

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

Herr  
Dr. med. Richard Roe  
Paul-Ehrlich-Str. 23  
72076 Tübingen

<b>Name</b>	Doe, Jane (*TT.MM.JJJJ)
<b>Geschlecht</b>	weiblich
<b>Patienten-ID</b>	#
<b>Probeneingang</b>	TT.MM.JJJJ (Tumor- FFPE)
<b>Befunddatum</b>	TT.MM.JJJJ

## Molekularpathologischer Befund – Doe, Jane (\*TT.MM.JJJJ)

**Indikation** Mammakarzinom (ED MM/JJJJ)

### ERGEBNIS

- Es wurden potenziell therapierelevante Veränderungen in den angeforderten Genen nachgewiesen.

#### 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
BRCA2	stop_gained	c.3847_3848delGT; p.Val1283Lysfs*2  und Verlust des Wildtyp-Allels	0,75	inaktivierend	PARP-Inhibitor	EMA* & FDA*	EMA* & FDA*

**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 VARIANTEN

In folgender Tabelle sind alle Varianten gelistet (Einzelnukleotid-Varianten und kleine Deletionen/Insertionen ( $\leq 40$ bp)), die innerhalb der sequenzierten Region (Molekularpathologie Version 2, Bewertungskriterien: Methodenteil 1. Absatz) automatisch erfasst wurden.

Gen	Funktionelle Klasse	Variante	Transkript	NAF
BRCA2	stop_gained	c.3847_3848delGT; p.Val1283Lysfs*2	NM_000059.4	0,86

**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.

## EMPFEHLUNG

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

Für Rückfragen stehen wir selbstverständlich jederzeit gerne zur Verfügung.

Befund erstellt von: XXX

Geprüft durch: XXX

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>Molekulargenetische Analyse aus Tumorgewebe</b> (Molekularpathologie Modul „BRCA1 und BRCA2“)
<b>Probenmaterial</b>	<b>Tumorgewebe: Probe des bekannten Mammakarzinoms</b> Probenentnahme MM/JJJJ DNA-Isolierung aus FFPE Material (FFPE-ID: XXX) nach Makrodissektion mit geschätztem Tumorgehalt von 80 % (HE Färbung)
<b>Probeneingang</b>	TT.MM.JJJJ (Tumor-FFPE)
<b>Untersuchte Regionen</b>	<i>BRCA1</i> (NM_007294.4), <i>BRCA2</i> (NM_000059.4)
<b>Methoden</b>	<b>DNA-Isolierung:</b> Die Isolierung der Tumor-DNA wurde durch das Zentrum für Humangenetik Tübingen durchgeführt. Falls nötig, wurde eine Makrodissektion durchgeführt. Eine ggf. durchgeführte Begutachtung des Tumormaterials erfolgte durch einen Pathologen.

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.

**Probenqualität:** 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 Varianten kann unter Umständen nur stark eingeschränkt oder gar nicht erfolgen.

**Sequenzierung:** Es wurde DNA aus 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.

**Bioinformatik:** 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.

**Genetische Datenauswertung:** 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 93,95 % der kodierenden Bereiche erreicht. Der pathologisch bestimmte Tumorgehalt der Probe beträgt 80 %. Somatische Veränderungen treten somit rechnerisch mit einer NAF von 40 % auf. Bei einer Sequenziertiefe von 25 Reads pro Base wird eine theoretische Sensitivität von > 99 % für die Detektion von Varianten mit einer NAF  $\geq$  40 % erreicht. Die Nomenklatur gefundener Varianten erfolgt nach den Richtlinien der HGVS. Bitte beachten Sie, dass befundete Varianten auch in der Keimbahn vorliegen können.

**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.

**Vorhersage struktureller Varianten:** 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.

**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.

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 Mindestumorgehalt von 20 % zugrunde gelegt.

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

## IN FRAGE KOMMENDE MEDIKAMENTE

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

### BRCA2, c.8935A>T; p.Lys2979\*, NM\_000059.4:

#### Mögliche Therapien/Medikamente für das Gen BRCA2

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 chemotherapy	
		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	
	Ovarialkarzinom	FDA	deleterious or suspected deleterious germline BRCA mutation adult patients, prior platinum-based chemotherapy	
		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	
	<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	<b>Brustkrebs</b>	<b>EMA</b>	<b>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</b>	
		<b>FDA</b>	<b>deleterious or suspected deleterious germline BRCA mutation, HER2-negative metastatic or locally advanced cancer</b>	