

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**DNA methylierungsbasierte Verbesserung der Klassifikation
sinunasaler Tumore**

**DNA methylation-based refinement of sinonasal tumor
classification**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Ingrid Glöß

Datum der Promotion: 23. März 2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	iv
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	4
1.1 Anatomie und Histologie des sinunasalen Raums	4
1.2 klinische Bedeutung undifferenzierter sinunasaler Tumore	5
1.3 die Problematik histopathologischer Tumordiagnostik undifferenzierter sinunasaler Tumore	8
1.4 molekulare Charakterisierung undifferenzierter sinunasaler Tumore	9
1.5 <i>IDH2</i> mutierte sinunasale Tumore	13
1.6 Fragestellung	15
2 Methodik	16
2.1 Auswahl der Tumorentitäten und Fallakquise	16
2.2 <i>IDH2</i> mutierte sinunasale Tumore	16
2.3 Histologie und Immunhistochemie	17
2.4 DNA Extraktion	18
2.5 Pyrosequenzierung	18
2.6 DNA Methylierungsanalyse	19
2.7 tSNE-Dimensionsreduktionsanalyse	20
2.8 unsupervidierte Clusteranalyse	21
2.9 Kopiezahlanalyse	21
2.10 statistische Analyse	22
3. Ergebnisse	23
3.1 demographische und klinische Daten	23

3.2 Pathologie	23
3.2.1 Histopathologie.....	23
3.2.2 neuroendokrine Marker	24
3.3 molekulare Analysen.....	24
3.3.1 DNA Methylierungsanalyse	24
3.3.2 Kopiezahlveränderungen.....	25
3.4 Outcome-Überlebensanalyse.....	27
4. Diskussion	28
4.1 Kurze Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse.....	28
4.2 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand.....	29
4.3 Stärken und Schwächen der Studie	32
4.4 Nutzen für die klinische Praxis	33
4.5 Ausblick auf weitere Forschungsaspekte	34
5. Schlussfolgerungen	35
Literaturverzeichnis	36
Eidesstattliche Versicherung	46
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	48
Auszug aus der Journal Summary List	50
Druckexemplar der Publikation.....	51
Lebenslauf.....	67
Komplette Publikationsliste.....	69
Danksagung	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der sinunasale Raum.	5
Abbildung 2: tSNE der DNA Methylierungsdaten.	25
Abbildung 3: Kopiezahlveränderungen.	26
Abbildung 4: Vergleich der Kopiezahlveränderungen.	31

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
BRD4	bromodomain-containing protein 4
CIMP	CpG Island Methylator Phenotyp
DFS	disease free survival, krankheitsfreies Überleben
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSS	disease specific survival, krankheitsspezifisches Überleben
EBV	Epstein-Barr-Virus
FDA	Food and Drug Administration
FFPE	formalin fixed paraffin embedded
HE	Hämatoxylin und Eosin
HPV	human papilloma virus, humanes Papillomvirus
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IDH2	Isocitrat-Dehydrogenase 2
INI1	Integrase interactor 1
INSM1	Insulinoma-associated 1
LCNEC	large cell neuroendocrine carcinoma, großzelliges neuroendokrines Karzinom
mbp	Megabasensaare
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
MSK-IMPACTTM	MSK-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets
NA	not applicable, nicht einschätzbar
NEC	neuroendokrines Karzinom
NGS	next generation sequencing, Hochdurchsatz Sequenzierung
NUT	Nuclear protein in testis
ONB	olfactoriusneuroblastoma, Olfactoriusneuroblastom
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PNET	primitive neuroektodermale Tumore
PPi	Pyrophosphationen
RCT	randomised controlled trial, randomisiert kontrollierte Studie
SNEC	sinonasal neuroendocrine carcinoma, sinunasal neuroendokrines Karzinom
SNP	single nucleotide polymorphism, Einzel-Nukleotid Polymorphismen
SNUC	sinonasal undifferentiated carcinoma, sinunasal undifferenziertes Karzinom
tSNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Zusammenfassung

Der sinunasale Raum bietet in Anbetracht seiner geringen anatomischen Größe einer enormen Bandbreite an Tumorentitäten die Möglichkeit zur Entstehung. Ein für die Forschung bedeutender Fokus liegt hierbei auf der Diagnostik und Klassifizierung von undifferenzierten sinunasalen Tumoren. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, in Anlehnung an den DNA methylierungsbasierten Tumorclassifier für Tumore des Zentralnervensystems von Capper et al. [1], eine diagnostische Neuorientierung für schwer einzuordnende sinunasale Tumore zu erarbeiten. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf undifferenzierten sinunasalen Tumoren mit einer *Isocitrat-Dehydrogenase 2 (IDH2)* Mutation und der Frage, ob es mehrere Tumorentitäten im sinunasalen Raum gibt, die *IDH2* mutiert sind oder ob die *IDH2* Mutation ein molekular bestimmendes Merkmal für eine einzelne neue Tumorentität im sinunasalen Raum ist. Dieser Frage wurde im Paper von Glöss et al. [2] nachgegangen, welches als Basis für diese Dissertation angesehen werden kann. Insgesamt wurden 165 sinunasale Tumore, von denen 40 *IDH2* mutiert waren, histomorphologisch und hinsichtlich ihres DNA Methylierungsprofils analysiert. 125 sinunasale Tumore waren vom *IDH2*-Wildtyp und dienten der Studie als Vergleichsgruppe. Von den *IDH2* mutierten sinunasalen Tumoren umfassten an histologischen Diagnosen 25 (64%) sinusal undifferenziertes Karzinom (SNUC), 8 (21%) großzellige neuroendokrine Tumore (LCNEC), 2 (5%) undifferenzierte Adenokarzinome, ein (3%) Olfactoriusneuroblastom (ONB) und 3 (8%) *IDH2*-mutierte Tumore mit Merkmalen, die histologisch an ein ONB denken ließen, aber nicht eindeutig klassifizierbar waren. Alle *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore zeigten histomorphologische Eigenschaften von hochgradig undifferenzierten Tumoren. In der t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) Analyse bildeten alle *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore eine gemeinsame eigenständige Gruppe, die sich deutlich vom Vergleichskollektiv abgrenzte, unabhängig vom histologischen Erscheinungsbild der einzelnen *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore. Zu den wiederkehrenden Kopiezahlveränderungen gehörten ein Chromosom 1q-Zugewinn (79%), ein 17p-Verlust (76%) und ein 17q-Gewinn (57%). Des Weiteren wurden keine Unterschiede in den Kopiezahlveränderungen zwischen *IDH2* mutierten SNUC und LCNEC festgestellt. *IDH2* mutierte sinunasale Tumore zeigten ein besseres krankheitsspezifisches Überleben als sinunasale Tumore mit einem INI1-Verlust ($p=0,027$) und *IDH2*-Wildtyp Tumore insgesamt ($p=0,042$). Auf molekularer Ebene sind *IDH2* mutierte sinunasale Tumore bemerkenswert homogen und unterscheiden sich

von IDH2-Wildtyp-Tumoren. Ausgehend von dieser Erkenntnis können wir davon ausgehen, dass die *IDH2* Mutation das dominierende Merkmal dieser Gruppe ist und das biologische Verhalten mehr durch die spezifischen molekularen Eigenschaften der IDH2 Gruppe bestimmt wird als durch das histologische Erscheinungsbild.

Abstract

Due to its small anatomical size, the sinonasal space offers the possibility for the development of an enormous range of tumor entities. An important focus of research is the diagnosis and classification of undifferentiated sinonasal tumors. The aim of this dissertation was to perform a diagnostic reclassification for sinonasal tumors, in particular for sinonasal tumors that are difficult to classify diagnostically, following the DNA methylation-based tumor classifier for tumors of the central nervous system by Capper et al [1]. Another focus was on undifferentiated sinonasal tumors with an *IDH2* mutation and whether there are multiple tumor entities in the sinonasal space that are *IDH2* mutated or whether the *IDH2* mutation is a molecular defining feature for a single novel tumor entity in the sinonasal anatomic area. This question was investigated in the paper by Glöss et al [2], which can be considered as the basis for this dissertation. A total of 165 sinonasal tumors, 40 of which were *IDH2* mutated, were analyzed histomorphologically and by DNA methylation profiling. 125 sinonasal tumors were IDH2 wild-type and served as the comparison group for the study. All tumors were evaluated by light microscopy and subjected to DNA methylation analysis. Of the *IDH2* mutated sinonasal tumors, histologic diagnoses included 25 (64%) sinonasal undifferentiated carcinoma (SNUC), 8 (21%) large cell neuroendocrine tumors (LCNEC), 2 (5%) undifferentiated adenocarcinomas, one (3%) olfactory neuroblastoma (ONB), and 3 (8%) *IDH2* mutated tumors with features histologically suggestive of ONB but not clearly classifiable. All *IDH2* mutant sinonasal tumors showed histomorphologic features of high grade tumors.

In tSNE analysis, all *IDH2* mutant sinonasal tumors formed a common distinct group that was clearly distinguishable from the comparison group, regardless of the histological appearance of the individual *IDH2* mutant sinonasal tumors. Recurrent copy number variations included chromosome 1q gain (79%), 17p loss (76%), and 17q gain (58%). No differences in copy number variations were observed between *IDH2* mutant SNUC and

LCNEC. *IDH2* mutant sinonasal tumors showed better disease-specific survival than sinonasal tumors with an *INI1* loss ($p=0.027$) and *IDH2* wild-type tumors overall ($p=0.042$). *IDH2* mutant sinonasal tumors are remarkably homogeneous at the molecular level and are distinct from *IDH2* wild-type tumors.

Based on this finding, we can assume that the *IDH2* mutation is the dominant feature of this group and that the biological behavior is determined more by the specific molecular aspects of the *IDH2* group than by the histological appearance.

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Histologie des sinunasalen Raums

Der sinunasale Raum stellt sich sowohl anatomisch als auch histologisch komplexe dar. Anatomisch werden zum sinunasalen Raum die Nase mit den angrenzenden Nasennebenhöhlen und der Nasopharynx gezählt. Die Nase ist durch 4 Wände begrenzt. Das Dach bildet die Regio olfactoria, welche die Riechzellen beherbergt. Der Boden der Nase wird vom harten Gaumen geformt. Die laterale Wand wird durch 3 knöchernen Nasenmuscheln, die Conchae nasales, gebildet. Die Nasenmuscheln sind innen mit Schleimhaut überdeckt. Durch Ausführungsgänge haben sie direkte Anbindung zu den Nasennebenhöhlen, sowie zu den Tränendrüsen. Die mediale Wand wird durch das Septum nasi begrenzt, welches wiederum die zwei paarigen Nasenhauptgänge voneinander trennt. Von den Nasenhaupthöhlen abgehend und durch die Nasenmuscheln verbunden, findet man 4 paranasale Räume, die Nasennebenhöhlen. Diese sind pneumatisiert und dienen zum einen der Vergrößerung des Resonanzraums für das Sprechen, zum anderen verringern sie das Gewicht des menschlichen Schädels. Die Nasennebenhöhlen haben engen Kontakt zu angrenzenden anatomischen Strukturen wie der Orbita, der vorderen Schädelgrube und der Kieferhöhle. Von den insgesamt 4 Nasennebenhöhlen, dem Sinus frontalis, dem Sinus sphenoidalis, dem Sinus ethmoidales und dem Sinus maxillaris, stellt der letztgenannte den größten Raum dar. Die Nase und die Nasennebenhöhlen bilden somit eine zusammenhängende anatomische und funktionelle Einheit.

Kenntnisse über die anatomischen Verhältnisse sind vor allem in der bildgebenden Diagnostik von Tumorerkrankungen von Bedeutung, um Ausdehnung und Verhalten einer Neoplasie, sowie mögliche Symptome beurteilen zu können. Durch die engen nachbarschaftlichen Beziehungen lassen sich typische Symptome wie Nasenatmungsbehinderung, Riech- und Sehstörungen, sowie ungewollter Tränenfluss erklären.

Histologisch werden 3 Regionen unterschieden: die Regio cutanea, die Regio respiratoria und die Regio olfactoria. In der Regio cutanea findet sich mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel, sowie Talgdrüsen und apokrine Schweißdrüsen. Die Regio respiratoria besteht wiederum aus 3 Gewebsschichten. Die erste Schicht stellt das mehrreihige Flim-

merepithel dar, in welches Becherzellen eingestreut sind. Darunter folgt die Basalmembran, von der sämtliche Zellen des Epithels ausgehen. Es folgt die Lamina propria, welche ein dichtes Kapillarnetz und Lymphozyten aufweist. Des Weiteren finden sich in dieser Region submuköse Drüsen, die das Nasensekret bilden. Die Regio olfactoria, auch Riechschleimhaut genannt, besteht aus einem mehrreihigen Epithel mit Riechzellen, Stützzellen und Basalzellen. Die Riechzellen sind primäre Sinneszellen. Im Gegensatz zu sekundären Sinneszellen, wie den Geschmacksknospen der Zunge, sind primäre Sinneszellen neuroektodermalen Ursprungs und stellen somit Neurone dar. Anders als sekundäre Sinneszellen, die endo- oder ektodermalen Ursprungs sind, können primäre Sinneszellen Rezeptorpotenziale in Aktionspotenziale eigenständig umwandeln, da sie ein Axon besitzen.

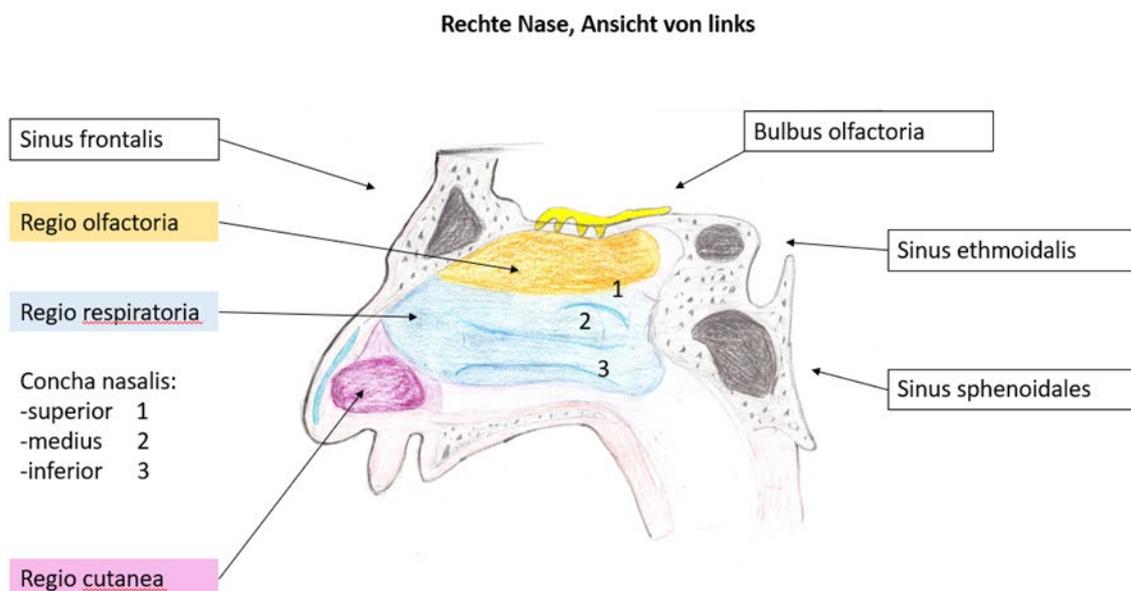


Abbildung 1: Der sinunasale Raum (eigene Darstellung). Anatomisch orientierende Zeichnung des sinunasalen Raumes mit wesentlichen, in dieser Arbeit beschriebenen, Strukturen.

1.2 klinische Bedeutung undifferenzierter sinunasaler Tumore

Durch das Vorkommen von epithelalem, mesenchymalem und neuroektodermalem Gewebe, bietet der sinunasale Raum trotz seiner engen anatomischen Verhältnisse den unterschiedlichsten Tumorentitäten die Möglichkeit zur Entstehung. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) beschreibt insgesamt 40 sinunasale Tumorentitäten mit jeweili-

gen Untergruppen [3]. Insgesamt gehören sinunasale Tumore zu den eher seltenen Tumoren. In der WHO werden sie mit einer Inzidenz von gerade einmal 0,5-1 auf 100.000 Einwohner angegeben.[3]

Zu den häufigsten sinunasalen Tumoren gehört das Plattenepithelkarzinom und das intestinale Adenokarzinom, welche zusammengenommen etwa 70% aller sinunasalen Tumore ausmachen. Undifferenzierte sinunasale Karzinome hingegen machen nur etwa 7% aller Tumoren in dieser anatomischen Region aus. [3]

Zu den undifferenzierten sinunasalen Tumoren werden vor allem das SNUC, das SMARCB1(INI1) - defiziente sinunasale Karzinom, das ONB, das LCNEC, das kleinzellige neuroendokrine Karzinom, das Nuclear protein in testis (NUT)-Karzinom, das Ewing-Sarkom, das sinunasale Schleimhautmelanom und sinunasale Lymphome gezählt. [4]

Undifferenzierte sinunasale Tumore gelten als aggressive, schnell wachsende Tumore mit einer schlechten Überlebensprognose für die Patienten. Am Beispiel des SNUC, welches der häufigste Vertreter aus der Gruppe der undifferenzierten sinunasalen Tumore ist, soll das klinische Verhalten dieser Gruppe dargestellt werden.

Das SNUC wurde zum ersten Mal 1986 von Frierson et al. beschrieben. Bereits damals wurde es als aggressiver und schnell wachsender Tumor mit der Tendenz der destruktiven Invasion benachbarter Strukturen wie Orbita und Schädelbasis dargestellt. [6]

Die meisten bisher publizierten Studien zu SNUC arbeiteten mit eher geringen Fallzahlen. Dies erklärt, warum es aktuell keine größeren epidemiologischen Studien zu SNUC zu verzeichnen gibt. Die WHO gibt für das SNUC eine Inzidenz von 0,02 Fällen auf 100.000 Einwohner pro Jahr an. Sie kommen in jeder Altersgruppe vor, betreffen jedoch überwiegend Männer im Alter zwischen 50 und 60 Jahren. [3]

Eindeutige ätiologische Faktoren konnten bislang für das SNUC nicht festgestellt werden. Zur diagnostischen Differenzierung bietet es sich jedoch an, den Epstein-Barr-Virus (EBV) und human papilloma virus (HPV) - Status zu bestimmen, da SNUCs im Gegensatz zu verschiedenen anderen sinunasalen Tumoren keine Assoziation zu diesen Virusinfektionen zeigen. [7]

Das SNUC verursachen zumeist Kopfschmerzen, beständiges Druckgefühl im nasalen und frontalen Bereich des Schädels, Riech- und Sehstörungen, sowie eine Behinderung der Nasenatmung und Nasenbluten. Wie oben beschrieben, lässt sich dies auf die anatomischen Verhältnisse im sinunasalen Raum zurückführen.

Am häufigsten entsteht das SNUC im Sinus maxillaris (60%), gefolgt von der Nasenhaupthöhle (20-30%), dem Sinus ethmoidale (10-15%) und dem Sinus frontalis und sphenoidalis (~1%) [3].

Die Diagnose SNUC ist mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert. Als Parameter für die klinische Prognose gelten die 5-Jahres-Überlebensrate und das Gesamtüberleben. Khan et al. verglichen in einer Studie die besten therapeutischen Optionen für SNUCs und ermittelten eine 5 Jahres-Überlebensrate von unter 60%. [8]

In einer Studie mit einem großen Patientenkollektiv von über 318 Patienten mit der Diagnose SNUC, ermittelten Lehmann et al. eine 5 Jahre-Überlebensrate von sogar nur 34,9%. [9] Haupteinflussfaktoren für die schlechte klinische Prognose des SNUCs sind zum einen die Tumorgröße und das Tumorstadium, sowie der Status der lymphatischen Metastasierung. In einer Metaanalyse schlossen Morand et al. 29 klinische Fallstudien ein. Dabei zeigte sich, dass 80,9% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose ein fortgeschrittenes T4- Tumorstadium aufwiesen und 16% bereits eine Lymphknotenmetastasierung zeigten. [10]

Die Einteilung der sinunasalen Tumore erfolgt über die TNM-Klassifikation. Dabei beschreibt das T-Stadium die Tumorgröße, das N-Stadium den Lymphknotenbefall und dessen Größe und das M-Stadium das Vorhandensein von Fernmetastasen. Bei Wittekind und Meyer wird zusätzlich zwischen verschiedenen Lokalisationen des Primärtumors unterschieden. Die Einteilung bezieht sich auf Karzinome des Sinus ethmoidale, der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen. [11]

Der Status der Halslymphknoten ist ein wichtiger prognostischer Faktor und mitentscheidend für die Prognose einer sinunasalen Krebserkrankung. Aufgrund des vielfältigen Erscheinungsbildes mit teils uncharakteristischer Beschwerdesymptomatik werden die Tumoren häufig erst in einem fortgeschrittenem Tumorstadium, das heißt Stadium III oder IV erkannt. [12] Das klinische Stadium wird in Europa durch UICC vergeben. Dabei wird sich an der TNM Klassifikation orientiert. Ein undifferenzierter sinunasaler Tumor, der sich in einem klinischen Stadium IV befindet, hat bereits angrenzende Organstrukturen infiltriert und weist sowohl Lymphknoten als auch Fernmetastasen auf. [13]

Desweiteren limitiert der ungünstige Sitz dieser Tumoren in der Nähe zu lebenswichtigen Strukturen und Organen, wie Carotis, Orbita oder Großhirn, die vollständige Tumorentfernung im Gesunden. Die sogenannte R0-Resektion stellt den Idealzustand dar. R0 bedeutet in der Histopathologie, dass der gesamte Tumor entfernt werden konnte und kein weiteres Tumorgewebe im Resektionsrand nachweisbar ist. Ein R0 Zustand verringert

dabei die Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv. Aufgrund der komplexen anatomischen Verhältnisse kann ein R0 Zustand bei SNUC jedoch nur selten hergestellt werden.

Die therapeutische Strategie zur Behandlung des SNUCs basiert heutzutage aber nicht mehr nur alleinig auf der chirurgischen Resektion des Tumors. Morand et al. konnten in ihrer Metanalyse aufzeigen, dass eine Zweifachtherapie einen wesentlichen Überlebensvorteil gegenüber einer isolierten Resektion oder Radiotherapie zeigten. Dabei schien es egal, ob die Therapie aus einer Kombination aus chirurgischer Resektion und Radiatio oder einer Kombination aus Chemotherapie, sowohl neoadjuvant als auch adjuvant, und Radiatio bestand. Interessanter Weise ergab eine Dreifachtherapie aus Resektion und Radiochemotherapie keinen Vorteil im Vergleich zur Zweifachtherapie. [10]

Von enormer Wichtigkeit, egal um welchen undifferenzierten sinunasalen Tumor es sich handelt, ist die exakte Diagnosestellung. Eine möglichst exakte Diagnose zu stellen, hat für die Prognose des Patienten eine enorme Bedeutung. Eine differenzierte und akkurate Diagnostik ist entscheidend für die bestmögliche Wahl der therapeutischen Strategie.

Doch gerade die spezifische Klassifikation undifferenzierter sinunasaler Tumore ist in vielerlei Hinsicht schwer.

1.3 die Problematik histopathologischer Tumordiagnostik undifferenzierter sinunasaler Tumore

Ein wesentlicher Bestandteil der Diagnostik von sinunasalen Tumoren ist die mikroskopische Begutachtung und histologische Auswertung. Undifferenzierte sinunasale Tumore präsentieren sich zumeist mit einem hohen Anteil an anaplastischen Zellen, einer hohen Rate an Mitosefiguren und Nekrosearealen. Dies sind alles allgemeine Merkmale von undifferenzierten Tumoren. Das Hauptproblem der histologischen Diagnostik von undifferenzierten sinunasalen Tumoren liegt darin, dass eindeutige histomorphologische Merkmale und eine spezifische Differenzierung der Zellen fehlen oder bisher nicht bekannt sind.

In der aktuellen Version der WHO Klassifikation für Tumoren des Kopf- Hals- Bereichs ist die Diagnose des SNUCs immer noch eine Ausschlussdiagnose.[3] Das bedeutet, dass eine Vielzahl anderer potenziell in Frage kommender Entitäten ausgeschlossen werden müssen, bevor die Diagnose eines SNUC vergeben werden kann.

So definiert die WHO das SNUC als eine undifferenzierte epitheliale Neoplasie, der eine spezifische plattenepitheliale, glanduläre, mesenchymale oder melanozytische histologi-

sche oder immunologische Differenzierung fehlt. [3] Die alleinige Definition auf Basis eines Ausschlusses birgt jedoch die Gefahr von Fehldiagnosen durch das subjektive Empfinden von Pathologen, ob eine spezifische histologische Differenzierung vorhanden ist oder nicht. So kann es vorkommen, dass die Diagnose SNUC für viele andere undifferenzierte sinunasale Tumore verwendet wird und andere undifferenzierte Tumore wie zum Beispiel das ONB oder andere sinunasale Tumore mit neuroendokriner Differenzierung als SNUC verkannt werden. Denn prinzipiell kann das SNUC eine neuroendokrine Differenzierung aufweisen und somit durchaus einem neuroendokrinen Karzinom ähneln. [14]

Weitere limitierende Faktoren bei der exakten histologischen Diagnosestellung sind die zumeist geringen Mengen an Biopsiematerial, sowie die niedrige Inzidenzrate und die damit verbundene Schwierigkeit für Pathologen und Neuropathologen Erfahrung und Routine in der Diagnostik dieser Tumore zu erlangen.

Es ist fraglich, wie spezifisch eine Diagnosestellung allein auf Grundlage von Histologie und Immunhistochemie bei solch gering differenzierten und histologisch variablen Tumoren ist. Ein möglicher Lösungsansatz liegt im Auffinden objektivierbarer molekularer Marker und in der Erweiterung der Diagnostik um Analyseverfahren, die diese Marker sichtbar machen.

1.4 molekulare Charakterisierung undifferenzierter sinunasaler Tumore

Aufgrund der limitierenden histologischen und zum Teil auch immunhistochemischen Charakterisierung von undifferenzierten sinunasalen Tumoren, richtete sich das Augenmerk der aktuellen Forschung auf die Möglichkeiten der molekularen Analysen und das damit verbundene Bestreben molekulare Marker zu finden, die die Diagnostik dieser heterogenen Tumorgruppe erleichtern. Bei einigen undifferenzierten sinunasalen Tumoren wie dem SMARCB1 -defizienten sinunasalen Karzinom, dem NUT-Karzinom und dem HPV assoziierten adenoid zystischen Karzinom ist es bereits gelungen robuste genetische Marker zu identifizieren. [15,16,17] Das SMARCB1-defiziente sinunasale Karzinom ist durch einen kompletten Verlust von SMARCB1, einem Tumorsuppressorgen, gekennzeichnet. Dies lässt sich diagnostisch durch einen Verlust des SMARCB1 Genproduktes INI1 erkennbar machen. Es wurde erstmals 2014 von Agaimy et al. und Bishop et al. beschrieben. [15,18]

Histologisch präsentiert es sich überwiegend durch rhabdoide oder basaloide Zellen. Eine konventionell histologisch schwer zu unterscheidende Differenzialdiagnose ist das

basaloide Plattenepithelkarzinom, wobei das SMARCB1-defiziente sinunasale Karzinom klinisch ein wesentlich aggressiveres Verhalten zeigt und eine deutlich schlechtere Prognose aufweist.

Ein weiterer Tumor, der erst kürzlich in die 4. Edition der WHO für Kopf- und Halstumore von 2017 als eigenständige Entität aufgenommen wurde, ist das NUT-Karzinom. Ebenfalls mit einer äußerst schlechten Prognose assoziiert, befinden sich 35% aller NUT-Karzinome im Kopf-Hals-Bereich, was den häufigsten Manifestationsort dieser Tumoren darstellt.[19] Genetisch gekennzeichnet ist das NUT-Karzinom durch eine t(15:19) Translokation. Dabei ist das NUTM1-Gen auf Chromosom 15 mit dem BRD4-Gen (bromodomain-containing protein 4) auf Chromosom 19 zum BRD4-NUT-Fusionsonkogen fusioniert. Seltener kommt es vor, dass das NUTM1-Gen mit dem BRD3-Gen fusioniert. [20] Das NUT-Karzinom kann sowohl genetisch über eine Gensequenzierung als auch immunhistochemisch diagnostiziert werden. Eine positive nukleäre Reaktion des NUT1-Antikörpers in der Immunhistochemie gilt als spezifischer und sensitiver Marker.[16]

Histologisch ist das NUT-Karzinom schwer zu klassifizieren. Eine diffuse Keratinisierung lässt als Differenzialdiagnose häufig an ein undifferenziertes Plattenepithelkarzinom denken. Wobei wie oben bereits erwähnt die Prognose eines NUT-Karzinoms im Vergleich durch eine 5-Jahres-Überlebensrate von nur 7% wesentlich ungünstiger ausfällt.[3]

Ein weiterer diagnostischer Schritt, der sich etabliert hat, ist die Bestimmung des HPV-Status. Eigentlich bekannt durch p16 und p18 high risk Vulva-und Vaginalkarzinome, kann der HPV-Status auch differenzialdiagnostisch bei undifferenzierten sinunasalen Tumoren angewandt werden. So schließt sich ein SMARCB1(INI1) -Verlust mit einem positiven HPV-Status aus und auch bei Entitäten wie dem SNUC und dem ONB konnten bislang keine Assoziationen zu einer HPV Infektion hergestellt werden. [3]

Mit dem Bestreben auch für weitere undifferenzierte sinunasale Tumore immunchemische oder molekulare Marker zur genaueren Diagnostik zu entdecken, nahmen sich López-Hernández et al. in einer molekularen Studie dem Problem des histologischen Mimikry von SNUC, ONB und sinusal neuroendokrinen Karzinomen (SNEC) an. Sie versuchten einen Zusammenhang zwischen dem Phänotyp und Genotyp dieser sinusalen Tumorentitäten herzustellen. Dazu analysierten sie 54 Tumore mit den Diagnose ONB, SNEC und SNUC anhand von immunhistochemischen Cytokeratin- und neuroendokrinen Markern und ordneten die Tumore nach den immunhistochemischen Markerprofilen neu. Dabei vergaben sie die Diagnose ONB, wenn der Tumor negativ auf die Cytokeratinfärbung, aber positiv für neuroendokrine Marker war, SNEC sowohl positiv für

Cytokeratin- und neuroendokrine Färbungen und SNUC bei positiven Cytokeratinfärbungen und negativen neuroendokrinen Markern.

In einem zweiten Schritt untersuchten sie sowohl die Originaldiagnosen als auch die nach immunhistochemischer Färbung neuklassifizierten Tumore auf Kopiezahlveränderungen. Während sich bei den Originaldiagnosen keine eindeutigen Kopiezahlveränderungen zeigten, konnten bei den durch die Immunhistochemie neuklassifizierten Tumoren klare Unterschiede in Form von chromosomalen Zugewinnen und Verlusten festgestellt werden. Durch diese erweiterte Analyse änderte sich bei 17 von 54 Tumoren die Diagnose, wobei sich zeigte, dass ONBs stark überdiagnostiziert wurden. [21]

Die Erweiterung der sinunasalen Tumordiagnostik um die Analyse von Kopiezahlveränderungen nach vorangegangener immunhistochemischer Diagnostik ist somit eine Weiterentwicklung. Sie könnte helfen Fehldiagnosen zu vermeiden und wurden auch in dieser Arbeit als diagnostisches Analyseverfahren angewandt.

Trotz dieser diagnostischen Erweiterung blieb das Hauptproblem der Studie von López-Hernández et al., dass für die Tumorgruppe des SNUC weiterhin keine eindeutige immunhistochemische Klassifizierung gefunden wurde und auch auf molekularer Ebene das SNUC weiterhin eine heterogene Gruppe darzustellen schien.

Capper et al. nahmen sich der gleichen Problematik an und analysierten 66 Tumore mit der initialen Diagnose ONB anhand ihres genomweiten molekularen DNA Methylierungsprofils.[5] Dabei wurde ein neues molekulares Analyseverfahren angewandt, welches erlaubt Tumore anhand ihres DNA Methylierungsprofils zu klassifizieren. Diese Methode des DNA methylation profiling (Illumina Infinium Methylation EPIC array) wurde zuvor von Sturm et al. bereits bei Tumoren des Zentralnervensystems angewandt und führte dazu, dass es zur Spezifizierung einer bis dahin etablierten Tumorgruppe, der primitiven neuroektodermalen Tumore (PNET), kam. Die Diagnose PNET wurde daraufhin durch 4 exaktere Subgruppen abgelöst. [22]

Es gibt verschiedene Methoden, um DNA Methylierung nachzuweisen. [23] Die Bisulfit-Konvertierung gilt als Goldstandard für die Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus, da bei dieser Art der Analyse die Quantifizierung der Methylierung an jeder einzelnen Basenposition ermöglicht wird. [24] Durch die Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, das anschließend bei der PCR-Amplifikation in Thymin umgewandelt wird, während Methylcytosin unverändert bleibt. [25,26]

Mit der Einführung der Illumina Infinium humanMethylation BeadChip Array Technologie 2008/2009 gelang es, ein umfassendes genomweites Profil der menschlichen DNA-Methylierung zu erstellen.[27] Ähnlich wie bei der Bisulfit-Sequenzierung quantifiziert diese Methode die Methylierungsgrade an verschiedenen Loci innerhalb des Genoms. Mit dem humanMethylation27 BeadChip, der ca. 27.000 CpG Positionen hauptsächlich in Promotorregionen genomweit abdeckte, war erstmals die hochstandardisierte und reproduzierbare Analyse von Einzel-CpG-Positionen im Genom möglich.[27]

2011 folgte dann der humanMethylation450 BeadChip mit der Möglichkeit, 450.000 genomweiter CpG Positionen abzudecken.[28] Seit 2016 bietet Illumina den bislang umfangreichsten Chip mit 850.000 genomweiten CpG Positionen an. [29]

DNA Methylierung bedeutet, dass eine Methylgruppe (-CH₃) kovalent an die C5-Position eines Cytosin-Bases gebunden wird, wodurch 5-Methylcytosin entsteht. Diese enzymatische Modifikation findet fast ausschließlich an Cytosin-Basen statt, welchen in der Basenabfolge ein Guanin folgt (CpG). Cytosin-Guanin Dinukleotide sind im Genom eher unterrepräsentiert. [30]. Es gibt jedoch Regionen, wo diese gehäuft auftreten. Diese werden als sogenannte CpG Inseln beschrieben. [31,32] Bis zu 40% dieser CpG Inseln sind auf Promotorregionen oder anderen regulatorischen Bereichen der DNA zu finden [33]. Eine vermehrte DNA-Methylierung in Promotorregionen verhindert in der Regel das Ablesen des zugehörigen Gens und mindert demnach seine Expression.

Anders als in der Studie von López-Hernández analysierten Capper et al. zuerst die 66 Tumore anhand ihres Methylierungsprofils, wobei sich in einer unsupervidierten hierarchischen Clusteranalyse insgesamt 4 distinkte molekulare Gruppen aufzeigten. Diese wurden in einem zweiten Schritt dann histologisch und immunhistochemisch charakterisiert, um histopathologische Eigenschaften der einzelnen Gruppen zu detektieren.

Die größte der vier Gruppen (n=42) bezeichneten Capper et al. als „Core-ONB“ Gruppe. Sie zeichnet sich durch ein distinktes DNA Methylierungsprofil aus und zeigt die klassische Histologie für ONBs, wie sie auch in der WHO beschrieben ist. [5]

Klassischerweise zeigen ONB ein lobuläres Wachstum, sind immunhistochemisch durch eine Positivität für Synaptophysin, Chromogranin A und eine positive Färbung der sustentakulären Zellen mit S100 gekennzeichnet, sind jedoch negativ für Cytokeratine. [3]

Um die Tumorzellen histomorphologisch zu klassifizieren, wurde das international anerkannte Hyams Grading für ONB angewandt. Dieses histologische Klassifizierungssystem

basiert auf der Einteilung der Tumorzellen nach Tumorarchitektur, der zellulären Pleomorphie, dem Vorhandensein von neurofibrillärer Matrix und Rosetten, der mitotischen Aktivität und dem Vorhandensein von Nekrosen und teilt ONBs in eine von vier Graden ein, die von gut differenziert (I) bis am wenigsten bzw. undifferenziert (IV) reichen. [34] Interessanterweise waren alle Tumore der „Core-ONB“ Gruppe Hyams Grade I oder II, was für eine klare Differenzierung der Tumorzellen spricht.

Eine weitere Gruppe (n=7) bei Capper et al. zeichnete sich durch ein ähnliches Methylierungsprofil aus, wie es bereits von Isocitrat-Dehydrogenase (*IDH*)-mutierten Gliomen bekannt ist. Das Profil ist durch eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in Gen Promotorregionen gekennzeichnet, was auch als CpG Island Methylator Phenotyp (CIMP) bezeichnet wird. Folge dieser pathologischen Hypermethylierung der Promotoren ist zu meist ein Genfunktionsausfall, der zum Verlust von Tumorsuppressoren führen kann. [5] In einem zweiten Schritt wurde durch Capper et al. durch DNA-Sequenzierung in allen 7 Tumoren eine *IDH2* pR172 Hotspot Mutation nachgewiesen. Histologisch zeichnete sich die Gruppe durch eine undifferenzierte Histologie mit einer Häufung an Nekrosearealen aus. Die Gruppe wurde als „sinonasal tumors with *IDH2* mutation“ bezeichnet, was ausdrücken sollte, dass diese Tumore zum Zeitpunkt der Erstellung der Arbeit keiner definierten Tumorentität zugeordnet werden konnten. [5]

1.5 *IDH2* mutierte sinunasale Tumore

Um die genauere Pathogenese und Tumorentstehung des SNUCs zu verstehen, führten Dogan et al. eine genetische Studie an 47 sinunasalen Tumoren, darunter 17 SNUCs durch. Die Tumore wurden mittels Hochdurchsatz Sequenzierung (NGS, next generation sequencing) und Sanger Sequenzierung analysiert. Ähnlich wie bei Capper et al. fanden sich bei einem Teil der Tumoren des Kollektivs *IDH2* pR172 Hotspot Mutationen. Die Mutationen fanden sich in 14 der analysierten 17 SNUC (82%) [47]

Auch Jo et al. analysierten 11 SNUCs mittels Hochdurchsatz Sequenzierung und fanden in mehr als der Hälfte von ihnen eine *IDH2* pR172 Mutation. [35]

Dies lässt die Annahme zu, dass eine *IDH2* Mutation gehäuft im SNUC vorkommt und sehr wahrscheinlich Einfluss auf Tumorentstehung und klinisches Verhalten hat.

Isocitrat-Dehydrogenasen (*IDH*) sind Enzymkomplexe, die die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat katalysieren, wobei α -Ketoglutarat entsteht. Das *IDH1* Gen kodiert für das NADP-abhängige *IDH1* Enzym, wobei das *IDH2* Gen das NADP-abhängige *IDH2* Enzym kodiert. Während das *IDH1* Enzym im Zytoplasma und Peroxisomen vorkommt

[36], tritt das IDH2 Enzym in Mitochondrien auf [37]. IDH1 und IDH2 sind Homodimere und spielen eine wichtige Rolle in der Suppression von Apoptose und in der Abwehr von intrazellulärem oxidativem Stress. IDH3 ist ein Heterotetramer und NAD-abhängiges Enzym, das in den Mitochondrien vorkommt und eine wichtige Rolle in der Energiegewinnung im Citratzyklus spielt [38]. Ein mutiertes IDH1 oder IDH2 Protein verliert seine normale enzymatische Aktivität und erwirbt eine neue Funktion, welche zu einer abnormen Erhöhung von R-2-Hydroxyglutarat führt. [39]. R-2-Hydroxyglutarat wird zu den sogenannten Oncometaboliten gezählt.[40] Eine abnorme Anhäufung von R-2-Hydroxyglutarat kann zu einer Histon- und DNA-Hypermethylierung und somit zu einer Blockierung der Zelldifferenzierung führen. [39] Zum ersten Mal explizit beschrieben und mit einer klinischen Relevanz einhergehend, wurden *IDH1* pR132 Mutationen in Glioblastomen. 2008 sequenzierten Parsons et al. Glioblastome und entdeckten ein gehäuftes Vorkommen der heterozygoten Arg132-to-His (R132H) Punktmutation im *IDH1* Gen. [41] Ein gehäuftes Vorkommen von *IDH* Mutationen konnte ebenfalls in akuter myeloischer Leukämie, T-Zell-Lymphomen, Chondrosarkomen und Cholangiokarzinomen festgestellt werden. [42,43,44,45]

Für die *IDH2* Mutation wurden bisher 2 Hotspot Mutationen entdeckt. Die eine auf Codon 140 (*IDH2* R140), die andere auf Codon 172 (*IDH2* R172). [46]. Für undifferenzierte sinunasale Tumore, im Speziellen für das SNUC konnten bisher nur *IDH2* pR172 Mutationen festgestellt werden [47,48,49].

Gegenwärtig konnten für das SNUC die *IDH2* Arg172-to-Ser (R172S), Arg-to-Thr (R172T), Arg-to-Met (R172M) und Arg-to-Gly (R172G) Punktmutationen festgestellt werden, wobei die *IDH2* R172S ein gehäuftes und die R172G ein eher seltenes Ereignis im Vergleich darstellen [50].

Um Assoziationen dieser Mutation mit bestimmten sinunasalen Tumorklassen oder dem klinischen Verhalten von SNUCs aufzuzeigen, analysierten Dogan et al. 42 sinunasalen Tumore anhand ihres DNA Methylierungsprofils und führten eine hierarchische Clusteranalyse der DNA Methylierungsdaten durch. Ähnlich wie bei Capper et al. fanden sie 4 distinkte Gruppen. [4] Die erste Gruppe bestand aus *IDH2* mutierten sinunasalen Tumoren. Hervorzuheben ist hierbei, dass diese Gruppe nicht nur von SNUCs gebildet wurde, sondern auch von anderen undifferenzierten Karzinomen mit neuroendokriner und glandulärer histologischer Differenzierung, sowie einem Adenokarzinom.

Zwei weiteren Cluster wurden von SMARCB1(INI1)-defizienten Karzinomen und ONBs gebildet, die sich eindeutig von den *IDH2* mutierten Karzinomen abgrenzten. Das letzte

Cluster bestand aus einer heterogenen Gruppe von sinusalen Tumoren mit unterschiedlicher Histologie. [4]

1.6 Fragestellung

Anhand der oben dargestellten Problematik lassen sich folgende Fragen ableiten: Zum einen, ob sich die Diagnostik sinusalen Tumore durch die DNA Methylierung im Vergleich zur konventionellen histomorphologischen Beurteilung zusammen mit dem Einsatz immunhistochemischer Färbungen, im Speziellen neuroendokriner Marker, präziser und effizienter gestalten ließe. Zum anderen, ob es sich bei undifferenzierten sinusalen Tumoren mit einer *IDH2* Mutation um eine histologisch und molekular einheitliche Tumorentität mit klinischer Relevanz handelt.

2 Methodik

2.1 Ausfall der Tumorentitäten und Fallakquise

Eine der Hauptaufgaben zu Beginn der Arbeit bestand darin, ein aussagekräftiges Kollektiv an sinunasalen Tumorentitäten aufzubauen. Der Fokus lag vor allem auf diversen seltenen sinunasalen Tumoren und wurde im Verlauf auf SNUC und undifferenzierte sinunasale Tumore mit einer *IDH2* Mutation eingegrenzt. Für den Aufbau eines Kontrollkollektivs wurden die häufigsten und histologisch eindeutig zu definierenden Tumore ausgesucht. Dabei orientierte man sich an den Kriterien der WHO für Hals-Nasen-Ohren-Pathologie. Anfänglich wurde eine Recherche der Archive der Pathologie und der Neuropathologie der Charité durchgeführt. Aufgrund der Seltenheit undifferenzierter sinunasaler Tumore, wurde jedoch die Suche erweitert und Pathologien und Neuropathologien verschiedener Universitätskliniken Deutschlands für die Fallakquise angefragt, sowie eine Kooperation mit dem Memorial Sloan Kettering Cancer Center in New York aufgebaut. Weitere Kooperationen kamen mit folgenden Universitätskliniken zu Stande: Universitätsklinikum Basel, Universitätsklinikum Gießen, Universitätsklinikum Göttingen, Universitätsklinikum Lübeck, Universitätsklinikum Marburg, Universitätsklinikum Münster und dem Universitätsklinikum Schleswig-Holstein.

Da die Fälle über einen langen Zeitraum gesammelt und aus verschiedenen Instituten stammen, wurden die initialen Einsenderdiagnosen überprüft. Von dem erfahrenen Neuropathologen Prof. Dr. David Capper und der erfahrenen Pathologin für Hals-Nasen-Ohren-Tumore Dr. med. Snjezana Dogan zusammen mit der Promovendin Stefanie Glöß wurden die Tumore streng nach WHO Klassifikation histologisch und immunhistochemisch begutachtet und die Diagnosen bestätigt oder angepasst. Weiteres Einschlusskriterium war ein Tumorzellgehalt von mindestens 70%.

Insgesamt wurden 165 Tumore aus dem anatomischen Bereich der Nasennebenhöhle und der Schädelbasis eingeschlossen. Darunter 40 *IDH2* mutierte und 125 *IDH2*-Wildtyp-Tumore. Von den 40 Fällen mit *IDH2* Mutation wurden 23 bereits veröffentlicht. [4,5] Ein Ethikvotum wurde von der Ethikkommission der Charité erteilt (EA1/122/18).

2.2 *IDH2* mutierte sinunasale Tumore

Insgesamt konnten durch diese intensive Suche 40 sinunasale Tumore mit einer nachgewiesenen *IDH2* Mutation identifiziert werden. 38 davon waren Primärtumore und 2 Metastasen. Der *IDH2* Status wurde anhand mindestens einer der nachfolgenden Methoden

nachgewiesen: mit dem targeted exome massive parallel sequencing by MSK-IMPACT™ (MSK-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (Cheng, Zehir)), und/ oder per Pyrosequenzierung by PyroMark Q24 (Qiagen).

Da die Tumore sowohl im MSKCC in New York als auch in der Neuropathologie der Charité Mitte analysiert wurden, kamen mehrere Nachweismethoden zum Einsatz.

Alle Tumore wurden mikroskopisch beurteilt und die Diagnosen SNUC, ONB und LCNEC nach den WHO Kriterien vergeben. Eine beschreibende histologische Diagnose wurde bei den Fällen angewandt, bei denen die Kriterien nicht zutrafen.

Zur Einschätzung des histologischen Tumorstadiums kamen folgende Parameter zum Einsatz:

1. Nekroseareale vorhanden nein (0), fokal (1), moderat (2) und extensiv (3).
2. Apoptosen vereinzelt (1), erheblich (2) und prominent (3).
3. Nukleoli als nicht sichtbar (0), unauffällig (1), auffällig (2), prominent sichtbar (3).

Nicht einschätzbar (not applicable= NA) wurde verwendet, wenn Artefakte vorhanden waren oder das Tumorbiosiematerial zu gering ausfiel, als dass alle Parameter hätten bestimmt werden können.

2.3 Histologie und Immunhistochemie

Wir führten für die mikroskopische Untersuchung Hämatoxylin und Eosin (HE)-, sowie Immunhistochemische Färbungen an 4 µm dicken Formalin fixierten in Paraffin eingebetteten (FFPE, formalin fixed paraffin embedded) Tumorschnitten durch.

Dabei wurden verschiedene Färbepattformen verwendet. Zum einen die Ventana Benchmark Ultra Plattform (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA), wobei eine Streptavidin-Biotin-Peroxidase Lösung (iView, Ventana) zur Anwendung kam. Zum anderen die Leica-Bond-3 automatisierte Färbepattform (Leica, Buffalo Grove, IL) unter Verwendung eines polymeren Sekundärdetektionskits (Refine, Leica) und einer hitzebasierten Antigen-Retrieval-Methode, zusammen mit einem hoch-pH-Retrieval-Puffer. Dabei wurden die Empfehlungen des Herstellers berücksichtigt.

Die Beurteilung der Expression der neuroendokrinen Marker Synaptopsin, Chromogranin A und Insulinoma-associated 1 (INSM1) erfolgte über die abgewandelte und vereinfachte Form des H-Score. [51] Dabei ist die Intensität der Färbung und der Anteil markierter Tumorzellen von Bedeutung. Der Färbungsintensitätsgrad lag zwischen 0 (keine Färbung), 1 (schwach), 2 (moderat) und 3 (stark). Daraus wurde dann der H-Score wie folgt

errechnet: (% der positiven Zellen, Intensität 3 x 3) + (% der positiven Zellen, Intensität 2 x 2) + (% der positiven Zellen, Intensität 1 x 1) = H-Score. Diese Form des „Quick-Scores“ wurde 1995 von Detre et al. etabliert, um die Intensität der immunhistochemischen Färbungen von Östrogenrezeptoren beim Mammakarzinom zu beurteilen. [51]

Die Cytokeratin-Expression wurde wie folgt definiert: eine Markierung in >25% der Zellen wurde als "positiv", 6%-25% "fokal positiv", <1%-5% "sehr fokal/seltene Zellen positiv" beschrieben.

2.4 DNA Extraktion

Für die molekularen Analysen war es erforderlich DNA von FFPE Material, zumeist Tumorblöcken, zu extrahieren. Dafür musste zuerst anhand des HE Schnittes unter dem Lichtmikroskop eine Stelle des Tumors identifiziert werden, die einen besonders hohen Tumorzellgehalt aufwies. Als Minimum wurde ein Tumorzellgehalt von geschätzt mindestens 70% aller Zellen festgelegt. Die DNA Extraktion erfolgte dann mit Hilfe des Maxwell RSC FFPE Plus DNA Purification Kit (Promega, USA), unter Beachtung der Empfehlungen des Herstellers.

2.5 Pyrosequenzierung

Die Durchführung der labortechnischen Analysen erfolgte durch spezialisierte chemisch/medizinisch technische Assistenten des Instituts für Neuropathologie Charité Berlin. Wir führten Pyrosequenzierungsanalysen durch, um den *IDH2* Mutationsstatus und die Sequenz der R172 genauer zu definieren.

Bei der Pyrosequenzierung werden Lichtreaktionen genutzt, um auf DNA-Sequenzen zu schließen. Pyrosequenzierung basiert auf dem Prinzip des Sequencing-by-Synthesis, d.h. dass die Synthese eines komplementären Stranges Nukleotid-für-Nukleotid verfolgt wird. Gemessen wird jedoch nicht der direkte Einbau eines Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP), sondern von Pyrophosphationen (PPi), die bei der Verknüpfung abgespalten werden. Diese führen über Enzymen zu einem messbaren Lichtblitz. [52]

Um die DNA aufzuarbeiten, wurde das DNA Mini Kit von Qiagen benutzt. Die DNA wird in einem ersten Schritt extrahiert, um daraufhin fragmentiert zu werden. Es können DNA Fragmente mit einer Länge von bis zu 400 Basenpaaren (bp) sequenziert werden [52]. Durch Hitze wird die doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen verändert.

Die Stärke des später abgegebenen Lichts korreliert mit der Menge des abgegebenen Pyrophosphats. Über eine Polymerasekettenreaktion (PCR) wird zuerst die DNA amplifiziert, um später ein starkes Signal zu generieren. Für die Amplifikation wurde der vorwärts Sequenzierungsprimer FW-TCC GGG AGC CCA TCA TCT und der rückwärts Sequenzierungsprimer RV- CTG GCC TAC CTG GTC GC verwendet. Nach Ablauf von 40 Zyklen des PCR-Programmes wird das PCR-Produkt an Kugeln (Beads) gebunden. Jede dieser Kugeln trägt zahlreiche Kopien eines DNA-Fragments. Die einzelnen Beads werden in Poren auf einer Platte fixiert. Für die Pyrosequenzierung wurde der Sequenzierprimer Seq- AGC CCA TCA CCA TTG verwendet. Der Sequenzieransatz wird auf eine Vakuum Prepstation gegeben und vorbereitet, um im nachfolgenden Schritt denaturiert zu werden. Nach Abkühlung wird die Plattenbelegung mit dem PyroMark Q24 Programm von Qiagen nach Anleitung des Herstellers ausgelesen.

2.6 DNA Methylierungsanalyse

Für die genomweite DNA Methylierungsanalyse wurde der Infinium MethylationEPIC (850k) BeadChip (Illumina) oder der Infinium HumanMethylation450 (450k) BeadChip (Illumina) unter Beachtung der Anweisungen des Herstellers genutzt.

Für die Bisulfidanalyse wurde DNA aus FFPE Material extrahiert und das Zymo EZ Methylation Kit (Zymo Research Irvine, USA) verwendet.

Sinn der Bisulfit-Konvertierung ist es, methylierte und unmethylierte CpG-Regionen in der DNA Methylierungsanalyse unterscheiden zu können. Während unmethylierte Cytosinbasen in Uracilbasen durch die Bisulfitbehandlung umgewandelt werden, bleiben methylierte Cytosine unberührt. Es folgt eine Polymerasekettenreaktion, wobei Uracilbasen in Thymin umgewandelt werden. In der Bisulfit konvertierten DNA sind somit nach der Polymerasekettenreaktion unmethylierte Cytosine durch Thymin ersetzt, wohingegen methylierte Cytosine als Cytosine verbleiben. [53]

Als nächster Schritt folgt die Denaturierung der DNA und eine anschließend Whole-Genome-Amplifizierung der Bisulfit konvertierten DNA. Hierfür wurde das Infinium HD FFPE Restore Kit genutzt. Danach wird die bis zu tausendfach amplifizierte DNA enzymatisch fragmentiert und nachfolgend hybridisiert. Hierbei werden die DNA Fragmente auf den Chip gegeben, sodass diese komplementär an Oligonukleotidsonden binden können.

Diese Oligonukleotidsonden sind so designt, dass sich der fragliche CpG-Lokus bei Anlagerung der komplementären DNA-Fragmente einer Probe immer an der letzten Basenposition befindet.

Als nächstes werden DNA-Reste und unspezifische DNA vom Chip entfernt.

Es erfolgt die Verlängerung der Oligonukleotidsonde um eine einzelne Base (single base extention). Als Matrize wird das angelagerte DNA-Fragment der Probe benutzt. Guanin wird für Cytosin (methyliert) und Adenin für Thymin (unmethyliert) eingebaut. Danach erfolgt eine Markierung der eingebauten Basen mit je einem Farbstoff für den methylierten Zustand und für den unmethylierten Zustand. Rot für Adenin und Thymin und Grün für Guanin und Cytosin.

Als letztes folgt die Methylierungsanalyse über den Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina, USA). Die Bead Chips wurden anschließend mit dem iScan (Illumina, USA) gescannt und die Daten (idat files) generiert, wie vom Hersteller empfohlen.

2.7 tSNE-Dimensionsreduktionsanalyse

Um die generierten Daten zu veranschaulichen, haben wir uns für die Anwendung der t-distributed stochastic neighbour embedding (tSNE)-Analyse und der unsupervidierten Clusteranalyse entschieden. t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) ist eine statistische Methode zur Visualisierung hochdimensionaler Daten, bei der jedem Datenpunkt ein Ort in einer zwei- oder dreidimensionalen Karte zugeordnet wird [54]. Es handelt sich um eine nichtlineare Dimensionalitätsreduktionstechnik, wobei jedes hochdimensionale Objekt, in unserem Fall der Methylierungsgard in Form von Intensitätssignalen, durch einen zwei- oder dreidimensionalen Punkt so dargestellt wird, so dass ähnliche Methylierungsgrade durch nahe gelegene Punkte und unähnliche Methylierungsgrade durch weit entfernte Punkte präsentiert werden. [54]

Alle Analysen wurden mit der R-Version 3.5.0 (2018-04-23) "Joy in Playing", wie in unserer Arbeit beschrieben, durchgeführt. [2,55]

Für die Verarbeitung der Methylierungsdaten in Form von Intensitätssignalen wurde das R-Paket minfi, Version 1.26.2, genutzt. [56] Da sowohl rgSets von 450k Array und EPIC Array Daten verwendet wurden, mussten diese in einem Set zusammengefügt werden. Das kombinierte rgSet aus 450k Array und EPIC Array Daten wurde als 450k output Format generiert, wobei overlap probes genutzt wurden.

Zur Normalisierung der Daten wurde die functional normalization Methode für 450k Daten genutzt. [57] Wie von Maksimovic J. et al. [58] empfohlen, wurde eine Qualitätskontrolle und Filterung der Sonden durchgeführt. Dies wiederum bedeutet, dass nur Proben mit einem mittleren Detektions-p-Wert von $<0,01$ und nur Sonden mit einem Detektions-p-Wert $<0,01$ in über 90 % der Proben für die weiteren Analysen genutzt werden. Ebenfalls wurden Sonden, die auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert sind, Sonden von CpG-Stellen, Sonden, die Einzel-Nukleotid Polymorphismen (SNP) enthalten und kreuzreaktive Sonden ausgeschlossen [59].

Die geschätzte Varianz im Datensatz wurde mit der Standardabweichung der β -Werte zwischen allen Stichproben berechnet. Die 25.000 Sonden mit der höchsten Varianz wurden für die Dimensionalitätsreduktion mit dem Rtsne-Paket ausgewählt, Version: 0.13 ([60,61,62].

30 *IDH2* mutierte sinunasale Karzinome wurden analysiert und mit 5 Referenztumorklassen (n=92) verglichen, einschließlich ausgewählter sinunasaler Tumore und Tumoren des zentralen Nervensystems: sinunasale Plattenepithelkarzinome (n=23), sinunasale Schleimhautmelanome (n=8), SMARCB1(INI1)-defiziente sinunasale Karzinome (n=13), ONB (n=36) und Hypophysenadenome (n=12).

2.8 unsupervidierte Clusteranalyse

Um weitere Variationen in unseren Methylierungsdaten aufzudecken, führten wir eine unsupervidierte Clusteranalyse durch. Hierbei wurde das R Packet ComplexHeatmap (v.2.0.0) genutzt, wie wir es in unsere Arbeit beschrieben haben [2,63]. Für die Analyse wurden die β -Werte der 2000 am stärksten variabel methylierten CpG-Sonden über alle Proben hinweg genommen. Die Proben wurden unter Verwendung von ward.D2 als Methode und dem Pearson-Korrelationskoeffizienten als Distanzmaß geclustert.

2.9 Kopiezahlanalyse

Es wurden genome-wide copy number Profile aus DNA-Methylierungsdaten abgeleitet. Dabei wurde eine modifizierte Version des conumee-package genutzt und durchgeführt, wie in unserer Arbeit beschrieben [2, 64,65]. Die Segmentdaten wurden nach Abschnitten gefiltert, die weniger als 3 Megabasenpaare (mbp) breit waren und eine mittlere Abweichung von mindestens 0,4 von der Basislinie aufwiesen, um fokale Kopiezahlveränderungen zu identifizieren [66]. Die Segmente wurden mit der getBM-Funktion aus dem

biomaRt-Paket annotiert. Dabei wurden krebsrelevante Gene sowie Gene, von denen bekannt ist, dass sie an Fusionsereignissen beteiligt sind, ausgewählt. Für die Auswahl wurde das Cosmic Cancer Gene Census genutzt [64,65].

2.10 statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem exakten Fisher-Test für nichtparametrische Variablen und dem zweiseitigen Student's t-Test für kontinuierliche Variablen durchgeführt. Die Überlebensanalyse wurde mit dem Log-Rank-Test analysiert. P-Werte $<0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 demographische und klinische Daten

Im Patientenkollektiv der 40 *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore waren die meisten Patienten Männer (63 % 25/40). Das mediane Alter lag bei 49 Jahren (Altersrange 30-74). Bei Frauen traten die Tumore in einem höheren Alter auf. Hier lag der Median bei 62 Jahren (Altersrange 33-87). Zum Zeitpunkt der Diagnose befanden sich die meisten im Stadium T4 (80 % 24/30), 27 % (8/30) hatten Lymphknotenmetastasen, 6 % (2/30) hatten Fernmetastasen und insgesamt 86 % (26/30) der Patienten befanden sich im klinischen Stadium IV. Die mittlere Tumorgöße betrug im Durchschnitt 4,4 cm (Bereich 2,0 cm bis 7,0 cm, n=21).

3.2 Pathologie

3.2.1 Histopathologie

Für 39 der *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore lag Material für eine histologische Reevaluation vor. Bei der anfänglich beschriebenen histologischen Überprüfung wurde die ursprüngliche histologische Diagnose in 7 Fälle (18%) geändert. Drei Fälle mit der ursprünglichen Diagnose ONB wurden neu als SNUC klassifiziert. In 2 ursprünglich diagnostizierten ONB wurde die Diagnose zu einem schwer zu klassifizierenden *IDH2* mutierten Tumor mit ONB Eigenschaften revidiert. In 2 Fällen wurde die ursprüngliche Diagnose von SNUC in LCNEC geändert. Nach histologischer Überprüfung gab es 25 (64%) SNUC, 8 (21%) LCNEC, 2 (5%) undifferenzierte Karzinome mit fokalen glandulär-azinösen Merkmalen, ein (2%) ONB Hyams Grad III-IV und 3 (8%) schwer zu klassifizierende *IDH2* mutierte Tumore mit ONB Eigenschaften. Die drei letztgenannten Fälle zeigten eine positive S100 Immunreaktion der sustentakulären Zellen, was als charakterisierendes Merkmal für ONBs gilt. [3] Gleichzeitig waren die 3 Fälle jedoch negativ für Synaptophysin und Chromogranin A, was wiederum immunhistochemisch gegen die Diagnose ONB spricht. Bei allen 39 *IDH2* mutierten Fällen konnten histologische Merkmale von undifferenzierten Tumoren nachgewiesen werden. So zeigten die meisten fokale bis ausgedehnte Nekrosen (82%), deutliche bis ausgeprägte Apoptosen (79%) und im Durchschnitt 21 Mitosen pro 10 hochauflösende Gesichtsfelder.

3.2.2 neuroendokrine Marker

Als Nächstes untersuchten wir das Ausmaß der Expression neuroendokriner Marker in *IDH2* mutierten sinunasalen Tumoren. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Korrelation zwischen den konventionellen Markern Synaptophysin, Chromogranin, und INSM1. Insgesamt exprimierten die meisten Fälle INSM1 (80% 28/35), 33% (13/39) waren positiv für Chromogranin A und 24 % (9/38) für Synaptophysin.

Alle 3 Marker wurden in 32 Fällen nachgewiesen.

3.3 molekulare Analysen

3.3.1 DNA Methylierungsanalyse

Definitionsgemäß wiesen alle Fälle *IDH2* pR172-Mutationen auf. Da einige Tumore nur mittels *IDH2* Immunhistochemie ausgewertet wurden und der im MSKCC angewandte Antikörper 11C1B8 nicht zwischen *IDH2* pR172S und pR172T unterscheidet, wurde die Häufigkeit der *IDH2* Varianten anhand der Fälle mit verfügbaren molekularen Ergebnissen (n=27) ermittelt. Die häufigste Variante war eine Substitution von Serin(pR172S) mit 70%, gefolgt von Threonin (pR172T) mit 14% (14,8%, 4/27), Guanin (pR172G) (11,1%, 3/27) und Methionen (pR172M).

Die tSNE-Analyse der DNA-Methylierungsprofile zeigte, dass alle *IDH2* pR172 mutierten sinunasale Tumore unabhängig von ihrer morphologischen Diagnose von den Tumoren des Vergleichskollektivs getrennt waren und eine eigene Gruppe bildeten. Tumore vom *IDH2*-Wildtyp einschließlich SMARCB1(INI1)-defiziente Karzinome, *IDH2*-Wildtyp-ONB, sinunasale Schleimhautmelanome, sinunasale Plattenepithelkarzinome und Hypophysenadenome dienten hierbei als Vergleichskollektiv. In einer unsupervidierten Clusteranalyse bildeten *IDH2* mutierte Tumore keine Cluster nach histologischen Gruppen. Außerdem wurde keine Korrelation zwischen den verschiedenen Clustergruppen und den Typen der *IDH2* pR172-Varianten gefunden.

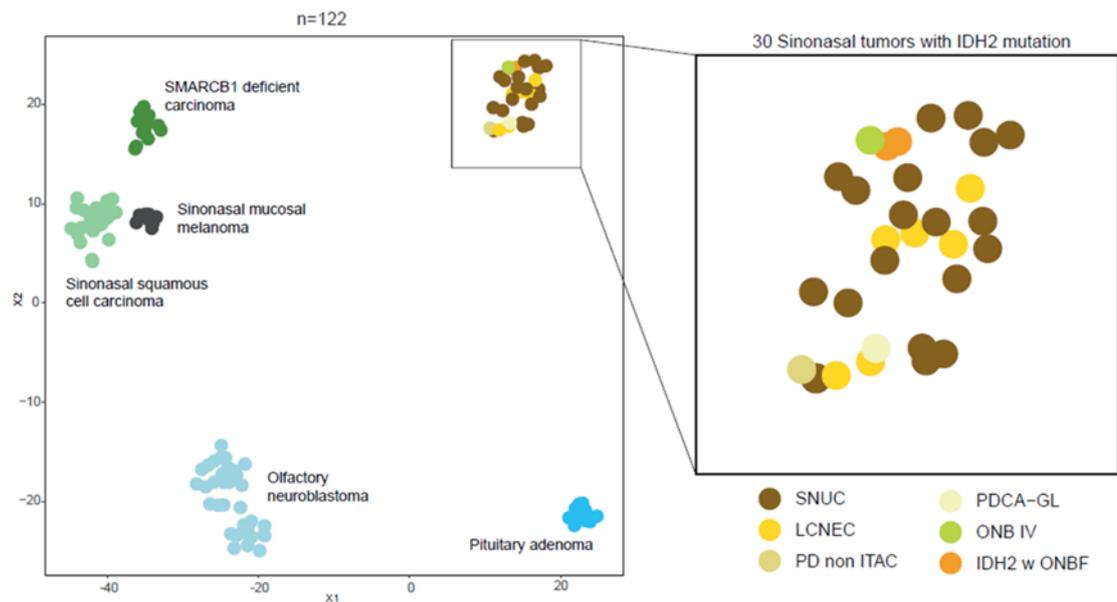


Abbildung 2: tSNE der DNA Methylierungsdaten.

Abbildung entnommen und modifiziert aus Glöss et al. 2021. Darstellung der DNA Methylierungsdaten der IDH2 mutierte sinunasal undifferenzierte Tumore vergleichend zu anderen sinunasalen Tumorentitäten. Die Gruppe der IDH2 mutierten sinunasal undifferenzierten Tumore grenzt sich eindeutig von anderen histologisch ähnlich erscheinenden Tumorgruppen wie Olfactoriusneuroblastome (n=36) und SMARCB1(INI1)-defiziente Karzinome (n=15) ab. Als Vergleichsgruppe dienen Hypophysenadenome (n=12), sinunasale Schleimhautmelanome (n=8) und sinunasale Plattenepithelkarzinome (n=23). SNUC: sinunasal undifferenziertes Karzinom. LCNEC: großzelliges neuroendokrines Karzinom. PD non ITAC: undifferenziertes nicht intestinales Adenokarzinom. PDCA-GL: undifferenzierte Karzinome mit fokalen glandulär-azinösen Merkmalen. ONB IV: Olfactoriusneuroblastom Hyams Grad 4. IDH2 w ONBF: IDH2 mutierte Tumore mit Olfactoriusneuroblastom Eigenschaften.

3.3.2 Kopiezahlveränderungen

Eine spezifische Analyse der Kopiezahlveränderungen wurde für die gesamte Kohorte der IDH2 mutierten sinunasalen Tumore erstellt, sowie noch einmal explizit für die Kohorte der SNUC und LCNEC.

Veränderungen, die einen gesamten Chromosomenarm betrafen, wurden für Chromosom 1 mit einem 1q-Zugewinn (79%, 23/29), für Chromosom 17 mit einem 17p-Verlust (76% 22/29), 17q-Gewinn (59%, 17/29) und einer Kombination aus 17pVerlust/17q-Gewinn, im Sinne eines Isochromosoms 17q, in 38% (11/29) Fällen beobachtet. Chromosom 8 (45%, 13/29) zeigte einen isolierter 8q-Zugewinn in 10% (3/29) Fällen. Ein 12p-Zugewinn trat in insgesamt 35 % (10/29) der Fälle auf, darunter 4 von 6 LCNEC Fällen (67%) und 5 von 19 SNUC (26%). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,143$, exakter Fisher Test).

Zusammenfassend zeigen *IDH2* mutierte SNUC und *IDH2* mutierte LCNEC insgesamt sehr ähnliche Kopiezahlveränderungen.

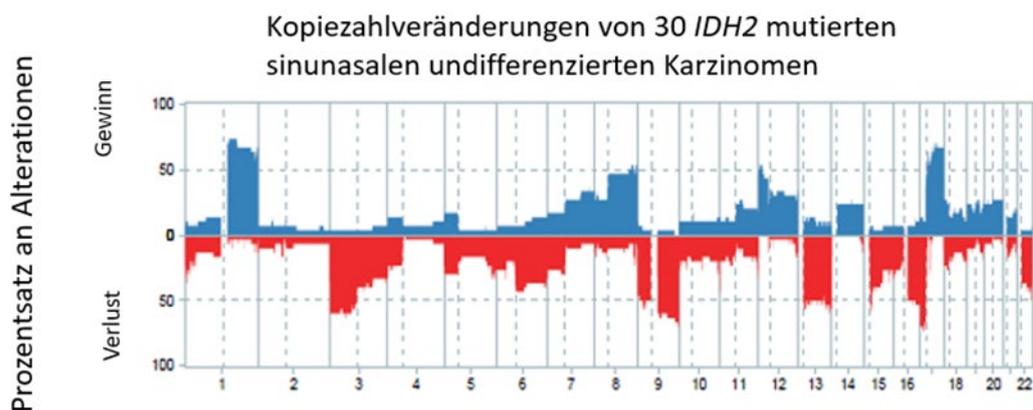


Abbildung 3: Kopiezahlveränderungen von 30 *IDH2* mutierten undifferenzierten sinusalen Tumoren.

Abbildung entnommen und modifiziert aus Glöss et al. 2021. Gehäuftes Vorkommen von 1q- und 8q- Zugewinnen, 12p-Zugewinn und Auftreten eines kombinierten Verlustes von 17p und Zugewinns von 17q.

Fokale Kopiezahlveränderungen waren selten und umfassten Amplifikationen von *EGFR*, *ETV6* und *SMAD4*, *MYC* sowie *INTS4* und *AKT2*. Fokale Deletionen waren selten und umfassten wiederkehrende Deletion von *CDKN2A* (14%, 4/29).

3.4 Outcome-Überlebensanalyse

Für 28 Fälle mit *IDH2* Mutation konnte eine klinische Nachbeobachtung mit einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 21 Monaten durchgeführt werden (Bereich 3-167 Monate). Das 2-Jahres-, 3-Jahres- und 5-Jahres-Gesamtüberleben betrug 79%, 66% und 59%. Das krankheitsspezifische Überleben (disease specific survival = DSS) lag bei 82%, 69% und 61%, und das krankheitsfreie Überleben (disease free survival = DFS) betrug 27%, 27% bzw. 20%.

Im Vergleich zu SMARCB1(INI1)-defizienten Karzinomen waren *IDH2* mutierte sinunale Tumore mit einem signifikant längeren DSS ($p=0,027$) und einem tendenziell besseren Gesamtüberleben ($p=0,059$) und DFS ($p=0,097$) assoziiert. Ein besseres DSS konnte auch bei *IDH2* mutierten sinunasalen Tumoren im Vergleich zu *IDH2* Wildtyp Tumoren beobachtet werden, unabhängig vom SMARCB1(INI1)-Proteinstatus ($p=0,042$). Interessanterweise zeigte ein Vergleich von *IDH2* Wildtyp und SMARCB1(INI1)-Wildtyp Tumore ein deutlich besseres DFS als SMARCB1(INI1)-defiziente Karzinome ($p<0,001$).

4. Diskussion

4.1 Kurze Zusammenfassung und Interpretation der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es molekulare Eigenschaften zu identifizieren, um die Klassifikation und Diagnostik von undifferenzierten sinunasalen Tumoren erleichtern und verbessern zu könnten. Der Fokus lag auf undifferenzierten sinunasalen Tumoren mit einer *IDH2* Mutation. Anhand von histopathologischen und molekularen Analysen wurde das Spektrum der *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore näher beleuchtet.

Dabei zeigte sich, dass undifferenzierte sinunasale Tumore mit einer *IDH2* Mutation mehr molekulare Gemeinsamkeiten aufweisen als histomorphologische.

Ein eindeutiges histologisches Wachstumsbild, welches *IDH2* mutierte sinunasale Tumore klassifizieren könnte, konnte nicht ausgemacht werden. Jedoch zeigte sich in DNA Methylierungs- und Cluster-Analysen, dass *IDH2* mutierte sinunasale Tumore unabhängig ihres histologischen Wachstumsbildes, eine eigenständige molekulare Gruppe bilden. Wir konnten zeigen, dass undifferenzierte sinunasale Tumore eine günstigere klinische Prognose gegenüber Wildtyp SNUCs, d.h sinusal undifferenzierte Tumore ohne eine *IDH2* Mutation, und sinunasalen Tumoren mit einer *SMARCB1*-Mutation aufweisen. Durch die *IDH2* Mutation sehen wir das Potenzial, dass in zukünftigen klinischen Studien neue therapeutische Optionen für Patienten identifiziert werden könnten.

Insgesamt analysierten wir 40 sinunasale Tumore mit einer *IDH2* Mutation. Die Kohorte bestand aus SNUC, ONB, LCNEC, einem nicht intestinalen sinunasalen Adenokarzinom und undifferenzierten sinunasalen Tumoren mit glandulären histologischen Eigenschaften. 39 der 40 *IDH2* mutierten Tumore weisen histologische Merkmale von hochgradig undifferenzierten Tumoren auf. Jedoch fanden wir kein für alle *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore übereinstimmendes histologisches Merkmal, welches mit einer *IDH2* Mutation assoziiert werden könnte. Auch im Hinblick auf die immunhistochemische Färbung von neuroendokrinen Markern fanden wir keine diagnostisch relevanten Aspekte.

Die Wichtigkeit der histologischen Beurteilung und der immunhistochemischen Diagnostik soll in dieser Arbeit nicht gemindert werden. Zu Beginn einer jeden pathologischen Routinediagnostik steht noch immer die visuelle histologische Begutachtung eines Tumors. Darauf folgt zumeist die immunhistochemische Färbung.

Auch wir haben zuerst allen Tumoren eine histologische Arbeitsdiagnose gegeben.

Jedoch sehen wir in der Anwendung der DNA Methylierungsanalyse einen wesentlichen Mehrwert für die Diagnostik von undifferenzierten sinunasalen Tumoren im Vergleich zur Färbung von neuroendokrinen Markern.

Anhand unserer Ergebnisse sprechen wir uns für einen veränderten Einsatz der immunhistochemischen Färbungen, im Speziellen der von neuroendokrinen Markern bei der Diagnostik von undifferenzierten sinunasalen Tumoren aus. Wir erachten es als effizienter, wenn die immunhistochemische Färbung nicht mehr einen diagnostischen, sondern einen bestätigenden bzw. ergänzenden Einsatz erhalten würde.

Demnach würden alle undifferenzierten sinunasalen Tumore nach der histologischen Begutachtung zuerst eine DNA Methylierungs- und Clusteranalyse bekommen und anschließend bei Bedarf weiterführende immunhistochemische Färbungen. Anhand der Methylierungs- und Clusteranalyse lässt sich eine erste Einschätzung geben, um was für einen undifferenzierten Tumor es sich handeln könnte. Auch die direkte Unterscheidung von *IDH2* mutierten sinunasalen Tumoren zu ONB und SMARCB1(*INI1*)-defizienten Tumoren kann bereits mit der DNA-Methylierungsanalyse durchgeführt werden und bedarf keiner vorangehenden immunhistochemischen oder spezifischen Antikörper Diagnostik. Beide Tumorentitäten grenzen sich klar in den Clusteranalysen von *IDH2* mutierten sinunasalen Tumoren ab. [2,4]

Nachfolgend können ergänzende immunhistochemische und weiterführende molekulare Analysen durchgeführt werden, die die DNA-methylierungsbasierte Diagnose dann verifizieren können.

4.2 Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand

Eine Vielzahl von vorangegangenen Publikationen konnten eine *IDH2* Mutation in bis zu 82% der SNUC nachweisen. [49,50, 67, 68]. Der Fokus lag bei diesen Publikationen vor allem auf SNUCs.

Im Gegensatz zu diesen Studien konzentrierten wir uns nicht nur auf SNUC, sondern erweiterten das Spektrum auch auf morphologisch ähnlich anmutende Tumore.

2019 untersuchten Riobello et al. das Vorkommen und den Einfluss von *IDH* Mutationen bei undifferenzierten sinunasalen Tumoren. Auch sie fanden vor allem *IDH2* Mutationen in SNUCs, jedoch ebenfalls in LCNEC. [49]

Unsere Ergebnisse decken sich mit denen von anderen Studien, jedoch variiert die Häufigkeit der nachgewiesenen *IDH2* Mutationen. Riobello et al. wiesen *IDH2* Mutationen in 11% der LCNEC (1/9) nach, Dogan et al. 2019 83% (5/6) und Mito et al. keine einzige *IDH2* Mutation in LCNEC (0/8). [49,50,68]

Erklärbar wären diese Differenzen durch die schwer histologisch zu klassifizierenden Tumorentitäten und dass die Tumore dadurch eine eventuell falsche Arbeitsdiagnose erhielten. Gleichfalls wie Riobello fanden wir *IDH2* Mutationen in einem undifferenzierten nicht intestinalen Adenokarzinom. [49]

Des Weiteren konnten wir in einem hochgradig undifferenziertem ONB eine *IDH2* Mutation feststellen. Jedoch wird das Vorhandensein von *IDH2* Mutationen in ONBs in der Literatur kontrovers diskutiert. Während in einigen molekularen Studien zu undifferenzierten sinunasalen Tumoren das Vorhandensein von *IDH2* mutierten ONBs verneint wird [49,50,68,69], konnten in zwei Studien *IDH2* Mutationen in ONBs nachgewiesen werden. [5,70].

Auffällig hierbei ist jedoch, dass die immunhistochemische Diagnostik bei diesen *IDH2* positiven ONBs eine starke Cytokeratinexpression zeigte im Vergleich zu neuroendokrinen Markern. ONBs sind klassischerweise durch eine starke Expression von S100 und Chromogranin A gekennzeichnet und negativ für Cytokeratine. Es könnte demnach sein, dass es sich hierbei um SNUCs oder LCNEC handelt und nicht um ONBs.

Auch wir klassifizierten 5/6 Fälle mit der externen Diagnose ONB bei der zentralen Referenzierung um. 2 Fälle erhielten die Diagnose SNUC und 3 Fälle eine beschreibende Diagnose: *IDH2* mutierte sinunasale Tumore mit histologischen Merkmalen eines ONB. Histomorphologisch zeigen diese Tumore ein lobuläres Wachstumsmuster und eine S100 Positivität in den Sustentakularzellen.

Unabhängig der schwierigen histologischen Klassifizierung dieser Tumore, clusterten auch diese 3 Tumore bei den *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore. Es wäre demnach sinnvoll, auch bei dem histologischen Verdacht eines hochgradig undifferenzierten ONBs eine *IDH2* Mutationsdiagnostik durchzuführen.

Es bleibt zu diskutieren, ob alle sinusal undifferenzierten Tumore von vornherein eine Testung auf eine *IDH2* Mutation erhalten sollten. Dafür spräche, dass eine *IDH2* Mutation mit einer besseren Prognose assoziiert ist [2, 4, 49] und ggf. bei Etablierung einer zielgerichteten Therapie für *IDH2* mutierte sinunasale Tumore sich das therapeutische Regime im Gegensatz zu Wildtyp Tumoren ändern würde. Andererseits konnten wir zeigen, dass alle *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore ein gemeinsames Cluster bilden. Auch hier bietet es sich an, die DNA-Methylierungs- und Clusteranalyse voranzuschalten, da das Clustern in diese Gruppe eine *IDH2* Mutation hochwahrscheinlich macht. Daraufhin können diagnostische Analysen angewandt werden, die die *IDH2* Mutation bestätigen, wie zum Beispiel in unserer Arbeit die Pyrosequenzierung.

Hinsichtlich der Kopiezahlveränderungen war das Vorhandensein einer kombinierten Deletion des Chromosomarms 17p (del(17p)) und ein Zugewinn von 17q (17q+) im Sinne eines Isochromosoms 17q (1(17q)) bei Capper et al. bereits bekannt und konnten durch das vergrößerte Tumorkollektiv unserer Studie verifiziert werden. [5] Zusätzlich fanden wir ein Zugewinn von 1q (1q+) in 23 von 29 Fällen (73%).

Riobello et al. konnten in ihrer Studie ebenfalls diese Art der Kopiezahlveränderung und des Weiteren einen Verlust von 22q (22q-) nachweisen, was von uns jedoch nicht bestätigt werden kann. [49]

Interessanterweise konnten Riobello et. al diese Art der Kopiezahlveränderung nur in SNUCs feststellen, obwohl sie ebenfalls LCNEC analysierten. In der Arbeit von Glöss et al. analysierten wir sowohl die gesamte Kohorte der *IDH2* mutierten sinunasalen Tumore als auch noch einmal separat die *IDH2* mutierten SNUC und *IDH2* mutierten LCNEC. Dabei fanden wir keine deutlichen Unterschiede zwischen *IDH2* mutierten SNUCs und LCNEC. [2]

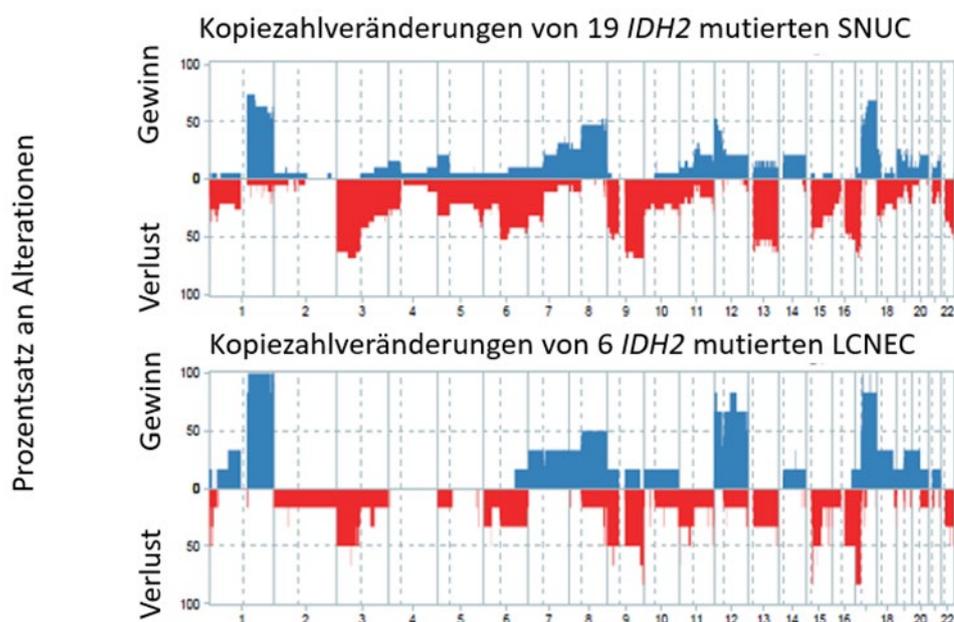


Abbildung 4: Vergleich der Kopiezahlveränderungen von *IDH2* mutierten SNUCs mit *IDH2* mutierten LCNEC.

Abbildung entnommen und modifiziert aus Glöss et al. 2021. Es lassen sich kaum Unterschiede in den Kopiezahlprofilen von *IDH2* mutierten SNUCs im Vergleich zu *IDH2* mutierten LCNEC

finden. *SNUC*: sinusal undifferenziertes Karzinom. *LCNEC*: großzelliges neuroendokrines Karzinom.

Mehrere vorangegangene molekulare Studien mit kleineren Kollektiven diskutierten bereits, ob es sich bei *IDH2* mutierten sinusalen Tumoren um eine gemeinsame Tumorentität handeln könnte. [49,50,67]

Angesichts dessen, dass wir in einem wesentlich größeren Kollektiv an *IDH2* mutierten sinusalen Tumoren kaum bis gar keine Unterschiede in den DNA Methylierungsprofilen und Kopiezahlveränderungen feststellen, alle *IDH2* mutierten sinusalen Tumore eine Gruppe im tSNE- Analyse formen und *IDH2* mutierte sinusale Tumore im Vergleich zu *IDH2*-Wildtyp Tumoren eine günstigere Prognose aufweisen, sprechen wir uns dafür aus, dass es sich bei *IDH2* mutierten sinusalen Tumoren um eine einzige Tumorklasse handelt.

4.3 Stärken und Schwächen der Studie

Die von uns durchgeführte Studie ist als retrospektive Beobachtungsstudie zu werten. Wir analysierten retrospektiv eine Kohorte an sinusalen Tumoren, ohne eine medizinische Intervention durchzuführen. [2]

Das Durchführen einer retrospektiven Studie kann mit verschiedenen Verzerrungen (Bias) assoziiert sein. [71] Bei der von uns durchgeführten Studie könnte ein Informationsbias vorliegen. Unter einem Informationsbias wird die fehlerhafte oder ungenaue Erhebung individueller Parameter verstanden.[72]

Unterschieden werden können: misclassification bias, observer bias, recall bias und reporting bias.[73]

Prinzipiell muss sich bei einem Informationsbias gefragt werden, ob die Datenerhebung bei allen Fällen gleich ablief. Um dies zu gewährleisten, erhielten unsere Kooperationspartner eine einheitliche Excel Tabelle, auszufüllen mit den für uns wichtigen klinischen Angaben zu den Tumoren. Um einem misclassification bias bezüglich der Diagnose entgegenzuwirken, wurde jede Tumorprobe, die von uns eingeschlossen wurde, hinsichtlich ihrer Histomorphologie noch einmal evaluiert.

In unserer Studie ist es uns gelungen, eines der bisher größten Kollektive an undifferenzierten sinusalen Tumoren aufzubauen und zu analysieren. Um möglichst viele Fälle identifizieren zu können, wurden bei der internen Archivrecherche kombinierte Suchparameter verwendet wie zum Beispiel „sinusal“ und „Nase-Nasennebenhöhle“ in Kombination mit der Tumordiagnose.

4.4 Nutzen für die klinische Praxis

In der klinischen Forschung gilt die randomisierte, kontrollierte Studie (RCTs – „randomised controlled trials“) als Goldstandard, um den Nutzen und die Wirkung einer Therapie zu erforschen. Die Überlegenheit einer neuen Therapie im Vergleich zu einer Standardtherapie kann in einer randomisierten, kontrollierten Studie nachgewiesen werden. Qualitativ-hochwertige RCTs mit geringem Risiko für systematische Fehler haben neben Metaanalysen den höchsten Evidenzgrad 1. [74]

Dennoch leisten auch retrospektive Beobachtungsstudien, wie die von uns durchgeführte Studie, einen wesentlichen Anteil daran, den Fortschritt in der Medizin und vor allem in der Diagnostik und Therapie für Patientin mit seltenen Erkrankungen voranzutreiben. So können wir nun beispielsweise durch den Nachweis der molekularen Uniformität von *IDH2* mutierten sinunasalen Tumoren eine klarere Struktur für die Diagnostik von undifferenzierten sinunasalen Tumoren geben. Des Weiteren kann der Nachweis einer *IDH2* Mutation im klinischen Alltag helfen, eine günstigere Prognose für das Überleben eines Patienten mit einem undifferenzierten sinunasalen Tumor auszusprechen.

Ein weiterer klinischer Aspekt betrifft den möglichen therapeutischen Ansatz in Bezug auf die *IDH2* Mutation. Gegenwärtig werden klinische Studien durchgeführt, um den Effekt und die Wirksamkeit von Medikamenten zu testen, die entweder eine direkte Wirkung auf *IDH2* oder indirekt durch die Hemmung der Akkumulation von 2-HG haben.

In Amerika hat die Food and Drug Administration (FDA) 2017 das Medikament Enasidenib zugelassen, welches in oraler Tablettenform verfügbar ist. Enasidenib ist ein direkter *IDH2* Inhibitor. Aktuell laufen Studien, um die Wirksamkeit bei therapierefraktärerer *IDH2* mutierter akuter myeloischer Leukämie (AML) zu testen. [75]

Enasidenib hemmt gezielt die mutierten *IDH2*-Varianten R140Q, R172K und R172S. Die Wirksamkeit und Verträglichkeit könnte demnach an *IDH2* mutierte sinunasale Tumore mit einer *IDH2* R172S Mutation getestet werden. Die Wirkung von Enasidenib basiert auf der Senkung des 2-HG-Spiegel und löst somit eine Differenzierung in leukämischen Zellen aus. [75,76]

Enasidenib könnte somit auch ein potenzielles Arzneimittel für undifferenzierte sinunasale Tumore mit einer *IDH2* Mutation sein. Jedoch ist zu beachten, dass es sich bei der AML um eine Erkrankung des Knochenmarks handelt und nicht um einen soliden Tumor. Dennoch könnte in einer interventionellen Studie die Wirksamkeit von Enasidenib an *IDH2* mutierten sinunasalen Tumorpatienten überprüft werden. Interventionelle Studien

werden in IV-klinische Phasen unterteilt. Demnach könnte der Effekt von Enasidenib anhand einer ausgewählten Patientengruppe z.B Patienten mit einem *IDH2* R172S mutiertem SNUC in einer Phase II Studie getestet werden. Eine Vermutung wäre, dass Enasidenib einen tumorverkleinernden Effekt durch den Differenzierungsstopp haben könnte und somit neoadjuvant, d.h vor einem geplanten chirurgischen Eingriff, eingesetzt werden könnte.

4.5 Ausblick auf weitere Forschungsaspekte

Der Fokus in der vorliegenden Arbeit lag vor allem auf undifferenzierten sinunasalen Tumoren mit einer *IDH2* Mutation. Das Spektrum an Tumoren des sinunasalen Raumes ist jedoch wesentlich weiter gefasst.

Wir konnten zeigen, dass die DNA Methylierungsanalyse das Potenzial hat, seltene und histologisch schwer zu diagnostizierende Tumore wie SNUC, SMARCB1(INI1)-defiziente sinunasale Tumore und ONB klar voneinander zu unterscheiden und somit eine Optimierung für die Diagnostik von sinunasalen Tumoren darstellt. Die Ausweitung der Analyse auf sämtliche Tumorentitäten des sinunasalen Raumes wäre ein nächster Schritt hin zum Aufbau und der Etablierung eines Tumorclassifiers auf Basis der DNA Methylierung, wie er bereits für Tumore des Zentralen Nervensystems besteht. [1] Unter zur Hilfenahme künstlicher Intelligenz, im Sinne eines machine learning Algorithmus, könnte so die Diagnostik von sinunasalen Tumoren effizienter gestaltet werden. Ein weiterer Fokus sollte auf weiterführende molekulare Analysen von Wildtyp SNUC gelegt werden. Aktuell wird das SNUC in der WHO noch als Ausschlussdiagnose geführt. [3] Jo et al. fanden in Wildtyp SNUCs genetische Treibermutationen wie NOTCH1, SMARCB4, TET2 und gehen deswegen davon aus, dass sich die Gruppe der SNUC genetisch noch in weitere Subgruppen aufspalten lässt. [67]

Nachfolgend könnten Beobachtungsstudien zum klinischen Verhalten dieser Subgruppen des SNUCs durchgeführt werden, sowie klinische Interventionsstudien bezüglich zielgerichteter, personalisierter Tumortherapiestrategien.

5. Schlussfolgerungen

Aus unseren Daten lassen sich verschieden Erkenntnisse und praktische Konsequenzen ableiten.

Erstens: Konnten wir zeigen, dass die DNA Methylierungsanalyse deutliche Vorteile in Bezug auf die Diagnostik von undifferenzierten sinunasalen Tumoren vergleichend zur bisher etablierten immunhistochemischen Färbung von neuroendokrinen Markern aufweist. Daher sprechen wir uns für einen verstärkten Einsatz der DNA Methylierungsanalyse in der Diagnostik von undifferenzierten sinunasalen Tumoren aus.

Zweites: Konnten wir zeigen, dass *IDH2* mutierte sinunasale Tumore mehr molekulare Ähnlichkeiten aufweisen als histomorphologische. Dass sie sich im t-distributed stochastic neighbour embedding (tSNE) klar von anderen sinunasalen Tumorentitäten abgrenzen. Des Weiteren, dass *IDH2* mutierte SNUCs und *IDH2* mutierte LCNEC kaum molekulare Unterschiede in Kopiezahlveränderungen zeigen.

Drittens: *IDH2* mutierte sinunasale Tumore zeigen eine bessere klinische Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben als SNUC vom *IDH2* Wildtyp und *SMARCB1*(*INI1*)-defiziente sinunasale Tumore. Ein Voranschreiten der Forschung bezüglich Langzeitstudien von *IDH2* mutierten sinunasalen Tumoren könnte weitere Aspekte zum klinischen Verhalten dieser Tumorentität aufzeigen.

Viertens: Unsere Erkenntnisse zusammenfügend, lässt sich ableiten, dass *IDH2* mutierte sinunasale Tumore als eine Tumorentität angesehen und sehr wahrscheinlich klinisch auch als solche behandelt werden können.

Literaturverzeichnis

1. Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, Koelsche C, Sahm F, Chavez L, Reuss DE, Kratz A, Wefers AK, Huang K, Pajtler KW, Schweizer L, Stichel D, Olar A, Engel NW, Lindenberg K, Harter PN, Braczynski AK, Plate KH, Dohmen H, Garvalov BK, Coras R, Holsken A, Hewer E, Bewerunge-Hudler M, Schick M, Fischer R, Beschorner R, Schittenhelm J, Staszewski O, Wani K, Varlet P, Pages M, Temming P, Lohmann D, Selt F, Witt H, Milde T, Witt O, Aronica E, Giangaspero F, Rushing E, Scheurlen W, Geisenberger C, Rodriguez FJ, Becker A, Preusser M, Haberler C, Bjerkvig R, Cryan J, Farrell M, Deckert M, Hench J, Frank S, Serrano J, Kannan K, Tsirigos A, Bruck W, Hofer S, Brehmer S, Seiz-Rosenhagen M, Hanggi D, Hans V, Rozsnoki S, Hansford JR, Kohlhof P, Kristensen BW, Lechner M, Lopes B, Mawrin C, Ketter R, Kulozik A, Khatib Z, Heppner F, Koch A, Jouvet A, Keohane C, Muhleisen H, Mueller W, Pohl U, Prinz M, Benner A, Zapatka M, Gottardo NG, Driever PH, Kramm CM, Muller HL, Rutkowski S, von Hoff K, Fruhwald MC, Gnekow A, Fleischhack G, Tippelt S, Calaminus G, Monoranu CM, Perry A, Jones C, Jacques TS, Radlwimmer B, Gessi M, Pietsch T, Schramm J, Schackert G, Westphal M, Reifenberger G, Wesseling P, Weller M, Collins VP, Blumcke I, Bendszus M, Debus J, Huang A, Jabado N, Northcott PA, Paulus W, Gajjar A, Robinson GW, Taylor MD, Jaunmuktane Z, Ryzhova M, Platten M, Unterberg A, Wick W, Karajannis MA, Mittelbronn M, Acker T, Hartmann C, Aldape K, Schuller U, Buslei R, Lichter P, Kool M, Herold-Mende C, Ellison DW, Hasselblatt M, Snuderl M, Brandner S, Korshunov A, von Deimling A, Pfister SM. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 22. März 2018;555(7697):469–74.
2. Glöss S, Jurmeister P, Thieme A, Schmid S, Cai WY, Serrette RN, Perner S, Ribbat-Idel J, Pagenstecher A, Bläker H, Keber U, Stadelmann C, Zechel S, Johann PD, Hasselblatt M, Paulus W, Thomas C, Dohmen H, Baumhoer D, Frank S, Agaimy A, Schüller U, Vasudevaraja V, Snuderl M, Liu CZ, Pfister DG, Jungbluth AA, Ghossein RA, Xu B, Capper D, Dogan S. IDH2 R172 mutations across poorly differentiated sinonasal tract malignancies: Forty molecularly homogenous and histologically variable cases with favorable outcome. *The American Journal of Surgical Pathology*. 01. September 2021;45(9):1190–1204.

3. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2017: p.18-25.
4. Dogan S, Vasudevaraja V, Xu B, Serrano J, Ptashkin RN, Jung HJ, Chiang S, Jungbluth AA, Cohen M A, Ganly I, Berger MF, Boroujeni AM, Ghossein RA, Ladanyi M, Chute DJ, Snuderl M. DNA methylation-based classification of sinonasal undifferentiated carcinoma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*. 11. Juni 2019; 32(10):1447–1459.
5. Capper D, Engel NW, Stichel D, Lechner M, Glöss S, Schmid S, Koelsche C, Schrimpf D, Niesen J, Wefers AK, Jones D, Sill M, Weigert O, Ligon K L, Olar A, Koch A, Forster M, Moran S, Tirade OM, Sáinz-Jaspeado M, Mora J, Esteller M, Alonso J, Garcia Del Muro X, Paulus W, Felsberg J, Reifenberger G, Glatzel M, Frank S, Monoranu CM, Lund VJ, von Deimling A, Pfister S, Buslei R, Ribbat-Idel J, Perner S, Gudziol V, Meinhardt M, Schüller U. DNA methylation-based reclassification of olfactory neuroblastoma. *Acta Neuropathologica*, 5. Mai 2018;136(2):255–271.
6. Frierson HF Jr., Mills SE, Fechner RE, Taxy JB, Levine PA. Sinonasal undifferentiated carcinoma. An aggressive neoplasm derived from schneiderian epithelium and distinct from olfactory neuroblastoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. November 1986;10(11):771–779.
7. Wadsworth B, Bumpous JM, Martin AW, Nowacki MR, Jenson AB, Farghaly H. Expression of p16 in sinonasal undifferentiated carcinoma (SNUC) without associated human papillomavirus (HPV). *Head and Neck Pathology*. 05.Dezember 2011;5(4):349–354.
8. Khan MN, Konuthula N, Parasher A, Genden EM, Miles BA, Govindaraj S, Iloreta AM. Treatment modalities in sinonasal undifferentiated carcinoma: an analysis from the national cancer database. *International Forum of Allergy and Rhinology*. Februar 2017;7(2):205–210.
9. Lehmann A, Remenschneider A, Dedmon M, Meier J, Gray S, Lin D, Chambers K. Incidence and survival patterns of sinonasal undifferentiated carcinoma in the United States. *Journal of Neurological Surgery. Part B, Skull Base*. März 2015; 76(02):094–100.
10. Morand GB, Anderegg N, Vital D, Ikenberg K, Huber GF, Soyka MB, Egger M, Holzmann D. Outcome by treatment modality in sinonasal undifferentiated carcinoma

- (SNUC): A case-series, systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology*. Dezember 2017;75:28–34.
11. Wittekind C, Meyer HJ (2013): *TNM: Klassifikation Maligner Tumoren*. 7. Auflage Weinheim: Wiley-VCH.
 12. Khademi B, Moradi A, Hoseini S, Mohammadianpanah M. Malignant neoplasms of the sinonasal tract: report of 71 patients and literature review and analysis. *Oral and maxillofacial surgery*. Dezember 2009;13(4):191–199.
 13. Internisten im Netz. UICC-Stadien [Internet]. [zitiert 25.06.2022]. verfügbar unter: <https://www.internisten-im-netz.de/glossar/begriff/uicc-stadien.html>
 14. Thompson LDR. Small round blue cell tumors of the sinonasal tract: a differential diagnosis approach. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology Inc*. Januar 2017;30(s1):S1–S26.
 15. Bishop J A, Antonescu C R, Westra WH. SMARCB1 (INI-1)-deficient carcinomas of the sinonasal tract. *The American Journal of Surgical Pathology*. September 2014;38(9):1282–1289.
 16. Bishop JA, Westra WH. NUT midline carcinomas of the sinonasal tract. *The American Journal of Surgical Pathology*. August 2012;36(8):1216–1221.
 17. Bishop JA, Guo TW, Smith DV, Wang H, Ogawa T, Pai SI, Westra Wh. Human papillomavirus-related carcinomas of the sinonasal tract. *The American Journal of Surgical Pathology*. Februar 2013;37(2):185–192.
 18. Agaimy A, Koch M, Lell M, Semrau S, Dudek W, Wachter DL, Knöll A, Iro H, Haller F, Hartmann A. SMARCB1(INI1)-deficient sinonasal basaloid carcinoma: a novel member of the expanding family of SMARCB1-deficient neoplasms. *The American Journal of Surgical Pathology*. September 2020;38(9):1274–1281.
 19. French CA. The importance of diagnosing NUT midline carcinoma. *Head and Neck Pathology*. März 2013;7(1):11–16.
 20. French CA, Miyoshi I, Kubonishi I, Grier HE, Perez-Atayde AR, Fletcher JA. BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Research*. Januar 2003;63(2):304–307.
 21. López-Hernández A, Vivanco B, Franchi, Bloemena E, Cabal VN, Potes S, Riobello C, García-Inclán C, López F, Llorente JL, Hermsen M. Genetic profiling of poorly differentiated sinonasal tumours. *Scientific Reports*. 05. März 2018;8(1):3998.
 22. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, Hovestadt V, Jones DTW, Capper D, Sill M, Buchhalter I, Northcott PA, Leis I, Ryzhova M, Koelsche C, Pfaff E, Allen SJ, Balasubramanian

- G, Worst BC, Pajtler KW, Brabetz S, Johann PD, Sahm F, Reimand J, Mackay A, Carvalho DM, Remke M, Phillips JJ, Perry A, Cowdrey C, Drissi R, Fouladi M, Giangaspero F, Lastowska M, Grajkowska W, Scheurlen W, Pietsch T, Hagel C, Gojo J, Lotsch D, Berger W, Slavc I, Haberler C, Jouvett A, Holm S, Hofer S, Prinz M, Keohane C, Fried I, Mawrin C, Scheie D, Mobley BC, Schniederjan MJ, Santi M, Buccoliero AM, Dahiya S, Kramm CM, von Bueren AO, von Hoff K, Rutkowski S, Herold-Mende C, Fruhwald MC, Milde T, Hasselblatt M, Wesseling P, Rossler J, Schuller U, Ebinger M, Schittenhelm J, Frank S, Grobholz R, Vajtai I, Hans V, Schneppenheim R, Zitterbart K, Collins VP, Aronica E, Varlet P, Puget S, Dufour C, Grill J, Figarella-Branger D, Wolter M, Schuhmann MU, Shalaby T, Grotzer M, van Meter T, Monoranu CM, Felsberg J, Reifenberger G, Snuderl M, Forrester LA, Koster J, Versteeg R, Volckmann R, van Sluis P, Wolf S, Mikkelsen T, Gajjar A, Aldape K, Moore AS, Taylor MD, Jones C, Jabado N, Karajannis MA, Eils R, Schlesner M, Lichter P, von Deimling A, Pfister SM, Ellison DW, Korshunov A, Kool M. New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell*. 25. Februar 2016;164(5):1060–72.
23. Zuo T, Tycko B, Liu TM, Lin J, Huang THM. Methods in DNA methylation profiling. *Epigenomics*. Dezember 2009;1(2):331–345.
24. Miyata K, Naito M, Miyata T, Mokuda S, Asahara H. Bisulfite sequencing for DNA methylation analysis of primary muscle stem cells. In *Methods in Molecular Biology*; 2017(1668):3-13.
25. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collin CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*. 01. März 1992;89(5):1827–1831.
26. Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res*. 01. Juli 2001;29(13):E65-5.
27. Bibikova M, Le J, Barnes B, Saedinia-Melnyk S, Zhou L, Shen R, Gunderson KL. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. *Epigenomics*. 1. Oktober 2009;1(1):177–200.
28. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 1. Oktober 2011;98(4):288–95.

29. Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, Van Dijk S, Muhlhausler B, Stirzaker C, Clark SJ. Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. *Genome Biol.* 7. Oktober 2016;17:208.
30. Cooper DN, Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Human Genetic.* September 1989;83(2):181-8.
31. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 15-21. Mai 1986;321(6067):209-13.
32. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology.* 20. Juli;196(2):261-82.
33. Fatemi M, Pao MM, Jeong S, Gal-Yam EN, Egger G, Weisenberger DJ, Jones PA. Footprinting of mammalian promoters: use of a CpG DNA methyltransferase revealing nucleosome positions at a single molecule level. *Nucleic Acids Research.* 27. November 2005;33(20):e176.
34. Hyams VJ. Olfactory neuroblastoma (Case 6) In: Batsakis JG, Hyams VJ, Morales AR, editors. *Special tumors of the head and neck.* Chicago: ASCP Press; 1982. pp. 24–29.
35. Jo VY, Chau NG, Hornick JL, Krane JF, Sholl LM. Recurrent IDH2 R172X mutations in sinonasal undifferentiated carcinoma. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology.* Mai 2017;30(5): 650–659
36. Geisbrecht BV, Gould SJ. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry.* 22. Oktober 1999; 274(34):30527-30533.
37. Haselbeck RJ, McAlister-Henn L. Function and expression of yeast mitochondrial NAD- and NADP-specific isocitrate dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry.* 05.Juni 1993;268(16):12116-12122.
38. Ceccarelli C, Grodsky NB, Ariyaratne N, Colman RF, Bahnson BJ. Crystal structure of porcine mitochondrial NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase complexed with Mn²⁺ and isocitrate. Insights into the enzyme mechanism. *Journal of Biological Chemistry.* 08.November 2002;277(45):43454-43462.
39. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Holland KB, Whitman SP, Becker H, Schwind S, Metzeler KH, Powell BL, Carter TH, Koltz JE, Wetzler M, Carroll AJ, Baer MR, Caligiuri MA, Larson RA, and Bloomfield CD.

- IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*. 10. Mai 2010; 28(14): 2348-2355.
40. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks CM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 10. September 2009;462(7274):739–744
41. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JCH, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, N.Y.)*. 26. September 2008;321(5897):1807–1812.
42. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipok C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *New England Journal of Medicine*. 10. September 2009;361(11):1058–1066.
43. Cairns RA, Iqbal J, Lemonnier F, Kucuk C, de Level L, Jais J-P, Marie Parrens, Martin A, Xerri L, Brousset P, Chan LC, Chan W-C, Gaulard P, Mak TW. IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*. 23. Februar 2012;119(8):1901–1903.
44. Amary MF, Bacsi K, Maggiani F, Damato S, Halai D, Berisha F, Pollock R, O'Donnell P, Grigoriadis A, Diss T, Eskandarpour M, Presneau N, Hogendoorn PC, Futreal A, Tirabosco R, Flanagan AM. IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *Journal of Pathology*. Juli 2011;224(3):334–343.

45. Wang P, Dong Q, Zhang C, Kuan P-F, Liu Y, Jeck WR, Andersen JB, Jiang W, Savich GL, Tan TX, Auman JT, Hoskins JM, Misher AD, Moser CD, Yourstone SM, Kim JW, Cibulskis K, Getz G, Hunt HV, Thorgeirsson SS, Roberts LR, Ye D, Guan K-L, Xiong Y, Qin L-X, Chiang DY. Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas. *Oncogene*. 20. Juni 2013; 32(25) 3091–3100.
46. Chen JY, Lai YS, Tsai HJ, Kuo CC, Yen BL, Yeh SP, Sun HS, Hung W-C. The Oncometabolite R-2-Hydroxyglutarate Activates NF- κ B-Dependent Tumor-Promoting Stromal Niche for Acute Myeloid Leukemia Cells. *Scientific Reports*. 31. August 2016;6:32428.
47. Dogan S, Chute DJ, Xu B, Ptashkin RN, Chandramohan R, Casanova-Murphy J, Nafa K, Bishop JA, Chiosea SI, Stelow EB, Ganly I, Pfister DG, Katabi N, Ghossein RA, Berger MF. Frequent IDH2 R172 mutations in undifferentiated and poorly-differentiated sinonasal carcinomas. *Journal of Pathology*. August 2017; 242(4):400-408.
48. Jo VY, Chau NG, Hornick JL, Krane JF, Sholl LM. Recurrent IDH2 R172X mutations in sinonasal undifferentiated carcinoma. *Modern Pathology*. Mai 2017; 30(5):650-659.
49. Riobello C, López-Hernández A, Cabal VN, García-Marín R, Suárez-Fernández L, Sánchez-Fernández P, Vivanco B, Blanco V, López F, Franchi A, Llorente JL, Hermsen MA. IDH2 Mutation Analysis in Undifferentiated and Poorly Differentiated Sinonasal Carcinomas for Diagnosis and Clinical Management. *The American Journal of surgical Pathology*. März 2020; 44(3):396-405.
50. Dogan S, Frosina D, Geronimo JA, Hernandez E, Mohanty A, Bale T, Hechtman JF, Arcila ME, Hameed MR, Jungbluth AA. Molecular epidemiology of IDH2 hotspot mutations in cancer and immunohistochemical detection of R172K, R172G, and R172M variants. *Human Pathology*. Dezember 2020;106:45–53.
51. Detre S, Jotti GS, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semi-quantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Journal of clinical Pathology*. September 1995; 48(9): 876–878.
52. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of pyrosequencing. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. September 2013;137(9): 1296-1303.
53. Grigg G, Clark S. Genes and genomes: Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *BioEssays*. 1994;16(6):431–6.
54. van der Maaten LJP, Hinton GE. Visualizing High-Dimensional Data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research*. November 2008; 9(27):2579-2605.

55. R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
56. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, Irizarry RA. Minfi: a flexible and comprehensive Bio-conductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*. 15. Mai 2014;30(10):1363–1369.
57. Kelly BJ, Fitch JR, Hu Y, Corsmeier DJ, Zhong H, Wetzel AN, Nordquist RD, Newsom DL, White P. Churchill: an ultra-fast, de-deterministic, highly scalable and balanced parallelization strategy for the discovery of human genetic variation in clinical and population-scale genomics. *Genome Biology*. 20. Januar 2015;16(1):6.
58. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data. *F1000Research*. 08. Juni 2016;5:1281.
59. Chen Y-a, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, Gallinger S, Hudson TJ, Weksberg R. Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics*. Februar 2013;8(2):203-9.
60. van der Maaten LJP. Accelerating t-SNE using Tree-Based Algorithms. *Journal of Machine Learning Research*. 2014;15:3221–45.
61. van der Maaten LJP, Hinton G. Visualizing High-Dimensional Data Using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research*. 2008;9:2579–605.
62. Krijthe JH (2015). Rtsne: T-Distributed Stochastic Neighbor Embedding using Barnes-Hut Implementation
63. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*. 15. September 2016;32(18):2847–2849.
64. Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones DTW, Schrimpf D, Sill M, Schmid S, Hovestadt V, Reuss DE, Koelsche C, Reinhardt A, Wefers AK, Huang K, Sievers P, Ebrahimi A, Schöler A, Teichmann D, Koch A, Hänggi D, Unterberg A, Platten M, Wick W, Witt O, Milde T, Korshunov A, Pfister SM, von Deimling A. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathologica*. August 2018; 136(2):181-210.
65. Hovestadt V, Zapatka M. conumee: Enhanced copy-number variation analysis using Illumina DNA methylation arrays. R package version 1.9.0

66. Krijgsman O, Carvalho B, Meijer GA, Steenbergen RDM, Ylstra B. Focal chromosomal copy number aberrations in cancer—Needles in a genome haystack. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*. November 2014;843(11):2698–2704
67. Jo VY, Chau NG, Hornick JL, Krane JF, Lynette Sholl LM. Recurrent IDH2 R172X mutations in sinonasal undifferentiated carcinoma. *Modern Pathology*. 2017 May;30(5):650-659.
68. Mito JK, Bishop JA, Sadow PM, Stelow EB, Faquin WC, Mills SE, Krane JF, French CA, Fletcher CDM, Hornick JL, Sholl LM, Jo YV. Immunohistochemical Detection and Molecular Characterization of IDH-mutant Sinonasal Undifferentiated Carcinomas. *American Journal of surgical Pathology*. 2018 Aug;42(8):1067-1075.
69. Gay LM, Kim S, Fedorchak K, Kundranda M, Odia Y, Nangia C, Battiste J, Colon-Otero G, Powell S, Russell J, Elvin JA, Vergilio J-A, Suh J, Ali SM, Stephens PJ, Miller VA, Ross JS. Comprehensive Genomic Profiling of Esthesioneuroblastoma Reveals Additional Treatment Options. *Oncologist*. Juli 2017;22(7):834-842.
70. Classe M, Yao H, Mouawad R, Creighton CJ, Burgess A, Allanic F, Wassef M, Leroy X, Verillaud B, Mortuaire G, Bielle F, Le Tourneau C, Kurtz J-E, Khayat D, Su X, Malouf GG. Integrated multiomic analysis of esthesioneuroblastomas identifies two subgroups linked to cell ontogeny. *Cell Reports*. 16. Oktober 2018;25(3): 811-821.
71. Oxford Centre for Evidence-Based Medicine: Levels of Evidence (March 2009) — Centre for Evidence-Based Medicine (CEBM), University of Oxford [Internet]. [zitiert 03. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://www.cebm.ox.ac.uk/resources/levels-of-evidence/oxford-centre-for-evidence-based-medicine-levels-of-evidence-march-2009>
72. Hammer G, du Prel J-B, Blettner M. Avoiding Bias in Observational Studies—Part 8 of a Series on Evaluation of Scientific Publications. *Deutsches Ärzteblatt*. 2009; 106(41):664-8.
73. Catalogue of Bias [Internet]. Catalog of Bias. 2017 [zitiert 3. Juli 2022]. Verfügbar unter: <https://catalogofbias.org/>
74. Harbour R, Miller J. A new system for grading recommendations in evidence based guidelines. *BMJ*. 11. August 2001;323(7308):334–6.
75. Dugan J, Pollyea D. Enasidenib for the Treatment of Acute Myeloid Leukemi. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. August 2018;11(8):755-760.
76. Krämer A, Bochtler T. Enasidenib. *Recent Results in Cancer Research*. 2018;212:187-197.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stefanie Ingrid Glöß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: DNA methylierungsbasierte Verbesserung der Klassifikation sinunasaler Tumore; DNA methylation-based refinement of sinonasal tumor classification selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 20.07.2022

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Stefanie Ingrid Glöß hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Capper, D., Engel, N. W., Stichel, D., Lechner, M., Glöss, S., Schmid, S., Koelsche, C., Schrimpf, D., Niesen, J., Wefers, A. K., et al. (2018). DNA methylation-based reclassification of olfactory neuroblastoma. *Acta Neuropathologica*, 136(2): p 255–271.

Beitrag im Einzelnen:

- Akquirierung von Tumorproben
- Verwaltung der Tumorproben
- Mitarbeit an der Erstellung und Einpflegung einer molekularen Tumordatenbank
- Mitarbeit an der Erstellung des Manuskriptes

Publikation 2: Glöss, S., Jurmeister, P., Thieme, A., Schmid, S., Cai, W. Y., Serrette, R. N., Perner, S., Ribbat-Idel, J., Pagenstecher, A., Bläker, H., et al (2021). IDH2 R172 mutations across poorly differentiated sinonasal tract malignancies: Forty molecularly homogenous and histologically variable cases with favorable outcome. *The American Journal of Surgical Pathology*, 45(9): p. 1190–1204.

Beitrag im Einzelnen:

- Herstellung und Verwaltung von Kooperationspartnern für das Projekt
- Datenbank und Archivrecherche zur Akquirierung geeigneter Tumorproben
- Verwaltung des Probenmaterials (z.B. FFPE-Blöcke, Gewebeschnitte)
- Anfertigung von HE-Schnitten
- Anforderung von immunhistochemischen Färbungen und molekularen Analysen
- Histologische Begutachtung durch Mikroskopieren und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen unter Aufsicht von Prof. Dr. David Capper und Dr.med. Snjezana Dogan
- Auswahl des geeigneten Tumorareals zur Stanzung und Entnahme von Gewebe
- Anlage und verwalten der Probanden und der molekularen Ergebnisse in einer Datenbank
- Bewerten der Qualität der DNA-Methylierungsanalysen
- Durchführen der bioinformatischen Auswertung der Methylierungsdaten:
 - Durchführung des unsupervidierten Clusterings
 - Durchführen der tSNE Analysen
 - Berechnung der Kopiezahlveränderungen
- Erheben/Verwalten der klinischen Daten
- Auswerten der histologischen Analysen,
- Auswerten der DNA-Methylierungsanalysen
- Schreiben des Manuskript - Entwurfes
- Auf den Daten basierende von mir erstellte Abbildungen: Abbildung 1-4 in dieser Dissertation, Figure 6 und Figure 7 in Glöss et al. 2021, sowie Table 3 in Glöss et al. 2021

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: "PATHOLOGY" Selected Category Scheme: WoS
 Gesamtanzahl: 78 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease	5,083	16.750	0.009070
2	ACTA NEUROPATHOLOGICA	21,908	14.251	0.040740
3	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,992	7.500	0.005960
4	Seminars in Immunopathology	3,734	7.480	0.006690
5	MODERN PATHOLOGY	13,799	5.988	0.019760
6	JOURNAL OF PATHOLOGY	16,307	5.979	0.017910
7	BRAIN PATHOLOGY	5,308	5.568	0.007020
8	JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS	4,299	5.553	0.009700
9	CELLULAR ONCOLOGY	1,719	5.304	0.002220
10	AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY	19,940	4.958	0.020820
11	Disease Models & Mechanisms	5,926	4.651	0.013370
12	LABORATORY INVESTIGATION	10,491	4.197	0.008970
13	EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS	3,020	4.096	0.006000
14	ARCHIVES OF PATHOLOGY & LABORATORY MEDICINE	10,104	4.094	0.012880
15	ADVANCES IN ANATOMIC PATHOLOGY	1,502	3.746	0.002260
16	PATHOLOGY	3,086	3.744	0.004860
17	CANCER CYTOPATHOLOGY	2,768	3.703	0.004670
18	HISTOPATHOLOGY	9,864	3.626	0.011930
19	AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY	37,564	3.491	0.021170
20	Journal of Pathology Clinical Research	416	3.489	0.001700

Druckexemplar der Publikation

Quelle: Glöss, S., Jurmeister, P., Thieme, A., Schmid, S., Cai, W. Y., Serrette, R. N., Perner, S., Ribbat-Idel, J., Pagenstecher, A., Bläker, H., et al (2021). IDH2 R172 mutations across poorly differentiated sinonasal tract malignancies: Forty molecularly homogenous and histologically variable cases with favorable outcome. *The American Journal of Surgical Pathology*, 45(9): p. 1190–1204

<https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001697>

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Komplette Publikationsliste

1. **Glöss S**, Jurmeister P, Thieme A, Schmid S, Cai WY, Serrette RN, Perner S, Ribbat-Idel J, Pagenstecher A, Bläker H, Keber U, Stadelmann C, Zechel S, Johann PD, Hasseblatt M, Paulus W, Thomas C, Dohmen H, Baumhoer D, Frank S, Agaimy A, Schüller U, Vasudevaraja V, Snuderl M, Liu CZ, Pfister DG, Jungbluth AA, Ghossein RA, Xu B, Capper D, Dogan S. IDH2 R172 Mutations Across Poorly Differentiated Sinonasal Tract Malignancies: Forty Molecularly Homogenous and Histologically Variable Cases With Favorable Outcome. *Am J Surg Pathol.* 2021 Sep 1;45(9):1190-1204. doi: 10.1097/PAS.0000000000001697.

Impact-Faktor: 6,394

2. Capper D, Engel NW, Stichel D, Lechner M, **Glöss S**, Schmid S, Koelsche C, Schrimpf D, Niesen J, Wefers AK, Jones DTW, Sill M, Weigert O, Ligon KL, Olar A, Koch A, Forster M, Moran S, Tirado OM, Sáinz-Jaspeado M, Mora J, Esteller M, Alonso J, Del Muro XG, Paulus W, Felsberg J, Reifenberger G, Glatzel M, Frank S, Monoranu CM, Lund VJ, von Deimling A, Pfister S, Buslei R, Ribbat-Idel J, Perner S, Gudziol V, Meinhardt M, Schüller U. DNA methylation-based reclassification of olfactory neuroblastoma. *Acta Neuropathol.* 2018 Aug;136(2):255-271. doi: 10.1007/s00401-018-1854-7.

Impact-Faktor: 18,174

Danksagung

Zuallererst möchte ich Prof. Dr. David Capper dafür danken, dass er mir die Chance gegeben hat, Einblick in ein äußerst spannendes Gebiet der molekularen Pathologie zu erhalten. Sowie für das Vertrauen und die Möglichkeit, mich in komplexen analytischen Verfahren der Bioinformatik einzuarbeiten und somit die Grundlage geschaffen hat, eine Verbindung aus klassischer Histomorphologie und molekularer Pathologie herzustellen. Für die Unterstützung beim Erstellen und Auswerten der bioinformatischen Aspekte, möchte ich meiner Zweitbetreuerin Dr. Anne Thieme Dank sagen. Für die Möglichkeit, am Institut für Neuropathologie zu forschen und für die Bereitstellung des Equipments, danke ich dem Institutsleiter Prof. Dr. Frank Heppner.

Einen besonderen Dank möchte ich Dr. Snjezana Dogan zukommen lassen, die mich in das MSKCC eingeladen hat und mir somit sowohl einen besonderen kulturellen Einblick gewährt als auch durch Ihre Expertise auf dem Gebiet der Hals-Nasen-Ohren Pathologie mein Interesse an sinunasalen Tumoren befeuert hat.

Ich danke Dr. Phillip Jurmeister für das tatkräftige Vorantreiben und Fortführen des Projektes.

Des Weiteren möchte ich Simone Schmid danken, die mir in vielerlei Hinsicht ihre Unterstützung hat zu Teil werden lassen. Mein Dank gilt auch den Labortechnischen Assistenten, sowie dem gesamten Team der Neuropathologie der Charité, die mich während meiner gesamten Zeit als Doktorandin mit offenen Armen, kollegial und freundschaftlich empfangen haben.

Dem Berlin Institut of Health möchte ich dafür danken, dass sie mich und meine Arbeit mit einem Stipendium gewürdigt haben.

Zum Schluss gilt mein herzlicher Dank den besonderen Menschen in meinem Leben: meiner Familie, die mich immer und zu jeder Zeit unterstützte, meinen Freunden, die trotz der zwei Jahre Pandemie zu mir gehalten haben und meinem Lebensgefährten für seine Geduld, seinen Frohmut und seinen positiven Optimismus.