequenz ein medianes Überleben von 88 Monaten (**Abbildung 21.A**), wobei dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ist. (Lennartz et al., 2023)

In der Untergruppe der CD56+/CD94+ NK-Zellen wurden Grad 3 Gliompatienten mit einer Frequenz unter 7,2 % (n=14; 7 Oligodendrogliompatienten und 7 Astrozytompatienten) der niedrigen NK-Zell Gruppe und Patienten mit einer Frequenz über 7,2 % der hohen NK-Zell Gruppe (n=14, 6 Oligodendrogliompatienten und 8 Astrozytompatienten) zugeordnet. Die Patienten mit einer niedrigen CD56+/CD94+ Frequenz hatten ein medianes Überleben von 50 Monaten und die Patienten mit einer hohen Frequenz ein medianes Überleben von 88 Monaten (**Abbildung 21.B**), wobei auch dieser Unterschied nicht statistisch signifikant ist. (Lennartz et al., 2023)

In den anderen Lymphozytensubpopulationen sowie in Patienten mit hohem und niedrigem Hsp70 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Gesamtüberlebens.

5.8 Zeitliche Dynamik der peripheren Hsp70 Konzentration von Oligodendrogliom- und Astrozytompatienten

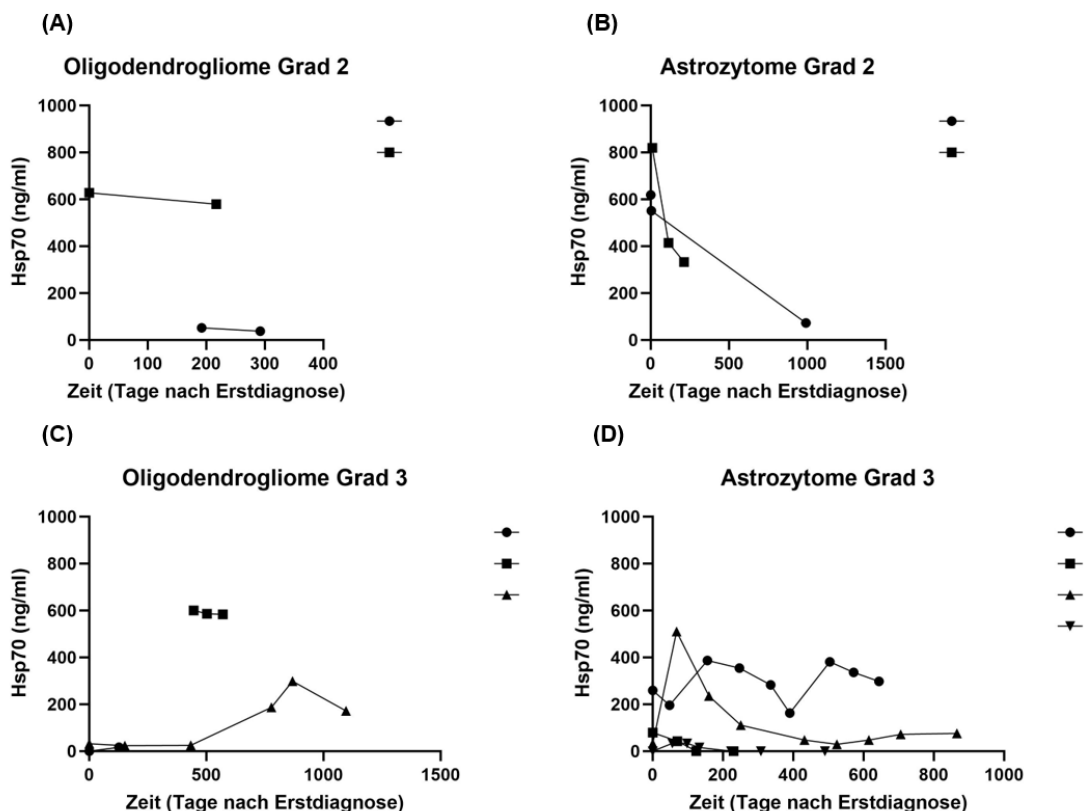


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Hsp70 (ng/ml) Konzentration im peripheren Plasma von Gliompatienten. **(A)** Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=2), **(B)** Grad 2 Astrozytompatienten (n=2), **(C)** Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=3) und **(D)** Grad 3 Astrozytompatienten (n=4).

Grad 2 Oligodendrogliompatienten zeigten keine eindeutigen Veränderungen ihrer Hsp70 Plasmakonzentration im Verlauf und unter Therapie der Erkrankung (**Abbildung 22.A**).

Grad 2 Astrozytompatienten mit initial hohen Hsp70-Werten zeigten nach der Diagnose und im Verlauf der Tumorthherapie fallende Hsp70-Werte (**Abbildung 22.B**). Ein Patient zeigte hier bei Diagnose eine Hsp70 Plasmakonzentration von 618,4 ng/ml und 992 Tage nach Diagnose 73,0 ng/ml. Der zweite Patient, dessen Verlauf untersucht wurde, zeigte eine initiale Hsp70 Plasmakonzentration von 819,8 ng/ml die nach 114 Tagen auf 414,8 ng/ml und nach 213 Tagen auf 332,7 ng/ml gefallen war.

Unter den Grad 3 Oligodendrogliompatienten fiel ein Patient auf, der nach initial niedrigen Hsp70 Werten von 32,2 ng/ml bei Diagnose, steigende Hsp70-Werte zeigte (**Abbildung 22.C**). Den höchsten Hsp70-Wert von 298,0 ng/ml erreichte dieser Patient 868 Tagen nach Diagnose, danach fiel der Hsp70-Wert wieder auf 172,0 ng/ml. Dieser Anstieg konnte allerdings nicht mit einem Tumorrezidiv oder einem anderen klinischen Ereignis in Verbindung gebracht werden.

Grad 3 Astrozytompatienten zeigten keine eindeutige Entwicklung ihrer Hsp70 Plasmakonzentration im Verlauf der Erkrankung (**Abbildung 22.D**). Einer dieser Patienten zeigte nach initial stark steigenden Werten einen Abfall der Hsp70-Plasmakonzentration, der allerdings nicht mit einem besonderen klinischen Verlauf der Erkrankung in Verbindung gebracht werden konnte. Ein weiterer Patient zeigte mehrere Anstiege seiner Hsp70-Plasmakonzentration, die durch Abfälle des Werts gefolgt wurden. Auch hier konnte keine eindeutige Verbindung zu klinischen Ereignissen hergestellt werden.

6. Diskussion

Trotz der stetigen Weiterentwicklung von multimodalen Diagnose- und Therapiekonzepten gibt es derzeit keine gängigen Früherkennungsmethoden oder etablierte Tumormarker für Gliome, wobei die Diagnose weiterhin vor allem auf bildgebenden Verfahren und anschließenden histologischen Untersuchungen basiert (Ringel et al., 2021; Silantyev et al., 2019). Demzufolge werden Gliome oft erst diagnostiziert, wenn Symptome wie epileptische Anfälle auftreten, die durch frühere Therapiemaßnahmen potenziell vermeidbar sind (Alther et al., 2020). Das stressinduzierbare Hitzeschockprotein Hsp70 stellt einen vielversprechenden neuartigen Tumormarker dar, der über „Liquid Biopsy“ im peripheren Blut gut zugänglich messbar ist und in Glioblastomen nachweislich erhöht ist (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich weder in WHO-Grad 2 Gliomen noch in WHO-Grad 3 Gliomen gegenüber Gesundspendern signifikant erhöhte periphere Hsp70 Werte messen. Im Vergleich zu Glioblastomen, in welchen erhöhte periphere Hsp70 Konzentrationen nachweisbar sind, weisen WHO-Grad 2 und 3 Gliome ein langsames Wachstum und eine bessere Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens auf (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021; Weller et al., 2015). Das langsamere Wachstum führt in der Regel zu einem kleineren Tumolvolumen, wobei die periphere Hsp70 Konzentration, insbesondere in Tumoren mit sehr großen Volumen, in direkter Korrelation zu dem Tumolvolumen steht (Gunther et al., 2015; Lobinger et al., 2021). Schnelles Wachstum und großes Tumolvolumen führen durch geringere Verfügbarkeit von Sauerstoff und Nährstoffen vor allem im Tumorzentrum zu erhöhtem zellulären Stress. Daher zeigen WHO-Grad 2 und 3 Gliome im Vergleich zu Glioblastomen weniger zentrale Nekrosen, die durch Zelluntergang zytosolisches Hsp70 in das Gewebe freisetzen könnten (Lobinger et al., 2021). Folglich entfällt auch der inflammatorische Effekt dieser Nekrosen, der durch das Rekrutieren von Makrophagen und Leukozyten zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie proinflammatorischen Zytokinen führt und den zellulären Stress im TME nochmals steigert (Papale et al., 2020). Die intrakranielle Lokalisation von Gliomen bedeutet auch, dass die Zugänglichkeit von Tumormarkern im peripheren Blut durch die Blut-Hirn-Schranke moderiert wird. In Hirntumoren ist die

Blut-Hirn-Schranke oft nicht vollständig intakt, jedoch ist das Ausmaß dieser Schädigung sehr variabel und in Glioblastomen potenziell deutlich stärker ausgeprägt als in anderen Gliomen (Sarkaria et al., 2018). Zusammenfassend weisen die von mir erhobenen Daten darauf hin, dass die Anwendbarkeit von peripherem Hsp70 als diagnostischer Biomarker in WHO-Grad 2 und 3 Gliomen geringer als in WHO-Grad 4 Glioblastomen ist.

Auf methodischer Ebene lieferte der Hsp70-exo ELISA fast ausschließlich höhere Messwerte als der R&D Systems DuoSet® ELISA. Im Gegensatz zu dem R&D Systems DuoSet® ELISA ist die Messung von membrangebundenem Hsp70 mit dem Hsp70-exo ELISA möglich (Werner et al., 2021). Die aus dem Patientenblut isolierten Exosomen zeigten eine deutliche Expression von membrangebundenem Hsp70, womit sie ein Abbild der ebenfalls Hsp70-positiven Tumorzellmembran darstellen (Gehrmann et al., 2008; Multhoff et al., 1995). Nach Isolation der Exosomen hatte der Exosomen-freie Überstand deutlich geringere Hsp70 Konzentrationen als das native Plasma. Insgesamt ergibt sich das Bild, dass ein großer Teil des peripher mit dem Hsp70-exo ELISA messbaren Hsp70 durch membrangebundenes exosomales Hsp70 gebildet wird, was das Potenzial hat, die Spezifität der peripheren Hsp70-Messung in Tumorerkrankungen zu erhöhen.

Das Immunsystem rückt immer stärker in den Fokus neuartiger Ansätze der Tumorthherapie. Die Fähigkeit von Tumoren, das Immunsystem zu unterdrücken und sich diesem zu entziehen, ist ein entscheidender Schritt der Pathogenese aller Tumorerkrankungen. Gliome gelten als hoch immunsuppressiv, indem sie in Lymphozyten Seneszenz, Toleranz, Anergie, Erschöpfung und Ignoranz induzieren (Grabowski et al., 2021; K. I. Woroniecka et al., 2018). Senescente T-Zellen befinden sich in einem hypofunktionalen Zustand und zeichnen sich durch den Verlust von costimulatorischen Oberflächenmarkern wie CD27 und CD28 sowie verkürzten Telomeren durch Verlust der Telomeraseaktivität aus (Grabowski et al., 2021; K. I. Woroniecka et al., 2018). Diese Zustände werden im TME typischerweise durch die Unterdrückung von Antigenen und dem Fehlen stimulatorischer Faktoren wie Interleukinen ausgelöst (Grabowski et al., 2021). Der Versuch die körpereigene immunologische Tumorerabwehr wiederherzustellen, eröffnet viele neue therapeutische Möglichkeiten. Unter anderem findet die Immuncheckpoint-Blockade

über PD-1/PD-L1 oder CTLA-4 Antagonisten in vielen Tumorerkrankungen immer weiter verbreitete Anwendung (Upadhaya et al., 2022). Durch das extrem immunsuppressive TME ist die klinische Anwendbarkeit dieser Therapieoptionen in Gliomen allerdings zum heutigen Zeitpunkt stark eingeschränkt (Chen et al., 2019; Lim et al., 2018; K. Woroniecka et al., 2018).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich in Gliompatienten weitreichende Veränderungen des peripheren Immunphänotyps zeigen. Die Patienten zeigten tendenziell eine reduzierte relative Frequenz der Lymphozyten insgesamt, wobei dies in WHO-Grad 3 Astrozytompatienten signifikant ausgeprägt war. In dieser Gruppe wurde das kürzeste Gesamtüberleben beobachtet, was möglicherweise durch die starke Suppression der Lymphozyten verstärkt wurde. Zudem zeigten die Tumorkohorten tendenziell reduzierte CD4⁺ T-Helferzellfrequenzen. CD4⁺ T-Helferzellen sind durch die Sekretion von Zytokinen und Co-Stimulation anderer Leukozyten für die Initiierung und Aufrechterhaltung einer anti-tumorösen Immunreaktion unabdingbar. Im Rahmen der T-Zell Erschöpfung zeigen T-Helferzellen in Gliomen eingeschränkte Produktion von IFN γ und IL-2, wobei dies in Astrozytomen am stärksten ausgeprägt ist (K. Woroniecka et al., 2018). Daher könnte die reduzierte Lymphozytenfrequenz der WHO-Grad 3 Astrozytompatienten zum Teil auf ein Mangel an immunstimulatorischen Signalstoffen von T-Helferzellen zurückzuführen sein. In Patienten mit Lungenkarzinomen konnten bereits reduzierte Konzentrationen von IFN γ und IL-2 in Patienten mit niedrigen peripheren T-Helferzellen gemessen werden (Seier et al., 2022). Diese Patienten zeigten zusätzlich reduzierte periphere Konzentrationen der Interleukine IL-4 und IL-6 (Seier et al., 2022). Gleichzeitig konnte ich signifikant erhöhte CD4⁺ T-Helferzellfrequenzen in den Hsp70^{high} WHO-Grad 2 Patienten gegenüber den Hsp70^{low} WHO-Grad 2 Patienten zeigen. Möglicherweise sind in WHO-Grad 2 Patienten, mit einem weniger immunsuppressiven TME, ausreichend inflammatorische Zytokine vorhanden, um die Induktion von T-Helferzellen über Hsp70 aufrechtzuhalten.

Gliome können auch körpereigene Mechanismen der Immunsuppression, die unter physiologischen Bedingungen überschießenden oder autoimmunen Immunreaktionen entgegenwirken, nutzen, um sich dem Immunsystem zu entziehen. Hierzu gehört die Induktion von CD4⁺ und CD8⁺ regulatorischen T-Zellen, die vor

allem durch die Sekretion von IL-10 und TGF β die Produktion von IL-2 und IFN γ durch T-Helferzellen hemmen, wodurch wichtige stimulatorische Signale zur Aufrechterhaltung der immunologischen Tumorabwehr fehlen (Ooi et al., 2014; K. I. Woroniecka et al., 2018). Erhöhte Frequenzen regulatorischer T-Zellen sind in Glioblastomen bekannt (Andaloussi & Lesniak, 2006) und ich konnte in den WHO-Grad 2 und 3 Gliompatienten ebenfalls tendenziell erhöhte Frequenzen von regulatorischen T-Zellen zeigen. Demnach bietet die Hemmung von regulatorischen T-Zellen möglicherweise einen weiteren neuartigen Therapieansatz für Gliompatienten. Ein typischer Angriffspunkt hierfür ist CD25, die α -Untereinheit des hochaffinen IL-2 Rezeptors, der konstitutionell auf der Membran von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird (Fecci et al., 2006). Neben CD25 sind auch CTLA-4 und GITR Hemmer Ansatzpunkte für derartige Therapieversuche (Andaloussi & Lesniak, 2006). Erste Versuche an Glioblastom-Mausmodellen haben gezeigt, dass die Blockade von CD25 über monoklonale Antikörper die Tumormunität erhöhen kann (Fecci et al., 2006). Die tendenziell erhöhten Frequenzen von regulatorischen T-Zellen in WHO-Grad 2 und 3 Gliompatienten weisen darauf hin, dass ähnliche Therapieansätze auch in diesen Patienten einen interessanten neuen Forschungsaspekt darstellen.

Neben der Wiederherstellung der körpereigenen Tumorabwehr durch Immuncheckpointblockade oder Hemmung von regulatorischen T-Zellen, ist auch die Entwicklung von CAR T Zellen, die spezifisch gegen Antigene von Gliomen gerichtet sind, von wissenschaftlichen Interesse. In der klinischen Anwendung sind CAR T Zellen noch durch dieselben immunsuppressiven Mechanismen, mit welchen sich Tumoren vor den körpereigenen T-Zellen schützen, limitiert (Choi Bryan D. et al., 2024; Cordell et al., 2022; Petersen & Krenciute, 2019). Auch die Entwicklung chimärer NK-Zellen als spezifische Tumorthherapie in Gliomen ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Grabowski et al., 2021), wobei die immunstimulatorischen Eigenschaften von Hsp70, insbesondere auf NK-Zellen, diese Therapieansätze in Zukunft unterstützen könnten. Die 14 Aminosäuren umfassende TKD-Sequenz des Hsp70 Proteins kann NK-Zellen für membrangebundenes Hsp70 sensibilisieren, wonach der Heterodimer des CD94 Lectinrezeptors und NKG2A oder NKG2C auf der Zellmembran der NK-Zellen mit membrangebundenem Hsp70 interagiert und Granzym B vermittelte Apoptose auslöst (H. Zhang et al., 2007). In einer Phase II

Studie konnte gezeigt werden, dass ex vivo mit TKD stimulierte autologe NK-Zellen einen Überlebensvorteil in Patienten mit fortgeschrittenem nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen vermitteln können (Multhoff et al., 2020). Obwohl dieser Mechanismus auf zusätzliche stimulatorische Signale durch Zytokine wie IL-2 angewiesen ist (Multhoff et al., 2020), die im TME von Gliomen unterdrückt werden, konnten Hsp70/IL-2 vorbehandelte NK-Zellen einen Überlebensvorteil in einem Glioblastom-Rattenmodell vermitteln (Sharifzad et al., 2020).

Ich konnte in WHO-Grad 3 Astrozytomen erhöhte Frequenzen verschiedener aktivierter NK-Zell-Subpopulationen wie CD69+, CD94+, NKG2D+, NKp30+ und NKp46+ nachweisen, obwohl diese Patienten unter den eingeschlossenen Tumorentitäten das kürzeste Gesamtüberleben aufwiesen. Da Astrozytome die Sekretion von Zytokinen wie IL-2 am stärksten inhibieren (K. Woroniecka et al., 2018), können die NK-Zellen ihre anti-tumoröse Wirkung in Astrozytomen möglicherweise nicht vollständig entfalten. HLA-G ist ein weiteres Oberflächenmolekül, welches in Gliomen überexprimiert wird und die Zytotoxizität von NK-Zellen potenziell hemmt (Grabowski et al., 2021). Die erhöhte Frequenz von CD56^{bright} NK-Zellen könnte einen weiteren Erklärungsansatz für die mangelnde Tumorkontrolle in Astrozytomen durch NK-Zellen darstellen. Obwohl CD56^{bright} NK-Zellen den Großteil aller NK-Zellen darstellen, sind sie meist in Lymphknoten oder anderen lymphatischen Organen statt in der peripheren Zirkulation lokalisiert (Poli et al., 2009). CD56^{bright} NK-Zellen können in CD56^{dim} NK-Zellen übergehen, allerdings ist ihre immunologische Aktivität initial geringer als die der CD56^{dim} NK-Zellen (Poli et al., 2009). Erhöhte CD56^{bright} NK-Zellfrequenzen könnten als Zeichen der Rekrutierung von NK-Zellen aus den lymphatischen Organen, um den Verbrauch durch die Astrozytome auszugleichen, gewertet werden. Ein Faktor, der unter den richtigen Voraussetzungen zur Erhöhung der NK-Zellfrequenzen beiträgt, ist die Freisetzung von Hsp70. Ich konnte in Hsp70^{high} WHO-Grad 3 Oligodendrogliompatienten gegenüber Hsp70^{low} WHO-Grad 3 Oligodendrogliompatienten signifikant erhöhte CD3-/CD56+ NK-Zellfrequenzen zeigen. Möglicherweise wegen des immunsuppressiveren TME und des Mangels an stimulatorischen Interleukinen in Astrozytomen (K. Woroniecka et al., 2018), zeigte sich zwischen Hsp70^{low} und Hsp70^{high} WHO-Grad 3 Astrozytompatienten allerdings kein signifikanter Unterschied der CD3-/CD56+ NK-Zellfrequenzen.

Insgesamt hatten die eingeschlossenen WHO-Grad 3 Gliompatienten mit höheren CD3-/CD56+ und CD56+/CD94+ NK-Zellfrequenzen ein etwas besseres Gesamtüberleben als Patienten mit niedrigen NK-Zellfrequenzen, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war. Dies könnte darauf hinweisen, dass NK-Zellen, vor allem in hochgradigen Astrozytomen, keine effektive Tumorkontrolle gewährleisten (Grabowski et al., 2021; K. Woroniecka et al., 2018). Die Verbesserung der NK-Zell Funktion ist Gegenstand der aktuellen Forschung, wobei die Stimulation mit TKD und IL-2 einen möglichen Ansatz darstellt, um die Therapiewirksamkeit in stark immunsuppressiven Tumoren zu steigern (Multhoff et al., 2020; Sharifzad et al., 2020). Zwischen Patienten mit hohen und niedrigen T-Zellfrequenzen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede des Gesamtüberlebens.

Die zeitliche Dynamik der peripheren Hsp70-Konzentration im Verlauf von Gliomerkrankungen unterliegt einer Fülle an Faktoren, die sich durch die Etablierung individueller Tumorthérapien vervielfachen. Um Rückschlüsse von den peripheren Hsp70 Spiegeln auf den Krankheitsverlauf, das Therapieansprechen und das Auftreten von Rezidiven zu ziehen, sind daher weitere Studien notwendig.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit einen signifikanten Anstieg der NK-Zellen in Korrelation mit der peripheren Hsp70-Konzentration in WHO-Grad 3 Oligodendrogliompatienten, der in WHO-Grad 3 Astrozytomentpatienten, die durch ein noch immunsuppressiveres TME gekennzeichnet sind, weniger stark ausgeprägt ist. Die NK-Zell Depletion in WHO-Grad 3 Astrozytomentpatienten wird durch Rekrutierung von CD56^{bright} NK-Zellen teilweise ausgeglichen, wobei erhöhte NK-Zellfrequenzen WHO-Grad 3 Gliompatienten allenfalls einen minimalen Überlebensvorteil bieten. WHO-Grad 2 Oligodendrogliompatienten zeigten einen Abfall der CD4+ T-Helferzellen, welcher möglicherweise durch hohe Hsp70 Konzentrationen abgefangen werden kann. Die peripheren Hsp70 Werte als Abbild des Krankheitsverlaufs und zur Früherkennung von Rezidiven zu etablieren sind laufende Projekte unserer Arbeitsgruppe, die das Verständnis von Hsp70 als diagnostischen und prognostischen Biomarker in Tumorerkrankungen auch in Zukunft weiter voranbringen werden.

7. Referenzen

- Alther, B., Mylius, V., Weller, M., & Gantenbein, A. (2020). From first symptoms to diagnosis: Initial clinical presentation of primary brain tumors. *Clinical and Translational Neuroscience*, 4(2), 2514183X20968368.
<https://doi.org/10.1177/2514183X20968368>
- Alzial, G., Renoult, O., Paris, F., Gratas, C., Clavreul, A., & Pecqueur, C. (2022). Wild-type isocitrate dehydrogenase under the spotlight in glioblastoma. *Oncogene*, 41(5), 613–621. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02056-1>
- Andaloussi, A. E., & Lesniak, M. S. (2006). An increase in CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology*, 8(3), 234–243.
- Atkin, A. S., Moin, A. S. M., Nandakumar, M., Al-Qaissi, A., Sathyapalan, T., Atkin, S. L., & Butler, A. E. (2021). Impact of severe hypoglycemia on the heat shock and related protein response. *Scientific Reports*, 11(1), 17057.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-96642-8>
- Bell, E. H., Zhang, P., Shaw, E. G., Buckner, J. C., Barger, G. R., Bullard, D. E., Mehta, M. P., Gilbert, M. R., Brown, P. D., Stelzer, K. J., McElroy, J. P., Fleming, J. I., Timmers, C. D., Becker, A. P., Salavaggione, A. L., Liu, Z., Aldape, K., Brachman, D. G., Gertler, S. Z., ... Chakravarti, A. (2020). Comprehensive Genomic Analysis in NRG Oncology/RTOG 9802: A Phase III Trial of Radiation Versus Radiation Plus Procarbazine, Lomustine (CCNU), and Vincristine in High-Risk Low-Grade Glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 38(29), 3407–3417. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02983>
- Bondy, M. L., Scheurer, M. E., Malmer, B., Barnholtz-Sloan, J. S., Davis, F. G., Il'yasova, D., Kruchko, C., McCarthy, B. J., Rajaraman, P., Schwartzbaum, J.

- A., Sadetzki, S., Schlehofer, B., Tihan, T., Wiemels, J. L., Wrensch, M., Buffler, P. A., & On behalf of the Brain Tumor Epidemiology Consortium. (2008). Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer*, 113(S7), 1953–1968. <https://doi.org/10.1002/cncr.23741>
- Bukau, B., Weissman, J., & Horwich, A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125(3), 443–451.
- Byun, Y. H., & Park, C.-K. (2022). Classification and Diagnosis of Adult Glioma: A Scoping Review. *Brain & Neurorehabilitation*, 15(3).
- Cairncross, G., Wang, M., Shaw, E., Jenkins, R., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K., Souhami, L., Laperriere, N., Curran, W., & Mehta, M. (2013). Phase III Trial of Chemoradiotherapy for Anaplastic Oligodendroglioma: Long-Term Results of RTOG 9402. *Journal of Clinical Oncology*, 31(3), 337–343. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.2674>
- Chen, R. Q., Liu, F., Qiu, X. Y., & Chen, X. Q. (2019). The prognostic and therapeutic value of PD-L1 in glioma. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 430610.
- Choi Bryan D., Gerstner Elizabeth R., Frigault Matthew J., Leick Mark B., Mount Christopher W., Balaj Leonora, Nikiforow Sarah, Carter Bob S., Curry William T., Gallagher Kathleen, & Maus Marcela V. (2024). Intraventricular CARv3-TEAM-E T Cells in Recurrent Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 390(14), 1290–1298. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2314390>
- Cordell, E. C., Alghamri, M. S., Castro, M. G., & Gutmann, D. H. (2022). T lymphocytes as dynamic regulators of glioma pathobiology. *Neuro-Oncology*, 24(10), 1647–1657.
- Delgado-Martín, B., & Medina, M. Á. (2020). Advances in the knowledge of the molecular biology of glioblastoma and its impact in patient diagnosis, stratification, and treatment. *Advanced Science*, 7(9), 1902971.

- Dong, X., Noorbakhsh, A., Hirshman, B. R., Zhou, T., Tang, J. A., Chang, D. C., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2016). Survival trends of grade I, II, and III astrocytoma patients and associated clinical practice patterns between 1999 and 2010: A SEER-based analysis. *Neuro-Oncology Practice*, 3(1), 29–38. <https://doi.org/10.1093/nop/npv016>
- Fecci, P. E., Sweeney, A. E., Grossi, P. M., Nair, S. K., Learn, C. A., Mitchell, D. A., Cui, X., Cummings, T. J., Bigner, D. D., & Gilboa, E. (2006). Systemic anti-CD25 monoclonal antibody administration safely enhances immunity in murine glioma without eliminating regulatory T cells. *Clinical Cancer Research*, 12(14), 4294–4305.
- Gaillard, F. (2024, October 2). *Astrocytoma, IDH-mutant* | *Radiology Reference Article* | *Radiopaedia.org*. Radiopaedia. <https://doi.org/10.53347/rID-14598>
- Gastpar, R., Gross, C., Rossbacher, L., Ellwart, J., Riegger, J., & Multhoff, G. (2004). The cell surface-localized heat shock protein 70 epitope TKD induces migration and cytolytic activity selectively in human NK cells. *The Journal of Immunology*, 172(2), 972–980.
- Gehrmann, M., Liebisch, G., Schmitz, G., Anderson, R., Steinem, C., De Maio, A., Pockley, G., & Multhoff, G. (2008). Tumor-specific Hsp70 plasma membrane localization is enabled by the glycosphingolipid Gb3. *PloS One*, 3(4), e1925.
- Goodenberger, M. L., & Jenkins, R. B. (2012). Genetics of adult glioma. *Cancer Genetics*, 205(12), 613–621. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2012.10.009>
- Grabowski, M. M., Sankey, E. W., Ryan, K. J., Chongsathidkiet, P., Lorrey, S. J., Wilkinson, D. S., & Fecci, P. E. (2021). Immune suppression in gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 151, 3–12.
- Gunther, S., Ostheimer, C., Stangl, S., Specht, H. M., Mozes, P., Jesinghaus, M., Vordermark, D., Combs, S. E., Peltz, F., Jung, M. P., & Multhoff, G. (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*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00556>
- Hamblin, R., Vardon, A., Akpalu, J., Tampourlou, M., Spiliotis, I., Sbardella, E., Lynch, J., Shankaran, V., Mavilakandy, A., & Gagliardi, I. (2022). Risk of second brain tumour after radiotherapy for pituitary adenoma or craniopharyngioma: A retrospective, multicentre, cohort study of 3679 patients with long-term imaging surveillance. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 10(8), 581–588.
- Harat, M., Rakowska, J., Harat, M., Szyberg, T., Furtak, J., Miechowicz, I., & Małkowski, B. (2023). Combining amino acid PET and MRI imaging increases accuracy to define malignant areas in adult glioma. *Nature Communications*, 14(1), 4572. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39731-8>
- Hofer, S., Bullinger, L., Dierlmann, J., Grosu, A.-L., Hau, P., Hense, J., Hoffmann, J., Proescholdt, M., Pflugshaupt, T., Preusser, M., Pukrop, T., Rushing, E. J., Wörmann, B., & Sinn, M. (2021). *Gliome im Erwachsenenalter Onkopedia Leitlinie*. <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/archive/guidelines/gliome-im-erwachsenenalter/version-13032024T103600/@@guideline/html/index.html#ID0EEE>
- Hromadnikova, I., Li, S., Kotlabova, K., & Dickinson, A. M. (2016). Influence of in vitro IL-2 or IL-15 alone or in combination with Hsp 70 derived 14-Mer peptide (TKD) on the expression of NK cell activatory and inhibitory receptors on peripheral blood T cells, B cells and NKT cells. *Plos One*, 11(3), e0151535.
- Huang, W.-J., Xia, L.-M., Zhu, F., Huang, B., Zhou, C., Zhu, H.-F., Wang, B., Chen, B., Lei, P., Shen, G.-X., & De-AnTian. (2009). Transcriptional upregulation of

- HSP70-2 by HIF-1 in cancer cells in response to hypoxia. *International Journal of Cancer*, 124(2), 298–305. <https://doi.org/10.1002/ijc.23906>
- Johnson, O. T., Nadel, C. M., Carroll, E. C., Arhar, T., & Gestwicki, J. E. (2022). Two distinct classes of cochaperones compete for the EEVD motif in heat shock protein 70 to tune its chaperone activities. *Journal of Biological Chemistry*, 298(3).
- Khomenko, I. P., Bakhtina, L. Yu., Zelenina, O. M., Kruglov, S. V., Manukhina, E. B., Bayda, L. A., & Malyshev, I. Yu. (2007). Role of heat shock proteins HSP70 and HSP32 in the protective effect of adaptation of cultured HT22 hippocampal cells to oxidative stress. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 144(2), 174–177. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0282-9>
- King, F. W., Wawrzynow, A., Höhfeld, J., & Zylicz, M. (2001). Co-chaperones Bag-1, Hop and Hsp40 regulate Hsc70 and Hsp90 interactions with wild-type or mutant p53. *The EMBO Journal*, 20(22), 6297–6305.
- Kroeger, H., Messah, C., Ahern, K., Gee, J., Joseph, V., Matthes, M. T., Yasumura, D., Gorbatyuk, M. S., Chiang, W.-C., & LaVail, M. M. (2012). Induction of endoplasmic reticulum stress genes, BiP and chop, in genetic and environmental models of retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(12), 7590–7599.
- Larjavaara, S., Mäntylä, R., Salminen, T., Haapasalo, H., Raitanen, J., Jääskeläinen, J., & Auvinen, A. (2007). Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro-Oncology*, 9(3), 319–325. <https://doi.org/10.1215/15228517-2007-016>
- Law, M., Yang, S., Wang, H., Babb, J. S., Johnson, G., Cha, S., Knopp, E. A., & Zagzag, D. (2003). Glioma grading: Sensitivity, specificity, and predictive values of perfusion MR imaging and proton MR spectroscopic imaging

- compared with conventional MR imaging. *American Journal of Neuroradiology*, 24(10), 1989–1998.
- Lennartz, P., Thölke, D., Bashiri Dezfouli, A., Pilz, M., Lobinger, D., Messner, V., Zanth, H., Ainslie, K., Kafshgari, M. H., Rammes, G., Ballmann, M., Schlegel, M., Foulds, G. A., Pockley, A. G., Schmidt-Graf, F., & Multhoff, G. (2023). Biomarkers in Adult-Type Diffuse Gliomas: Elevated Levels of Circulating Vesicular Heat Shock Protein 70 Serve as a Biomarker in Grade 4 Glioblastoma and Increase NK Cell Frequencies in Grade 3 Glioma. *Biomedicines*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123235>
- Li, W.-H., Li, Y.-X., & Ren, J. (2019). High altitude hypoxia on brain ultrastructure of rats and Hsp70 expression changes. *British Journal of Neurosurgery*, 33(2), 192–195. <https://doi.org/10.1080/02688697.2018.1519108>
- Lim, M., Xia, Y., Bettegowda, C., & Weller, M. (2018). Current state of immunotherapy for glioblastoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(7), 422–442.
- Lobinger, D., Gempt, J., Sievert, W., Barz, M., Schmitt, S., Nguyen, H. T., Stangl, S., Werner, C., Wang, F., Wu, Z., Fan, H., Zanth, H., Shevtsov, M., Pilz, M., Riederer, I., Schwab, M., Schlegel, J., & Multhoff, G. (2021). Potential Role of Hsp70 and Activated NK Cells for Prediction of Prognosis in Glioblastoma Patients. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.669366>
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>

- Malmer, B., Grönberg, H., Bergenheim, A. T., Lenner, P., & Henriksson, R. (1999). Familial aggregation of astrocytoma in northern Sweden: An epidemiological cohort study. *International Journal of Cancer*, 81(3), 366–370.
- Mattoo, R. U., & Goloubinoff, P. (2014). Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71, 3311–3325.
- Mattoo, R. U., Sharma, S. K., Priya, S., Finka, A., & Goloubinoff, P. (2013). Hsp110 is a bona fide chaperone using ATP to unfold stable misfolded polypeptides and reciprocally collaborate with Hsp70 to solubilize protein aggregates. *Journal of Biological Chemistry*, 288(29), 21399–21411.
- Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 670–684.
- Molinaro, A. M., Taylor, J. W., Wiencke, J. K., & Wrensch, M. R. (2019). Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology*, 15(7), 405–417. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0220-2>
- Mosser, D. D., Caron, A. W., Bourget, L., Denis-Larose, C., & Massie, B. (1997). Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*.
- Moura, C. S., Lollo, P. C. B., Morato, P. N., & Amaya-Farfan, J. (2018). Dietary nutrients and bioactive substances modulate heat shock protein (HSP) expression: A review. *Nutrients*, 10(6), 683.
- Muldoon, L. L., Alvarez, J. I., Begley, D. J., Boado, R. J., Del Zoppo, G. J., Doolittle, N. D., Engelhardt, B., Hallenbeck, J. M., Lonser, R. R., & Ohlfest, J. R. (2013). Immunologic privilege in the central nervous system and the blood–brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(1), 13–21.

- Multhoff, G., Botzler, C., Wiesnet, M., Müller, E., Meier, T., Wilmanns, W., & Issels, R. D. (1995). A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *International Journal of Cancer*, 61(2), 272–279.
- Multhoff, G., Seier, S., Stangl, S., Sievert, W., Shevtsov, M., Werner, C., Pockley, A. G., Blankenstein, C., Hildebrandt, M., Offner, R., Ahrens, N., Kokowski, K., Hautmann, M., Rödel, C., Fietkau, R., Lubgan, D., Huber, R., Hautmann, H., Duell, T., ... Combs, S. E. (2020). Targeted Natural Killer Cell–Based Adoptive Immunotherapy for the Treatment of Patients with NSCLC after Radiochemotherapy: A Randomized Phase II Clinical Trial. *Clinical Cancer Research*, 26(20), 5368–5379. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-1141>
- Murphy, M. E. (2013). The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis*, 34(6), 1181–1188. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt111>
- Ooi, Y. C., Tran, P., Ung, N., Thill, K., Trang, A., Fong, B. M., Nagasawa, D. T., Lim, M., & Yang, I. (2014). The role of regulatory T-cells in glioma immunology. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 119, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2013.12.004>
- Ostrom, Q. T., Kinnersley, B., Wrensch, M. R., Eckel-Passow, J. E., Armstrong, G., Rice, T., Chen, Y., Wiencke, J. K., McCoy, L. S., Hansen, H. M., Amos, C. I., Bernstein, J. L., Claus, E. B., Il'yasova, D., Johansen, C., Lachance, D. H., Lai, R. K., Merrell, R. T., Olson, S. H., ... GliomaScan consortium. (2018). Sex-specific glioma genome-wide association study identifies new risk locus at 3p21.31 in females, and finds sex-differences in risk at 8q24.21. *Scientific Reports*, 8(1), 7352. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24580-z>

- Ostrom, Q. T., Price, M., Neff, C., Cioffi, G., Waite, K. A., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2023). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016—2020. *Neuro-Oncology*, 25(Supplement_4), iv1–iv99.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noad149>
- Papale, M., Buccarelli, M., Mollinari, C., Russo, M. A., Pallini, R., Ricci-Vitiani, L., & Tafani, M. (2020). Hypoxia, Inflammation and Necrosis as Determinants of Glioblastoma Cancer Stem Cells Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8). <https://doi.org/10.3390/ijms21082660>
- Petersen, C. T., & Krenciute, G. (2019). Next generation CAR T cells for the immunotherapy of high-grade glioma. *Frontiers in Oncology*, 9, 69.
- Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., & Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: An important NK cell subset. *Immunology*, 126(4), 458–465.
- Radons, J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: Where do we stand? *Cell Stress and Chaperones*, 21(3), 379–404. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0676-6>
- Reuss, D. E., Mamatjan, Y., Schrimpf, D., Capper, D., Hovestadt, V., Kratz, A., Sahm, F., Koelsche, C., Korshunov, A., Olar, A., Hartmann, C., Reijneveld, J. C., Wesseling, P., Unterberg, A., Platten, M., Wick, W., Herold-Mende, C., Aldape, K., & von Deimling, A. (2015). IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: A grading problem for WHO. *Acta Neuropathologica*, 129(6), 867–873.
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1438-8>
- Ringel, F., Meyer, B., Schmidt-Graf, F., Hemmer, B., Höfler, H., Förschler, A., Scheidhauer, K., Schwaiger, M., Astner, S., Molls, M., Herschbach, P.,

- Heberger, B., Tonn, J.-C., Dieterich, M., Kirchner, T., Bartenstein, P., Manapov, F., Belka, C., Heußner, P., ... Albert, N. (2017, July 11). *Intrakranielles Gliom Standard Operating Procedure (SOP) Behandlungskonzept*. CCC München Comprehensive Cancer Center.
- Ringel, F., Meyer, B., Schmidt-Graf, F., Hemmer, B., Höfler, H., Förschler, A., Scheidhauer, K., Schwaiger, M., Astner, S., Molls, M., Herschbach, P., Heberger, B., Tonn, J.-C., Dieterich, M., Kirchner, T., Bartenstein, P., Manapov, F., Belka, C., Heußner, P., ... Albert, N. (2021, May 31). *Intrakranielles Gliom Standard Operating Procedure (SOP) Behandlungskonzept*. CCC München Comprehensive Cancer Center.
- Robertson, L. B., Armstrong, G. N., Olver, B. D., Lloyd, A. L., Shete, S., Lau, C., Claus, E. B., Barnholtz-Sloan, J., Lai, R., Il'yasova, D., Schildkraut, J., Bernstein, J. L., Olson, S. H., Jenkins, R. B., Yang, P., Rynerason, A. L., Wrensch, M., McCoy, L., Wienkce, J. K., ... Houlston, R. S. (2010). Survey of familial glioma and role of germline p16INK4A/p14ARF and p53 mutation. *Familial Cancer*, 9(3), 413–421. <https://doi.org/10.1007/s10689-010-9346-5>
- Ronckers, C., Spix, C., Trübenbach, C., Katalinic, A., Christ, M., Cicero, A., Folkerts, J., Hansmann, J., Kranzhöfer, K., & Kunz, B. (2023). *Krebs in Deutschland für 2019/2020*.
- Rosenzweig, R., Nillegoda, N. B., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2019). The Hsp70 chaperone network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(11), 665–680.
- Roufayel, R., & Kadry, S. (2019). Molecular chaperone HSP70 and key regulators of apoptosis-a review. *Current Molecular Medicine*, 19(5), 315–325.
- Sarkaria, J. N., Hu, L. S., Parney, I. F., Pafundi, D. H., Brinkmann, D. H., Laack, N. N., Giannini, C., Burns, T. C., Kizilbash, S. H., Laramy, J. K., Swanson, K. R., Kaufmann, T. J., Brown, P. D., Agar, N. Y. R., Galanis, E., Buckner, J. C., &

- Elmqvist, W. F. (2018). Is the blood–brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncology*, 20(2), 184–191. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox175>
- Seier, S., Bashiri Dezfouli, A., Lennartz, P., Pockley, A. G., Klein, H., & Multhoff, G. (2022). Elevated Levels of Circulating Hsp70 and an Increased Prevalence of CD94+/CD69+ NK Cells Is Predictive for Advanced Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers*, 14(22). <https://doi.org/10.3390/cancers14225701>
- Sharifzad, F., Mardpour, S., Mardpour, S., Fakharian, E., Taghikhani, A., Sharifzad, A., Kiani, S., Heydarian, Y., Łos, M. J., Azizi, Z., Ghavami, S., Hamidieh, A. A., & Ebrahimi, M. (2020). HSP70/IL-2 Treated NK Cells Effectively Cross the Blood Brain Barrier and Target Tumor Cells in a Rat Model of Induced Glioblastoma Multiforme (GBM). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072263>
- Shin, D.-W., Lee, S., Song, S. W., Cho, Y. H., Hong, S. H., Kim, J. H., Kim, H. S., Park, J. E., Nam, S. J., & Kim, Y.-H. (2020). Survival outcome and prognostic factors in anaplastic oligodendroglioma: A single-institution study of 95 cases. *Scientific Reports*, 10(1), 20162. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77228-2>
- Silantyev, A. S., Falzone, L., Libra, M., Gurina, O. I., Kardashova, K. Sh., Nikolouzakakis, T. K., Nosyrev, A. E., Sutton, C. W., Mitsias, P. D., & Tsatsakis, A. (2019). Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080863>
- Tamai, S., Ichinose, T., & Nakada, M. (2023). Liquid biomarkers in glioma. *Brain Tumor Pathology*, 40(2), 66–77. <https://doi.org/10.1007/s10014-023-00452-x>
- Tonn, J.-C., Westphal, M., Rutka, J. T., & Grossman, S. A. (2006). *Neuro-oncology of CNS tumors*. Springer Science & Business Media.

- Upadhaya, S., Neftelinov, S. T., Hodge, J., & Campbell, J. (2022). Challenges and opportunities in the PD1/PDL1 inhibitor clinical trial landscape. *Nat Rev Drug Discov*, 21(7), 482–483.
- van den Bent, M. J., Tesileanu, C. M. S., Wick, W., Sanson, M., Brandes, A. A., Clement, P. M., Erridge, S., Vogelbaum, M. A., Nowak, A. K., & Baurain, J. F. (2021). Adjuvant and concurrent temozolomide for 1p/19q non-co-deleted anaplastic glioma (CATNON; EORTC study 26053-22054): Second interim analysis of a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet Oncology*, 22(6), 813–823.
- Wang, B., Lan, T., Xiao, H., Chen, Z.-H., Wei, C., Chen, L.-F., Guan, J.-F., Yuan, R.-F., Yu, X., Hu, Z.-G., Wu, H.-J., Dai, Z., & Wang, K. (2021). The expression profiles and prognostic values of HSP70s in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell International*, 21(1), 286. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01987-9>
- Wang, Y., Zhang, F., Xiong, N., Xu, H., Chai, S., Wang, H., Wang, J., Zhao, H., Jiang, X., & Fu, P. (2021). Remodelling and treatment of the blood-brain barrier in glioma. *Cancer Management and Research*, 4217–4232.
- Wang, Z., Gou, W., Liu, M., Sang, W., Chu, H., & Zhang, W. (2015). Expression of P53 and HSP70 in chronic hepatitis, liver cirrhosis, and early and advanced hepatocellular carcinoma tissues and their diagnostic value in hepatocellular carcinoma: An immunohistochemical study. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 21, 3209.
- Weller, M., van den Bent, M., Preusser, M., Le Rhun, E., Tonn, J. C., Minniti, G., Bendszus, M., Balana, C., Chinot, O., & Dirven, L. (2021). EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(3), 170–186.

- Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S. M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P. Y., Stupp, R., & Reifenberger, G. (2015). Glioma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1), 15017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.17>
- Wen, P. Y., Macdonald, D. R., Reardon, D. A., Cloughesy, T. F., Sorensen, A. G., Galanis, E., DeGroot, J., Wick, W., Gilbert, M. R., & Lassman, A. B. (2010). Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: Response assessment in neuro-oncology working group. *Journal of Clinical Oncology*, 28(11), 1963–1972.
- Werner, C., Stangl, S., Salvermoser, L., Schwab, M., Shevtsov, M., Xanthopoulos, A., Wang, F., Dezfouli, A. B., Thölke, D., & Ostheimer, C. (2021). Hsp70 in liquid biopsies—A tumor-specific biomarker for detection and response monitoring in cancer. *Cancers*, 13(15), 3706.
- Woroniecka, K., Chongsathidkiet, P., Rhodin, K., Kemeny, H., Dechant, C., Farber, S. H., Elsamadicy, A. A., Cui, X., Koyama, S., Jackson, C., Hansen, L. J., Johanns, T. M., Sanchez-Perez, L., Chandramohan, V., Yu, Y.-R. A., Bigner, D. D., Giles, A., Healy, P., Dranoff, G., ... Fecci, P. E. (2018). T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, 24(17), 4175–4186. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1846>
- Woroniecka, K. I., Rhodin, K. E., Chongsathidkiet, P., Keith, K. A., & Fecci, P. E. (2018). T-cell dysfunction in glioblastoma: Applying a new framework. *Clinical Cancer Research*, 24(16), 3792–3802.
- Xia, H., Green, D. R., & Zou, W. (2021). Autophagy in tumour immunity and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 21(5), 281–297. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00344-2>

Zhang, H., Gong, W., Wu, S., & Perrett, S. (2022). Hsp70 in redox homeostasis.

Cells, 11(5), 829.

Zhang, H., Liu, R., & Huang, W. (2007). A 14-mer peptide from HSP70 protein is the critical epitope which enhances NK activity against tumor cells in vivo.

Immunological Investigations, 36(3), 233–246.

Zhang, K., Zhao, T., Huang, X., Liu, Z., Xiong, L., Li, M., Wu, L., Zhao, Y., Zhu, L., & Fan, M. (2009). Preinduction of HSP70 promotes hypoxic tolerance and facilitates acclimatization to acute hypobaric hypoxia in mouse brain. *Cell Stress and Chaperones*, 14(4), 407–415. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0094-5>

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des haupt-stressinduzierbaren Hitzeschockproteins Hsp70A1A (Hsp70) (Johnson et al., 2022; Radons, 2016; Rosenzweig et al., 2019; Werner et al., 2021). Erstellt mit Biorender.	12
Abbildung 2: CONSORT-Diagramm des Studiendesigns. (Lennartz et al., 2023) ..	22
Abbildung 3: Beispielhaftes Gating der Lymphozyten eines Grad 3 Astrozytompatienten. R1: Lymphozyten, R2: Monozyten, R3 Granulozyten.	37
Abbildung 4: Beispielhaftes Gating der (A) Isotypen-Kontrolle, (B) CD19+/CD3- B-Zellen, (C) CD3+/CD45+ T-Zellen und (D) CD56+/CD3- NK-Zellen eines Grad 3 Oligodendrogliompatienten.....	38
Abbildung 5: Beispielhaftes Gating der CD56 ^{bright} Untergruppe der CD56+/CD3- NK-Zellen eines Grad 3 Oligodendrogliompatienten.....	39
Abbildung 6: Kaplan-Meier Kurven des Gesamtüberlebens der Grad 3 Oligodendrogliom- (n=15) und Astrozytompatienten (n=16) in Monaten nach der Erstdiagnose der Tumorerkrankung. (Lennartz et al., 2023).....	44
Abbildung 7: Konzentration (ng/ml) des freien und membrangebundenen Hsp70 im Plasma von Gesundspendern (n=118), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=4), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=10) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=13), gemessen mit dem Hsp70-exo ELISA. Die Gruppen wurden mit einem Kruskal-Wallis Test verglichen. (Lennartz et al., 2023) .	46
Abbildung 8: Konzentration (ng/ml) des freien Hsp70 im Serum von Gesundspendern (n=150), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=7) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=5), gemessen mit dem R&D Systems DuoSet® ELISA. Die dargestellten Daten wurden von Dominik Lobinger erhoben. Die Gruppen wurden mit einem Kruskal-Wallis Test verglichen. (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021)	47
Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der Charakteristika isolierter extrazellulärer Vesikel eines Grad 3 Astrozytompatienten. (A) Größenverteilung der extrazellulären Vesikel, (B) Bindungsaffinität (K_D) der extrazellulären Vesikel zu dem cmHsp70.1 Antikörper und (C) Membranpositivität von den Exosomen-typischen Oberflächenmarkern CD9, CD81 und cmHsp70.1. (Lennartz et al., 2023).....	49
Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung des intrazellulären Hsp70 eines Grad 3 Hirntumorschnittes mit dem cmHsp70.1 Antikörper. Der angezeigte Maßstab	

entspricht 100µm. Die Färbung wurde von Dominik Lobinger durchgeführt. (Lennartz et al., 2023; Lobinger et al., 2021)	51
Abbildung 11: Membranexpression von Hsp70 an Tumorzellen von Grad 3 Oligodendrogliom (n=4) und Grad 3 Astrozytomentpatienten (n=2). Die dargestellten Daten wurden von Mathias Pilz erhoben. Die Gruppen wurden mit einem Mann-Whitney Test verglichen. (Lennartz et al., 2023).....	52
Abbildung 12: Relativer Anteil (%) der Lymphozyten an den gesamten peripheren Leukozyten im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten (n=5), Grad 2 Astrozytomentpatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliomentpatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytomentpatienten (n=15). Statistisch signifikante Ergebnisse * p<0,05. Die Gruppen wurden mit einem one-way ANOVA verglichen.	54
Abbildung 13: Relativer Anteil (%) der CD3-/CD19+ B-Zellen im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten (n=5), Grad 2 Astrozytomentpatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliomentpatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytomentpatienten (n=15). Die Gruppen wurden mit einem Kruskal-Wallis Test verglichen.	56
Abbildung 14: Relativer Anteil (%) der T-Zellpopulationen im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten (n=5), Grad 2 Astrozytomentpatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliomentpatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytomentpatienten (n=15). (A) CD3+/CD45+ T-Lymphozyten (One-way ANOVA), (B) CD3+/CD4+ T-Helferzellen (One-way ANOVA), (C) CD3+/CD8+ zytotoxische T-Zellen (One-way ANOVA), (D) CD56+/CD3+ NKT-Zellen (Kruskal-Wallis Test), (E) CD69+/CD3+ T-Zellen (Kruskal-Wallis Test, Astrozytom Grad 3 n=14), (F) CD94+/CD3+ T-Zellen (Kruskal-Wallis Test, Oligodendrogliom Grad 2 n=4) und (G) NKG2D+/CD3+ T-Zellen (One-way ANOVA). Statistisch signifikante Unterschiede: * p<0,05, ** p<0,01. (Lennartz et al., 2023).....	59
Abbildung 15: Relativer Anteil (%) der CD4+ und CD8+ regulatorischen T-Zellpopulationen im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliomentpatienten (n=5), Grad 2 Astrozytomentpatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliomentpatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytomentpatienten (n=15). (A) CD4+/FoxP3+/CD25+ regulatorische T-Zellen (One-way ANOVA) und (B) CD8+/FoxP3+/CD25+ regulatorische T-Zellen (Kruskal-Wallis Test, Grad 3 Oligodendrogliom n=12). Statistisch signifikante Ergebnisse: ** p<0,01.	62

Abbildung 16: Relativer Anteil (%) der NK-Zellpopulationen im venösen Vollblut von Gesundspendern (n=16), Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=5), Grad 2 Astrozytompatienten (n=8), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=13) und Grad 3 Astrozytompatienten (n=15). **(A)** CD3-/CD56+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(B)** CD56^{bright} NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test, Gesundspender n=23, Oligodendrogliom Grad 2 n=3, Astrozytom Grad 2 n=7, Oligodendrogliom Grad 3 n=13, Astrozytom Grad 3 n=15), **(C)** CD56+/CD69+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(D)** CD56+/CD94+ NK-Zellen (One-way ANOVA), **(E)** NKG2D+/CD3- NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(F)** NKp30+/CD3- NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test) und **(G)** NKp46+/CD3- NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test). Statistisch signifikante Unterschiede: * p<0,05, ** p<0,01. (Lennartz et al., 2023)..... 65

Abbildung 17: Korrelation der Hsp70 Plasmaspiegel und der relativen Frequenz (%) der CD3+/CD4+ T-Helferzellen in Gesundspendern (n=16), Grad 2 Gliompatienten (Hsp70^{low} n=5, Hsp70^{high} n=4) und Grad 3 Gliompatienten (Hsp70^{low} n=11, Hsp70^{high} n=11). Statistisch signifikante Ergebnisse: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001. Die Gruppen wurden mit einem One-way ANOVA verglichen. 70

Abbildung 18: Korrelation der Hsp70 Plasmaspiegel und der relativen Frequenz (%) der CD3+/CD4+ T-Helferzellen in Gesundspendern (n=16), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (Hsp70^{low} n=5, Hsp70^{high} n=4) und Grad 3 Astrozytompatienten (Hsp70^{low} n=7, Hsp70^{high} n=6). Die Gruppen wurden mit einem One-way ANOVA verglichen. 71

Abbildung 19: Korrelation der Hsp70 Plasmaspiegel und der relativen Frequenz (%) der untersuchten NK-Zellpopulationen in Gesundspendern (n=16), Grad 2 Gliompatienten (Hsp70^{low} n=5, Hsp70^{high} n=4) und Grad 3 Gliompatienten (Hsp70^{low} n=11, Hsp70^{high} n=11). **(A)** CD3-/CD56+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(B)** CD56^{bright} NK-Zellen (Gesundspender n=23, Kruskal-Wallis Test), **(C)** CD56+/CD69+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(D)** CD56+/CD94+ NK-Zellen (One-way ANOVA), **(E)** NKG2D+/CD3- NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(F)** NKp30+/CD3- NK-Zellen (One-way ANOVA) und **(G)** NKp46+/CD3- NK-Zellen (One-way ANOVA). Statistisch signifikante Ergebnisse: * p<0,05, ** p<0,01. (Lennartz et al., 2023)..... 74

Abbildung 20: Korrelation der Hsp70 Plasmaspiegel und der relativen Frequenz (%) der untersuchten NK-Zellpopulationen in Gesundspendern (n=16), Grad 3 Oligodendrogliompatienten (Hsp70^{low} n=5, Hsp70^{high} n=4) und Grad 3 Astrozytompatienten (Hsp70^{low} n=7, Hsp70^{high} n=6). **(A)** CD3-/CD56+ NK-Zellen

(One-way ANOVA), **(B)** CD56^{bright} NK-Zellen (Gesundspender n=23, Kruskal-Wallis Test), **(C)** CD56+/CD69+ NK-Zellen (Kruskal-Wallis Test), **(D)** CD56+/CD94+ NK-Zellen (One-way ANOVA), **(E)** NKG2D+/CD3- NK-Zellen (One-way ANOVA), **(F)** NKp30+/CD3- NK-Zellen (One-way ANOVA) und **(G)** NKp46+/CD3- NK-Zellen (One-way ANOVA). Statistisch signifikante Ergebnisse: * p<0,05, ** p<0,01. (Lennartz et al., 2023)..... 76

Abbildung 21: Kaplan-Meier Kurven des Gesamtüberlebens von Grad 3 Gliompatienten mit niedrigen (n=14) und hohen (n=14) NK-Zellfrequenzen bestimmter NK-Zellsubpopulationen. **(A)** CD3-/CD56+ NK-Zellen (Log-Rank Test) und **(B)** CD56+/CD94+ NK-Zellen (Log-Rank Test). (Lennartz et al., 2023) 80

Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Hsp70 (ng/ml) Konzentration im peripheren Plasma von Gliompatienten. **(A)** Grad 2 Oligodendrogliompatienten (n=2), **(B)** Grad 2 Astrozytompatienten (n=2), **(C)** Grad 3 Oligodendrogliompatienten (n=3) und **(D)** Grad 3 Astrozytompatienten (n=4)..... 82

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Patienteneigenschaften und angewandte Therapieregime. Verwendete Abkürzungen: RT, Radiotherapie (50,4 bis 54Gy, 1,8 Gy pro Tag 5x wöchentlich); PCV, Procarbazin, CCNU, Vincristin; TMZ, Temozolomid. *PCV gegebenenfalls ohne Vincristin, durch Toxizität bei entsprechendem Risikoprofil, **Günstige Faktoren: Alter <40 Jahre, keine Mittellinienüberschreitung, Tumor <6 cm, kein postoperativer Tumorstillstand oder Tumorstillstand, keine neurologischen Defizite. Details zu den Therapieregimen können Abschnitt 3.6 Therapie nach dem Behandlungskonzept des Klinikums rechts der Isar entnommen werden. (Lennartz et al., 2023).....	20
Tabelle 2: Reagenzien des Hsp70-exo ELISA.	24
Tabelle 3: Monoklonale Antikörper des Hsp70-exo ELISA.....	25
Tabelle 4: Monoklonale Antikörper des R&D Systems DuoSet® ELISA. (Lobinger et al., 2021).....	26
Tabelle 5: Reagenzien der durchflusszytometrischen Exosomencharakterisierung.	27
Tabelle 6: Monoklonale Antikörper der durchflusszytometrischen Exosomencharakterisierung.	28
Tabelle 7: Reagenzien der immunhistochemischen Hsp70 Färbung. (Lobinger et al., 2021)	29
Tabelle 8: Antikörper der immunhistochemischen Hsp70 Färbung. (Lobinger et al., 2021)	29
Tabelle 9: Reagenzien der durchflusszytometrischen Untersuchung des membrangebundenen Hsp70 von Tumorzellen.	31
Tabelle 10: Monoklonale Antikörper der durchflusszytometrischen Untersuchung des membrangebundenen Hsp70 von Tumorzellen.	31
Tabelle 11: Reagenzien der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung.	33
Tabelle 12: Fluoreszenzantikörper der durchflusszytometrischen Immunphänotypisierung.	35
Tabelle 13: Pipettierschema der Antikörper der Durchflusszytometrie. *Die Hinzugabe dieser Antikörper erfolgte erst nach Permeabilisierung der Zellen (siehe Abschnitt 4.10).....	36
Tabelle 14: Zusammenfassung der statistisch signifikanten Ergebnisse.	42

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an all jene ausdrücken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Zuerst möchte ich Prof. Dr. Gabriele Multhoff für die Möglichkeit und das Vertrauen an diesem vielseitigen Thema zu arbeiten, danken. Ihre Ratschläge waren von unschätzbarem Wert und ich bin dankbar für die fortwährende Unterstützung, die Sie mir entgegengebracht haben.

Besonderer Dank gebührt Dr. Ali Bashiri, der durch seine enorme fachliche Kompetenz vor allem mit den methodischen Aspekten dieser Arbeit unersetzliche Hilfe leistete.

Abschließend möchte ich mich bei allen teilnehmenden Patienten bedanken, die diese Arbeit durch ihre Teilnahme trotz schwerer Diagnose ermöglicht haben.

11. Appendix

11.1 Patienteninformation und Einwilligungserklärung



Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie
und Strahlentherapie
der Technischen Universität München



Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie
Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München

Briefanschrift Ismaninger Straße 22
81675 München
Direktion: +49 89 4140-4501 oder -4502
Telefax +49 89 4140-4882
Internet: www.radonc.med.tu-muenchen.de

– Patienteninformation –

Gewinnung von Tumormaterial und Blut für die Erforschung der HSP70-Expression als Tumormarker

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bitte lesen Sie diese Information über die geplanten Untersuchungen im Rahmen des oben genannten Vorhabens sorgfältig durch. Für weitere Fragen stehen Ihnen die Prüfarzte gerne zur Verfügung.

Wir bitten Sie, an diesem Vorhaben teilzunehmen. Sie selbst haben davon keinen unmittelbaren Nutzen, helfen aber möglicherweise mit, ein Verfahren zu entwickeln, auf dessen Grundlage kranken Patienten eine innovative Therapieoption angeboten werden könnte.

Ziel der Studie

Ziel dieser Studie ist es, frisches Tumormaterial von Patienten auf das Vorhandensein von Hitze-Schock-Protein 70 (HSP70) zu untersuchen. Das Blut des Tumorpatienten wird funktionell und phänotypisch charakterisiert.

Einleitung

Es hat sich gezeigt, dass Tumorzelllinien häufig das HSP70 auf ihrer Zellmembran präsentieren. In der vorliegenden Studie soll überprüft werden, ob HSP70 auch auf soliden Tumoren oder auf Tumorzellen, die aus dem Blut oder Bronchiallavage gewonnen werden, von Patienten präsentiert wird.

Natürliche Killerzellen stellen eine Untergruppe der weißen Blutkörperchen dar und leisten einen wichtigen Beitrag in der körpereigenen Immunabwehr gegen Tumorerkrankungen. Die natürliche Funktion dieser Zellen ist leider nicht immer ausreichend, um die Ausbreitung einer Tumorerkrankung zu verhindern. Deshalb soll die Funktionalität Ihrer Immunabwehrzellen in einem etablierten Laborverfahren untersucht werden.

Ablauf der Studie

Es können entweder eine, zwei oder alle drei Maßnahmen durchgeführt werden. Die bei Ihnen vorgesehenen Maßnahmen werden im Folgenden von Ihrem Prüfarzt markiert:

1. Blutuntersuchungen: Wir benötigen von Ihnen 3 x 10 ml Ihres Blutes (entspricht der Menge von 6 Esslöffeln). Die Blutentnahme wird im Rahmen der allgemein notwendigen Therapievorbereitung und im Verlauf der Therapie erfolgen. Allgemein kann es bei der Blutentnahme (z.B. Armvenenblut) zu Schmerzen an der Einstichstelle, Entzündungen und Nachblutungen kommen. Manche Patienten können mit Übelkeit oder Schwindel auf eine Blutentnahme reagieren.
2. Tumoruntersuchung: Bei dem klinisch notwendigen diagnostischen Eingriff (Zangenbiopsie aus der Raumforderung in der Lunge oder den Atemwegen) wird eine Tumorseite von maximal 0,5 cm³ (etwa stecknadelkopf- bis erbsengroß) entnommen. Dies beeinträchtigt in keinem Fall die weitere Diagnostik oder Therapie. Das stecknadelkopf- bis erbsengroße Tumormaterial wird in unserem Labor (Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie auf das Vorhandensein von HSP70 untersucht. Völlig unabhängig davon wird das übrige entnommene Tumormaterial durch einen Pathologen (Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologie Anatomie am Klinikum rechts der Isar der TU München) im Rahmen der Routinediagnostik feingeweblich untersucht.
3. Bronchiallavage: Als Bronchiallavage bezeichnet man Spülung der Atemwege (Bronchien) mit einer sterilen Kochsalzlösung (ca. 20ml, die Menge von 4 Esslöffeln). Die Flüssigkeit wird im Rahmen des klinisch notwendigen diagnostischen Eingriffs nur kurz in die Atemwege gegeben und danach sofort wieder abgesaugt. Dies wird im Rahmen des klinisch notwendigen Eingriffs durchgeführt, eine zusätzliche Untersuchung ist hierzu nicht notwendig. Die Flüssigkeit wird dann in unserem Labor auf das Vorhandensein von Hsp70 untersucht.

Bei Ihnen sind folgende Maßnahmen vorgesehen:

- ☐ Blutuntersuchung
- ☐ Tumoruntersuchung durch Zangenbiopsie
- ☐ Bronchiallavage

Abschließende Hinweise:

Um an dieser Studie teilzunehmen, ist Ihre Zustimmung notwendig. Stimmen Sie jedoch einer Teilnahme an dieser Studie nicht zu, wird Ihnen daraus in keiner Weise ein Nachteil entstehen. Auch zu einem späteren Zeitpunkt können Sie die Teilnahme jederzeit beenden.

Weitere ergänzend besprochene Punkte:

Vertraulichkeit der Daten und Einblicknahme in die Krankenakte

Im Rahmen dieser Studie werden personenbezogene Daten erhoben, gespeichert und ausgewertet. Die Verwendung der Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen.

Nur wenn Sie die beiliegende Datenschutzerklärung unterschreiben, können sie an der Studie teilnehmen.

Weitere ergänzend besprochene Punkte:



Klinik und Poliklinik für RadioOnkologie und Strahlentherapie
Klinikum rechts der Isar, Ismaninger Straße 22, 81675 München

Briefanschrift Ismaninger Straße 22
81675 München
Direktion: +49 89 4140-4501 oder -4502
Telefax: +49 89 4140-4882
Internet: www.radonc.med.tu-muenchen.de

– **Datenschutzerklärung und Patienteneinwilligungserklärung** –

Gewinnung von Tumormaterial und Blut für die Erforschung der HSP70-Expression als Tumormarker

Hiermit erkläre ich, _____

dass ich durch Frau/Herrn _____

über das Ziel, das Wesen, die Bedeutung und die Tragweite des oben erwähnten Studienvorhabens aufgeklärt wurde.

Mein Arzt hat mich über die mit der Teilnahme an der Studie verbundenen Risiken informiert.

Informationen und Einwilligungserklärung zum Datenschutz:

Mir ist bekannt, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde, über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Angaben über meine Gesundheit erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, in Papierform und auf elektronischen Datenträgern aufgezeichnet werden und namentlich (nicht anonymisiert) unabhängig von der Studie zurück an den betreuenden Arzt gehen.
Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten anonymisiert (ohne Namensnennung) weitergegeben werden.
2. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der Studie beenden kann. Im Fall eines solchen Widerrufs meiner Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten ohne Namensnennung weiterhin verwendet werden dürfen.
3. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden. Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche oder satzungsmäßige Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.

Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit meine Einwilligung zur Studienteilnahme ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile erwachsen.

Die oben genannten Punkte habe ich verstanden, alle von mir gestellten Fragen wurden mir beantwortet. Ich hatte Gelegenheit und ausreichend Zeit, mich für die Teilnahme an der Studie zu entscheiden. Dabei wurde ich nicht von meinem behandelnden Arzt oder einem anderen Klinikangehörigen beeinflusst.

Ich bin bereit, an der oben dargestellten HSP70-Screening-Studie teilzunehmen und willige in die Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten unter Wahrung des Datenschutzes ein.

Eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung wurde mir ausgehändigt.

Name der Patientin / des Patienten in Blockschrift ; Geburtsdatum

Ort, Datum

Unterschrift der Patientin/des Patienten

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes

11.2 Publikation

“Biomarkers in Adult-Type Diffuse Gliomas: Elevated Levels of Circulating Vesicular Heat Shock Protein 70 Serve as a Biomarker in Grade 4 Glioblastoma and Increase NK Cell Frequencies in Grade 3 Glioma”

Lennartz, P., Thölke, D., Bashiri Dezfouli, A., Pilz, M., Lobinger, D., Messner, V., Zanth, H., Ainslie, K., Kafshagari, M., Rammes, G., Ballmann, M., Schlegel, M., Foulds, G., Pockley, A., Schmidt-Graf, F. & Multhoff, G. (2023).

Biomedicines, 11(12), 3235.