

**Identifikation und prognostische Bedeutung  
von varianten ALK-Fusionen beim pädiatrischen  
anaplastisch großzelligen Lymphom**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer  
Doktorin der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jette Lüdersen

aus

Hamburg

2024

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation:	Prof. Dr. Wilhelm Wößmann
Gutachter:in der Dissertation:	Prof. Dr. Francis Ayuketang Ayuk
Vorsitz der Prüfungskommission:	Prof. Dr. Francis Ayuketang Ayuk
Mitglied der Prüfungskommission:	PD Dr. Jasmin Wellbrock
Mitglied der Prüfungskommission:	PD Dr. Andrea Hinsch
Datum der mündlichen Prüfung:	12.06.2025

# Inhaltsverzeichnis

1. Darstellung der Publikation.....	4
1.1 Einleitung .....	4
1.2 Patient:innen und Methoden .....	6
1.2.1 Patient:innen .....	6
1.2.2 Material und Methoden .....	6
1.3 Ergebnisse .....	8
1.4 Diskussion .....	11
1.4.1 Häufigkeiten der varianten ALK-Fusionspartner .....	11
1.4.2 Molekulare Pathogenese der ALK-positiven ALCL.....	12
1.4.3 Prognosefaktoren beim pädiatrischen ALK-positiven ALCL .....	13
1.4.3.1 Prognostische Rolle der varianten ALK-Fusionspartner.....	13
1.4.3.2 Minimal disseminierte Erkrankung bei NPM1::ALK-positiven ALCL und die Anwendung bei ALCL mit varianten ALK-Fusionspartnern .....	15
1.5 Zusammenfassung .....	16
2. Originalarbeit .....	17
3. Zusammenfassung.....	22
3.1 Deutsch .....	22
3.2 Englisch .....	23
4. Literaturverzeichnis.....	24
5. Abkürzungsverzeichnis.....	29
6. Abbildungsverzeichnis.....	30
7. Tabellenverzeichnis .....	30
8. Erklärung des Eigenanteils .....	31
9. Eidesstattliche Versicherung .....	32
10. Danksagung .....	33

# 1. Darstellung der Publikation

## 1.1 Einleitung

ALK-positive anaplastisch großzellige Lymphome (Anaplastic large cell lymphoma, ALCL) gehören zu den reifen T-Zell-Lymphomen und machen 10-15 % der pädiatrischen Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) aus (Alaggio et al., 2022). Sie sind durch Translokationen unter Beteiligung des *ALK*-Gens auf Chromosom 2 charakterisiert. Die Translokation führt zur Entstehung von *ALK*-Fusionsgenen, welche maßgeblich an der Pathogenese des ALK-positiven ALCL beteiligt sind (Pulford et al., 2004b, Hallberg and Palmer, 2013). Mit einer kurzen, intensiven Polychemotherapie wird bei pädiatrischen Patient:innen ein ereignisfreies Überleben (event-free survival, EFS) von 70-75 % bzw. ein Gesamtüberleben (overall survival, OS) von 90-95 % erreicht (Seidemann et al., 2001, Brugières et al., 2009, Mussolin et al., 2020).

Bei der häufigsten Translokation t(2;5)(p23;q35) fusioniert *ALK* mit Nukleophosmin 1 (*NPM1*) (Morris et al., 1994). Neben *NPM1* sind bislang 14 weitere, sogenannte „variante“ *ALK*-Fusionspartner beim ALCL beschrieben (s. Tabelle 1). Immunhistochemisch lassen sich *NPM1::ALK*-Fusionen von varianten *ALK*-Fusionen anhand des ALK-Färbemusters unterscheiden (Pulford et al., 1997). In gemischten Kollektiven erwachsener und pädiatrischer Patient:innen wurde immunhistochemisch eine Häufigkeit von 15-25 % ALK-positiver ALCL mit varianten *ALK*-Fusionen geschätzt (Falini et al., 1999, Benharroch et al., 1998, Falini et al., 1998), während in kleinen pädiatrischen Kohorten ein Anteil von etwa 10 % beobachtet wurde (Perkins et al., 2005, Damm-Welk et al., 2009, Lamant et al., 2011). Es ist bisher unbekannt, ob spezifische variante *ALK*-Fusionspartner eine prognostische Bedeutung haben (Damm-Welk et al., 2015, Lamant et al., 2011, Falini et al., 1999).

Im Allgemeinen fusioniert beim ALK-positiven ALCL der 3'-Anteil des *ALK*-Gens mit dem 5'-Anteil eines Partnergens zu einem chimären *ALK*-Fusionsgen. Der *ALK*-Bruchpunkt liegt in den meisten Fällen im Intron 19 des *ALK*-Gens. Lediglich für *ALK*-Fusionen mit Myosin Heavy Chain 9 (*MYH9*) und Moesin (*MSN*) sind beim ALCL variierende *ALK*-Bruchpunkte beschrieben (Lamant et al., 2003, Tort et al., 2001).

Durch die Expression des *ALK*-Fusionsproteins wird die ALK-Tyrosinkinase konstitutiv aktiviert, was wiederum eine Reihe an Signalkaskaden auslöst, die entscheidend zur Pathogenese des ALK-positiven ALCL beitragen (Hallberg and Palmer, 2013, Falini, 2001, Duyster et al., 2001). In *in vitro* Untersuchungen wurden Unterschiede hinsichtlich der Transformationskapazität der Tumorzellen oder des Ausbreitungspotentials zwischen den varianten *ALK*-Partnergenen beschrieben (Armstrong et al., 2004, Armstrong et al., 2007).

TABELLE 1: ALK-Fusionspartner bei ALK-positiven ALCL

ALK-Partnergen	Fusion	Chromosomale Translokation	ALK-Färbung	Referenz
Nucleophosmin 1 ( <i>NPM1</i> )	<i>NPM1::ALK</i>	t(2;5)(p23;q35)	zytoplasmatisch und nukleär	(Morris et al., 1994)
5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/cyclohydrolase ( <i>ATIC</i> )	<i>ATIC::ALK</i>	inv(2)(p23;q35)	zytoplasmatisch	(Wlodarska et al., 1998, Trinei et al., 2000, Ma et al., 2000, Colleoni et al., 2000)
TRK-fused gene ( <i>TFG</i> )	<i>TFG::ALK</i>	t(2;3)(p23;q21)	zytoplasmatisch	(Rosenwald et al., 1999, Hernández et al., 1999)
Clathrin heavy chain ( <i>CLTC</i> )	<i>CLTC::ALK</i>	t(2;17)(p23;q23)	zytoplasmatisch (granulär)	(Touriol et al., 2000, Cools et al., 2002)
Tropomyosin 3 ( <i>TPM3</i> )	<i>TPM3::ALK</i>	t(1;2)(q21;p23)	zytoplasmatisch	(Rosenwald et al., 1999, Lamant et al., 1999)
Tropomyosin 4 ( <i>TPM4</i> )	<i>TPM4::ALK</i>	t(2;19)(p23;p13)	zytoplasmatisch	(Lawrence et al., 2000) <sup>1</sup> , (Liang et al., 2004)
Myosin heavy chain 9 ( <i>MYH9</i> )	<i>MYH9::ALK</i>	t(2;22)(p23;q11.2)	zytoplasmatisch	(Lamant et al., 2003)
Moesin ( <i>MSN</i> )	<i>MSN::ALK</i>	t(X;2)(q11-12;p23)	zytoplasmatisch (membranständig)	(Tort et al., 2001)
Ring finger protein 213 ( <i>RFN213</i> )	<i>RFN213::ALK</i>	t(2;17)(p23;q25)	zytoplasmatisch	(Cools et al., 2002)
TNF receptor associated factor 1 ( <i>TRAF1</i> )	<i>TRAF1::ALK</i>	t(2;9)(p23;q33.2)	zytoplasmatisch	(Feldman et al., 2013)
Eucariotic translation elongation factor 1 gamma ( <i>EEF1G</i> )	<i>EEF1G::ALK</i>	t(2;11)(p23;q12.3)	zytoplasmatisch	(Palacios et al., 2017)
Poly(A) binding protein cytoplasmic 1 ( <i>PABPC1</i> )	<i>PABPC1::ALK</i>	t(2;8)(p23;q22)	zytoplasmatisch	(Graetz et al., 2019)
SATB homeobox 1 ( <i>SATB1</i> )	<i>SATB1::ALK</i>	t(2;3)(p23,2;p24,3)	zytoplasmatisch und nukleär	(Drieux et al., 2021) <sup>2</sup> , (Kalinova et al., 2024)
Sequestosome 1 ( <i>SQSTM1</i> )	<i>SQSTM1::ALK</i>	t(2;5)(p23,1;q35,3)	zytoplasmatisch	(Takeuchi et al., 2011) <sup>3</sup> , (Kalinova et al., 2024)
Cell cycle associated protein 1 ( <i>CAPRIN1</i> )	<i>CAPRIN1::ALK</i>	t(2;11)(p23,2;p13)	zytoplasmatisch	(Kalinova et al., 2024)
RAN binding protein 2 ( <i>RANBP2</i> )	<i>RANBP2::ALK</i>	t(2;2)(p23;q13)	Kernmembran	(Ma et al., 2003) <sup>1</sup>
Exportin 1 ( <i>XPO1</i> )	<i>XPO1::ALK</i>	t(2;2)(p23;p15)	zytoplasmatisch	siehe diese Arbeit

<sup>1</sup>in inflammatorischen myofibroblastischen Tumor (IMT), <sup>2</sup> in peripheren T-Zell-Lymphom (PTCL), <sup>3</sup> in großzelligen B-Zell-Lymphom (LBCL)

Das Ziel dieser populationsbasierten Kohortenstudie war es, die Fusionspartnergene varianter *ALK*-Fusionen innerhalb einer Kohorte von 316 Kindern und Jugendlichen mit *ALK*-positiven ALCL zu identifizieren, die Häufigkeit der einzelnen Varianten zu beschreiben und ihre prognostische Bedeutung zu untersuchen. Alle Patient:innen waren in die ALCL99-Studie oder das NHL-BFM-Register 2012 eingeschlossen und wurden nach vergleichbaren Therapieprotokollen behandelt (Seidemann et al., 2001, Brugières et al., 2009).

Diese Dissertationsschrift stellt zusätzlich zur Kurzdarstellung eine Ergänzung und Vertiefung der Originalpublikation dar.

## **1.2 Patient:innen und Methoden**

### **1.2.1 Patient:innen**

Zwischen Januar 2000 und Dezember 2017 wurden 316 pädiatrische Patient:innen in Österreich, Tschechien, Deutschland und der Schweiz mit einem referenzpathologisch bestätigten *ALK*-positiven ALCL diagnostiziert und in die ALCL99-Studie oder das NHL-BFM-Register 2012 eingeschlossen. Bei 267 Patient:innen wurde eine *NPM1::ALK*-Fusion immunhistochemisch durch eine zytoplasmatische und nukleäre *ALK*-Färbung mit dem *ALK1*-Antikörper oder durch eine Dual-Color Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) für *NPM1* und *ALK* nachgewiesen. 49 Patient:innen zeigten eine ausschließlich auf das Zytoplasma beschränkte *ALK*-Färbung als Hinweis auf das mögliche Vorliegen eines varianten *ALK*-Fusionsgens. Geeignetes Tumormaterial für weitere molekulargenetische Analysen zum Nachweis des varianten *ALK*-Partnergens war für 41 der 49 Patient:innen verfügbar. Die *ALK*-Partnergene von sechs der in dieser Arbeit beschriebenen Patient:innen wurden bereits in früheren Arbeiten veröffentlicht (Damm-Welk et al., 2009, Krumbholz et al., 2018).

### **1.2.2 Material und Methoden**

Die Tumor-DNA wurde aus gefrorenen oder Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten (FFPE) Tumorproben mit dem QIAamp DNA- oder AllPrep DNA/RNA FFPE-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Verfügbare Tumor-RNA wurde mit Trizol™-Reagenz extrahiert. Anschließend wurde komplementäre DNA (cDNA) mit SuperScript™ II (Thermo

Fisher, Darmstadt, Deutschland) unter Verwendung von 1 µg Gesamt-RNA und zufälligen Hexameren (MERCK; Darmstadt, Deutschland) hergestellt.

Die extrahierten Tumor-DNA-Proben wurden hinsichtlich ihrer Quantität und Qualität durch die Messung der DNA-Konzentration und der DNA-Fragmentlängen getestet. Die DNA-Konzentrationen wurden mit dem Qubit dsDNA HS Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) untersucht. Die DNA-Fragmentlänge wurde mit dem D1000 Screen Tape® auf einem TapeStation-System (Agilent, Santa Clara, CA, USA) gemessen und bei Fragmentlängen > 300 Basenpaare (bp) nach dem Zufallsprinzip mit einem Bioruptor Sonication System (Bioruptor NGS UCD-600, Diagenode, Seraing (Ougrée), Belgien) geschert, um eine durchschnittlich Fragmentlänge von 200-300 bp sicherzustellen.

Anschließend wurde eine Sequenzierung mittels Genomic Capture High Throughput Sequencing (gcHTS) durchgeführt. Hierfür wurde der auf degradierte DNA-Proben angepasster gcHTS-Ansatz xGen™ cfDNA & FFPE DNA Library Prep MC Kit v2 (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgien) verwendet. Die Vorbereitung der zu sequenzierenden DNA-Bibliotheken erfolgte gemäß dem Protokoll „xGen™ cfDNA & FFPE DNA Library Prep Protocol“ (Integrated DNA Technologies Leuven) unter Verwendung von 60-250 ng fragmentierter DNA für die Einzelbibliotheken. Vier Einzelbibliotheken wurden dabei mit jeweils bis zu 500 ng nach Masse gepoolt. Die anschließende Hybridisierung und das Capturing erfolgten mit dem xGen™ Hybridisierungs- und Waschkit und den xGen™ Universal Blockers, gemäß dem Protokoll „xGen hybridization capture of DNA libraries Protocol Version 4“ (Integrated DNA Technologies, Leuven). Für die Anreicherung der Zielsequenzen wurden xGen™ Lockdown Probe Pools mit *NPM1*- und *ALK*-spezifische Capture-Sonden verwendet, welche alle Exons von *NPM1* und *ALK* sowie die intronischen Sequenzen der *NPM1*- und die *ALK*-Bruchpunkt-Regionen abdecken. Die genomischen Koordinaten (hg38) sind (171405292 - 171406745) für *NPM1* und (29920565 - 29193332) für *ALK*. Die finale Aufkonzentration der gepoolten Bibliotheken erfolgte nach dem Bead-basierten Ansatz gemäß Anhang A des o.g. Protokolls, wobei die Hybridisierung über 16 Stunden bei 65 °C durchgeführt wurde. Die anschließende Sequenzierung der gepoolten Bibliotheken erfolgte mit dem MiSeq-System unter Verwendung eines MiSeq Reagent Micro Kit V2 oder MiSeq Reagent Nano Kit V2 mit 300 Zyklen (Illumina, San Diego, CA, USA). Je 10 pm der denaturierten und verdünnten Bibliothek wurden nach den Angaben des „MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide“ (Illumina) für die Sequenzierung verwendet, wobei während des Prozesses 10 % PhiX (Illumina, San Diego, CA, USA) hinzugefügt wurde. In fünf Fällen erfolgte die Sequenzierung mittels eines zuvor veröffentlichten Panels (Zur Stadt et al., 2019), unter zusätzlicher Verwendung von Capture-Sonden für Chromosom 2 (*ALK*). Die Vorbereitung der Bibliotheken, Anreicherung und Sequenzierung wurde hierfür mit einem NextSeq 550-System durchgeführt, wie von Möker et al. beschrieben (Möker et al., 2022).

Die Analyse der Sequenzierungsdaten erfolgte mithilfe der Open-Source-Software Segemehl zur Identifikation von *ALK*-spezifischen genomischen Bruchstellen und Sequenzen der Fusionsgene (Hoffmann et al., 2014). Anschließend erfolgte die weitere Analyse der Genfusionen und der genomischen Bruchpunkte wie zuvor beschrieben (Zur Stadt et al., 2016, Zur Stadt et al., 2019, Hoffmann et al., 2014). Die angegebenen genomischen Koordinaten für *NPM1*, *ALK* und der varianten Fusionspartnergene beziehen sich dabei auf die Version hg38 des humanen Referenzgenoms.

War eine Sequenzierung mittels gCHTS nicht durchführbar, wurden bereits vorhandene Daten zu den Partnergenen verwendet. Hierfür wurde in acht Fällen eine reverse Transkriptase (RT)-PCR, in drei Fällen eine 5'-Rapid Amplification of cDNA-Ends (5'-RACE)-PCR (Damm-Welk et al., 2009) und in einem Fall eine RNA-Sequenzierung durchgeführt (Kalinova et al., 2024).

Für die statistische Auswertung wurde für die univariante Analyse der Wilcoxon-Test für quantitative Variablen und der exakte Test von Fisher für qualitative Variablen verwendet. Bei hinreichend großen Häufigkeiten wurde der  $\chi^2$ -Test angewandt. Das EFS wurde vom Tag der Diagnose bis zum Tag der letzten Nachuntersuchung oder dem Tag des ersten Ereignisses berechnet. Als Ereignis galten ein Rückfall, Zweitmalignom oder der Tod. Das Überleben wurde vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Tod oder der letzten Nachuntersuchung berechnet. Die entsprechenden Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden anhand der Kaplan-Meier-Methode mit Standardfehlern nach Greenwood geschätzt und mit dem Log-Rank-Test verglichen. Die Berechnungen erfolgte mit dem Programm SAS (Statistical Analysis System Version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC).

### 1.3 Ergebnisse

Bei 23 der 41 untersuchbaren Tumorproben konnte FFPE-Tumor-DNA erfolgreich mittels gCHTS analysiert werden. In 11 Fällen kamen PCR-basierte Ansätze zum Einsatz und in einem Fall wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Insgesamt 9 Tumorproben wurden sowohl mittels gCHTS als auch PCR-basiert untersucht (s. Tabelle 2).

13 Tumorproben wiesen eine *NPM1::ALK*-Fusion auf. Von diesen war in sechs Fällen Material für eine zweite ALK-Färbung mit dem sensitiveren ALK-Antikörper D5F3 (rabbit monoclonal, Cell Signaling Technologies) verfügbar, womit in allen sechs Fällen eine nukleäre ALK-Expression dargestellt werden konnte.

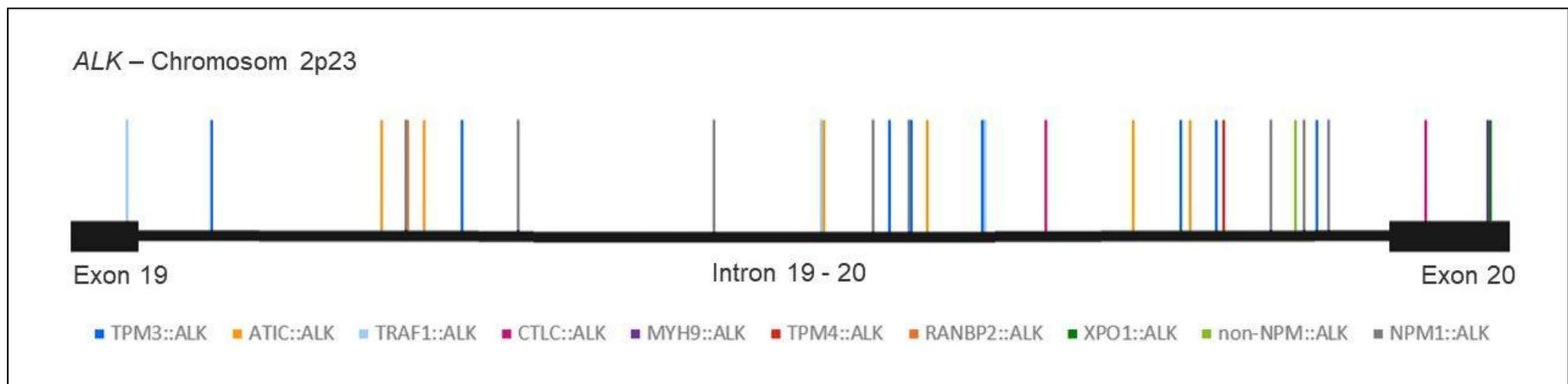
TABELLE 2: Bruchpunkte in *ALK* und dem Partnergen, identifiziert mit gcHTS (s. Supplements der Originalarbeit, Tabelle 2)

Variantes Partnergen	Zusätzliche Methode	Lokalisation des Bruchpunktes (Variante)	Lokalisation des Bruchpunktes ( <i>ALK</i> )	Chromosom (Variante)	Bruchpunkt (Variante)	Chromosom ( <i>ALK</i> )	Bruchpunkt ( <i>ALK</i> )
TPM3		Intron 9-10	Intron 19-20	1	154166854	2	29223849
TPM3	RT-PCR	Exon 10 (3' untranslatierte Region)	Intron 19-20	1	154167427	2	29225347
TPM3		Exon 10 (3' untranslatierte Region)	Intron 19-20	1	154165499	2	29223639
TPM3		Exon 10 (3' untranslatierte Region)	Intron 19-20	1	154166232	2	29223794
TPM3		Exon 10 (3' untranslatierte Region)	Intron 19-20	1	154167663	2	29224298
TPM3		Exon 10 (3' untranslatierte Region)	Intron 19-20	1	154161266	2	29224155
TPM3		3' downstream Region	Intron 19-20	1	154157797	2	29224266
TPM3		3' downstream Region	Intron 19-20	1	154158262	2	29224962
ATIC	RT-PCR	Intron 7-8	Intron 19-20	2	215331017	2	29223922
ATIC		Intron 7-8	Intron 19-20	2	215332270	2	29224399
ATIC		Intron 7-8	Intron 19-20	2	215327715	2	29225020
ATIC	RT-PCR	Intron 7-8	Intron 19-20	2	215331722	2	29224240
ATIC		Intron 7-8	Intron 19-20	2	215327191	2	29225085
ATIC	RT-PCR	Intron 7-8	Intron 19-20	2	215328243	2	29223836
TRAF1	RT-PCR	Intron 6-7	Intron 19-20	9	120909980	2	29224152
TRAF1	RACE-PCR, RT-PCR	Intron 6-7	Intron 19-20	9	120911119	2	29224402
TRAF1		Intron 6-7	Exon 19	9	120909893	2	29225477
CLTC	RT-PCR	Intron 31-32	Exon 20	17	59693548	2	29223472
CLTC		Intron 31-32	Intron 19-20	17	59692253	2	29224056
MYH9	RACE PCR, RT-PCR	Intron 32-33	Exon 20	22	36289013	2	29223374
RANBP2		Intron 18-19	Intron 19-20	2	108759504	2	29225045
TPM4		Intron 7-8	Intron 19-20	19	16096926	2	29223783

Variantes Partnergen	Zusätzliche Methode	Lokalisation des Bruchpunktes (Variante)	Lokalisation des Bruchpunktes (ALK)	Chromosom (Variante)	Bruchpunkt (Variante)	Chromosom (ALK)	Bruchpunkt (ALK)
XPO	RACE-PCR, RT-PCR	Intron 16-17	Exon 20	2	61490716	2	29223373
non NPM1		-	Intron 19-20	4	106782680	2	29223672
NPM1		Intron 4-5	Intron 19-20	5	171392328	2	29225048
NPM1		Intron 4-5	Intron 19-20	5	171391856	2	29223622
NPM1		Intron 4-5	Intron 19-20	5	171392421	2	29224568
NPM1		Intron 4-5	Intron 19-20	5	171391852	2	29223710
NPM1		Intron 4-5	Intron 19-20	5	171391992	2	29223659
NPM1		Intron 4-5	Intron 19-20	5	171392278	2	29224268
NPM1		Intron 4-5	Intron 19-20	5	171392653	2	29224875
NPM1		Intron 4-5	Intron 19-20	5	171392222	2	29224323

gCHTS: genomic capture high throughput sequencing, RT-PCR: reverse transcriptase PCR, RACE-PCR: rapid amplification of cDNA ends; genomische Koordinaten beziehen sich auf hg38 des humanen Referenzgenoms

ABBILDUNG 1: ALK-Bruchpunkte identifiziert mit gCHTS



Bei 28 Tumorproben (9 % der 316 Patient:innen) konnte ein varianter *ALK*-Fusionspartner detektiert werden. Hierunter waren 9 *TPM3::ALK* (32 %), acht *ATIC::ALK* (28 %), drei *TRAF1::ALK* (11 %), zwei *CLTC::ALK* (7 %), zwei *MYH9::ALK* (7 %) und jeweils einmal *TPM4::ALK*, *RANPB2::ALK* und *XPO1::ALK*. In einem Fall konnte das variante Partnergen nicht identifiziert werden, *NPM1* konnte jedoch als Fusionspartner ausgeschlossen werden. Die klinischen Merkmale der 28 Patient:innen mit varianten *ALK*-Partnergenen sind in den Supplements der Originalarbeit in Tabelle 3 aufgeführt und zeigten insgesamt keine signifikanten Unterschiede zu den 280 *NPM1::ALK*-positiven ALCL hinsichtlich Geschlecht, Alter, Stadium, Knochenmark- und ZNS-Beteiligung sowie dem histologischen Subtyp.

Das 5-Jahres-EFS betrug  $69 \pm 3 \%$  für ALCL-Patient:innen mit Variante::*ALK* und  $75 \pm 8 \%$  für *NPM1::ALK*-positive ( $p = 0,39$ , siehe Abbildung 2A der Originalarbeit). Das Gesamtüberleben nach 5 Jahren betrug  $100 \%$  für Variante::*ALK* und  $92 \pm 2 \%$  für *NPM1::ALK* ( $p = 0,13$ ). Bei Patient:innen mit *TPM3::ALK*-positivem ALCL wurde innerhalb von 5 Jahren kein Ereignis verzeichnet (EFS  $100 \pm 0 \%$ ), wohingegen beim zweithäufigsten varianten Fusionspartner *ATIC* innerhalb von 5 Jahren fünf Rezidive beobachtet wurden (EFS  $50 \pm 18 \%$ ;  $p = 0,24$ , s. Abbildung 2B der Originalarbeit). Ein weiteres Rezidiv trat bei einem *ATIC::ALK*-positiven Fall 12 Jahre nach der Erstdiagnose auf.

## 1.4 Diskussion

### 1.4.1 Häufigkeiten der varianten *ALK*-Fusionspartner

In dieser Arbeit lag bei 32 % der *ALK*-positiven ALCL mit ausschließlich zytoplasmatischer *ALK*-Färbung eine *NPM1::ALK*-Fusion vor. Bereits in früheren Arbeiten wurden *NPM1::ALK*-Fusionen bei einem beträchtlichen Anteil der ALCL-Patient:innen ohne nukleäre *ALK*-Färbung nachgewiesen (Falini et al., 1999). Die ausbleibende nukleäre Färbung könnte durch eine Variation der *NPM1::ALK*-Expression zwischen den ALCLs und die dadurch nur geringe nukleäre Expression in manchen Fällen erklärt werden, welche ggf. mit dem *ALK1*-Antikörper nicht detektiert werden kann, sondern den sensitiveren *ALK*-Antikörper D5F3 zur Detektion benötigt. Darüber hinaus könnte die *ALK*-Färbung bei *NPM1::ALK*-Fusionen ohne nukleäre Färbung methodenbedingt bei unzureichender Fixierung des Gewebes und unzureichender Antigengewinnung beeinträchtigt sein. Bei ausschließlich zytoplasmatischer *ALK*-Expression sollte daher eine *NPM1::ALK*-Fusion durch molekulare Ansätze ausgeschlossen werden.

In unserer Studie konnte bei 28 Tumorproben eine variante *ALK*-Fusion detektiert werden. Unter Berücksichtigung der acht Tumorproben, die nicht hinsichtlich ihres *ALK*-Fusionspartners untersucht werden konnten, beträgt der Anteil varianter *ALK*-Fusionen innerhalb unserer Kohorte maximal 11,4 %, wahrscheinlich jedoch weniger. Dies deckt sich mit dem zuvor beschriebenen Anteil von ca. 10 % varianten *ALK*-Fusionspartnern (Perkins et al., 2005, Damm-Welk et al., 2009, Lamant et al., 2011). Die Ergebnisse unserer populations-basierten Kohortenstudie weisen dabei auf einen geringeren Anteil von *TPM3::ALK* hin, als bislang angenommen (Stein et al., 2000, Damm-Welk et al., 2009), bei einem vergleichbar großen Anteil von *AT1C::ALK*.

Kalinova et al. ermittelten einen größeren Anteil varianter *ALK*-Fusionen bei *ALK*-positiven ALCL-Patient:innen (Kalinova et al., 2024). Bei isolierter Betrachtung der 55 pädiatrischen Patient:innen dieser Studie lag bei acht Patient:innen resp. 15 % eine variante *ALK*-Fusion vor, wovon *AT1C* und *TPM3* die häufigsten varianten Fusionspartner waren, was wiederum mit den Ergebnissen unserer Studie korreliert.

In je einem Fall detektierten wir *RANBP2* und *XPO1* als Fusionsgene von *ALK*.

Bislang war *RANBP2* nicht als Fusionspartner beim *ALK*-positiven ALCL bekannt. Die *RANBP2::ALK*-Fusion wurde zuvor nur bei inflammatorischen myofibroblastischen Tumoren (IMT) (Ma et al., 2003, Patel et al., 2007, Mariño-Enríquez et al., 2011) und in seltenen Fällen bei verschiedenen Formen monozytärer myeloischer Leukämien beschrieben (Röttgers et al., 2010, Maesako et al., 2014, Lim et al., 2014, Murakami et al., 2018, Hergott et al., 2023).

*XPO1* wurde bislang nicht als *ALK*-Partnergen veröffentlicht. Es weist einige, insbesondere für die Pathogenese bedeutsame, besondere Merkmale auf, die bisher nur bei den *ALK*-Fusionen mit *MYH9* und *MSN* beschrieben wurden (Lamant et al., 2003, Tort et al., 2001). Der Bruchpunkt in *ALK* liegt bei diesen Fusionen im Exon 20 und nicht im Intron 19-20 lokalisiert, wie bei den meisten anderen bekannten *ALK*-Fusionen (s. Tabelle 2).

### **1.4.2 Molekulare Pathogenese der *ALK*-positiven ALCL**

Die Translokation des *ALK*-Gens ist ein zentraler Mechanismus in der Pathogenese der *ALK*-positiven ALCL. Durch die Fusion wird das *ALK*-Fusionsgen unter die Kontrolle des Promoters des Partnergens gestellt. Viele Fusionspartner teilen die Eigenschaft einer hohen Expression in lymphatischen Geweben, sodass eine permanente Transkription des Fusionsgens mit konsekutiver Expression des Fusionsproteins stattfindet (Stein et al., 2000, Pulford et al., 2004a, Hallberg and Palmer, 2013). Die Fusionspartner besitzen in der Regel die Fähigkeit zur Oligomerisierung, welche die Ligandenbindung an *ALK* imitiert und somit zur konstitutiven Aktivierung der *ALK*-Tyrosinkinase-

domäne führt (Bischof et al., 1997, Duyster et al., 2001, Pulford et al., 2004a, Falini, 2001). Die Aktivierung der ALK-Tyrosinkinase führt wiederum zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, u.a. über Phospholipase C $\gamma$ , PI3K-AKT, JAK-STAT, mTOR und weitere, die insbesondere das Zellwachstum, die Zelltransformation und die antiapoptotische Signalübertragung beeinflussen und dadurch wesentlich zur Pathogenese des ALK-positiven ALCL beitragen (Hallberg and Palmer, 2013, Falini, 2001, Duyster et al., 2001).

Auch bei der bisher nicht beim ALCL beobachteten *RANBP2::ALK*-Fusion vermittelt die intakte Leucin-Zipper-Domäne des RANBP2 wahrscheinlich eine Oligomerisierung (Mariño-Enríquez et al., 2011, Maesako et al., 2014). Eine vermehrte ALK-Expression und Phosphorylierung in *RANBP2::ALK*-positiven Fällen myeloider Neoplasien legt die Vermutung nahe, dass die verschiedenen zellulären Signalwege analog zu den bekannten Pathomechanismen anderer *ALK*-Fusionen durch das ektope *RANBP2::ALK*-Fusionsprotein aktiviert werden (Röttgers et al., 2010).

Im Gegensatz zu den meisten anderen *ALK*-Partner-Proteinen, hat das von *XPO1* kodierte Protein Exportin 1 keine Oligomerisierungsdomäne. Dies trifft auch auf die *ALK*-Fusionspartner *MYH9* und *MSN* zu, sodass der genaue Mechanismus der Aktivierung von *ALK* durch die drei Fusionsproteine *XPO1::ALK*, *MYH9::ALK* und *MSN::ALK* noch ungeklärt ist (Pulford et al., 2004a). Möglicherweise stellt hier die Multimerisierung mit weiteren Proteinen eine ausreichend enge räumliche Nähe her, sodass über Kreuzphosphorylierung die konstitutive Aktivierung der *ALK*-Kinasedomäne erfolgt (Lamant et al., 2003, Tort et al., 2001).

### **1.4.3 Prognosefaktoren beim pädiatrischen ALK-positiven ALCL**

#### **1.4.3.1 Prognostische Rolle der varianten *ALK*-Fusionspartner**

In dieser Studie waren die klinischen und histopathologischen Daten für Patient:innen mit *Variante::ALK* insgesamt vergleichbar zu denen mit *NPM1::ALK* (s. Supplements der Originalarbeit, Tabelle 3), was sich mit vorherigen Veröffentlichungen auf Grundlage des *ALK*-Färbemusters deckt (Lamant et al., 2011). Den speziellen Fusionspartnern von *ALK* wird bisher keine prognostische Bedeutung zugeschrieben (Lamant et al., 2011). Das 5-Jahre-EFS unterschied sich zwischen ALCL mit *NPM1::ALK* oder *Variante::ALK* auch in unserer Studie nicht (s. Abbildung 2A der Originalarbeit). Die Beobachtung von vermehrten Rezidiven bei Patient:innen mit *AT1C::ALK* gegenüber *TPM3::ALK* und den übrigen *Variante::ALK* war zwar aufgrund der geringen Fallzahlen statistisch nicht signifikant, deutet aber dennoch auf Unterschiede in der Onkogenese und im Therapieansprechen zwischen den verschiedenen varianten *ALK*-Fusionspartnern hin.

Insgesamt ist die spezielle Pathogenese der ALCL mit varianten *ALK*-Fusionen aufgrund der geringen Fallzahlen kaum untersucht. Alle *ALK*-Fusionspartner haben jedoch gemeinsam, dass die Transkription des Fusionsproteins über den Promotor des *ALK*-Partnerproteins gesteuert wird (Bischof et al., 1997, Palmer et al., 2009). Die für die Onkogenese entscheidende Autophosphorylierung und somit Aktivierung der *ALK*-Kinasedomäne wird in der Regel durch das *ALK*-Partnerprotein initiiert, wobei die verschiedenen *ALK*-Fusionsproteine anhand ihrer speziellen Eigenschaften, wie z.B. ihrer subzelluläre Lokalisierung, der Proteinstabilität oder spezifischer Substratinteraktionen unterschiedliche Signalwirkungen in unterschiedlicher Intensität auslösen (Barreca et al., 2011, Hallberg and Palmer, 2013).

*In vitro* Studien spiegelten das in unserer Studie beobachtete günstigere Outcome für *TMP3::ALK*-positive ALCL gegenüber *ATIC::ALK*-positiven ALCL überwiegend nicht wieder. So wiesen *TPM3::ALK*-exprimierende Zellen *in vitro* eine wesentlich höhere Migrations- und Invasionsfähigkeit sowie ein erhöhtes Metastasierungspotenzial im Vergleich zu anderen *ALK*-Fusionspartnern auf (Armstrong et al., 2004, Armstrong et al., 2007). Die Proliferationsrate der transfizierten NIH3T3-Zellen korrelierte dabei mit dem Fusionsproteingehalt, mit Ausnahme von *TPM3::ALK*-exprimierenden Zellen, bei denen die Proliferationsrate umgekehrt proportional zum Proteingehalt war (Armstrong et al., 2004). In der Untersuchung der Genexpressionsprofile von *NPM1::ALK*- und *TPM3::ALK*-positiven Tumoren konnten insbesondere Unterschiede in der Regulation von Genen beobachtet werden, die an der Organisation des Zytoskeletts und der Zell-expression beteiligt sind und somit zu einem Phänotyp mit erhöhtem Metastasierungspotential bei *TPM3::ALK*-positiven Tumoren beitragen könnten (Bohling et al., 2008). Van der Krogt et al. konnten in ihrer Arbeit einen Kopienanzuwachs der rearrangierten *ALK*-Fusionsgene feststellen, welcher bei der *NPM1::ALK*-Fusion nicht auftrat. Zudem zeigten *ATIC::ALK*-exprimierende Zellen *in vitro* ein niedrigeres Expressionslevel, eine langsamere Transformationsrate sowie ein langsames Wachstum gegenüber *NPM1::ALK*-positiven Zellen, sodass vermutet wird, dass die transformierenden Eigenschaften der *Variante::ALK* geringer sein könnten als die von *NPM1::ALK* (van der Krogt et al., 2017). Insgesamt führte die Studie zu der Annahme, dass durch *Variante::ALK* angetriebene Lymphome eine erhöhte Dosis des *ALK*-Hybridgens benötigen, um die relativ geringe Expression und Signalwirkung der *Variante::ALK* zu kompensieren. Im Gegensatz dazu konnten Armstrong et al. *in vitro* eine unterschiedlich starke Aktivierung des Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) in *Variante::ALK*-positiven Zellen beobachten, wobei die stärkste Phosphorylierung von STAT3 in *ATIC::ALK*-positiven Zellen auftrat (Armstrong et al., 2004). Eine starke Aktivierung von STAT3 könnte zu einem aggressiveren klinischen Verlauf beitragen.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser *in vitro* Studien darauf hin, dass die Rolle des *ALK*-Fusionspartners an der Onkogenese über die *ALK*-Kinaseaktivierung hinaus geht und die Eigenschaften des

*Variante::ALK*-Fusionsproteins dabei von den Eigenschaften des Fusionspartners beeinflusst werden. Unterschiede in der Pathogenese der verschiedenen *ALK*-Fusionspartner könnten wiederum Unterschiede in der Chemosensitivität und in der Empfindlichkeit gegenüber *ALK*-Tyrosinkinaseinhibitoren verursachen. *In vitro* konnte eine unterschiedliche Empfindlichkeit *Variante::ALK*-exprimierender Zellen gegenüber *ALK*-Tyrosinkinaseinhibitoren bereits für einzelne *Variante::ALK*-Fusionen festgestellt werden (Heuckmann et al., 2011, Van Roosbroeck et al., 2010). Zusammenfassend könnten Unterschiede in der Pathogenese und im Therapieansprechen ein unterschiedliches Outcome und somit auch prognostische Unterschiede der varianten *ALK*-Fusionen begründen.

### **1.4.3.2 Minimal disseminierte Erkrankung bei *NPM1::ALK*-positiven ALCL und die Anwendung bei ALCL mit varianten *ALK*-Fusionspartnern**

Bei den *ALK*-positiven ALCL korrelieren in multivariaten Analysen der histologische Subtyp (Lamant et al., 2011, Mussolin et al., 2020), der *ALK*-Antikörper-Titer (Ait-Tahar et al., 2010) sowie bei *NPM1::ALK*-positiven ALCL die minimal disseminierte Erkrankung (minimal disseminated disease, MDD) (Damm-Welk et al., 2015, Mussolin et al., 2020) bzw. minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) (Damm-Welk et al., 2014, Rigaud et al., 2021) mit dem Rezidivrisiko und können als Prognosefaktoren verwendet werden.

Mittels fusionsspezifischer PCR-Assays kann die minimale Erkrankung auf Transkriptebene mit einer Sensitivität bis  $1 \text{ in } 10^{-6}$  gemessen werden (Mussolin et al., 2005, Damm-Welk et al., 2007), woraufhin sich in Abhängigkeit der gemessenen MDD unterschiedliche Risikogruppen definieren lassen (Damm-Welk et al., 2007, Damm-Welk et al., 2020). Eine fusionsspezifische MDD-Messung ist grundsätzlich auch bei *Variante::ALK*-positiven ALCL möglich. Sowohl zur Bedeutung der MDD, als auch der MRD gibt es bei *Variante::ALK* ALCL bislang jedoch keine ausreichenden Daten. Innerhalb unserer Kohorte führten wir bei einzelnen Patient:innen eine MDD-Messung durch. Insgesamt war die Anzahl der untersuchten Fälle jedoch zu gering, um eine Analyse hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der MDD bei ALCL mit varianten *ALK*-Fusionen zu erlauben (s. Tabelle 3). Zur Prüfung der prognostischen Bedeutung der minimalen Erkrankung bei ALCL mit varianten *ALK*-Fusionen sind weiterführende Untersuchungen an einer größeren Patient:innenkohorte notwendig.

TABELLE 3: MDD bei ALCL mit varianten ALK-Fusionspartnern

Variante ALK-Fusion	Material	MDD mit RT-PCR	MDD mit dPCR (NCN)
ATIC::ALK	KM	negativ	-
	PB	kein Ergebnis <sup>1</sup>	-
ATIC::ALK	KM	negativ	-
	PB	negativ	-
ATIC::ALK	KM	negativ	-
	PB	positiv	59
ATIC::ALK	KM	negativ	-
	PB	negativ	-
ATIC::ALK	KM	kein Ergebnis <sup>2</sup>	0
	PB	negativ	kein Ergebnis <sup>2</sup>
TPM3::ALK	KM	negativ	-
	PB	negativ	-
TPM3::ALK	KM	positiv	-
	PB	positiv	-
TRAF1::ALK	KM	positiv	12
	PB	-	-
TRAF1::ALK	KM	positiv	331
	PB	kein Ergebnis <sup>2</sup>	-
MYH9::ALK	KM	kein Ergebnis <sup>2</sup>	-
	PB	kein Ergebnis <sup>2</sup>	-
MYH9::ALK	KM	kein Ergebnis <sup>2</sup>	-
	PB	kein Ergebnis <sup>2</sup>	-

MDD = minimal disseminierte Erkrankung, RT-PCR = reverse Transkriptase PCR, dPCR = digital PCR, NCN = Normalized Copy Number, KM = Knochenmark, PB = peripheres Blut  
<sup>1</sup> unzureichende RNA-Qualität, <sup>2</sup> nicht auswertbar aufgrund unzureichender PCR-Qualitätskontrollen

## 1.5 Zusammenfassung

Diese Studie stellt die bisher größte untersuchte populationsbasierte internationale Kohorte an pädiatrischen ALCL mit varianten ALK-Fusionspartnern dar. Etwa 10 % der Kinder und Jugendlichen mit ALK-positivem ALCL weisen einen varianten ALK-Fusionspartner auf, wovon *ATIC* und *TPM3* jeweils ein Drittel ausmachen. Die Gesamtgruppe der Kinder und Jugendlichen mit ALCL mit varianter ALK-Fusion hatte eine vergleichbare Prognose zu *NPM1::ALK*-positiven ALCL. Obwohl eine statistisch signifikante prognostische Bedeutung der spezifischen varianten Fusionsgene nicht festgestellt werden konnte, deutet das hohe Rückfallrisiko von Patient:innen mit *ATIC::ALK*-exprimierenden ALCL (5 von 8) und das geringe Rückfallrisiko für *TPM3::ALK*-positive ALCL-Patient:innen (0 von 9) auf eine mögliche Bedeutung des Fusionspartners für das Rückfallrisiko hin. Die minimal disseminierte und minimal residuelle Erkrankung ist auch für *Variante::ALK*-positive ALCL-Patient:innen messbar. Eine umfassende Studie an einer größeren, internationalen Kohorte pädiatrischer ALCL mit varianten ALK-Fusionen ist anzustreben, um die prognostische Bedeutung der einzelnen Fusionsgene und der minimalen Erkrankung zu untersuchen.

## 2. Originalarbeit



Received: 2 November 2023 | Accepted: 10 January 2024

DOI: 10.1111/bjh.19308



### SHORT REPORT

#### Paediatric

# Variant ALK-fusion positive anaplastic large cell lymphoma (ALCL): A population-based paediatric study of the NHL-BFM study group

Jette Luedersen<sup>1</sup> | Udo zur Stadt<sup>2</sup> | Julia Richter<sup>3</sup> | Ilske Oschlies<sup>3</sup> | Wolfram Klapper<sup>3</sup> | Andreas Rosenwald<sup>4</sup> | Marketa Kalinova<sup>5,6</sup> | Ingrid Simonitsch-Klupp<sup>7</sup> | Reiner Siebert<sup>8</sup> | Martin Zimmermann<sup>9</sup> | Minyue Qi<sup>10</sup> | Jacqueline Nakel<sup>11</sup> | Katrin Scheinemann<sup>12,13,14</sup> | Fabian Knörr<sup>1,15</sup> | Andishe Attarbaschi<sup>16,17</sup> | Edita Kabickova<sup>18</sup> | Wilhelm Woessmann<sup>1</sup> | Christine Damm-Welk<sup>1</sup>

#### Correspondence

Wilhelm Woessmann and Christine Damm-Welk, Paediatric Haematology and Oncology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, Hamburg 20246, Germany.  
Email: w.woessmann@uke.de and c.damm-welk@uke.de

#### Funding information

Hamburger Stiftung zur Foerderung der Krebsbekämpfung; Juli Harnack scholarship of the Foerderegemeinschaft Kinderkrebszentrum Hamburg e.V.; KinderkrebsInitiative Buchholz, Holm-Seppensen; Deutsche Kinderkrebsstiftung

#### Summary

Frequency, distribution and prognostic meaning of *ALK*-partner genes other than *NPM1* in ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma (ALCL) are unknown. Forty-nine of 316 ALCL diagnosed in the NHL-BFM study group showed no nuclear ALK expression suggestive of a variant *ALK*-partner; 41 were analysed by genomic capture high-throughput sequencing or specific RT-PCRs. *NPM1::ALK* was detected in 13 cases. Among the 28 patients with a non-*NPM1::ALK*-fusion partner, *AT1C* ( $n=8$ ; 29%) and *TPM3* ( $n=9$ ; 32%) were the most common. Five of eight patients with *AT1C::ALK*-positive ALCL relapsed, none of nine with *TPM3::ALK*. Variant *ALK*-partners are rare and potentially associated with different prognoses.

#### KEYWORDS

ALK positive ALCL, non-Hodgkin's lymphoma, variant ALK

## INTRODUCTION

ALK-positive anaplastic large-cell lymphomas (ALCL) are characterized by rearrangements involving the *ALK* gene on chromosome 2. The most frequent translocation t(2;5)(p23;q35) results in the *NPM1::ALK* gene fusion.<sup>1,2</sup> The *NPM1::ALK* fusion protein is expressed in the nucleus and cytoplasm, whereas all other known non-*NPM1* (i.e. variant) *ALK*-fusion proteins are not expressed in the nucleus.<sup>3,4</sup> Based on immunohistochemistry using ALK-staining, a frequency of 15%–25% of ALK-positive ALCL caused by such

variant *ALK*-fusions was estimated in mixed collectives of adult and paediatric patients.<sup>3,5,6</sup> In paediatric cohorts, a proportion of about 10% variant ALK-positive ALCL was observed by histopathological and molecular means.<sup>7–9</sup> The frequencies of individual variant *ALK*-partner genes were judged to be about 13%–17.5% for *TPM3::ALK* in the WHO classification and a review from Stein et al. in 2000. In the same publications, frequencies of 1–2.5% were assumed for *AT1C::ALK*, *TFG::ALK* and *CLTC::ALK*.<sup>2,4</sup> *TPM3::ALK* showed a higher metastatic potential in in vitro analyses compared to *AT1C::*, *TFG::* and *CLTC::ALK*, whereas

Wilhelm Woessmann and Christine Damm-Welk shared last authorship.

For Affiliation refer page on 4

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2024 The Authors. *British Journal of Haematology* published by British Society for Haematology and John Wiley & Sons Ltd.

ATIC::ALK had a lower transforming capacity compared to NPM1::ALK in vitro.<sup>10–12</sup> In addition, wild-type ATIC and TPM3 were only weakly expressed in normal and malignant lymphoid cells. Therefore, TPM3::ALK- and ATIC::ALK-positive tumours seem to need a higher ALK dosage through copy number gain of the ALK gene to achieve higher expression levels.<sup>12</sup> However, data on the distribution and possible prognostic role of variant ALK-partner genes in ALK-positive ALCL have not been analysed in larger patient cohorts. We herein describe a population-based analysis in a uniformly treated cohort of 316 children and adolescents with ALK-positive ALCL.

## PATIENTS AND METHODS

Three hundred and sixteen paediatric patients diagnosed with ALK-positive ALCL were included in the ALCL99 study or NHL-BFM Registry 2012 between January 2000 and December 2017 in Austria, the Czech Republic, Germany and Switzerland. ALK-1-staining without nuclear ALK expression was detected in 49 of those patients. From 41 of these 49 patients, tumour material was available and suitable for further molecular analyses.

Genomic capture high-throughput sequencing (gcHTS) was performed on tumour-DNA extracted from frozen or FFPE tumour samples to detect variant ALK-partner genes. According to the manufacturer's instructions, library preparation was performed with the xGen cfDNA & FFPE DNA Library Prep MC Kit v2 (Integrated DNA Technologies, Leuven). ALK- and NPM1-specific custom probes were applied for capturing, following the 'xGen hybridization capture of DNA libraries' protocol (Integrated DNA Technologies, Leuven). Sequencing was performed with the MiSeq System (Illumina, San Diego, CA, USA). Data analyses were performed as previously reported (Supplementary Methods and Supplementary Literature in Data S1). If gcHTS was not feasible, PCR-based approaches were conducted as previously described<sup>8</sup> (Supplementary Methods in Data S1 and Table S1).

Of the 41 tumour samples, FFPE-tumour DNA from 23 patients was analysed by gcHTS, tumour cDNA from 9 patients was examined by PCR-based approaches ( $n=8$ ) or RNA-seq ( $n=1$ ), and 9 tumours were investigated with both gcHTS and PCR (Table S2).

Six patients were described in previous work (see Supplementary Material and Methods and Supplementary References in Data S1).

## RESULTS AND DISCUSSION

Among 41 analysed patient samples with non-nuclear ALK expression, 13 lymphomas (32%) were positive for NPM1::ALK, and 28 lymphomas (68%) harboured variant ALK-partner genes. The finding of 9% variant ALK-fusion partners in our study cohort of 316 patients aligns

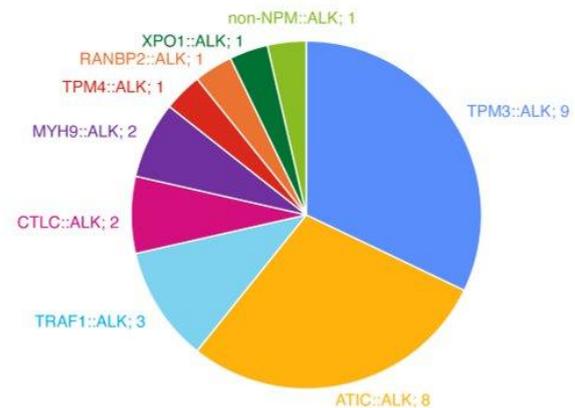


FIGURE 1 Distribution of the partner gene among the patients with a confirmed variant ALK-partner gene.

with previously published data by us and others, describing 10%–11% variant ALK-fusion genes in smaller series.<sup>7–9</sup> Among the variant ALK-partner genes, we detected TPM3 ( $n=9$ ; 32%), ATIC ( $n=8$ ; 28%), TRAF1 ( $n=3$ ; 11%), CLTC, MYH9 (each  $n=2$ ; 7%), TPM4, RANBP2 and XPO1 (each  $n=1$ ) (Figure 1). The partner gene of one patient could not be identified further with gcHTS, but NPM1 could be excluded as a partner. RANBP2::ALK was previously described in inflammatory myofibroblastic tumours and rare chronic and acute myeloid leukaemia cases but not in ALCL so far.<sup>13</sup> XPO1 was identified as a hitherto not published ALK partner gene.

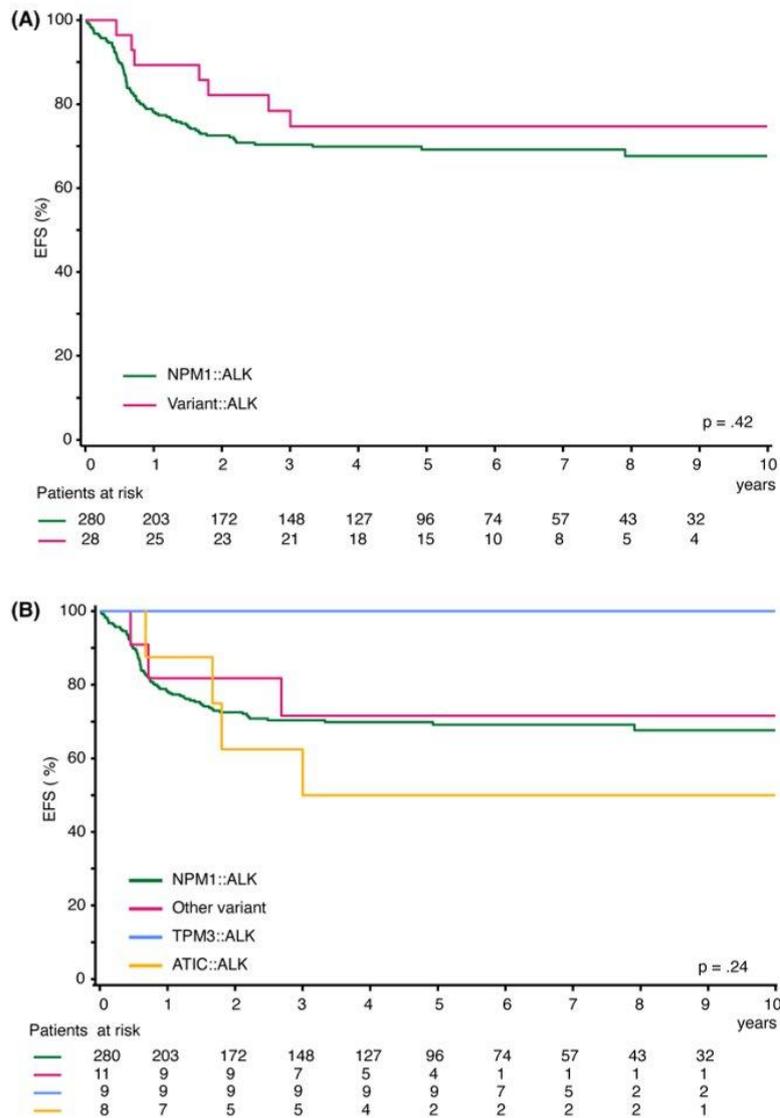
Interestingly, XPO1::ALK shares some special unique features, which were described only in two other ALK-fusions, MYH9 and MSN.<sup>14</sup> The Exportin 1 protein coded by XPO1 has no oligomerization domain, characteristic for all other ALK-partner proteins. This domain is implicated in the constitutive activation of ALK by the fusion proteins.<sup>14</sup> The exact mechanisms of ALK-activation are not known for these three fusion proteins. Furthermore, the breakpoint in ALK in these three fusion genes is located in Exon 20, not in Intron 19–20.

So far, the frequency of the variant ALK-fusion partners could only be estimated based on case series.<sup>4</sup> The distribution of ALK-fusion partners in our population-based cohort hints towards fewer TPM3::ALK-positive ALCL (2.9% of all ALK-positive ALCL) than estimated up to now, whereas ATIC::ALK was detected at a comparable frequency (2.4%) as predicted.<sup>4</sup> The observation that NPM1::ALK was detected in a sizeable portion of patients without nuclear ALK-staining aligns with earlier observations.<sup>3</sup> In all six cases with available material for second ALK-staining, nuclear ALK-expression could be detected by using the more sensitive ALK-antibody clone D5F3 (rabbit monoclonal, Cell Signaling Technologies). The variation of NPM1::ALK-expression between ALCLs may in few cases (<5%) lead to low nuclear expression levels that escape routine diagnostics

with the ALK1 antibody. In addition, insufficient tissue fixation and inadequate antigen retrieval could also impact on the traceability of ALK expression in the nucleus. The finding implies that *NPM1::ALK* should be excluded by molecular approaches in tumours with exclusive cytoplasmic ALK expression.

The clinical characteristics of the 28 patients with *Variant::ALK*-positive ALCL were comparable to the ones of the 280 *NPM1::ALK*-positive ALCL with regard to gender, age, stage, bone marrow or CNS involvement or the histological subtype (Table S3). The event-free survival (EFS) at 5 years was  $69 \pm 3\%$  for the 28 ALCL patients with

a variant *ALK*-partner gene, compared to  $75 \pm 8\%$  for the 280 *NPM1::ALK*-positive patients ( $p = 0.39$ , Figure 2A). The survival (OS) at 5 years was 100% for the *Variant::ALK* patient cohort compared to  $92 \pm 2\%$  for *NPM1::ALK*-positive patients ( $p = 0.13$ ). The comparable outcome between *NPM1::ALK* and *Variant::ALK*-positive patients is in line with a previous observation based on the ALK staining pattern.<sup>9</sup> Next, we compared the 5-year EFS of the patients with the two most common variant subtypes, *TPM3::ALK* and *ATIC::ALK*, to the one of patients with *NPM1::ALK* and other *Variant::ALK*-positive ALCL. We observed no event among the nine *TPM3::ALK*-positive patients



**FIGURE 2** Event-free survival at 5 years according to *NPM1::ALK* and variant ALK status (A) and according to *TPM3::ALK* (light blue line), *ATIC::ALK* (yellow line), *NPM1::ALK* (green line) and all other *Variant::ALK*-partners (purple line) (B).

(100 ± 0%) compared to five relapses among the eight *ATIC::ALK*-positive patients (50 ± 18%) (Figure 2B) with one relapse of an *ATIC::ALK*-positive patient occurring 12 years after diagnosis. Although not statistically significant, this observation hints towards differences in chemosensitivity between the *Variant::ALK*-fusions and asks for further analysis of a larger international patient cohort. The favourable outcome of patients with *TPM3::ALK* and high relapse risk of *ATIC::ALK*-positive ALCL was not reflected in preclinical *in vitro* studies.<sup>10–12</sup> NIH3T3 cells transformed by *TPM3::ALK* exhibited a higher invasive potential compared to *ATIC::ALK*, *CLTC::ALK* and *NPM1::ALK*.<sup>10,11</sup> BAF3 cells containing *ATIC::ALK*-fusions generated through CRISPR/CAS9 genome editing had a lower transformation and growth rate than *NPM1::ALK*-positive BAF3 cells.<sup>12</sup> However, *ATIC::ALK* expressing NIH3T3 cells showed the strongest STAT3 phosphorylation compared to the above-mentioned *Variant::ALK* transformed NIH3T3 cells.<sup>10</sup> Since STAT3 is one of the key players in the survival and maintenance of *ALK*-positive ALCL, strong activation of STAT3 may contribute to a more aggressive clinical course. Interestingly, a rare *ATIC::ALK*-positive cutaneous T-cell lymphoma case reports an aggressive clinical course.<sup>15</sup> Of note, all relapses in *ATIC::ALK*-positive patients occurred after the end of the first-line therapy and in four of five patients more than 1 year after diagnosis, and all patients could be rescued by second-line therapies.

In summary, among children with *ALK*-positive ALCL, about 10% showed variant *ALK*-partners, of which *ATIC* and *TPM3* comprise one-third each. The observation of a high relapse risk for *ATIC::ALK* and a low relapse risk for *TPM3::ALK*-positive ALCL patients needs to be confirmed in larger patient series.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

WW and CDW designed the work; JL, WW and CDW wrote the manuscript; JL, CDW, MK, UzST and JN performed NGS and PCR-based analysis; WK, IO, AR and ISK performed central pathological review; JR and IO centrally collected the FFPE samples and extracted the DNA; MQ performed bioinformatics analysis; AA, KS, EK, AR, FK and ISK provided tumour samples; FK organized sample collection; RS performed FISH analysis; MZ performed statistical analysis.

#### AFFILIATIONS

<sup>1</sup>Paediatric Haematology and Oncology and NHL-BFM Study Centre, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>2</sup>Paediatric Haematology and Oncology and CoALL Study Centre, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>3</sup>Department of Pathology, Haematopathology Section and Lymph Node Registry, University Hospital Schleswig-Holstein, Kiel, Germany

<sup>4</sup>Department of Pathology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

<sup>5</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague and University Hospital in Motol, Prague, Czech Republic

<sup>6</sup>Department of Pathology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University Prague and University Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic

<sup>7</sup>Department of Pathology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

<sup>8</sup>Institute of Human Genetics, Ulm University & Ulm University Medical Centre, Ulm, Germany

<sup>9</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, Hannover Medical School, and NHL-BFM Study Centre, Hannover, Germany

<sup>10</sup>Bioinformatics Core, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>11</sup>Leibniz Institute of Virology (LIV), Hamburg, Germany

<sup>12</sup>Division of Paediatric Haematology/Oncology, Children's Hospital of Eastern Switzerland, St. Gallen, Switzerland

<sup>13</sup>Faculty of Health Science and Medicine, University of Lucerne, Lucerne, Switzerland

<sup>14</sup>Department of Paediatrics, McMaster Children's Hospital and McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

<sup>15</sup>Mildred Scheel Cancer Career Centre HaTriCS4, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

<sup>16</sup>Department of Paediatric Haematology and Oncology, St. Anna Children's Hospital, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

<sup>17</sup>St. Anna Children's Cancer Research Institute, Vienna, Austria

<sup>18</sup>Department of Pediatric Hematology and Oncology, Charles University Prague and University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all colleagues from local pathology centres who provided FFPE samples for the study. This work was supported by a grant from the Hamburger Stiftung zur Foerderung der Krebsbekämpfung zu CDW and WW. JL was supported by the Juli Harnack scholarship of the Foerdergemeinschaft Kinderkrebszentrum Hamburg e.V. We thank Nicole Kasdepke, Dana Germer and Lorena Vallés Uriate for excellent technical assistance. JR, IO and WK were supported by the KinderkrebsInitiative Buchholz, Holm-Seppensen. The NHL-BFM Registry 2012 is funded by a grant from the Deutsche Kinderkrebsstiftung to WW. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

#### FUNDING INFORMATION

Grant from the Hamburger Stiftung zur Foerderung der Krebsbekämpfung; Scholarship of the Foerdergemeinschaft Kinderkrebszentrum Hamburg e.V.; KinderkrebsInitiative Buchholz, Holm-Seppensen.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available from the last authors upon request.

#### ETHICS STATEMENT

The studies were ethically approved by the Institutional Ethics Committee of the primary investigators of the BFM group.

#### PATIENT CONSENT

All patients or their parents/legal caregivers had given informed consent to use the tumour material.

#### ORCID

Julia Richter  <https://orcid.org/0000-0002-9543-4084>

Wolfram Klapper  <https://orcid.org/0000-0001-7208-4117>

Andishe Attarbaschi  <https://orcid.org/0000-0002-9285-6898>

Wilhelm Woessmann  <https://orcid.org/0000-0002-6315-0888>

Christine Damm-Welk  <https://orcid.org/0000-0002-8221-4197>

## REFERENCES

- Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IBO, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1720–48.
- Elenitoba-Johnson KS, Ott G, Takeuchi K, Klapper W, Lamant-Rochaix L, d'Amore ESG, et al. ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. WHO classification of tumours editorial board Haematolymphoid tumours. Volume 11. 5th ed. Lyon (France): WHO Classification of Tumours Series, International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2023 Oct 20]. Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>
- Falini B, Pulford K, Pucciarini A, Carbone A, De Wolf-Peeters C, Cordell J, et al. Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. *Blood*. 1999;94(10):3509–15.
- Stein H, Foss HD, Durkop H, Marafioti T, Delsol G, Pulford K, et al. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*. 2000;96(12):3681–95.
- Benharroch D, Meguerian-Bedoyan Z, Lamant L, Amin C, Brugieres L, Terrier-Lacombe MJ, et al. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*. 1998;91(6):2076–84.
- Falini B, Bigerna B, Fizzotti M, Pulford K, Pileri SA, Delsol G, et al. ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol*. 1998;153(3):875–86.
- Perkins SL, Pickering D, Lowe EJ, Zwick D, Abromowitch M, Davenport G, et al. Childhood anaplastic large cell lymphoma has a high incidence of ALK gene rearrangement as determined by immunohistochemical staining and fluorescent in situ hybridisation: a genetic and pathological correlation. *Br J Haematol*. 2005;131(5):624–7.
- Damm-Welk C, Klapper W, Oschlies I, Gesk S, Rottgers S, Bradtke J, et al. Distribution of NPM1-ALK and X-ALK fusion transcripts in paediatric anaplastic large cell lymphoma: a molecular-histological correlation. *Br J Haematol*. 2009;146(3):306–9.
- Lamant L, McCarthy K, D'Amore E, Klapper W, Nakagawa A, Fraga M, et al. Prognostic impact of morphologic and phenotypic features of childhood ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma: results of the ALCL99 study. *J Clin Oncol*. 2011;29(35):4669–76.
- Armstrong F, Duplantier MM, Trempat P, Hieblot C, Lamant L, Espinos E, et al. Differential effects of X-ALK fusion proteins on proliferation, transformation, and invasion properties of NIH3T3 cells. *Oncogene*. 2004;23(36):6071–82.
- Armstrong F, Lamant L, Hieblot C, Delsol G, Touriol C. TPM3-ALK expression induces changes in cytoskeleton organisation and confers higher metastatic capacities than other ALK fusion proteins. *Eur J Cancer*. 2007;43(4):640–6.
- van der Krogt JA, Bempt MV, Ferreiro JF, Mentens N, Jacobs K, Pluys U, et al. Anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma with the variant RNF213-, ATIC- and TPM3-ALK fusions is characterized by copy number gain of the rearranged ALK gene. *Haematologica*. 2017;102(9):1605–16.
- Ma Z, Hill DA, Collins MH, Morris SW, Sumegi J, Zhou M, et al. Fusion of ALK to the ran-binding protein 2 (RANBP2) gene in inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;37(1):98–105.
- Pulford K, Lamant L, Espinos E, Jiang Q, Xue L, Turturro F, et al. The emerging normal and disease-related roles of anaplastic lymphoma kinase. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(23):2939–53.
- Wehkamp U, Oschlies I, Nagel I, Brasch J, Kneba M, Gunther A, et al. ALK-positive primary cutaneous T-cell-lymphoma (CTCL) with unusual clinical presentation and aggressive course. *J Cutan Pathol*. 2015;42(11):870–7.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

**How to cite this article:** Luedersen J, Stadt Uz, Richter J, Oschlies I, Klapper W, Rosenwald A, et al. Variant ALK-fusion positive anaplastic large cell lymphoma (ALCL): A population-based paediatric study of the NHL-BFM study group. *Br J Haematol*. 2024;00:1–5. <https://doi.org/10.1111/bjh.19308>

### 3. Zusammenfassung

#### 3.1 Deutsch

Die Mehrheit der pädiatrischen großzelligen anaplastischen Lymphome (ALCL) sind ALK-positiv und weisen eine Fusion zwischen der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) und Nukleophosmin 1 (NPM1) auf. Bei einer geringeren Anzahl der ALK-positiven ALCL liegt eine Genfusion zwischen ALK und einem varianten Fusionspartnern vor. Zur Häufigkeit und Verteilung der spezifischen varianten ALK-Fusionspartnergene und ihrer prognostischen Bedeutung gibt es bislang kaum Daten.

In dieser Studie wiesen 49 von 316 ALCL-Patient:innen innerhalb der NHL-BFM-Studiengruppe immunhistochemisch eine ausschließlich zytoplasmatische ALK-Färbung auf, was auf das Vorliegen einer varianten ALK-Fusion hindeutet. Mittels Genomic Capture High Throughput Sequencing (gcHTS) oder PCR-basierten Verfahren konnten bei 41 der 49 Fälle das ALK-Partnergen analysiert werden. Bei 13 Patient:innen fand sich eine NPM1::ALK-Fusion, sodass auch bei einer rein zytoplasmatischen ALK-Färbung eine NPM1::ALK-Fusion mit einer sensitiveren Methode ausgeschlossen werden sollte. Unter den varianten ALK-Partnergenen kamen TPM3 (n = 9; 32 %) und ATIC (n = 8; 28 %) am häufigsten vor. Das Auftreten von fünf Rezidiven unter den acht Patient:innen mit ATIC::ALK-positiven ALCL gegenüber keinem Rezidiv unter Patient:innen mit TPM3::ALK-positiven ALCL weist auf eine mögliche prognostische Bedeutung des Fusionspartners hin. Die Detektion der Partnergene ermöglicht die Etablierung fusionsspezifischer Assays zur Messung der minimal disseminierten und minimal residuellen Erkrankung auch für Variante::ALK-positive ALCL-Patient:innen. Zusammenfassend sind variante ALK-Fusionen mit einem Anteil von etwa 10 % aller ALK-positiver ALCL in unserer Studie insgesamt selten. Die spezifischen Fusionspartnergene sind dabei möglicherweise mit unterschiedlichen Prognosen verbunden.

## 3.2 Englisch

Most pediatric anaplastic large cell lymphomas (ALCL) are ALK-positive and contain a gene fusion between the anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) and nucleophosmin 1 (*NPM1*). A smaller number of ALK-positive ALCL contains a gene fusion with a variant ALK partner-gene. Little is known about the frequency and distribution of the specific variant *ALK* partner genes and their prognostic significance.

In this study, 49 of 316 ALCL patients in the NHL-BFM study group showed an exclusive cytoplasmatic ALK staining pattern with the ALK1 antibody, indicative for an *ALK* gene fusion variant. By using genomic capture high throughput sequencing (gcHTS) or specific PCR-based methods, 41 of the 49 cases could be analysed for the *ALK* partner gene. An *NPM::ALK* fusion was detected in 13 cases, suggesting that *NPM::ALK* fusion needs to be excluded with a more sensitive ALK antibody or molecular methods in case of cytoplasmatic ALK staining. Among the 28 ALCL with variant *ALK* partner genes, *TPM3* (n = 9; 32 %) and *ATIC* (n = 8; 28 %) were the most common. The occurrence of five relapses within the eight *ATIC::ALK* positive ALCL compared to no relapse among the nine *TPM3::ALK* positive ALCL indicates that the fusion partner might be associated with the relapse risk. Based on the detection of the *ALK* fusion partner, prognostic factors established for *NPM::ALK*-positive ALCL, such as minimal disseminated disease (MDD), can also be analysed for *Variant::ALK*-expressing ALCL patients.

In conclusion, variant *ALK* fusions are rare, accounting for approximately 10 % of all ALK-positive ALCL in our study. The specific fusion partner genes may be associated with different prognosis.

## 4. Literaturverzeichnis

- AIT-TAHAR, K., DAMM-WELK, C., BURKHARDT, B., ZIMMERMANN, M., KLAPPER, W., REITER, A., PULFORD, K. & WOESSMANN, W. 2010. Correlation of the autoantibody response to the ALK oncoantigen in pediatric anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma with tumor dissemination and relapse risk. *Blood*, 115, 3314-9.
- ALAGGIO, R., AMADOR, C., ANAGNOSTOPOULOS, I., ATTYGALLE, A. D., ARAUJO, I. B. O., BERTI, E., BHAGAT, G., BORGES, A. M., BOYER, D., CALAMINICI, M., CHADBURN, A., CHAN, J. K. C., CHEUK, W., CHNG, W. J., CHOI, J. K., CHUANG, S. S., COUPLAND, S. E., CZADER, M., DAVE, S. S., DE JONG, D., DU, M. Q., ELENITOBA-JOHNSON, K. S., FERRY, J., GEYER, J., GRATZINGER, D., GUITART, J., GUJRAL, S., HARRIS, M., HARRISON, C. J., HARTMANN, S., HOCHHAUS, A., JANSEN, P. M., KARUBE, K., KEMPF, W., KHOURY, J., KIMURA, H., KLAPPER, W., KOVACH, A. E., KUMAR, S., LAZAR, A. J., LAZZI, S., LEONCINI, L., LEUNG, N., LEVENTAKI, V., LI, X. Q., LIM, M. S., LIU, W. P., LOUISSAINT, A., JR., MARCOGLIESE, A., MEDEIROS, L. J., MICHAL, M., MIRANDA, R. N., MITTELDORF, C., MONTES-MORENO, S., MORICE, W., NARDI, V., NARESH, K. N., NATKUNAM, Y., NG, S. B., OSCHLIES, I., OTT, G., PARRENS, M., PULITZER, M., RAJKUMAR, S. V., RAWSTRON, A. C., RECH, K., ROSENWALD, A., SAID, J., SARKOZY, C., SAYED, S., SAYGIN, C., SCHUH, A., SEWELL, W., SIEBERT, R., SOHANI, A. R., TOOZE, R., TRAVERSE-GLEHEN, A., VEGA, F., VERGIER, B., WECHALEKAR, A. D., WOOD, B., XERRI, L. & XIAO, W. 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*, 36, 1720-1748.
- ARMSTRONG, F., DUPLANTIER, M. M., TREMPAT, P., HIEBLOT, C., LAMANT, L., ESPINOS, E., RACAUD-SULTAN, C., ALLOUCHE, M., CAMPO, E., DELSOL, G. & TOURIOL, C. 2004. Differential effects of X-ALK fusion proteins on proliferation, transformation, and invasion properties of NIH3T3 cells. *Oncogene*, 23, 6071-82.
- ARMSTRONG, F., LAMANT, L., HIEBLOT, C., DELSOL, G. & TOURIOL, C. 2007. TPM3-ALK expression induces changes in cytoskeleton organisation and confers higher metastatic capacities than other ALK fusion proteins. *Eur J Cancer*, 43, 640-6.
- BARRECA, A., LASORSA, E., RIERA, L., MACHIORLATTI, R., PIVA, R., PONZONI, M., KWEE, I., BERTONI, F., PICCALUGA, P. P., PILERI, S. A. & INGHIRAMI, G. 2011. Anaplastic lymphoma kinase in human cancer. *J Mol Endocrinol*, 47, R11-23.
- BENHARROCH, D., MEGUERIAN-BEDOYAN, Z., LAMANT, L., AMIN, C., BRUGIÈRES, L., TERRIER-LACOMBE, M. J., HARALAMBIEVA, E., PULFORD, K., PILERI, S., MORRIS, S. W., MASON, D. Y. & DELSOL, G. 1998. ALK-positive lymphoma: a single disease with a broad spectrum of morphology. *Blood*, 91, 2076-84.
- BISCHOF, D., PULFORD, K., MASON, D. Y. & MORRIS, S. W. 1997. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol*, 17, 2312-25.
- BOHLING, S. D., JENSON, S. D., CROCKETT, D. K., SCHUMACHER, J. A., ELENITOBA-JOHNSON, K. S. & LIM, M. S. 2008. Analysis of gene expression profile of TPM3-ALK positive anaplastic large cell lymphoma reveals overlapping and unique patterns with that of NPM-ALK positive anaplastic large cell lymphoma. *Leuk Res*, 32, 383-93.
- BRUGIÈRES, L., LE DELEY, M. C., ROSOLEN, A., WILLIAMS, D., HORIBE, K., WROBEL, G., MANN, G., ZSIROS, J., UYTTEBROECK, A., MARKY, I., LAMANT, L. & REITER, A. 2009. Impact of the methotrexate administration dose on the need for intrathecal treatment in children and adolescents with anaplastic large-cell lymphoma: results of a randomized trial of the EICNHL Group. *J Clin Oncol*, 27, 897-903.
- COLLEONI, G. W., BRIDGE, J. A., GARICOCHEA, B., LIU, J., FILIPPA, D. A. & LADANYI, M. 2000. ATIC-ALK: A novel variant ALK gene fusion in anaplastic large cell lymphoma resulting from the recurrent cryptic chromosomal inversion, inv(2)(p23q35). *Am J Pathol*, 156, 781-9.
- COOLS, J., WLODARSKA, I., SOMERS, R., MENTENS, N., PEDEUTOUR, F., MAES, B., DE WOLF-PEETERS, C., PAUWELS, P., HAGEMEIJER, A. & MARYNEN, P. 2002. Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 34, 354-62.
- DAMM-WELK, C., BUSCH, K., BURKHARDT, B., SCHIEFERSTEIN, J., VIEHMANN, S., OSCHLIES, I., KLAPPER, W., ZIMMERMANN, M., HARBOTT, J., REITER, A. & WOESSMANN, W. 2007. Prognostic significance of

- circulating tumor cells in bone marrow or peripheral blood as detected by qualitative and quantitative PCR in pediatric NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*, 110, 670-7.
- DAMM-WELK, C., KLAPPER, W., OSCHLIES, I., GESK, S., RÖTTGERS, S., BRADTKE, J., SIEBERT, R., REITER, A. & WOESSMANN, W. 2009. Distribution of NPM1-ALK and X-ALK fusion transcripts in paediatric anaplastic large cell lymphoma: a molecular-histological correlation. *Br J Haematol*, 146, 306-9.
- DAMM-WELK, C., KUTSCHER, N., ZIMMERMANN, M., ATTARBASCHI, A., SCHIEFERSTEIN, J., KNÖRR, F., OSCHLIES, I., KLAPPER, W. & WOESSMANN, W. 2020. Quantification of minimal disseminated disease by quantitative polymerase chain reaction and digital polymerase chain reaction for NPM-ALK as a prognostic factor in children with anaplastic large cell lymphoma. *Haematologica*, 105, 2141-2149.
- DAMM-WELK, C., MUSSOLIN, L., ZIMMERMANN, M., PILLON, M., KLAPPER, W., OSCHLIES, I., D'AMORE, E. S., REITER, A., WOESSMANN, W. & ROSOLEN, A. 2014. Early assessment of minimal residual disease identifies patients at very high relapse risk in NPM-ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*, 123, 334-7.
- DAMM-WELK, C., PILLON, M., WOESSMANN, W. & MUSSOLIN, L. 2015. Prognostic factors in paediatric anaplastic large cell lymphoma: role of ALK. *Front Biosci (Schol Ed)*, 7, 205-16.
- DRIEUX, F., RUMINY, P., SATER, V., MARCHAND, V., FATACCIOLI, V., LANIC, M. D., VIENNOT, M., VIAILLY, P. J., SAKO, N., ROBE, C., DUPUY, A., VALLOIS, D., VERESEZAN, L., POULLOT, E., PICQUENOT, J. M., BOSSARD, C., PARRENS, M., LEMONNIER, F., JARDIN, F., DE LEVAL, L. & GAULARD, P. 2021. Detection of Gene Fusion Transcripts in Peripheral T-Cell Lymphoma Using a Multiplexed Targeted Sequencing Assay. *J Mol Diagn*, 23, 929-940.
- DUYSTER, J., BAI, R. Y. & MORRIS, S. W. 2001. Translocations involving anaplastic lymphoma kinase (ALK). *Oncogene*, 20, 5623-37.
- FALINI, B. 2001. Anaplastic large cell lymphoma: pathological, molecular and clinical features. *Br J Haematol*, 114, 741-60.
- FALINI, B., BIGERNA, B., FIZZOTTI, M., PULFORD, K., PILERI, S. A., DELSOL, G., CARBONE, A., PAULLI, M., MAGRINI, U., MENESTRINA, F., GIARDINI, R., PILOTTI, S., MEZZELANI, A., UGOLINI, B., BILLI, M., PUCCIARINI, A., PACINI, R., PELICCI, P. G. & FLENGHI, L. 1998. ALK expression defines a distinct group of T/null lymphomas ("ALK lymphomas") with a wide morphological spectrum. *Am J Pathol*, 153, 875-86.
- FALINI, B., PULFORD, K., PUCCIARINI, A., CARBONE, A., DE WOLF-PEETERS, C., CORDELL, J., FIZZOTTI, M., SANTUCCI, A., PELICCI, P. G., PILERI, S., CAMPO, E., OTT, G., DELSOL, G. & MASON, D. Y. 1999. Lymphomas expressing ALK fusion protein(s) other than NPM-ALK. *Blood*, 94, 3509-15.
- FELDMAN, A. L., VASMATZIS, G., ASMANN, Y. W., DAVILA, J., MIDDHA, S., ECKLOFF, B. W., JOHNSON, S. H., PORCHER, J. C., ANSELL, S. M. & CARIDE, A. 2013. Novel TRAF1-ALK fusion identified by deep RNA sequencing of anaplastic large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 52, 1097-102.
- GRAETZ, D., CREWS, K. R., AZZATO, E. M., SINGH, R. K., RAIMONDI, S., MASON, J., VALENTINE, M., MULLIGHAN, C. G., HOLLAND, A., INABA, H. & LEVENTAKI, V. 2019. Leukemic presentation of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma with a novel partner, poly(A) binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1), responding to single-agent crizotinib. *Haematologica*, 104, e218-e221.
- HALLBERG, B. & PALMER, R. H. 2013. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer*, 13, 685-700.
- HERGOTT, C. B., DAL CIN, P., HORNICK, J. L., WINER, E. S., CARRASCO, R. D. & KIM, A. S. 2023. Characteristic nuclear membrane ALK reactivity in chronic myelomonocytic leukemia with RANBP2-ALK fusion. *Am J Hematol*, 98, 365-367.
- HERNÁNDEZ, L., PINYOL, M., HERNÁNDEZ, S., BEÀ, S., PULFORD, K., ROSENWALD, A., LAMANT, L., FALINI, B., OTT, G., MASON, D. Y., DELSOL, G. & CAMPO, E. 1999. TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations. *Blood*, 94, 3265-8.
- HEUCKMANN, J. M., HÖLZEL, M., SOS, M. L., HEYNCK, S., BALKE-WANT, H., KOKER, M., PEIFER, M., WEISS, J., LOVLY, C. M., GRÜTTER, C., RAUH, D., PAO, W. & THOMAS, R. K. 2011. ALK mutations conferring differential resistance to structurally diverse ALK inhibitors. *Clin Cancer Res*, 17, 7394-401.
- HOFFMANN, S., OTTO, C., DOOSE, G., TANZER, A., LANGENBERGER, D., CHRIST, S., KUNZ, M., HOLDT, L. M., TEUPSER, D., HACKERMÜLLER, J. & STADLER, P. F. 2014. A multi-split mapping algorithm for circular RNA, splicing, trans-splicing and fusion detection. *Genome Biol*, 15, R34.
- KALINOVA, M., MRHALOVA, M., KABICKOVA, E., SVATON, M., SKOTNICOVA, A., PROUZOVA, Z., KRENOVA, Z., KOLENOVA, A., DIVOKA, M., FRONKOVA, E. & KODET, R. 2024. Molecular Screening in Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma: Anaplastic Lymphoma Kinase Analysis,

- Next-Generation Sequencing Fusion Gene Detection, and T-Cell Receptor Immunoprofiling. *Mod Pathol*, 37, 100428.
- KRUMBHOLZ, M., WOESSMANN, W., ZIERK, J., SENIUK, D., CEPPI, P., ZIMMERMANN, M., SINGH, V. K., METZLER, M. & DAMM-WELK, C. 2018. Characterization and diagnostic application of genomic NPM-ALK fusion sequences in anaplastic large-cell lymphoma. *Oncotarget*, 9, 26543-26555.
- LAMANT, L., DASTUGUE, N., PULFORD, K., DELSOL, G. & MARIAMÉ, B. 1999. A new fusion gene TPM3-ALK in anaplastic large cell lymphoma created by a (1;2)(q25;p23) translocation. *Blood*, 93, 3088-95.
- LAMANT, L., GASCOYNE, R. D., DUPLANTIER, M. M., ARMSTRONG, F., RAGHAB, A., CHHANABHAI, M., RAJCAN-SEPAROVIC, E., RAGHAB, J., DELSOL, G. & ESPINOS, E. 2003. Non-muscle myosin heavy chain (MYH9): a new partner fused to ALK in anaplastic large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 37, 427-32.
- LAMANT, L., MCCARTHY, K., D'AMORE, E., KLAPPER, W., NAKAGAWA, A., FRAGA, M., MALDYK, J., SIMONITSCH-KLUPP, I., OSCHLIES, I., DELSOL, G., MAUGUEN, A., BRUGIÈRES, L. & LE DELEY, M. C. 2011. Prognostic impact of morphologic and phenotypic features of childhood ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma: results of the ALCL99 study. *J Clin Oncol*, 29, 4669-76.
- LAWRENCE, B., PEREZ-ATAYDE, A., HIBBARD, M. K., RUBIN, B. P., DAL CIN, P., PINKUS, J. L., PINKUS, G. S., XIAO, S., YI, E. S., FLETCHER, C. D. & FLETCHER, J. A. 2000. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *Am J Pathol*, 157, 377-84.
- LIANG, X., MEECH, S. J., ODOM, L. F., BITTER, M. A., RYDER, J. W., HUNGER, S. P., LOVELL, M. A., MELTESEN, L., WEI, Q., WILLIAMS, S. A., HUTCHINSON, R. N. & MCGAVRAN, L. 2004. Assessment of t(2;5)(p23;q35) translocation and variants in pediatric ALK+ anaplastic large cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 121, 496-506.
- LIM, J. H., JANG, S., PARK, C. J., CHO, Y. U., LEE, J. H., LEE, K. H., LEE, J. O., SHIN, J. Y., KIM, J. I., HUH, J. & SEO, E. J. 2014. RANBP2-ALK fusion combined with monosomy 7 in acute myelomonocytic leukemia. *Cancer Genet*, 207, 40-5.
- MA, Z., COOLS, J., MARYNEN, P., CUI, X., SIEBERT, R., GESK, S., SCHLEGELBERGER, B., PEETERS, B., DE WOLF-PEETERS, C., WLODARSKA, I. & MORRIS, S. W. 2000. Inv(2)(p23q35) in anaplastic large-cell lymphoma induces constitutive anaplastic lymphoma kinase (ALK) tyrosine kinase activation by fusion to ATIC, an enzyme involved in purine nucleotide biosynthesis. *Blood*, 95, 2144-9.
- MA, Z., HILL, D. A., COLLINS, M. H., MORRIS, S. W., SUMEGI, J., ZHOU, M., ZUPPAN, C. & BRIDGE, J. A. 2003. Fusion of ALK to the Ran-binding protein 2 (RANBP2) gene in inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer*, 37, 98-105.
- MAESAKO, Y., IZUMI, K., OKAMORI, S., TAKEOKA, K., KISHIMORI, C., OKUMURA, A., HONJO, G., AKASAKA, T. & OHNO, H. 2014. inv(2)(p23q13)/RAN-binding protein 2 (RANBP2)-ALK fusion gene in myeloid leukemia that developed in an elderly woman. *Int J Hematol*, 99, 202-7.
- MARIÑO-ENRÍQUEZ, A., WANG, W. L., ROY, A., LOPEZ-TERRADA, D., LAZAR, A. J., FLETCHER, C. D., COFFIN, C. M. & HORNICK, J. L. 2011. Epithelioid inflammatory myofibroblastic sarcoma: An aggressive intra-abdominal variant of inflammatory myofibroblastic tumor with nuclear membrane or perinuclear ALK. *Am J Surg Pathol*, 35, 135-44.
- MÖKER, P., ZUR STADT, U., ZIMMERMANN, M., ALAWI, M., MUELLER, S., FINGER, J., KNÖRR, F., RIQUELME, A., OSCHLIES, I., KLAPPER, W., BRADTKE, J., BURKHARDT, B., WOESSMANN, W. & DAMM-WELK, C. 2022. Characterization of IG-MYC-breakpoints and their application for quantitative minimal disease monitoring in high-risk pediatric Burkitt-lymphoma and -leukemia. *Leukemia*, 36, 2343-2346.
- MORRIS, S. W., KIRSTEIN, M. N., VALENTINE, M. B., DITTMER, K. G., SHAPIRO, D. N., SALTMAN, D. L. & LOOK, A. T. 1994. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*, 263, 1281-4.
- MURAKAMI, N., OKUNO, Y., YOSHIDA, K., SHIRAISHI, Y., NAGAE, G., SUZUKI, K., NARITA, A., SAKAGUCHI, H., KAWASHIMA, N., WANG, X., XU, Y., CHIBA, K., TANAKA, H., HAMA, A., SANADA, M., ITO, M., HIRAYAMA, M., WATANABE, A., UENO, T., KOJIMA, S., ABURATANI, H., MANO, H., MIYANO, S., OGAWA, S., TAKAHASHI, Y. & MURAMATSU, H. 2018. Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, 131, 1576-1586.
- MUSSOLIN, L., LE DELEY, M. C., CARRARO, E., DAMM-WELK, C., ATTARBASCHI, A., WILLIAMS, D., BURKE, A., HORIBE, K., NAKAZAWA, A., WROBEL, G., MANN, G., CSÓKA, M., UYTTEBROECK, A., FERNÁNDEZ-DELGADO CERDÁ, R. F., BEISHUIZEN, A., MELLGREN, K., BURKHARDT, B., KLAPPER, W., TURNER, S. D., D'AMORE, E. S. G., LAMANT, L., REITER, A., WOESSMANN, W., BRUGIÈRES, L. & PILLON, M. 2020. Prognostic Factors in Childhood Anaplastic Large Cell Lymphoma: Long Term Results of the International ALCL99 Trial. *Cancers (Basel)*, 12.

- MUSSOLIN, L., PILLON, M., D'AMORE, E. S., SANTORO, N., LOMBARDI, A., FAGIOLI, F., ZANESCO, L. & ROSOLEN, A. 2005. Prevalence and clinical implications of bone marrow involvement in pediatric anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia*, 19, 1643-7.
- PALACIOS, G., SHAW, T. I., LI, Y., SINGH, R. K., VALENTINE, M., SANDLUND, J. T., LIM, M. S., MULLIGHAN, C. G. & LEVENTAKI, V. 2017. Novel ALK fusion in anaplastic large cell lymphoma involving EEF1G, a subunit of the eukaryotic elongation factor-1 complex. *Leukemia*, 31, 743-747.
- PALMER, R. H., VERNERSSON, E., GRABBE, C. & HALLBERG, B. 2009. Anaplastic lymphoma kinase: signalling in development and disease. *Biochem J*, 420, 345-61.
- PATEL, A. S., MURPHY, K. M., HAWKINS, A. L., COHEN, J. S., LONG, P. P., PERLMAN, E. J. & GRIFFIN, C. A. 2007. RANBP2 and CLTC are involved in ALK rearrangements in inflammatory myofibroblastic tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 176, 107-14.
- PERKINS, S. L., PICKERING, D., LOWE, E. J., ZWICK, D., ABROMOWITCH, M., DAVENPORT, G., CAIRO, M. S. & SANGER, W. G. 2005. Childhood anaplastic large cell lymphoma has a high incidence of ALK gene rearrangement as determined by immunohistochemical staining and fluorescent in situ hybridisation: a genetic and pathological correlation. *Br J Haematol*, 131, 624-7.
- PULFORD, K., LAMANT, L., ESPINOS, E., JIANG, Q., XUE, L., TURTURRO, F., DELSOL, G. & MORRIS, S. W. 2004a. The emerging normal and disease-related roles of anaplastic lymphoma kinase. *Cell Mol Life Sci*, 61, 2939-53.
- PULFORD, K., LAMANT, L., MORRIS, S. W., BUTLER, L. H., WOOD, K. M., STROUD, D., DELSOL, G. & MASON, D. Y. 1997. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood*, 89, 1394-404.
- PULFORD, K., MORRIS, S. W. & TURTURRO, F. 2004b. Anaplastic lymphoma kinase proteins in growth control and cancer. *J Cell Physiol*, 199, 330-58.
- RIGAUD, C., ABBAS, R., GRAND, D., MINARD-COLIN, V., ALADJIDI, N., BUCHBINDER, N., GARNIER, N., PLAT, G., COUEC, M. L., DUPLAN, M., LAMBILLIOTTE, A., SCHMITT, C., LEBLANC, T., LAMANT, L. & BRUGIÈRES, L. 2021. Should treatment of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma be stratified according to minimal residual disease? *Pediatr Blood Cancer*, 68, e28982.
- ROSENWALD, A., OTT, G., PULFORD, K., KATZENBERGER, T., KÜHL, J., KALLA, J., OTT, M. M., MASON, D. Y. & MÜLLER-HERMELINK, H. K. 1999. t(1;2)(q21;p23) and t(2;3)(p23;q21): two novel variant translocations of the t(2;5)(p23;q35) in anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 94, 362-4.
- RÖTTGERS, S., GOMBERT, M., TEIGLER-SCHLEGEL, A., BUSCH, K., GAMERDINGER, U., SLANY, R., HARBOTT, J. & BORKHARDT, A. 2010. ALK fusion genes in children with atypical myeloproliferative leukemia. *Leukemia*, 24, 1197-200.
- SEIDEMANN, K., TIEMANN, M., SCHRAPPE, M., YAKISAN, E., SIMONITSCH, I., JANKA-SCHAUB, G., DÖRFFEL, W., ZIMMERMANN, M., MANN, G., GADNER, H., PARWARESCH, R., RIEHM, H. & REITER, A. 2001. Short-pulse B-non-Hodgkin lymphoma-type chemotherapy is efficacious treatment for pediatric anaplastic large cell lymphoma: a report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood*, 97, 3699-706.
- STEIN, H., FOSS, H. D., DÜRKOP, H., MARAFIOTI, T., DELSOL, G., PULFORD, K., PILERI, S. & FALINI, B. 2000. CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood*, 96, 3681-95.
- TAKEUCHI, K., SODA, M., TOGASHI, Y., OTA, Y., SEKIGUCHI, Y., HATANO, S., ASAKA, R., NOGUCHI, M. & MANO, H. 2011. Identification of a novel fusion, SQSTM1-ALK, in ALK-positive large B-cell lymphoma. *Haematologica*, 96, 464-7.
- TORT, F., PINYOL, M., PULFORD, K., RONCADOR, G., HERNANDEZ, L., NAYACH, I., KLUIN-NELEMANS, H. C., KLUIN, P., TOURIOL, C., DELSOL, G., MASON, D. & CAMPO, E. 2001. Molecular characterization of a new ALK translocation involving moesin (MSN-ALK) in anaplastic large cell lymphoma. *Lab Invest*, 81, 419-26.
- TOURIOL, C., GREENLAND, C., LAMANT, L., PULFORD, K., BERNARD, F., ROUSSET, T., MASON, D. Y. & DELSOL, G. 2000. Further demonstration of the diversity of chromosomal changes involving 2p23 in ALK-positive lymphoma: 2 cases expressing ALK kinase fused to CLTCL (clathrin chain polypeptide-like). *Blood*, 95, 3204-7.
- TRINEI, M., LANFRANCONE, L., CAMPO, E., PULFORD, K., MASON, D. Y., PELICCI, P. G. & FALINI, B. 2000. A new variant anaplastic lymphoma kinase (ALK)-fusion protein (ATIC-ALK) in a case of ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Cancer Res*, 60, 793-8.
- VAN DER KROGT, J. A., BEMPT, M. V., FERREIRO, J. F., MENTENS, N., JACOBS, K., PLUYS, U., DOMS, K., GEERDENS, E., UYTTEBROECK, A., PIERRE, P., MICHAUX, L., DEVOS, T., VANDENBERGHE, P.,

- TOUSSEYN, T., COOLS, J. & WLODARSKA, I. 2017. Anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma with the variant RNF213-, ATIC- and TPM3-ALK fusions is characterized by copy number gain of the rearranged ALK gene. *Haematologica*, 102, 1605-1616.
- VAN ROOSBROECK, K., COOLS, J., DIERICKX, D., THOMAS, J., VANDENBERGHE, P., STUL, M., DELABIE, J., DE WOLF-PEETERS, C., MARYNEN, P. & WLODARSKA, I. 2010. ALK-positive large B-cell lymphomas with cryptic SEC31A-ALK and NPM1-ALK fusions. *Haematologica*, 95, 509-13.
- WLODARSKA, I., DE WOLF-PEETERS, C., FALINI, B., VERHOEF, G., MORRIS, S. W., HAGEMEIJER, A. & VAN DEN BERGHE, H. 1998. The cryptic inv(2)(p23q35) defines a new molecular genetic subtype of ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*, 92, 2688-95.
- ZUR STADT, U., ALAWI, M., ADAO, M., INDENBIRKEN, D., ESCHERICH, G. & HORSTMANN, M. A. 2019. Characterization of novel, recurrent genomic rearrangements as sensitive MRD targets in childhood B-cell precursor ALL. *Blood Cancer J*, 9, 96.
- ZUR STADT, U., ESCHERICH, G., INDENBIRKEN, D., ALAWI, M., ADAO, M. & HORSTMANN, M. A. 2016. Rapid Capture Next-Generation Sequencing in Clinical Diagnostics of Kinase Pathway Aberrations in B-Cell Precursor ALL. *Pediatr Blood Cancer*, 63, 1283-6.

## 5. Abkürzungsverzeichnis

5'-RACE	5'-Rapid Amplification of cDNA-Ends
ALCL	Anaplastic large cell lymphoma; anaplastisch großzelliges Lymphom
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ALL	Akute lymphatische Leukämie
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster Studiengruppe
bp	base pairs; Basenpaare
CAPRIN1	Cell cycle associated protein 1
cDNA	complementary DNA; komplementäre DNA
CLTC	Clathrin heavy chain
EF1G	Eucariotic translation elongation factor 1 gamma
EFS	Event-free survival; ereignisfreies Überleben
FFPE	Formalin-fixierten Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
gcHTS	Genomic Capture High Throughput Sequencing
hg38	Humanes Referenzgenom 38
IMT	Inflammatorisch myofibroblastischer Tumor
KM	Knochenmark
LBCL	large B-cell lymphoma; großzelliges B-Zell-Lymphom
MDD	Minimal disseminated disease; minimale disseminierte Erkrankung
MRD	Minimal residual disease; minimale Resterkrankung
MSN	Moesin
MYH9	Myosin heavy chain 9
NCN	Normalized Copy Number
NGS	Next generation sequencing
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OS	Overall survival; Gesamtüberleben
PABPC1	Poly(A) binding protein cytoplasmic 1
pB	peripheres Blut
PTCL	peripheral T-cell lymphoma; peripheres T-Zell-Lymphom
RANBP2	RAN binding protein 2
RNF213	Ring finger protein 213
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SATB1	SATB homeobox 1
SQSTM1	Sequestosome 1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TFG	TRK-fused gene
TPM3	Tropomyosin 3
TPM4	Tropomyosin 4
TRAF1	TNF receptor associated factor 1
WHO	World Health Organisation
XPO1	Exportin 1
ZNS	zentrales Nervensystem

## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Inhalt	Seite
<b>Abb. 1</b>	<i>ALK</i> -Bruchpunkte identifiziert mit gcHTS	10

## 7. Tabellenverzeichnis

Tabelle	Inhalt	Seite
<b>Tabelle 1</b>	<i>ALK</i> -Fusionspartner bei <i>ALK</i> -positiven ALCL	5
<b>Tabelle 2</b>	Bruchpunkte in <i>ALK</i> und dem Partnergen, identifiziert mit gcHTS (s. Supplements der Originalarbeit, Tabelle 2)	9
<b>Tabelle 3</b>	MDD bei ALCL mit varianten <i>ALK</i> -Fusionspartnergenen	16

## 8. Erklärung des Eigenanteils

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Publikation mit dem Titel „Variant ALK-fusion positive anaplastic large cell lymphoma (ALCL): A population-based paediatric study of the NHL-BFM study group“ überwiegend selbstständig und eigenverantwortlich von mir verfasst wurde. Der Eigenanteil umfasst sämtliche Aspekte, welche im Folgenden detailliert aufgeführt sind. Die ergänzende Dissertationsschrift wurde von mir vollständig selbstständig und eigenverantwortlich verfasst.

Die Entwicklung des Forschungskonzeptes erfolgte initial durch Wilhelm Wößmann und Christine Damm-Welk und wurde im Verlauf von mir mitgestaltet, insbesondere bei der Ausarbeitung der Forschungsfrage, der Auswahl und Etablierung geeigneter Methoden, sowie der Planung einzelner Arbeitsschritte. Die zentrale Sammlung der FFPE-Tumorproben sowie das Extrahieren der DNA aus den FFPE-Proben erfolgte durch Ilske Oschlies und Julia Richter. Andishe Attarbashi, Katrin Scheinmann, Edith Kabickova, Andreas Rosenwald, Fabian Knörr und Ingrid Simonitsch-Klupp stellten Tumorproben zur Verfügung. Fabian Knörr, Christine Damm-Welk und ich organisierten die Probensammlung. Das angewandte NGS-Verfahren zur Sequenzierung der FFPE-Proben wurde von mir etabliert und optimiert, wobei Jaqueline Nackel mich zu der Optimierung der DNA-Fragmentierung sowie der Auswahl der Sequenzierungsplattform beriet. Die Erhebung der Sequenzierungsdaten erfolgte durch mich. Maketa Kalinova stellte die NGS-Ergebnisse von zwei tschechischen Patient:innen zur Verfügung. Die PCR-basierte Identifikation der varianten ALK-Partnergene war bereits Gegenstand in vorherigen Publikationen. PCR-basierte MDD-Messungen wurden durch mich durchgeführt. Dual-color FISH-Analysen wurden von Reiner Siebert durchgeführt. Die zentrale pathologische Referenzbegutachtung erfolgte durch Wolfram Klapper, Ilske Oschlies, Andreas Rosenwald und Ingrid Simonitsch-Klupp. Bioinformatische Analysen der NGS-Daten erfolgten durch Minyue Qi. Die statistische Auswertung wurden von Martin Zimmermann durchgeführt. Die Analyse und Interpretation der erhobenen Daten erfolgte vorrangig durch mich. Hierbei wurde ich von Christine Damm-Welk und Udo zur Stadt supervidiert. Das Schreiben des Manuskriptes für die Publikation, einschließlich der Darstellung der Ergebnisse sowie deren Diskussion und Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext, erfolgte durch Wilhelm Wößmann, Christine Damm-Welk und mich. Die gesamte schriftliche Ausarbeitung der dazugehörigen Dissertation, inkl. der umfassenden Recherche und Auswertung relevanter Fachliteratur sowie daraus folgender Schlussfolgerungen, wurde von mir eigenständig vorgenommen. Die Tabellen der Publikation wurden von Wilhelm Wößmann, Christine Damm-Welk und mir erstellt. Die Abbildungen der Publikation wurden von Christine Damm-Welk, Fabian Knörr, Martin Zimmermann und mir erstellt. Alle zusätzlichen Tabellen und Abbildungen der Dissertation wurden von mir eigenständig erstellt.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum

Unterschrift

## 10. Danksagung

Diese Dissertation wäre ohne die Unterstützung und Mithilfe vieler Menschen nicht möglich gewesen, wofür ich mich an dieser Stelle sehr herzlich und mit großer Wertschätzung bedanken möchte. Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilhelm Wößmann und meiner Betreuerin Dr. Christine Damm-Welk danken, die mich außerordentlich engagiert gefördert und betreut haben. Ihr anhaltendes Vertrauen in meine Fähigkeiten, genauso wie ihre wertvollen Ratschläge und ihr tiefgehendes Wissen haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Udo zur Stadt, der mir immer wieder beratend zur Seite stand. Seine Erfahrungen und seine Unterstützung waren von bedeutendem Wert für meine Arbeit. Darüber hinaus möchte ich ganz besonders bei den Kolleginnen und Kollegen des Labors der Pädiatrischen Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bedanken, insbesondere bei Lukas Duscher und Nicole Kasdepke. Ihre Hilfsbereitschaft und technische Assistenz machten die Zusammenarbeit sehr angenehm.

Mein Dank gilt zudem allen weiteren Co-Autorinnen und Co-Autoren der Publikation für ihre Beiträge, die eine Arbeit in diesem Umfang erst ermöglicht haben.

Ich möchte mich bei der Fördergemeinschaft Kinderkrebszentrum Hamburg e.V. für die finanzielle Unterstützung während meiner Promotionsarbeit durch ein Juli-Harnack-Promotionsstipendium bedanken.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für ihren stetigen Zuspruch danken. Ich danke meinen Eltern, Ute Hantelmann und Karsten Lüdersen, die mir in jeglicher Hinsicht unterstützend zur Seite standen. Mein tiefer Dank gilt meiner Schwester Rieke Lüdersen, die mir durch ihre Stammzellspende die Chance gab, die Arbeit an dieser Dissertation zu beginnen und zu vollenden.