

Zentrum für Humangenetik Tübingen | Paul-Ehrlich-Str. 23 | D-72076 Tübingen

Herr  
Dr. med. Richard Roe  
Zentrum für Humangenetik  
Paul-Ehrlich-Straße 23  
72076 Tübingen

<b>Name</b>	Doe, Jane (*01.01.19xx)
<b>Geschlecht</b>	weiblich
<b>Patienten-ID</b>	xxxxxx
<b>Befunddatum</b>	TT.MM.JJJJ

## Befund somatische Tumordiagnostik – Doe, Jane (\*01.01.19xx)

**Indikation**                      **Brustkrebs**

### ERGEBNISSE IN DER ÜBERSICHT

<p><b>Tumorgewebe &amp; Tumorgehalt</b></p> <p>FFPE-Material von 03/2022</p> <p>30 % (histologisch) 25% (bioinformatisch)</p> <p>Mindestens 20%</p>	<p><b>Mutationslast (TMB)</b></p> <p>7,6 Var/Mb</p> <p>Hoch <math>\geq 10</math></p>	<p><b>Mikrosatelliten-Instabilität (MSI)</b></p> <p>Kein Hinweis auf eine MSI</p> <p>Score 0,14</p> <p>Hinweis auf MSI <math>\geq 0,33</math></p>	<p><b>Homologe Rekombinations-Defizienz (HRD)</b></p> <p>Hinweis auf eine HRD</p> <p>Score 58.0</p> <p>Hinweis auf HRD <math>\geq 30</math></p>	<p><b>Fusionen, Strukturvarianten</b></p> <p>Kein Hinweis auf das Vorliegen potenziell therapierelevanter Veränderungen auf DNA- und RNA-Ebene</p>
<p><b>Tumor-Treiber</b></p> <p>Identifizierte Tumortreiber: <i>BRCA2, PIK3CA</i></p> <p>Relevante Gene ohne onkogene Veränderung: <i>BRCA1, ERBB2</i></p>	<p><b>Virale Infektion</b></p> <p>Kein Hinweis auf eine Infektion mit HPV/EBV im Tumor</p>	<p><b>Keimbahn-Varianten</b></p> <p>Nachweis einer pathogenen Keimbahnvariante im Gen <i>BRCA2</i>.</p>	<p><b>Pharmakogenetik</b></p> <p>Kein Nachweis von Keimbahnvarianten mit Auswirkungen auf Arzneimittel</p>	<p><b>CHIP</b></p> <p>Kein Hinweis auf eine CHIP</p>

## POTENZIELL THERAPIERELEVANTE VERÄNDERUNGEN:

Gen	Funktionelle Klasse	Variante	NAF	Einfluss auf die Proteinfunktion	Therapie-Option zur Diskussion im MTB	EMA/FDA Zulassung	Zulassung in der vorliegenden Entität
<i>BRCA2</i> (Keimbahn)	frameshift	c.3847_3848delGT; p.Val1283Lysfs*2  und Verlust des Wildtyp-Allels im Tumor	het.	inaktivierend	PARP-Inhibitor	EMA* & FDA*	EMA* & FDA*
HRD	N/A	N/A	N/A	N/A	PARP-Inhibitor	EMA* & FDA*	EMA* & FDA*
<i>PIK3CA</i>	missense	c.3140A>G; p.His1047Arg	0,15	aktivierend	PI3K-Inhibitor	EMA* & FDA*	EMA* & FDA*
					mTOR-Inhibitor	EMA* & FDA*	EMA* & FDA*
					AKT-Inhibitor	nein	nein
					Mögliche Resistenz ggü. EGFR/HER-Inhibitor	N/A	N/A
					Mögliche Resistenz ggü. Hormontherapie	N/A	N/A
<i>FGFR1</i>	Amplifikation	Komplettes Gen, nicht fokal (~10 Kopien)	N/A	aktivierend	FGFR-Inhibitor	EMA* & FDA*	nein
					Mögliche Resistenz ggü. CDK4/6-Inhibitor	N/A	N/A
					Mögliche Resistenz ggü. Hormontherapie	N/A	N/A

**NAF:** *Novel allele frequency*, entspricht der Frequenz, mit der das mutierte Allel in der Sequenzierung detektierbar war (1 entspricht 100 %). Die beobachteten Frequenzen werden durch den Tumorgehalt und durch Kopienzahlveränderungen beeinflusst und entsprechen nicht direkt der Häufigkeit der Variante im Tumor. Der Einfluss der detektierten Variante auf die Funktion des Proteins wurde basierend auf der aktuellen Datenlage in die Kategorien inaktivierend/aktivierend/Funktion verändert, wahrscheinlich inaktivierend/aktivierend/Funktion verändert, unklar oder benigne eingeteilt. Details hierzu entnehmen Sie bitte dem Methodenteil.

**Zulassung:** Nur diejenigen Organisationen, welche eine Zulassung für die jeweilige Therapieoption erteilt haben, werden hier aufgelistet. Ein Sternchen weist auf Zulassungseinschränkungen hin (Details entnehmen Sie bitte dem Anhang).

**Zugelassene Therapeutika (EMA/FDA), die unter Therapie-Option gelistet sind, sowie genauere Zulassungskriterien und Angaben zu möglichen Resistenzen, entnehmen Sie bitte der Tabelle im Anhang.**

## ALLE AUTOMATISCH DETEKTIERTEN SOMATISCHEN VARIANTEN

In folgender Tabelle sind alle somatischen Varianten gelistet (Einzelnukleotid-Varianten und kleine Deletionen/Insertionen ( $\leq 40\text{bp}$ )), die innerhalb der sequenzierten Region (Tumor-Panel V.7, Bewertungskriterien: Methodenteil 1. Absatz) automatisch erfasst wurden.

Gen	Funktionelle Klasse	Variante	Transkript	NAF
ARID5B	synonymous	c.537C>G; p.=	NM_032199.3	0.14
CSMD1	synonymous	c.6021G>A; p.=	NM_033225.6	0.09
DPYD	stop_gained	c.697C>T; p.Gln233*	NM_000110.4	0.15
PIK3CA	missense	c.3140A>G; p.His1047Arg	NM_006218.4	0,15

**NAF:** *Novel allele frequency*, entspricht der Frequenz, mit der das mutierte Allel in der Sequenzierung detektierbar war (1 entspricht 100 %). Die beobachteten Frequenzen werden durch den Tumorgehalt und durch Kopienzahlveränderungen beeinflusst und entsprechen nicht direkt der Häufigkeit der Variante im Tumor. Details hierzu entnehmen Sie bitte dem Methodenteil.

Eine detaillierte Suche zum Nachweis oder Ausschluss krankheitsrelevanter somatischer Veränderungen sowie deren Bewertung hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz erfolgt ausschließlich für die angeforderten Regionen.

## KOPIENZAHNVERÄNDERUNGEN:

Unsere Sequenzierdaten weisen auf das Vorliegen von Kopienzahlveränderungen (Deletionen und/oder Amplifikationen) größerer genomischer Bereiche hin. Neben der aufgeführten Kopienzahlveränderung liegen keine Hinweise auf weitere starke Amplifikationen oder homozygote Deletionen therapierelevanter Gene vor.

Chromosomale Region	Funktionelle Klasse	Variante	Kopienzahl	Betroffene potenziell therapierelevante Kandidatengene
chr8 37553498-41906820	Amplifikation	p-Arm, partiell	~10	FGFR1

Die Detektion der beobachteten Kopienzahlveränderungen wird durch den Tumorgehalt und die Qualität des Ausgangsmaterials für die Tumor-DNA-Isolation beeinflusst. Die Angaben der Kopienzahl sowie ggf. aufgeführte Bruchpunkte stellen aus den NGS Daten abgeleitete Näherungswerte dar. Die Auflistung stellt eine Auswahl potenziell therapierelevanter Gene dar und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Wir weisen darauf hin, dass größere genomische Bereiche mit veränderter Kopienzahl ggf. eine Vielzahl von Genen enthalten, die durch mögliche Wechselwirkung untereinander einen nicht sicher vorhersagbaren Einfluss auf die Tumorbilologie aufweisen können.

## EMPFEHLUNG

**Die nachgewiesene Variante c.3847\_3848delGT; p.Val1283Lysfs\*2 im Gen BRCA2 liegt in der Keimbahn vor.** Eine genetische Beratung sollte aufgrund dieser Veränderung dringend in Erwägung gezogen werden.

**Wir empfehlen Befunde molekulargenetischer Tumoranalysen in ein interdisziplinäres Tumorboard einzubringen.**

Für Rückfragen stehen wir selbstverständlich jederzeit gerne zur Verfügung.

Befund erstellt von:

Geprüft durch:

Mit freundlichen Grüßen

Dr. med. Dr. rer. nat. Saskia Biskup

Dr. med. Friedmar Kreuz, M.A.

Fachärztin/Facharzt für Humangenetik

## ERGÄNZENDE INFORMATIONEN

<b>Auftrag</b>	<b>Somatische molekulargenetische Analyse aus Tumorgewebe:</b> Tumor Panel-Analyse TUM01, Bewertung der therapierelevanten Varianten  RNA-Fusions-Panel-Analyse STR
<b>Probenmaterial</b>	<b>Tumorgewebe: Probe des bekannten Mammakarzinoms</b> Probenentnahme 03/2022, DNA- und RNA-Isolierung aus FFPE Material (FFPE-ID: 22/XXXX) nach Makrodissektion mit geschätztem Tumorgehalt von 30 % (HE Färbung) Bioinformatisch bestimmter Tumorgehalt 25 % (min 18 %, max 28 %)  <b>Normalgewebe: EDTA-Blut</b>
<b>Probeneingang</b>	06.06.2022 (EDTA-Blut) 19.06.2022 (Tumor-FFPE)
<b>Untersuchte Regionen / Strukturelle Varianten</b>	<b>DNA:</b> <i>BRCA1</i> (NM_007294.4), <i>BRCA2</i> (NM_000059.4), <i>ERBB2</i> (NM_004448.4), <i>FGFR1</i> (NM_023110.3), <i>KMT2C</i> (NM_170606.3), <i>PIK3CA</i> (NM_006218.4), <i>POT1</i> (NM_015450.3), <i>PTEN</i> (NM_000314.8)  <b>RNA:</b> <i>FGFR1</i> (NM_023110.3), <i>FGFR2</i> (NM_000141.5), <i>FGFR3</i> (NM_000142.5), <i>NOTCH2</i> (NM_024408.4), <i>BRAF</i> (NM_004333.6)
<b>Methoden</b>	<b>DNA- und RNA-Isolierung:</b> Die Isolierung der Tumor-DNA und RNA wurde nach Makrodissektion im Zentrum für Humangenetik Tübingen durchgeführt. Die Begutachtung des Tumormaterials erfolgte durch einen Facharzt für Pathologie.  Die pathologischen Leistungen (Bestätigung der histologischen Diagnose, Bestimmung des Tumorgehaltes) erfolgten in unserem Auftrag durch einen Facharzt für Pathologie. Die Leistungen der Pathologie gehören nicht zum Akkreditierungsumfang der ISO 15189.  <b>Bioinformatischer Tumorgehalt:</b> Der Tumorgehalt wird auf Basis der vorliegenden Sequenzierdaten berechnet (cellularity nach Favero et al., 2015 PMID: 25319062).  <b>Probenqualität:</b> Die Eignung einer Probe für molekulargenetische Analysen wird durch den Tumorgehalt und die Qualität des Ausgangsmaterials (z.B. chemische und physikalische Komponenten bei der Fixierung) beeinflusst (Arreaza et al., 2016 PMID: 27657050; Einaga et al., 2017, PMID: 28498833; Jones et al., 2019, PMID: 31061401). Die

Detektion von Veränderungen (Varianten calling, Kopienzahlveränderungen, strukturelle Varianten) sowie die Bestimmung der Mutationslast, der Mikrosatelliteninstabilität (MSI), der Homologen Rekombinations-Defizienz (HRD) sowie der viralen Infektion im Tumor können dadurch unter Umständen nur stark eingeschränkt oder gar nicht erfolgen.

**Sequenzierung DNA:** Es wurde DNA aus Normalgewebe und Tumorgewebe sequenziert. Die kodierenden Bereiche sowie die angrenzenden Intronbereiche und weitere nicht kodierende, krankheitsrelevante Regionen wurden mittels in-solution-hybridization Technologie angereichert und anschließend mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung auf dem Illumina NovaSeq6000 System analysiert.

**Sequenzierung RNA:** Es wurde RNA aus Tumorgewebe sequenziert. Fusionstranskripte wurden mittels in-solution-hybridization Technologie angereichert. Für Fusionstranskripte mit bekannten Bruchpunkten wurden Bruchpunkt-überspannende Sonden verwendet. Für Gene mit unbekanntem Bruchpunkten oder einer großen Zahl von möglichen Fusionspartnern wurde zur Anreicherung die kodierende Sequenz verwendet. Anschließend wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung auf dem Illumina NovaSeq6000 System sequenziert.

**Bioinformatik DNA:** Die Sequenzierdaten wurden mit Illumina bcl2fastq2 aufbereitet. Mitsequenzierte Adaptersequenzen wurden mit Skewer entfernt und die so erhaltenen Sequenzen durch den Burrows Wheeler Aligner gegen das humane Referenzgenom (hg19) aligniert. Sequenzen, die nicht eindeutig einer genomischen Position zugeordnet werden konnten, wurden entfernt, ebenso Sequenzduplikate, die wahrscheinlich auf die Amplifikation zurückzuführen sind. Anhand der verbleibenden Sequenzen hoher Qualität wurden Sequenzvarianten (Einzelnukleotidaustausche und kurze Insertionen/Deletionen) bestimmt. Diese wurden mit verschiedenen internen und externen Datenbanken annotiert.

**Bioinformatik RNA:** Die Sequenzierdaten wurden mit Illumina bcl2fastq2 aufbereitet. Mitsequenzierte Adaptersequenzen wurden mit Skewer entfernt und die so erhaltenen Sequenzen durch den STAR aligner gegen das humane Referenzgenom (hg19) aligniert. Fusionen wurden mittels STAR-Fusion (Haas et al., 2017) detektiert. Intragenische strukturelle Varianten in den Genen *EGFR* und *MET* wurden zusätzlich aus dem STAR output extrahiert.

**Genetische Datenauswertung DNA:** Bewertet werden alle somatischen Varianten (SNVs/Small Indels) innerhalb der kodierenden Regionen, sowie in deren flankierenden intronischen Regionen (-/+ 8 Basenpaare) mit einer Novel Allelfrequenz (NAF) von > 5 % in der Tumorprobe. Eine klinische Interpretation erfolgt anhand unterschiedlicher externer und interner Datenbanken sowie einer Literaturrecherche. Jederzeit kann die Liste aller Varianten angefordert werden. Die Sensitivität des Tests ist abhängig vom Tumorgehalt des Untersuchungsmaterials, der Probenqualität sowie der Sequenziertiefe. Im vorliegenden Fall wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Sequenziertiefe von min. 70X für 99,03 % der kodierenden Bereiche erreicht. Der pathologisch bestimmte Tumorgehalt der Probe beträgt 50 %. Somatische Veränderungen treten somit rechnerisch mit einer NAF von 25 % auf. Bei einer Sequenziertiefe von 43 Reads pro Base wird eine theoretische Sensitivität von > 99 % für die Detektion von Varianten mit einer NAF  $\geq$  25 % erreicht. Die Nomenklatur gefundener Varianten erfolgt nach den Richtlinien der HGVS.

**Genetische Datenauswertung RNA:** Die Sensitivität des Tests ist abhängig vom Tumorgehalt des Untersuchungsmaterials, der Probenqualität sowie der Datenmenge an sequenzierten Transkripten. Im vorliegenden Fall wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Datenmenge von 11,17 Gigabasen sequenziert. Der vorliegende Datensatz reicht somit für die Detektion struktureller Veränderungen auf RNA Ebene aus.

**Variantenklassifizierung:** Die Einteilung der Relevanz der beobachteten Genveränderung auf die Funktion des Proteins erfolgt basierend auf der aktuellen Datenlage (u. a. cBioPortal, My Cancer Genome, Clinical Interpretations of Variants in Cancer (CIVIC), MD Anderson Personalized Medicine Center Datenbank, IARC TP53 Datenbank, CKB, OncoKB, PubMed Recherche) und/oder auf einer *in silico*-Vorhersage (MetaLR, PrimateAI und SpliceAI) in die Kategorien inaktivierend/aktivierend/Funktion verändert, wahrscheinlich inaktivierend/aktivierend/Funktion verändert, unklar oder benigne. Einteilung in „inaktivierend“: Frameshift-, Nonsense-, sowie Spleiß-Stellen-Varianten, sofern nicht als benigne oder aktivierend beschrieben, sowie bekannt inaktivierende Varianten. Einteilung in „aktivierend“: Bekannt aktivierende Varianten. Einteilung in „Funktion verändert“: Bekannt funktionsverändernde Varianten. Varianten, die der Kategorie inaktivierend/aktivierend/Funktion verändert zugeordnet wurden, besitzen eine gesicherte Evidenz der funktionellen Relevanz auf Proteinebene, die über funktionelle *in vivo/in vitro* Analysen gezeigt wurde. Einteilung in „wahrscheinlich inaktivierend/aktivierend/Funktion verändert“: Eine Funktionsänderung des Proteins durch die

Variante ist wahrscheinlich. Hierzu zählen Varianten mit einschlägigen Dateneinträgen in ClinVar und spezifischen Gendatenbanken von Konsortien, für die jedoch keine funktionellen Daten existieren. Die Bewertung dieser Varianten basiert auf Grundlage der Gen- und Proteinstruktur (Lage in Domäne, aktives Zentrum, Konservierungsgrad etc.), auf der Datenlage zu funktionell charakterisierten, die gleiche Aminosäure betreffenden Varianten oder benachbarten pathogenen Varianten, *in silico* Vorhersageprogrammen und der Häufigkeit in Tumoren. Einteilung in „unklar“: Eine genaue Einschätzung ist anhand der derzeit verfügbaren Daten nicht möglich. Einteilung in „benigne“: Es handelt sich um eine bekannt benigne Variante oder die betroffene Aminosäure ist nicht konserviert, *in silico* Programme stufen die Variante einheitlich als benigne ein und der Austausch kommt mehrfach im Tierreich vor.

Eine Variante wird als Treibermutation definiert, wenn sie eine krankheitsursächliche Keimbahnvariante darstellt, oder es sich um eine somatische Mutation handelt, welche für eine spezifische Tumorentität charakterisierend ist. Zusätzlich werden gut beschriebene somatische Mutationen in der untersuchten Tumorentität sowie in mehreren Entitäten rekurrent auftretende Mutationen als Treibermutationen klassifiziert.

Die Relevanz von Keimbahnvarianten in Genen, welche zu unserem Pharmakogenetik Subpanel (PGX-01) gehören, wurden durch Verwendung der PharmGKB Datenbank und der CPIC Leitlinien ermittelt.

**Deletions- und Duplikationsanalyse:** (nicht anwendbar auf das mitochondriale Genom) CNVs (copy number variations) wurden auf Basis von Sequenzen, die eindeutig einer genomischen Position zugeordnet werden konnten, unter Verwendung einer intern entwickelten Methode basierend auf der Sequenzierungstiefe berechnet. Es wurden Referenzproben verwendet, um ein Modell der erwarteten Abdeckung zu erstellen, das sowohl mögliche Abweichungen im Laborprozess als auch Variation zwischen Proben generell widerspiegelt. Das CNV-Calling wurde durchgeführt, indem die normalisierte Abdeckung jeder Probe und deren Abweichung von der erwarteten Abdeckung berechnet wurden. Genomische Regionen werden als Variante bezeichnet, wenn sie signifikant von der erwarteten Abdeckung abweichen. Regionen auf dem Y-Chromosom sowie die pseudoautosomalen Regionen können nicht mit hoher Genauigkeit erfasst werden. Das NGS-basierte CNV-Calling erlaubt keine Aussage über den Integrationsort von Duplikationen.

Bitte beachten Sie, dass die auf Next-Generation Sequencing basierende Detektion von Kopienanzahlveränderungen eine geringere Sensitivität/Spezifität aufweist als beispielsweise eine MLPA. Wir empfehlen diese Veränderungen vor einer darauf abgestimmten Therapieentscheidung durch eine zweite Methode zu bestätigen.

Die Angaben der Kopienzahl sowie ggf. aufgeführte Bruchpunkte stellen aus den NGS Daten abgeleitete Näherungswerte dar. Eine Kopienzahlveränderung wurde als therapeutisch relevant bewertet, sofern 1. es sich bei dieser um eine fokale oder Cluster Amplifikation von mindestens 4 Kopien bzw. eine homozygote Deletion handelt, bei der „druggable“ Gene betroffen sind und 2. der entsprechende Pathomechanismus des „druggable“ Gens gewährleistet ist (Amplifikation bei Onkogenen und Deletion bei Tumorsuppressoren).

Die Auflistung der berichteten Gene in der Tabelle weiterer chromosomaler Kopienzahlveränderungen stellt nur eine Auswahl an betroffenen möglicherweise zusätzlich therapeutisch relevanten Genen dar und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Da ein heterozygoter Verlust eines Allels nicht zwangsläufig zu einer reduzierten Proteinexpression und auch eine geringfügige Amplifikation nicht immer zu einer deutlich gesteigerten Proteinexpression führt, werden in dieser Tabelle nur starke Amplifikationen von mindestens 5 Kopien bzw. homozygote Deletionen berichtet. Zudem umfassen die chromosomalen Deletionen bzw. Amplifikationen diverse Gene, so dass eine Bewertung der für den Tumor relevanten Tumorsuppressor- bzw. Onkogene unmöglich ist.

**Vorhersage struktureller Varianten in DNA:** Genomische Regionen, die bekanntermaßen Bruchpunkte für Translokationen, Gen-Fusionen oder größere Insertionen/Deletionen beinhalten können, werden ebenfalls angereichert. Die Alignments werden bioinformatisch nach diskordanten Read-Paaren oder gesplitteten Reads als Hinweis auf das mögliche Vorliegen struktureller Veränderungen untersucht (Chen et al., 2016, PMID: 26647377). Die Ergebnisse werden visuell überprüft und ggf. vorliegende strukturelle Varianten manuell annotiert. Die auf strukturelle Varianten untersuchten genomischen Bereiche stellen eine Auswahl häufig veränderter Regionen dar und erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Sollten keine strukturellen Varianten befundet werden, garantiert dies nicht die Abwesenheit struktureller Veränderungen.

**Mutationslast (Tumor Mutational Burden):** Die Mutationslast ist definiert als die Anzahl somatischer SNV-, InDel- und essentieller Spleißveränderungen pro kodierender Megabase DNA. Es werden hierfür nur somatische Varianten berücksichtigt, die mindestens eine Allelfrequenz von 0,1 aufweisen. Aus den Veränderungen im

analysierten Bereich wird die Mutationslast auf Exom-Ebene extrapoliert. Trunkierende Veränderungen in Tumorsuppressorgenen sowie bekannte Driver-Mutationen und alle somatischen Varianten mit einer inhouse-Frequenz  $\geq 1\%$  werden hierbei nicht berücksichtigt. Die Mutationslast wird ab einem Wert von  $\geq 10$  Mut/Mb als hoch eingestuft (Hellmann et al., 2018, PMID: 29658845; Reck et al., 2019, PMID: 31195357).

**Mikrosatelliteninstabilität (MSI):** Ein möglicher MSI-Status wird auf Basis der vorliegenden Sequenzierdaten vorhergesagt (step-wise difference (DIF); Threshold 0,33; Kautto et al., 2017, PMID: 27980218). Wir weisen darauf hin, dass ein diagnostisch gesicherter MSI-Status nur durch eine validierte Laboruntersuchung festgestellt werden kann.

**Virale Infektion:** Virale Sequenzen werden mithilfe von Sonden gebunden, die spezifisch für die Genome von EBV (Epstein-Barr-Virus) bzw. HPV (Humanes Papilloma-Virus) Typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, und 59 designt wurden. Reads, die sich nicht auf das menschliche Genom zurückführen lassen, werden mit diesen Genomen verglichen und Treffer gezählt.

**Therapeutische Optionen:** Für die Kategorisierung von Medikamenten in unterschiedliche Medikamentengruppen wurden die Informationen aus FDA, EMA und PubChem zusammengetragen. Zulassungsstatus und Limitationen wurden von drugs.com (FDA) und ema.europa.eu (EMA) übernommen.

Ist der Biomarker gemäß aktueller Leitlinien (NCCN und/oder ESMO) mit einem Nicht-Ansprechen, einem verminderten Ansprechen oder einer Resistenz gegenüber der angegebenen Medikamentenklasse in der vorliegenden Entität assoziiert, oder liegen in der aktuellen Literatur Daten für ein Nicht-Ansprechen, vermindertes Ansprechen oder eine Resistenz vor, werden entsprechende Medikamente mit einem Warnsymbol im Anhang versehen.

**Klonale Hämatopoese von unbestimmtem Potential (CHIP):** Das Vorliegen einer CHIP ist definiert durch niederfrequente (Allelfrequenz  $\sim 10\%$ ) somatische Mutationen im peripheren Blut bei Abwesenheit einer hämatopoetischen Dysplasie. Die Krankheitsrelevanz solcher Varianten wird derzeit als unklar eingeschätzt. Es besteht nur ein geringes Potential (0,5-1 % pro Jahr) zur Transformation in eine myeloide oder lymphoide Neoplasie (Heuser et al., 2016, PMID: 27215596). Da CHIP Varianten mit Allelfrequenzen  $< 5\%$  vorliegen können, handelt sich die Diagnose durch unsere Analyse um einen Zufallsbefund.

Die Probe hat die bei uns geltenden Qualitätskriterien nach Probeneingang und den jeweiligen analytischen Bearbeitungsschritten im Labor eingehalten.

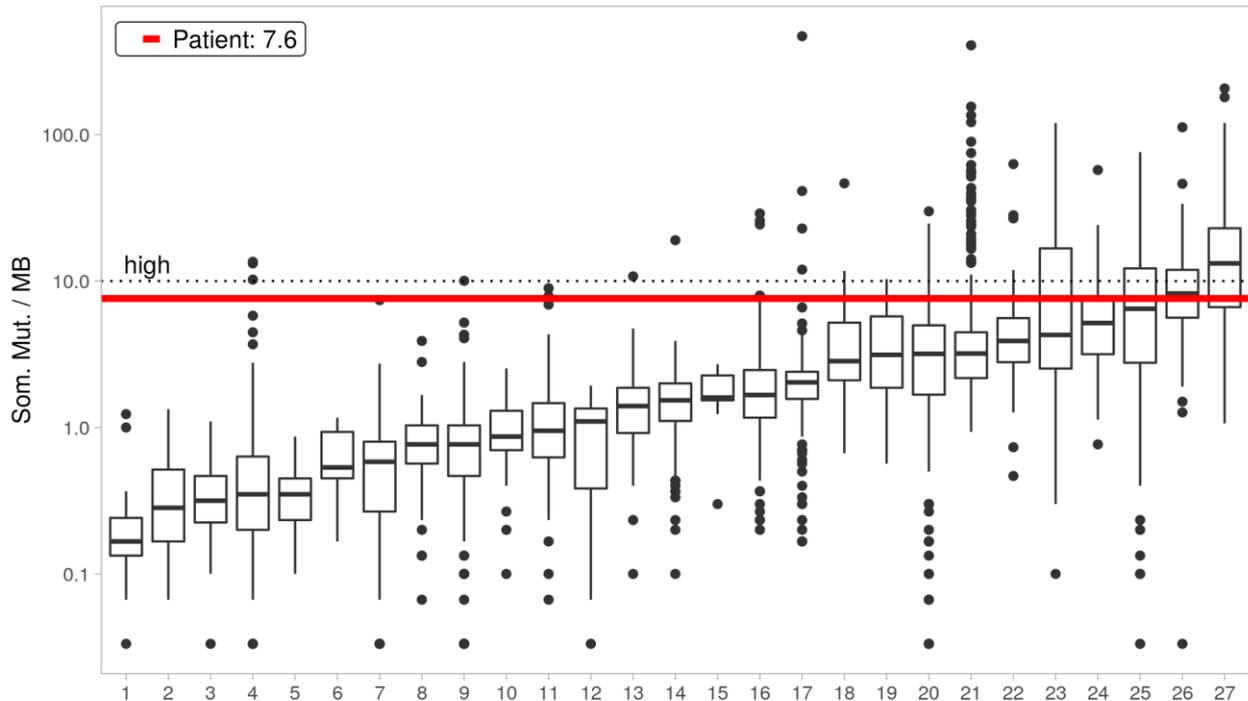
Bei dem oben beschriebenen Verfahren handelt es sich um einen inhouse entwickelten und validierten Test (Laboratory developed test; LDT). Dabei wurde ein Mindesttumorgehalt von 20 % zugrunde gelegt.

**Genetische Beratung** Bitte beachten Sie, dass dieser somatische Befund keine reguläre Keimbahndiagnostik ersetzen kann. Das Fehlen eines Hinweises auf therapierelevante oder wahrscheinlich ursächliche Keimbahnvarianten schließt das Vorhandensein von krankheitsrelevanten Keimbahnveränderungen nicht aus. Im Falle eines Nachweises einer Variante in der Keimbahn ist eine humangenetische Beratung in Erwägung zu ziehen. Die Klassifizierung von Varianten basiert auf den ACMG/ACGS-2020v4.01 Richtlinien (Richards et al., 2015, PMID: 25741868, <https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/>).

**Bezüglich Mitteilung, Weitergabe und wissenschaftlicher Verwendung dieses Befundes gelten die Bestimmungen des GenDG.**

## ANHANG - MUTATIONSLAST

Die nachfolgende Abbildung zeigt die aus den Paneldaten auf das Exom extrapolierte Mutationslast der hier analysierten Tumorstube (roter Querbalken) in Relation zur publizierten Mutationslast, wie sie für unterschiedliche Tumorentitäten ermittelt wurde (Lawrence et al., 2013, PMID: 23770567). Eine hohe Mutationslast wurde bereits bei unterschiedlichen Tumorentitäten in Verbindung mit einem Ansprechen auf Immuntherapien gebracht (Johnson et al., 2016, PMID: 27671167; Rizvi et al., 2015, PMID: 25765070; Snyder et al., 2014, PMID: 25409260; Le et al., 2015, PMID: 26028255; Bouffet et al., 2016, PMID: 27001570; Hellmann et al., 2018, PMID: 29658845; Reck et al., 2019, PMID: 31195357).

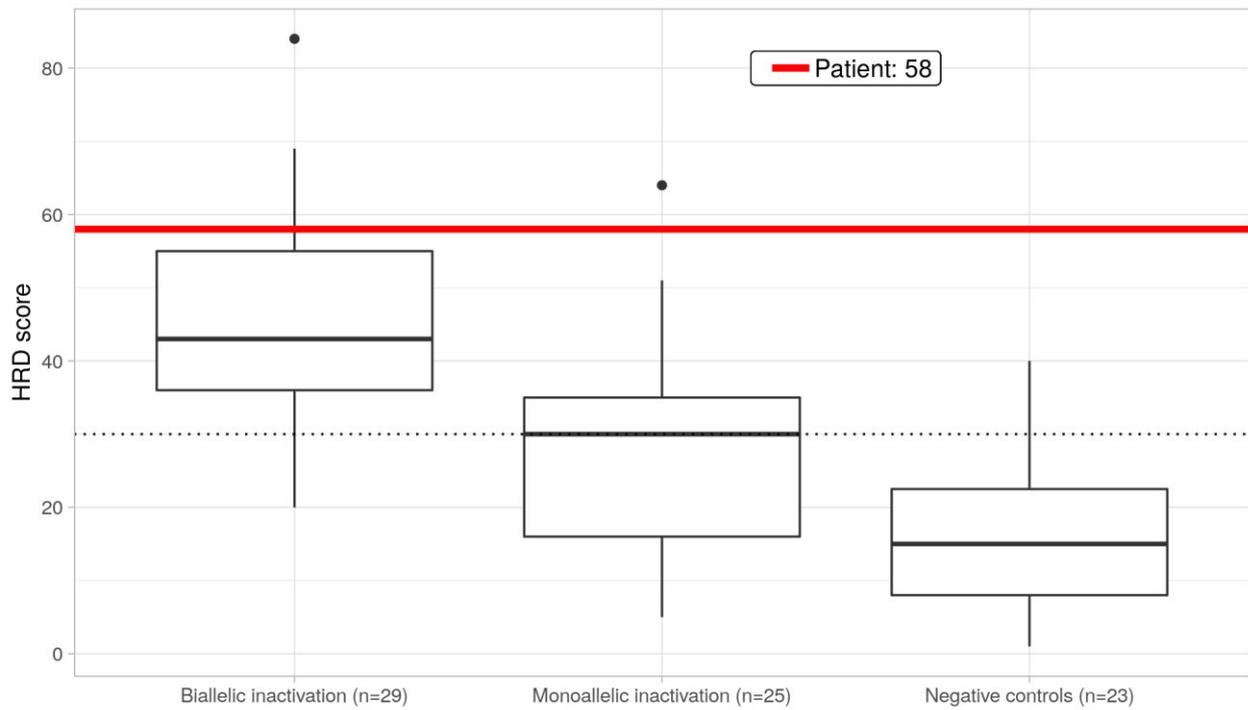


### Verteilung der Mutationslast in 27 Tumorentitäten

Dargestellt ist die Verteilung der Mutationslast innerhalb 27 unterschiedlicher Tumorentitäten (n = 3083) in Relation zur in dieser Analyse bestimmten Mutationslast von 7,6 Varianten/MB (roter Querbalken). Die Boxplots zeigen jeweils den Bereich, in den 50 % der Werte fallen (*interquartile* Range IQR; Abstand zwischen Perzentil 75 und 25) als Kasten, sowie den Median (zentraler Querbalken). Als Ausreißer (Kreise) werden Werte angezeigt, die mehr als das 1,5-fache des IQR abweichen (dargestellt durch vertikale Linien). Y-Achse in logarithmischer Skalierung. Eine hohe Mutationslast ( $\geq 10$  Mut/MB) ist durch eine gestrichelte Linie dargestellt (Hellmann et al., 2018, PMID: 29658845; Reck et al., 2019, PMID: 31195357).

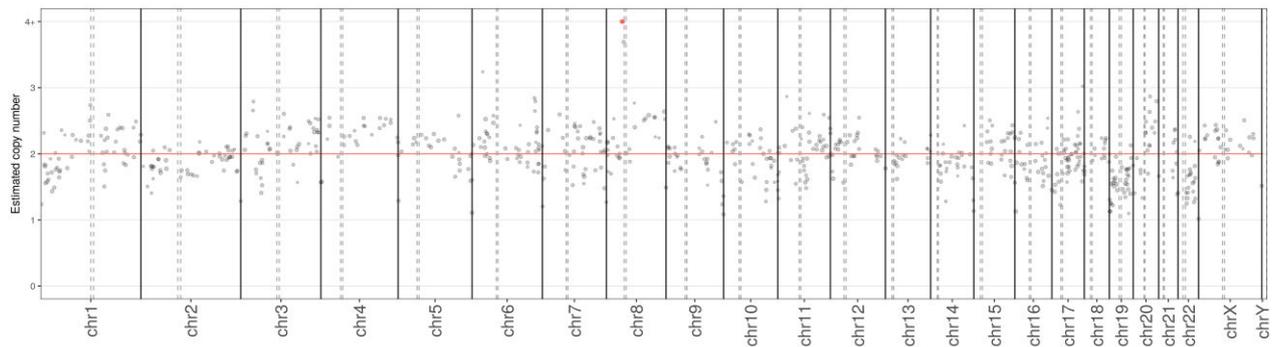
Dargestellte Tumorentitäten: (1) Rhabdoid-Tumore, (2) Ewing-Sarkom, (4) Akute myeloische Leukämie, (5) Medulloblastom, (6) Karzinoid, (7) Neuroblastom, (8) Prostatakarzinom, (9) Chronische lymphatische Leukämie, (10) Niedrig-maligne Gliome, (11) **Brustkrebs**, (12) Pankreaskarzinom, (13) Multiples Myelom, (14) Klarzelliges Nierenkarzinom, (15) Papilläres Nierenzellkarzinom, (16) Ovarialkarzinom, (17) Glioblastom, (18) Zervixkarzinom, (19) Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom, (20) Kopf-Hals-Karzinom, (21) Kolorektales Karzinom, (22) Ösophaguskarzinom, (23) Magentumore, (24) Blasenkarzinome, (25) Lungen-Adenokarzinome, (26) Lungen-Plattenepithelkarzinom, (27) Melanom (Abbildung verändert nach Lawrence et al., 2013, PMID: 23770567).

## ANHANG - HOMOLOGE-REKOMBINATIONS-DEFIZIENZ (HRD)

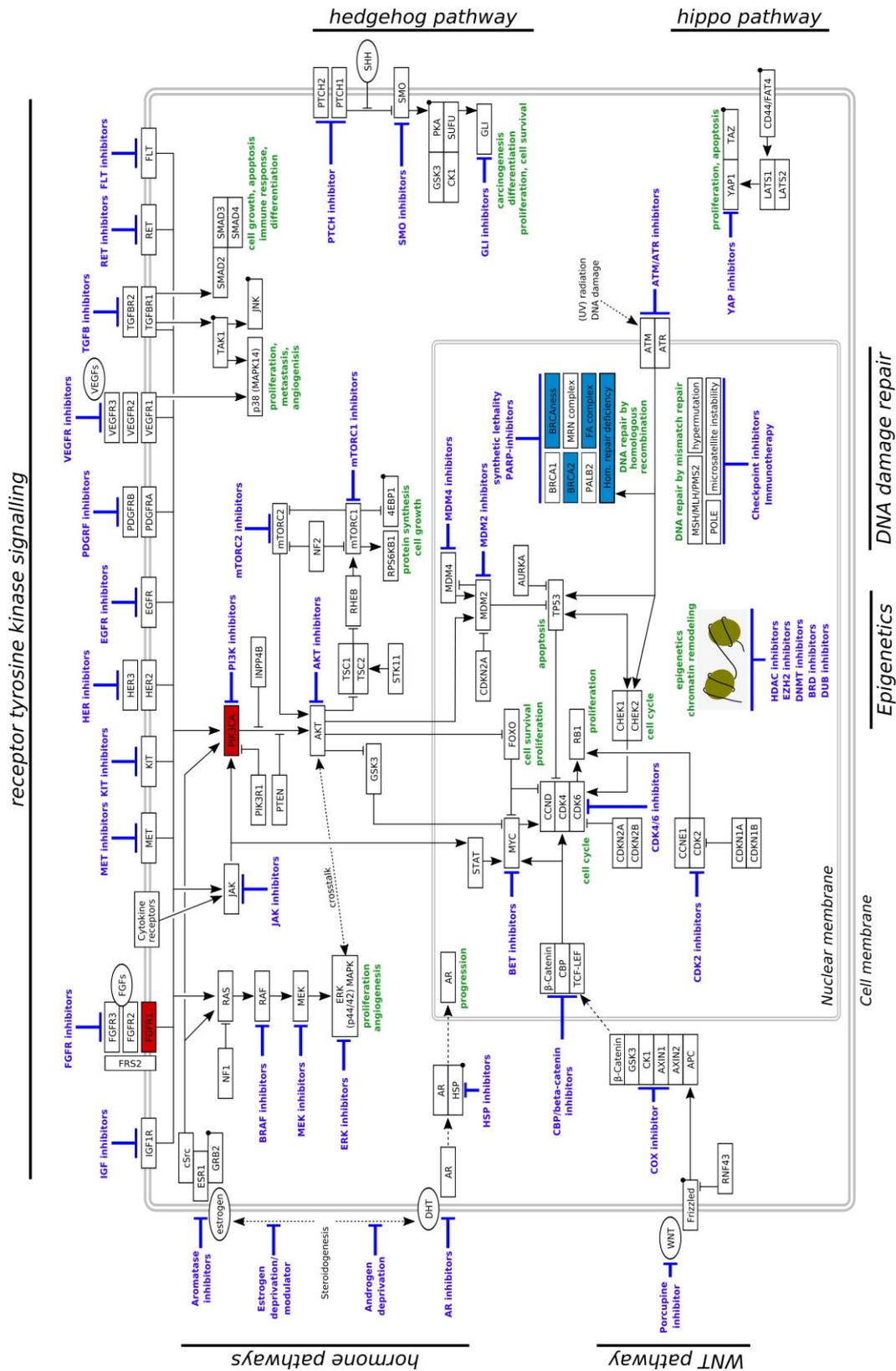


Homologe-Rekombinations-Defizienz (HRD)-Wert der untersuchten Probe im Vergleich zu Kohorten von Proben mit biallelischer Inaktivierung von HRD-assoziierten Genen, monoallelischer Inaktivierung von HRD-assoziierten Genen (oder Fehlen der zweiten Variante in den verfügbaren Daten) sowie Negativkontrollen ohne erkennbare Inaktivierung von HRD-assoziierten Genen. Der Wert wird als Summe der von Birkbak et al, 2012, PMID: 22576213; Abkevich et al, 2012, PMID: 23047548; Popova et al, 2012, PMID: 22933060 vorgeschlagenen Marker berechnet. Höhere Werte bedeuten eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer HRD.

## ANHANG - KOPIENZAHLVERÄNDERUNGEN



Das Genom eines Tumors kann größere Kopienzahlveränderungen aufweisen. Die Abbildung zeigt auf der X-Achse die Chromosomen, die Breite des jeweiligen Feldes ist hierbei proportional zur Basenanzahl im Chromosom dargestellt. Auf der Y-Achse werden die aus dem Coverage-Profil der sequenzierten Tumorprobe abgeleiteten Kopienzahlen dargestellt. Jeder Punkt enthält zusammengefasste Daten zur Abdeckung aus 1 Mb angereicherter DNA. Kopienzahlen von 0 (Homozygote Deletion) bis hin zu 4+ Kopien sind dargestellt. Ab 4 oder mehr Kopien werden die Datenpunkte rot markiert auf Höhe von 4 Kopien eingezeichnet. Bitte beachten Sie, dass der Tumorgehalt der Probe sowie dessen subklonale Zusammensetzung einen signifikanten Einfluss auf die errechneten Kopienzahlen haben können und die Abbildung nicht exakt die Kopienzahl in einer Tumorzelle wiedergeben kann, sondern die durchschnittliche Kopienzahl in der untersuchten Gewebeprobe darstellt.



Die Abbildung zeigt die wichtigsten Biomarker in tumor-relevanten Signalwegen inklusive der Angriffspunkte für potenzielle Medikamentengruppen. Ovale Felder: Liganden; Rechteckige Boxen: Untersuchte Biomarker; Rechteckige Boxen mit Punkt: Nicht untersuchte Biomarker; —|: Hemmung; →: Aktivierung; —|: inhibierende Substanzen; →: Transport. **Im Tumorgewebe Ihrer Patientin veränderte Biomarker wurden farblich hervorgehoben. Blau:** Biomarker wahrscheinlich inaktiviert; **Rot:** Biomarker wahrscheinlich aktiviert; **Braun:** Funktion des Biomarkers wahrscheinlich verändert; Bitte beachten Sie, dass Crosstalks, Feedback-Schleifen, Interferenz-Effekte sowie bekannte Resistenzmechanismen nicht dargestellt sind.

## IN FRAGE KOMMENDE MEDIKAMENTE

Wir weisen darauf hin, dass die hier erstellten Listen nur eine Auswahl an in Frage kommenden Medikamenten darstellen können.

### Mögliche Therapien/Medikamente aufgrund der Homologen Rekombinations-Defizienz und der Variante BRCA2 (Keimbahn), c.3847\_3848delGT; p.Val1283Lysfs\*2, NM\_000059.4

Medikament	Tumorentität	Zulassung	Zulassung beschränkt auf Biomarker/Sonstiges	Zulassung in Kombination mit weiterem Wirkstoff	
Niraparib PARP-Inhibitor	Eileiterkrebs	EMA	advanced or relapsed cancer, prior response to platinum-based chemotherapy		
		FDA	cancer associated with homologous recombination deficiency (HRD) adult patients, advanced or recurrent cancer, prior response to platinum-based chemotherapy		
	Ovarialkarzinom	EMA	advanced or relapsed cancer, prior response to platinum-based chemotherapy		
		FDA	cancer associated with homologous recombination deficiency (HRD) adult patients, advanced or recurrent cancer, prior response to platinum-based chemotherapy		
	Peritonealkarzinom	EMA	advanced or relapsed cancer, prior response to platinum-based chemotherapy		
		FDA	cancer associated with homologous recombination deficiency (HRD) adult patients, advanced or recurrent cancer, prior response to platinum-based chemotherapy		
	Olaparib PARP-Inhibitor	Brustkrebs	EMA	germline BRCA1/2 variant, HER2-negative or HR-positive adult patients, locally advanced or metastatic breast cancer, prior endocrine or chemo therapy	
			FDA	deleterious or suspected deleterious germline BRCA mutation, HER2-negative or HR-positive adult patients, high risk or metastatic cancer, prior adjuvant or neo-adjuvant therapy	
Eileiterkrebs		EMA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, advanced (FIGO stages III and IV) cancer, prior response to platinum-based chemotherapy		
		FDA	cancer associated with homologous recombination deficiency (HRD) adult patients, advanced cancers, prior response to platinum-based chemotherapy	Bevacizumab	
		FDA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, prior response to platinum-based chemotherapy		
Neoplasie des Pankreas		EMA	germline BRCA1/2 variant adult patients, metastatic adenocarcinoma of the pancreas, prior response to platinum-based chemotherapy		
		FDA	deleterious or suspected deleterious germline BRCA mutation adult patients, prior platinum-based chemotherapy		
Ovarialkarzinom		EMA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, advanced cancer (FIGO stages III and IV), prior response to platinum-based chemotherapy		
		FDA	cancer associated with homologous recombination deficiency (HRD) adult patients, advanced cancers, prior response to platinum-based chemotherapy	Bevacizumab	
		FDA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, prior response to platinum-based chemotherapy		

Medikament	Tumorentität	Zulassung	Zulassung beschränkt auf Biomarker/Sonstiges	Zulassung in Kombination mit weiterem Wirkstoff
	Peritonealkarzinom	EMA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, advanced (FIGO stages III and IV) cancer, prior response to platinum-based chemotherapy	
		FDA	cancer associated with homologous recombination deficiency (HRD) adult patients, advanced cancers, prior response to platinum-based chemotherapy	Bevacizumab
		FDA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, prior response to platinum-based chemotherapy	
	Prostatakarzinom	EMA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients with metastatic castration-resistant prostate cancer, following prior hormone therapy	
		FDA	HRD; BRCA1, BRCA2, ATM, BARD1, BRIP1, CDK12, CHEK1, CHEK2, FANCL, PALB2, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RAD54L adult patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC), prior treatment with enzalutamide or abiraterone	
		FDA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, recurrent cancer, prior response to platinum-based chemotherapy	
<b>Rucaparib</b> PARP-Inhibitor	Eileiterkrebs	EMA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, recurrent cancer, prior response to platinum-based chemotherapy	
		FDA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, prior response to platinum-based chemotherapy	
	Ovarialkarzinom	EMA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, recurrent cancer, prior response to platinum-based chemotherapy	
		FDA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, prior response to platinum-based chemotherapy	
	Peritonealkarzinom	EMA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, recurrent cancer, prior response to platinum-based chemotherapy	
		FDA	deleterious or suspected deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, prior response to platinum-based chemotherapy	
Prostatakarzinom	FDA	deleterious germline or somatic BRCA mutation adult patients, metastatic castration-resistant prostate cancer, prior androgen receptor-directed therapy and taxane-based chemotherapy		
<b>Talazoparib</b> PARP-Inhibitor	Brustkrebs	EMA	deleterious or suspected deleterious germline BRCA1/2 mutation, HER2-negative metastatic or locally advanced cancer, prior treatments (anthracycline and/or a taxane (neo)adjuvant; HR positive: endocrine-based therapy) or considered unsuitable for these treatments	
		FDA	deleterious or suspected deleterious germline BRCA mutation, HER2-negative metastatic or locally advanced cancer	

**PIK3CA, c.3140A>G; p.His1047Arg, NM\_006218.4:**

**Mögliche Therapien/Medikamente für das Gen PIK3CA**

Medikament	Tumorentität	Zulassung	Zulassung beschränkt auf Biomarker/Sonstiges	Zulassung in Kombination mit weiterem Wirkstoff
<b>Alpelisib</b> PI3K-Inhibitor	Brustkrebs	EMA	HR-positive, HER2-negative, PIK3CA mutated postmenopausal women, and men, locally advanced or metastatic breast cancer, prior endocrine therapy	Fulvestrant
		FDA	HR positive, HER2-negative, PIK3CA-mutated postmenopausal women, and men, advanced or metastatic breast cancer, prior endocrine-based therapy	Fulvestrant
<b>Copanlisib</b> PI3K-Inhibitor	Non-Hodgkin Lymphom (NHL)	FDA	adult patients with relapsed follicular lymphoma (FL), at least two prior systemic therapies	
<b>Duvelisib</b> PI3K-Inhibitor	Non-Hodgkin Lymphom (NHL)	EMA	- adult patients - Relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) or small lymphocytic lymphoma (SLL) after at least two prior therapies.	
		FDA	- Relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) after at least two prior therapies. - Follicular lymphoma (FL) that is refractory to at least two prior systemic therapies.	
<b>Idelalisib</b> PI3K-Inhibitor	Non-Hodgkin Lymphom (NHL)	EMA	adult patients with follicular lymphoma (FL) that is refractory to two prior lines of treatment.	
		EMA	adults with chronic lymphocytic leukemia (CLL), at least one prior therapy, as first line treatment in the presence of 17p deletion or TP53 mutation in patients who are not eligible for any other therapies	Rituximab, Ofatumumab
		FDA	in chronic lymphocytic leukemia (CLL)	Rituximab
<b>Everolimus</b> mTOR-Inhibitor	Brustkrebs	EMA	HR positive, HER2 negative postmenopausal women without symptomatic visceral disease after recurrence or progression following a non-steroidal aromatase inhibitor	Exemestane
		FDA	HR positive, HER2 negative advanced breast cancer, postmenopausal, recurrence or progression after treatment with letrozole or anastrozole	Exemestane
	Gliom	FDA	patients ages 1 year and older with tuberous sclerosis complex (TSC) who are diagnosed with SEGA that cannot be treated with surgery	
	Neuroendokrine Neoplasie	EMA	well-differentiated (Grade 1 or Grade 2) non-functional neuroendocrine tumours of gastrointestinal or lung origin in adults with progressive disease	
		FDA	adults, progressive, well-differentiated, nonfunctional neuroendocrine tumors (NET) of gastrointestinal (GI) or lung origin that are unresectable, locally advanced or metastatic	
	Neuroendokriner Tumor des Pankreas	EMA	unresectable or metastatic, well or moderately differentiated neuroendocrine tumours of pancreatic origin in adults with progressive disease.	
	Nierenzellkarzinom	EMA	advanced renal-cell carcinoma, progression on or after treatment with VEGF-targeted therapy	
		FDA	advanced renal cell carcinoma (RCC) after failure of treatment with sunitinib or sorafenib; adult patients with kidney tumors known as renal angiomyolipomas and tuberous sclerosis complex (TSC), who do not require immediate surgery	
<b>Sirolimus</b> mTOR-Inhibitor	Weichgewebstumor	FDA	adult patients with locally advanced unresectable or metastatic malignant perivascular epithelioid cell tumor (PEComa)	
<b>Temsirolimus</b> mTOR-Inhibitor	Nierenzellkarzinom	EMA	first-line treatment, adult, advanced renal-cell carcinoma (RCC) who have at least three of six prognostic risk factors	
		FDA	advanced renal cell carcinoma	
	Non-Hodgkin Lymphom (NHL)	EMA	adult patients with relapsed and/or refractory mantle-cell lymphoma (MCL)	

**FGFR1, Amplifikation, Komplettes Gen, nicht fokal (~10 Kopien):**

**Mögliche Therapien/Medikamente für das Gen FGFR1**

Medikament	Tumorentität	Zulassung	Zulassung beschränkt auf Biomarker/Sonstiges	Zulassung in Kombination mit weiterem Wirkstoff
<b>Ponatinib</b> BCR-ABL-Inhibitor FGFR-Inhibitor PDGFR-Inhibitor VEGF/VEGFR-Inhibitor	Lymphatische Leukämie (ALL, CLL)	EMA	Philadelphia chromosome positive, ABL T315I intolerant or resistant to dasatinib or nilotinib, imatinib is not considered appropriate	
		FDA	Philadelphia chromosome positive, T315I no other kinase inhibitors indicated	
	Myeloische Leukämie (AML, CML)	EMA	T315I chronic, accelerated or blast phase, intolerant or resistant to dasatinib, imatinib is not considered appropriate	
		FDA	Philadelphia chromosome positive, T315I resistance/intolerance to at least two prior kinase inhibitors, no other kinase inhibitors indicated	
<b>Erdafitinib</b> FGFR-Inhibitor	Blasenkarzinom	FDA	FGFR2, FGFR3 alteration adult, advanced or metastatic, progressed during/following prior platinum-containing chemotherapy	
<b>Infigratinib (BGJ398)</b> FGFR-Inhibitor	Cholangiozelluläres Karzinom	FDA	FGFR2 fusion or other rearrangement adult, previously treated, unresectable locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma	
<b>Lenvatinib</b> FGFR-Inhibitor KIT-Inhibitor PDGFR-Inhibitor RET-Inhibitor VEGF/VEGFR-Inhibitor	Endometriumkarzinom	EMA	adult, advanced or recurrent, previous platinum-based treatment, surgery or radiation impossible	Pembrolizumab
		FDA	not MSI-high oder dMMR advanced, progression, prior systemic therapy, surgery or radiation impossible	
	Hepatozelluläres Karzinom	EMA	adult, no previous therapy, advanced or not eligible for surgery	
		FDA	unresectable hepatocellular carcinoma	
	Nierenzellkarzinom	EMA	adult, advanced renal cell carcinoma, first line treatment	Pembrolizumab
		EMA	adult, advanced renal cell carcinoma, prior VEGF-targeted therapy	Everolimus
	Schilddrüsenkarzinom	FDA	advanced renal cell carcinoma, previously treated with an anti-angiogenic therapy	Everolimus
		EMA	adult, differentiated, progressed or spread, resistance to treatment with radioactive iodine	
<b>Pazopanib</b> FGFR-Inhibitor KIT-Inhibitor PDGFR-Inhibitor VEGF/VEGFR-Inhibitor	Nierenzellkarzinom	EMA	advanced renal cell carcinoma, no previous treatment or in patients who have already been treated cytokines	
		FDA	advanced renal cell carcinoma	
<b>Nintedanib</b> FGFR-Inhibitor PDGFR-Inhibitor VEGF/VEGFR-Inhibitor	Sarkom	EMA	adults, previously treated with chemotherapy because their cancer had spread, or progress within 12 months after receiving adjuvant or neoadjuvant therapy	
		FDA	advanced soft tissue sarcoma	
<b>Pemigatinib</b> FGFR-Inhibitor selektiver FGFR-Inhibitor	Cholangiozelluläres Karzinom	EMA	abnormal FGFR2 adult, spreaded, removal surgery impossible, worsened after previous treatment with at least one cancer medicine	Docetaxel
		FDA	FGFR2 fusions or rearrangements locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma	

