

Aus dem Zentrum für Neurochirurgie der Universität zu Köln
Klinik für Allgemeine Neurochirurgie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Goldbrunner

Death receptor 6 als prognostischer Marker in niedriggradigen Gliomen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sarah Katharina Stegmann
aus Köln

promoviert am 07. Februar 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Herr Dr. med. Marco Timmer, Herr Prof. Dr. med. Roland Goldbrunner, Herr Dr. med. Lukas Görtz und Frau Dang Thuy-Diem Dinh haben das Manuskript kommentiert.
Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. med. Roland Goldbrunner als Doktorvater und Herrn Dr. med. Marco Timmer als Laborleiter betreut.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 26.10.2022

Unterschrift: .....

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Personen, die mich während der Promotion unterstützt haben. Einen besonderen Dank möchte ich Saskia Kuhl für die Zusammenarbeit aussprechen. Meinen Freunden danke ich für die Begleitung meiner Promotion. Mein Dank gilt zudem meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Roland Goldbrunner und Herrn Dr. med. Marco Timmer für die Betreuung der Doktorarbeit.

Für
Meine Eltern
Meine Schwester
Meinen Freund

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	11
2.1. Gliome	11
2.1.1. Molekulares Verständnis und Klassifikation	12
2.1.2. Therapie	15
2.1.3. Prognose	16
2.2. Tumornekrosefaktor-Superfamilie	17
2.2.1. Tumornekrosefaktoren und ihre Rolle in Tumoren	18
2.2.2. Death receptor 6	19
2.3. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	21
3. PUBLIKATION: DEATH RECEPTOR 6 AS A PROGNOSTIC MARKER IN LOW-GRADE GLIOMA	22
4. DISKUSSION	32
4.1. Expression von DR6 in niedriggradigen Gliomen	32
4.2. DR6 als Prognosefaktor in Gliomen	32
4.3. Andere Anwendungsbereiche für DR6 in Gliomen	34
4.4. Limitationen der Arbeit	35
5. LITERATURVERZEICHNIS	36
6. ANHANG	49
6.1. Abbildungsverzeichnis	49
6.2. Tabellenverzeichnis	49

Abkürzungsverzeichnis

+7/-10	Chromosom 7 Zugewinn und Chromosom 10 Verlust
1p/19q Kodeletion	Kodeletion des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19
5-ALA	5-Aminolävulinsäure
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor-1
APP	Amyloid-Vorläuferprotein (engl. amyloid precursor protein)
ATRX	ATRX Chromatin Remodeler
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-x _L	B-cell lymphoma-extra large
Bid	BH3-interacting domain death agonist
CDKN2A	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A
CGGA	Chinesischer Gliom-Genomatlas (engl. Chinese Glioma Genome Atlas)
CIC	Capicua Transcriptional Repressor
DR	Todesrezeptor (engl. death receptor)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular-signal regulated kinases
FADD	Fas-associated protein with death domain
FLAIR	Fluid Attenuated Inversion Recovery
FUBP1	Far Upstream Element Binding Protein 1
IDH	Isocitrate Dehydrogenase
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KPS	Karnofsky-Index (engl. Karnofsky Performance Status)
LGG	niedriggradiges Gliom (engl. low grade glioma)
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MGMT	O-6-Methylguanin-DNA Methyltransferase
MMP-14	Matrixmetalloproteinase-14
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NEC	nicht anderweitig klassifiziert (engl. not elsewhere classified)
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NOS	nicht anders spezifiziert (engl. not otherwise specified)
OS	Gesamtüberleben (engl. overall survival)
PCV	Procarbazin, Lomustin und Vincristin
PD-1	Programmed cell death protein 1
PFS	progressionsfreies Überleben (engl. progression free survival)
PSAP	Proapoptotic mitochondrial carrier homolog protein
RAIDD	RIP-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain
RIP1	Receptor-interacting protein 1
TCGA	der Krebs-Genomatlas (engl. The Cancer Genome Atlas)
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TNFSF	Tumornekrosefaktor-Superfamilie
TOR1A	Torsin Family 1 Member A
TP53	Tumor Protein P53
TRADD	TNF receptor-associated protein with death domain
TRAILR	TNF-related apoptosis inducing ligand receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organization)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Diffuse WHO Grad 2 Gliome weisen im Vergleich zu anderen Gliomentitäten wie dem Glioblastom eine gute Prognose auf, jedoch ist das Gesamtüberleben auch unter Berücksichtigung des häufig jungen Erkrankungsalters weiterhin gering.¹⁻³ In den letzten Jahren konnte ein besseres molekulares Verständnis der Tumore sowohl die Diagnostik der einzelnen Entitäten verbessern, als auch die Einschätzung ihrer Prognose präzisieren, wodurch sich ihre Therapie effektiver gestalten lässt.^{1,4,5} Somit ist die tumorbiologische Untersuchung von Gliomen zur genaueren Beurteilung der Krankheit und ihrer Prognose wichtig.

Mitglieder der Tumornekrosefaktor-Superfamilie weisen eine erhöhte Expression in Gliomen auf und wurden als mögliche Prognosefaktoren in den Tumoren identifiziert.⁶⁻¹¹ DR6, ein Todesrezeptor aus der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie, kann Apoptose in Tumoren auslösen, spielt jedoch auch eine prokarzinogene Rolle.¹²⁻¹⁶ Der Rezeptor wurde bereits in anderen Tumorarten als Prognosefaktor bestimmt und ist in manchen Gliomentitäten hochreguliert.¹⁷⁻¹⁹ In dieser Arbeit wurde die Expression des Rezeptors mittels PCR und Western Blot in WHO Grad 2 Gliomen untersucht sowie sein prognostischer Wert anhand des Krebs-Genomatlas (engl. The Cancer Genome Atlas, [TCGA]) und erhobenen Patientendaten analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass DR6 in niedriggradigen Gliomen im Vergleich zu Kontrollgewebe hochreguliert ist. In rezidivierenden niedriggradigen Gliomen war die Expression des Rezeptors höher als in primären WHO Grad 2 Gliomen. Auch in Proben vom gleichen Patienten wurde der Rezeptor im Rezidiv stärker exprimiert als im Primärtumor. In Bezug auf molekulare und histologische Charakteristika wurde DR6 in Astrozytomen und IDH1-mutierten Tumoren am höchsten exprimiert.

Eine Analyse des TCGA zeigte ein längeres progressionsfreies Überleben (engl. progression free survival, [PFS]) und Gesamtüberleben (engl. overall survival, [OS]) für Tumore mit hoher DR6 Expression. Ein ähnlicher Trend ließ sich in unserer Patientenkohorte im PFS wiederfinden. Eine detaillierte Analyse der Gruppen und eine getrennte Betrachtung von primären und rezidivierenden Tumoren zeigte jedoch, dass eine erhöhte Expression von DR6 vor allem in erstmalig erkrankten WHO Grad 2 Gliompatienten mit einem längeren PFS assoziiert ist. In der Rezidiv-Kohorte hingegen war eine vermehrte Expression des Rezeptors mit einem kürzeren OS verbunden.

Die Hochregulation von DR6 in niedriggradigen Gliomen stimmt mit vorherigen Daten überein, die eine verstärkte Expression des Rezeptors in einigen Gliomentitäten nachweisen.¹⁷ Weitere Arbeiten sind jedoch notwendig, um die ambivalente prognostische Rolle von DR6 in primären und rezidivierenden Tumoren aufzuklären. Auch in anderen Tumorzelllinien zeigen sich

Unterschiede in der antitumoralen Wirkung des Rezeptors, welche möglicherweise vom Expressionslevel des Rezeptors abhängen.^{12,13} Jedoch sind insbesondere in Gliomen die Signalwege von DR6 noch ungewiss und eine genauere Analyse ist notwendig, um die Funktion des Rezeptors besser zu verstehen.^{13,20–22}

2. Einleitung

Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) weisen insgesamt eine Inzidenz von etwa 25/100.000 Personen bei einer jährlichen Mortalität von circa 4/100.000 auf.³ Das zumeist benigne Meningeom, ein Tumor der Hirnhäute, ist die häufigste Tumorentität. Gliome machen etwa 24% aller ZNS-Tumore aus.³

2.1. Gliome

In Deutschland waren Gliome im Jahr 2018 mit 88,7% (Frauen) bzw. 89,3% (Männer) die häufigsten malignen Tumore des ZNS²³ und treten mit einer Inzidenz von etwa 6/100.000 Personen auf.^{1,5,23}

Die mit Abstand größte Untergruppe der Tumore bilden die diffusen Gliome,³ welche sich durch ein entsprechendes Wachstumsverhalten auszeichnen.¹ Obwohl einige Entitäten der diffusen Gliome primär im Kindesalter auftreten, liegt das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung bei 63 Jahren.^{1,3}

Typische Erstsymptome eines Glioms sind eine neu aufgetretene fokale oder generalisierte Epilepsie, neurologische Defizite und Zeichen eines erhöhten Hirndrucks wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen oder Bewusstseinsveränderungen.^{4,5,24}

Bei Verdachtssymptomen ist zur Diagnostik in erster Linie eine Magnetresonanztomographie (MRT) in T1-Wichtung ohne und mit Kontrastmittel sowie T2- Fluid Attenuated Inversion Recovery (FLAIR) indiziert.^{4,5} Daneben werden der Karnofsky-Index (Karnofsky Performance Status [KPS]) und eine klinische Untersuchung zur Einschätzung des Allgemeinzustandes und Operabilität des Patienten erhoben.^{4,5} Neurokognitive Tests wie der Mini-Mental-Status-Test oder der Montreal Cognitive Assessment-Test dienen zur genauen Beurteilung der bereits entstandenen tumorbedingten Beeinträchtigungen.^{4,5,25,26} Eine Lumbalpunktion kann dabei helfen Differenzialdiagnosen auszuschließen, sofern der Patient sich nicht mit Zeichen eines erhöhten Hirndrucks präsentiert.⁴

Eine routinemäßige Vorsorgeuntersuchung zur Erkennung von Gliomen erfolgt nicht, auch weil einfache diagnostische Untersuchungen bspw. des Blutes oder Liquors zur Detektion der Krankheit fehlen.^{4,5} Leidglich beim Li Fraumeni- und Turcot-Syndrom sowie der Neurofibromatose Typ I und II, bei denen Gliome mit einer erhöhten Inzidenz auftreten, wird ein bildgebendes Screening zum Nachweis der Krankheit durchgeführt.^{4,5}

Grundsätzlich wird angestrebt, eine histologische Diagnose des Tumors zu sichern. Ist eine Operation aufgrund der Tumorlokalisierung oder Komorbiditäten kontraindiziert, kann eine stereotaktische Biopsie des Tumors zur Diagnosesicherung erfolgen.^{4,5}

2.1.1. Molekulares Verständnis und Klassifikation

Gliome werden durch die „WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System“ der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization [WHO]) klassifiziert.¹ Die zuvor hauptsächlich auf morphologischen Kriterien beruhende Einteilung der diffusen Gliome wurde 2016 und 2021 grundlegend überarbeitet, da sich gezeigt hatte, dass molekulare Charakteristika der Tumore eine erhebliche Rolle bezogen auf ihre klinischen Eigenschaften, Therapieoptionen und Prognose spielen und die alleinige Berufung auf histologische Merkmale der Komplexität der Erkrankungen nicht gerecht wird.^{1,27,28} Daher werden die einzelnen Entitäten diffuser Gliome nun vor allem anhand molekularer Marker kategorisiert und eine Unterteilung in Malignitätsgrade erfolgt innerhalb der jeweiligen Tumorgruppe.¹

Diffuse Gliome werden anhand des Erkrankungsalters in drei Gruppen eingeteilt, da sich zwischen pädiatrischen und adulten Entitäten deutliche klinische und molekulare Unterschiede zeigen.¹

Diffuse Gliome vom adulten Typ stellen die größte Gruppe der Gliome dar und werden neben histologischen Kriterien anhand folgender genetischer Veränderung klassifiziert: Mutation der Isocitrate Dehydrogenase 1 (IDH1) oder IDH2, Kodeletion des kurzen Arms von Chromosom 1 und des langen Arms von Chromosom 19 (1p/19q Kodeletion), Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Promotor Mutation, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Amplifikation, Chromosom 7 Zugewinn und Chromosom 10 Verlust (+7/-10).^{1,3}

IDH-Mutationen

Mutationen der Isocitrat-Dehydrogenase wurden in diffusen Gliomen bei IDH1 an Codon 132, bei IDH2 an Position 172 nachgewiesen und führen zu einem Aminosäureaustausch.^{1,29,30} IDH1 R132H ist mit 83-91% der IDH1-Mutationen die häufigste nachgewiesene Mutation.^{1,29-}

31

Physiologisch sind Isocitrat-Dehydrogenasen innerhalb des Citratzyklus an der Umwandlung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat unter gleichzeitiger Produktion von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) beteiligt.³² Durch die Missense-Mutationen kommt es stattdessen zu einer Umwandlung und Überproduktion von α -Ketoglutarat zu R(-)-2-Hydroxyglutarat.³³ R(-)-2-Hydroxyglutarat nimmt unter anderem Einfluss auf die Epigenetik der Tumorzellen, indem es die Histon-Demethylierung hemmt und eine Hypermethylierung der DNA induziert.³⁴⁻³⁷ Als frühe „gain-of-function“ (engl. für Funktionsgewinn) Mutation innerhalb der Entwicklung von diffusen Gliomen fördern diese Veränderungen beispielsweise durch eine gestörte Differenzierung der Zellen und einer Hochregulation von Onkogenen die weitere Genese des Tumors.^{33,34,37,38}

IDH-Mutationen sind mit einem längeren Überleben vergesellschaftet und eine Einteilung anhand des Mutationsstatus erlaubt eine genauere Einschätzung der Prognose als die

bisherige Kategorisierung mittels histologischer Kriterien.^{2,39-41} Gliome, in denen diese Mutationen auftreten, ähneln sich zudem in klinischen Eigenschaften wie einem frühen Erkrankungsalter und einer überwiegenden Lokalisation im Frontalhirn^{39,41-43} und stammen möglicherweise von der gleichen Ursprungszelle ab.⁴⁴

Die Mutationen konnten als Charakteristikum von Astrozytomen und Oligodendrogliomen identifiziert werden und entsprechen in diesen Entitäten nun einem Diagnosekriterium.^{1,30}

In der Gruppe „Astrozytome, IDH-mutiert“ – Astrozyten-ähnlichen Tumoren - treten neben den IDH-Mutationen häufig Mutationen des Tumorsuppressors Tumor Protein p53 (TP53) sowie ein Verlust des Transkriptionsregulators ATRX Chromatin Remodeler (ATRX) auf, welcher unter anderem zu einer alternativen Verlängerung der Telomere führt.^{1,41,45} Astrozytome werden weiter in WHO Grad 2-4 unterteilt, wobei die Tumore im klinischen Verlauf in höhere Malignitätsgrade übergehen können.¹ Astrozytom Grad 4 Tumore entsprechen den früheren sekundären Glioblastomen.¹ Zur Differenzierung der Malignitätsgrade werden neben histologischen Kriterien auch homozygote Deletionen von Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A) und CDKN2B mitbeurteilt, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind und deshalb ein Charakteristikum von Grad 4 Tumoren darstellen.¹

Die Gruppe „Astrozytome, IDH-Wildtyp“, die durch ein Fehlen von IDH-Mutationen bei gleichzeitig typischer astrozytärer Histologie gekennzeichnet war und bei welcher häufig Mutationen nachgewiesen werden konnten, die sich sonst in IDH-Wildtyp Glioblastomen – WHO Grad 4 - wiederfinden, wurde in der aktuellen Ausgabe der WHO Klassifikation gestrichen.^{1,2,41}

1p/19q Kodeletion

Oligodendrogliome – Oligodendrozyten-ähnliche Tumore - sind neben einer IDH-Mutation durch eine 1p/19q Kodeletion charakterisiert.^{1,38,41}

Diese Kodeletion geht häufig mit einer Mutation des Capicua Transcriptional Repressor (CIC) Gens und seltener mit Mutationen des Far Upstream Element Binding Protein 1 (FUBP1) einher.^{2,46} CIC fungiert als Repressor des Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK)-Signalwegs - eine Mutation von CIC führt in Oligodendrogliomen zu einer Dysregulation des Signalwegs und unterstützt damit das Mitogen-unabhängige Tumorwachstum.⁴⁷ Zudem tritt in den Tumoren häufig eine TERT Mutation auf.^{41,48} Die Tumorentität kann in WHO Grad 2 und 3 unterteilt werden, wobei auch im Falle von Oligodendrogliomen WHO Grad 2 Tumore in WHO Grad 3 übergehen können.¹ Die Tumore sind mit einem vergleichsweise guten Therapieansprechen und einer guten Prognose assoziiert.^{49,50}

Tumore, die histologisch Oligodendrogliomen ähneln oder aber Ähnlichkeiten mit Oligodendrogliomen und Astrozytomen teilen, die aber nicht die molekularen Eigenschaften dieser Entitäten erfüllen, werden als „Oligodendrogliome not otherwise specified (NOS)“ (engl.

für nicht anders spezifiziert) bzw. „Oligoastrozytome NOS“ oder „Oligoastrozytome not elsewhere classified (NEC)“ (engl. für nicht anderweitig klassifiziert) bezeichnet, was die fehlende Diagnostik bzw. Verständnis dieser Tumore verdeutlicht.¹

IDH-Wildtyp Glioblastome

IDH-Wildtyp Glioblastome – ehemals primäre Glioblastome - stellen als Grad 4 Tumore die aggressivste Form der diffusen Gliome dar und sind mit etwa 45-50% die häufigste auftretende Gliomentität.¹ Sie sind mit einem Überleben von wenigen Monaten assoziiert und weisen damit die schlechteste Prognose auf.^{2,30,51} Neben der Abwesenheit von IDH und Histon H3 Mutationen dienen folgende Kriterien zur Diagnose des IDH-Wildtyp Glioblastoms: mikrovaskuläre Proliferation und/oder Nekrose, TERT Promoter Mutation, EGFR Amplifikation sowie +7/-10 Chromosomenveränderungen.¹ Bei Vorliegen einer der zuletzt genannten genetischen Veränderungen kann ein Glioblastom klassifiziert werden, auch wenn die histologischen Kriterien nicht erfüllt sind.¹ Glioblastome treten vor allem im höheren Alter auf, das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt 65 Jahre.³

Neben der Gruppe der diffusen Gliome vom adulten Typ existieren noch zwei andere Gruppen der diffusen Gliome (siehe Tabelle 1). Die weitere Arbeit bezieht sich auf die im Erwachsenenalter auftretenden diffusen Gliome.

Einteilung der diffusen Gliome

Diffuse Gliome vom adulten Typ
Astrozytom, IDH-mutiert
Oligodendrogliome, IDH-mutiert und 1p/19q kodeletiert
Glioblastom, IDH-Wildtyp
diffuse niedriggradige Gliome vom pädiatrischen Typ
Diffuses Astrozytom, MYB- oder MYBL1-alteriert
Angiozentrisches Gliom
Polymorpher niedriggradiger neuroepithelialer Tumor des Jugendalters
Diffuses, niedriggradiges Gliome, MAPK Signalweg alteriert
Diffuse hochgradige Gliome vom pädiatrischen Typ
Diffuses Mittelliniengliom, H3-K27-alteriert
Diffuses hemisphärisches Gliom, H3-G34-mutiert
Diffuses hochgradiges Gliom vom pädiatrischen Typ, IDH- und H3-Wildtyp
Hemisphärisches Gliom vom infantilen Typ

Tabelle 1. WHO Klassifikation der diffusen Gliome 2021^{1,52}

2.1.2. Therapie

Die Therapie von diffusen Gliomen vom adulten Typ besteht aktuell aus drei Säulen: Operation, Radiotherapie und Chemotherapie.^{4,5}

Präoperativ wird häufig eine antiödematöse Therapie mit Kortikosteroiden sowie eine antikonvulsive Behandlung bei Auftreten von Krampfanfällen durchgeführt.^{4,5} Eine offene Resektion erfolgt neben der Diagnosesicherung auch in therapeutischer Absicht, wobei diffuse Gliome vom adulten Typ durch eine Operation alleine nicht kurativ behandelt werden können.^{4,5} Dies liegt am infiltrativen Wachstum des Tumors in das umliegende Gewebe, was eine vollständige Resektion unmöglich macht.^{53,54} Daher sollte eine chirurgische Intervention immer unter größtmöglicher Erhaltung neurologischer Funktionen durchgeführt werden.^{4,5,55} Um trotzdem eine möglichst vollständige Resektion des Tumors zu gewährleisten, können bspw. bildgebende Verfahren wie die intraoperative Kernspintomographie oder der Einsatz von 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) - ein Protein der Porphyrinsynthese, welches zur Fluoreszenzfärbung des Tumors führt - herangezogen werden.⁵⁶⁻⁵⁸

Das Ausmaß der adjuvanten Therapie richtet sich nach der jeweiligen Tumorentität bzw. dem Malignitätsgrad sowie patientenbezogenen Faktoren.^{4,5}

Bei WHO Grad 2 Astrozytomen und Oligodendrogliomen kann eine „watch-and-wait“ (engl. für Beobachten und Abwarten) Strategie nach der Operation indiziert sein. Dies ist vor allem bei jüngeren, unter epileptischer Therapie asymptomatischen Patienten mit vollständiger Resektion der Fall, aber auch abhängig von der jeweiligen Tumorentität.^{4,5} Ansonsten führt eine Strahlentherapie mit anschließender Procarbazin, Lomustin, und Vincristin (PCV) Polychemotherapie zu einem deutlich verlängerten Gesamtüberleben.⁵⁹ Da es bei WHO Grad 2 Tumoren zu einem vergleichsweise langen postinterventionellen Überleben kommt, ist eine Schonung des gesunden Gewebes während der Strahlentherapie entscheidend, um die Lebensqualität des Patienten zu erhalten.⁴

WHO Grad 3 Astrozytome sollten mittels Radiotherapie und anschließender Temozolomid-Chemotherapie behandelt werden, da sich ein gutes Ansprechen auf das Chemotherapeutikum in den IDH-mutierten Tumoren gezeigt hat.⁶⁰ Bei Oligodendrogliomen hingegen ist neben der Bestrahlung eine PCV-Chemotherapie indiziert.^{4,61,62}

Für WHO Grad 4 Astrozytome gibt es bisher keine klaren Therapieempfehlungen, da sie zuvor zu den Glioblastomen gezählt und entsprechend behandelt wurden.¹ Eine Therapie entweder in Anlehnung an WHO Grad 3 Astrozytome oder IDH-Wildtyp Glioblastome wird empfohlen.⁴ Zur Standardtherapie von IDH-Wildtyp Glioblastomen nach Operation gehört die Strahlentherapie, die das Überleben der Patienten ungefähr verdoppelt.^{4,5,63} Eine konkomitante Chemotherapie mit Temozolomid sowie eine Erhaltungstherapie ist zudem bei Patienten unter 70 Jahren und gutem Allgemeinzustand indiziert.^{4,5} Für Patienten über 70

Jahren bzw. mit Komorbiditäten, für die eine kombinierte Radiochemotherapie nicht in Frage kommt, soll zur Therapieentscheidung der O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) Methylierungsstatus herangezogen werden.^{4,5} MGMT revidiert physiologisch die Effekte von Alkylanzien wie Temozolomid und führt damit zu einem verminderten Ansprechen auf die Therapie.⁶⁴ Durch eine Methylierung des Gens kommt es zu dessen Inaktivierung und dadurch zu einer höheren Sensitivität gegenüber Alkylanzien und somit einem besseren Therapieerfolg durch Temozolomid.^{65,66} Patienten mit MGMT Methylierung sollten im Falle von Komorbiditäten mit dem Chemotherapeutikum therapiert werden, alle anderen mittels Strahlentherapie.^{4,5}

In vielen Ländern außerhalb der europäischen Union ist Bevacizumab, ein Vascular endothelial growth factor (VEGF) Inhibitor, als Therapie für rezidivierende Glioblastome zugelassen, obwohl bisher nur begrenzte Effekte für die Behandlung nachgewiesen werden konnten.^{4,5,67} Daneben gibt es zahlreiche Versuche neue Therapieansätze im Rahmen der Immuntherapie und personalisierten Medizin zu etablieren. Klinische Studien wurden unter anderem zu Tyrosinkinaseinhibitoren wie EGFR Inhibitoren, MAPK-Signalweg und mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-Signalweg Therapien, Immuncheckpoint-Inhibitoren und Impfungen durchgeführt.⁶⁸ Neben der Bluthirnschranke, welche die Anreicherung der Medikamente im Tumor erschwert und neue Therapiemöglichkeiten begrenzt, führt auch die intratumorale molekulare Heterogenität zu Schwierigkeiten, eine effektive personalisierte Therapie anzubieten.^{41,69,70} So hat sich in den letzten Jahren die Behandlung von diffusen Gliomen nicht wesentlich verbessern können.

2.1.3. Prognose

Die Prognose von Gliomen gerade in Bezug auf Glioblastome ist insgesamt immer noch schlecht.³ So beträgt das mediane Überleben der WHO Grad 4 Tumore 8 Monate.³ Zu den etablierten positiven Prognosefaktoren gehören ein junges Alter des Patienten und ein guter Allgemeinzustand, während eine unvollständige Resektion des Tumors mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist.⁴ Daneben ist die MGMT Promoter-Methylierung in Anbetracht der häufig verwendeten Alkylanzien in der Behandlung von diffusen Gliomen wichtig zur Einschätzung der Prognose.⁴

Brat et al.² zeigten, dass sich das Gesamtüberleben (engl. overall survival [OS]) der einzelnen Tumorentitäten durch eine Einteilung der Gliome anhand des IDH- und 1p/19q Kodeletionsstatus mit einem geringeren Vorhersagefehler prognostizieren lässt als anhand der Histologie der Tumore (siehe Abbildung 1). Während IDH-mutierte und 1p/19q kodeletierte Gliome (WHO Grad 2 und 3) ein medianes OS von 8 Jahren aufweisen, beträgt dieses bei IDH-mutierten und nicht 1p/19q kodeletierten Tumoren (WHO Grad 2 und 3) 6,3 Jahre.² Die zuvor bestehende Gruppe der IDH-Wildtyp WHO Grad 2 und 3 Gliome zeigt ein OS ähnlich dem von Glioblastomen und beträgt im Durchschnitt 1,7 Jahre.² Das mediane Überleben von

IDH-mutierten Grad 4 Gliomen ist beinahe doppelt so lang wie das von IDH-Wildtyp Glioblastomen (2,1 Jahre vs. 1,1 Jahre).²

Gerade in Bezug auf WHO Grad 2 Astrozytome und Oligodendrogliome, die zwar nur mit einer Inzidenz von etwa 0,2 bzw. 0,15/100.000 auftreten und damit vergleichsweise selten sind,³ jedoch häufig jüngere Patienten in der dritten und vierten Lebensdekade betreffen,^{2,39} hilft diese genauere Charakterisierung und Prognosebestimmung der Gliome dabei, die Tumore besser einzuschätzen und Therapieregime zu planen.^{4,5,49}

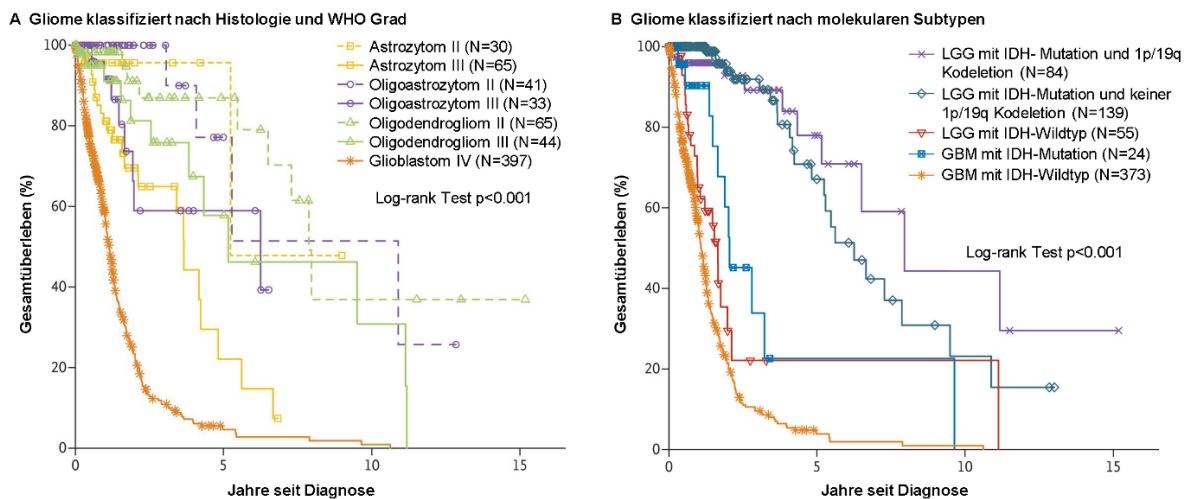


Abbildung 1. Gesamtüberleben von Gliompatienten abhängig von histologischen und molekularen Charakteristika. (A) zeigt das Gesamtüberleben von Patienten der WHO Klassifikation 2007 folgend. (B) gibt das Überleben der Patienten abhängig von ihrem IDH-Mutations- und 1p/19q Kodeletionsstatus an.

Niedriggradiges Gliom (engl. low grade glioma [LGG]), Glioblastom (GBM)

Reproduziert mit Erlaubnis von Brat et al.², Copyright Massachusetts Medical Society.

2.2. Tumornekrosefaktor-Superfamilie

Die Tumornekrosefaktor-Superfamilie (TNFSF) besteht aus insgesamt 19 Liganden und 29 Rezeptoren (Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie [TNFRSF])⁷¹. TNF(α) war dabei der erste Ligand, der entdeckt wurde.⁷²⁻⁷⁴ Mitglieder der TNF und TNFR Superfamilie führen physiologisch unterschiedlichste Funktionen aus und sind vor allem an Abläufen des Immunsystems beteiligt.⁷¹ So führt beispielsweise die Ausschüttung von TNF α als proinflammatorisches Zytokin zu Vasodilatation, Ödembildung, Leukozytenadhäsion und Fieber.⁷⁵

Die Gruppe der Rezeptoren kann unterteilt werden in Rezeptoren mit „Death Domain“ (engl. für Todesdomäne), ohne Todesdomäne und „Decoy“-Rezeptoren (engl. für Köder/Attrappe).⁷⁶ Letztere konkurrieren mit Todesrezeptoren um Liganden und unterbinden so deren Funktion.⁷⁶ Zu den Todesrezeptoren, welche in der Lage sind Apoptose einzuleiten, gehören Todesrezeptor 1 (engl. Death receptor 1 [DR1])/TNFR1, DR2/Fas cell surface death receptor

(Fas)/TNFRSF6, DR3/TNFRSF25, DR4/TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (TRAILR1)/TNFRSF10A, DR5/TRAILR2/TNFRSF10B und DR6/TNFRSF21.⁷⁷⁻⁷⁹ Die Bindung des jeweils zugehörigen Liganden führt zu einer Aktivierung des Todesrezeptors.^{79,80} Unter Zuhilfenahme von Adaptermolekülen wie Fas-associated protein with death domain (FADD), TNF receptor-associated protein with death domain (TRADD) oder Receptor-interacting protein 1 (RIP1) kommt es zu einer Aktivierung der Initiatorcaspasen Caspase-8 und -10.^{79,80} Diese aktivieren die Effektorcaspasen Caspase-3, -6 und -7, welche zur Apoptose führen.^{79,80} Zudem kann Caspase-8 durch die Spaltung von BH3-interacting domain death agonist (Bid) eine Ausschleusung von Cytochrom C aus den Mitochondrien initiieren und damit den intrinsischen Weg der Apoptose über apoptotic peptidase activating factor 1 (Apaf-1) und Caspase-9 aktivieren.^{81,82}

Daneben können Todesrezeptoren auch proliferative Signalwege auslösen. Dazu gehören der Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B), Extracellular-signal regulated kinases (ERK) und c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) Signalweg. TNFR1, einer der beiden Rezeptoren, an die TNF α bindet, löst beispielsweise häufiger proinflammatorische bzw. proliferative Signalwege aus als Apoptose.^{79,80,83}

2.2.1. Tumornekrosefaktoren und ihre Rolle in Tumoren

Mitglieder der TNF Superfamilie wurden erstmalig im Zusammenhang mit Tumoren entdeckt und ihre ambivalente Rolle in der Krebsentstehung und Therapie wird seither untersucht. TNF α wurde zunächst als Substrat beschrieben, das zu hämorrhagischen Nekrosen von Sarkomen führt.⁸⁴⁻⁸⁶ Die Applikation von rekombinanten TNF α wird heute beispielsweise in Form einer isolierten Extremitätenperfusion bei lokal fortgeschrittenen Weichgewebssarkomen als Therapieoption empfohlen,⁸⁷ aufgrund der proinflammatorischen Nebenwirkungen ist eine systemische Applikation jedoch nicht indiziert.^{88,89} Gleichzeitig kann der Ligand unter anderem über den NF- κ B Signalweg die Tumorentwicklung, dessen Wachstum und die Entstehung von Metastasen fördern^{83,90-92} und die genauen Mechanismen und Umstände, unter denen es zu einem proliferativen oder apoptotischen Signal durch den Liganden kommt, sind noch nicht vollständig geklärt.⁹³⁻⁹⁵ Eine ähnlich ambivalente Rolle in Tumoren wurde beispielsweise für das TRAIL-TRAILR-System nachgewiesen.^{96,97}

Viele Mitglieder der TNF und TNFR Superfamilie sind in Tumorzellen exprimiert.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Eine Hochregulation der Rezeptoren und Liganden konnte auch in Gliomen gezeigt werden: so ist beispielsweise Fas, TNF α und DR5 in Gliomproben bzw. Gliomzelllinien vermehrt nachweisbar.^{6-8,101} Zudem hat sich gezeigt, dass Tumornekrosefaktoren und darunter auch Todesrezeptoren als prognostische Marker in unterschiedlichen Tumorentitäten dienen können. Beispielsweise ist die zytoplasmatische Expression von TRAIL-R1 mit einem verlängerten OS im duktalem Adenokarzinom des Pankreas assoziiert,¹⁰² während eine nukleäre Expression von TRAIL-R2 mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist.¹⁰³

Eine hohe Fas Expression ist mit einem längeren progressionsfreien Überleben (engl. progression free survival [PFS]) in Brustkrebs verbunden¹⁰⁴ und bei akuter myeloischer Leukämie zeigten Patienten mit niedriger Expression von TNFR1 und TRAILR2 ein längeres Überleben.¹⁰⁵ Auch in Gliomen könnten Tumornekrosefaktoren und deren Rezeptoren von prognostischer Relevanz sein: eine hohe CD40 Expression ist in diesen Tumoren mit einem kürzeren Überleben verbunden,¹⁰ während die Expression von Fas-Ligand mit einem längeren PFS in niedriggradigen Gliomen assoziiert ist.⁷ Sowohl die Expression von TRAILR1 als auch von TRAILR2 ist mit einer besseren Prognose in Glioblastomen vergesellschaftet.⁹ Somit sind Mitglieder der TNF und TNFR Superfamilie aussichtsreiche Kandidaten zur weiteren Evaluation prognostischer Marker in Gliomen.

2.2.2. Death receptor 6

TNFRSF21 oder auch DR6 ist ein vergleichsweise spät identifizierter Todesrezeptor der TNFR Superfamilie.¹² Das DR6 Gen liegt auf Chromosom 6p21.1-21.1¹⁰⁶ und der Rezeptor ist physiologisch vor allem im Herzen, Gehirn, Plazenta, Pankreas, Lymphknoten, Thymus und Prostata exprimiert.¹² In Neuronen wurde das Amyloid-Vorläuferprotein (engl. amyloid precursor protein [APP]) als Ligand für den Rezeptor identifiziert,¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ in anderen Zelltypen konnte sich dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen.^{110,111} DR6 ist durch die Förderung des Zelltods von Nervenzellen und deren Axone an der neuronalen Entwicklung beteiligt.^{107,109,112} Der Rezeptor reguliert die Funktion von Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, indem er deren Überleben und die Myelinisation hemmt^{111,113} und ist wichtig für die Angiogenese des Gehirns und die Entwicklung der Blut-Hirn-Schranke.¹¹⁴ Daneben spielt der Rezeptor bei der Funktion von B- und T-Zellen eine Rolle. Eine Störung des Rezeptors führt zu einer vermehrten CD4⁺ T-Zellproliferation und Differenzierung zu T Helfer Typ 2 Zellen.¹¹⁵⁻¹¹⁷ DR6 beeinflusst die Aktivierung, Proliferation und das Überleben von B-Zellen sowie die Bildung von Keimzentren *in vitro* und *in vivo*.¹¹⁸ Zudem ist der Rezeptor vermehrt auf plasmazytoiden dendritischen Zellen exprimiert und an der Produktion von Typ-I-Interferon beteiligt.¹¹⁹ Wie alle Todesrezeptoren ist DR6 in der Lage Apoptose einzuleiten.¹² Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren interagiert er jedoch nur schwach mit TRADD und nicht mit den Adaptermolekülen FADD, RIP oder RIP-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain (RAIDD).^{12,13} Während Kasof et al.¹³ zeigten, dass die Inhibition von Caspase-8 eine DR6-abhängige Apoptose verhindert, wiesen Zeng et al.²⁰ nach, dass der von DR6 eingeleitete Zelltod Caspase-8 und Bid unabhängig ist. Stattdessen aktiviert der Rezeptor über die Bindung des Proapoptotic mitochondrial carrier homolog protein (PSAP), ein Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran, den intrinsischen Apoptoseweg.²¹ Die genauen Mechanismen dieses möglichen Signalweges sind jedoch noch ungeklärt. So wurde nachgewiesen, dass DR6 mit Bcl-2 associated X protein (Bax), einem proapoptischen Molekül der Bcl-2 Familie, im Zytoplasma einen Komplex bilden kann und

PSAP wiederum DR6-abhängig einen Komplex mit Bax im Mitochondrium bildet, wodurch dessen Translokation und Cytochrom C Freisetzung ausgelöst wird.²¹ Wie genau es zu einer Interaktion dieser beiden Komplexe kommt, konnte jedoch noch nicht gezeigt werden.²¹

Daneben aktiviert der Rezeptor den NF-κB Signalweg über eine Bindung an TRADD,^{12,13,120} sowie den JNK-Signalweg.^{12,13,121,12} Die Expression von DR6 kann über den NF-κB Signalweg^{13,110} sowie im Rahmen der Angiogenese durch den Wnt/β-catenin Signalweg reguliert werden.¹¹⁴

Pathophysiologische Rolle von DR6

DR6 ist an der Pathogenese unterschiedlichster neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt. Beispielsweise ist der Rezeptor in Gehirnproben von Alzheimerpatienten erhöht exprimiert und im Rahmen der Krankheit am durch β-Amyloid ausgelösten Zelltod beteiligt.^{122,123} In einem Prionen-Modell löst DR6 eine Degeneration von Axonen über Caspase-6 aus.¹²⁴ Der Rezeptor ist zudem an der Degeneration von Nerven nach Verletzung beteiligt.^{125,126} Durch seinen Einfluss auf die Myelinisierung des Gehirns wird ein Zusammenhang mit demyelinisierenden Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose vermutet.¹¹¹ Ein Knockdown von DR6 im experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis Modell der Multiplen Sklerose führt zu einer verminderten Infiltration von CD4⁺ T-Zellen ins Gehirn und dadurch zu einem Ausbleiben der Pathologie.¹²⁷ Der Rezeptor ist in humanen Proben der amyotrophen Lateralsklerose verstärkt exprimiert und seine Antagonisierung führt im Mausmodell unter anderem zu einem verlängerten Überleben von Motoneuronen und Oligodendrozyten.¹²⁰ Zudem wird die Rolle von DR6 in psychiatrischen Erkrankungen wie der bipolaren Störung und Depression zunehmend erforscht.^{128–130} Der Rezeptor ist außerdem an der Entstehung von autoimmunen Erkrankungen wie Asthma oder systemischen Lupus erythematodes beteiligt.^{131,132}

In Tumorproben bzw. *in vitro* und *in vivo* Modellen von beispielsweise Prostata-, Kolon-, Brust-, Ovarialkrebs und Melanomen ist DR6 hoch exprimiert.^{12–14,133–135} In manchen Tumorentitäten steigt die Expression zudem mit zunehmendem Malignitätsgrad.^{133,134} Daneben wird der Rezeptor auch in Blutgefäßen von Tumoren gebildet.^{136,137}

Bezogen auf die pathophysiologische Rolle von DR6 in der Krebsentwicklung wurde nachgewiesen, dass der Rezeptor über die Aktivierung von NF-κB und konsekutive Freisetzung von IL-6 die Tumorangiogenese im *in vivo* Modell des Melanoms fördert.¹⁴ Durch die Expression von APP durch Tumorzellen kann eine DR6-abhängige Nekroptose von Endothelzellen ausgelöst werden, die zum Austreten von Tumorzellen aus dem Gefäß ins Gewebe führt und damit die Bildung von Metastasen unterstützt.¹⁵ Zudem beeinflusst DR6 die Differenzierung von Monozyten in unreife dendritische Zellen und induziert deren Zelltod, sodass der Rezeptor auch an der Immunevasion von Tumoren beteiligt sein könnte.¹⁶

DR6 kann durch die Matrixmetalloproteinase-14 (MMP-14) von der Oberfläche von Tumorzellen gespalten und als löslicher Rezeptor im Blut nachgewiesen werden, weswegen er auch als diagnostischer Serum-Marker gehandelt wird.^{16,134,138,139}

Daneben wurde der Rezeptor als prognostischer Faktor in unterschiedlichen Tumorentitäten identifiziert. In Pankreas-Adenokarzinomen ist eine niedrige Expression des Rezeptors mit einem längeren OS verbunden.¹⁹ Auch in hepatozellulären Karzinomen ist eine erhöhte Expression des Rezeptors mit einer schlechteren Prognose assoziiert.¹⁴⁰ In akuter lymphatischer Leukämie und Ösophagus-Plattenepithelkarzinom führt eine hohe Expression des Rezeptors dagegen zu einer besseren Prognose.^{18,141} Sowohl in klarzelligen Nierenzellkarzinomen als auch Melanomen wurde DR6 im Rahmen von Gensignaturen als prognostischer Faktor genutzt, wobei die Expression des Rezeptors jeweils mit einer besseren Prognose assoziiert ist.^{142–145}

DR6 in Gliomen

Bezogen auf Tumore des ZNS konnte in Gangliogliomen und dysembryoplastischen neuroepithelialen Tumoren ein sich von gesundem Hirngewebe unterscheidendes Expressionsmuster von DR6 nachgewiesen werden.^{146,147} Während DR6 physiologisch im Neuropil um große pyramidale Neuronen herum gebildet wird,¹⁴⁶ zeigen sich in den Tumoren punktuelle Cluster des Rezeptors um Neurone sowie eine gesteigerte Expression in deren Perikarya.¹⁴⁷ Zudem korreliert die Expression von DR6 positiv mit der neuronalen Expression von APP und Caspase-3.¹⁴⁷

Die Analyse eines humanen Proteom-Datensatzes zeigte einen veränderten Signalweg von DR6 in Gliomen verglichen mit gesunden Gliazellen.²² DR6 interagiert demnach mit APP und TRADD, aber auch FADD, TNFSF10/TRAIL und Torsin Family 1 Member A (TOR1A), wobei nur letzteres auch in normalem Gliagewebe nachgewiesen werden konnte. Die Autoren vermuten daher die Auslösung von Apoptose durch DR6 sowohl durch die Interaktion mit TRADD/FADD als auch mit TRAIL.²²

In einer vorherigen Arbeit konnten wir zudem zeigen, dass DR6 in manchen Gliomentitäten im Vergleich zu peritumoralen Gewebe signifikant hochexprimiert ist.¹⁷

2.3. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Das Verständnis von diffusen Gliomen hat sich durch molekulare Untersuchungen in den letzten Jahren erheblich verbessert. Die aktuelle WHO Klassifikation unterstreicht die wichtige Rolle von Mutationen wie der IDH1/2 Mutation, 1p/19q Kodeletion, TERT Promoter Mutation, EGFR Amplifikation und +7/-10 Chromosomenveränderungen.¹ Das Wissen über diese tumorbiologischen Hintergründe hat nicht nur die Diagnostik der Tumore verbessert, sondern wirkt sich auch auf die Prognoseeinschätzung und Therapieplanung aus.^{1,4,5}

Die Prognose von WHO Grad 2 Gliomen ist im Vergleich zu höhergradigen Entitäten wie dem Glioblastomen zwar gut, insgesamt ist die Überlebensdauer auch unter Berücksichtigung des häufig jungen Erkrankungsalters jedoch immer noch gering.^{2,3} Somit ist eine weitere Untersuchung der Tumore für ein besseres Verständnis ihrer Biologie, ihrer Prognoseeinschätzung sowie möglicher Therapieoptionen wichtig.

Mitglieder der TNF und TNFR Superfamilie spielen sowohl in der Krebsentstehung, als auch in der Behandlung der Erkrankungen eine interessante Rolle.^{94,96,148} Manche Liganden und Rezeptoren der Superfamilie zeigen eine aberrante Expression in diffusen Gliomen⁶⁻⁸ und können als Prognosefaktoren in den Tumoren dienen.^{7,9,10}

DR6 ist ein Todesrezeptor, der in unterschiedlichen Krebsarten erhöht exprimiert wird^{12,13} und dessen prognostische Rolle in anderen Tumoren untersucht wurde.^{18,19} In der Vergangenheit konnten wir zeigen, dass der Rezeptor in manchen Gliomentitäten hochreguliert ist.¹⁷ In dieser Arbeit wurde daher die Rolle von DR6 in niedriggradigen Gliomen unter folgenden Fragestellungen untersucht:

- Wie ist DR6 in niedriggradigen Gliomen im Vergleich zu Kontrollgewebe sowohl auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene exprimiert? Gibt es Unterschiede in der Expression des Rezeptors abhängig von molekularen und histologischen Charakteristika der Tumore?
- Welche Rolle spielt das Expressionslevel von DR6 bezogen auf das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben von an niedriggradigen Gliomen erkrankten Patienten? Ist der Rezeptor ein möglicher zukünftiger Prognosefaktor?

3. Publikation: Death Receptor 6 as a Prognostic Marker in Low-grade Glioma

Death Receptor 6 as a Prognostic Marker in Low-grade Glioma

SARAH K. STEGMANN^{1,2}, SASKIA KUHL^{1,2}, NAM GYU IM², DANG THUY DIEM DINH^{1,2},
LUKAS GOERTZ^{1,2}, ROLAND GOLDBRUNNER^{1,2} and MARCO TIMMER^{1,2}

¹Laboratory for Neurooncology and Experimental Neurosurgery,
Department of General Neurosurgery, Center for Neurosurgery, Cologne, Germany;

²Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, Cologne, Germany

Abstract. *Background/Aim:* Low-grade gliomas (LGG) are heterogenous tumours, causing variable survivals in patients. Identifying molecular markers for a more accurate prognosis is, therefore, important. Since death receptor 6 (DR6) is up-regulated in gliomas and shows an aberrant signalling network, we tested its suitability as a prognostic marker. *Materials and Methods:* DR6 was investigated in patient samples via PCR and western blot. Clinical data were analysed and compared to The Cancer Genome Atlas (TCGA) 'brain lower grade glioma' dataset. *Results:* DR6 was found to be enhanced in LGG and its expression increased in recurrent LGG. The receptor showed a protective effect in primary LGG with a significantly elongated progression-free survival that was confirmed in the TCGA study. This effect was reversed in relapsed LGG in which cases with high DR6 expression reveal a shorter overall survival. *Conclusion:* DR6 is an interesting candidate for further studies regarding its effect as a prognostic marker, playing an opposing role in primary and relapsed LGG.

Low-grade gliomas (LGG) are primary brain tumours mostly occurring in the second to fourth decade of life (1, 2). They show a diverse prognosis and clinical occurrence varying from asymptomatic patients to neurological deficits (3). Molecular markers have started to unravel the heterogenous biology and survival of these tumours, becoming an important diagnostic and prognostic tool in LGG (1, 4, 5). For instance, analysing isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation status and co-deletion of chromosome arm 1p and 19q (1p19q codeletion) predicts survival more accurately. While a mutation status in IDH and 1p19q codeletion results

in a median survival of about 13 years, cases without alterations display a prognosis of only approximately 6 years (5). Thus, identifying new molecular prognostic markers is essential for a more accurate prediction of survival and optimal therapy planning, as treatment of LGG patients still ranges from watchful waiting to surgical resection, radiation and chemotherapy (6-7).

Death receptors are members of the tumour necrosis factor superfamily (TNFSF) and show a prognostic effect in different tumour entities (8-11). One of these death receptors is death receptor 6 (DR6). Besides its ability to induce apoptosis, DR6 activates the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway (11). The receptor is enhanced in different tumour types like prostate, breast and ovarian cancer and, in some cases, the level of expression of DR6 rises with increasing malignancy (11-14). It is often located in tumour vessels and can be cleaved by matrix metalloproteinase-14 (MMP14) (15-17). Thus, it is also proposed as diagnostic serum marker for different malignancies (18, 19). In pulmonary carcinoid tumours, DR6 expression is associated with development of recurrences and the receptor is known to play a pro-carcinogenic role in different tumours (20-23).

Previously, we showed that DR6 is enhanced in gliomas and displays a trend towards increased expression with rising malignancy (24). Therefore, we further analysed the expression of DR6 in LGG and tested its suitability as a prognostic marker.

Materials and Methods

Patients. Tumour samples were obtained during neurosurgery, shock frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further processing. They were categorized by two independent neuropathologists based on the WHO classification 2007 and only grade II gliomas were used for this study. Peritumoral tissue that was confirmed to be histologically normal functioned as a control. Patient data were last updated on January 1st 2017. The study was concluded following the World Medical Association Declaration of Helsinki and informed consent was obtained.

Correspondence to: Marco Timmer, MD, MSc, Department of General Neurosurgery, University Hospital Cologne, Kerpener Strasse 62, 50937 Cologne, Germany. E-mail: marco.timmer@uk-koeln.de

Key Words: Death receptor 6, glioma, low-grade glioma, prognosis, survival, tumor necrosis factor receptor 21.

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. Glioma and control samples were measured *via* reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and cDNA was generated with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). The following sequence served as a primer for DR6: Forward-ATTCCCCAGGCTGAGGACAAAC, Reverse-ACACACACACACCCCAAAC (Eurofins, Luxemburg). Succinate dehydrogenase complex subunit A, flavoprotein variant (SDHA) acted as a housekeeping gene (Quantitect primer assay; Qiagen). PCR was performed using the Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen) following a two-step PCR protocol (95°C for 5 s, 60°C for 10 s; 40 cycles) in the Cycler Rotor-Gene Q (Qiagen). All samples were measured in triplets.

IDH1 mutation analysis. For analysis of IDH1 mutation status, amplified cDNA was generated *via* PCR with the following primers: Forward-GTGCCACTATCACTCCTGATG, Reverse-AAGGCCAACCC TTAGACAGAG (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Direct sequencing was performed using the ABI PRISM BigDye Terminator, version 1.1 Cycle Sequencing Kit, with the ABI 3730 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

Western Blot. Protein isolation was achieved using RIPA with a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) and sonication. Concentration was measured *via* Bradford Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 50 µg of protein stored in LDS samples buffer and sample reducing agent (NuPAGE; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were used per sample. Samples were separated *via* SDS PAGE gels (NuPAGE 4%-12% Bis-Tris 1 mm gel, Thermo Fisher Scientific) with the Thermo Fisher Scientific gel system. The gels were blotted onto a nitrocellulose membrane (Thermo Fisher Scientific blotting system) and blocked in 5% dry non-fat milk with 3% BSA dissolved in TBST. Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against DR6 (1:500 in 5% dry non-fat milk and 3% BSA; ABIN203535, antibodies-online GmbH, Aachen, Germany) and β-Actin as housekeeping gene (1:10,000 in TBST; A1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). They were washed and incubated for 30 min at room temperature with secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:10,000 in TBST, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Blots were measured using ECL-spray (advansta) and ChemiDox CRS - System, Bio-Rad and analysed with the Image Lab software (Bio-Rad). All samples were measured three times.

The Cancer Genome Atlas Analysis. The Cancer Genome Atlas (TCGA) was analysed *via* cBioPortal for cancer genomics (<https://www.cbioportal.org>) (25, 26). The 'Brain Lower Grade Glioma (TCGA, Firehose Legacy)' study was selected and the 'mRNA expression z-scores relative to diploid samples (RNA Seq V2 RSEM)' were investigated. High and altered mRNA respectively was defined as above mean (TNFRSF21: EXP>0).

Statistical analysis. Results were analysed using GraphPad Prism (version 9). Outliers were defined as above or below the 1.5 times interquartile range. Normality assumption was tested using the D'Agostino and Pearson test or Shapiro-Wilk test for small sample numbers. Parametric data was investigated using ANOVA and Tukey's multiple comparison test or *t*-test. Paired data was analysed

with the paired *t*-test. For non-parametric data, Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test or Mann-Whitney test were performed. Categorical variables were analysed with Fisher's exact test or Chi-square test. For Kaplan-Meier-Analysis, samples of our study were divided into two groups by the median of DR6 mRNA expression. Statistical significance was tested using the Log-rank test and Mantel-Haenszel method. Significance was defined as $p < 0.05$ and indicated with asterisks: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Results

The Cancer Genome Atlas Analysis. To assess the putative prognostic role of DR6 in LGG, we investigated The Cancer Genome Atlas (TCGA) 'Brain Lower Grade Glioma' study *via* cBioPortal (25, 26). From all samples within the study, 225 (42%) showed a high DR6 mRNA expression level. These patients displayed a longer progression-free survival (PFS) compared to cases with low DR6 level ($q = 0.0097$; hazard ratio (HR) = 0.6599, 95% CI = 0.4816-0.9042) (Figure 1A). In addition, the overall survival (OS) of cases with high DR6 level was extended ($q = 0.0097$; HR = 0.6240, 95% CI = 0.4372-0.8907) (Figure 1B). Therefore, DR6 mRNA expression displayed a positive effect on patient's survival in TCGA lower grade gliomas.

DR6 expression in LGG. We further analysed the expression of the receptor in LGG comparing it to histologically normal tissue. DR6 mRNA expression was enhanced in tumour samples (0.2418 ± 0.1762 vs. 0.08442 ± 0.02662 , $p = 0.0031$) (Figure 2A). On the protein level, the receptor was increased in cancer samples, though not significantly (0.2634 ± 0.1187 vs. 0.1688 ± 0.1083) (Figure 2B).

In primary tumours within the LGG cohort, we observed no significant difference in DR6 expression compared to the control. However, in relapsed LGG the receptor was highly enhanced compared to both control and primary LGG ($p = 0.0003$ and $p = 0.0011$ respectively) (Figure 2C). Patients with LGG suffering a low-grade relapse showed an increase of DR6 mRNA expression in their recurrence ($p = 0.0019$) (Figure 2D).

Within the different histologic subtypes defined by the WHO classification 2007, astrocytomas (A) expressed the highest level of DR6. The receptor was also elevated in oligoastrocytomas (OA) and oligodendrogliomas (OG) compared to the control, though not significantly (Figure 3A). As IDH1 mutation plays a major role in gliomas including diagnosis and prognosis of the tumour (1, 5), we investigated the DR6 mRNA expression level depending on the IDH1 status of the tumours. DR6 was highly expressed in IDH1 mutant (IDH1_{mut}) samples, but not in IDH1 wildtype (IDH1_{wt}) (Figure 3B). Therefore, LGG display an enhanced DR6 level with higher expression in relapses, astrocytoma and IDH1_{mut} samples.

TCGA lower grade glioma

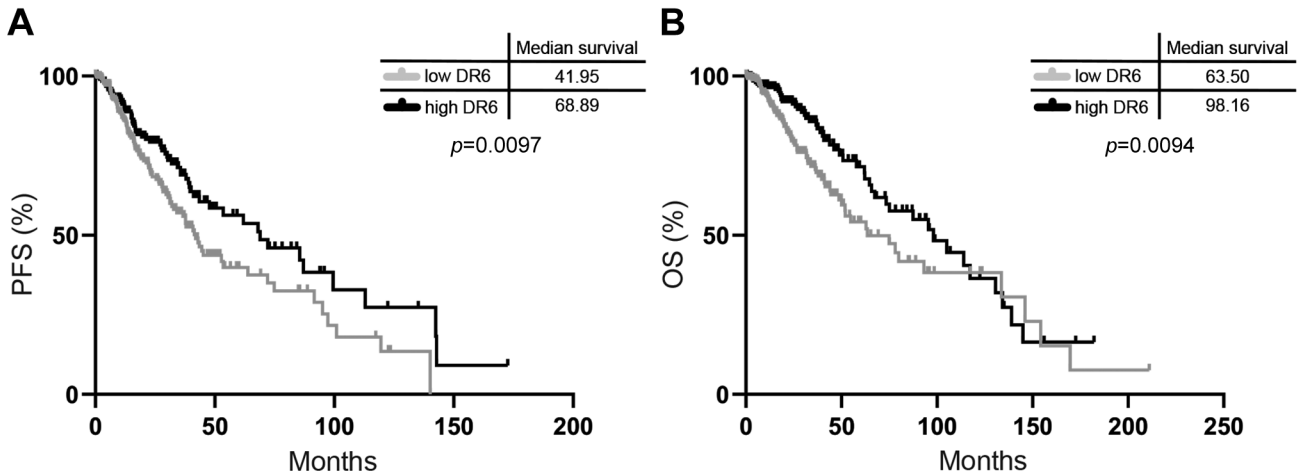


Figure 1. Death receptor 6 (DR6) is a positive prognostic marker in The Cancer Genome Atlas (TCGA) lower grade glioma. (A, B) Survival analysis of TCGA ‘brain lower grade glioma’ study depending on DR6 expression. (A) Progression-free survival (PFS) is prolonged in cases with high DR6 expression (n=200) compared to cases with low expression (n=270). (B) Cases with high receptor level (n=213) show a longer overall survival (OS) compared to cases with low level (n=294).

Survival analysis. To test the influence of DR6 on survival in our study, we divided the patient samples by their mRNA expression level into two groups. Comparing cases with DR6 mRNA expression above median with samples below did not show any significant difference in PFS. However, the PFS was longer for samples with high expression (44.22 months vs. 31.27 months), similar to the ‘brain lower grade glioma’ TCGA analysis (Figure 4A). The OS analysis indicated a contradictory trend. Patients with lower DR6 mRNA level displayed a longer OS (137.1 months vs. 115.8 months) (Figure 4B).

Comparing the TCGA dataset and our study, in the TCGA dataset 516 of the 530 samples (97.4%) were primary lower-grade gliomas. On the contrary, our study consisted of more relapsed tumour samples. The PFS and OS analysis was composed of 33.33% and 39.71% recurrences respectively. Therefore, we analysed only the primary LGG tumour samples in our study which exhibited a significantly longer PFS for cases with high DR6 expression compared to samples with low DR6 level (HR 0.4094, 95% CI 0.1968 to 0.8516) (Figure 4C). This effect was independent of other prognostic factors. No distinct distribution of IDH1 status, histology, age at diagnosis, sex and Karnofsky performance status scale (KPS) before surgery was found between the two compared cohorts (Table I). There was also a trend towards a longer OS for cases with high DR6 level corresponding to results of the TCGA ‘brain lower grade glioma’ dataset (Figure 4D).

Analysis of relapsed LGG samples revealed no significant difference in PFS between samples with high and low DR6

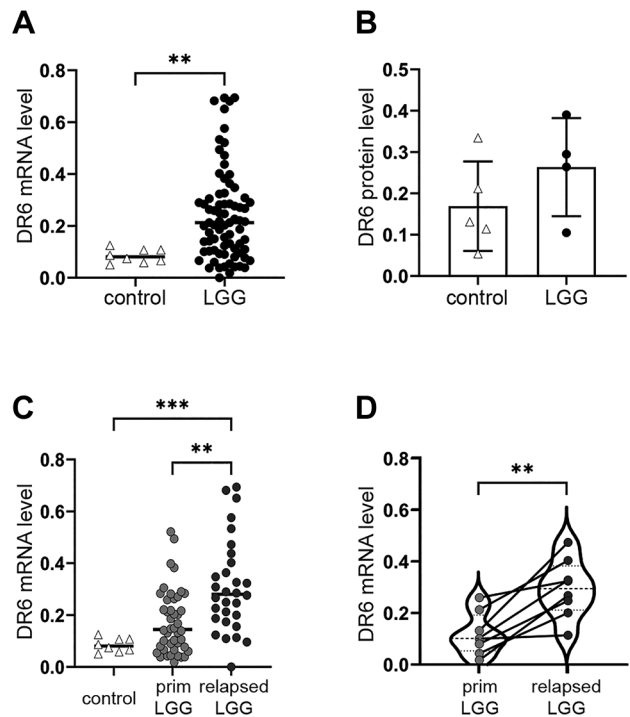


Figure 2. Death receptor 6 (DR6) is enhanced in low-grade gliomas (LGG) and its expression rises in relapses. (A) DR6 mRNA expression in LGG is enhanced compared to non-tumoral control tissue. (B) DR6 protein expression in tumour and control samples. (C) Relapsed LGG shows an increased DR6 mRNA expression compared to primary (prim) LGG and control tissue. (D) DR6 mRNA expression rises in relapsed LGG compared to their respective primary tumours.

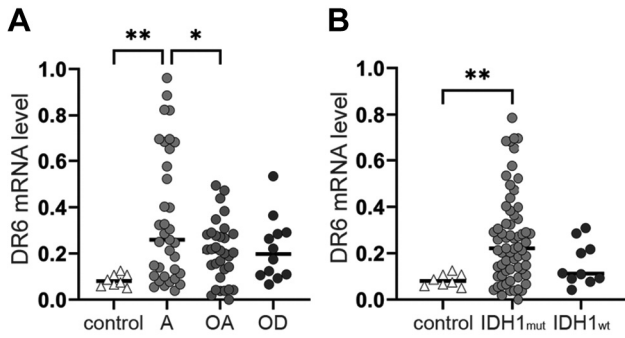


Figure 3. Death receptor 6 (DR6) expression depending on histology and isocitrate dehydrogenase (IDH)1 status. (A) DR6 mRNA expression in histological subtypes astrocytoma (A), oligoastrocytoma (OA) and oligodendroglioma (OD) versus control. (B) IDH1_{mut} LGG show a higher DR6 mRNA expression compared to control and IDH1_{wt} low-grade gliomas (LGG).

expression. The median survival was moderately shorter for cases with high DR6 level (29.00 months vs. 35.00 months) (Figure 4E). However, relapsed LGG with high DR6 level showed a significantly shorter OS (HR=2.533, 95% CI=1.022-6.280) (Figure 4F). Other prognostic factors were not differently distributed between the compared groups as well (Table II). Analysing primary and relapsed cases separately in the TCGA ‘brain lower grade glioma’ study revealed similar trends as seen in our study. For primary samples, it showed a trend towards a longer PFS in the high DR6 group and a significantly extended OS (Figure 5A and B). The relapsed samples displayed no difference in PFS, but the OS was longer for patients with low DR6, though not significantly (94.45 months vs. 38.68 months) (Figure 5C and D). Thus, high DR6 mRNA expression showed a protective effect in primary LGG that was reversed in low-grade recurrences.

Discussion

Death receptors and other members of the TNFSF are highly expressed in different tumour entities including gliomas (11, 27-31). Herein, we showed that DR6 is up-regulated in LGG with increasing expression in low-grade relapses. This aligns with previous findings revealing that the receptor is enhanced in gliomas (24).

TNFSF members that showed an aberrant expression in gliomas were also shown to be suitable as prognostic markers (31-33). For instance, high CD40 levels in low-grade gliomas revealed a negative prognostic effect on survival while FAS-L expression was correlated with a longer PFS (31-32). The TCGA ‘brain lower grade glioma’ dataset and our study showed a prolonged PFS and OS for primary tumours with enhanced DR6 level.

Table I. Comparison of primary low-grade glioma (LGG) patients attributes with low and high death receptor 6 (DR6) mRNA expression.

	DR6<median	DR6>median	p-Value
IDH1 status			ns (0.3398)
IDH1 _{mut} (%)	15 (78.95%)	18 (94.74%)	
IDH1 _{wt} (%)	4 (21.05%)	1 (5.26%)	
Histology			ns (0.2083)
Astrocytoma (%)	11 (57.89%)	6 (31.58%)	
Oligoastrocytoma (%)	5 (26.32%)	10 (52.63%)	
Oligodendroglioma (%)	3 (15.79%)	3 (15.79%)	
Age			ns (0.8785)
Mean (SD)	40.11 (±10.42)	39.53 (±12.65)	
Gender			ns (0.7431)
Female (%)	9 (47.37%)	7 (36.84%)	
Male (%)	10 (52.63%)	12 (63.16%)	
KPS			ns (0.2566)
Mean (SD)	88.67 (±9.537)	92.14 (±6.112)	

IDH1: Isocitrate dehydrogenase 1 status; mut: mutant; wt: wildtype; KPS: Karnofsky performance status scale.

Table II. Characteristics of relapsed low-grade gliomas (LGG) comparing cases with low and high death receptor 6 (DR6) mRNA expression.

	DR6<median	DR6>median	p-Value
IDH1 status			ns (0.3259)
IDH1 _{mut} (%)	10 (71.43%)	13 (92.86%)	
IDH1 _{wt} (%)	4 (28.57%)	1 (7.14%)	
Histology			ns (0.2876)
Astrocytoma (%)	3 (21.43%)	7 (50.00%)	
Oligoastrocytoma (%)	8 (57.14%)	5 (35.71%)	
Oligodendroglioma (%)	3 (21.43%)	2 (14.29%)	
Age			ns (0.5507)
Mean (SD)	41.21 (±9.407)	43.86 (±13.38)	
Gender			ns (0.7036)
Female (%)	7 (50.00%)	9 (64.29%)	
Male (%)	7 (50.00%)	5 (35.71%)	
KPS			ns (0.5341)
Mean (SD)	83.75 (±12.45)	80.50 (±11.41)	

IDH1: Isocitrate dehydrogenase 1 status; mut: mutant; wt: wildtype; KPS: Karnofsky performance status scale.

Relapsed TCGA cases indicated a decreased OS in the group with high DR6 level. However, the TCGA study only consisted of 14 relapsed samples, thereby being too small of a sample size to make conclusive predictions about the role of the receptor in relapses. Thus, our study provides new insights into the role of DR6 in recurrences showing that low-grade relapses with high DR6 level display a significantly reduced OS. We could not find an influence of DR6 expression on PFS in recurrent LGG, which might be related to the relatively small number of cases in our study.

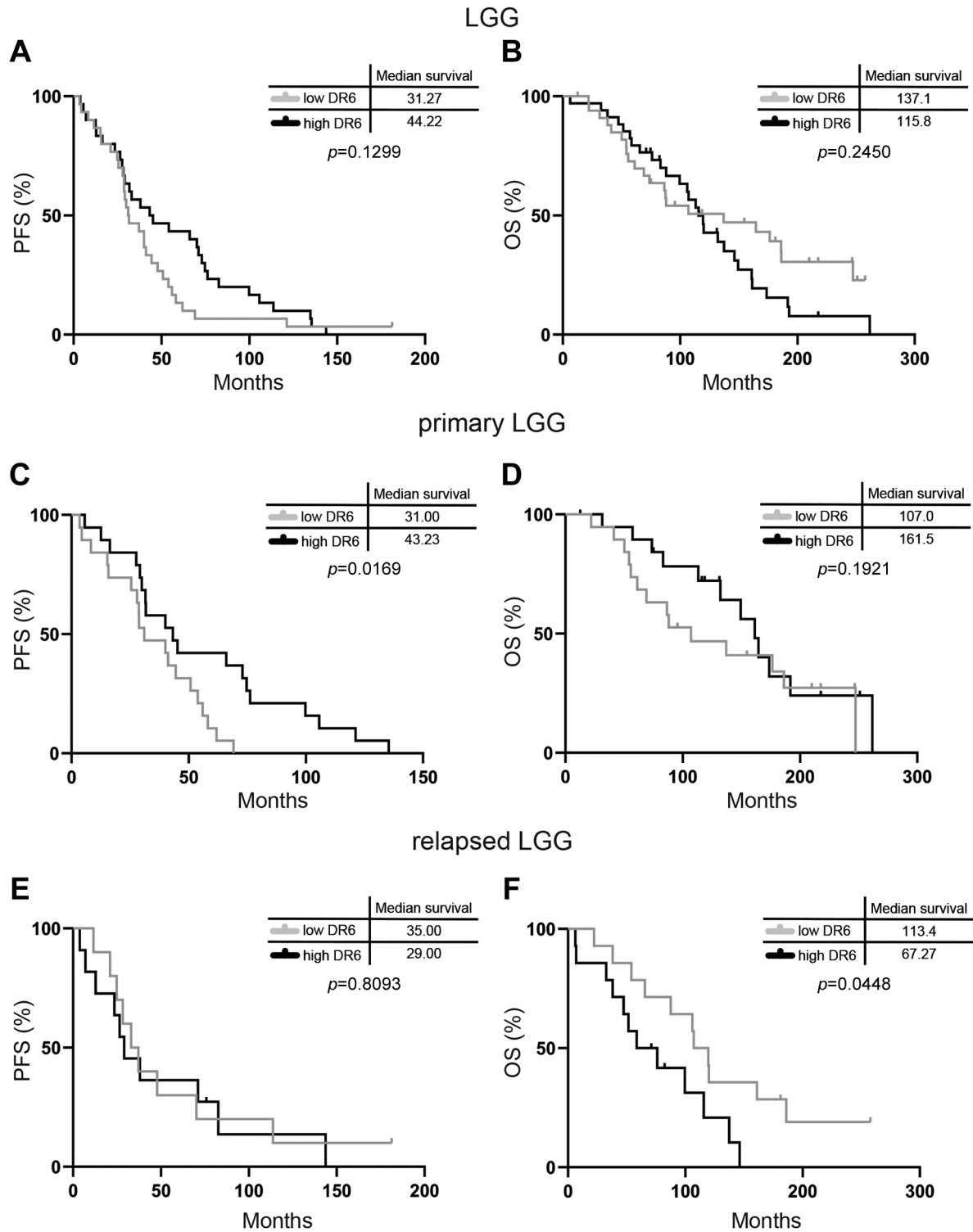
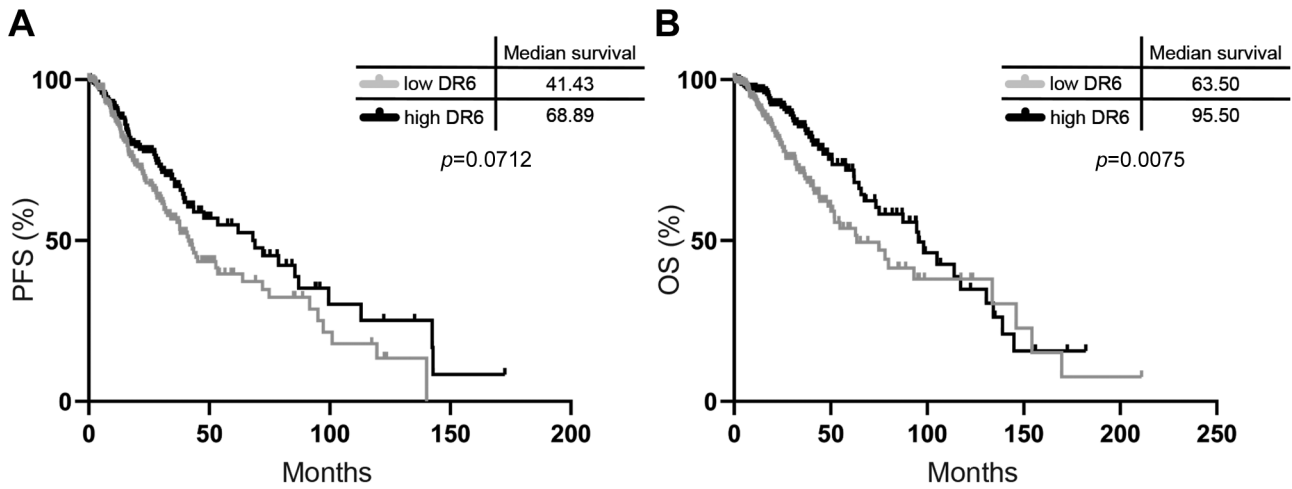


Figure 4. Death receptor 6 (DR6) as a prognostic marker in low-grade gliomas (LGG). (A-F) Survival analysis of LGG investigating the influence of DR6 expression. (A) Progression-free survival (PFS) analysis of LGG with low ($n=30$) versus high DR6 level ($n=30$). (B) Overall survival (OS) analysis of low ($n=34$) and high DR6 LGG ($n=34$). (C) PFS is elongated in primary LGG with high receptor level ($n=19$) compared to low level ($n=19$). (D) OS analysis of primary LGG with low DR6 expression ($n=19$) versus high expression ($n=20$). (E) PFS analysis of relapsed LGG shows no difference between cases with high ($n=10$) and low DR6 level ($n=11$). (F) OS is longer in relapsed LGG with high receptor expression ($n=14$) compared to cases with low expression ($n=14$).

TCGA primary lower grade glioma



TCGA relapsed lower grade glioma

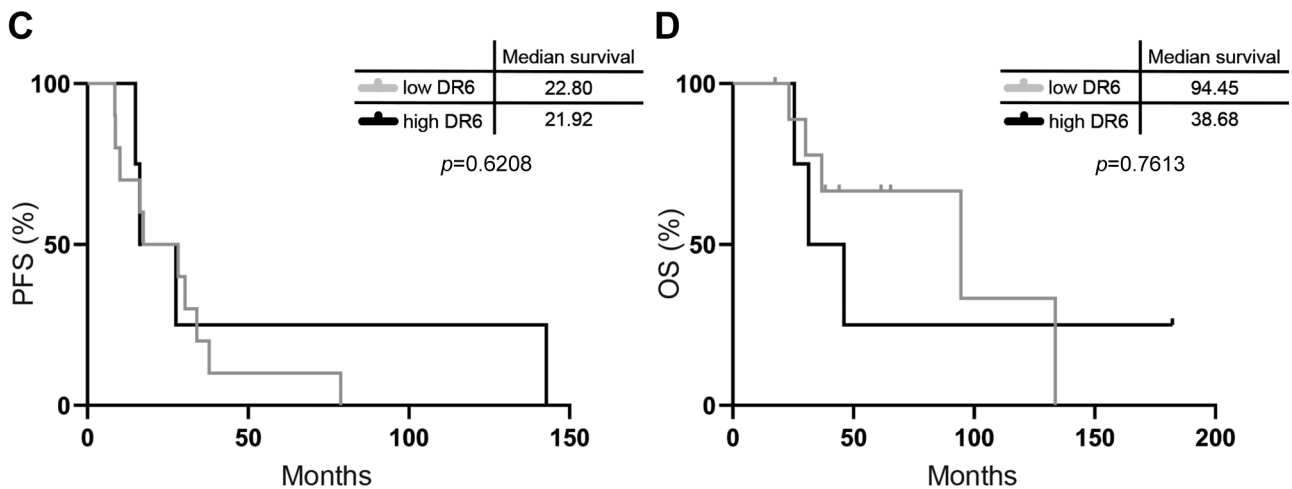


Figure 5. Death receptor 6 (DR6) as a prognostic marker in The Genome Cancer Atlas (TCGA) primary and relapsed lower grade glioma. (A-D) Survival analysis of TCGA ‘brain lower grade glioma’ dataset depending on DR6 expression. (A) Progression-free survival (PFS) analysis of primary cases with low ($n=271$) versus high DR6 expression ($n=206$). (B) Overall survival (OS) is longer in cases with high receptor expression ($n=295$) compared to low expression ($n=219$). (C) PFS analysis of relapsed cases with low ($n=10$) and high DR6 ($n=4$). (D) OS analysis of relapsed cases with low receptor expression ($n=10$) compared to high expression ($n=4$).

Further studies with larger cohorts of LGG patients are needed to unravel the prognostic effect of DR6 in relapses.

TNFSF members have been shown to act both, as pro-carcinogenic and anti-tumoral factors in cancer (34-36). For example, tumour necrosis factor α (TNF- α) is used as an antitumoral drug in isolated limb perfusion therapy of melanoma and sarcoma causing tumour vasculature destruction and haemorrhage (37, 38). However, TNF- α also plays a tumour-supporting role and is expressed in different

tumour entities and tumour environments (39). It is associated *i.e.* with tumorigenesis, tumour growth and development of metastasis through the activation of NF- κ B (40-42). Also, tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is involved in the suppression of tumour growth and liver metastases *via* a natural killer cell mediated mechanism (43, 44, 35). On the other hand, TRAIL supports tumour invasion in cholangiocarcinoma cells and pancreatic ductal adenocarcinoma (34, 45). Thus, analysing

the potential roles of TNFSF members as well as the trigger or circumstances in which they play a tumour supporting role is critical to evaluate their suitability as prognostic markers and therapeutic targets. Our data indicate a diametric role of DR6 within gliomas, as the receptor shows an opposite prognostic effect in primary LGG compared to relapsed tumours. Previously, Kasof *et al.* showed that the apoptotic ability of DR6 depends on its expression level in prostate cancer cell lines. While cell lines with high DR6 levels were resistant against the induction of cell death through the receptor, DR6 was still able to induce apoptosis in cells with low expression of the receptor (13). A similar mechanism might exist in gliomas, as primary LGG showed a lower level of DR6 expression compared to relapses. DR6 is also known to promote tumour angiogenesis, facilitate development of metastasis and immunological tumour escape (22, 21, 23). The signalling network that the receptor activates specifically in gliomas differs from normal glia cells (46). Thus, we showed that DR6 might act as a prognostic marker in LGG, but its role needs to be further studied in a dose-dependent manner to elucidate its distinct prognostic effect in primary and relapsed LGG.

Conflicts of Interest

The Authors declare no conflicts of interest regarding this study.

Authors' Contributions

S.K.S and S.K. performed the experiments. S.K.S. analysed the data. S.K.S and N.G.I. visualized the data. S.K.S wrote the manuscript. D.T.D.D., L.G., R.G. and M.T. edited the manuscript. M.T. had the idea, designed the experiments and supervised the project. All Authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank Diana Tran for proof reading the article. 'Brain Lower Grade Glioma' results shown are based upon data published by the TCGA Research Network: <http://www.cancer.gov/tcga>. This work was supported by a 'Köln Fortune' fellowship for Sarah K. Stegmann (grant number 414/2017).

References

- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P and Ellison DW: The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 131(6): 803-820, 2016. PMID: 27157931. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1
- Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C and Barnholtz-Sloan JS: CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol* 21(Suppl 5): v1-v100, 2019. PMID: 31675094. DOI: 10.1093/neuonc/noz150
- Pignatti F, van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R, Therasse P, Afra D, Cornu P, Bolla M, Vecht C, Karim AB, European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Cooperative Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer Radiotherapy Cooperative Group: Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol* 20(8): 2076-2084, 2002. PMID: 11956268. DOI: 10.1200/JCO.2002.08.121
- Cancer Genome Atlas Research Network, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M, Morozova O, Robertson AG, Noushmehr H, Laird PW, Cherniack AD, Akbani R, Huse JT, Ciriello G, Poisson LM, Barnholtz-Sloan JS, Berger MS, Brennan C, Colen RR, Colman H, Flanders AE, Giannini C, Grifford M, Iavarone A, Jain R, Joseph I, Kim J, Kasaian K, Mikkelsen T, Murray BA, O'Neill BP, Pachter L, Parsons DW, Sougnez C, Sulman EP, Vandenberg SR, Van Meir EG, von Deimling A, Zhang H, Crain D, Lau K, Mallery D, Morris S, Paulauskis J, Penny R, Shelton T, Sherman M, Yena P, Black A, Bowen J, Dicostanzo K, Gastier-Foster J, Leraas KM, Lichtenberg TM, Pierson CR, Ramirez NC, Taylor C, Weaver S, Wise L, Zmuda E, Davidsen T, Demchok JA, Eley G, Ferguson ML, Hutter CM, Mills Shaw KR, Ozenberger BA, Sheth M, Sofia HJ, Tarnuzzer R, Wang Z, Yang L, Zenklusen JC, Ayala B, Baboud J, Chudamani S, Jensen MA, Liu J, Pihl T, Raman R, Wan Y, Wu Y, Ally A, Auman JT, Balasundaram M, Balu S, Baylin SB, Beroukhim R, Bootwalla MS, Bowlby R, Bristow CA, Brooks D, Butterfield Y, Carlsen R, Carter S, Chin L, Chu A, Chuah E, Cibulskis K, Clarke A, Coetzee SG, Dhalla N, Fennell T, Fisher S, Gabriel S, Getz G, Gibbs R, Guin R, Hadjipanayis A, Hayes DN, Hinoue T, Hoadley K, Holt RA, Hoyle AP, Jefferys SR, Jones S, Jones CD, Kucherlapati R, Lai PH, Lander E, Lee S, Lichtenstein L, Ma Y, Maglinte DT, Mahadeshwar HS, Marra MA, Mayo M, Meng S, Meyerson ML, Mieczkowski PA, Moore RA, Mose LE, Mungall AJ, Pantazi A, Parfenov M, Park PJ, Parker JS, Perou CM, Protopopov A, Ren X, Roach J, Sabedot TS, Schein J, Schumacher SE, Seidman JG, Seth S, Shen H, Simons JV, Sipahimalani P, Soloway MG, Song X, Sun H, Tabak B, Tam A, Tan D, Tang J, Thiessen N, Triche T Jr, Van Den Berg DJ, Veluvolu U, Waring S, Weisenberger DJ, Wilkerson MD, Wong T, Wu J, Xi L, Xu AW, Yang L, Zack TI, Zhang J, Aksoy BA, Arachchi H, Benz C, Bernard B, Carlin D, Cho J, DiCara D, Frazer S, Fuller GN, Gao J, Gehlenborg N, Haussler D, Heiman DI, Iype L, Jacobsen A, Ju Z, Katzman S, Kim H, Knijnenburg T, Kreisberg RB, Lawrence MS, Lee W, Leinonen K, Lin P, Ling S, Liu W, Liu Y, Liu Y, Lu Y, Mills G, Ng S, Noble MS, Paull E, Rao A, Reynolds S, Saksena G, Sanborn Z, Sander C, Schultz N, Senbabaoglu Y, Shen R, Shmulevich I, Sinha R, Stuart J, Sumer SO, Sun Y, Tasman N, Taylor BS, Voet D, Weinhold N, Weinstein JN, Yang D, Yoshihara K, Zheng S, Zhang W, Zou L, Abel T, Sadeghi S, Cohen ML, Eschbacher J, Hattab EM, Raghunathan A, Schniederjan MJ, Aziz D, Barnett G, Barrett W, Bigner DD, Boice L, Brewer C, Calatozzolo C, Campos B, Carlotti CG Jr, Chan TA, Cuppini L, Curley E, Cuzzubbo S, Devine K, DiMeco F, Duell R, Elder JB, Fehrenbach A, Finocchiaro G, Friedman W, Fulop J, Gardner J, Hermes B, Herold-Mende C, Jungk C, Kessler A, Lehman NL, Lipp E, Liu O, Mandt R, McGraw M, McLendon R, McPherson C, Neder L, Nguyen P, Noss A, Nunziata R, Ostrom QT, Palmer C, Perin A, Pollo B, Potapov A, Potapova O, Rathmell WK, Rotin D,

- Scarpace L, Schilero C, Senecal K, Shimmel K, Shurkhay V, Sifri S, Singh R, Sloan AE, Smolenski K, Staugaitis SM, Steele R, Thorne L, Tirapelli DP, Unterberg A, Vallurupalli M, Wang Y, Warnick R, Williams F, Wolinsky Y, Bell S, Rosenberg M, Stewart C, Huang F, Grimsby JL, Radenbaugh AJ and Zhang J: Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med* 372(26): 2481-2498, 2015. PMID: 26061751. DOI: 10.1056/NEJMoa1402121
- 5 Houillier C, Wang X, Kaloshi G, Mokhtari K, Guillemin R, Laffaire J, Paris S, Boisselier B, Idbah A, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Sanson M and Delattre JY: IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* 75(17): 1560-1566, 2010. PMID: 20975057. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181f96282
 - 6 Brown TJ, Bota DA, van Den Bent MJ, Brown PD, Maher E, Aregawi D, Liau LM, Buckner JC, Weller M, Berger MS and Glantz M: Management of low-grade glioma: a systematic review and meta-analysis. *Neurooncol Pract* 6(4): 249-258, 2019. PMID: 31386075. DOI: 10.1093/nop/npy034
 - 7 Jakola AS, Skjulsvik AJ, Myrnes KS, Sjøvik K, Unsgård G, Torp SH, Aaberg K, Berg T, Dai HY, Johnsen K, Kloster R and Solheim O: Surgical resection *versus* watchful waiting in low-grade gliomas. *Ann Oncol* 28(8): 1942-1948, 2017. PMID: 28475680. DOI: 10.1093/annonc/mdx230
 - 8 Schmohl JU, Nuebling T, Wild J, Jung J, Kroell T, Kanz L, Salih HR and Schmetzer H: Death receptor expression on blasts in AML is associated with unfavorable prognosis. *Anticancer Res* 35(7): 4043-4052, 2015. PMID: 26124353.
 - 9 Gundlach JP, Hauser C, Schlegel FM, Böger C, Röder C, Röcken C, Becker T, Egberts JH, Kalthoff H and Trauzold A: Cytoplasmic TRAIL-R1 is a positive prognostic marker in PDAC. *BMC Cancer* 18(1): 777, 2018. PMID: 30064384. DOI: 10.1186/s12885-018-4688-8
 - 10 Blok EJ, van den Bulk J, Dekker-Ensink NG, Derr R, Kanters C, Bastiaannet E, Kroep JR, van de Velde CJ and Kuppen PJ: Combined evaluation of the FAS cell surface death receptor and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic biomarker in breast cancer. *Oncotarget* 8(9): 15610-15620, 2017. PMID: 28121628. DOI: 10.18632/oncotarget.14779
 - 11 Pan G, Bauer JH, Haridas V, Wang S, Liu D, Yu G, Vincenz C, Aggarwal BB, Ni J and Dixit VM: Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett* 431(3): 351-356, 1998. PMID: 9714541. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00791-1
 - 12 McNeal S, Bitterman P, Bahr JM, Edassery SL, Abramowicz JS, Basu S and Barua A: Association of immunosuppression with DR6 expression during the development and progression of spontaneous ovarian cancer in laying hen model. *J Immunol Res* 2016: 6729379, 2016. PMID: 27579331. DOI: 10.1155/2016/6729379
 - 13 Kasof GM, Lu JJ, Liu D, Speer B, Mongan KN, Gomes BC and Lorenzi MV: Tumor necrosis factor- α induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF- κ B. *Oncogene* 20(55): 7965-7975, 2001. PMID: 11753679. DOI: 10.1038/sj.onc.1204985
 - 14 Bilecova-Rabajdova M, Urban P, Gregova K, Varga J, Fialkovicová V, Kruzliak P and Marekova M: Breast carcinoma progression and tumour vascular markers related to apoptotic mechanisms. *Dis Markers* 2014: 156034, 2014. PMID: 24696529. DOI: 10.1155/2014/156034
 - 15 Barua A, Yellapa A, Bahr JM, Abramowicz JS, Edassery SL, Basu S, Rotmensch J and Bitterman P: Expression of death receptor 6 by ovarian tumors in laying hens, a preclinical model of spontaneous ovarian cancer. *Transl Oncol* 5(4): 260-268, 2012. PMID: 22937178. DOI: 10.1593/tlo.12184
 - 16 Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, Botbyl J, Hammond R, Katsaros D, Sandaltzopoulos R, Liotta LA, Gimotty PA and Coukos G: Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 25(7): 852-861, 2007. PMID: 17327606. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.8583
 - 17 Tam EM, Morrison CJ, Wu YI, Stack MS and Overall CM: Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101(18): 6917-6922, 2004. PMID: 15118097. DOI: 10.1073/pnas.0305862101
 - 18 Yang K, Mooney C, Spahlinger G, Schuetz S, Arias-Pulido H, Verschraegen C, Gimotty P and Buckanovich RJ: DR6 as a diagnostic and predictive biomarker in adult sarcoma. *PLoS One* 7(5): e36525, 2012. PMID: 22567163. DOI: 10.1371/journal.pone.0036525
 - 19 Sasaroli D, Gimotty PA, Pathak HB, Hammond R, Kougoumtzidou E, Katsaros D, Buckanovich R, Devarajan K, Sandaltzopoulos R, Godwin AK, Scholler N and Coukos G: Novel surface targets and serum biomarkers from the ovarian cancer vasculature. *Cancer Biol Ther* 12(3): 169-180, 2011. PMID: 21617380. DOI: 10.4161/cbt.12.3.16260
 - 20 Miyanaga A, Masuda M, Motoi N, Tsuta K, Nakamura Y, Nishijima N, Watanabe SI, Asamura H, Tsuchida A, Seike M, Gemma A and Yamada T: Whole-exome and RNA sequencing of pulmonary carcinoid reveals chromosomal rearrangements associated with recurrence. *Lung Cancer* 145: 85-94, 2020. PMID: 32417679. DOI: 10.1016/j.lungcan.2020.03.027
 - 21 Strilic B, Yang L, Albarrán-Juárez J, Wachsmuth L, Han K, Müller UC, Pasparakis M and Offermanns S: Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis *via* death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* 536(7615): 215-218, 2016. PMID: 27487218. DOI: 10.1038/nature19076
 - 22 Yang X, Shi B, Li L, Xu Z, Ge Y, Shi J, Liu Y and Zheng D: Death receptor 6 (DR6) is required for mouse B16 tumor angiogenesis *via* the NF- κ B, P38 MAPK and STAT3 pathways. *Oncogenesis* 5: e206, 2016. PMID: 26950598. DOI: 10.1038/onsis.2016.9
 - 23 DeRosa DC, Ryan PJ, Okragly A, Witcher DR and Benschop RJ: Tumor-derived death receptor 6 modulates dendritic cell development. *Cancer Immunol Immunother* 57(6): 777-787, 2008. PMID: 17962943. DOI: 10.1007/s00262-007-0413-1
 - 24 Stegmann S, Werner JM, Kuhl S, Röhn G, Krischek B, Stavrinou P, Goldbrunner R and Timmer M: Death receptor 6 (DR6) is overexpressed in astrocytomas. *Anticancer Res* 39(5): 2299-2306, 2019. PMID: 31092421. DOI: 10.21873/anticancer.13346
 - 25 Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C and Schultz N: The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2(5): 401-404, 2012. PMID: 22588877. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095
 - 26 Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C and Schultz N: Integrative analysis of complex cancer

- genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6(269): p11, 2013. PMID: 23550210. DOI: 10.1126/scisignal.2004088
- 27 Szlosarek PW, Grimshaw MJ, Kulbe H, Wilson JL, Wilbanks GD, Burke F and Balkwill FR: Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium. *Mol Cancer Ther* 5(2): 382-390, 2006. PMID: 16505113. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0303
 - 28 Blank AE, Baumgarten P, Zeiner P, Zachskorn C, Löffler C, Schittenhelm J, Czupalla CJ, Capper D, Plate KH, Harter PN and Mittelbronn M: Tumour necrosis factor receptor superfamily member 9 (TNFRSF9) is up-regulated in reactive astrocytes in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 41(2): e56-e67, 2015. PMID: 24606203. DOI: 10.1111/nan.12135
 - 29 Tachibana O, Nakazawa H, Lampe J, Watanabe K, Kleihues P and Ohgaki H: Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytomas. *Cancer Res* 55(23): 5528-5530, 1995. PMID: 7585627.
 - 30 Gratas C, Tohma Y, Van Meir EG, Klein M, Tenan M, Ishii N, Tachibana O, Kleihues P and Ohgaki H: Fas ligand expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors. *Brain Pathol* 7(3): 863-869, 1997. PMID: 9217971. DOI: 10.1111/j.1750-3639.1997.tb00889.x
 - 31 Werner JM, Kuhl S, Stavrinou P, Röhn G, Krischek B, Blau T, Goldbrunner R and Timmer M: Expression of FAS-L differs from primary to relapsed low-grade gliomas and predicts progression-free survival. *Anticancer Res* 37(12): 6639-6648, 2017. PMID: 29187439. DOI: 10.21873/anticancer.12121
 - 32 Werner JM, Kuhl S, Ulrich K, Krischek B, Stavrinou P, Goldbrunner R and Timmer M: Expression of CD40 correlates negatively with overall and progression-free survival of low- and high-grade gliomas. *World Neurosurg* 130: e17-e25, 2019. PMID: 31125770. DOI: 10.1016/j.wneu.2019.05.112
 - 33 Kuijlen JM, Mooij JJ, Platteel I, Hoving EW, van der Graaf WT, Span MM, Hollema H and den Dunnen WF: TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 78(2): 161-171, 2006. PMID: 16544055. DOI: 10.1007/s11060-005-9081-1
 - 34 Ishimura N, Isomoto H, Bronk SF and Gores GJ: Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(1): G129-G136, 2006. PMID: 16166346. DOI: 10.1152/ajpgi.00242.2005
 - 35 Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H and Okumura K: Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 7(1): 94-100, 2001. PMID: 11135622. DOI: 10.1038/83416
 - 36 Mocellin S and Nitti D: TNF and cancer: the two sides of the coin. *Front Biosci* 13: 2774-2783, 2008. PMID: 17981752. DOI: 10.2741/2884
 - 37 Hoving S, Seynhaeve AL, van Tiel ST, aan de Wiel-Ambagtsheer G, de Bruijn EA, Eggermont AM and ten Hagen TL: Early destruction of tumor vasculature in tumor necrosis factor-alpha-based isolated limb perfusion is responsible for tumor response. *Anticancer Drugs* 17(8): 949-959, 2006. PMID: 16940805. DOI: 10.1097/01.cad.0000224450.54447.b3
 - 38 Lienard D, Ewalenko P, Delmotte JJ, Renard N and Lejeune FJ: High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *J Clin Oncol* 10(1): 52-60, 1992. PMID: 1727926. DOI: 10.1200/JCO.1992.10.1.52
 - 39 Sethi G, Sung B and Aggarwal BB: TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Front Biosci* 13: 5094-5107, 2008. PMID: 18508572. DOI: 10.2741/3066
 - 40 Egberts JH, Cloosters V, Noack A, Schniewind B, Thon L, Klose S, Kettler B, von Forstner C, Kneitz C, Tepel J, Adam D, Wajant H, Kalthoff H and Trauzold A: Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 68(5): 1443-1450, 2008. PMID: 18316608. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5704
 - 41 Tang D, Tao D, Fang Y, Deng C, Xu Q and Zhou J: TNF-alpha promotes invasion and metastasis via NF-Kappa B pathway in oral squamous cell carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res* 23: 141-149, 2017. PMID: 28386055. DOI: 10.12659/msmbr.903910
 - 42 Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Galkovitch-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E and Ben-Neriah Y: NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431(7007): 461-466, 2004. PMID: 15329734. DOI: 10.1038/nature02924
 - 43 Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Yamaguchi N, Yagita H and Okumura K: Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol* 214(2): 194-200, 2001. PMID: 12088418. DOI: 10.1006/cimm.2001.1896
 - 44 Seki N, Hayakawa Y, Brooks AD, Wine J, Wiltroth RH, Yagita H, Tanner JE, Smyth MJ and Sayers TJ: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis is an important endogenous mechanism for resistance to liver metastases in murine renal cancer. *Cancer Res* 63(1): 207-213, 2003. PMID: 12517799.
 - 45 Trauzold A, Siegmund D, Schniewind B, Sipos B, Egberts J, Zorenkov D, Emme D, Röder C, Kalthoff H and Wajant H: TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 25(56): 7434-7439, 2006. PMID: 16751802. DOI: 10.1038/sj.onc.1209719
 - 46 He Y, Yu Z, Ge D, Wang-Sattler R, Thiesen HJ, Xie L and Li Y: Cell type specificity of signaling: view from membrane receptors distribution and their downstream transduction networks. *Protein Cell* 3(9): 701-713, 2012. PMID: 22802048. DOI: 10.1007/s13238-012-2049-y

Received November 1, 2021
 Revised November 30, 2021
 Accepted December 7, 2021

4. Diskussion

Die dargestellte Arbeit charakterisiert die Expression von DR6 in WHO Grad 2 diffusen Gliomen und untersucht seine Rolle als Prognosefaktor sowohl in unserer Patientengruppe als auch der „brain lower grade glioma study“ des TCGA.

4.1. Expression von DR6 in niedriggradigen Gliomen

Es konnte gezeigt werden, dass DR6 im Vergleich zu peritumoralem Gewebe in niedriggradigen Gliomen erhöht exprimiert ist. Dies reiht sich in vorherige Ergebnisse ein, die nachweisen, dass der Rezeptor in manchen Gliomentitäten hochreguliert ist.¹⁷ Zudem zeigte sich eine vermehrte Expression in WHO Grad 2 Rezidiven im Vergleich zu Primärtumoren und dieses Ergebnis bestätigte sich auch in Tumorprobenpaaren von den gleichen Patienten. Betrachtet man die Primärtumore allein, so ergab sich auf Transkriptions-Ebene kein Unterschied in der Expression zwischen Tumor- und Kontrollgruppe.

Daneben konnten wir erstmalig die Expression von DR6 in Abhängigkeit des IDH1-Status der Tumore analysieren. Dabei zeigte sich, dass der Rezeptor vor allem in IDH1-mutierten Tumoren hochreguliert wird. Zukünftige Studien sind notwendig, um diesen Zusammenhang auf Grundlage der neuen WHO Klassifikation und des 1p/19q Kodeletionsstatus genauer zu untersuchen.

4.2. DR6 als Prognosefaktor in Gliomen

Wie die neueste Klassifikation der WHO gezeigt hat, sind tumorbiologische Marker essentiell zur besseren diagnostischen und prognostischen Einschätzung von Gliomen.¹ Während insbesondere Sequenzierungsanalysen von Gliomen wie der TCGA Datenbank geholfen haben, die Eigenschaften der Tumore besser zu verstehen,² bleiben viele Fragen wie beispielsweise die Entstehungszelle der Hirntumore und Risikofaktoren für die Erkrankung weitestgehend ungeklärt.^{5,149–151} Ein tiefergehendes Verständnis und die Identifikation weiterer Charakteristika und Marker der Erkrankung sind somit wichtig, um das Verhalten der Tumore noch besser vorhersagen zu können.

DR6 zeigte in primären niedriggradigen Gliomen einen positiven prognostischen Wert in unserer Patientengruppe mit einem längeren PFS. Dieses Ergebnis deckt sich mit ähnlichen Trends in der TCGA Datenbank. DR6 könnte in primären Gliomen beispielsweise durch das Auslösen von Apoptose eine antikarzinogene Wirkung ausüben. Die genauen Mechanismen, durch welche es zur Aktivierung des Zelltodes durch den Rezeptor in Tumoren kommt, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.^{13,20,21} Es wurde gezeigt, dass der Ligand APP von Tumorzellen exprimiert werden kann, um DR6 zu aktivieren¹⁵ und unter physiologischen Bedingungen kann es durch die Interaktion von APP mit dem Rezeptor zum Zelltod

kommen.¹⁰⁷ Jedoch kann der Rezeptor auch selber Apoptose auslösen, wenn er überexprimiert wird.^{12,13} Daneben haben He et al.²² gezeigt, dass der Signalweg von DR6 in Gliomen verändert ist und der Rezeptor sowohl über die Interaktion mit FADD und TRADD, als auch über TRAIL den Zelltod auslösen könnte.

Im Gegensatz dazu war eine hohe DR6 Expression in WHO Grad 2 Rezidiven mit einem kürzeren OS vergesellschaftet und es wurde bereits nachgewiesen, dass der Rezeptor unter anderem durch den NF- κ B Signalweg eine prokarzinogene Wirkung entfalten kann.^{14–16} Unter welchen Umständen es jedoch zur Auslösung des jeweiligen Signalweges und der unterschiedlichen Wirkweisen kommt, bleibt ungewiss. DR6 leitet nur in bestimmten Zelllinien Apoptose ein, während andere Zellen gegenüber dem Mechanismus resistent sind.^{12,13} So führt beispielsweise eine ektope Expression des Rezeptors in einer Zervixkarzinom-Zelllinie zum Zelltod, während die Brustkrebszelllinie MCF7 keine Zeichen von Apoptose aufweist.¹² Bezogen auf Prostatakrebs zeigte Kasof et al.¹³, dass Zelllinien mit niedriger DR6 Expression sensitiv gegenüber dem Signalweg des Rezeptors sind, während Prostatakrebs-Zelllinien mit hoher Expression keine Zeichen von Apoptose tragen. Stattdessen wiesen die Autoren eine vermehrte Expression des antiapoptotischen Moleküls B-cell lymphoma-extra large (Bcl-x_L) und Aktivierung des NF- κ B Signalwegs in diesen Zellen nach. Beide Mechanismen schützen die Zellen mit hoher DR6 Expression möglicherweise durch ihre Überlebenssignale vor dem durch den Rezeptor ausgelösten Zelltod.¹³

NF- κ B ist in niedriggradigen Gliomen vergleichsweise gering exprimiert.^{152,153} In Glioblastomen wurde gezeigt, dass Bcl-X_L in Rezidiven im Vergleich zu Primärtumoren hochreguliert wird¹⁵⁴ und dass das proapoptotische Molekül *in vitro* vor allem von Tumorsphären der Gliomstammzellen exprimiert wird, welche an der Entwicklung von Rezidiven beteiligt sind.¹⁵⁵ Sowohl IDH-Wildtyp als auch IDH-mutierte WHO Grad 4 Gliomzelllinien sprechen nach Chemo- oder Radiotherapie auf eine Inhibition von Bcl-x_L an.^{156,157} Inwieweit BCL-x_L auch in WHO Grad 2 Rezidiven exprimiert wird und ob auch in dieser Tumorentität ein Zusammenhang zwischen der Expression des proapoptotischen Moleküls und DR6 besteht, der zu einer Resistenz gegenüber der vom Rezeptor eingeleiteten Apoptose führt, muss noch erforscht werden.

Insgesamt scheint sich der Apoptose-Signalweg von DR6 deutlich von dem anderer Todesrezeptoren zu unterscheiden.^{20–22} Eine genaue Studie der Signalwege von DR6 und der auslösenden Faktoren in Tumoren ist notwendig, um den Rezeptor und seine Rolle in der Krebsentstehung und Prognoseeinschätzung besser zu verstehen.

Wang et al.¹¹ bestätigten kürzlich einen protektiven Wert von DR6 sowohl in niedrig- als auch hochgradigen Gliomen der TCGA Datenbank. Zudem konnten sie mit Hilfe von TNFSF und TNFRSF Mitgliedern eine Signatur erstellen, die das 1-, 3- und 5-Jahres Überleben von Gliomen sowohl im TCGA Datensatz als auch anderen Datenbanken wie dem Chinesischen

Gliom-Genomatlas (engl. Chinese Glioma Genome Atlas [CGGA]) besser vorhersagt als die bisher häufig herangezogenen Faktoren Alter und WHO Grad. Diese Ergebnisse unterstreichen neben anderen Studien die vielversprechende Rolle, die TNFSF und TNFRSF Mitglieder in der Prognoseeinschätzung von Gliomen spielen.^{7,9,10}

4.3. Andere Anwendungsbereiche für DR6 in Gliomen

Aktuell werden Vorsorgeuntersuchungen für Gliome bei Patienten mit erhöhtem Erkrankungsrisiko nur mittels MRT durchgeführt.^{4,5} Angesichts dessen würde die Entwicklung diagnostischer Marker, die verlässlich, kostengünstig und einfach nachweisbar sind, die Früherkennung der Erkrankung erleichtern.^{4,5} Ob DR6 durch seine erhöhte Expression in Gliomen ein möglicher Kandidat zur Evaluation als diagnostischer Marker ist, muss in weiteren Studien untersucht werden. Zwar wurde gezeigt, dass der Rezeptor in anderen Tumorentitäten von Tumorzellen und -gefäßen exprimiert und mittels MMP-14 gespalten wird^{16,136,137}, sodass er im Serum von Patienten nachgewiesen werden kann.^{16,134,138} Es bleibt jedoch ungewiss, ob ein ähnliches Expressionsmuster in Gliomen vorliegt. In glioneuronalen Tumoren wurde eine Expression primär um Zellkörper von Neuronen herum sowie in deren Perikarya nachgewiesen.¹⁴⁷ Zu welchem Zeitpunkt der Gliomentwicklung die Expression von DR6 hochreguliert wird, ist außerdem nicht bekannt. Zudem zeigte sich in WHO Grad 2 Primärtumoren kein signifikanter Anstieg der Expression auf mRNA Ebene im Vergleich zu peritumoralen Gewebe. Eine genaue Analyse des Expressionsortes des Rezeptors in Gliomen und dessen Vorkommen im Blut von Gliompatienten ist daher notwendig, um dessen diagnostische Rolle genauer zu analysieren.

Die Rolle von Tumornekrosefaktoren in der Therapie von Gliomen wird stetig untersucht. Beispielsweise wird aktuell eine Behandlungskombination aus agonistischem TNFRSF18 Antikörper, Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) Antikörper und stereotaktischer Radiochirurgie in rezidivierenden Glioblastomen in einer Phase-II-Studie untersucht (*NCT04225039*). Der TNF Rezeptor soll dabei die Immunantwort gegenüber den Tumorzellen verstärken.^{158–160} Eine Kombinationstherapie mit einem agonistischen TNFRSF5 Antikörper wird in einer Phase-I-Studie in rezidivierenden WHO Grad 3 und 4 Gliomen getestet (*NCT04547777*).¹⁶¹ Im Mausmodell löste eine Therapie mit TNFRSF5 Antikörpern die Apoptose von Tumorzellen aus.¹⁶²

DR6 könnte als Zelloberflächenrezeptor ebenfalls ein interessanter Kandidat zur Evaluation als Therapiestrategie sein. So führte beispielsweise ein Inhibitor der Interaktion von DR6 und APP *in vitro* zu einer verminderten hämatogenen Metastasenbildung.¹⁶³ Jedoch muss dessen ambivalente Rolle in Gliomen zunächst genauer untersucht werden – bisher bleibt unklar, inwieweit ein agonistischer oder antagonistischer Therapieansatz zum Einsatz kommen müsste. Da der Rezeptor auch physiologisch in Organen wie beispielsweise dem Gehirn

exprimiert wird,¹² ist zudem eine spezifische Therapie, die lediglich den Tumor, nicht aber das umliegende physiologische Gewebe angreift, schwierig zu realisieren.

4.4. Limitationen der Arbeit

Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen von WHO Grad 2 Gliomen basieren auf der WHO Klassifikation 2007.²⁷ Damit wurden molekulare Eigenschaften wie der IDH-Mutationsstatus und die 1p/19q Kodeletion bei der Einteilung der Tumore nicht berücksichtigt. Zudem findet sich in dieser Klassifikation noch die Gruppe der Oligoastrozytome, welche in den folgenden Klassifikationen größtenteils in die Gruppe der Oligodendrogliome und Astrozytome integriert wurde.¹

Zur besseren Einordnung der Ergebnisse haben wir nachträglich den IDH1-Mutationsstatus der analysierten Tumorproben erhoben. IDH1-Mutationen machen den Großteil der IDH-Mutationen in diffusen Gliomen aus. Erste Untersuchungen des IDH-Status in diffusen Gliomen zählten über 90% der Mutationen zu IDH1.^{30,31} Die Gruppe der IDH-Wildtyp Gliome enthält jedoch möglicherweise IDH2-mutierte Gliome.

Als Kontrollprobe für die Expressionsanalyse wurde aufgrund fehlender Verfügbarkeit von Proben gesunder Patienten peritumorales, histologisch normales Gewebe verwendet. Zum einen ist bekannt, dass sich Gliome diffus in das gesamte Gehirn ausbreiten und sich Tumorzellen auch in histologisch vermeintlich gesundem Gewebe befinden.^{53,54} Zum anderen wurde gezeigt, dass das den Tumor umgebende Mikromilieu im Vergleich zu gesundem Hirngewebe verändert und besonders reich an Zellen des Immunsystems ist.¹⁶⁴ DR6, der als Rezeptor Einfluss auf das Immunsystem nimmt, könnte damit eine aberrante Expression im Mikromilieu aufweisen, sodass dieses Gewebe als Vergleichsprobe möglicherweise nicht vollständig repräsentativ ist.^{16,115,116,118}

Patienten mit Gliom-Rezidiv wurden in ihrer Vergangenheit zur Behandlung des Primärtumors mit unterschiedlichen Therapiestrategien versorgt. Diese beinhalteten eine alleinige Operation, eine adjuvante Radiotherapie, stereotaktische Brachytherapie und kombinierte Radiotherapie und stereotaktische Brachytherapie. Diese Behandlungsunterschiede wurden aufgrund ihrer Vielfältigkeit und der dadurch entstehenden vielen Untergruppen in der Analyse der Expressions- und Überlebensdaten nicht berücksichtigt. Die durch die unterschiedlichen Therapieregime entstehende Heterogenität der Tumore könnte jedoch die Ergebnisse der Auswertungen verzerren.

Für die Analyse von DR6 als Prognosefaktor bei Rezidivpatienten lagen insgesamt noch wenige Patientenproben und -daten vor. Zur genaueren Beurteilung der Rolle von DR6 in Rezidiven ist daher eine größere Patientenkohorte notwendig.

Die Studie der TCGA Datenbank zu „Brain Lower Grade Glioma“ umfasst sowohl WHO Grad 2 als auch Grad 3 Tumore.² Die Vergleichbarkeit mit der von uns erhobenen Kohorte ist daher eingeschränkt.

5. Literaturverzeichnis

- 1 WHO Classification of Tumours Editorial Board, ed. Central nervous system tumours. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2021.
- 2 Brat DJ, Verhaak RGW, Aldape KD, et al. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* 2015; **372**: 2481–98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1402121>.
- 3 Ostrom QT, Price M, Neff C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2015–2019. *Neuro-oncology* 2022; **24**: v1-v95. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noac202>.
- 4 Wick W, et al. Gliome, S2k-Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2021. <https://www.dgn.org/leitlinien> (zuletzt abgerufen am 26.10.2022).
- 5 Weller M, van den Bent M, Preusser M, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; **18**: 170–186. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-00447-z>.
- 6 Tachibana O, Nakazawa H, Lampe J, Watanabe K, Kleihues P, Ohgaki H. Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytomas. *Cancer Res* 1995; **55**: 5528–30.
- 7 Werner J-M, Kuhl S, Stavrinou P, et al. Expression of FAS-L Differs from Primary to Relapsed Low-grade Gliomas and Predicts Progression-free Survival. *Anticancer Res* 2017; **37**: 6639–48. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.12121>.
- 8 Nitta T, Ebato M, Sato K, Okumura K. Expression of tumour necrosis factor- α , - β and interferon- γ genes within human neuroglial tumour cells and brain specimens. *Cytokine* 1994; **6**: 171–80. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/1043-4666(94)90039-6).
- 9 Kuijlen JMA, Mooij JJA, Platteel I, et al. TRAIL-receptor expression is an independent prognostic factor for survival in patients with a primary glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2006; **78**: 161–71. <https://doi.org/10.1007/s11060-005-9081-1>.
- 10 Werner J-M, Kuhl S, Ulrich K, et al. Expression of CD40 Correlates Negatively with Overall and Progression-Free Survival of Low- and High-Grade Gliomas. *World Neurosurg* 2019; **130**: e17-e25. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.05.112>.
- 11 Wang Q-W, Lin W-W, Zhu Y-J. Comprehensive analysis of a TNF family based-signature in diffuse gliomas with regard to prognosis and immune significance. *Cell Commun Signal* 2022; **20**: 6. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00814-y>.

- 12 Pan G, Bauer JH, Haridas V, et al. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett* 1998; **431**: 351–56.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00791-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00791-1).
- 13 Kasof GM, Lu JJ, Liu D, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF-kappaB. *Oncogene* 2001; **20**: 7965–75. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204985>.
- 14 Yang X, Shi B, Li L, et al. Death receptor 6 (DR6) is required for mouse B16 tumor angiogenesis via the NF-κB, P38 MAPK and STAT3 pathways. *Oncogenesis* 2016; **5**: e206. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2016.9>.
- 15 Strilic B, Yang L, Albarrán-Juárez J, et al. Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis. *Nature* 2016; **536**: 215–18.
<https://doi.org/10.1038/nature19076>.
- 16 DeRosa DC, Ryan PJ, Okragly A, Witcher DR, Benschop RJ. Tumor-derived death receptor 6 modulates dendritic cell development. *Cancer Immunol Immunother* 2008; **57**: 777–87. <https://doi.org/10.1007/s00262-007-0413-1>.
- 17 Stegmann S, Werner J-M, Kuhl S, et al. Death Receptor 6 (DR6) Is Overexpressed in Astrocytomas. *Anticancer Res* 2019; **39**: 2299–306.
<https://doi.org/10.21873/anticanres.13346>.
- 18 Yu W, Wang W, Yu X. Investigation of lncRNA-mRNA co-expression network in ETV6-RUNX1-positive pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS ONE* 2021; **16**: e0253012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253012>.
- 19 Xu H, Yin L, Xu Q, Xiang J, Xu R. N6-methyladenosine methylation modification patterns reveal immune profiling in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Cell Int* 2022; **22**: 199.
<https://doi.org/10.1186/s12935-022-02614-x>.
- 20 Zeng L, Li T, Xu DC, et al. Death receptor 6 induces apoptosis not through type I or type II pathways, but via a unique mitochondria-dependent pathway by interacting with Bax protein. *J Biol Chem* 2012; **287**: 29125–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362038>.
- 21 Zhang J, Zhao ZJ, Fu X, et al. Proapoptotic Mitochondrial Carrier Homolog Protein PSAP Mediates Death Receptor 6 Induced Apoptosis. *J Alzheimers Dis* 2020; **74**: 1097–106.
<https://doi.org/10.3233/JAD-191086>.
- 22 He Y, Yu Z, Ge D, et al. Cell type specificity of signaling: view from membrane receptors distribution and their downstream transduction networks. *Protein Cell* 2012; **3**: 701–13.
<https://doi.org/10.1007/s13238-012-2049-y>.
- 23 Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe. Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin, 2021.
<https://doi.org/10.25646/8353>.

- 24 Pignatti F, van den Bent M, Curran D, et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 2076–84. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.08.121>.
- 25 Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. “Mini-mental state”. *Journal of Psychiatric Research* 1975; **12**: 189–98. [https://doi.org/10.1016/0022-3956\(75\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6).
- 26 Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc* 2005; **53**: 695–99. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x>.
- 27 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds. WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: International Agency for Research of Cancer, 2007.
- 28 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds. WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2016.
- 29 Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; **321**: 1807–12. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>.
- 30 Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; **360**: 765–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808710>.
- 31 Hartmann C, Meyer J, Balss J, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 2009; **118**: 469–74. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0561-9>.
- 32 Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro-oncology* 2016; **18**: 16–26. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov136>.
- 33 Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; **462**: 739–44. <https://doi.org/10.1038/nature08617>.
- 34 Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012; **483**: 474–78. <https://doi.org/10.1038/nature10860>.
- 35 Turcan S, Rohle D, Goenka A, et al. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012; **483**: 479–83. <https://doi.org/10.1038/nature10866>.
- 36 Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 2011; **19**: 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.014>.
- 37 Flavahan WA, Drier Y, Liau BB, et al. Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature* 2016; **529**: 110–14. <https://doi.org/10.1038/nature16490>.

- 38 Watanabe T, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* 2009; **174**: 1149–53. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080958>.
- 39 Reuss DE, Mamatjan Y, Schrimpf D, et al. IDH mutant diffuse and anaplastic astrocytomas have similar age at presentation and little difference in survival: a grading problem for WHO. *Acta Neuropathol* 2015; **129**: 867–73. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1438-8>.
- 40 Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors. *N Engl J Med* 2015; **372**: 2499–508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407279>.
- 41 Suzuki H, Aoki K, Chiba K, et al. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet* 2015; **47**: 458–68. <https://doi.org/10.1038/ng.3273>.
- 42 Stockhammer F, Misch M, Helms H-J, et al. IDH1/2 mutations in WHO grade II astrocytomas associated with localization and seizure as the initial symptom. *Seizure* 2012; **21**: 194–97. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2011.12.007>.
- 43 Sun Z-L, Chan AK-Y, Chen L-C, et al. TERT promoter mutated WHO grades II and III gliomas are located preferentially in the frontal lobe and avoid the midline. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; **8**: 11485–94.
- 44 Venteicher AS, Tirosh I, Hebert C, et al. Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science* 2017; **355**: eaai8478. <https://doi.org/10.1126/science.aai8478>.
- 45 Heaphy CM, Wilde RF de, Jiao Y, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* 2011; **333**: 425. <https://doi.org/10.1126/science.1207313>.
- 46 Bettgowda C, Agrawal N, Jiao Y, et al. Mutations in CIC and FUBP1 contribute to human oligodendroglioma. *Science* 2011; **333**: 1453–55. <https://doi.org/10.1126/science.1210557>.
- 47 Weissmann S, Cloos PA, Sidoli S, Jensen ON, Pollard S, Helin K. The Tumor Suppressor CIC Directly Regulates MAPK Pathway Genes via Histone Deacetylation. *Cancer Res* 2018; **78**: 4114–25. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0342>.
- 48 Langford L, Piatyszek M, Shay J, Schold S. Telomerase activity in human brain tumours. *The Lancet* 1995; **346**: 1267–68. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)91865-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)91865-5).
- 49 Houillier C, Wang X, Kaloshi G, et al. IDH1 or IDH2 mutations predict longer survival and response to temozolomide in low-grade gliomas. *Neurology* 2010; **75**: 1560–66. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181f96282>.
- 50 van den Bent MJ, Smits M, Kros JM, Chang SM. Diffuse Infiltrating Oligodendroglioma and Astrocytoma. *JCO* 2017; **35**: 2394–401. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.6737>.

- 51 Hartmann C, Hentschel B, Simon M, et al. Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 5146–57. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0017>.
- 52 Weller M, Knobbe-Thomsen CB, Le Rhun E, Reifenberger G. Die WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems 2021. *Onkologe* 2022; **28**: 155–63. <https://doi.org/10.1007/s00761-021-01083-7>.
- 53 Osswald M, Jung E, Sahm F, et al. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* 2015; **528**: 93–98. <https://doi.org/10.1038/nature16071>.
- 54 Sahm F, Capper D, Jeibmann A, et al. Addressing diffuse glioma as a systemic brain disease with single-cell analysis. *Arch Neurol* 2012; **69**: 523–26. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.2910>.
- 55 Horbinski C, Berger T, Packer RJ, Wen PY. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours. *Nat Rev Neurol* 2022; **18**: 515–29. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00679-w>.
- 56 Stummer W, Stocker S, Wagner S, et al. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery* 1998; **42**: 518-25; discussion 525-6. <https://doi.org/10.1097/00006123-199803000-00017>.
- 57 Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The Lancet Oncology* 2006; **7**: 392–401. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70665-9).
- 58 Senft C, Bink A, Franz K, Vatter H, Gasser T, Seifert V. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *The Lancet Oncology* 2011; **12**: 997–1003. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70196-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70196-6).
- 59 Buckner JC, Shaw EG, Pugh SL, et al. Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma. *N Engl J Med* 2016; **374**: 1344–55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500925>.
- 60 van den Bent MJ, Tesileanu CMS, Wick W, et al. 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* 2021; **22**: 813–23. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00090-5).
- 61 van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol* 2013; **31**: 344–50. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.2229>.

- 62 Cairncross G, Wang M, Shaw E, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *JCO* 2013; **31**: 337–43. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.2674>.
- 63 Walker MD, Alexander E, Hunt WE, et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg* 1978; **49**: 333–43. <https://doi.org/10.3171/jns.1978.49.3.0333>.
- 64 Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC. Structure, Function, and Inhibition of O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. In: Cohn WE, Moldave K, eds. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, v. 51. San Diego: Academic Press, 1995: 167–223.
- 65 Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1350–54. <https://doi.org/10.1056/NEJM200011093431901>.
- 66 Hegi ME, Diserens A-C, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; **352**: 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>.
- 67 Wick W, Gorlia T, Bendszus M, et al. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med* 2017; **377**: 1954–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707358>.
- 68 Afonso M, Brito MA. Therapeutic Options in Neuro-Oncology. *Int J Mol Sci* 2022; **23**: 5351. <https://doi.org/10.3390/ijms23105351>.
- 69 Karmur BS, Philteos J, Abbasian A, et al. Blood-Brain Barrier Disruption in Neuro-Oncology: Strategies, Failures, and Challenges to Overcome. *Front Oncol* 2020; **10**: 563840. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.563840>.
- 70 Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, et al. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014; **344**: 1396–401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>.
- 71 Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012; **119**: 651–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225>.
- 72 Aggarwal BB, Henzel WJ, Moffat B, Kohr WJ, Harkins RN. Primary structure of human lymphotoxin derived from 1788 lymphoblastoid cell line. *J Biol Chem* 1985; **260**: 2334–44.
- 73 Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* 1985; **260**: 2345–54.
- 74 Aggarwal BB, Moffat B, Harkins RN. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem* 1984; **259**: 686–91.

- 75 Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res* 2013; **62**: 641–51. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0633-0>.
- 76 Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Current Opinion in Cell Biology* 1999; **11**: 255–60. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(99\)80034-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(99)80034-9).
- 77 Tartaglia LA, Ayres T, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 1993; **74**: 845–53. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90464-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90464-2).
- 78 Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* 1993; **268**: 10932–37.
- 79 Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J* 2009; **23**: 1625–37. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111005>.
- 80 Ashkenazi A, Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; **30**: 337–56. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013226>.
- 81 Li H, Zhu H, Xu C, Yuan J. Cleavage of BID by Caspase 8 Mediates the Mitochondrial Damage in the Fas Pathway of Apoptosis. *Cell* 1998; **94**: 491–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81590-1).
- 82 Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 Interacting Protein, Mediates Cytochrome c Release from Mitochondria in Response to Activation of Cell Surface Death Receptors. *Cell* 1998; **94**: 481–90. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81589-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81589-5).
- 83 Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003; **10**: 45–65. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401189>.
- 84 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; **72**: 3666–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3666>.
- 85 O'Malley WE, Achinstein B, Shear MJ. Journal of the National Cancer Institute, Vol. 29, 1962: Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. *Nutr Rev* 1988; **46**: 389–91. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1988.tb05376.x>.
- 86 Coley WB. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med* 1910; **3**: 1–48.
- 87 Kogosov V. S3-Leitlinie „Adulte Weichgewebesarkome“. *Chirurg* 2022; **93**: 520. <https://doi.org/10.1007/s00104-022-01632-9>.

- 88 Kimura K, Taguchi T, Urushizaki I, et al. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987; **20**: 223–29. <https://doi.org/10.1007/BF00570490>.
- 89 Moritz T, Niederle N, Baumann J, et al. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor alpha in advanced malignant disease. *Cancer Immunol Immunother* 1989; **29**: 144–50. <https://doi.org/10.1007/BF00199290>.
- 90 Egberts J-H, Cloosters V, Noack A, et al. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 2008; **68**: 1443–50. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5704>.
- 91 Tang D, Tao D, Fang Y, Deng C, Xu Q, Zhou J. TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res* 2017; **23**: 141–49. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.903910>.
- 92 Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; **431**: 461–66. <https://doi.org/10.1038/nature02924>.
- 93 Mocellin S, Nitti D. TNF and cancer: the two sides of the coin. *Front Biosci* 2008; **13**: 2774–83. <https://doi.org/10.2741/2884>.
- 94 Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; **9**: 361–71. <https://doi.org/10.1038/nrc2628>.
- 95 Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol (Dordr)* 2020; **43**: 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00489-1>.
- 96 Karstedt S von, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer* 2017; **17**: 352–66. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.28>.
- 97 Thapa B, Kc R, Uludağ H. TRAIL therapy and prospective developments for cancer treatment. *J Control Release* 2020; **326**: 335–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.013>.
- 98 Naylor MS, Stamp GW, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest* 1993; **91**: 2194–206. <https://doi.org/10.1172/JCI116446>.
- 99 Koyama S, Koike N, Adachi S. Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptors in gastric carcinoma and tumor-infiltrating lymphocytes: a possible mechanism of immune evasion of the tumor. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002; **128**: 73–79. <https://doi.org/10.1007/s004320100292>.

- 100 Schwab U, Stein H, Gerdes J, et al. Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature* 1982; **299**: 65–67. <https://doi.org/10.1038/299065a0>.
- 101 Riddick E, Evans S, Rousch J, Gwebu E, Banerjee HN. Identification of death receptors DR4 and DR5 in HTB-12 astrocytoma cell lines and determination of TRAIL sensitivity. *J Solid Tumors* 2013; **3**: 20–26. <https://doi.org/10.5430/jst.v3n6p20>.
- 102 Gundlach J-P, Hauser C, Schlegel FM, et al. Cytoplasmic TRAIL-R1 is a positive prognostic marker in PDAC. *BMC Cancer* 2018; **18**: 777. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4688-8>.
- 103 Haselmann V, Kurz A, Bertsch U, et al. Nuclear death receptor TRAIL-R2 inhibits maturation of let-7 and promotes proliferation of pancreatic and other tumor cells. *Gastroenterology* 2014; **146**: 278–90. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.009>.
- 104 Blok EJ, van den Bulk J, Dekker-Ensink NG, et al. Combined evaluation of the FAS cell surface death receptor and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic biomarker in breast cancer. *Oncotarget* 2017; **8**: 15610–20. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14779>.
- 105 Schmohl JU, Nuebling T, Wild J, et al. Death Receptor Expression on Blasts in AML Is Associated with Unfavorable Prognosis. *Anticancer Res* 2015; **35**: 4043–52.
- 106 Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK, et al. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature* 2003; **425**: 805–11. <https://doi.org/10.1038/nature02055>.
- 107 Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 2009; **457**: 981–89. <https://doi.org/10.1038/nature07767>.
- 108 Xu K, Olsen O, Tzvetkova-Robev D, Tessier-Lavigne M, Nikolov DB. The crystal structure of DR6 in complex with the amyloid precursor protein provides insight into death receptor activation. *Genes Dev* 2015; **29**: 785–90. <https://doi.org/10.1101/gad.257675.114>.
- 109 Olsen O, Kallop DY, McLaughlin T, et al. Genetic analysis reveals that amyloid precursor protein and death receptor 6 function in the same pathway to control axonal pruning independent of β -secretase. *J Neurosci* 2014; **34**: 6438–47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3522-13.2014>.
- 110 Klíma M, Broučková A, Koc M, Anděra L. T-cell activation triggers death receptor-6 expression in a NF- κ B and NF-AT dependent manner. *Mol Immunol* 2011; **48**: 1439–47. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.03.021>.
- 111 Mi S, Lee X, Hu Y, et al. Death receptor 6 negatively regulates oligodendrocyte survival, maturation and myelination. *Nat Med* 2011; **17**: 816–21. <https://doi.org/10.1038/nm.2373>.

- 112 Yong Y, Gamage K, Cheng I, et al. p75^{NTR} and DR6 Regulate Distinct Phases of Axon Degeneration Demarcated by Spheroid Rupture. *J Neurosci* 2019; **39**: 9503–20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1867-19.2019>.
- 113 Colombo A, Hsia H-E, Wang M, et al. Non-cell-autonomous function of DR6 in Schwann cell proliferation. *EMBO J* 2018; **37**: e97390. <https://doi.org/10.15252/embj.201797390>.
- 114 Tam SJ, Richmond DL, Kaminker JS, et al. Death receptors DR6 and TROY regulate brain vascular development. *Dev Cell* 2012; **22**: 403–17. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.11.018>.
- 115 Liu J, Na S, Glasebrook A, et al. Enhanced CD4⁺ T Cell Proliferation and Th2 Cytokine Production in DR6-Deficient Mice. *Immunity* 2001; **15**: 23–34. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00162-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00162-5).
- 116 Zhao H, Yan M, Wang H, Erickson S, Grewal IS, Dixit VM. Impaired c-Jun amino terminal kinase activity and T cell differentiation in death receptor 6-deficient mice. *J Exp Med* 2001; **194**: 1441–48. <https://doi.org/10.1084/jem.194.10.1441>.
- 117 Liu J, Heuer JG, Na S, et al. Accelerated onset and increased severity of acute graft-versus-host disease following adoptive transfer of DR6-deficient T cells. *J Immunol* 2002; **169**: 3993–98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3993>.
- 118 Schmidt CS, Liu J, Zhang T, et al. Enhanced B cell expansion, survival, and humoral responses by targeting death receptor 6. *J Exp Med* 2003; **197**: 51–62. <https://doi.org/10.1084/jem.20020617>.
- 119 Li J, Du Q, Hu R, et al. Death receptor 6 is a novel plasmacytoid dendritic cell-specific receptor and modulates type I interferon production. *Protein Cell* 2016; **7**: 291–94. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0239-0>.
- 120 Huang G, Lee X, Bian Y, et al. Death receptor 6 (DR6) antagonist antibody is neuroprotective in the mouse SOD1^{G93A} model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e841. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.378>.
- 121 Hu R, Du Q, Yin X, Li J, Wang T, Zhang L. Agonist antibody activates death receptor 6 downstream signaling involving TRADD recruitment. *FEBS Lett* 2014; **588**: 401–07. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.12.010>.
- 122 Hu Y, Lee X, Shao Z, et al. A DR6/p75^{NTR} complex is responsible for β -amyloid-induced cortical neuron death. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e579. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.110>.
- 123 Xu Y, Wang D, Luo Y, et al. Beta amyloid-induced upregulation of death receptor 6 accelerates the toxic effect of N-terminal fragment of amyloid precursor protein. *Neurobiol Aging* 2015; **36**: 157–68. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.027>.

- 124 Wang Y, Zhao D, Pan B, et al. Death Receptor 6 and Caspase-6 Regulate Prion Peptide-Induced Axonal Degeneration in Rat Spinal Neurons. *J Mol Neurosci* 2015; **56**: 966–76. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0562-1>.
- 125 Yong Y, Gamage K, Cushman C, Spano A, Deppmann C. Regulation of degenerative spheroids after injury. *Sci Rep* 2020; **10**: 15472. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71906-x>.
- 126 Gamage KK, Cheng I, Park RE, et al. Death Receptor 6 Promotes Wallerian Degeneration in Peripheral Axons. *Curr Biol* 2017; **27**: 890–96. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.062>.
- 127 Schmidt CS, Zhao J, Chain J, et al. Resistance to myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis by death receptor 6-deficient mice. *J Immunol* 2005; **175**: 2286–92. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.4.2286>.
- 128 Göteson A, Isgren A, Jonsson L, et al. Cerebrospinal fluid proteomics targeted for central nervous system processes in bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2021; **26**: 7446–53. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01236-5>.
- 129 Schroeder JW, Smith AK, Brennan PA, et al. DNA methylation in neonates born to women receiving psychiatric care. *Epigenetics* 2012; **7**: 409–14. <https://doi.org/10.4161/epi.19551>.
- 130 Thalamuthu A, Mills NT, Berger K, et al. Genome-wide interaction study with major depression identifies novel variants associated with cognitive function. *Mol Psychiatry* 2022; **27**: 1111–19. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01379-5>.
- 131 Venkataraman C, Justen K, Zhao J, Galbreath E, Na S. Death receptor-6 regulates the development of pulmonary eosinophilia and airway inflammation in a mouse model of asthma. *Immunology Letters* 2006; **106**: 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.04.009>.
- 132 Fujikura D, Ikesue M, Endo T, Chiba S, Higashi H, Uede T. Death receptor 6 contributes to autoimmunity in lupus-prone mice. *Nat Commun* 2017; **8**: 13957. <https://doi.org/10.1038/ncomms13957>.
- 133 McNeal S, Bitterman P, Bahr JM, et al. Association of Immunosuppression with DR6 Expression during the Development and Progression of Spontaneous Ovarian Cancer in Laying Hen Model. *J Immunol Res* 2016; **2016**: 6729379. <https://doi.org/10.1155/2016/6729379>.
- 134 Bilecova-Rabajdova M, Urban P, Gregova K, et al. Breast carcinoma progression and tumour vascular markers related to apoptotic mechanisms. *Dis Markers* 2014; **2014**: 156034. <https://doi.org/10.1155/2014/156034>.

- 135 Urban P, Rabajdova MB, Varga J, et al. Vascular marker expression during the development of various types of gynaecological malignancy. *Tumour Biol* 2014; **35**: 11229–35. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2447-2>.
- 136 Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, et al. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 852–61. <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.8583>.
- 137 Barua A, Yellapa A, Bahr JM, et al. Expression of death receptor 6 by ovarian tumors in laying hens, a preclinical model of spontaneous ovarian cancer. *Transl Oncol* 2012; **5**: 260–68. <https://doi.org/10.1593/tlo.12184>.
- 138 Yang K, Mooney C, Spahlinger G, et al. DR6 as a diagnostic and predictive biomarker in adult sarcoma. *PLoS ONE* 2012; **7**: e36525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036525>.
- 139 Overall CM, Tam EM, Kappelhoff R, et al. Protease degradomics: mass spectrometry discovery of protease substrates and the CLIP-CHIP, a dedicated DNA microarray of all human proteases and inhibitors. *Biol Chem* 2004; **385**: 493–504. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.058>.
- 140 Gao X, Di Huang, Li S-G, et al. Identification and Validation of Prognosis-Related Necroptosis Genes for Prognostic Prediction in Hepatocellular Carcinoma. *J Oncol* 2022; **2022**: 3172099. <https://doi.org/10.1155/2022/3172099>.
- 141 Qiu H, Song H, Luo M, et al. Dysfunction of apoptosis and autophagy correlates with local recurrence in esophageal squamous cell carcinoma after definitive chemoradiation. *Cancer Cell Int* 2021; **21**: 466. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02171-9>.
- 142 Zhang W, Li C, Wu F, et al. Analyzing and Validating the Prognostic Value of a TNF-Related Signature in Kidney Renal Clear Cell Carcinoma. *Front Mol Biosci* 2021; **8**: 689037. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.689037>.
- 143 Xin S, Mao J, Duan C, et al. Identification and Quantification of Necroptosis Landscape on Therapy and Prognosis in Kidney Renal Clear Cell Carcinoma. *Front Genet* 2022; **13**: 832046. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.832046>.
- 144 Chen R, Niu L, Wu L, He Y, Liu G, Hong K. Identification of an endoplasmic reticulum stress-associated gene signature to predict the immune status and prognosis of cutaneous melanoma. *Medicine (Baltimore)* 2022; **101**: e30280. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000030280>.
- 145 Song B, Wu P, Liang Z, et al. A Novel Necroptosis-Related Gene Signature in Skin Cutaneous Melanoma Prognosis and Tumor Microenvironment. *Front Genet* 2022; **13**: 917007. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.917007>.

- 146 Iyer A, Prabowo A, Anink J, Spliet WGM, van Rijen PC, Aronica E. Cell injury and premature neurodegeneration in focal malformations of cortical development. *Brain Pathol* 2014; **24**: 1–17. <https://doi.org/10.1111/bpa.12060>.
- 147 Prabowo AS, Iyer AM, Veersema TJ, et al. Expression of neurodegenerative disease-related proteins and caspase-3 in glioneuronal tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2015; **41**: e1-e15. <https://doi.org/10.1111/nan.12143>.
- 148 Annibaldi A, Walczak H. Death Receptors and Their Ligands in Inflammatory Disease and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2020; **12**: a036384. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036384>.
- 149 Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013; **155**: 462–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.034>.
- 150 Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, et al. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer* 2008; **113**: 1953–68. <https://doi.org/10.1002/cncr.23741>.
- 151 Cahill D, Turcan S. Origin of Gliomas. *Semin Neurol* 2018; **38**: 5–10. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1620238>.
- 152 Ius T, Ciani Y, Ruaro ME, et al. An NF- κ B signature predicts low-grade glioma prognosis: a precision medicine approach based on patient-derived stem cells. *Neuro-oncology* 2018; **20**: 776–87. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox234>.
- 153 Wang H, Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WSL, Fuller GN. Analysis of the activation status of Akt, NF κ B, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest* 2004; **84**: 941–51. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700123>.
- 154 Strik H, Deininger M, Streffer J, et al. BCL-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; **67**: 763–68. <https://doi.org/10.1136/jnnp.67.6.763>.
- 155 Fanfone D, Idbaih A, Mammi J, Gabut M, Ichim G. Profiling Anti-Apoptotic BCL-xL Protein Expression in Glioblastoma Tumorspheres. *Cancers* 2020; **12**: 2853. <https://doi.org/10.3390/cancers12102853>.
- 156 Rahman M, Olson I, Mansour M, et al. Selective Vulnerability of Senescent Glioblastoma Cells to BCL-XL Inhibition. *Mol Cancer Res* 2022; **20**: 938–48. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0029>.
- 157 Karpel-Massler G, Ishida CT, Bianchetti E, et al. Induction of synthetic lethality in IDH1-mutated gliomas through inhibition of Bcl-xL. *Nat Commun* 2017; **8**: 1067. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00984-9>.
- 158 Miska J, Rashidi A, Chang AL, et al. Anti-GITR therapy promotes immunity against malignant glioma in a murine model. *Cancer Immunol Immunother* 2016; **65**: 1555–67. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1912-8>.

- 159 Amoozgar Z, Kloeppe J, Ren J, et al. Targeting Treg cells with GITR activation alleviates resistance to immunotherapy in murine glioblastomas. *Nat Commun* 2021; **12**: 2582. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22885-8>.
- 160 Patel MA, Kim JE, Theodoros D, et al. Agonist anti-GITR monoclonal antibody and stereotactic radiation induce immune-mediated survival advantage in murine intracranial glioma. *J Immunother Cancer* 2016; **4**: 28. <https://doi.org/10.1186/s40425-016-0132-2>.
- 161 Desjardins A, Chandramohan V, Landi DB, et al. A phase 1 trial of D2C7-it in combination with an Fc-engineered anti-CD40 monoclonal antibody (2141-V11) administered intratumorally via convection-enhanced delivery for adult patients with recurrent malignant glioma (MG). *JCO* 2022; **40**: e14015-e14015. https://doi.org/10.1200/JCO.2022.40.16_suppl.e14015.
- 162 Shoji T, Saito R, Chonan M, et al. Local convection-enhanced delivery of an anti-CD40 agonistic monoclonal antibody induces antitumor effects in mouse glioma models. *Neuro-oncology* 2016; **18**: 1120–28. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now023>.
- 163 Wang L, Shen Q, Liao H, et al. Multi-Arm PEG/Peptidomimetic Conjugate Inhibitors of DR6/APP Interaction Block Hematogenous Tumor Cell Extravasation. *Adv Sci (Weinh)* 2021; **8**: e2003558. <https://doi.org/10.1002/advs.202003558>.
- 164 Klemm F, Maas RR, Bowman RL, et al. Interrogation of the Microenvironmental Landscape in Brain Tumors Reveals Disease-Specific Alterations of Immune Cells. *Cell* 2020; **181**: 1643-1660.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.007>.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Gesamtüberleben von Gliompatienten abhängig von histologischen und molekularen Charakteristika. S. 17

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. WHO Klassifikation der diffusen Gliome 2021^{1,52} S. 14