

CeGaT GmbH | Paul-Ehrlich-Str. 23 | D-72076 Tübingen

Dr. med. Richard Roe  
Paul-Ehrlich-Straße 23  
72076 Tübingen

<b>Name</b>	Doe, Jane (*TT.MM.JJJJ)
<b>Geschlecht</b>	Weiblich
<b>Patienten-ID</b>	123456
<b>Befunddatum</b>	TT.MM.JJJJ
<b>Befund-ID</b>	R999999999

## CancerDetect® Verlaufsbefund (Zellfreie DNA Analyse) Doe, Jane (\*TT.MM.JJJJ)

Indikation                      Brustkrebs (ED 10/2022)

### Ergebnis

- Es wurde die bislang noch nicht nachgewiesene Variante **c.1613A>G; p.Asp538Gly** im Gen **ESR1** in dieser Analyse nachgewiesen.
- Die **vorbekannten Veränderungen** in den Genen **PIK3CA** und **TP53** wurden in dieser Analyse erneut nachgewiesen.

### Beobachtete Veränderungen:

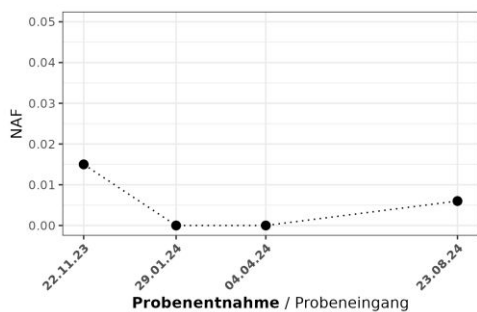
Gen	Funktionelle Klasse	Variante	Transkript	NAF	Einfluss auf die Proteinfunktion
<i>PIK3CA</i>	missense	c.3140A>G; p.His1047Arg chr3:178952085 A>G (hg19)	NM_006218.4	0,0060 (0,60%)	aktivierend
<i>TP53</i>	essential_splice_site	c.994-2A>C; p.? chr17:7574035 T>G (hg19)	NM_000546.6	0,0054 (0,54%)	inaktivierend
<i>ESR1</i>	missense	c.1613A>G; p.Asp538Gly chr6:152419926 A>G (hg19)	NM_000125.4	0,0070 (0,70%)	aktivierend

Diese Tabelle enthält alle Veränderungen, die in allen analysierten Proben innerhalb der sequenzierten Region (CancerDetect® Version 2) nachgewiesen wurden. Weitere Details zum Monitoring dieser Varianten finden Sie im Anhang. Informationen zur Interpretation dieser Tabelle können im Abschnitt *Ergänzende Informationen* eingesehen werden.

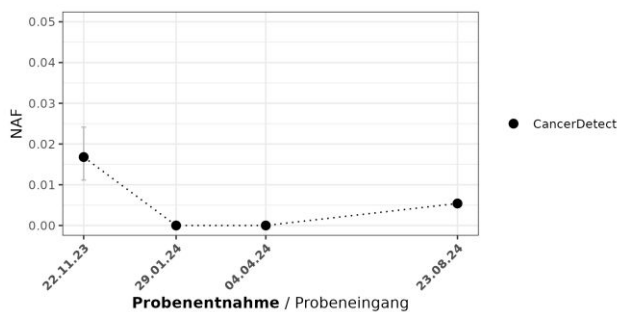
### Frequenzveränderungen relevanter Varianten über die Zeit:

Die nachstehenden Abbildungen zeigen für jede Variante die Veränderung der Allelfrequenz (NAF) in der zellfreien DNA als Prozentangabe über verschiedene Probenentnahmezeiten. Weitere Einzelheiten zu den Analysen werden im Anhang gelistet. Weitere Informationen zur Interpretation der Verlaufsgrafiken sind im Abschnitt *Zusätzliche Informationen* zu finden.

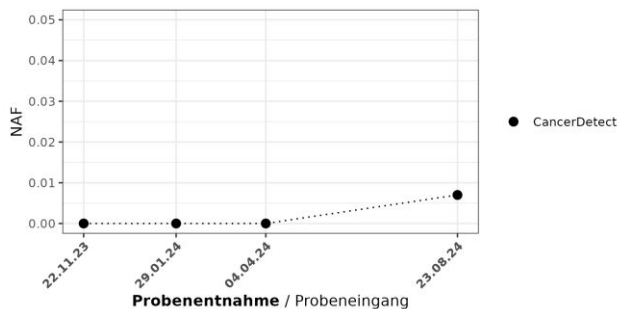
### PIK3CA, c.3140A>G; p.His1047Arg



### TP53, c.994-2A>C; p.?



### ESR1, c.1613A>G; p.Asp538Gly



## Empfehlung und Interpretation

Der Vergleich der Ergebnisse der aktuellen Probe mit der zuvor erfolgten Analyse zeigt einen Anstieg der Frequenz der detektierten Veränderungen. Dieses Ergebnis kann als Hinweis auf einen progressiven Krankheitsverlauf interpretiert werden.

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Analyse werden bildgebende Verfahren (z. B. MRT/CT) zur Überwachung eines möglicherweise progredienten Krankheitsverlaufs dringend empfohlen.

Bildgebende Verfahren (z. B. MRT/CT) zur Überwachung des Krankheitsverlaufs sollten unabhängig von molekulargenetischen Verfahren durchgeführt werden.

Die subklonale Zusammensetzung eines Tumors kann sich unter Therapie verändern, was die Allelfrequenzen der Zielvarianten beeinflussen kann. Ein Nicht-Nachweis einer Variante, eine Abnahme der Allelfrequenz oder keine Veränderung der Allelfrequenz einer somatischen Variante ist nicht zwangsläufig ein Beweis für einen stabilen Krankheitszustand oder einen regressiven Krankheitsverlauf, während ein Anstieg der Allelfrequenz einer Variante nicht zwangsläufig einen Beweis für einen progressiven Krankheitsverlauf darstellt.

**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

Validiert durch: Dr. rer. nat. Vorname Nachname

Mit freundlichen Grüßen



Dr. med. Berit Kerner

Fachärztin für Humangenetik

## Ergänzende Informationen

<b>Auftrag</b>	<b>Hoch sensitive UMI-basierte molekulargenetische Analyse einer Liquid biopsy Probe</b>
<b>Probenmaterial</b>	<b>Tumorgewebe: Zellfreie DNA (cfDNA)</b> Probenentnahme 23.08.2024 DNA-Isolierung aus STRECK-Blut mit diagnostisch geschätztem Tumorgehalt von 1,4 %
<b>Probeneingang</b>	27.08.2024 (Tumor-DNA: Streck Blut, ID P1234567_8)
<b>Untersuchte Regionen</b>	<i>AKT1</i> Exon 2 (NM_005163.2), <i>ALK</i> Exons 22-25 (NM_004304.5), <i>AR</i> Exons 4+5, 8 (NM_000044.6), <i>BRAF</i> Exons 11, 15 (NM_004333.6), <i>CDKN2A</i> komplettes Gen (NM_000077.5), <i>CTNNB1</i> Exons 2, 6+7 (NM_001904.4), <i>EGFR</i> Exons 2+3, 6+7, 15, 18-21 (NM_005228.5), <i>ERBB2</i> Exons 8, 17, 19-21 (NM_004448.4), <i>ERBB3</i> Exons 3, 7-9, 23 (NM_001982.4), <i>ESR1</i> Exons 4+5, 7+8 (NM_000125.4), <i>FGFR1</i> Exons 11-13 (NM_023110.3), <i>FGFR2</i> Exons 6, 8, 11-13 (NM_000141.5), <i>FGFR3</i> Exons 6, 8, 13 (NM_000142.5), <i>GNA11</i> Exons 4+5 (NM_002067.5), <i>GNAQ</i> Exons 2, 4+5 (NM_002072.5), <i>GNAS</i> Exon 8 (NM_000516.7), <i>H3-3A</i> Exon 1 (NM_002107.7), <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 (NM_000222.3), <i>KRAS</i> Exons 1-3 (NM_004985.5), <i>MET</i> Exons 13, 15, 18 (NM_001127500.3), <i>NRAS</i> Exons 1-3 (NM_002524.5), <i>PDGFRA</i> Exons 11, 13, 17 (NM_006206.6), <i>PIK3CA</i> Exons 1, 4, 7, 9, 13, 20 (NM_006218.4), <i>PTEN</i> komplettes Gen (NM_000314.8), <i>RET</i> Exons 10+11, 13-16 (NM_020975.6), <i>TERT</i> Promotor (NM_198253.3), <i>TP53</i> komplettes Gen (NM_000546.6) (cfDNA-Diagnostik Version 2, Exon Nummern beziehen sich auf die kodierenden Exons in den jeweils angegebenen Transkripten)
<b>Information zur Interpretation der Tabellen und Abbildungen</b>	<b>NAF: Novel allele frequency</b> , 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. Eine Frequenzwert (NAF) von Null oder die Angabe <i>n.d.</i> zeigt an, dass eine Variante in der jeweiligen Analyse nicht nachgewiesen wurde.  Bitte beachten Sie, dass vorhandene Sequenzierungsergebnisse basierend auf unterschiedlichen Anreicherungstechniken zum Monitoring eingesetzt werden können. Diese können ggf. nicht jede zur Verlaufsbestimmung geeignete Variante technisch bedingt abdecken. In den Tabellen sind zu einem Entnahmezeitpunkt einer Liquid Biopsy Probe mit der angewandten Technologie nicht abdeckbare Varianten mit einem "-" gekennzeichnet. In den grafischen Verlaufsdarstellungen werden keine Angaben zur Frequenz einer Variante hinterlegt, sofern die Probe mit einer Anreicherungstechnik sequenziert wurde, die die entsprechende Variante nicht detektieren kann. Die unterschiedlichen technologischen Ansätze weisen zudem eine unterschiedliche Sensitivität bei der Detektion somatischer Varianten auf. Für CancerDetect® Analysen (UMI basiert) können Varianten ab einer NAF von 0,25 % erfasst werden, wohingegen für CancerPrecision® Analysen (Tumor-Panel) und CancerNeo® Analysen (CeGaT ExomeXtra®-basierte) Varianten erst ab 5 % NAF detektiert werden können (bekannte Hotspot-Varianten können ggf. auch bis zu einer NAF von $\geq 2\%$ nachgewiesen werden).  <b>Proteinfunktion:</b> 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.
<b>Methoden</b>	<b>DNA-Isolierung:</b> 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 NovaSeq 6000/NovaSeq X Plus 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 Tumprobe. 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 78,61 % 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 *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.

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.**

## Supplement – Frequenzveränderung relevanter Varianten

Diese Tabelle enthält alle Veränderungen, die in allen analysierten Proben innerhalb der sequenzierten Region (CancerDetect® Version 2) nachgewiesen wurden.

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

Befund	Probenentnahme / Probeneingang	Isolationstyp	Probenmaterial	Analyse	Tumorgehalt	NAF	zellfreie DNA Menge
R1234567	23.08.2024	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 2	1.4%	0,0060 (0,60%)	0,24 µg / 18,00 ng/µl
R1234567	04.04.2024	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 1	n.d.	n.d.	0,09 µg / 1,80 ng/µl
R1234567	29.01.2024	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 1	n.d.	n.d.	0,07 µg / 2,50 ng/µl
R1234567	22.11.2023	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 1	3%	0,0150 (1,50%)	0,18 µg / 12,90 ng/µl

Informationen zur Interpretation dieser Tabelle können im Abschnitt *Ergänzende Informationen* eingesehen werden.

### TP53, c.994-2A>C; p.?, NM\_000546.6

Befund	Probenentnahme / Probeneingang	Isolationstyp	Probenmaterial	Analyse	Tumorgehalt	NAF	zellfreie DNA Menge
R1234567	23.08.2024	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 2	1.4%	0,0054 (0,54%)	0,24 µg / 18,00 ng/µl
R1234567	04.04.2024	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 1	n.d.	n.d.	0,09 µg / 1,80 ng/µl
R1234567	29.01.2024	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 1	n.d.	n.d.	0,07 µg / 2,50 ng/µl
R1234567	22.11.2023	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 1	3%	0,0168 (1,68%)	0,18 µg / 12,90 ng/µl

Informationen zur Interpretation dieser Tabelle können im Abschnitt *Ergänzende Informationen* eingesehen werden.

### ESR1, c.1613A>G; p.Asp538Gly, NM\_000125.4

Befund	Probenentnahme / Probeneingang	Isolationstyp	Probenmaterial	Analyse	Tumorgehalt	NAF	zellfreie DNA Menge
R1234567	23.08.2024	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 2	1.4%	0,0070 (0,70%)	0,24 µg / 18,00 ng/µl
R1234567	04.04.2024	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 1	n.d.	n.d.	0,09 µg / 1,80 ng/µl
R1234567	29.01.2024	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 1	n.d.	n.d.	0,07 µg / 2,50 ng/µl
R1234567	22.11.2023	zellfreie DNA	STRECK-Blut	CancerDetect® Version 1	3%	n.d.	0,18 µg / 12,90 ng/µl

Informationen zur Interpretation dieser Tabelle können im Abschnitt *Ergänzende Informationen* eingesehen werden.