

Name	Doe, Jane (*TT.MM.JJJJ)
Geschlecht	weiblich
Patienten-ID	#####
Befunddatum	TT.MM.JJJJ
Befund-ID	R#####

CancerDetect® Befund (zellfreie DNA-Analyse) – Doe, Jane (*TT.MM.JJJJ)

Indikation Melanom

Ergebnis

- Es wurden Veränderungen mit potenzieller Therapierelevanz 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
BRAF	missense	c.1799T>A; p.Val600Glu	0,0240 (2,40%)	aktivierend	BRAF-Inhibitor	EMA & FDA*	EMA* & FDA*
					MEK-Inhibitor	EMA* & FDA*	EMA* & FDA*
					Mögliche Resistenz ggü. EGFR/HER-Inhibitor	N/A	N/A
TP53	missense	c.818G>A; p.Arg273His	0,0431 (4,31%)	Funktion verändert	CHK1-Inhibitor	nein	nein
					Wee-Inhibitor	nein	nein

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 zielgerichtete 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 (CFD-Panel V.1) automatisch erfasst wurden.

Gen	Funktionelle Klasse	Variante	Transkript	NAF
<i>BRAF</i>	missense	c.1799T>A; p.Val600Glu	NM_004333.6	0,0240 (2,40%)
<i>TP53</i>	missense	c.818G>A; p.Arg273His	NM_000546.6	0,0431 (4,31%)

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: Dr. rer. nat. Vorname Nachname

Geprüft durch: Dr. rer. nat. Vorname Nachname

Mit freundlichen Grüßen

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

Dr. med. Friedmar Kreuz, M.A.

Fachärztin/Facharzt für Humangenetik

Ergänzende Informationen

Auftrag	Hoch sensitive UMI-basierte molekulargenetische Analyse einer Liquid Biopsy-Probe
Probenmaterial	Tumorgewebe: Zellfreie DNA (cfDNA) Probenentnahme MM/JJJJ Diagnostisch bestimmter Tumorgehalt 5-10 %
Probeneingang	TT.MM.JJJJ (Streck-Blut für cfDNA)
Untersuchte Regionen	<i>AKT1</i> Exon 2 (NM_005163.2), <i>ALK</i> Exons 21-25 (NM_004304.5), <i>ARAF</i> Exon 6 (NM_001654.5), <i>BRAF</i> Exons 11, 15 (NM_004333.6), <i>CTNNB1</i> Exon 2 (NM_001904.4), <i>EGFR</i> Exons 18-21 (NM_005228.5), <i>ERBB2</i> Exons 8, 19-21 (NM_004448.4), <i>ERBB3</i> Exons 3, 6-9, 23 (NM_001982.4), <i>ERBB4</i> Exon 12 (NM_005235.3), <i>ESR1</i> Exons 4-8 (NM_000125.4), <i>FGFR2</i> Exons 6, 8, 11 (NM_000141.5), <i>FGFR3</i> Exon 12 (NM_000142.5), <i>GNA11</i> Exon 5 (NM_002067.5), <i>GNAQ</i> Exon 5 (NM_002072.5), <i>GNAS</i> Exons 8+9 (NM_000516.7), <i>H3-3A</i> Exon 1 (NM_002107.7), <i>H3-3B</i> Exon 1 (NM_005324.5), <i>HRAS</i> Exons 1-3 (NM_005343.4), <i>IDH1</i> Exon 2 (NM_005896.4), <i>IDH2</i> Exon 4 (NM_002168.4), <i>JAK2</i> Exon 12 (NM_004972.4), <i>KIT</i> Exons 9, 11, 13+14, 17+18 (NM_000222.3), <i>KRAS</i> Exons 1-3 (NM_004985.5), <i>MAP2K1</i> Exon 3 (NM_002755.4), <i>MET</i> Exon 18 (NM_000245.4), <i>MYCN</i> Exon 1 (NM_005378.6), <i>NRAS</i> Exons 1-3 (NM_002524.5), <i>PDGFRA</i> Exons 4, 9, 11, 13, 17 (NM_006206.6), <i>PIK3CA</i> Exons 4, 7, 9, 13, 20 (NM_006218.4), <i>PTEN</i> Exons 5-7 (NM_000314.8), <i>RAC1</i> Exon 2 (NM_018890.4), <i>RAF1</i> Exon 6 (NM_002880.4), <i>RET</i> Exons 10+11, 13-16 (NM_020975.6), <i>STAT5B</i> Exon 15 (NM_012448.4), <i>TERT</i> Promotor (NM_198253.3), <i>TP53</i> (NM_000546.6) (cfDNA-Diagnostik Version 1, Exon Nummern beziehen sich auf die kodierenden Exons in den jeweils angegebenen Transkripten)
Methoden	DNA-Isolierung: Die Isolierung der cfDNA wurde von der CeGaT GmbH durchgeführt. Probenqualität: Die Eignung einer Probe für molekulargenetische Analysen wird durch den Tumorgehalt und die Qualität des Ausgangsmaterials beeinflusst. Im Falle schlechter Probenqualität kann die Detektion von Varianten unter Umständen nur stark eingeschränkt oder gar nicht erfolgen. Sequenzierung: Die extrahierten DNA-Moleküle wurden mit dual unique molecular indices (UMI) versehen. Die Zielregion wurde 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 Sequenzierduplikate, die wahrscheinlich auf die Amplifikation zurückzuführen sind. Die UMI Informationen wurden genutzt, um die Sequenzen in einer einzelnen Konsensus-Sequenz zu kombinieren. Nur DNA-Moleküle, die in beiden Richtungen mit passendem Konsensus sequenziert wurden, wurden für die Bestimmung von Sequenzvarianten (Einzelnukleotidaustausche und kurze Insertionen/Deletionen) herangezogen. Diese wurden mit verschiedenen internen und externen Datenbanken annotiert. Genetische Datenauswertung: Bewertet werden alle somatischen Varianten (SNVs/Small Indels) mit einer Novel Allelfrequenz (NAF) von $\geq 0,25\%$ in der Tumorable. Eine klinische Interpretation erfolgt anhand unterschiedlicher externer und interner Datenbanken sowie einer Literaturrecherche. Die Sensitivität des Tests ist abhängig vom Tumorgehalt des Untersuchungsmaterials, der Probenqualität sowie der Sequenziertiefe. Bei einer Sequenziertiefe von 1000 Reads pro Base wird eine theoretische Sensitivität von $> 91\%$ für die Detektion von Varianten mit einer NAF $\geq 0,25\%$ erreicht. Im vorliegenden Fall wurde mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung eine Sequenziertiefe von min. 1000X für 94,5 % der kodierenden Bereiche 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, TP53 Datenbank (ISB-CGC), CKB, OncoKB, PubMed Recherche) und/oder auf einer <i>in silico</i> -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 <i>in vivo/in vitro</i> 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.

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 Mindesttumorgehalt von 0,5 % zugrunde gelegt.

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

Anhang - in Frage kommende Medikamente

Wir weisen darauf hin, dass die hier erstellten Listen nur eine Auswahl an in Frage kommenden Medikamenten darstellen können. Die Aufzählung beschränkt sich zudem auf zielgerichtete Therapien und enthält keine gängigen Chemotherapien.

Zulassungen, welche die Tumorentität Ihres Patienten betreffen, werden Blau hervorgehoben.

BRAF, c.1799T>A; p.Val600Glu, NM_004333.6:

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

Medikament	Tumorentität	Zu- lassung	Zulassung beschränkt auf Biomarker/Sonstiges	Zulassung in Kombination mit weiterem Wirkstoff
Dabrafenib BRAF-Inhibitor	Melanom	EMA	BRAF V600 mutation adult patients, unresectable or metastatic melanoma or stage III melanoma after surgery	Trametinib
		EMA	BRAF V600 mutation adult patients, unresectable or metastatic melanoma	
		FDA	BRAF V600E or V600K unresectable or metastatic melanoma; adjuvant treatment and involvement of lymph node(s), following complete resection	Trametinib
		FDA	BRAF V600E unresectable or metastatic	
	Neoplasie	FDA	BRAF V600E patients 6 years and older, unresectable or metastatic solid tumor, progress following prior treatment, no satisfactory alternative treatment options not indicated for colorectal cancer!	Trametinib
Encorafenib BRAF-Inhibitor	Melanom	EMA	BRAF V600 mutation adult patients, unresectable or metastatic melanoma	Binimetinib
		FDA	BRAF V600E or BRAF V600K unresectable or metastatic melanoma	Binimetinib
Vemurafenib BRAF-Inhibitor	Melanom	EMA	BRAF V600 mutation adult patients, metastatic or unresectable melanoma	
		FDA	BRAF V600E metastatic or unresectable melanoma	
Sorafenib BRAF-Inhibitor FLT3-Inhibitor KIT-Inhibitor PDGFR-Inhibitor VEGF/VEGFR-Inhibitor pan-RAF(Dimer)-Inhibitor	Hepatozelluläres Karzinom	EMA		
		FDA	unresectable hepatocellular carcinoma (HCC)	
	Nierenzellkarzinom	EMA	advanced disease, failed prior interferon-alpha or interleukin-2 based therapy or considered unsuitable for such therapy	
		FDA	locally advanced / metastatic Renal Cell (clear cell) Carcinoma (RCC), failure or intolerance to prior systemic therapy	
	Schilddrüsenkarzinom	EMA	progressive, locally advanced or metastatic, differentiated (papillary/follicular/Hürthle cell) thyroid carcinoma, refractory to radioactive iodine	
		FDA	late-stage (metastatic) differentiated thyroid cancer, radioactive iodine-refractory	
Binimetinib MEK-Inhibitor	Melanom	EMA	BRAF V600 adult patients with unresectable or metastatic melanoma	Encorafenib
		FDA	BRAF V600E or V600K unresectable or metastatic melanoma	Encorafenib
Cobimetinib MEK-Inhibitor	Melanom	EMA	BRAF V600 unresectable or metastatic melanoma	Vemurafenib
		FDA	BRAF V600E or V600K unresectable or metastatic melanoma	Vemurafenib
Selumetinib MEK-Inhibitor	Neurofibrom	EMA	pediatric patients 3 years of age and older with neurofibromatosis type 1 (NF1) who have symptomatic, inoperable plexiform neurofibromas	
		FDA	pediatric patients 2 years of age and older with neurofibromatosis type 1 (NF1) who have symptomatic, inoperable plexiform neurofibromas	

Medikament	Tumorentität	Zu- lassung	Zulassung beschränkt auf Biomarker/Sonstiges	Zulassung in Kombination mit weiterem Wirkstoff
Trametinib MEK-Inhibitor	Melanom	EMA	BRAF V600 adult patients with unresectable or metastatic melanoma; adjuvant treatment of adult patients with Stage III melanoma following complete resection	Dabrafenib
		EMA	BRAF V600 adult patients with unresectable or metastatic melanoma; monotherapy has not demonstrated clinical activity in patients who have progressed on a prior BRAF inhibitor therapy	
		FDA	BRAF V600E or V600K -unresectable or metastatic melanoma -adjuvant treatment and involvement of lymph node(s), following complete resection	Dabrafenib
		FDA	BRAF V600E or V600K BRAF-inhibitor treatment-naïve patients with unresectable or metastatic melanoma	
	Neoplasie	FDA	BRAF V600E patients 6 years and older, unresectable or metastatic solid tumor, progress following prior treatment, no satisfactory alternative treatment options; not indicated for colorectal cancer	Dabrafenib