

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung VIII, Medizinische Onkologie und Pneumologie

**Zusammenstellung und Auswertung der Tübinger
Erwachsenen-Kohorte
an Mittellinienkarzinomen (NUT *midline carcinoma*)**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Sidiras, Mirjana, geb. Slijepcevic**

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Lauer

2. Berichterstatter: Professorin Dr. R. Klein

Tag der Disputation: 08.09.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Historie / Erstbeschreibung und Namensgebung	1
1.2 Epidemiologie	3
1.3 Molekulargenetik der Erkrankung.....	4
1.4 Epigenetische Auswirkungen der NUT Translokationen	5
1.5 Molekulare Diagnostik und Klassifikation	7
1.6 Bildgebung.....	8
1.7 Klinische Auswirkungen der NUT Translokationen	8
1.8 Prognosefaktoren	9
1.9 Therapieansätze	10
1.10 Wissenschaftliche Fragestellungen	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Tübinger NC-Patientenkohorte	14
2.2 Genehmigung der retrospektiven Datenanalyse und -auswertung durch ein entsprechendes Ethikvotum	16
2.3 Diagnostische Methodik zur Feststellung des Vorliegens von NC-Tumoren	17
2.4 Methoden der Auswertung.....	20
3. Ergebnisse.....	21
4. Diskussion.....	34
5. Zusammenfassung.....	51
6. Literaturverzeichnis.....	53
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	60
8. Danksagung	61

Abkürzungsverzeichnis

Abb: Abbildung

ALT: Alanine- aminotransferase

AST: Aspartate-aminotransferase

BD1: Bromodomain 1

BD2: Bromodomain 2

BET: Bromodomain; extraterminal motif

BI 894999: Bromodomain inhibitor 894999

BRD2: Bromodomain- containing protein 2

BRD3: Bromodomain- containing protein 3

BRD4: Bromodomain-containing protein 4

BRDT: Bromodomain Testis Associated

CDK9: inhibitor of cyclin-dependent kinase

cDNA: Complementary desoxyribonucleic acid

CGP: Comprehensive genomic profiling

CR: Kompletter Antwort

CYP3A4: Cytochrom P₄₅₀ 3A4

DAB: Diaminobenzidine

DNA: Desoxyribonucleic acid

dNTP: 2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate

ECOG: Eastern Co-operative Oncology Group

EFS: Ereignis-freie Überleben

EZH2: Enhancer of Zeste, homolog 2

FDA: Food and Drug Administration

F-FDG-PET/CT: Fluorodeoxyglucose- positron emission tomography/ computed tomography

FFPE: Formaline-fixed paraffin-embedded tissues

FISH: Fluorescence in situ Hybridisierung

HAT: Histon-Acetyltransferase

HDACi: Histone deacetylase inhibitors

HIV: Human immunodeficiency virus

HPV: Human Papilloma Virus

iBET: Bromodomain; extraterminal motif inhibitors

IGF-1R: Insulin-like growth factor-1 receptor

LVEF: Left ventricular ejection fraction

MHC: Major histocompatibility complex

mRNA: Messenger ribonucleic acid

MRT: Magnetic-resonance-tomography

mTOR: Mammalian target of rapamycin

NC-Tumor/NC: Nuclear-protein-in-testis carcinoma

NGS: Next-Generation sequencing

NLS: Bipartite nuclear localization signal

NSCLC-NOS: Non-small cell lung cancer / not otherwise specified

NSCLC-SCC: Non-small cell lung cancer / squamous cell carcinoma

NSD3: Nuclear receptor binding SET domain protein 3

NUT: Nuclear-protein-in-testis

NUTM1: NUT Midline Carcinoma Family Member 1

NYHA: New York Heart Association

OS: Overall Survival

PCR: Polymerase chain reaction

PET-CT: Positron emission tomography/ computed tomography

PFS: Progression-Free Survival

PR: Partieller Antwort

RNA: Ribonucleic acid

RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction

SARS-CoV-2: Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2

s.o.: siehe oben

Sox2: sex determining region Y- box 2

UKT: Universitätsklinikum Tübingen

U.S.A.: United States of America

ZNF532: Zinc finger protein 532

ZNF592: Zinc finger protein 592

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kaplan-Meier Kurve für Patienten mit NC-Tumoren

Abbildung 2: Schema der NUT-Genfusionen

Abbildung 3: Mechanistisches Modell

Abbildung 4: Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers C52B1

Abbildung 5: NC-Primärtumor in der rechten Sublingualdrüse

Abbildung 6: Unterteilung von NC-Tumoren in 3 Gruppen

Abbildung 7: Ansprechen eines NC-Tumors im Bereich der Nasopharynx

Abbildung 8: Landkarte der Tübinger Kohorte

Abbildung 9: Darstellung des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Feststellung der Erstdiagnose "NC-Tumorerkrankung"

Abbildung 10: Darstellung des Geschlechts in Prozent

Abbildung 11: Darstellung der Lokalisation der NC-Primärtumore in Prozent

Abbildung 12: Darstellung der Art der Gentranslokationen

Abbildung 13: Darstellung der Tumordurchmesser bei der Diagnosstellung

Abbildung 14: Darstellung des prozentualen Anteils von Metastasen bei Erstdiagnose

Abbildung 15: Darstellung der regionalen Lymphknotenbeteiligung in Prozent

Abbildung 16: Darstellung der zuerst zum Einsatz gekommenen Behandlungssequenz

Abbildung 17: Darstellung der initialen Therapieantwort

Abbildung 18: Darstellung der initial durchgeführten Bildgebungen

Abbildung 19: Darstellung der Dauer der Symptome

- Abbildung 20: Darstellung des prozentualen Anteils bei denen paraneoplastische Syndrome vorlagen
- Abbildung 21: Darstellung des prozentualen Anteils des Patienten bei denen maligne Ergüsse vorlagen
- Abbildung 22: Darstellung des Differenzierungsgrades
- Abbildung 23: Darstellung des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Feststellung der Erstdiagnose
- Abbildung 24: Vergleichende Geschlechterverteilung der Patienten der Tübinger NC-Kohorte und der Patienten der Bostoner NC-Kohorte.
- Abbildung 25: Primärtumorlokalisationen der Patienten der Tübinger NC-Kohorte und der Patienten der Bostoner NC-Kohorte
- Abbildung 26: Die häufigsten Genfusionen der Patienten der Tübinger NC-Kohorte und der Patienten der Bostoner NC-Kohorte
- Abbildung 27: Darstellung der Tumordurchmesser bei der Diagnosedstellung der Patienten der Tübinger NC-Kohorte und der Patienten der Bostoner NC-Kohorte
- Abbildung 28: Darstellung des prozentualen Anteils von Metastasen bei Erstdiagnose, unabhängig davon, ob primär eine Fehldiagnose vorlag oder nicht
- Abbildung 29: Darstellung der regionalen Lymphknotenbeteiligung
- Abbildung 30: Darstellung der zuerst bei den Patienten der Tübinger Kohorte und Patienten der Bostoner Kohorte zum Einsatz gekommenen Behandlungssequenz
- Abbildung 31: Darstellung der initialen Therapieantwort bei den Patienten der Tübinger Kohorte, und bei den Patienten der Bostoner Kohorte
- Abbildung 32: Darstellung der initial durchgeführten Bildgebungen bei Patienten der Tübinger NC-Kohorte

Abbildung 33: Darstellung der Dauer der Symptome, bevor erstmalig die Tumordiagnose gestellt wurde

Abbildung 34: Darstellung des prozentualen Anteils an Patienten der Tübinger Kohorte, bei denen paraneoplastische Syndrome vorlagen

Abbildung 35: Darstellung des prozentualen Anteils an Patienten der Tübinger Kohorte, bei denen maligne Ergüsse vorlagen

Abbildung 36: Darstellung des Differenzierungsgrades der Tübinger Kohorte

1. Einleitung

1.1 Historie / Erstbeschreibung und Namensgebung

Das Nuclear-protein-in-testis (NUT) Mittellinienkarzinom (engl. *NUT midline carcinoma (NC-Tumor/NC)*) stellt einen Subtyp sehr aggressiver Plattenepithelkarzinome dar^{13,21,28}, bei dem es zu einer chromosomalen Reorganisation im NUTM1 Gen kommt (Anmerkung: das vom NUTM1 Gen exprimierte NUT Protein ist normalerweise nur in postmeiotischen Spermatozyten detektierbar, was dessen Namensgebung begründet hat; seine physiologische Funktion ist bislang nicht bekannt).^{19,24,44,48}

NUTM1 bildet in den meisten Fällen mit dem Bromodomain-enthaltenden Protein 4 (BRD4) in der Folge einer aberranten Gentranslokation eine NUTM1-BRD4 Genfusion. Als zweit- und dritthäufigste Fusionen kommt es zur Ausbildung von NUTM1-BRD3 und NUTM1-NSD3 Fusionsgenen. Weitere Genfusionen sind in Literatur beschrieben, treten aber sehr viel seltener auf (z.B. Genfusionen mit den Zink Finger Proteinen 532 und 592 (ZNF532, ZNF592)).^{2,8,50}

Der ursprüngliche Name „Mittellinienkarzinom“ (heute: NUT Carcinoma - NC) kommt von den am häufigsten anzutreffenden Lokalisationen dieser Tumorentität, die sich sehr oft in der Körpermittellinie (Kopf, Hals, Mediastinum) abspielen. Allerdings wurden mit der immer höheren Anzahl an histologisch korrekt zugeordneten Fällen in den letzten Jahren auch viele Lokalisationen außerhalb der Körper-Mittellinie (u.a. in den Lungen, Nieren und an anderen Lokalisationen) registriert. Bei derartigen "extra-zentralen" Primärlokalisationen ist der Verlauf häufig durch ein besonders aggressives Tumorstadium mit früher Infiltration in umgebende anatomische Strukturen und einer ausgeprägten diffusen Metastasierung geprägt.^{1,48,49,51}

Initial wurden NC-Tumore insbesondere bei Kindern und Jugendlichen beschrieben. In der Tat betreffen NC-Tumore sehr häufig junge Menschen. Vor diesem Hintergrund kommt es häufig zunächst zu der Stellung von Fehldiagnosen und inkorrekten Zuordnungen zu Tumoren, die bekanntermaßen und in erster Linie bei Kindern und Jugendlichen gehäuft vorkommen (z.B. fälschliche Klassifikation als Keimzelltumore oder als gering differenzierte Karzinome).^{27,47}

Heutzutage weiß man, dass NC-Tumore in jedem Lebensalter auftreten können. Es findet sich eine Gleichverteilung bei Männern und Frauen.

Die NC-Tumore stellen eine der aggressivsten Formen von Plattenepithelkarzinomen dar; mehr als 80% der Patienten sterben innerhalb eines Jahres, gerechnet ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung (Abb. 1).⁴¹

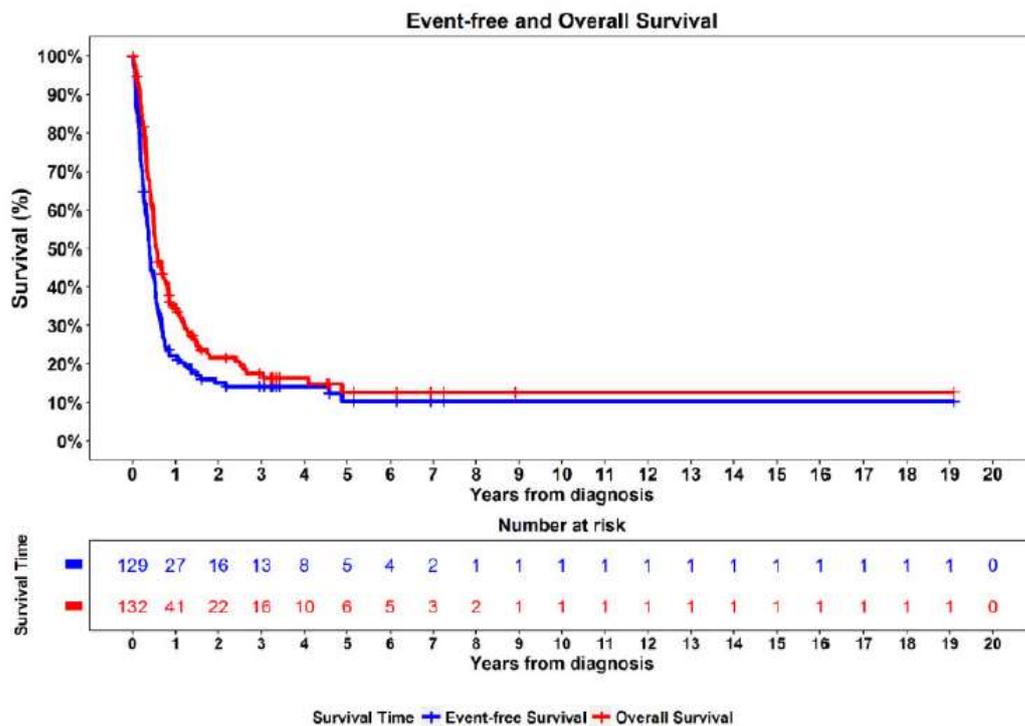


Abb. 1: Kaplan-Meier Kurve für Patienten (behandelt mit diversen Therapieregimen) mit NC-Tumoren. Quelle (Chau et al., 2019)⁸

Die Entität der NC-Tumore wurde zuerst in Japan im Jahr 1991 bei einem initial fälschlicherweise als Schilddrüsenkarzinom klassifizierten Tumor beschrieben. In aufwändiger Arbeit fand sich in der weitergehenden Analytik überraschenderweise eine Gentranslokation ((15;19) (q14; p13.1)). Die daraus resultierende NUTM1-BRD4 Fusion galt zu diesem Zeitpunkt als mehr als ungewöhnlich und wurde erst 12 Jahre später dem Pathologen Dr. Christopher A. French/Boston, USA, vorgestellt.^{19,53}

Im weiteren Verlauf wurden noch vier weitere Fälle mit genau dieser Translokation identifiziert. Im Rahmen eines daraufhin von Dr. French initiierten systematischen *screenings* an gering differenzierten Plattenepithelkarzinomen bei Kindern und jungen Erwachsenen wurden dann weitere elf Fälle mit NUTM1 Genfusionen identifiziert. Auf

dieser ersten breiteren Wissensbasis wurde dann von Dr. French und Kollegen im Jahr 2004 diese neuartige Entität der NC-Tumore definiert und publiziert.¹⁹

Dr. French, der sich von Anfang ausgesprochen intensiv um die Erforschung sämtlicher Aspekte der NC-Tumore kümmert, organisiert auch das weltweite Netzwerk zu dieser sehr seltenen Tumorart (<https://www.dana-farber.org/nut-carcinoma/>) und gilt u.a. auch deshalb als der Nestor dieses Forschungsgebietes.

1.2 Epidemiologie

NC-Tumore stellen eine sehr seltene und ausgesprochen aggressiv verlaufende maligne Erkrankung dar.³⁹ Die Prävalenz liegt in den U.S.A. bei 3.600 Fällen pro Jahr. Die Altersspanne betroffener Patienten bei Erstdiagnose umfasst das gesamte Lebensalter und liegt zwischen 18 Tagen und 80 Jahren. Das mittlere Lebensalter bei Erstdiagnose liegt bei 23,6 Jahren.^{8,40,47} Jüngere Patienten weisen nach wie vor keine bessere Überlebensrate als ältere Patienten auf (French CA, 2021).

Die häufigsten Tumorlokalisationen der NC-Tumore finden sich im Bereich Thorax/Mediastinum (51%) sowie im Kopf-Hals-Bereich (41%). Andere Lokalisationen (Nieren, Harnblase, Beckenknochen) sind im Vergleich hierzu sehr viel seltener (8%).⁸

Der Anteil der NC-Tumore an allen Tumorerkrankungen liegt bis dato bei lediglich 0,06 bis 0,2%. Allerdings liegen die „wahren“ Zahlen vermutlich deutlich höher, da NC-Tumore nach wie vor nicht zuverlässig als solche diagnostiziert und dementsprechend auch nicht vollständig erfasst werden. Dadurch, dass in der feingeweblichen Untersuchung NC-Tumore zunächst häufig fälschlicherweise nicht erkannt werden, sondern lediglich der Aspekt des Vorliegens eines schlecht differenzierten Karzinoms attestiert wird, wird eine rasche und bestmögliche Behandlung der NC-Patienten und eine Erfassung derselben in klinischen Studien häufig zunächst erschwert. NC-Tumore werden in dieser Konstellation nach wie vor viel zu selten als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen, obwohl seit vielen Jahren ein NC-spezifischer Antikörper zur Verfügung steht, der in einer überall sehr einfach durchführbaren Immunhistochemie mit hoher Spezifität und Sensitivität eingesetzt werden kann.

In Deutschland werden die meisten NC-Patienten am Universitätsklinikum Tübingen (UKT) behandelt, da hier das derzeit für Deutschland einzige Zentrum lokalisiert ist, das bis zum Jahr 2021 eine Studien-spezifische Therapieoption (s.o.) anbieten konnte

und diese Tumor-Entität parallel dazu hier auch intensiv präklinisch beforscht wird. Dadurch ist in den letzten Jahren am UKT eine besondere Expertise entstanden.

Da bisher immer noch zu wenige systematisch zu dieser sehr seltenen Krebserkrankung erhobene Daten bestehen, war es naheliegend, die bisherigen Daten der Tübinger NC-Kohorte in einem eigenen NC-Register zusammenzustellen und im Detail zu analysieren, um auf dieser Basis neuartige wissenschaftliche Fragestellungen formulieren zu können, die nun im Rahmen weiterer präklinischer und klinischer NC-Studien überprüft werden können.

1.3 Molekulargenetik der Erkrankung

Wie oben bereits beschrieben, kommt es bei NC-Tumoren zu einer chromosomalen Reorganisation im NUTM1 Gen.⁸ Als eine der daraus resultierenden Gentranslokationen wurde im Jahr 2004 erstmals durch Dr. French eine NUTM1-BRD4 Genfusion vorgestellt, nachdem es gelungen war, von den Primär-Tumorzellen des betroffenen Patienten aus Japan eine stabile Tumor-Zelllinie zu erzeugen. An diesem Material wurde zum ersten Mal festgestellt, dass BRD4-NUTM1 Genfusionen aus einer t (15;19) Gentranslokation resultieren.^{11,23,49}

Heutzutage kann die molekulargenetische Diagnose eines NC-Tumors mittels einer Karyotyp-Analyse gestellt werden, und zwar über Nachweis der charakteristischen Translokation t (15;19), in 60% mit Juxtaposition der Gene BRD4 und NUT, als BRD4-NUT Fusionsgen. Analog können auch andere Fusionsgene wie BRD3-NUT oder NSD3-NUT diagnostiziert werden (Abb. 2).^{22,25}

Es finden sich Fusionen zwischen dem 5' Ende des BRD4 und dem 3' Ende des NUTM1 Genes auf dem strukturell veränderten Chromosom 19 (man spricht in diesem Zusammenhang von einem sog. Derivatchromosom) wie auch zwischen dem 5' Ende des NUTM1 und dem 3' Ende des BRD4 Genes auf dem Derivatchromosom 15.^{19,30}

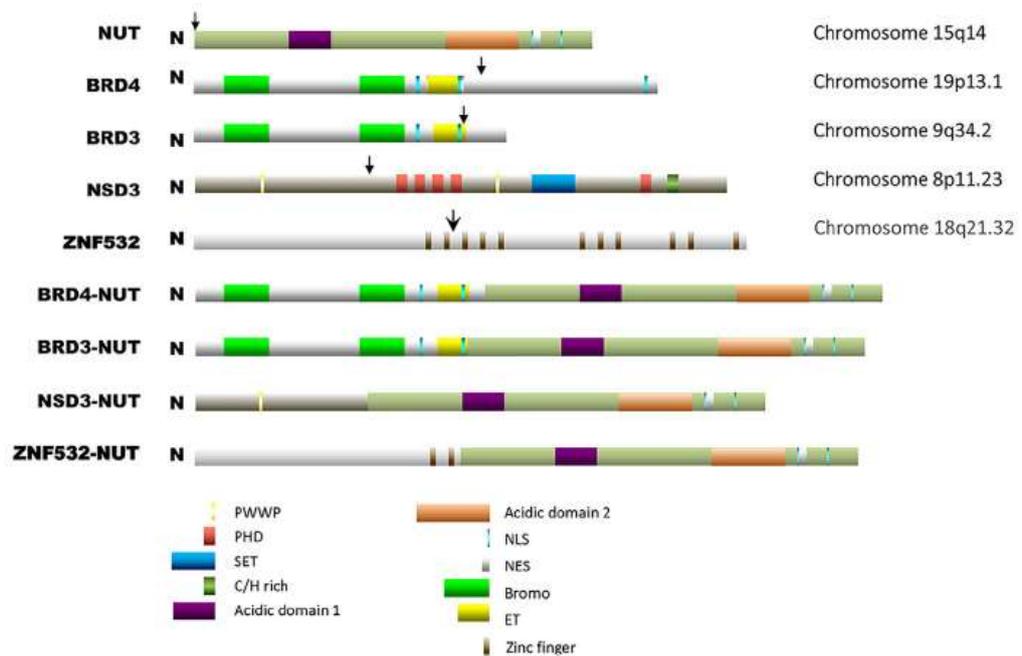


Abb. 2: Schema der NUT-Genfusionen und der daraus resultierenden aberranten Fusionsproteine. Quelle (French CA, 2018)¹⁹

Das BRD4 Protein ist das wichtigste Mitglied der BRD-Familie. Es reguliert Transkription, Zellwachstum, Zellzyklus sowie die Struktur des Chromatins. Eine Fehlregulation führt in pathognomonischer Weise zu der Entstehung von NC-Tumoren.^{19,24,46,52}

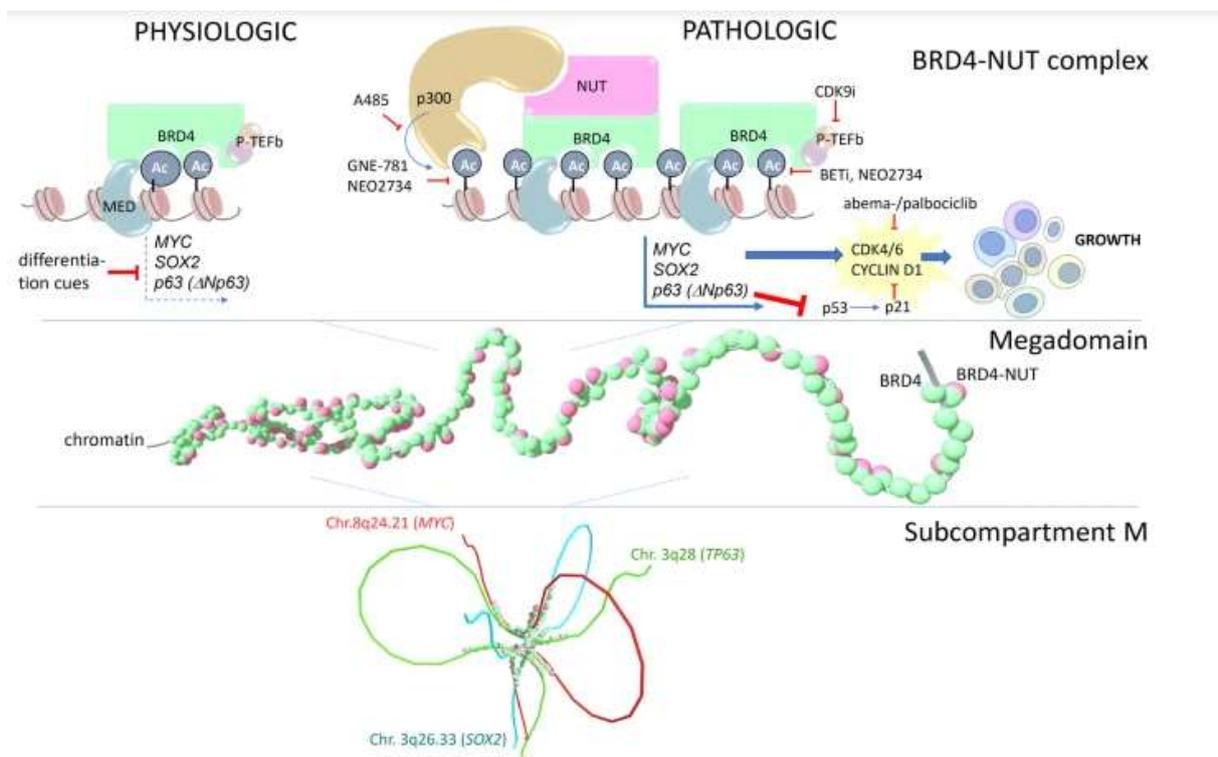
Das BRD4-NUT Fusions (Onko-)protein enthält zwei Bromodomänen (BD1 und BD2). Hierbei handelt es sich um Proteininteraktionsdomänen, die spezifisch acetylierte Lysinreste erkennen und diese binden. Zusätzlich enthalten sind eine extraterminale Domäne und ein *bipartite nuclear localization signal (NLS)*.

BD1 bindet an die Histon-Acetyltransferase (HAT) p300, die dadurch aktiviert wird. Die HAT p300 ist verantwortlich für die bereits aufgeführten stark alterierten Transkriptionsmuster, aus denen der maligne Phänotyp der NC-Tumore resultiert.^{12,19-21,46,52}

1.4 Epigenetische Auswirkungen der NUT Translokationen

Das BRD4-NUT Fusions (Onko-)protein lokalisiert und aktiviert Histone (H3K27Ac, H3K9, 14Ac). Dadurch entstehen transkriptionell hochaktive sog. Megadomänen, die in einem *Feed-Forward-Mechanismus* weitere Fusionsproteine rekrutieren, so dass

sich über die Zeit das Ausmaß der alterierten Transkriptionsmuster immer weiter zunimmt (Abb. 3).^{36,47,51} Im Resultat kommt es u.a. zur Stimulation der Transkription und Expression von wichtigen Onkoproteinen wie MYC, p63 und MED24, was Tumorbedingend ist.^{9,17,28} Der pathogenetische Mechanismus anderer Fusionsproteine, wie z.B. ZNF532-NUTM1 und NSD3-NUTM1, ist ähnlich gelagert wie beim Fusionsprotein BRD4-NUTM1.³²



Ac acetyl-lysine, MED mediator complex.

Abb. 3: Mechanistisches Modell, wie BRD4-NUT Fusionsproteine das aberrante Zellwachstum antreiben und die Differenzierung von NC-Tumorzellen blockieren. Quelle (Eagen, French CA, 2021)¹⁶

Es gibt bis dato keinen Hinweis, dass andere Faktoren ursächlich die Entstehung von NC-Tumoren herbeiführen. Nikotinabusus spielt offensichtlich keine Rolle bei der Krankheitsentstehung. Bis dato wurde auch kein NC-Fall beobachtet, bei dem ein kausaler Zusammenhang mit Infektionen durch das Epstein-Barr Virus oder das *Human Papilloma Virus* (HPV) hergestellt hätte werden können.⁴¹

1.5 Molekulare Diagnostik und Klassifikation

Für die Diagnosestellung von NC-Tumoren werden im Wesentlichen drei Methoden verwendet: die Immunhistochemie, die Genomsequenzierung und die *Fluorescence in situ* Hybridisierung (FISH).⁴²

Seit 2009 steht ein spezifischer Antikörper für die immunhistochemische Detektion von NC-Tumoren zur Verfügung (*monoclonal rabbit antibody, C52B1*; Sensitivität: 87%; Spezifität: nahe 100%).^{9,19} Auf dieser Basis wurden in einfacher Weise über 1.000 Fälle an NC-Tumoren registriert. Jedes gering aggressiv wachsende Karzinom ohne Drüsendifferenzierung und ohne bekannte Ätiologie sollte den Verdacht auf einen NC-Tumor lenken und immunhistochemisch (Abb. 4) untersucht werden.¹⁹

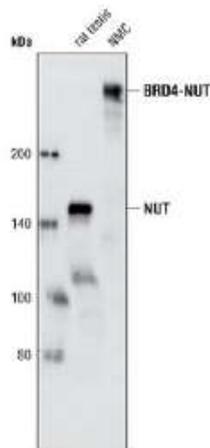


Abb. 4: Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers C52B1, der spezifisch an die entsprechenden Fusionsproteine von NC-Tumoren bindet. (Übernommen von Cell Signaling Technology, ohne Verfasser)⁴³

Die FISH Technik ist ebenso sensitiv, jedoch aufwändiger zu etablieren und deswegen nicht so stark verbreitet. Sie kann benutzt werden, um die genaue Art der chromosomalen Reorganisation in NUTM1 Gene zu bestimmen. Darüber hinaus steht das Archer® FusionPlex Solid Tumor Panel zur Verfügung, mit dem an Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Geweben (FFPE) alle Fusionspartner eindeutig detektiert werden können.¹⁹ Weiterhin können mit einer hochspezifischen *Reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) die Fusionspartner von BRD3 und BRD4 detektiert werden.

Auch eine spezifische zytogenetische Analytik kann zum Einsatz kommen, benötigt allerdings sehr viel Zeit und Ressourcen; darüber hinaus müssen hierfür die Gewebeproben frisch sein.¹⁹

1.6 Bildgebung

Die bildgebenden Verfahren spielen für die Diagnosestellung eine wichtige Rolle. Die kontrastverstärkte Computertomographie ist sehr hilfreich, um initial und im weiteren Verlauf die jeweiligen Tumorlokalisationen und die Ausdehnung der Krankheit zu bestimmen.

Wegen seines besonders guten Weichteilkontrastes kommt der Magnetresonanztomographie eine bedeutende Rolle für die Diagnosestellung insbesondere bei Tumorlokalisationen im Kopf-/Halsbereich zu. Andere Methoden wie ¹⁸F-FDG-PET/CT können benutzt werden, um die Anwesenheit insbesondere distanter Metastasen zu bestimmen.⁴¹

1.7 Klinische Auswirkungen der NUT Translokationen

Bei NC-Tumoren treten sehr häufig bereits initial unspezifische Beschwerden wie z.B. eine B-Symptomatik (Müdigkeit, Fieber, Gewichtabnahme) auf. Spezifische und dementsprechend besser auf die Tumorerkrankung hinweisende Beschwerden sind abhängig von den jeweiligen Tumorlokalisationen (Abb. 5). Hier gehören Schmerzen, persistierende Husten, Dyspnoe, Verstopfung der Nase, Visusbeschwerden, Geschmacksstörungen, usw.⁴² "Leider" kommt es häufig erst in sehr weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium zu lokalen Tumorkompressionen und Infiltrationen umgebender anatomischer Strukturen und damit stärkeren Beschwerden, bei deren Abklärung dann letztendlich die Diagnosestellung erfolgt.



Abb. 5: NC-Primärtumor in der rechten Sublingualdrüse. Quelle: Storck et al., 2017⁵³

1.8 Prognosefaktoren

Die Prognose ist in aller Regel sehr schlecht. Bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose besteht häufig eine diffuse lymphogene Metastasierung, so dass kurative Resektionen nicht mehr möglich sind. Die Lebensdauer nach Diagnosestellung beträgt derzeit in aller Regel lediglich 5 bis 9 Monate. Am häufigsten kommt es durch lokale Tumorkomplikationen zum Tod der Betroffenen.^{22,28,44} „Nur 16% der Patienten leben länger als 3 Jahre“ (French CA, 2021). In einer Studie wurde nachgewiesen, dass Patienten mit BRD4-NUTM1 Fusion eine schlechtere Prognose haben als die Patienten mit einer BRD3-NUTM1 oder NSD3-NUTM1 Fusion.⁸

Eine wichtige Rolle für die Prognose spielt die Lokalisation des Primarius.⁴² NC-Tumore können in folgende Gruppen unterteilt werden (Abb. 6): **Gruppe A** *Non-thoracic primary* mit BRD3- oder NSD3-NUT Fusionen, **Gruppe B** *Non-thoracic primary* mit BRD4-NUT Fusion und **Gruppe C** *Thoracic primary* unabhängig von dem jeweiligen Fusionspartner. Patienten mit *Non-thoracic primary* mit BRD3- oder NSD3-NUT Fusion haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung seltener diffuse lymphogene Metastasen und/oder Organmetastasen; die initiale Tumorgöße liegt meist unter 6 cm und eine operative Resektion hat gute Erfolgsaussichten. Damit lässt sich feststellen, dass die Gruppe A ein besseres Gesamtüberleben hat als die Gruppen B und C. Die Gruppe C hat die schlechteste Prognose.⁸

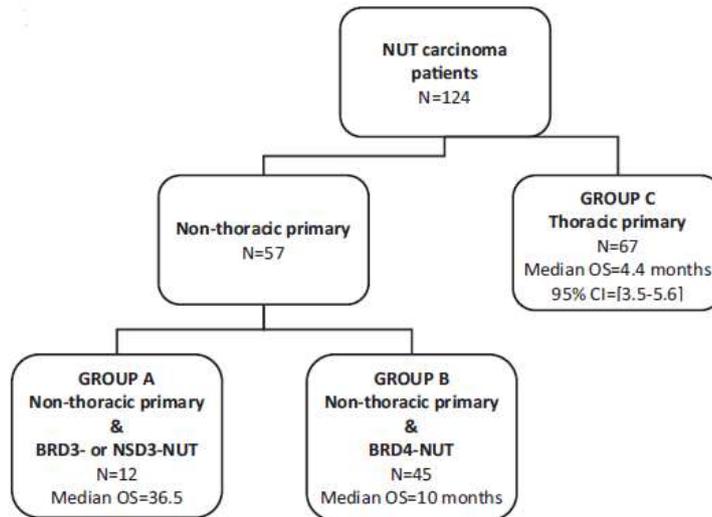


Abb. 6: Unterteilung von NC-Tumoren in 3 Gruppen: **Gruppe A** *Non-thoracic primary* mit BRD3- oder NSD3-NUT Fusionen, **Gruppe B** *Non-thoracic primary* mit BRD4-NUT Fusion und **Gruppe C** *Thoracic primary*. Quelle (Chau, et al., 2019)⁸

1.9 Therapieansätze

Es gibt bis jetzt keine effektive Therapie gegen diese ausgesprochen bösartige Neoplasie der NC-Tumore. Operative Resektionen und Bestrahlungen können nur kurativ sein, wenn die Tumorerkrankung in einem ausgesprochen frühen und dann noch streng lokalisierten Stadium diagnostiziert wird.

Beim Einsatz von Chemotherapien wurden zahlreiche Kombinationen getestet.¹⁹ Am häufigste eingesetzt werden Platin-haltige Wirkstoffe, Taxane oder Alkylanzien, jedoch in aller Regel leider ohne nachhaltigen Erfolg.⁴¹

Neben konventionellen Therapieformen wie Chirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie wurden in den letzten Jahren zahlreiche NC-spezifische *small molecules* (sog. iBET-Inhibitoren) entwickelt, die eine neue Klasse von Medikamenten darstellen und reversibel an die Bromodomänen der BET-Proteine (Bromodomänen; *extraterminal motif*) BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT binden und die Protein-Protein-Interaktion zwischen BET-Proteinen und acetylierten Histonen und Transkriptionsfaktoren verhindern.^{7,14,15,18,20,44}

Ein derartiger *small molecule*-Wirkstoff wurde am Universitätsklinikum Tübingen im Rahmen einer Phase I Studie (An Open Label, Phase Ia/Ib Dose Finding Study with BI 894999; EudraCT: 2015-001111-12; clinicaltrials.gov: NCT02516553) bis zum Jahr 2021 intensiv untersucht.

Es wurde nachgewiesen, dass iBET-Inhibitoren erfolgversprechende Ergebnisse bei NC-Tumoren haben können. Die Hauptnebenwirkung besteht in einer vorwiegend moderaten Thrombozytopenie, was die Einsetzbarkeit und damit die Effektivität der Therapie in aller Regel nur wenig einschränkt.¹⁹

Darüber hinaus kommen fallweise auch klinisch bei anderen Indikationen zugelassene Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi) zum Einsatz (in erster Linie Vorinostat). HDACi inhibieren das Tumorzellwachstum über eine epigenetische Reprogrammierung und eine dadurch herbeigeführte Re-Differenzierung. Es wurde ein Fall eines 10 Jahre alten Patienten beschrieben, der nach 5 Wochen Therapie mit Vorinostat eine gute antitumorale Wirkung zeigte. Allerdings musste diese Therapie wegen starker Nebenwirkungen (Übelkeit und Erbrechen) häufig pausiert werden; das Kind starb dann innerhalb weniger Monate bei einem weiteren Tumorprogress.^{32,37,48}

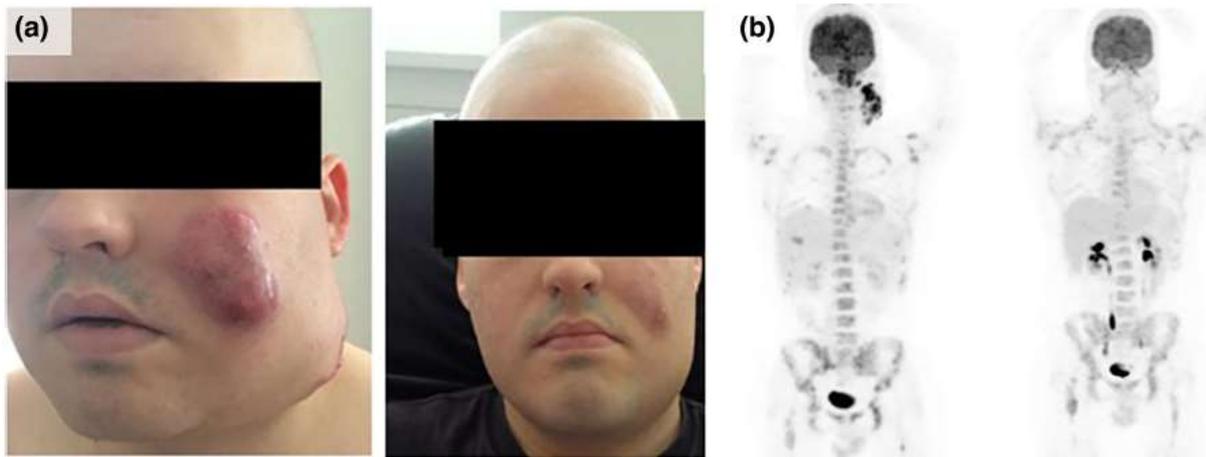


Abb. 7: (a) Ansprechen eines NC-Tumors im Bereich der Nasopharynx, initial (links) und acht Tagen nach der Therapie mit iBET-Wirkstoff (rechts). (b) PET-CT vor (links) und nach zwei Zyklen iBET Therapie (rechts). Quelle (French CA 2018)¹⁹

1.10 Wissenschaftliche Fragestellungen

Das Universitätsklinikum Tübingen (UKT) behandelt Deutschland-weit betrachtet die meisten Patienten mit NC-Tumoren, da hier für Deutschland das einzige Zentrum lokalisiert war, das in den letzten Jahren eine Studien-spezifische Therapieoption (s.o.) anbieten konnte (Phase I Studie unter dem Titel "An open label, Phase Ia/Ib dose finding study with BI 894999 orally administered once a day in patients with advanced malignancies with repeated administration in patients with clinical benefit", *clinicaltrials.gov accession number*: NCT02516553) und diese Tumor-Entität parallel dazu hier auch intensiv präklinisch und klinisch beforscht wird.

Dadurch ist in den letzten Jahren am UKT eine besondere Expertise auf dem Gebiet der NC-Tumore entstanden.

Da zu dieser sehr seltenen Krebserkrankung der NC-Tumore bisher immer noch zu wenige systematisch erhobene Daten bestehen, sollten nun die Daten der Tübinger NC-Kohorte in einem eigenen Register zusammengestellt und wissenschaftlich aufgearbeitet werden.

Im Rahmen der Analyse des Datenmaterials zu den Tübingern NC-Patienten sollten in dieser Promotionsarbeit u.a. folgende Aspekte eingehend betrachtet werden:

1. Welche Altersstruktur weist die Tübinger Kohorte auf?
2. Welche Symptome waren in der Tübinger NC-Kohorte initial / vor Stellung der Diagnose "NC-Tumorerkrankung" bestimmend?
3. Welche diagnostische Methode hat letztendlich zur korrekten Diagnose einer NC-Tumorerkrankung geführt?
4. Was waren initial die häufigsten Fehldiagnosen bis die korrekte Diagnose einer NC-Tumorerkrankung gestellt werden konnte? Wie gestalteten sich die "Irrwege", bis eine korrekte Diagnose gestellt werden konnte?
5. Welche Frequenzen finden sich in Bezug auf die bekannten, NC-typischen Gentranslokationen; finden sich im Tübinger Patientenkollektiv eventuell auch bis dato unbekannte / vollkommen neuartige NC-Gentranslokationen?
6. Welche konventionellen Therapien (Chirurgie, Strahlentherapie, Chemotherapie, etc.) kamen zum Einsatz?
7. Welche Prognose-bedingenden Faktoren finden sich in der Tübinger Kohorte?

2. Material und Methoden

2.1 Tübinger NC-Patientenkohorte

In Tübinger Kohorte wurden im Zeitraum von 2016 - 2021 retrospektiv insgesamt 21 Patienten im Alter zwischen 18 und 70 Jahren mit einem NC-Tumor identifiziert. In die hier vorgelegte retrospektive Analyse wurden alle NC-Patienten eingeschlossen, die (i) mindesten einen Kontakt mit der Ambulanz der Abteilung Innere Medizin VIII, Medizinische Onkologie und Pneumologie, Department Innere Medizin des Universitätsklinikums Tübingen aufzuweisen hatten und ihre sämtlichen bis dahin erhobenen Befunde zu einer Zweitbegutachtung vorgelegt hatten bzw. dann in Tübingen (ii) im Rahmen der Phase I Studie unter dem Titel "An open label, Phase Ia/Ib dose finding study with BI 894999 orally administered once a day in patients with advanced malignancies with repeated administration in patients with clinical benefit", (*clinicaltrials.gov* accession number: NCT02516553) oder (iii) im Rahmen individualisierter Therapieansätze behandelt wurden.

Die Mehrheit der Tübingern Fälle stammte dabei naturgemäß aus Deutschland. Nur einzelne Fällen kamen aus den Nachbarländern Schweiz und Dänemark.

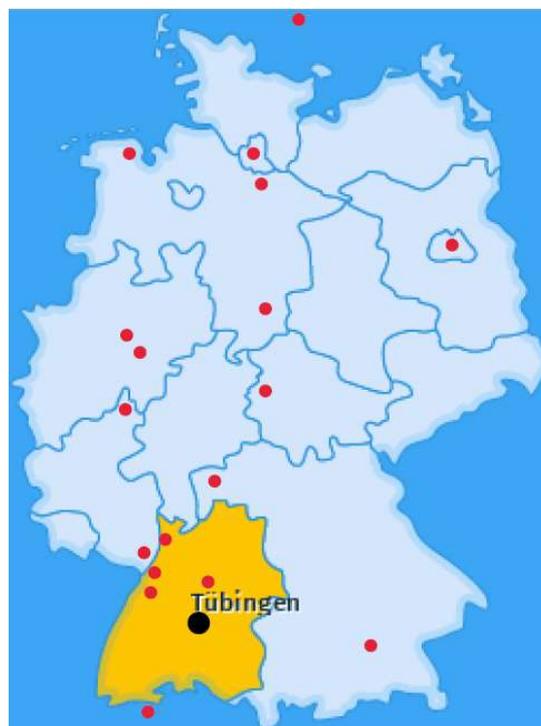


Abb. 8: Landkarte zu den Wohnorten der Patienten der Tübinger Kohorte: Darstellung eines kleinen Teils unserer Datenbank (n=21). Die Mehrheit der Patienten stammt aus

Deutschland, nur einzelne Fälle stammen aus den Nachbarländern Schweiz und Dänemark.

Universitätsklinikum Tübingen ist das einzige Zentrum in Deutschland, das zu NC-Patienten die Studie Therapie mit BI 894999 bitten kann. Den anderen europäischen Ländern sind Belgien, Frankreich und Spanien. Weltweit sind die USA (Massachusetts, New York, Ohio, Texas) und Korea. BI 894999 Studie steht allen Patienten zur Verfügung, die mindestens 15 Jahren alt sind und bei denen ein NC-Tumor diagnostiziert wurde. Ziel dieser Studie ist es, die höchste Dosis von BI 894999 zu verabreichen, die von den Patienten vertragen werden kann.

Diese Art der Therapie wurde oral, in Form von Tabletten einmal täglich verabreicht. Es wird geprüft, ob dieses Medikament besser vertragen wird, wenn er kontinuierlich eingenommen wird oder intermittierend. Die Therapie wird verabreicht, bis die Patienten von der Behandlung profitieren und diese gut vertragen können. Den allgemeinen Gesundheitszustand der Teilnehmer wird regelmäßig von zuständigem ärztlichem Personal überprüft.

In einer, nicht-randomisierter klinischen Studie welcher Sponsor Boehringer Ingelheim ist, mit 174 erwachsenen Patienten wurden die Teilnehmer in drei Gruppen geteilt: Die erste Gruppe (Group A) hat das Studien Medikament BI 894999 einmal täglich, kontinuierlich in 3-wöchigen Zyklus eingenommen (von Tag 1 bis zum Tag 21 in 3-wöchigen Zyklus). Die zweite Gruppe (Group B) hat das Studien Medikament BI 894999 einmal täglich, intermittierend zwei Wochen, gefolgt von einer Woche Pause in 3-wöchigen Zyklus eingenommen (von tag 1 bis zum Tag 14, gefolgt mit einer Woche Pause in 3-wöchigen Zyklus). Und die letzte, dritte Gruppe (Group C) hat das Studien Medikament eine Woche eingenommen, gefolgt mit einer Woche Pause. Alle zwei Wochen in einem 4-Wochen Zyklus wiederholt.

Einige von Kriterien, die erfüllt sein müssen, um in dieser Studie teilzunehmen sind: Volljährigkeit in dem jeweiligen Land zum Zeitpunkt der Unterzeichnung der Einwilligungserklärung, oder schriftliche Zustimmung des Patienten und der Eltern oder des Erziehungsberechtigten des Jugendlichen für die minderjährigen Patienten. Lebenserwartung von mindestens 12 Wochen nach Beginn der Behandlung, histologisch oder zytologisch bestätigte Diagnose eines fortgeschrittenen, inoperablen und/oder metastasierten bösartigen soliden Tumors, bei denen die konventionelle Behandlung versagt hat oder für die es keine Therapie mit nachgewiesener Wirksamkeit gibt oder für

Standardtherapien nicht zugänglich sind, ECOG-Performance Score 0 oder 1 zum Zeitpunkt der Untersuchung (Für NC-Karzinom ist eine Score von 2 zulässig), Genesung von therapiebedingten Toxizitäten.

Alle Frauen in gebärfähigen Altern müssen hochwirksamen Verhütungsmethode anwenden. Aufgrund der potenziell CYP3A4- induzierten Wirkung von BI 894999 ist eine zusätzliche Barrieremethode erforderlich. Männliche Patienten, die eine Partnerin im gebärfähigen Alter haben, müssen Kondome verwenden, deren Partnerinnen sollen ebenso eine hochwirksame Verhütungsmethode während der Studie und für mindestens drei Monate nach Ende der Studie verwenden.

Ausschlusskriterien sind: Unfähigkeit, Tabletten zu schlucken, aktive Infektionskrankheiten, wie z. B. eine aktive Infektion mit SARS-CoV-2, eine aktive Hepatitis B-Infektion, oder eine aktive Hepatitis C-Infektion und eine Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV), Vorgeschichte von klinisch relevanten kardiovaskulären Anomalien wie unkontrollierter Bluthochdruck, kongestive Herzinsuffizienz der NYHA-Klassifikation 3, instabile Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen, Myokardinfarkt innerhalb von 6 Monaten vor Studienbeginn und linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) unter 50 % bei Studienbeginn. Erkrankung des Gehirnes oder des Leptomeningeals in den letzten 28 Tagen vor Studienbeginn. Serumkreatinin > 1,5 mg/dl, Absolute Neutrophilenzahl < 1.500/mm³, Thrombozytenzahl < 100.000/mm³, Bilirubin > 1,5 mg/dl, Aspartat-Aminotransferase (AST) und/oder Alanin-Aminotransferase (ALT) über dem 2,5-fachen des oberen Grenzwertes der Norm (bzw. mehr als das Fünffache, wenn im Zusammenhang mit Lebermetastasen). Systemische Krebstherapie innerhalb der letzten zwei Wochen für NC-Patienten, Strahlentherapie innerhalb der letzten vier Wochen. Schwangere, Stillende oder die Frauen die eine Schwangerschaft während Dauer der Studie geplant haben, Behandlung mit anderen Prüfpräparaten oder Teilnahme an einer anderen klinischen Interventionsstudie innerhalb der letzten vier Wochen oder innerhalb der fünffachen Halbwertszeit des vorangegangenen Prüfpräparats. Falls der Patient/in sich nicht an dem Protokoll anhalten kann, Drogen und/oder Alkoholkonsum sind ebenso Ausschlusskriterien.¹⁰

2.2 Genehmigung der retrospektiven Datenanalyse und -auswertung durch ein entsprechendes Ethikvotum

Seitens der Ethik-Kommission an der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität und am Universitätsklinikum Tübingen wurde mit Datum 17.8.2021 die Zusammenstellung und Auswertung der Tübinger Erwachsenen-Kohorte an NUT Mittellinienkarzinomen (NUT *midline carcinomas* - NC) im Sinne einer retrospektiven Datenauswertung gemäß Prüfplan vom 26.07.2021 zustimmend bewertet (Projekt-Nummer: 609/2021BO2).

2.3 Diagnostische Methodik zur Feststellung des Vorliegens von NC-Tumoren

Die Diagnose der NC-Tumoren wurde in aller Regel mittels **NUT-Immunhistochemie** bestätigt. Hierbei kam der *primary rabbit monoclonal anti-NUT (C52B1)* zum Einsatz. Diese Immunhistochemie hat eine Sensitivität von 87% und Spezifität von 100%.^{9,31} *Primary rabbit monoclonal anti-NUT (C52B1)* wird durch Immunisierung von Tieren mit einem rekombinanten Protein, das dem menschlichen NUT-Protein entspricht, hergestellt. Seine Funktion ist, endogene Konzentrationen des gesamten NUT-Proteins, sowie des BRD4-NUT-Fusionsproteins in Geweben, durch Immunhistochemie und Immunfluoreszenz zu interpretieren.⁴³

Die Immunhistochemie wird an einem Schnitt des Primärtumors durchgeführt, welcher in Formalin fixiert und in Paraffin einbetten wird. Daraufhin folgt Deparaffinierung und Rehydrierung, in einem Dampfdrucktopf in einer Dako pH 9,0 Lösung (Dako USA, Carpinteria, CA) wurden die Schnitten antigenisiert. Hinterher folgt waschen in destilliertem Wasser und eine fünfminütige Behandlung mit Peroxidase-Block zur Löschung der Aktivität der endogenen Peroxidase, nachfolgend werden die Schnitte eine Stunde lang mit *primary rabbit monoclonal anti-NUT (C52B1)* (9,2 µg/ml) in Antikörperverdünnung (Dako) inkubiert. Anschließend in 50mM Tris-HCl (pH 7,4) gewaschen und mit Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörpern inkubiert. Die Färbung wurde durch Inkubation mit Diaminobenzidin (DAB) entwickelt, und die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.³¹

Der größte Nachteil der Immunhistochemie scheinen falsch negative Ergebnisse zu sein. Die Gründe könnten in Zusammenhang mit technischen Problemen (Handhabung, Fixierung, Verarbeitung des Gewebes) zusammenzustehen. Aufgrund dessen,

wird immer im Fall eines negativen Ergebnisses der Immunhistochemie bei einem hohen Verdacht auf NC-Tumor eine FISH –Untersuchung empfohlen.³¹

In Einzelfällen kamen außerdem **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH)** zum Einsatz. Mit dieser molekularzytogenetischen Technik kann das Vorhandensein oder Fehlen spezifischer DNA-Sequenzen auf Chromosomen nachgewiesen und lokalisiert werden.^{34,38} In diesem Fall wird einer, komplementären Strang einer Nukleotidsonde benutzt, der mit Fluorescein, Biotin oder Digoxigenin markiert ist, um diese mit einer bestimmten Sequenz der DNA oder RNA zu binden. Zur Visualisierung dieser, hybridisierten Sonden wird eine Fluoreszenzmikroskopie benutzt. Außerdem sind Radio- und Antigen-Markierungen möglich, jedoch in diesem Fall sprechen wir über nicht-fluoreszierende Methoden. Diese Methode wurde erstmals 1969 beschrieben. Grob können man die Markierungs-Methoden in zwei großen Gruppen eingeteilt werden: die radioisotopische Markierung und nicht-isotopische Markierung. Die nicht-isotopische Markierung gelten insgesamt als weniger empfindlich in Vergleich zu radioisotopische. Jedoch besteht bei der radioisotopischen Markierung die Gefahr einer Exposition gegenüber Radioaktivität, die Entsorgung von radioaktiven Abfällen, außerdem die lange Belichtungszeit und schlechte räumliche Auflösung.³⁴

Welche Sonde wird benutzt hängt von mehreren Faktoren ab (Sensibilität und Spezifität der Sonde, die Alternative der Produktion, Tiefe, bis zu der Sonde ins Gewebe eindringen kann, oder z.B. die Beständigkeit der Hybride). Die bestmögliche Größe der Sonde ist 50-300 Basen.³⁴ Bei Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) werden zwei Sonden-Kategorien benötigt: erste sind *lokusspezifische Sonden* die, wie der Name schon sagt, Funktion haben ein bestimmtes Gen oder Chromosomenbereich zu lokalisieren. Diese werden hauptsächlich zur Beurteilung von Deletionen und Amplifikationen von DNA-Sequenzen verwendet. Zweite Art der Sonde sind *Chromosomenanstrichsonden*, diese werden zum Nachweis des Ursprungs strukturell abnormaler Chromosomen und zur Erkennung von Umlagerungen, an denen nicht homologe Chromosomen beteiligt sind, genutzt werden.³⁴

Dabei ist es sehr wichtig, dass DNA und/oder RNA sowie die Gewebemorphologie unbeschädigt bleiben. Gewebeschnitten dürfen gefroren oder in Paraffin gelagert werden. So kann dieses nach Jahren immer noch verwendet werden. Um der Zugang zur Zielnukleinsäure zu erleichtern, wird am häufigsten Proteinase K verwendet.³⁴

Außerdem kann mittels des Archer FusionPlex[®] Assays jeder NUTM1-Fusionspartner identifiziert werden. Um die Fusionspartner zu erkennen, werden auf 3`- und 5`-Ende cDNA synthetisiert. Die Daten werden dann durch *Next- Generation sequencing* (NGS) auf verschiedene Plattformen gewonnen und die nachfolgende Analyse wird in der Archer Analysis Pipeline durchgeführt, die danach digital, auf einer Software verfügbar ist.²⁶ Mittels *Next-Generation sequencing* (NGS) ist es plausibel, eine Sequenzierung von mehreren kleiner DNA-Fragmente gleichzeitig durchzuführen, um eine Mutation zu identifizieren.³

Weiterhin steht auch eine *Reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) zur Verfügung. Diese Methode folgt in drei Schritten: die Amplifikation, Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Der ganze Prozess ist heutzutage instrumentali-siert. So wurden die Fehler vermieden und das Prozess wird beschleunigt. *Reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) ist die empfindlichste, in vitro- Methode für den Nachweis von mRNA und die Amplifikation von RNA-Sequenzen. Mit dieser Methode wird während jeden Zyklus der PCR-Reaktion die Produktion von Amplifikationsprodukte überwacht.^{4,5}

Eine der größten Probleme dieser Methode ist eine adäquate Normalisierungsmethode zu finden, um die häufigsten Fehler zu vermeiden.³³

Der erste Schritt besteht in der Synthese von cDNA (complementary DNA) aus RNA. Danach folgt mittels speziellen RNA- und DNA-abhängigen DNA- Polymerasen die Amplifikation von der synthetisierten cDNA. Welche DNA- Polymerase verwendet wird, hängt von dem Ziel des Experiments. Am häufigsten wird die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Enzymaktivität kann durch Mg^{2+} gestört werden, genauso wie erhöhte dNTP (2`-Desoxyribonucleosid-5`-triphosphate) – Konzentration. Die DNA-Polymera-sen können entweder in getrennten („zwei-Enzym/Zwei-Röhrchen“-) oder in einer Re-aktion („zwei Enzym/Ein-Röhrchen“-) verwendet. In Situation, in denen der Hinweis auf eine große Sekundärstruktur von Ziel –RNA besteht wurde „Ein Enzym/ Ein-Röhr-chen“ System zu verwenden empfohlen. Hier wurde Bicinpuffer mit Mn^{2+} eingesetzt. Die Detektion von amplifizierten Produkten folgt mittels Fluoreszenzfarbstoffen. mRNA kann mit semiquantitativen oder quantitativen Methoden bestimmt werden.⁵

2.4 Methoden der Auswertung

Das Gesamtüberleben (*Overall Survival*; OS) der Patienten der Tübinger NC-Kohorte wurde vom Zeitpunkt der ersten Krebsdiagnose (unabhängig, ob primär eine Fehldiagnose gestellt wurde oder nicht) bis zum Tod oder bis zum letzten Studien-bedingten *Follow-up* berechnet.

Das Ereignis-freie Überleben (EFS; auch: *Progression-Free Survival* (PFS)) wurde vom Zeitpunkt der erstmaligen Stellung der NC-Krebsdiagnose bis zur Progression oder bis zum Tod bzw. bis zum Zeitpunkt der letzten Nachuntersuchung berechnet.

Für unsere retrospektive Analyse wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- Alter bei erstmaliger Tumordiagnose
- Geschlecht
- Primärtumorlokalisierung
- Art der NC-spezifischen Gentranslokationen
- Tumorausmaß zum Zeitpunkt der Erstdiagnose
- Metastasierungsmuster
- Regionale Lymphknotenbeteiligung
- Erstbehandlungssequenz
- Art der ersten Therapieantwort
- Zur Diagnose führende Bildgebung
- Art und Dauer der NC-spezifischen Symptome
- Paraneoplastische Syndrome
- An-/Abwesenheit maligner Erg
- Grading

3. Ergebnisse

Am Universitätsklinikum Tübingen (UKT) ist in den letzten Jahren eine besondere Expertise auf dem Gebiet der NUT *midline carcinomas* (NC-Tumore) entstanden.

Da zu dieser sehr seltenen Krebserkrankung der NC-Tumore bisher immer noch zu wenige systematisch erhobene Daten bestehen, wurden die Daten der bisher in Tübingen behandelten NC-Patienten in einem eigenen Register im Sinne einer Tübinger NC-Kohorte zusammengestellt und wissenschaftlich aufgearbeitet.

Aus verschiedenen Voruntersuchungen (siehe Kapitel 1.1) ist bekannt, dass Patienten mit NUT *midline carcinoma* (NC) eine ausgesprochen schlechte Prognose haben. Das Gesamtüberleben liegt nach der Diagnosestellung bei lediglich 6 bis 9 Monaten.

In der bis dato noch wenig umfangreichen Tübinger NC-Kohorte (n=21) fand sich, dass das Gesamtüberleben mit durchschnittlich 11,2 Monaten höher liegt als bei den bereits vorliegenden Daten.

Unter den Tübinger NC-Patienten gab es dabei allerdings auch einen Patienten mit einer vergleichsweise sehr langen Überlebenszeit von 2 Jahren und 4 Monaten und darüber hinaus einen weiteren Patienten mit einem nachgerade "außerordentlichem" Gesamtüberleben von sogar 3 Jahren und 6 Monaten, wobei hier eine genaue Nachbetrachtung der Daten (insbesondere der histologischen und - falls vorhanden - auch der molekulargenetischen Befunde) noch in einer unabhängig von dieser Promotionsarbeit anstehenden Begutachtung durchgeführt werden muss.

Bei den NC-Patienten der Tübinger Kohorte wurde beobachtet, dass die initiale Tumorgröße gar keine Rolle bei der Prognose spielt (Abb. 13). Patienten mit dem Nachweis von Metastasen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose haben, unabhängig vom Tumorstadium und vom Vorliegen von Organ- und/oder Lymphmetastasen, eine schlechtere Prognose gezeigt (Abb. 14).

Die acht Patienten mit einer Primär-Tumorlokalisation (Abb. 11) im Kopf/Hals Bereich, haben eine etwas bessere Prognose (durchschnittlich 12,1 Monate) im Vergleich zu den neun Patienten mit der Primär-Tumorlokalisation im Bereich des Thoraxes (durchschnittlich 10,4 Monate). Bei den Frauen ergab sich mit durchschnittlich 13,7 Monaten eine bessere Prognose als bei den Männern mit durchschnittlich 9,9 Monaten (Abb.

10). Zusätzlich wurde beobachtet, dass das Alter (Abb. 9) keine relevante Rolle bei der Prognose spielen.

Faktoren wie genetische Prädisposition oder exogene Faktoren (Rauchen- und/oder Alkoholkonsum, Adipositas) spielen bezüglich der Prognose ebenso keine Rolle.

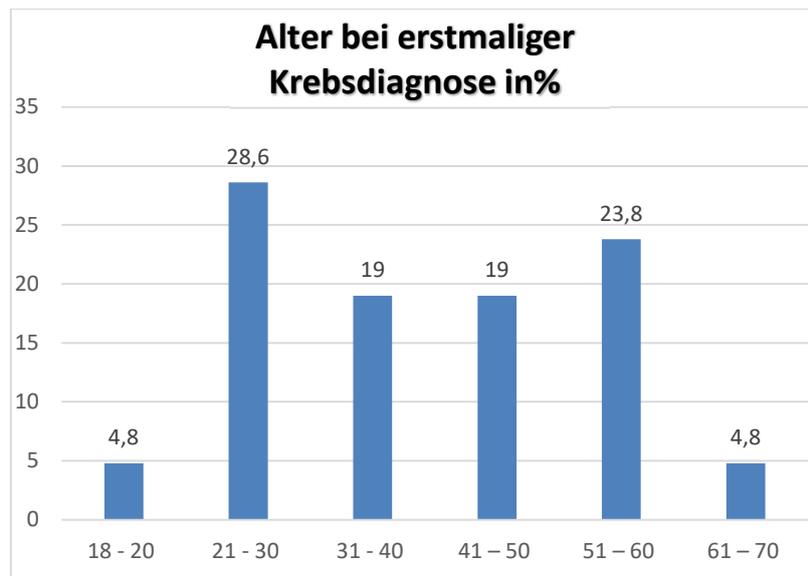


Abb. 9: Darstellung des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Feststellung der Erst-diagnose "NC-Tumorerkrankung". Es wurden 21 Patienten im Alter zwischen 18 und 70 Jahren der Tübinger NC-Kohorte berücksichtigt.

In der Abbildung 9 erkennen wir, dass die Tübinger NC-Kohorte 21 Patienten im Alter zwischen 18 und 70 Jahren umfasst, bei denen nachweislich eine NC-Tumorerkrankung diagnostiziert wurde. Das Durchschnittsalter bei der Diagnosestellung betrug 40,4 Jahre. In der zweiten Lebensdekade (21-30 Jahre) ist hierbei der höchste Prozentsatz mit Erstdiagnose von NC-Patienten anzutreffen (28,6%).

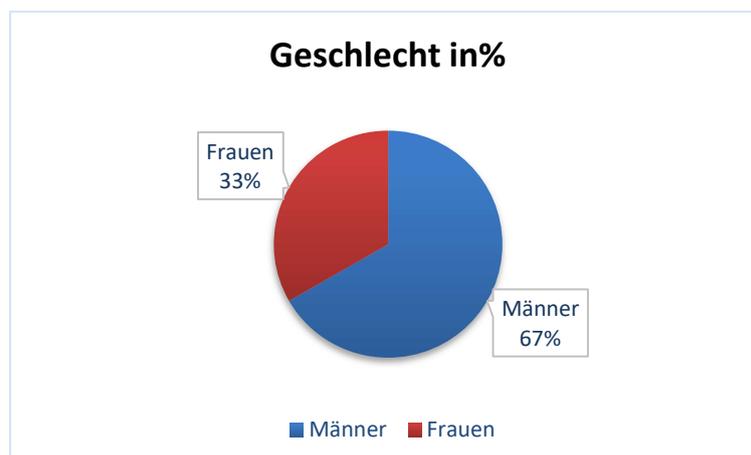


Abb. 10: Darstellung des Geschlechts in Prozent der 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger NC-Kohorte.

In Abbildung 10 ist ersichtlich, dass Männer in der vom Umfang her noch relativ kleinen Tübinger NC-Kohorte mit 67% häufiger betroffen sind als Frauen mit 33%.

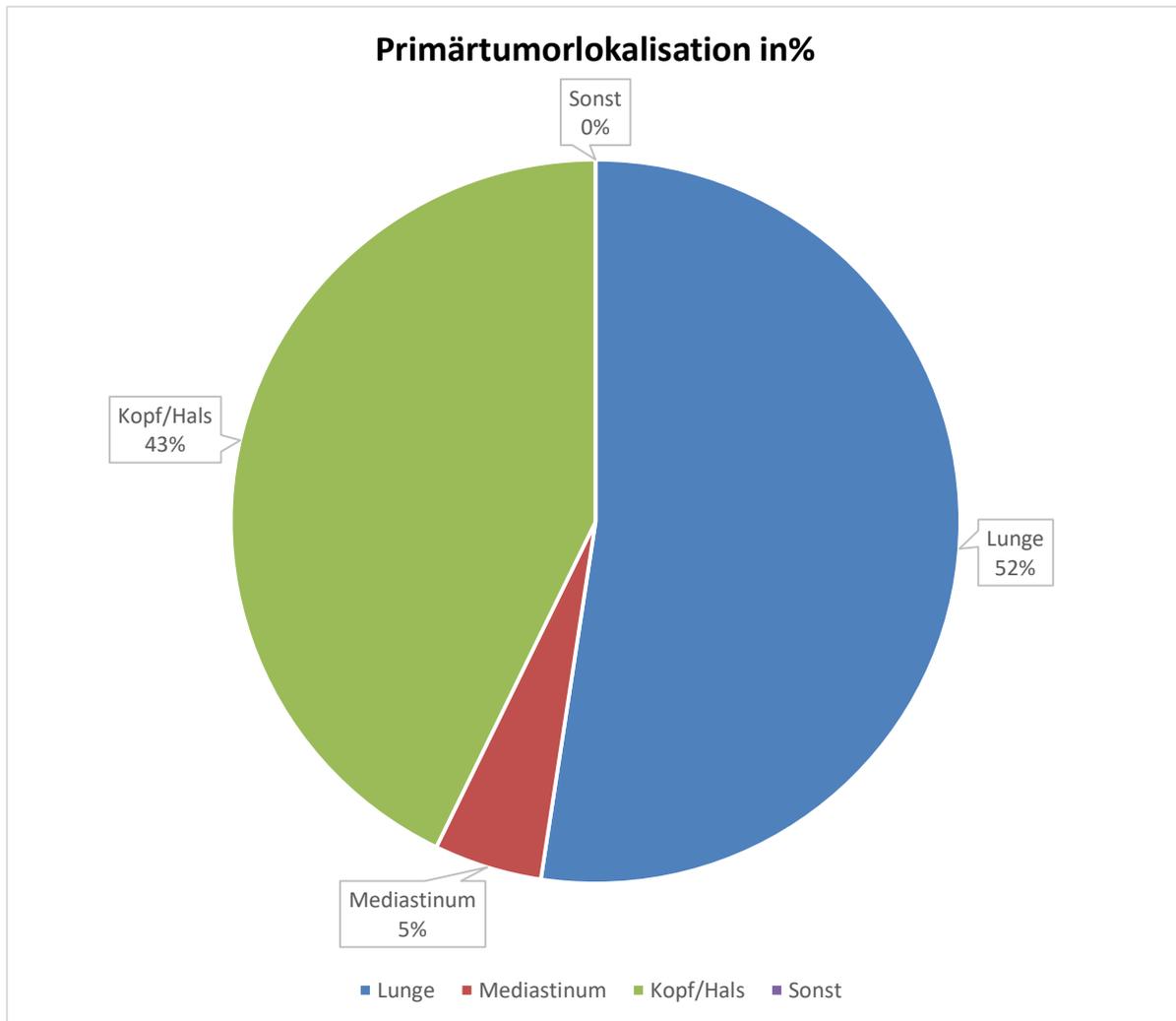


Abb. 11: Darstellung der Lokalisation der NC-Primärtumore in Prozent bei den 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger NC-Kohorte.

Die Abbildung 11 zeigt, dass die häufigsten Tumorlokalisationen bei den 21 Patienten der Tübinger NC-Kohorte im Bereich der Lungen (52%) und im Kopf-/Halsbereich (43%) anzutreffen sind.

Das Mediastinum ist hingegen weniger häufig betroffen (5%). Andere Tumorlokalisationen (Niere, Knochen, Leber etc.) wurden in unserer Tübinger NC-Kohorte bis dato noch nicht beobachtet.

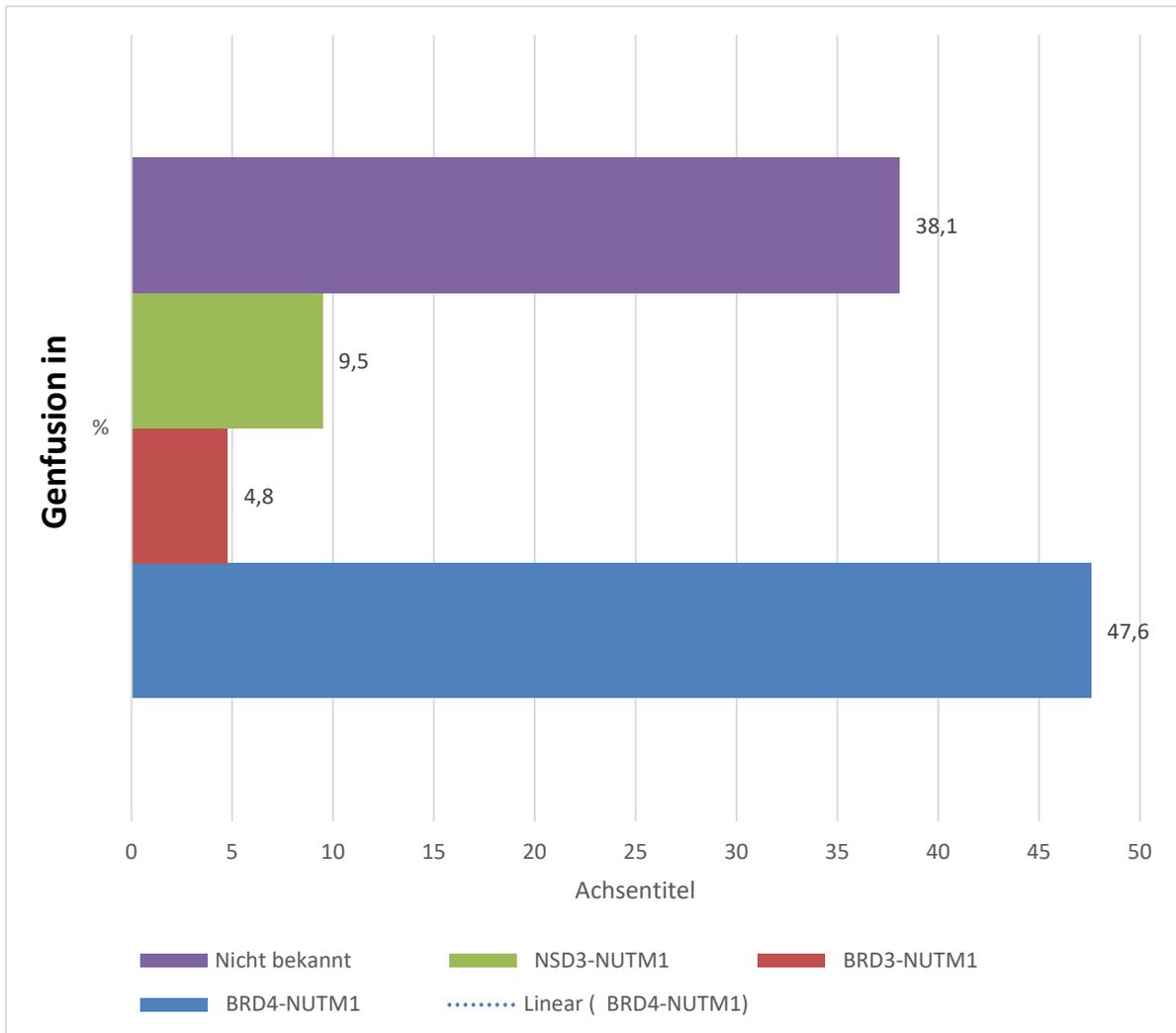


Abb. 12: Darstellung der Art der Gentranslokationen bei den insgesamt 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger NC-Kohorte.

In Abbildung 12 ist zu sehen, dass bei 38,1% der Patienten keine molekulargenetische Bestimmung der für NC-Tumorerkrankungen pathognomonischen Gentranslokationen durchgeführt wurde, oder hat die molekulargenetische Bestimmung kein wegweisender Befund gezeigt.

Bei den verbleibenden 61,9% der Patienten wurde die BRD4-NUTM1 Genfusion am weitaus häufigsten diagnostiziert (Anteil: 47,6%).

Andere Genfusionen (BRD3-NUTM1, NSD3-NUTM1) wurden nur in wenigen Fällen festgestellt (Anteil: 14,3%).

Keine unbekannten oder vollkommen neuartigen NC-Genstranslokationen wurden bis dato in der Tübinger NC-Kohorte ausfindig gemacht.

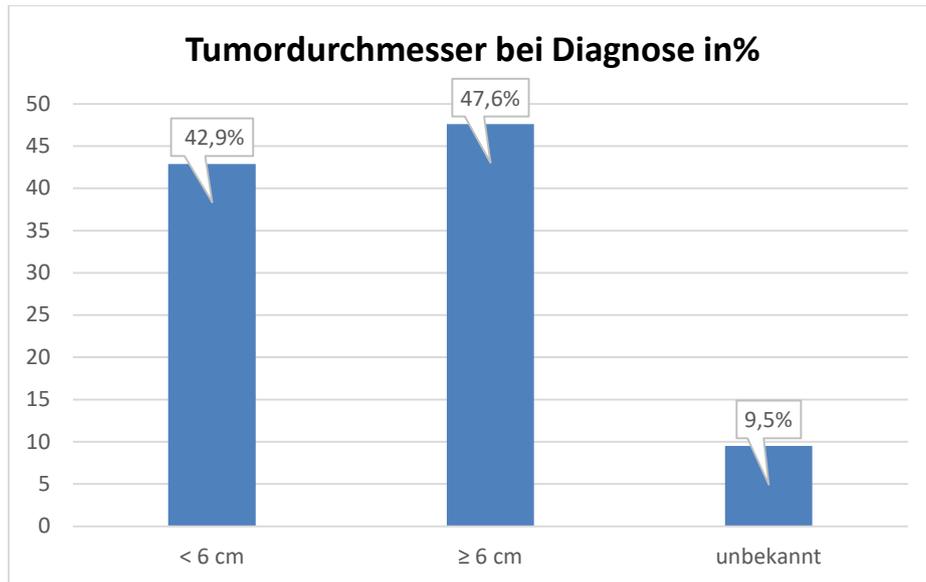


Abb. 13: Darstellung der Tumordurchmesser bei der Diagnosestellung von 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger NC-Kohorte.

In der Abbildung 13 ist bemerkbar, dass die mediane Tumorgöße zum Zeitpunkt der ersten verfügbaren Schnittbildgebung (extern oder intern), bei 47,6% der NC-Patienten ≥ 6 cm betrug. Bei 42,9% der NC-Patienten lag die Tumorgöße bei < 6 cm. Es konnte festgestellt werden, dass beide Tumorgößen (≥ 6 cm und < 6 cm) mit fast gleichem Anteil zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nachgewiesen wurden, so dass bezüglich dieses Parameters kein Unterschied besteht.

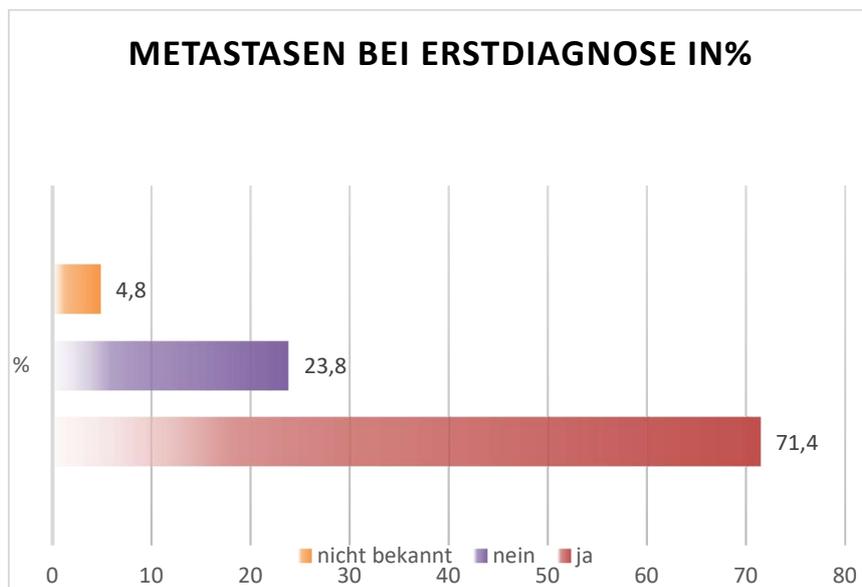


Abb. 14: Darstellung des prozentualen Anteils von Metastasen (regional und/oder nicht regional, Lymphknoten- oder Organmetastasen) bei Erstdiagnose, unabhängig davon, ob primär eine Fehldiagnose vorlag (fälschlicherweise Zuordnung des histologischen Befundes zu einer nicht-NC-Tumorentität) oder nicht.

Die Abbildung 14 deutet darauf hin, dass sich zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (unabhängig davon, ob primär eine Fehldiagnose vorlag oder nicht) die Mehrheit der NC-Patienten mit regionalen und/oder nicht-regionalen Lymphknoten- und/oder Organmetastasen (71,4%, 15 von 21 NC-Patienten) präsentierte.

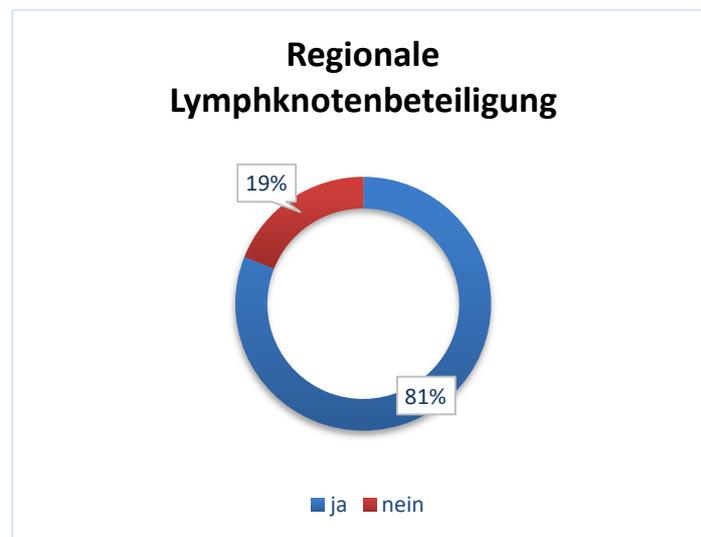


Abb. 15: Darstellung der regionalen Lymphknotenbeteiligung in Prozent, unabhängig vom Entwicklungsstadium der NC-Tumorerkrankung bei 21 Patienten der Tübinger Kohorte.

In Abbildung 15 zeigt sich, dass die Mehrheit der Tübinger NC-Patienten (81%, 17 von 21 Patienten) eine regionale Lymphknotenbeteiligung, unabhängig vom Entwicklungsstadium der NC-Tumorerkrankung, aufweisen.

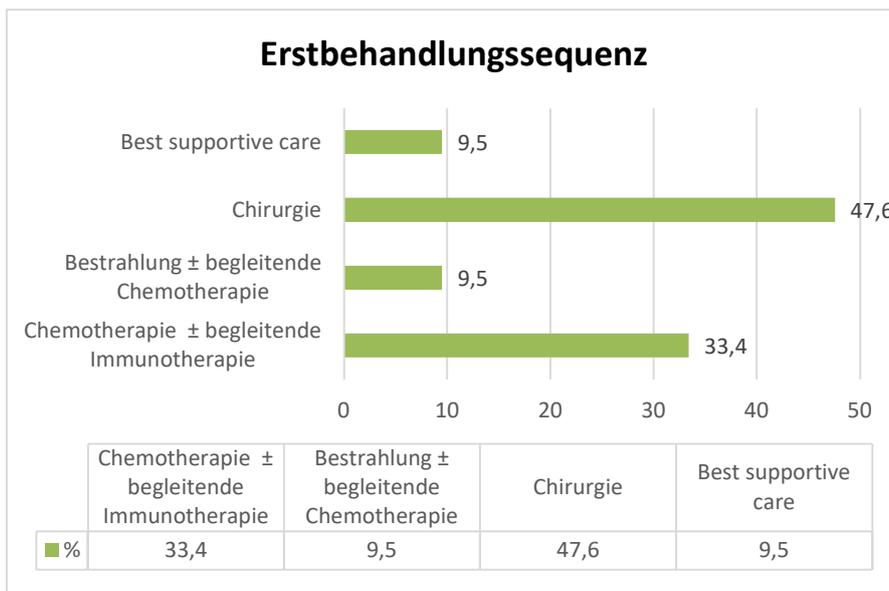


Abb. 16: Darstellung der zuerst, bei den 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger NC-Kohorte, zum Einsatz gekommenen Behandlungssequenz.

In Abbildung 16 ist ersichtlich, dass der größte Anteil der 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger NC-Kohorte zuerst chirurgisch behandelt wurde (im Sinne einer möglichst großvolumigen Tumormassenreduktion; kurative Intentionen waren aufgrund des überwiegend fortgeschrittenen Tumorstadiums in der Regel nicht gegeben). Die zweithäufigste Behandlungssequenz ist die Chemotherapie, allein oder in der Kombination mit der Immuntherapie.

Andere konventionellen Therapien, wie die Strahlentherapie hat initial nur wenige Patienten als Therapie bekommen. Aufgrund der ausgeprägten Tumorerkrankung wurde bei zwei Patienten bereits von Anfang an "lediglich" eine *best supportive care* Behandlung eingeleitet.

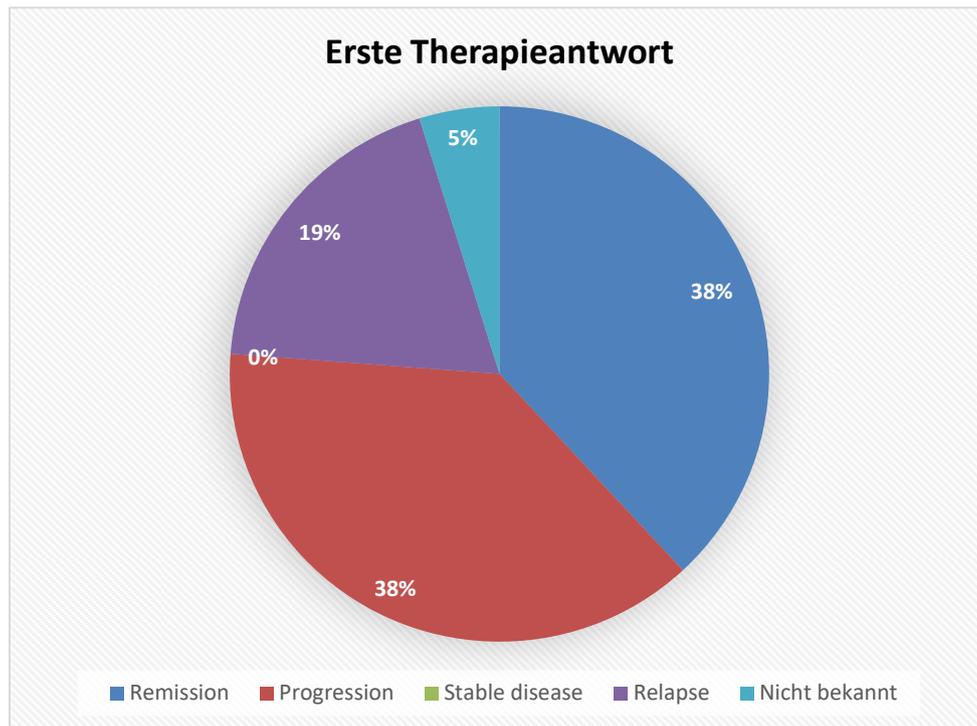


Abb. 17: Darstellung der initialen Therapieantwort, unabhängig von der zuerst zur Anwendung gekommenen Therapiemodalität (siehe Abb. 17) bei den 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte.

Abbildung 17 zeigt, dass es beim gleichen Anteil der NC-Patienten (38%) zu einer Progression und einer meist partiellen Tumor-Regression der Tumorerkrankung bereits nach der initialen Therapie kam, und zwar unabhängig von der initial gewählten Therapiemodalität. Die Regression den meisten Fällen war allerdings nur über einen sehr kurzfristigen Verlauf, da bereits im nächsten Tumor-Staging ein rascher Progress zu sehen war. Bei 19% der NC-Patienten wurde ein Relaps bemerkt. Bei einem Patienten (5%) lag nicht genug Informationen vor.

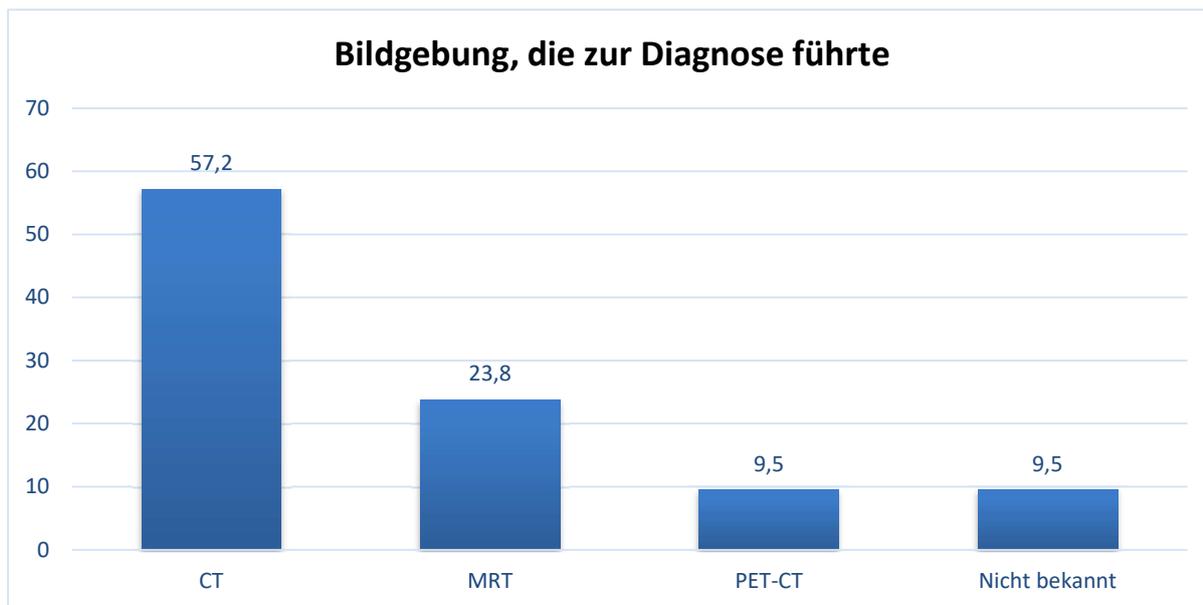


Abb. 18: Darstellung der initial durchgeführten Bildgebungen, die zum Verdacht auf das Vorliegen einer Tumorerkrankung geführt haben.

In der Abbildung 18 ist ersichtlich, dass die Computertomographie dasjenige Verfahren war, das am häufigsten zur Diagnose einer NC-Tumorerkrankung führte (57,2%; 12 von 21 Patienten; dabei 10 NC-Patienten mit Primärlokalisierung im Bereich des Thorax und 2 NC-Patienten mit Primärlokalisierung im Bereich Kopf-Hals).

Bei 5 Patienten (23,8%) führte die Magnetresonanztomografie (MRT) zum Nachweis eines NC-Tumors (4 dieser Patienten wiesen eine NC-Primärlokalisierung im Kopf-Hals-Bereich auf). Konventionelle Röntgen-Untersuchungen hatten, wegen deren niedriger Sensitivität nur selten zur Diagnose eines Tumorleidens geführt. Die PET-CT wurde initial sehr selten als diagnostisches Verfahren der Wahl zur Diagnosestellung benutzt, dagegen häufiger zur Tumor-Verlaufskontrolle.

Als häufigste Fehldiagnosen wurden am Anfang der Krankheit eine Pneumonie, eine Pleuritis oder eine Migräne vermutet. Erst mit weiteren diagnostischen Maßnahmen, wie Bildgebung und Biopsieentnahmen, wurde eine konkrete Diagnose gestellt.

Bei manchen NC-Patienten wurde initial in nicht korrekter Weise eine andere bösartige Krankheit histologisch festgestellt (meistens ein Plattenepithelkarzinom, ein kleinzelliges oder ein nichtkleinzelliges Lungenkarzinom). Diese Diagnosen wurden entsprechend den Ergebnissen weiterer histologischer Untersuchungen im weiteren Verlauf korrigiert und geändert.

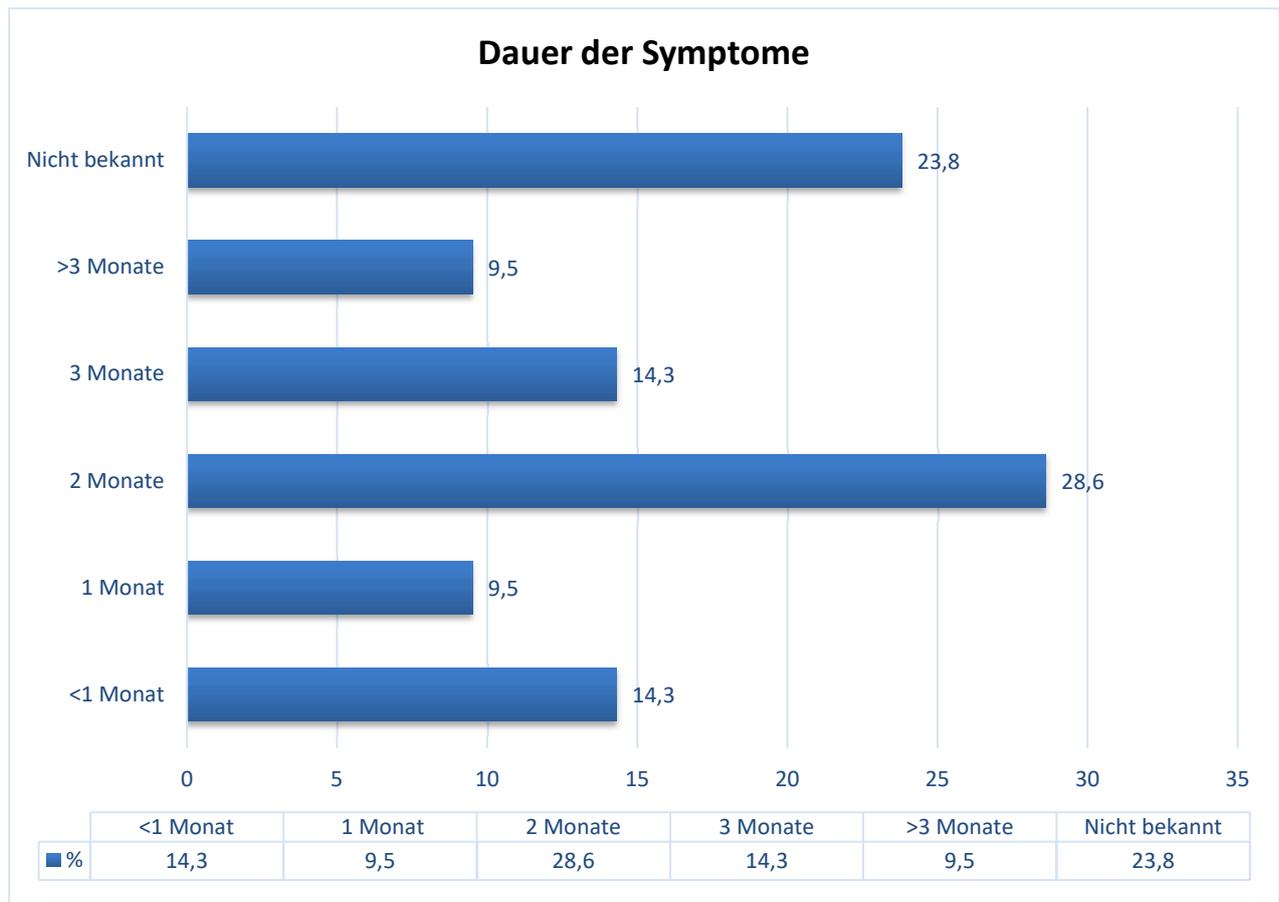


Abb. 19: Darstellung der Dauer der Symptome, bevor bei den 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte erstmalig die Tumordiagnose gestellt wurde.

Die mit der Entwicklung der NC-Tumoren einhergehenden Beschwerden zeigen sich verständlicherweise in erster Linie abhängig von der Tumorlokalisierung und sind zunächst meist unspezifisch in ihrer Natur:

- Bei einer Tumorlokalisierung im Bereich des Brustkorbes: Brustschmerzen, Husten, Bluthusten (Hämoptysen) und Belastungsdyspnoe.
- Bei einer Tumorlokalisierung im Kopf-Hals-Bereich: Kopfschmerzen, Ptosis, Doppelbilder, Miosis, Heiserkeit, verstopfte Nase, Verlust des Geruchssinns und Erkältungssymptomaten.
- Darüber hinaus fand sich häufig auch eine B-Symptomatik (Gewichtsverlust, erhöhte Körpertemperatur und Nachschweiß).

In der Abbildung 19 ist zu sehen, dass die Symptome bei 21 Patienten der Tübinger NC-Kohorte am häufigsten ca. zwei Monate andauert haben, bevor die Diagnose gestellt wurde (28,6%). In seltenen Fällen hielten die Beschwerden 3 Monate oder nur paar Tagen (14,3%) an. Länger als 3 Monate anhaltende Beschwerden ohne Stellung der Tumordiagnose traten in den seltensten Fällen auf.

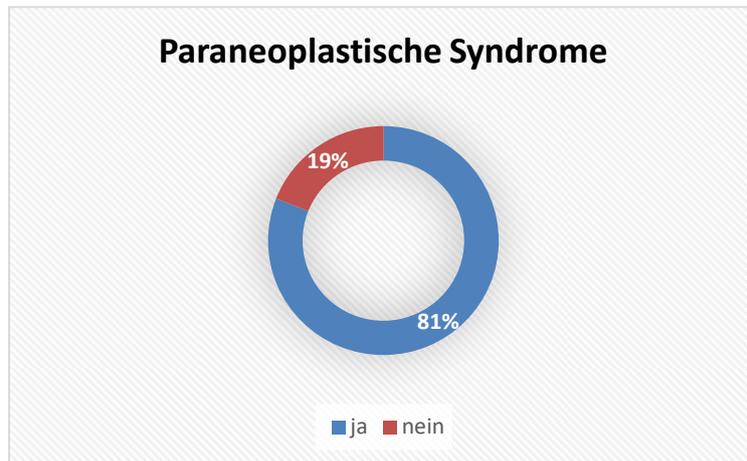


Abb. 20: Darstellung des prozentualen Anteils an Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte, bei denen paraneoplastische Syndrome (Hyperkalzämien, Neutropenien, Thrombozytopenien, Polyneuropathien) vorlagen.

In der Abbildung 20 ist erkennbar, dass 17 von 21 Patienten (81%) paraneoplastische Syndrome zeigten (am häufigsten in Form von Hyperkalzämie, Neutropenie, Thrombozytopenie, Polyneuropathie).

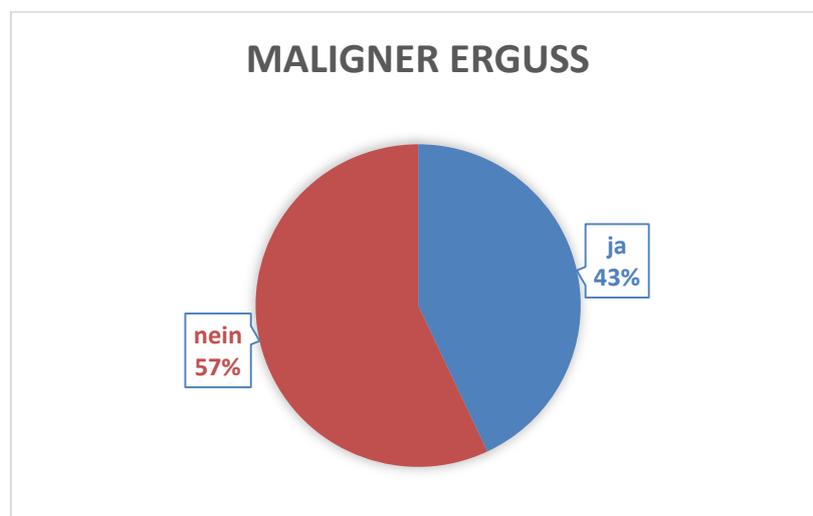


Abb. 21: Darstellung des prozentualen Anteils an Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte, bei denen maligne Ergüsse vorlagen (überwiegend in Form von einem meist einseitigen Pleuraerguss; selten auch als Perikarderguss).

Abbildung 21 zeigt uns, dass bei 9 von 21 Patienten (43%) maligne Ergüsse zu sehen waren (am häufigsten in Form von meist einseitigen Pleuraergüssen; selten auch in Form eines Perikardergusses).

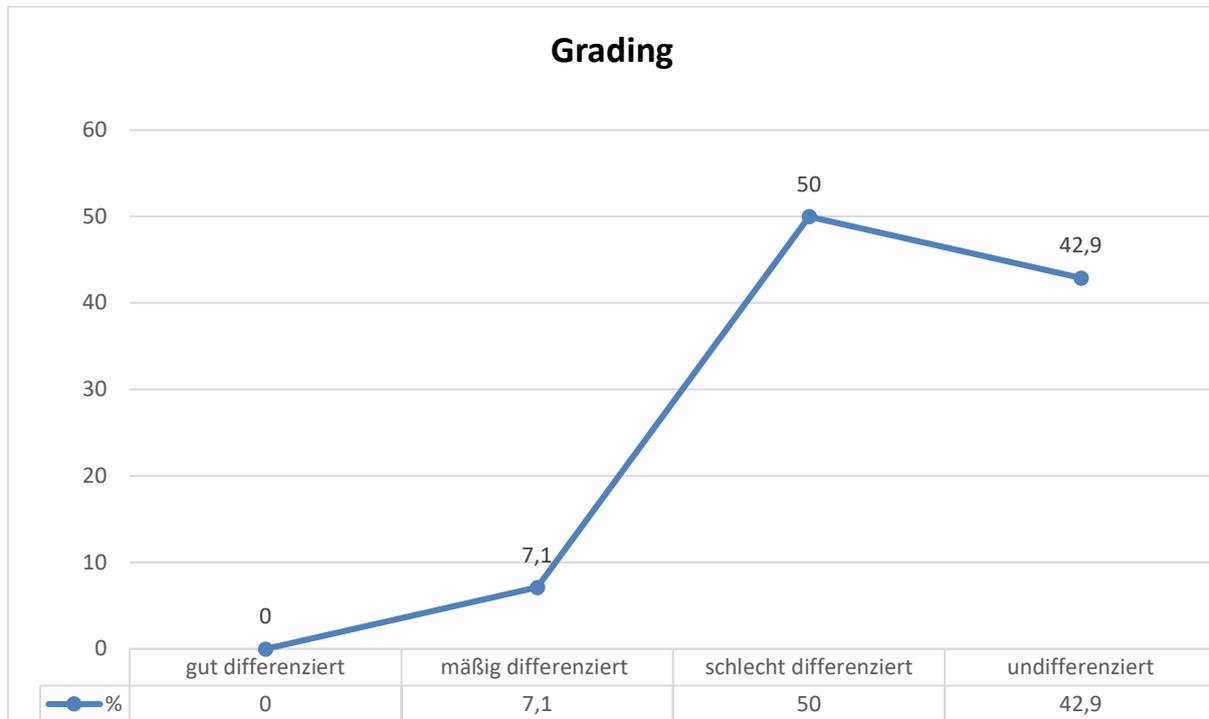


Abb. 22: Darstellung des Differenzierungsgrades, der bei der pathologischen Untersuchung von Tumorgewebe bei 14 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger NC-Kohorte festgestellt wurde. Bei den anderen 7 NC-Patienten der Tübinger NC-Kohorte wurde kein Differenzierungsgrad bestimmt.

In der Abbildung 22 ist ersichtlich, dass bei 50% der NC-Patienten (7 von 14) der Tübinger NC-Kohorte schlecht differenziertes bösartiges Gewebe bei der pathologischen Untersuchung von Tumorgewebe nachgewiesen wurde.

Bei 42,9% der Patienten wurde undifferenziertes bzw. anaplastisches bösartiges Gewebe festgestellt. Bei einem Patienten (7,1%) wurde niedrig differenziertes bösartiges Gewebe bei der pathologischen Untersuchung von Tumorgewebe nachgewiesen. Bei anderen 7 Patienten wurde leider kein Differenzierungsgrad bestimmt, da hier meistens eine immunhistochemische Untersuchung der Gewebe durchgeführt wurde.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die Tübinger NC-Kohorte erstmals eine Deutschland-weite Datenbasis liefert, die in weiteren Ausbaustufen wesentliche Hilfestellungen bei der Definition der beim NC vorliegenden speziellen Tumorbiologie liefern wird.

Insbesondere wird es im Rahmen einer kontinuierlichen Erweiterung dieser Kohorte möglich werden, spezifische Fragestellungen an genau definierten Untergruppen der Tübinger NC-Kohorte zu bearbeiten.

4. Diskussion

NC-Tumore stellen dahingehend ein sehr wichtiges Gebiet der Tumorforschung dar, weil diese eine besonders schlechte Prognose aufweisen und bislang ohne wirksame therapeutische Optionen sind.

Die Zahl der gemeldeten NC-Fälle nimmt immer noch kontinuierlich zu, was in erster Linie darauf zurückzuführen ist, dass NC-Tumore immer noch weitgehend unterdiagnostiziert sind und die wahre Prävalenz deutlich höher liegt als die derzeit gemeldeten Fälle.

Vor diesem Hintergrund ist es erforderlich, an Standorten, an denen intensiv präklinisch und klinisch zu dieser Tumorerkrankung geforscht wird, entsprechende NC-Register zu erstellen und darauf weiterführende Studien aufzubauen.

In einer weltweit angelegten NC-Register-Studie aus der Arbeitsgruppe von Dr. French in Boston wurden im Zeitraum von 1993 - 2017 insgesamt 141 NC-Patienten aus 17 Ländern identifiziert (pro Jahr rechnerisch 5,9 Patienten). In unserer eigenen Tübinger NC-Kohorte wurden im Zeitraum von 2016 - 2021 insgesamt 21 Patienten aus 3 Ländern identifiziert (pro Jahr rechnerisch 4,2 Patienten). Die Mehrheit der Tübinger Fälle stammt naturgemäß aus Deutschland. Nur einzelne Fälle kommen aus den Nachbarländern Schweiz und Dänemark.

Der Vergleich der zahlenmäßig bis dato noch weniger umfangreichen Tübinger NC-Kohorte (n=21) mit der NC-Kohorte in Boston (n=141) hat in erster Linie folgende Ergebnisse zu Tage gefördert:

Die Prognose ist in beiden Kohorten (Tübingen / Boston) ausgesprochen schlecht:

- Das durchschnittliche Gesamtüberleben liegt bei der Tübinger Kohorte mit 11,2 Monaten höher als bei der Bostoner Kohorte mit 6,5 Monaten.
- In der Bostoner Kohorte gab es 16 Patienten, die nach der Diagnosestellung länger als 3 Jahren gelebt haben; in der Tübinger Kohorte gab es hingegen lediglich zwei Patienten mit einer Überlebenszeit von länger als 2 Jahre.
- In der Bostoner Kohorte hatten die Patienten mit einer initialen Tumorgroße < 6 cm eine bessere Prognose. Bei der Tübinger Kohorte hingegen wurde beobachtet, dass die initiale Tumorgroße keine Rolle bei der Prognose spielt.

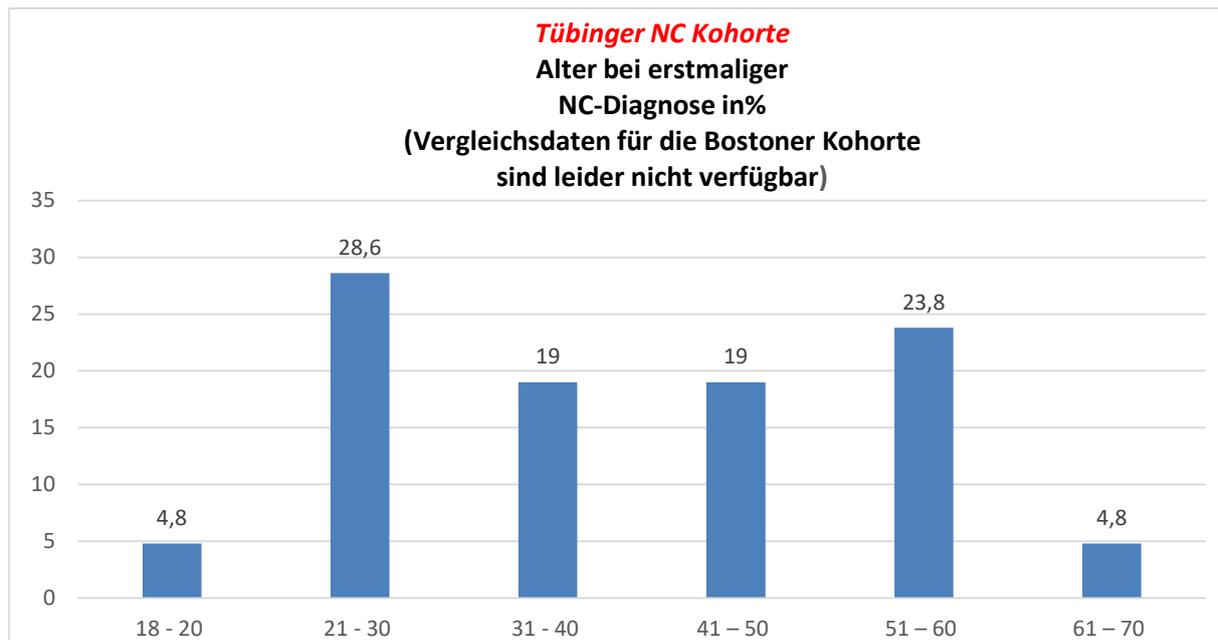


Abb. 23: Darstellung des Alters der Patienten zum Zeitpunkt der Feststellung der Erstdiagnose "NC-Tumorerkrankung" bei den 21 Patienten der Tübinger NC-Kohorte.

In der Abbildung 23 ist zu sehen, dass in der Tübinger NC-Kohorte der höchste Prozentsatz der Erstdiagnose mit 28,6% in der zweiten Lebensdekade (21-30 Jahre) lag. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag in der Bostoner NC-Kohorte bei 23,6 Jahren; in der Tübinger NC-Kohorte fand sich ein mittleres Alter von 40,4 Jahren.

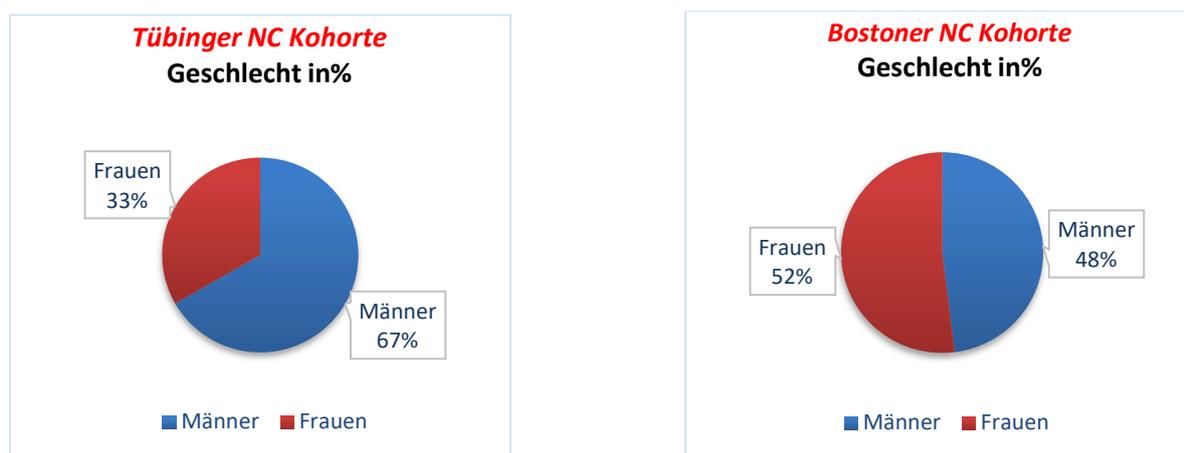


Abb. 24: Vergleichende Geschlechterverteilung der 21 Patienten der Tübinger NC-Kohorte mit den 141 Patienten der Bostoner NC-Kohorte.

In der Abbildung 24 ist ersichtlich, dass in der Tübinger Kohorte (33%) in Vergleich zu in der Bostoner Kohorte (52%) Frauen deutlich seltener als Männer betroffen sind.

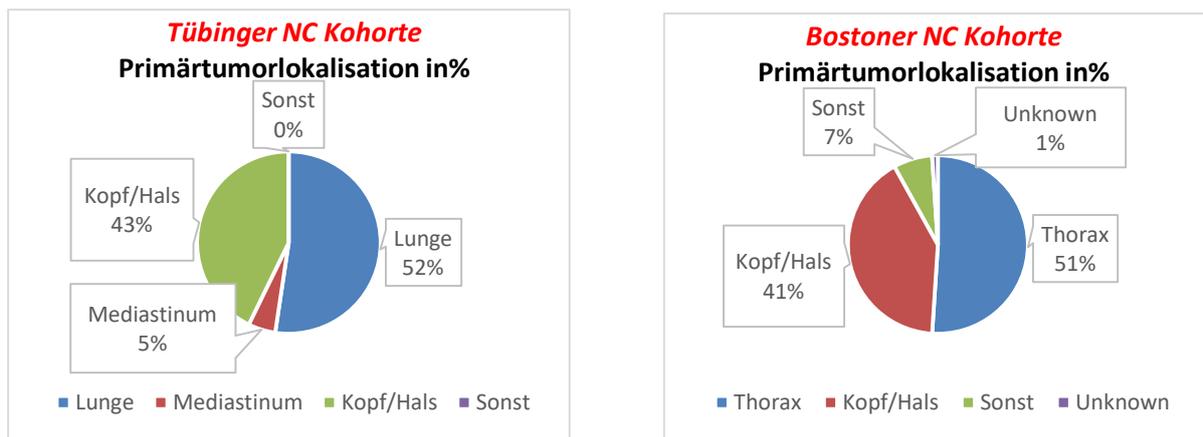


Abb. 25: Primärtumorlokalisationen der 21 Patienten der Tübinger NC-Kohorte und der 141 Patienten der Bostoner NC-Kohorte.

Die Abbildung 25 zeigt uns, dass in beiden Kohorten der Thorax (Lunge und Mediastinum) der bevorzugte Manifestationsort ist. Dementsprechend besteht eine gute Übereinstimmung seitens der beiden Kohorten.

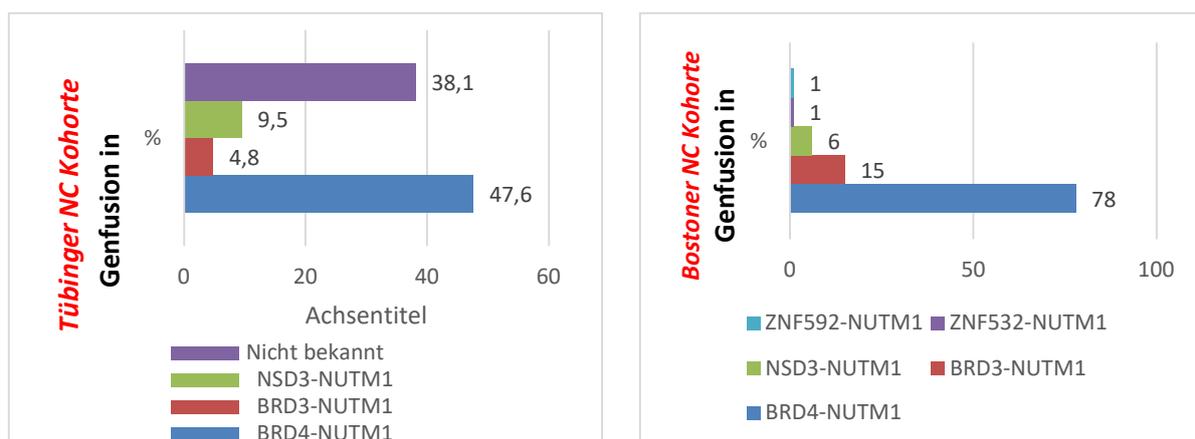


Abb. 26: Die häufigsten Genfusionen der 21 Patienten der Tübinger NC-Kohorte und der 127 Patienten der Bostoner NC-Kohorte.

In Abbildung 26 ist zu sehen, dass die BRD4-NUTM1 Fusion in beiden Kohorten im Vergleich zu anderen Fusionspaare deutlich häufiger vertreten ist. Der Anteil lag bei 47,6% in der Tübinger Kohorte (Anmerkung: 38,1% der NC-Patienten war bzgl. dieses Parameters nicht analysiert worden) und bei 78% den getesteten Patienten in der Bostoner Kohorte. Zweit- und dritthäufigste Fusionspaare sind in beiden Kohorten BRD3-NUTM1 und NSD3-NUTM1. Dementsprechend besteht auch bei diesem Kriterium eine sehr gute Übereinstimmung seitens der beiden Kohorten.

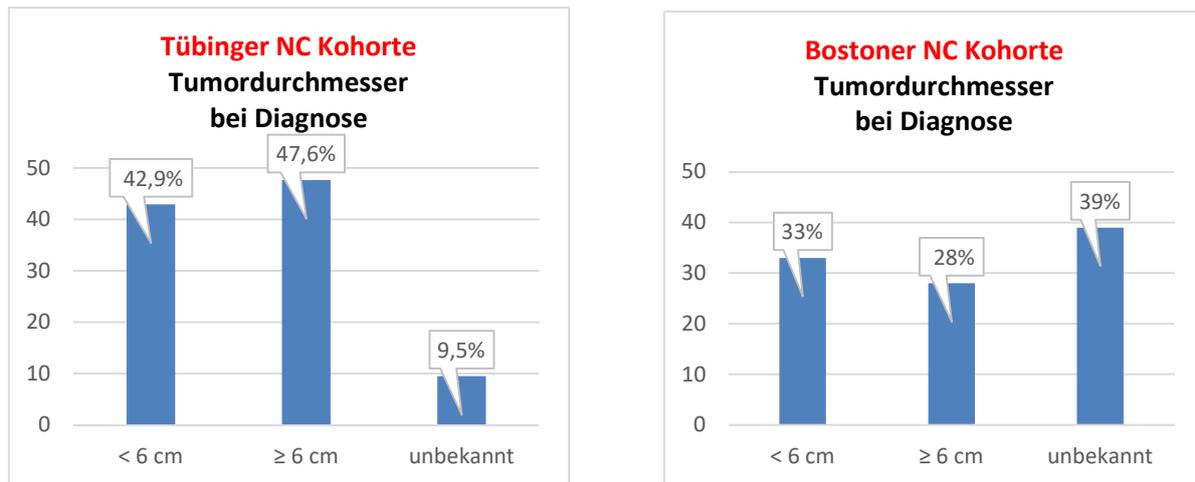


Abb. 27: Darstellung der Tumordurchmesser bei der Diagnosestellung bei den 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte sowie bei den 141 Patienten der Bostoner NC-Kohorte.

In Abbildung 27 ist zu sehen, dass bei der Mehrheit der Patienten der Tübinger NC-Kohorte (47,6%) der Tumordurchmesser zum Zeitpunkt der ersten verfügbaren Schnittbildgebung über oder genau bei 6 cm lag. Hingegen ist zu sehen, dass bei der Mehrheit der Patienten der Bostoner NC-Kohorte (33%) der Tumordurchmesser bei Diagnosestellung unter 6 cm lag. Bei der 39% der NC-Patienten der Bostoner Kohorte sind die Daten über Tumordurchmesser bei der Diagnosestellung fehlend.

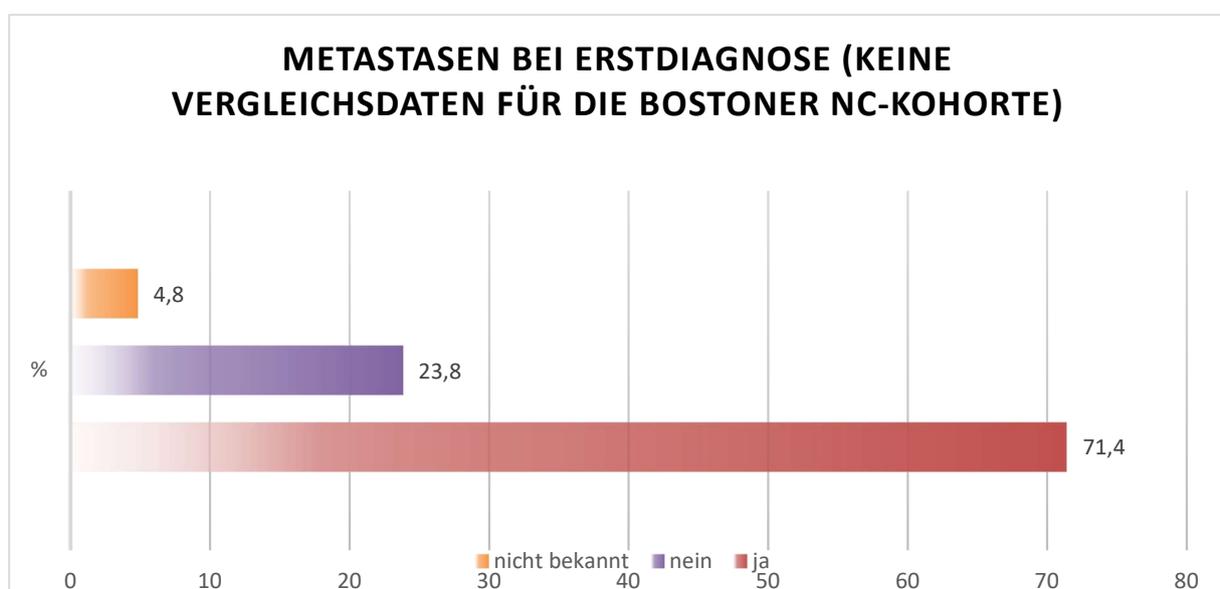


Abb. 28: Darstellung des prozentualen Anteils von Metastasen (regional und/oder nicht regional, Lymphknoten- oder Organmetastasen) bei Erstdiagnose, unabhängig davon, ob primär eine Fehldiagnose vorlag (fälschlicherweise Zuordnung des histologischen

Befundes einer nicht-NC-Tumorentität) oder nicht. Es sind keine Vergleichsdaten für die Bostoner Kohorte vorgeben.

In der Abbildung 28 zeigt sich, dass die meisten Patienten bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lymphogene Metastasen und/ oder Organmetastasen (15 von 21; 71,4%) hatten, und zwar unabhängig davon, ob zuerst eine Fehldiagnose gestellt wurde oder nicht. Bei 4,8% der Patienten lagen nur ungenügende Informationen vor. Für die Bostoner Kohorte liegen keine Vergleichsdaten vor.

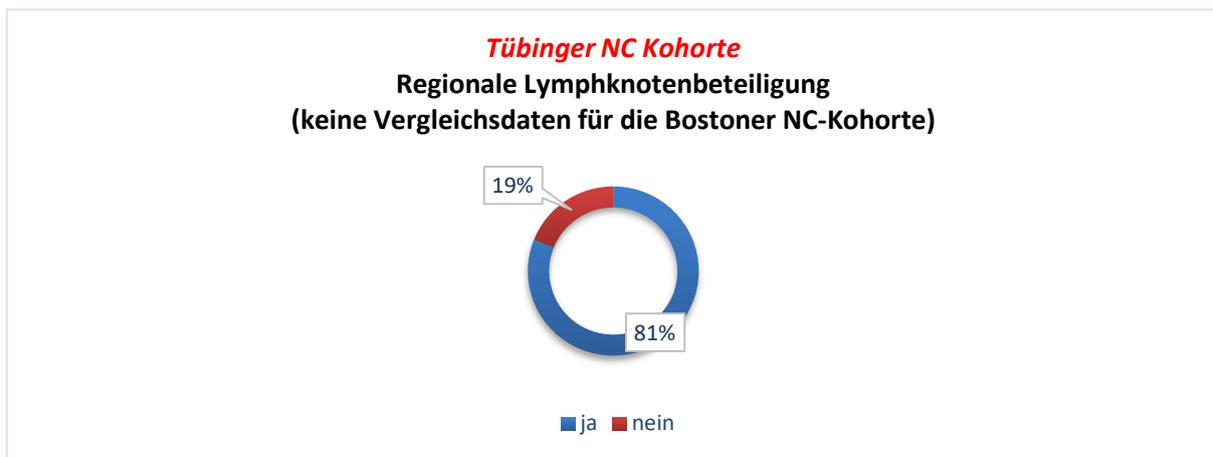


Abb. 29: Darstellung der regionalen Lymphknotenbeteiligung, unabhängig vom Entwicklungsstadium bei den 21 Patienten der Tübinger Kohorte. Leider sind keine Vergleichsdaten für die Bostoner Kohorte verfügbar.

In Abbildung 29 ist ersichtlich, dass 81% der Patienten der Tübinger NC-Kohorte, eine regionale Lymphknotenbeteiligung, unabhängig vom Entwicklungsstadium der NC-Tumorerkrankung, erlitten. Für die Bostoner Kohorte liegen keine Vergleichsdaten vor.

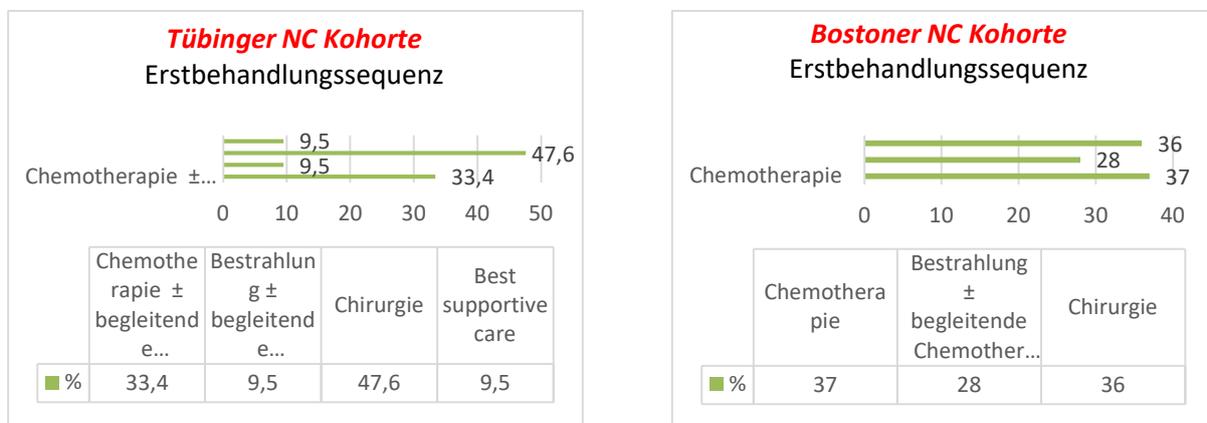


Abb. 30: Darstellung der zuerst bei den 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte und 112 Patienten der Bostoner Kohorte zum Einsatz gekommen

Behandlungssequenz. Andere 29 Patienten haben entweder keine Therapie erhalten oder ist sie nicht bekannt.

In der Abbildung 30 ist es zu sehen, dass der größte Teil der 21 Patienten der Tübinger Kohorte zuerst chirurgisch behandelt wurde. Eine Chemotherapie war die zweithäufigste benutzte initiale therapeutische Option. Eine Bestrahlung wurde am wenigsten eingesetzt. Bei zwei Patienten wurde aufgrund der sehr ausgeprägten Tumorerkrankung eine *best supportive care* angeboten.

Andererseits ist in Abbildung 30 zu sehen, dass es in der Bostoner Kohorte einen minimalen Unterschied zwischen operativer Therapie und Chemotherapie (Chemotherapie: 37%, operative Therapie: 36%) gibt. 29 Patienten der Bostoner Kohorte haben entweder keine Therapie erhalten oder diese ist nicht bekannt.

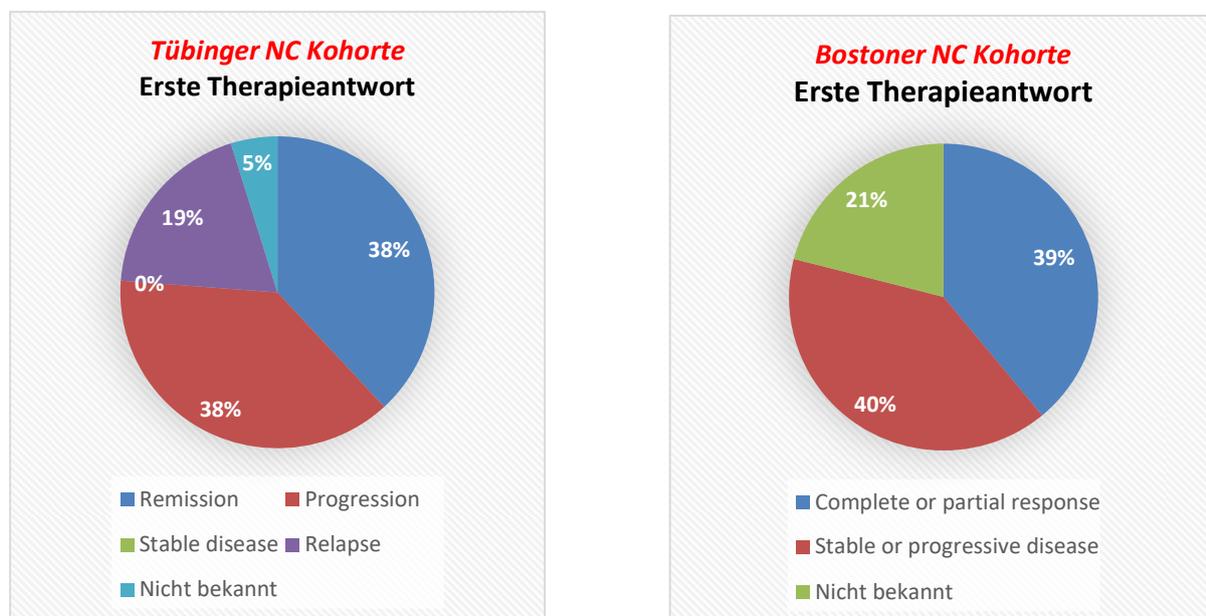


Abb. 31: Darstellung der initialen Therapieantwort, unabhängig von der zuerst zur Anwendung gekommenen Therapiemodalität bei den 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte, und bei den 141 Patienten der Bostoner Kohorte.

In der Abbildung 31 ist ersichtlich, dass es zwischen der Tübinger und der Bostoner Kohorte keinen wesentlichen Unterschied zwischen Patienten, die eine gute Antwort (Remission) auf die Therapie hatten und Patienten, die einen Progress hatten, ergibt. 19% der NC-Patienten der Tübinger Kohorte (4 von 21) haben, unabhängig von der zuerst zur Anwendung gekommenen Therapiemodalität, ein Rezidiv entwickelt. Fälle einer stabilen Erkrankung fanden sich in der Tübinger Kohorte nicht.

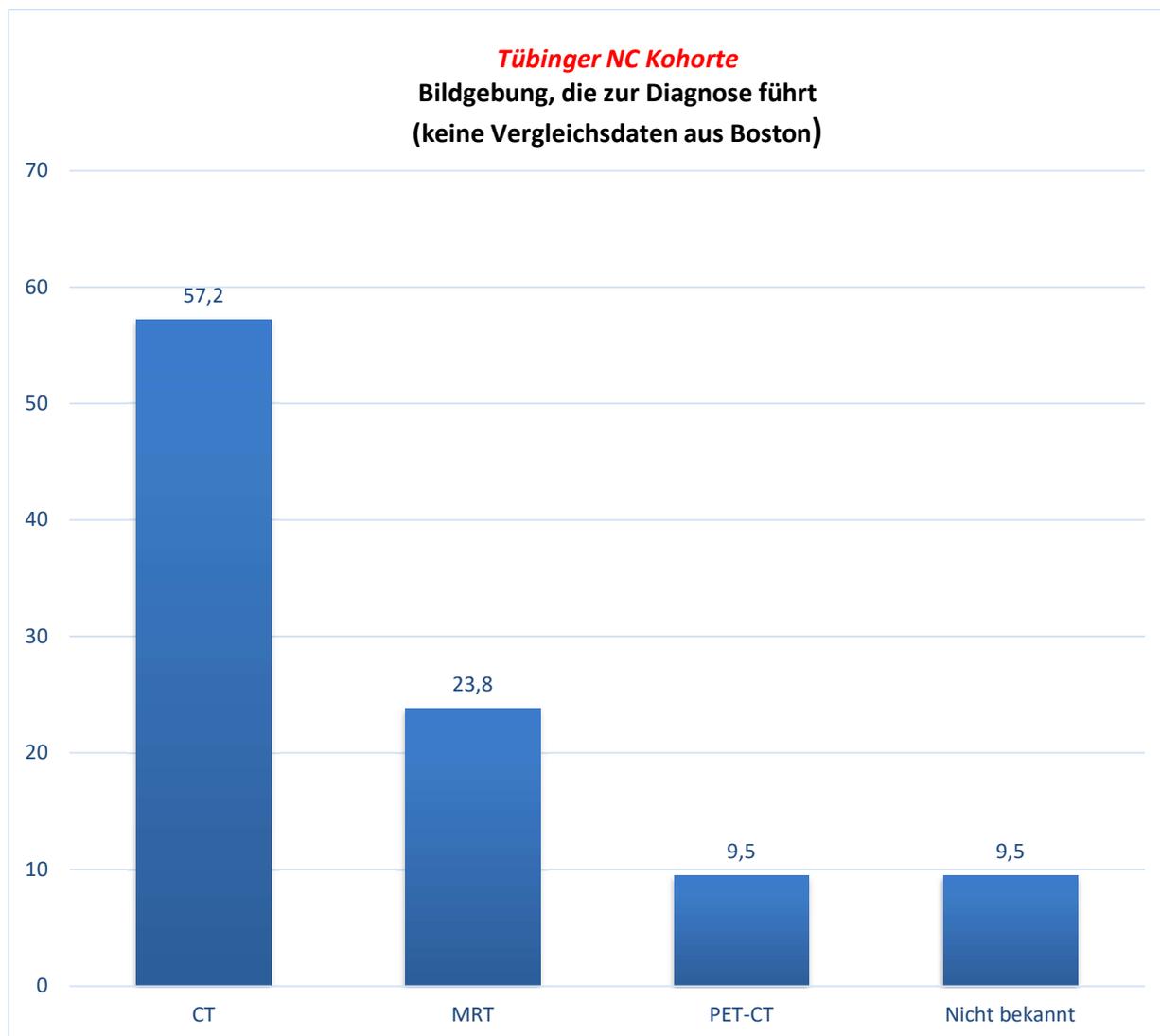


Abb. 32: Darstellung der initial durchgeführten Bildgebungen bei 21 Patienten der Tübinger NC-Kohorte, die zum Verdacht auf das Vorliegen einer Tumorerkrankung geführt haben. Es sind keine Vergleichsdaten für die Bostoner Kohorte vorgeben.

In der Abbildung 32 ist zu sehen, dass in der Tübinger Kohorte die Computertomographie, die häufigste initial durchgeführte Bildgebung war, die auf das Vorliegen einer Tumorerkrankung führte (57,2%).

Die zweithäufigste Bildgebung war die MRT (23,8%). PET-CT führte nur sehr selten zur Diagnose. Für die Bostoner Kohorte liegen keine Vergleichsdaten vor.

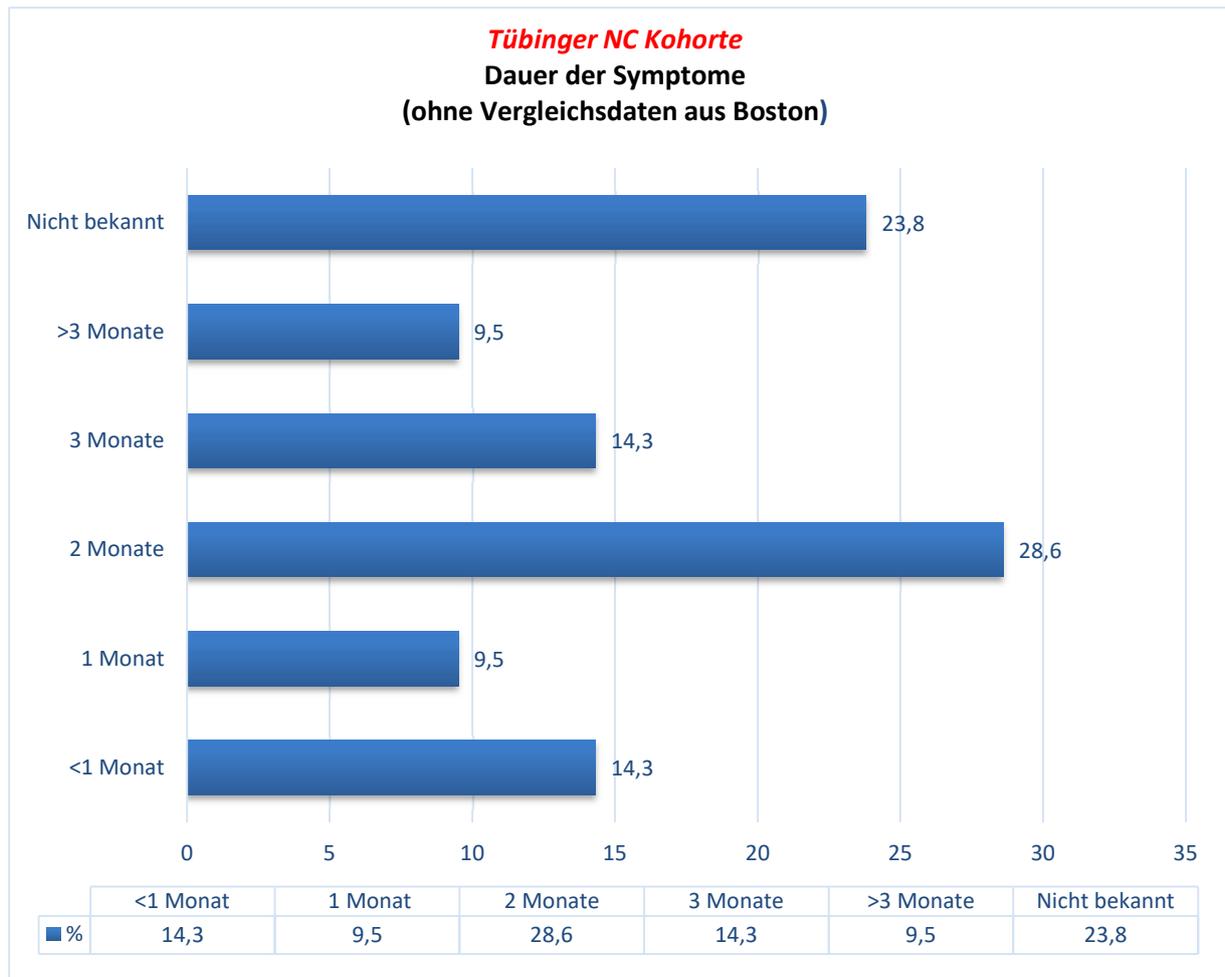


Abb. 33: Darstellung der Dauer der Symptome, bevor bei den 21 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte erstmalig die Tumordiagnose gestellt wurde. Es sind keine Vergleichsdaten für Boston Kohorte vorgeben.

Die Abbildung 33 zeigt uns, dass bei 21 Patienten der Tübinger NC-Kohorte, die Symptome meist ca. 2 Monaten andauert haben, bevor die Diagnose gestellt wurde (28,6%). In seltenen Fällen dauern die Beschwerden ein paar Tagen/Wochen (14,3%) an. Im Ganzen haben die Beschwerden sehr seltener länger als 3 Monaten andauert.

In 23,8% der Fälle standen uns leider nicht genug Informationen zur Verfügung. Für die Bostoner Kohorte liegen keine Vergleichsdaten vor.

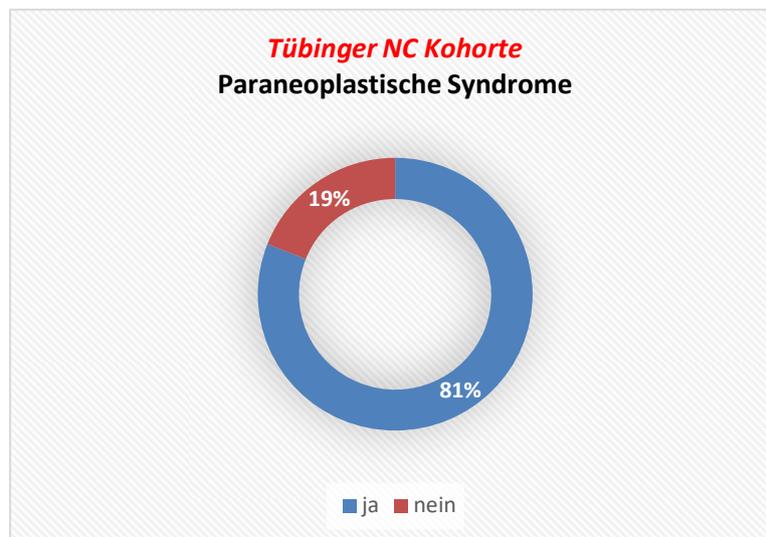


Abb. 34: Darstellung des prozentualen Anteils an Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte, bei denen paraneoplastische Syndrome (Thrombozytopenien, Polyneuropathien, Neutropenien, Hyperkalzämien) vorlagen. Es sind leider keine Vergleichsdaten für die Bostoner Kohorte vorgeben.

In der Abbildung 34 zeigt sich, dass 81% der Patienten der Tübinger NC-Kohorte ein Paraneoplastischen Syndrom entwickelt haben. Es liegen leider keine Vergleichsdaten für die Bostoner NC Kohorte vor.

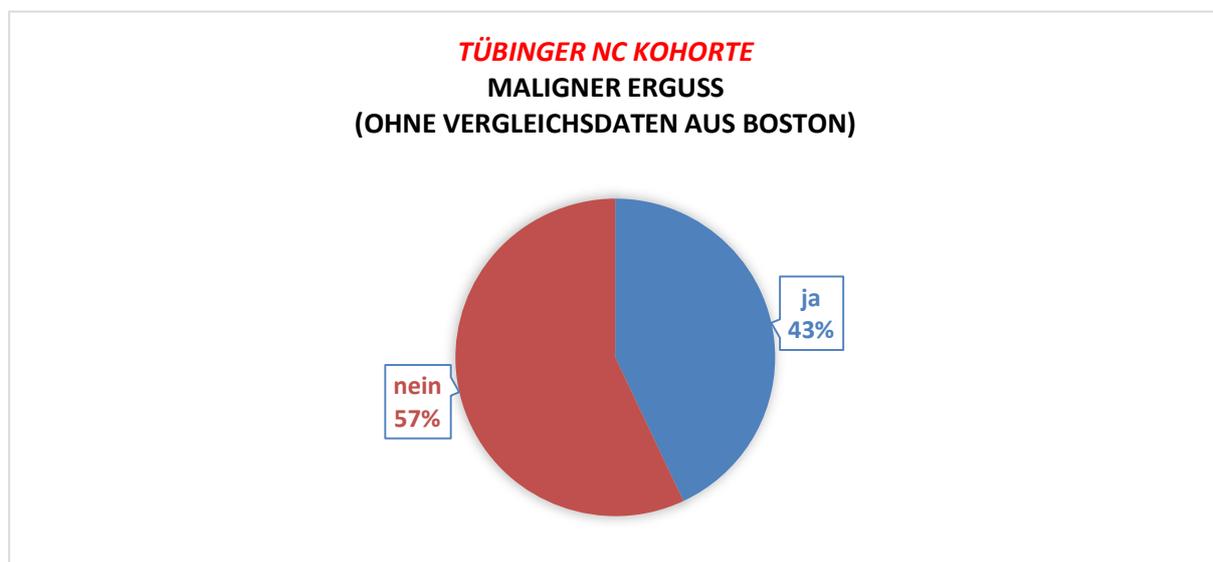


Abb. 35: Darstellung des prozentualen Anteils an Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte, bei denen maligne Ergüsse vorlagen (überwiegend in Form von einem, meist einseitigen, Pleuraergusses; selten auch in Form eines Perikardergusses). Es sind keine Vergleichsdaten für die Bostoner Kohorte vorgeben.

In der Abbildung 35 ist zu sehen, dass 43% der Patienten der Tübinger NC-Kohorte maligne Ergüsse, am häufigsten in Form von einseitigen Pleuraergüssen, hatten; selten auch in Form eines Perikardergusses. Es gibt leider keine Vergleichsdaten für Bostoner NC-Kohorte.

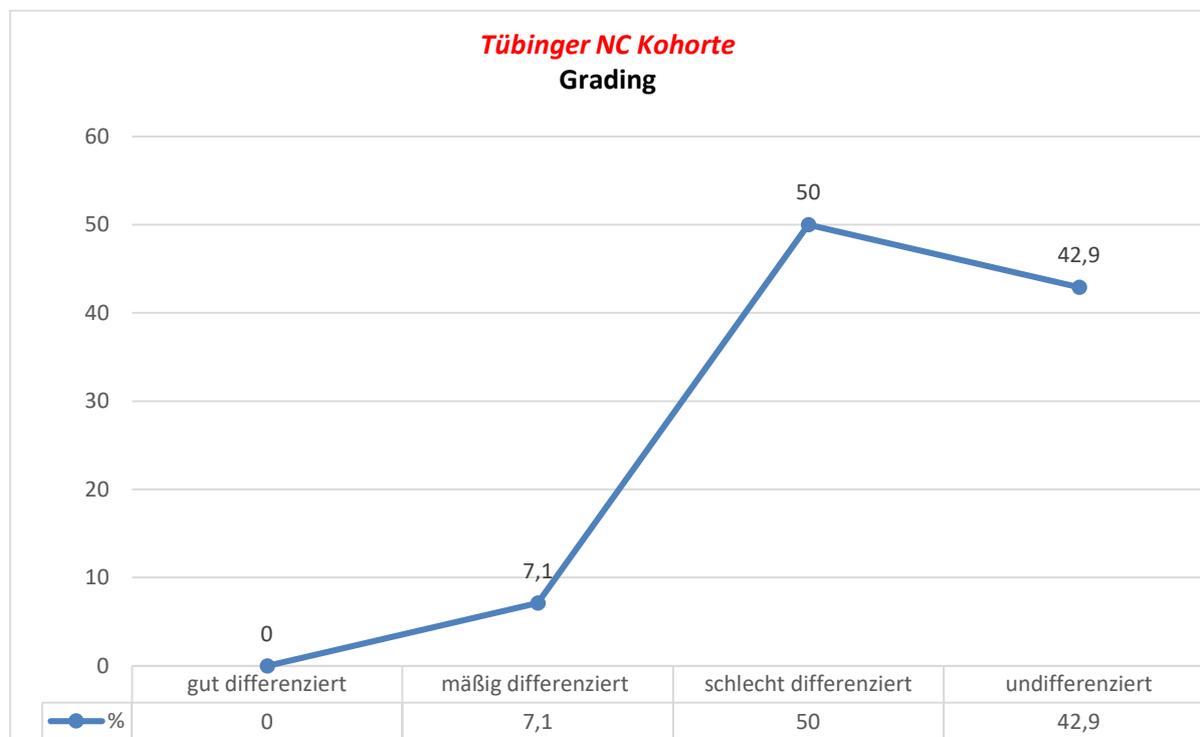


Abb. 36: Darstellung des Differenzierungsgrades, der bei der pathologischen Untersuchung von Tumorgewebe der 14 Patienten mit NC-Tumorerkrankung der Tübinger Kohorte festgestellt wurde. Bei anderen 7 Patienten wurde kein Differenzierungsgrad bestimmt. Es sind keine Vergleichsdaten für die Bostoner Kohorte vorgeben.

In der Abbildung 36 ist ersichtlich, dass bei 50% der Patienten ein schlecht differenziertes bösartiges Gewebe, bei der pathologischen Untersuchung von Tumorgewebe bei 14 Patienten der Tübinger NC-Kohorte nachgewiesen wurde.

Bei 42,9% der Patienten wurde ein undifferenziertes bzw. anaplastisches bösartiges Gewebe festgestellt. Es sind keine Vergleichsdaten für Bostoner Kohorte vorgeben.

Man kann somit zusammenfassen, dass das mittlere Alter bei der Diagnosestellung, in unserer zahlenmäßig noch sehr kleinen Kohorte deutlich höher ist. Weiteres findet sich in unserer Kohorte häufiger eine mittlere Tumorgöße bei genau, oder über 6 cm bei Diagnosestellung. In der Tübinger Kohorte sind Frauen deutlich seltener betroffen.

Die häufigste initiale therapeutische Option in unserer Kohorte war Chirurgie, währenddessen in der Bostoner Kohorte einen minimalen Unterschied zwischen Chirurgie und Chemotherapie zu sehen war.

Weiter kann festgehalten werden, dass zu den eingangs aufgeworfenen Fragestellungen (siehe Abschnitt 1.10 Wissenschaftliche Fragestellungen) in der Diskussion detailliert im Vergleich mit der Bostoner Kohorte Stellung genommen wurde (weitere Kohorten mit einer vergleichbaren Datenqualität, die in diesen Vergleich einbezogen werden könnten, sind leider bislang nicht verfügbar).

Blickt man auf eine retrospektive Studie von Giridhar et al. zwischen 1950 und 2017 mit insgesamt 119 Patienten aus unterschiedlichen Ländern lag das durchschnittliche Gesamtüberleben nach Stellung der Erstdiagnose, sehr ähnlich mit der Bostoner-NC-Kohorte, bei 5 Monaten. In der Giridhar-Kohorte gab es drei Patienten, die nach der Diagnosestellung länger als 10 Jahren gelebt haben. Das mittlere Alter bei der Diagnosestellung lag bei 23 Jahren. Frauen und Männer waren zu gleichen Teilen betroffen. Die häufigsten Tumorlokalisationen stimmen mit denen in den Tübinger- und Bostoner-NC-Kohorten überein. Im Vergleich zur Tübinger-NC-Kohorte, in welcher die Mehrheit der Patienten (15 von 21, 71,4 %) bereits zur Zeit der Diagnosestellung Metastasen hatten, war dies in der Giridhar-Kohorte sogar bei 39,8 % der Patienten der Fall. Genfusionen aus NUT-BRD4 stellte sich auch in der Giridhar-Kohorte als die häufigste nachgewiesene Translokation dar.²⁷

In der Giridhar Studie wurde weiterhin beobachtet, dass die Patienten, die Radio- und Chemotherapie als initiale Therapieoptionen erhalten hatten, eine bessere Gesamtüberlebenschance zeigten, vor allem bei einer Bestrahlungsdosis über 50 Gy. Bestrahlung spielte eine Rolle bei Patienten mit Primärlokalisationen im Kopf/Hals- und im Lungenbereich, ausgenommen Mediastinum. Der Zeitpunkt der Bestrahlung bzgl. der gesamten Behandlungssequenz spielte dabei keine Rolle. Die 1-Jahres-Überlebensrate für bestrahlte Patienten betrug 37,7 % in Vergleich zu 13 % für die Patienten ohne Radiotherapie. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 11 % gegenüber 0 % für nicht bestrahlte Patienten.

Die 1-Jahres-Überlebensrate für die Patienten mit Chemotherapie betrug 27 % in Vergleich zu 0 % für die Patienten ohne Chemotherapie. Dabei spielte die Chemotherapie

nur bei der Primärlokalisierung Mediastinum eine Rolle. Bei anderen Lokalisationen hatten die unterschiedlichen Chemotherapie-Regime keinen Effekt auf das Gesamtüberleben gezeigt.²⁷

In einer West-Australischen Studie wurden alle Patienten bis zum Alter von 16 Jahren, die sich im Kinderkrankenhaus `Princess Margaret Hospital for Children` zwischen 1989 und 2014 auf der onkologischen Abteilung gemeldet haben, eingeschlossen.

In diesem Zeitraum wurden insgesamt 14 Fälle mit der Diagnose eines undifferenzier-ten malignen Tumors festgestellt. Von diesen 14 Fälle, fünf waren immunhistoche-misch positiv auf Marker des NC-Karzinoms, hatten drei Fälle eine Brust-Lokalisation, ein Fall hat eine paraspinale Tumor-Lokalisation und ein Fall hatte eine Lokalisation im Kopf/Hals Bereich. Alle fünf immunhistochemisch positiven Fälle sprachen zu-nächst auf die jeweils gewählten Therapie-Regime an; im Verlauf zeigte sich aber je-weils rasch ein Progress.⁶

Wang et al. berichten über einem 18-jährigen Patienten mit der Lokalisation eines NC-Karzinoms in Nasen- und Nasennebenhöhle. Die initiale Diagnose lautet basaloid-squamöses Karzinom. Aufgrund des Alter des Patienten, der Tumorlokalisierung und einer mikroskopisch nachgewiesener Keratinisierung wurde das Vorliegen eines NC-Tumors differentialdiagnostisch in Erwägung gezogen.⁵⁵

Mittels NUT-Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) konnte in diesem Fall tatsächlich die Diagnose eines NC-Karzinoms bestätigt werden. Jedoch konnte trotz der oben genannten Auffälligkeiten mittels einer Next Generation sequencing (NGS) keine NUTM1 Gentranslokation nachgewiesen werden, wofür die eingeschränkte Qualität und die limitierte Menge der RNA, die für diese diagnostische Methode benutzt wurde, verantwortlich gemacht wurde.⁵⁵

Zudem berichten Grosse et al. über weitere zwei Patienten, bei denen eine NC-Diag-nose erst nachfolgend mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) gestellt und gesichert wurde. Bei dem einen 35-jähriger Patienten mit Lungenprimarius im Lungen-mittellappen und Beteiligung des Segmentbronchus wurde initial morphologisch der Verdacht auf ein kleinzelliges Lungenkarzinom gestellt. Bei dem anderen 72-jährigen Patienten mit unklarem Primarius und disseminierten Lungen- und Knochenmetasten und einem soliden Knoten in der rechten Niere wurde initial eine hämatologische Krankheit vermutet.²⁹

Für den weiteren Ausbau der Tübinger NC-Kohorte im Sinne einer "feineren" Differenzierung der bisherigen Basis-Parameter sind neuere Arbeiten zur Diagnostik und Therapie von NC-Tumorpatienten von großem Interesse.

In einer großen Kohorte von Riess et al. mit 181.838 Patienten konnte bei 31 Patienten mittels *comprehensive genomic profiling (CGP)* eine BRD4-NUT Translokation festgestellt werden. Dabei war nur bei 16% (5/31) der Fälle bereits initial die Diagnose NC gestellt worden. Bei 22% (7/31) wurde initial die Diagnose eines *non-small cell lung cancer / not otherwise specified (NSCLC-NOS)* und bei 16 % (5/31) die Diagnose eines *non-small cell lung cancer / squamous cell carcinoma (NSCLC-SCC)* gestellt.

Aus dieser großen Kohorte wurden zwei besondere Fälle hervorgehoben, bei denen eine Behandlung mit anti-PD-1 und anti-PD-L1 Immuncheckpoint Inhibitoren durchgeführt worden waren. Bei dem Fall einer 52-jährigen afroamerikanischen Frau mit der initialen Diagnose eines metastasierten *non-small cell lung cancer / squamous cell carcinoma (NSCLC- SCC)* wurde nachträglich eine BRD4-NUTM1 Translokation nachgewiesen, Nach zwei Monaten einer Monotherapie mit Nivolumab zeigte sich zunächst eine fast vollständige Rückbildung aller Tumormanifestationen; allerdings ergab dann ein nachfolgendes Staging einen Progress der NC-Tumorerkrankung mit neu aufgetretenen Knochenmetastase. Obwohl daraufhin eine Immun-Kombinationstherapie mit Nivolumab plus Ipilimumab eingeleitet wurde, kam es zum schnellen weiteren Progress der Krankheit.

In dem anderen Fall einer 39-jährigen europäischen Frau mit initialer Diagnose eines schlecht differenziertes *squamous cell carcinoma* wurde initial eine Therapie mit Cisplatin, Etoposid und Bestrahlung der Raumforderung der Brust mit 60 Gy durchgeführt. Nachdem ein partielles Ansprechen festgestellt wurde, wurde eine Therapie mit dem Immuncheckpoint Inhibitor Atezolizumab sowie mit Carboplatin und Paclitaxel eingeleitet; parallel erfolgte eine palliative Bestrahlung der Lunge mit 8 Gy. Initial konnte ein Ansprechen beobachtet werden; bereits nach fünf Monaten kam es dann wieder zum Progress der Krankheit.

Riess et al. haben eine Kohorte auf die Affinität von BRD4-NUT zum MHC-Komplex überprüft, da dieser Affinität potenziell mit Immunantworten korrelieren könnte. Möglicherweise haben NC-Patienten mit einer BRD4-NUT Fusion, die ein Fusionspeptid

mit der hohen Affinität zum MHC-Komplex besitzen, eine bessere Antwort auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren.⁴⁵ Entsprechende Ergebnisse stehen allerdings noch aus.

Bezüglich der Möglichkeiten einer epigenetischen Therapie wurde in letzter Zeit sehr viel Hoffnung auf *Histone deacetylase inhibitor (HDACi)* Wirkstoffe gesetzt. Zurzeit sind Vorinostat und Romidepsin von der *Food and Drug Administration (FDA)* zugelassen und auf dem Markt verfügbar. Schwartz et al. berichten über den Fall eines minderjährigen Patienten mit der Diagnose eines NC-Tumors in Mediastinum. Nach oraler Einnahme des HDACi-Wirkstoffes Vorinostat (400 mg täglich) erfolgte fünf Wochen später eine Kontrolle, hier wurde mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eine positivere Antwort auf *HDACi*, bemerkt. Leider durch die Unverträglichkeit des Medikamentes im Sinne ausgeprägter Übelkeit und Erbrechen musste die weitere Therapie mit Vorinostat unterbrechen werden. Der Patient ist gestorben elf Monaten nach dem die Diagnose gestellt wurde. Außerdem wurde eine dosislimitierende Thrombozytopenie registriert.⁴⁸

In einer Studie mit 13 koreanischen Patienten wurde in vier NC-Zelllinien bemerkt, dass eine Kombination aus *Histone deacetylase inhibitor (HDACi)* und *Phosphoinositide 3-kinase inhibitor (PI3K)*, sogenannter **CUDC-907**, sehr wirksam gegen die Proliferation von den NC Zellen ist ($IC_{50}=5,5-9,0$ pmol/L).

In Gegenteil zur Giridhar Studie wurde in dieser Studie festgestellt, dass Patienten, die eine chirurgische Intervention als initiale Therapie erhalten haben, eine bessere Gesamt-Überlebenschance zeigen.

Bei den allen Patienten wurde mittels *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH)* eine NUT Translokation identifiziert. Was spricht dafür wie wichtig es ist bei allen Patienten mit der Diagnose eines schlecht differenziertes Plattenepithelkarzinoms so eine diagnostische Maßnahme durchzuführen. Vor allem bei der Tumorlokalisierung in der Kopf-/Halsbereich und der Lunge.³⁵

Da bei NC-Tumorpatienten durch die Expression des BRD4-NUT Onkoproteins die Expression der Histon Acetylase (HAT) verringert ist, helfen Histon Deacetylase Inhibitoren (*HDACi*), die Verdrängung von HAT Proteinen wieder herzustellen, was zu einem *shift* hin zu einer verstärkten Differenzierung der NC-Tumorzellen führt. Zusätzlich wird das Wachstum der NC-Tumorzellen eingeschränkt.⁴⁸

In einer weiteren Studie von Beesley et al. wurde die Zytotoxizität verschiedener onkologischer Therapieoptionen verglichen. Dabei wurden drei Zelllinien mit BRD4-NUTM1 Translokation und zwei Zelllinien mit anderen Tumorentitäten verglichen. Alle Zelllinien stammten von minderjährigen Patienten. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Frage, wie sich die Reaktion dieser fünf Zelllinien auf verschiedenen Wirkstoffklassen darstellt. Verglichen werden 61 zytotoxische Substanzen aus 17 verschiedenen Wirkstoffklassen, bei einer fixen Dosis von 10 µM. Zu diesen Wirkstoffen zählen u.a. Vincristinsulfat, der Bromodomain-Inhibitor JQ1, Flavopiridol, Gemcitabine, Paclitaxel, Docetaxel, Etoposid, Methotrexat, Vorinostat, Topotecan, ... und viele weitere.

Daraus ergibt sich, dass Anthrazykline, Mikrotubuli-Inhibitoren, Topoisomerase-Inhibitoren und (*inhibitor of cyclin-dependent kinase*) CDK9 Flavopiridol eine ausgeprägte Zytotoxizität aufweisen. Damit können diese Wirkstoffe in der Zukunft als der Ausgangspunkt für die Verbesserung der NC-Therapie berücksichtigt werden.

Der Bromodomain-Inhibitor JQ1, Statine und der HDACi Wirkstoff Vorinostat weisen eine intermediäre Zytotoxizität auf.

Steroide und Steroid-Rezeptor-Antagonisten weisen hingegen eine geringe bis gar keine Zytotoxizität auf.²

Bei einer fünfunddreißigjährigen Patientin und einem dreizehnjährigen Patienten mit Diagnose eines NC-Tumors haben histologische Ergebnisse jeweils auf ein schlecht differenziertes bis undifferenziertes Karzinom hingedeutet. Diese zwei Beispiele haben Sun et al genutzt, um die Hypothese aufzustellen, dass das „NC-Karzinom das Ergebnis einer Hemmung der Tumorzellendifferenzierung in reife Plattenepithelzellen ist“ (Sun et al, 2015).⁵⁴

In dieser Studie wurde ein höheres Expressionsniveau von (*sex determining region Y-box 2*) Sox2, (*insulin-like growth factor-1 receptor*) IGF-1R, (*mammalian target of rapamycin*) mTOR, p-Akt und nukleäre Expression von c-Myc, Sirtuin 1 und (*enhancer of Zeste, homolog 2*) EZH2 in den undifferenzierten Tumorzellen in Vergleich zu Plattenepithelzellen nachgewiesen. Alle diese Komponenten spielen eine wesentliche Rolle in der Hemmung der Zelldifferenzierung bei NC-Karzinomen. Bezüglich dieses Parameters "Zelldifferenzierung" wurde die antitumorale Wirksamkeit der Wirkstoffe Curcumin, Metformin, Melatonin, Sulforaphane und Vorinostat evaluiert.⁵⁴

Derartige neuere Erkenntnisse und Ansätze sind für die weitere Entwicklung auf dem Gebiet der NC-Tumore von großer Bedeutung, so dass sich festhalten lässt, dass mit dieser Arbeit ein wichtiger Grundstein für die systematische Erfassung der Tübinger NC-Patienten gelegt werden konnte, der in den nächsten Jahren weiter ausgebaut, weiter differenziert und auch verstetigt werden muss.

Da parallel in der Abt. Medizinische Onkologie und Pneumologie umfangreiche präklinische Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der NC-Tumore angelaufen sind, ist der Aufbau der Tübinger NC-Kohorte bestens in ein Gesamt-Forschungskonzept eingebettet.

Aus diesen systematisch angelegten Forschungsarbeiten werden mit hoher Wahrscheinlichkeit neuartige Therapiekonzepte erwachsen, die den in jeder Hinsicht schwer betroffenen und teilweise ausgesprochen jungen NC-Patienten zu Gute kommen werden (*είναι ελπίδα*).

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich mit der Zusammenstellung und der Auswertung der Tübinger Erwachsenen-Kohorte an Mittellinienkarzinomen (NUT *midline carcinoma*) sowie mit dem Vergleich derselben mit der "Bostoner" Kohorte von Herrn Dr. C.A. French.

Das *Nuclear-protein-in-testis* (NUT) Mittellinienkarzinom ist eine seltene, jedoch sehr aggressive Krankheit mit einer Gesamtüberlebensdauer von lediglich 5-9 Monaten. NC-Tumore werden nach wie vor unterdiagnostiziert, häufig werden die Patienten erst in einem späten Stadium, wenn die Tumorerkrankung bereits sehr große Ausmaße angenommen hat und bereits disseminierte Metastasen vorliegen, vorgestellt.

Historisch betrachtet wurde diese Tumorerkrankung zuerst bei jungen Patienten bemerkt. Mit der Zeit wurde dann aber festgestellt, dass auch ältere Populationen betroffen sind. Heutzutage steht, trotz zahlreichen Studien, immer noch keine adäquate (wirksame) Therapie zur Verfügung.

Ziel dieser Arbeit war es, für das Universitätsklinikum Tübingen eine eigene Kohorte der hier vor Ort betreuten Patienten zu erstellen und zu charakterisieren. In Betracht gezogen wurden Patienten, die sich mindesten einmal in der Ambulanz der Abteilung Innere Medizin VIII, Medizinische Onkologie und Pneumologie, des Universitätsklinikums Tübingen vorgestellt haben bzw. an der Phase I Studie "An open label, Phase Ia/Ib dose finding study with BI 894999 orally administered once a day in patients with advanced malignancies with repeated administration in patients with clinical benefit (clinicaltrials.gov accession number: NCT02516553)" teilgenommen haben oder im Rahmen individualisierter Therapieansätze behandelt wurden.

Die eigenen Tübinger Ergebnisse wurden Punkt-für-Punkt mit den Ergebnissen einer Kohorte in Boston/USA, die von Dr. Christopher A. French und Mitarbeitern zusammengestellt und veröffentlicht wurde, verglichen. Dabei zeigten sich folgende Unterschiede zwischen diesen beiden Kohorten: Lediglich das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt in unserer zahlenmäßig noch sehr kleinen Kohorte deutlich höher. Weiter findet sich in unserer Kohorte häufiger eine mittlere Tumorgöße bei genau oder über 6 cm bei Diagnosestellung. In der Tübinger Kohorte sind Frauen deutlich seltener betroffen. Die häufigste initiale therapeutische Option in unserer Kohorte war Chirurgie, währenddessen in der Bostoner Kohorte ein minimaler Unterschied zwischen Chirurgie und Chemotherapie zu sehen war.

Diese Ergebnisse ermutigen zur weiteren Datensammlung und zur kontinuierlichen Vergrößerung unserer Tübinger NC-Kohorte, da die Informationen über diese Tumorerkrankung immer noch mangelhaft sind. Die verfügbare Behandlungsoptionen und die Ansprache des Tumors auf die unterschiedlichen Therapie-Regime sollten weiterhin beobachtet werden.

Von zentraler Bedeutung ist insbesondere auch der Aspekt, dass diese Tumorerkrankung in der Zukunft viel häufiger noch als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen werden muss, um frühzeitig intervenieren zu können und die Chancen auf eine Kuratation substantiell zu erhöhen.

6. Literaturverzeichnis

1. Bauer, D. E., Mitchell, C. M., Strait, K. M., Lathan, C. S., Stelow, E. B., Lüer, S. C., Muhammed, S., Evans, A. G., Sholl, L. M., Rosai, J., Giraldi, E., Oakley, R. P., Rodriguez-Galindo, C., London, W. B., Sallan, S. E., Bradner, J. E., French, C. A. (2012). *Clinicopathologic features and long-term outcomes of NUT midline carcinoma*. Clin Cancer Res, 18, 5773-5779.
2. Beesley, A. H., Stirnweiss, A., Ferrari, E., Endersby, R., Howlett, M., Failes, T. W., Arndt, G. M., Charles, A. K., Cole, C. H. & Kees, U. R. (2014). *Comparative drug screening in NUT midline carcinoma*. British journal of cancer, 110, 1189-1198.
3. Behjati, S., Tarpey, P. S. (2013). *What is next generation sequencing?* Arch Dis Child Educ Pract Ed, 98(6): 236–238.
4. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M. W. (2005). *Quantitative real-time RT-PCR-a perspective*. J Mol Endocrinol, 34(3):597-601
5. Bustin, S. A. (2000). *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 25(2):169-93.
6. Carter, T., Crook, M., Murch, A., Beesley, A. H., de Klerk, N., Charles, A., Kees, U. R. (2021). *Incidence of NUT carcinoma in Western Australia from 1989 to 2014: a review of pediatric and adolescent cases from Perth Children's Hospital*. BMC Cancer, 21(1):740.
7. Chaidos, A., Caputo V., Gouvedenou, K., Liu, B., Marigo, I., Chaudhry, M. S., Rotolo, A., Tough, D. F., Smithers, N. N., Bassil, A. K., Chapman, T. D., Harker, N. R., Barbash, O., Tummino, P., Al-Mahdi, N., Haynes, A. C., Cutler, L., LE, B., Rahemtulla, A., Roberts, I., Kleijnen, M., Witherington, J. J., Parr, N. J., Prinjha, R. K. & Karadimitris, A. (2014). *Potent antimyeloma activity of the novel bromodomain inhibitors I-BET151 and I-BET762*. Blood, 123, 697-705.
8. Chau, N. G., Ma, C., Danga, K., Al-Sayegh, H., Nardi, V., Barrette, R., Lathan, C. S., Dubois, S. G., Haddad, R. I., Shapiro, G. I., Sallan, S. E., Dhar, A., Nelson, J. J. & French, C. A. (2019). *An Anatomical Site and Genetic-Based Prognostic Model for Patients with Nuclear Protein in Testis (NUT) Midline Carcinoma: Analysis of 124 Patients*. JNCI Cancer Spectr, 4, pkz094.
9. Chau, N. G., Hurwitz, S., Mitchell, C.M., Aserlind, A., Grunfeld, N., Kaplan, L., His, P., Bauer, D. E., Lathan, C.S., Rodriguez-Galindo, C., Tishler, R. B., Haddad, R.

-
- I., Sallan, S. E., Bradner, J. E., French, C. A. (2016). *Intensive treatment and survival outcomes in NUT midline carcinoma (NMC) of the head and neck (HN)*. *Cancer*, 122, 3632-3640.
10. Clinicaltrials.gov. 2015. *BI 894999 First in Human Dose Finding Study in Advanced Malignancies* [Online]. ClinicalTrials.gov. Available: [Accessed 09.01.22].
11. Dang, T. P., Gazdar, A. F., Virmani, A. K., Sepetavec, T., Hande, K. R., Minna, J. D., Roberts, J. R. & Carbone, D. P. (2000). *Chromosome 19 Translocation, Overexpression of Notch3, and Human Lung Cancer*. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 92, 1355-1357.
12. Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T. & Ozato, K. (2003). *The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8758-8763.
13. Dickson, B. C., Sung, Y. S., Rosenblum, M. K., Reuter, V. E., Harb, M., Wunder, J. S., Swanson, D., & Antonescu, C. R. (2018). *NUTM1 Gene Fusions Characterize a Subset of Undifferentiated Soft Tissue and Visceral Tumors*. *The American journal of surgical pathology*, 42, 636–645.
14. Dong, X., HU, X., Chen, J., HU, D. & Chen, L. F. (2018). *BRD4 regulates cellular senescence in gastric cancer cells via E2F/miR-106b/p21 axis*. *Cell Death Dis*, 9, 203.
15. Doroshow, D. B., Eder, J. P. & LoRusso, P. M. (2017). *BET inhibitors: a novel epigenetic approach*. *Annals of Oncology*, 28, 1776-1787.
16. Eagen, K.P., French, C.A. (2021). *Supercharging BRD4 with NUT in carcinoma*. *Oncogene*, 40,1396–1408
17. Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwarz, B., Heightman, T. D., La Thangue, N., French, C. A., Wiest, O., Kung, A. L., Knapp, S. & Bradner, J. E. (2010). *Selective inhibition of BET bromodomains*. *Nature*, 468, 1067-1073

18. Fong, C. Y., Gilan, O., Lam, E. Y. N., Rubin, A. F., Ftouni, S., Tyler, D., Stanley, K., Sinha, D., YEH, P., Morison, J., Giotopoulos, G., Lugo, D., Jeffrey, P., Lee, S. C.-W., Carpenter, C., Gregory, R., Ramsay, R. G., Lane, S. W., Abdel-Wahab, O., Kouzarides, T., Johnstone, R. W., Dawson, S.-J., Huntly, B. J. P., Prinjha, R. K., Papenfuss, A. T. & Dawson, M. A. (2015). *BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells*. *Nature*, 525, 538-542.
19. French, C. A. (2018). *NUT Carcinoma: Clinicopathologic features, pathogenesis, and treatment*. *Pathol Int*, 68, 583-595.
20. French, C. A. (2016). *Chapter Two - Small-Molecule Targeting of BET Proteins in Cancer*. *Advances in Cancer Research*, 131, 21-58
21. French, C. A., Rahman, S., Walsh, E. M., Kühnle, S., Grayson, A. R., Lemieux, M. E., Grunfeld, N., Rubin, B. P., Antonescu, C. R., Zhang, S., Venkatramani, R., Dal Cin, P. & Howley, P. M. (2014). *NSD3-NUT fusion oncoprotein in NUT midline carcinoma: implications for a novel oncogenic mechanism*. *Cancer Discov.*, 4, 928-941.
22. French, C. A. (2013). *The importance of diagnosing NUT midline carcinoma*. *Head and neck pathology*, 7, 11–16.
23. French, C. A., Ramitez, C. L., Kolakova, J., Hickman, T. T., Cameron, M. J., Thyne, M. E., Kutok, J. L., Toretksy, J. A., Tadavarthy, A. K., Kees, U. R., Fletcher, J. A. & Aster, J. C. (2008). *BRD–NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells*. *Oncogene*, 27, 2237-2242.
24. French, C. A., Miyoshi, I., Kubonishi, I., Grier, H. E., Perez-Atayde, A. R. & Fletcher, J. A. (2003). *BRD4-NUT Fusion Oncogene: A Novel Mechanism in Aggressive Carcinoma*. *Cancer Research*, 63, 304-307.
25. French, C. A., Miyoshi, I., Aster, J. C., Kubonishi, I., Kroll, T. G., Dal Cin, P., Vargas, S. O., Perez-Atayde, A. R. & Fletcher, J. A. (2001). *BRD4 bromodomain gene rearrangement in aggressive carcinoma with translocation t(15;19)*. *The American Journal of Pathology*, 159, 1987-1992.
26. Fujita, S., Masago, K., Sasaki, E., Tsukushi, S., Horio, Y., Kuroda, H., Hida, T. (2021) *Weak-evidence Fusion Candidates Detected by a FusionPlex Assay Using the Ion Torrent System*. *In Vivo*, 35(2):993-998

27. Giridhar, P., Mallick, S., Kashyap, L. & Rath, G. K. (2018). *Patterns of care and impact of prognostic factors in the outcome of NUT midline carcinoma: a systematic review and individual patient data analysis of 119 cases*. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology, 275, 815-821.
28. Grayson, A. R., Walsh, E. M., Cameron, M. J., Godec, J., Ashworth, T., Ambrose, J. M., Aserlind, A. B., Wang, H., Evan, G., Kluk, M. J., Bradner, J. E., Aster, J. C. & French, C. A. (2014). *MYC, a downstream target of BRD-NUT, is necessary and sufficient for the blockade of differentiation in NUT midline carcinoma*. Oncogene, 33, 1736-1742.
29. Grosse, C., Grosse, A. (2021). *Challenging Diagnosis in NUT Carcinoma*. Int J Surg Pathol, 29, 722-725.
30. Haruki, N., Kawaguchi, K. S., Eichenberger, S., Massion, P. P., Gonzalez, A., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Carbone, D. P., Dang, T. P. (2005). *Cloned fusion product from a rare t (15;19) (q13.2; p13.1) inhibit S phase in vitro*. Journal of Medical Genetics, 42, 558-564.
31. Haack, H., Johnson, L. A., Fry, C. J., Crosby, K., Polakiewicz, R. D., Stelow, E. B., Hong, S. M., Schwartz, B. E., Cameron, M. J., Rubin, M. A., Chang, M. C., Aster, J. C., & French, C. A. (2009). *Diagnosis of NUT midline carcinoma using a NUT-specific monoclonal antibody*. The American journal of surgical pathology, 33(7), 984–991.
32. Huang, Q. W., He, L. J., Zheng, S., Liu, T., Peng, B. N. (2019). *An Overview of Molecular Mechanism, Clinicopathological Factors, and Treatment in NUT Carcinoma*. Biomed Res Int, 1018439.
33. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A. (2005). *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 6(4):279-84.
34. Jensen, E. (2014). *Technical review: In situ hybridization*. Anat Rec (Hoboken). 297(8):1349-53.
35. Jung, M., Kim, S., Lee, J. K., Yoon, S. O., Park, H. S., Hong, S. W., Park, W. S., Kim, J. E., Kim, J., Keam, B., Kim, H. J., Kang, H. J., Kim, D. W., Jung, K. C., Kim, Y. T., Heo, D. S., Kim, T. M., Jeon, Y. K. (2019) *Clinicopathological and Pre-clinical Findings of NUT Carcinoma: A Multicenter Study*. Oncologist. 24(8):e740-e748.

-
36. Liao, S., Maertens, O., Cichowski, K., Elledge, S. J. (2018). *Genetic modifiers of the BRD4-NUT dependency of NUT midline carcinoma uncovers a synergism between BETis and CDK4/6is*. *Genes Dev*, 32, 1188-1200.
 37. Maher, O. M., Christensen, A. M., Yedururi, S., Bell, D. & Tarek, N. (2015). *Histone deacetylase inhibitor for NUT midline carcinoma*. *Pediatric Blood & Cancer*, 62, 715-717.
 38. McNicol, A. M., Farquharson, M. A. (1997). *In situ hybridization and its diagnostic applications in pathology*. *J Pathol*, 182(3):250-61
 39. Mills, A. F., Lanfranchi, M., Wein, R. O., Mukand-Cerro, I., Pilichowska, M., Cowan, J., Bedi, H. (2014). *NUT Midline Carcinoma: A Case Report with a Novel Translocation and Review of the Literature*. *Head and Neck Pathol*, 8, 182–186.
 40. Morrison-Smith, C. D., Knox, T. M., Filic, I., Soroko, K. M., Eschle, B. K., Wilkens, M. K., Gokhale, P. C., Giles, F., Griffin, A., Brown, B., Shapiro, G. I., Zucconi, B. E., Cole, P. A., Lemieux, M. E. & French, C. A. (2020). *An Anatomical Site and Genetic-Based Prognostic Model for Patients with Nuclear Protein in Testis (NUT) Midline Carcinoma: Analysis of 124 Patients*. *JNCI Cancer Spectr* 19, 1406-1414.
 41. Napolitano, M., Venturelli, M., Molinaro, E. & Toss, A. (2019). *NUT midline carcinoma of the head and neck: current perspectives*. *OncoTargets and Therapy*, 12, 3235-3244.
 42. Ohne Verfasser, o. D. *About NUT Carcinoma*. Dana-Farber Cancer Institute.
 43. Ohne Verfasser, o. D. *NUT (C52B1) Rabbit mAb #3625*. Cell Signaling Technology.
 44. Piha-Paul, S. A., Hann, C. L., French, C. A., Cousin, S., Brana, I., Cassier, P. A., Moreno, V., De Bono, J. S., Harward, S. D., Ferron-Brady, G., Barbash, O., Wyce, A., Wu, Y., Horner, T., Annan, M., Parr, N. J., Prinjha, R. K., Carpenter, C. L., Hilton, J., Hong, D. S., Haas, N. B., Markowski, M. C., Dhar, A., O'Dwyer, P. J. & Shapiro, G. I. (2020). *Phase 1 Study of Molibresib (GSK525762), a Bromodomain and Extra-Terminal Domain Protein Inhibitor, in NUT Carcinoma and Other Solid Tumors*. *JNCI Cancer Spectr*, 4, pkz093.

-
45. Riess, J. W., Rahman, S., Kian, W., Edgerly, C., Heilmann, A. M., Madison, R., Ramkissoon, S. H., Klaitman, S. S., Chung, J. H., Trabucco, S. E., Jin, D. X., Alexander, B. M., Klempner, S. J., Albacker, L. A., Frampton, G. M., Roisman, L. C., Miller, V. A., Ross, J. S., Schrock, A. B., Gregg, J. P., Peled, N., Sokol, E. S., Ali, S. M. (2021). *Genomic profiling of solid tumors harboring BRD4-NUT and response to immune checkpoint inhibitors*. *Transl Oncol*, 14(10):101184
 46. Sakamaki, J.-I., Wilkinson, S., Hahn, M., Tasdemir, N., O'Prey, J., Clark, W., Hedley, A., Nixon, C., Long, J. S., New, M., Van Acker, T., Tooze, S. A., Lowe, S. W., Dikic, I. & Ryan, K. M. (2017). *Bromodomain Protein BRD4 Is a Transcriptional Repressor of Autophagy and Lysosomal Function*. *Molecular cell*, 66, 517-532.e9.
 47. Schaefer, I.-M., Dal Cin, P., Landry, L. M., Fletcher, C. D. M., Hanna, G. J. & French, C. A. (2018). *CIC-NUTM1 fusion: A case which expands the spectrum of NUT-rearranged epithelioid malignancies*. *Genes, chromosomes & cancer*, 57, 446-451.
 48. Schwarz, B. E., Hofer, M. D., Lemieux, M. E., Bauer, D. E., Cameron, M. J., West, N. H., Agoston, E. S., Reynoird, N., Khochbin, S., Ince, T. A., Christie, A., Janeway, K. A., Vargas, S. O., Perez-Atayde, A. R., Aster, J. C., Sallan, S. E., Kung, A. L., Bradner, J. E. & French, C. A. (2011). *Differentiation of NUT midline carcinoma by Epigenomic reprogramming*. *Cancer Res*, 71, 2686-2696.
 49. Shapiro, G. I., Dowlati, A., Lorusso, P. M., Eder, J. P., Anderson, A., Do, K. T., Kagey, M. H., Sirard, C., Bradner, J. E. & Landau, S. B. (2015). *Abstract A49: Clinically efficacy of the BET bromodomain inhibitor TEN-010 in an open-label sub-study with patients with documented NUT-midline carcinoma (NMC)*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14, A49.
 50. Stathis, A. & Bertoni, F. (2018). *BET Proteins as Targets for Anticancer Treatment*. *Cancer Discovery*, 8, 24-36.
 51. Stevens, T. M., Morlote, D., Xiu, J., Swensen, J., Brandwein-Weber, M., Miittinen, M. M., Gatalica, Z. & Bridge, J. A. (2019). *NUTM1-rearranged neoplasia: a multi-institution experience yields novel fusion partners and expands the histologic spectrum*. *Modern Pathology*, 32, 764-773.

52. Stirnweiss, A., McCarthy, K., Oommen, J., Crook, M. L., Hardy, K., Kees, U. R., Wilton, S. D., Anazodo, A. & Beesley, A. H. (2015). *A novel BRD4-NUT fusion in an undifferentiated sinonasal tumor highlights alternative splicing as a contributing oncogenic factor in NUT midline carcinoma*. *Oncogenesis*, 4, e174.
53. Storck, S., Kennedy, A. L., Marcus, K. J., Teot, L., Vaughn, J., Gnekow, A. K. (2017). *Pediatric NUT-midline carcinoma: Therapeutic success employing a sarcoma based multimodal approach*. *Pediatric Hematology and Oncology*, 231-237.
54. Sun, H., McGuire, M. F., Zhang, S., Brown, R. E. (2015). *NUT Midline Carcinoma: Morphoproteomic Characterization with Genomic and Therapeutic Correlates*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 692-701
55. Wang, X., Wang, J., Luo, X., Lu, J., Wang, L., Li, Q., Wang, E. H. (2021). *Diagnosis of NUT Carcinoma Despite False-Negative Next-Generation Sequencing Results: A Case Report and Literature Review*. *Onco Targets Ther*, 14:4621-4633.

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Abteilung Innere Medizin VIII des Universitätsklinikums Tübingen unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Ulrich M. Lauer durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Professor Dr. med. U. M. Lauer, Frau PD Dr. med. Ines Brecht und Herrn Dr. med. Tim Flaadt (letztere beide Mitarbeiter der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Tübingen, die die Kohorte der kindlichen und jugendlichen Kohorte an Mittellinienkarzinomen (NUT *midline carcinoma*) bearbeiten.

Die Datensammlung und Bearbeitung wurde von mir mit Unterstützung durch Professor Dr. med. U. M. Lauer und in Zusammenarbeit mit Herrn Claus Peter Rückerl, Studiendokumentar der Abteilung Innere Medizin VIII des Universitätsklinikums Tübingen, durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Professor Dr. med. U. M. Lauer durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig (nach Anleitung durch Professor Dr. med. Ulrich M. Lauer) verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 03.01.2023

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulrich M. Lauer für die Bereitstellung des besonders interessanten Themas, für die enorme Unterstützung, die hervorragende Betreuung und für das Korrekturlesen: ohne ihn wäre die Anfertigung meiner Dissertation nicht möglich gewesen.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Tim Flaadt meinen Dank aussprechen, der mich auf meinem Weg mit Rat und produktiven Gesprächen begleitet hat.

Großen Dank möchte ich auch an die gesamte Arbeitsgruppe der AG Lauer aussprechen: danke für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Kollegen für deren großzügigen Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Ehemann Apostolos, der meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte.