

Genetik II

Dr. Melanie Winter





TED- Umfrage

I) Basic Principles:

- Molecular Diagnostics
 - Molecular Pathology
 - Human Genetics
- Overview: Workflow in Routine Diagnostics
- Tissue Sources
- Chromosomes, Genes and Proteins
- Overview: Technical Aspects

II) Chromosomal Variations

- Chromosome Analysis
- FISH
- Array
- Karyotypes (female / male)
- Syndromes

III) Inheritance Patterns

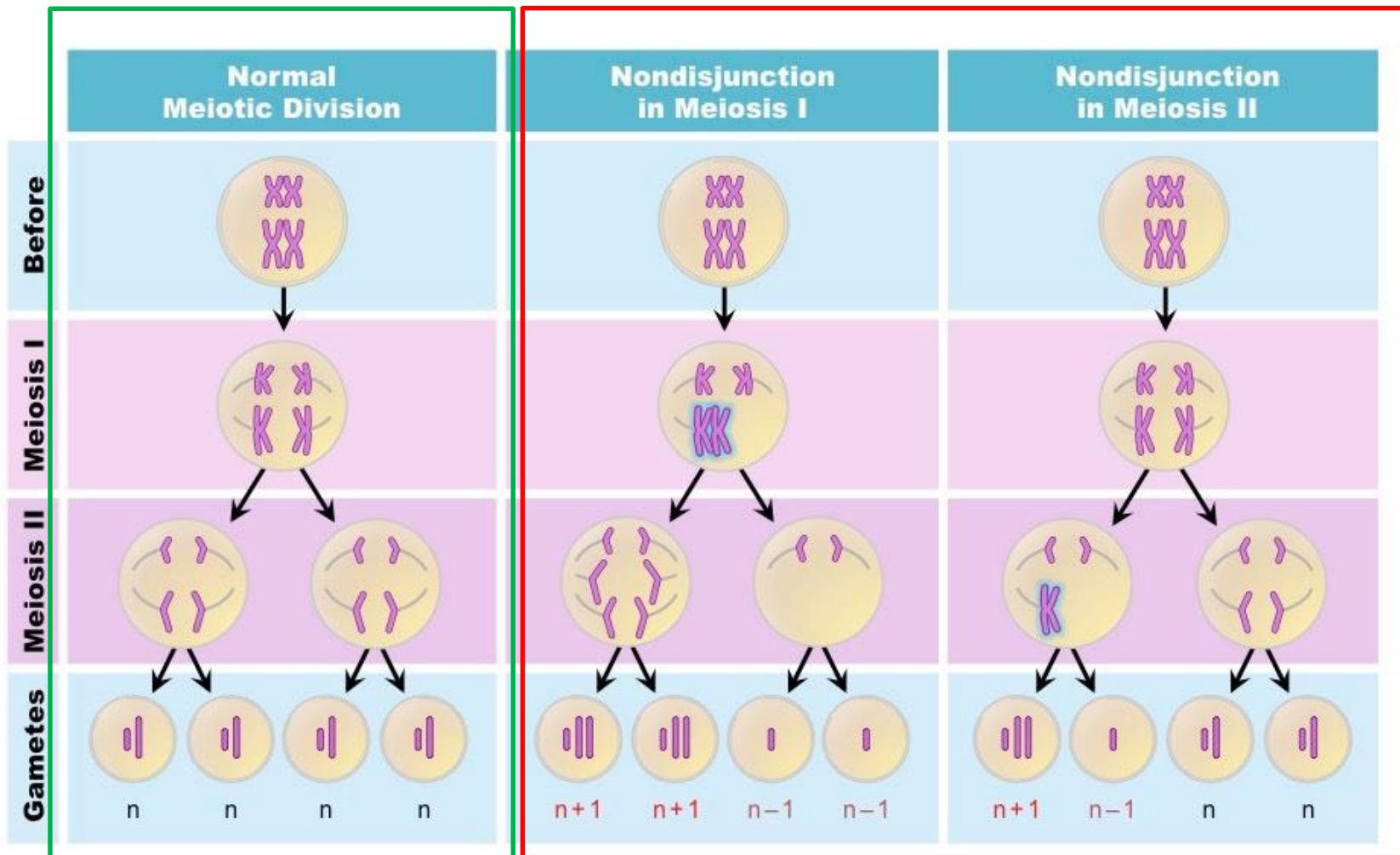
- Pedigree

IV) Cancer

- Molecular Pathology meets Human Genetics
- Lung Cancer
- Bowel Cancer
- *BRCA1/2*
- Classification System
- Reporting (Molecular Pathology/ Human Genetics)

31.10.24
10:30 – 11:15

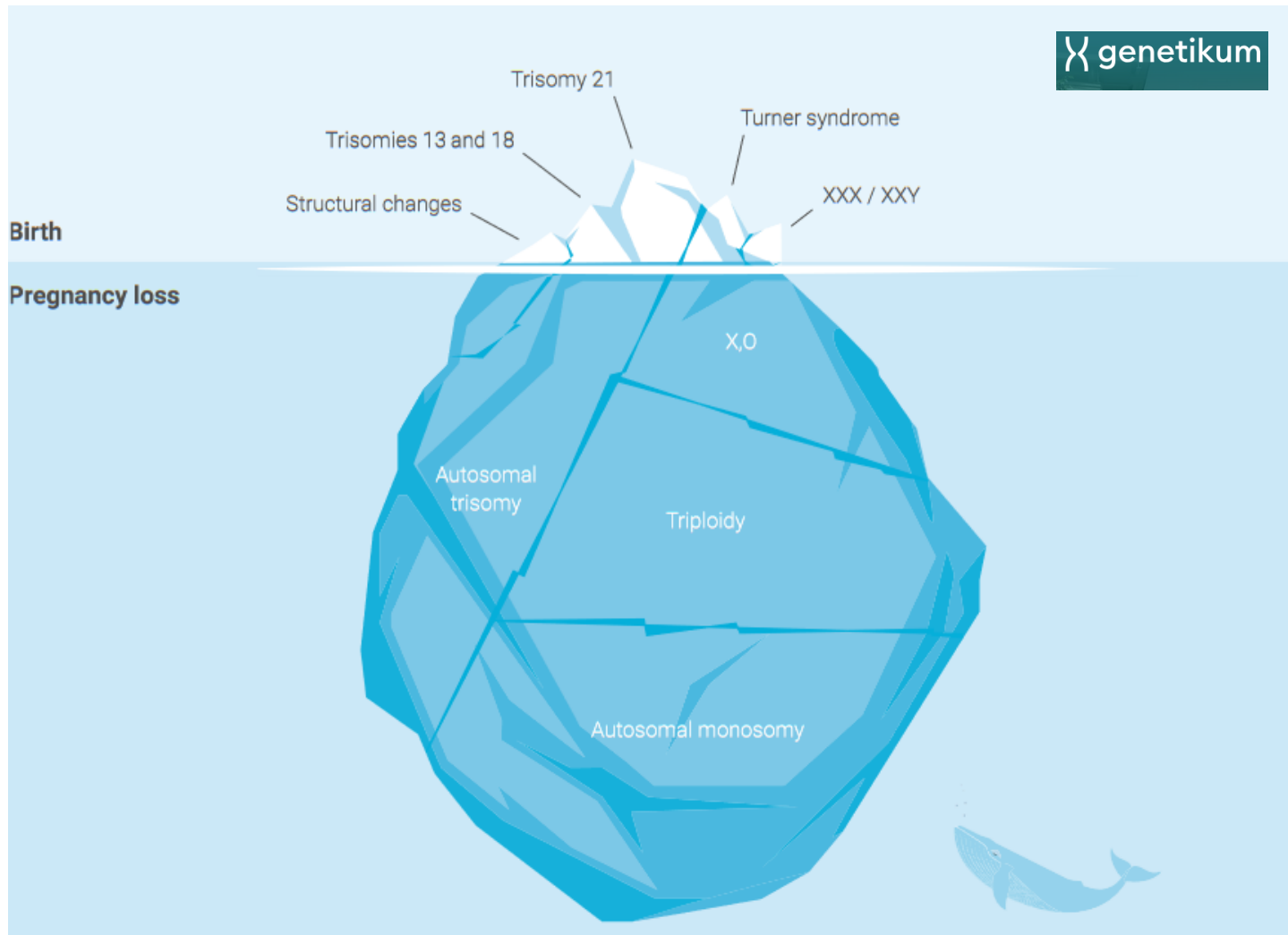
Repetition: Chromosome Failure



<https://old-ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/33-meiosis/non-disjunction.html>

© M. Winter

Prenatal Diagnostics





Chromosome Failure: Non-Disjunction

- Failure of chromosomes (chr.) to separate:
 - Failure of homologues chr. to separate (resulting in four affected daughter cells)
 - Failure of sister chromatids to separate (resulting in only two daughter cells being affected)

Conditions that arise from non-disjunction events include :

- Patau's Syndrome (trisomy 13)
- Edwards Syndrome (trisomy 18)
- Down Syndrome (trisomy 21)
- Klinefelter Syndrome (XXY)
- Turner's Syndrome (monosomy X)
-

Chromosome Failure: Down Syndrome

Down syndrome

Epidemiology

Incidence: ~ 1:700 live births

Etiology

Three complete copies of chromosome 21; due to meiotic nondisjunction in 95% of cases

Karyotype

♀ : 47,XX,+21

♂ : 47,XY,+21

Complications

Due to organ malformations and immunodeficiency.
Increased risk of AML/ALL.
Early onset Alzheimer's disease

Important

Risk increases with maternal age

Life expectancy

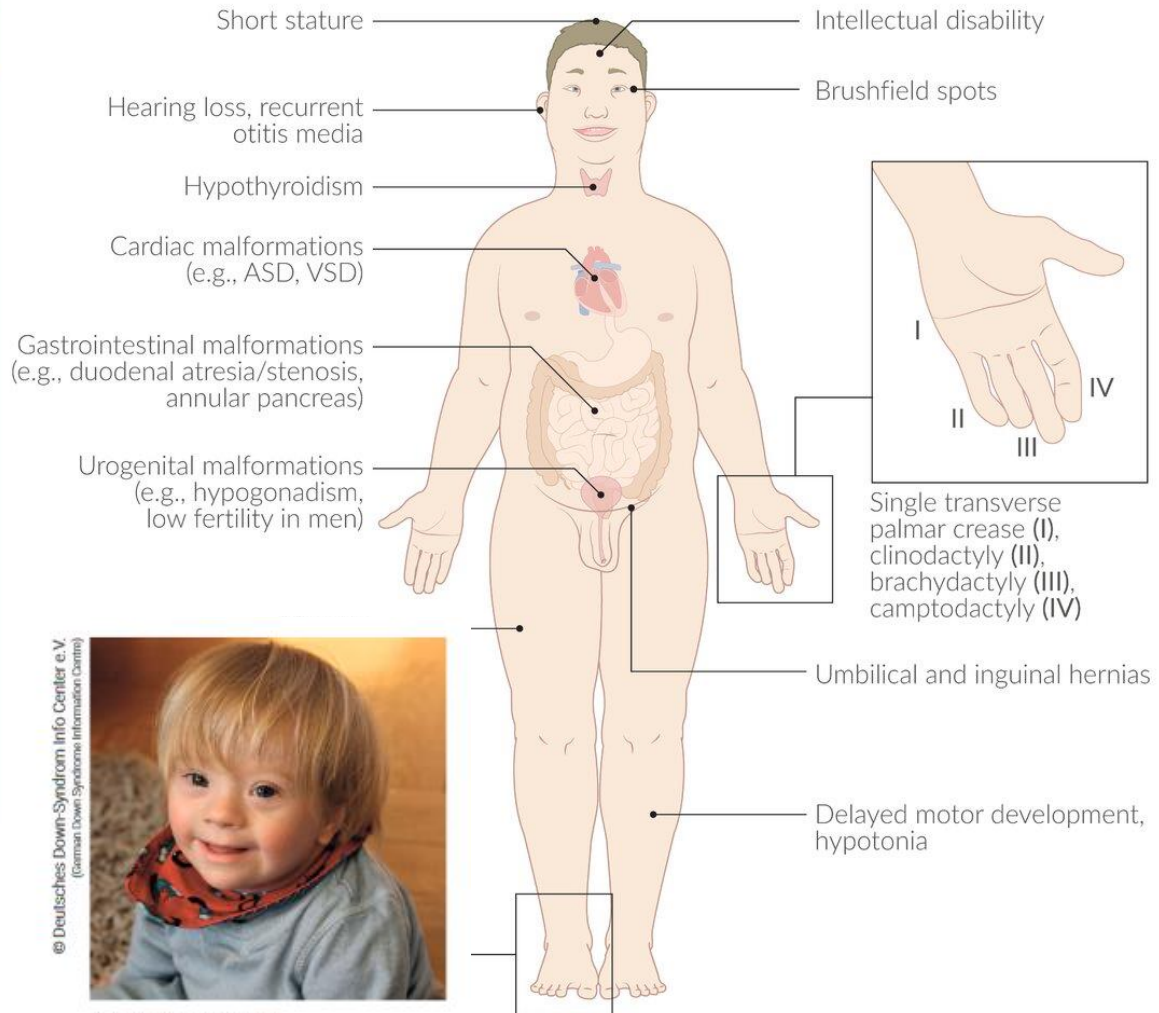
~50 years

Karyotype



+21

<https://ndss.org/about>

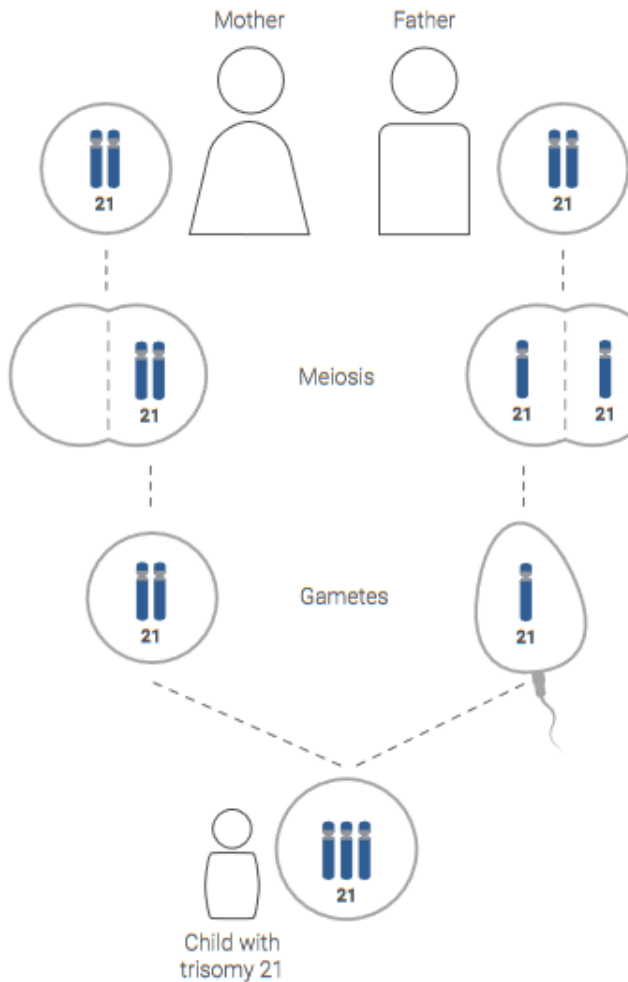


Boy (18 months) with Down syndrome (47,XY,+21)

© Deutsches Down-Syndrom Info Center e.V. (German Down Syndrome Information Centre)

Chromosome Failure: Down Syndrome

Nondisjunction in maternal meiosis



1/1,000 births
0.1%



30 years

3/1,000 births
0.3%



35 years

10/1,000 births
1%



40 years

32/1,000 births
3.2%



45 years

• Child with Down syndrome

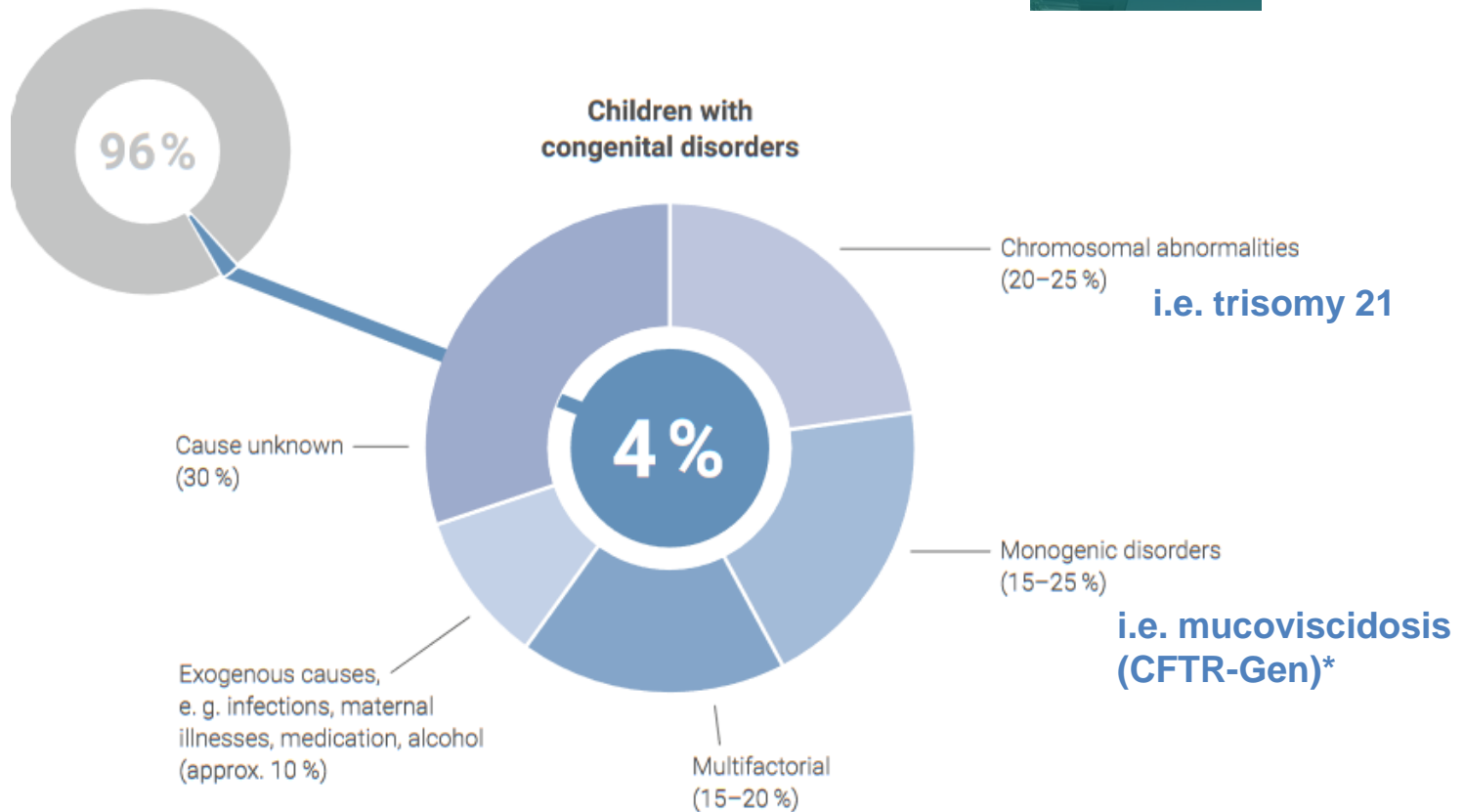


Prenatal Diagnostics

11-14th week of pregnancy

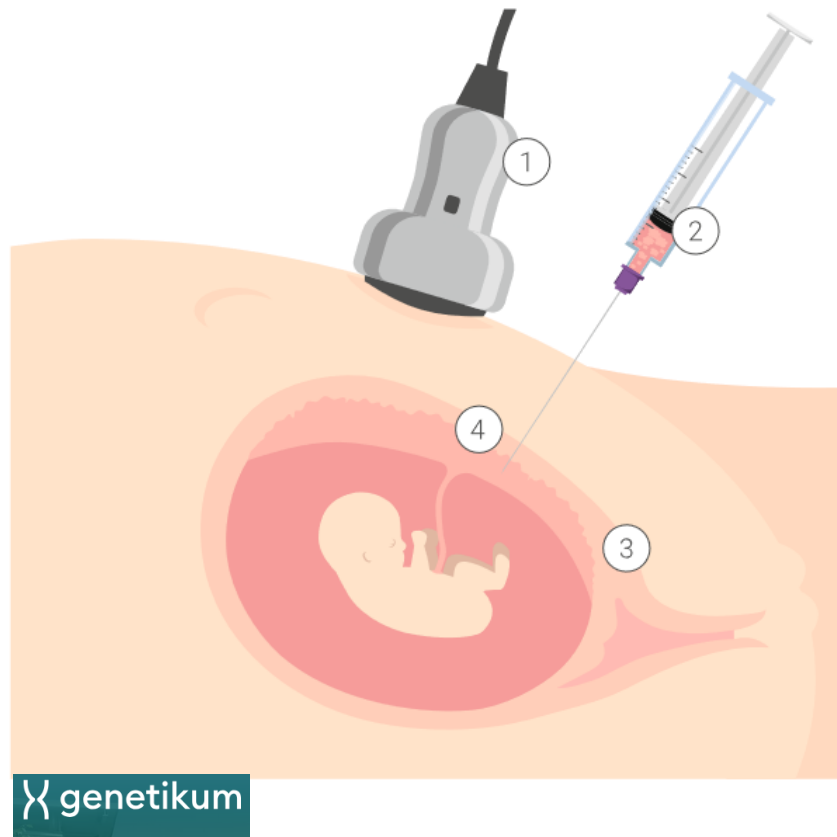
Healthy children

genetikum



* CFTR-Gen = protein cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

Prenatal Diagnostics



Chorionic villus sampling (CVS) = removal of a sample of tissue from the placenta

From the 11th week of pregnancy

Risk of miscarriage: 0.2–0.3 %

Results of chromosome analysis

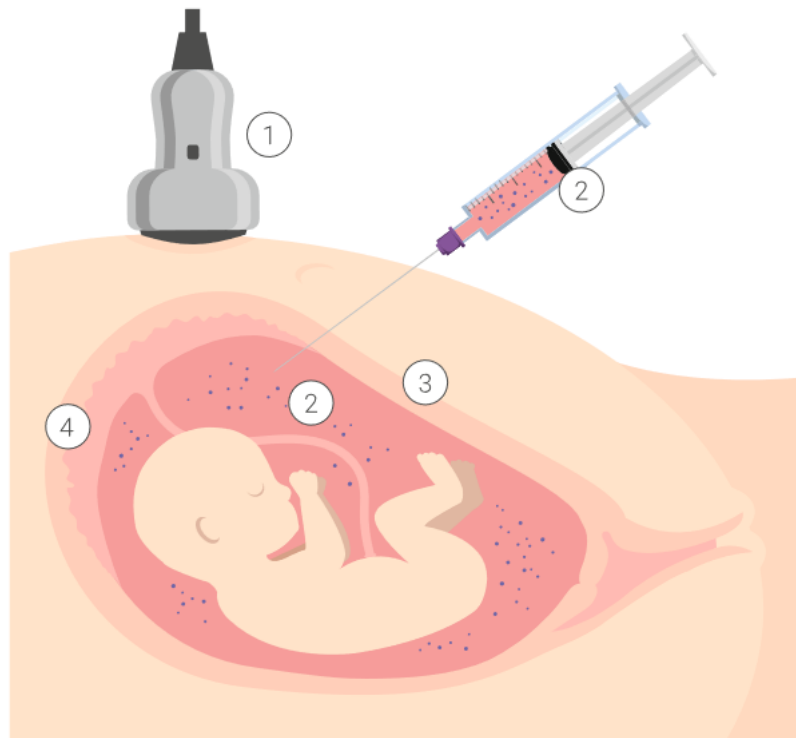
Short-term culture: 1–2 days

Long-term culture: 10–14 days

DNA diagnosis possible

- ① Ultrasound
- ② Chorionic villus tissue
- ③ Uterus
- ④ Placenta

Prenatal Diagnostics



Amniocentesis (AC, "amnio") = amniotic fluid test

From the 15th/16th week
of pregnancy

Risk of miscarriage: 0.1 %

Result of chromosome analysis

8-14 days

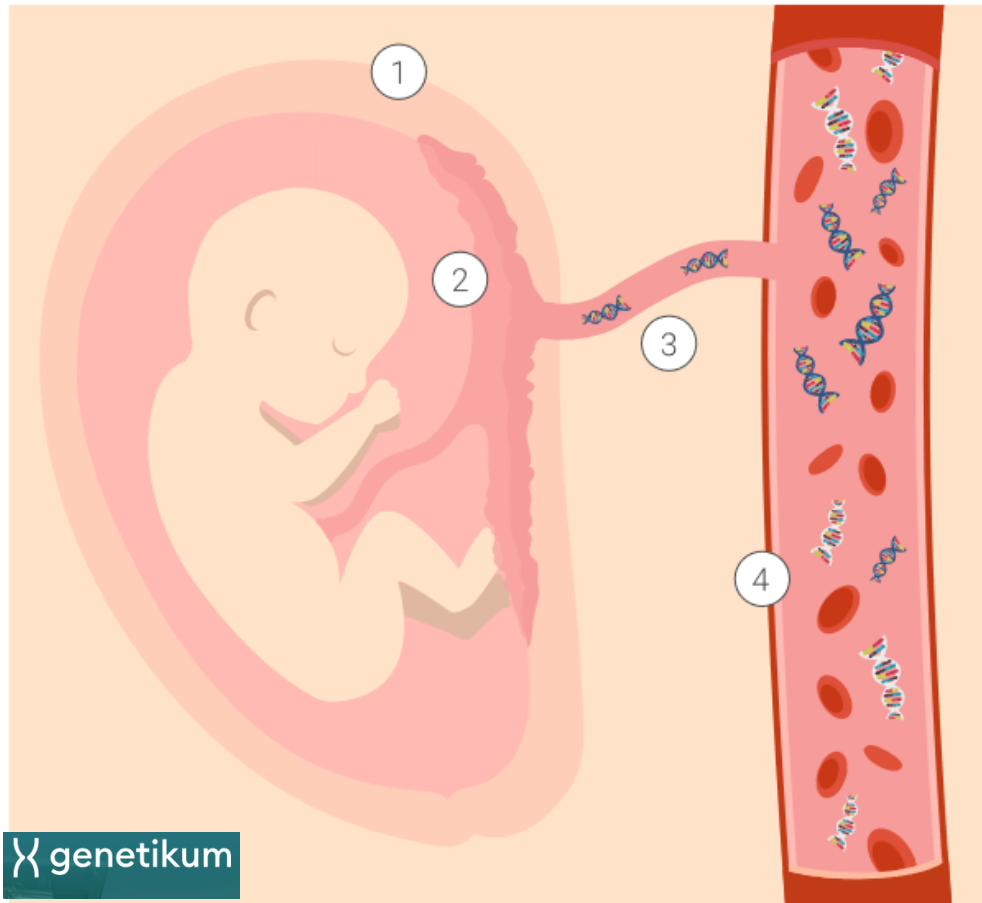
Rapid test available

DNA diagnosis possible

- ① Ultrasound
- ② Amniotic fluid
containing foetal cells
- ③ Uterus
- ④ Placenta

genetikum

Prenatal Diagnostics



genetikum

Noninvasive prenatal testing (NIPT) =





















detection of foetal chromosome anomalies from the maternal blood

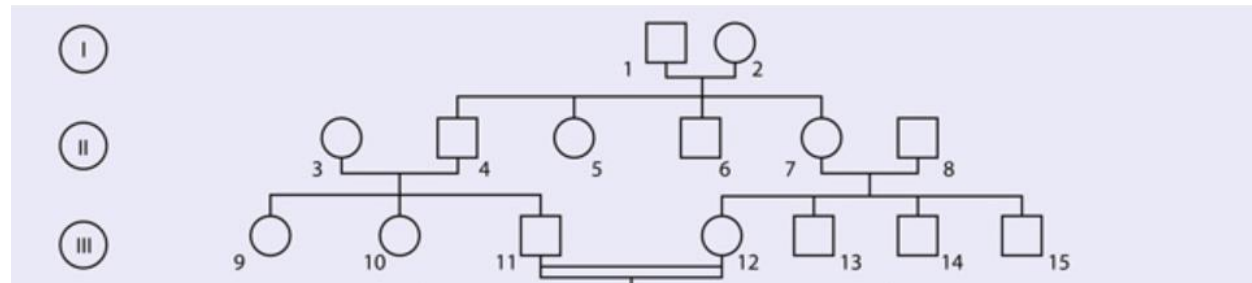
- ① Uterus
- ② Placenta
- ③ Foetal DNA
- ④ Maternal bloodstream (containing maternal and foetal DNA)



Pedigree Chart

....shows the members of the family who are affected by a genetic trait.

-  Male
-  Female
-  Sex undesignated
-  Adopted
-  Pregnancy
-  Deceased
-  Affected with trait
-  Carrier for trait
-  Carrier for X-linked trait
-  Mating
-  Consanguineous Mating
-  Siblings
-  Number of children
-  Divorced or Separated
-  Miscarriage, SAB
-  Dizygotic Twins (Fraternal Twins)
-  Monozygotic Twins (Identical Twins)
-  No offspring
-  Patient initiating genetic work-up (Proband, index case consultant)
-  Two mating



© M. Winter

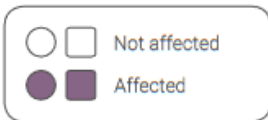
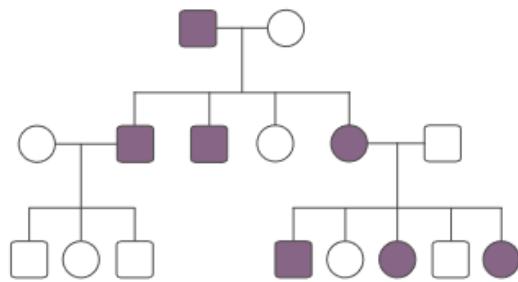


Inheritance Patterns

- Autosomal dominant inheritance
- Autosomal recessive inheritance
- X-linked inheritance
- Mitochondrial inheritance
- Germline mosaicism

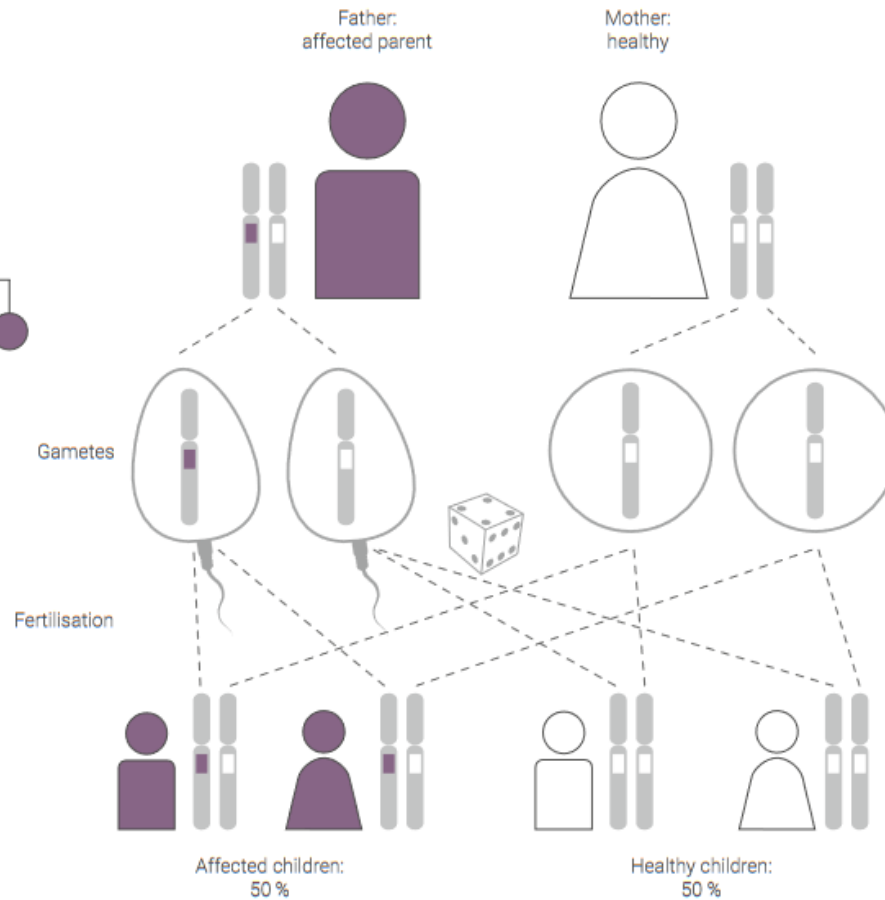
Autosomal Dominant

Autosomal dominant inheritance



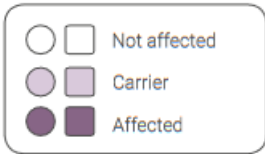
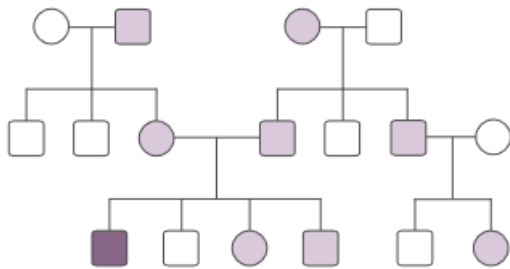
Characteristics:

- Affected individuals occur in successive generations.
- Women and men are equally affected.
- The inheritance risk for each child of an affected parent is 50 %.



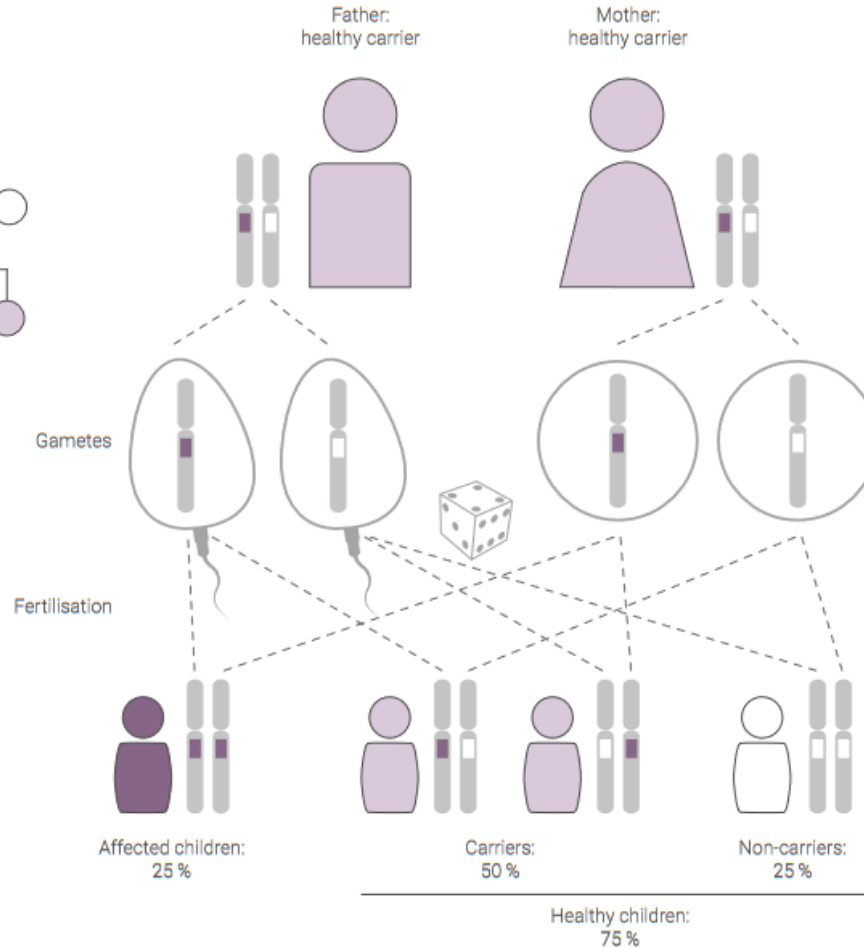
Autosomal Recessive

Autosomal recessive inheritance



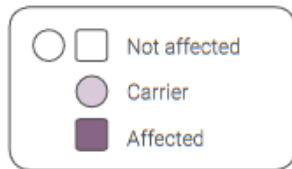
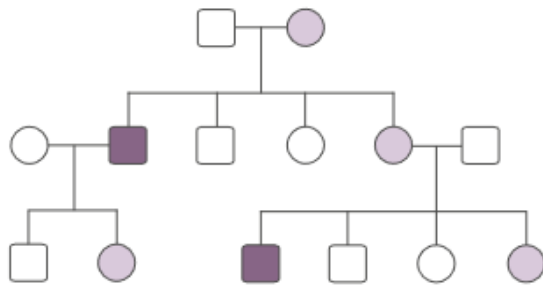
Characteristics:

- Both parents are carriers:
25% risk of an affected child.
- Girls and boys are equally affected.
- Affected individuals commonly occur in one generation only.
- There is an increased risk of affected offspring in consanguineous marriages.



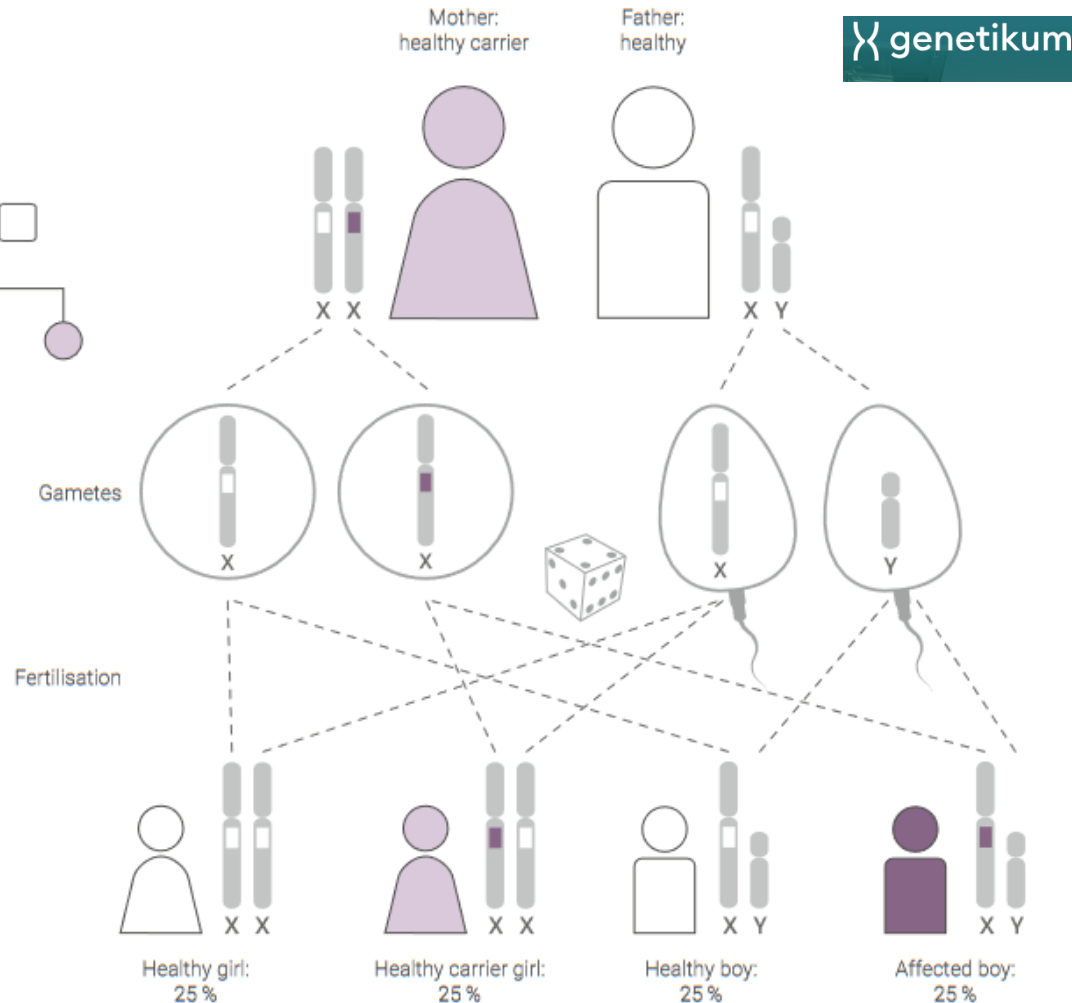
X-linked Inheritance

X-linked inheritance



Characteristics:

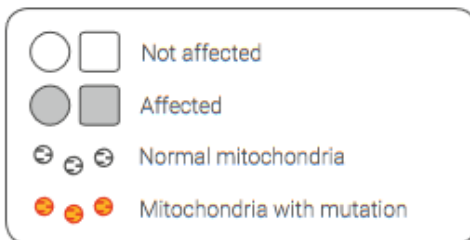
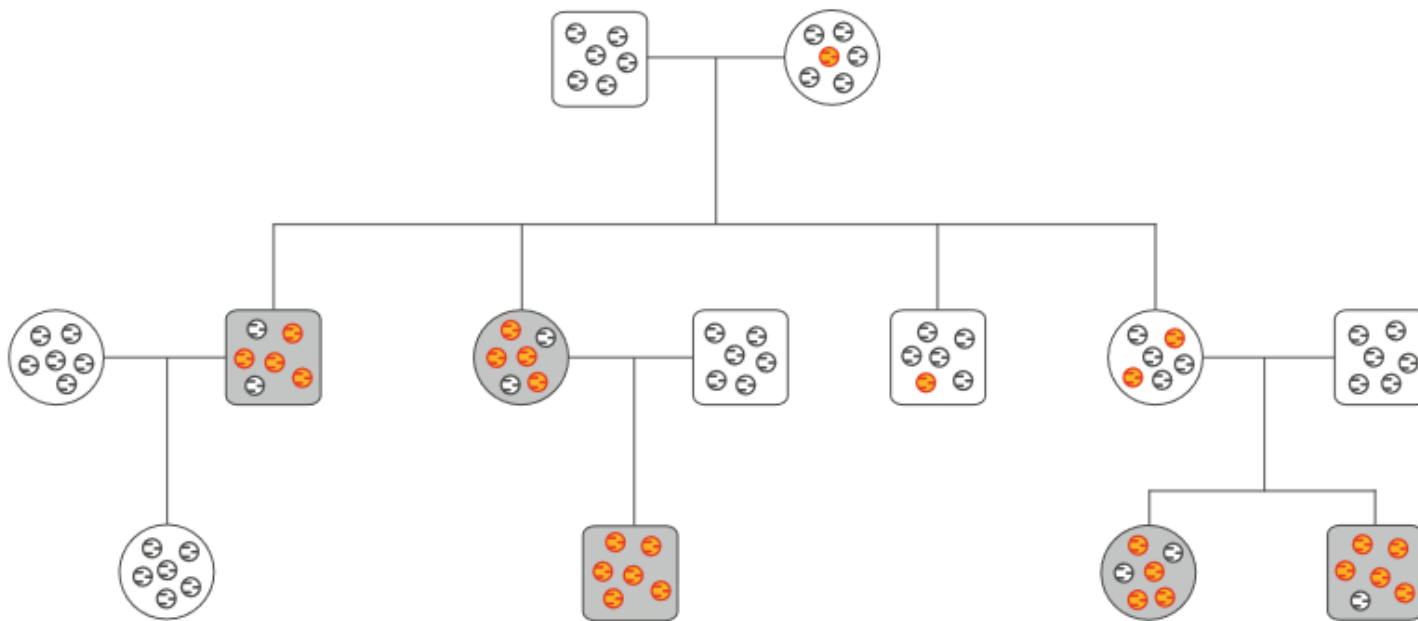
- The condition almost only affects boys/men.
- All daughters of affected men are carriers.
- The condition is not passed on from fathers to sons.
- 50 % of daughters, whose mothers are carriers, are carriers themselves.





Mitochondrial Linked Inheritance

Mitochondrial inheritance

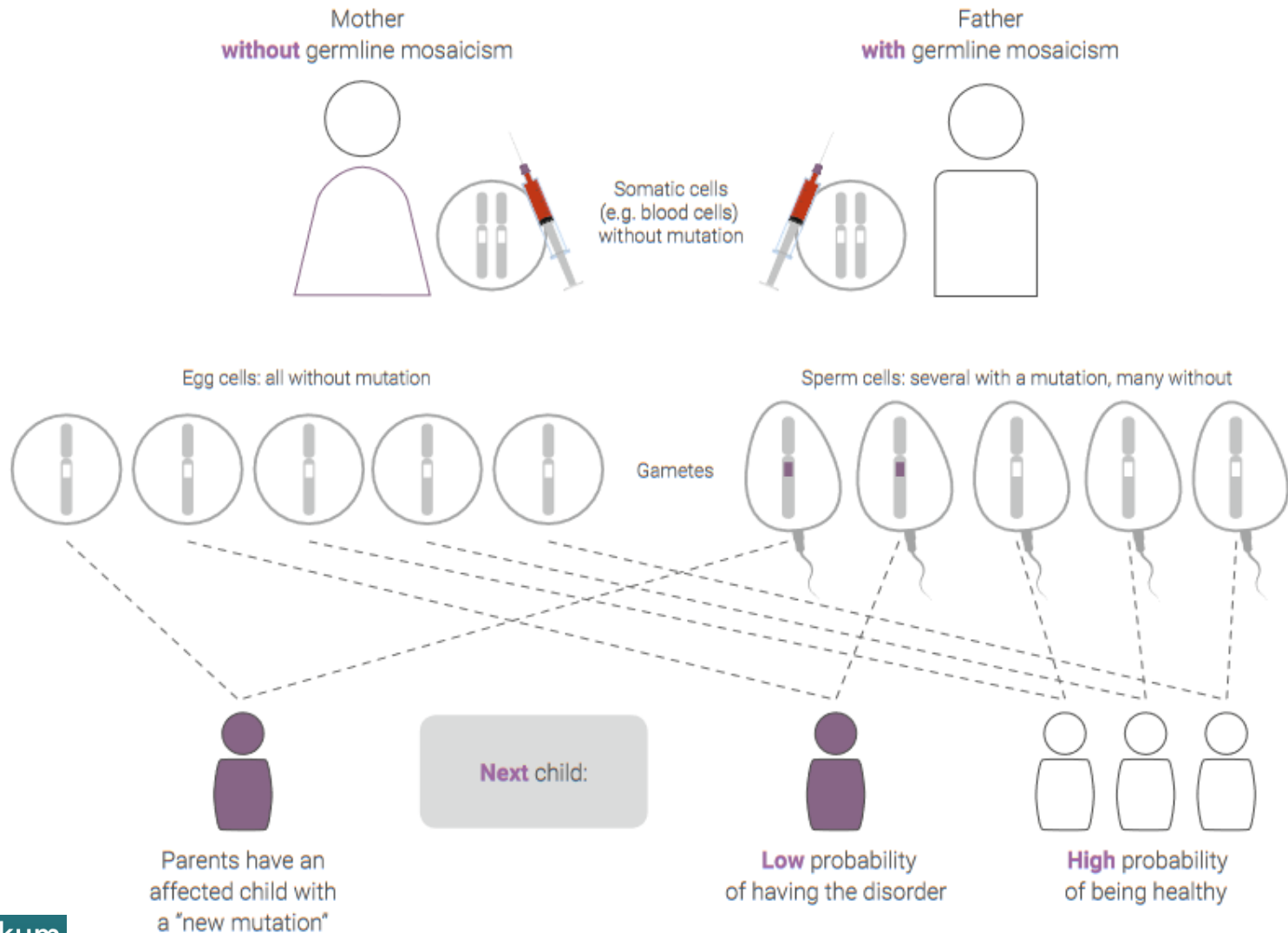


Characteristics:

- Mitochondria are inherited from the mother only: all offspring may be affected.
- Mitochondrial disease becomes apparent when the number of mutated mitochondria in the cell exceeds a threshold level.
- Sons/men cannot transmit the predisposition/disorder.



Mosaicism



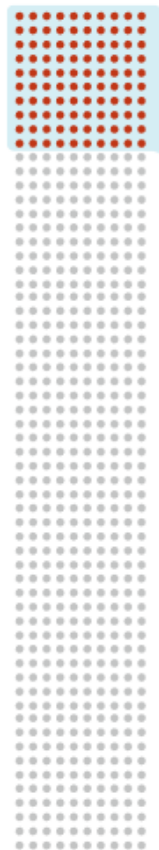
© M. Winter



Reproduction

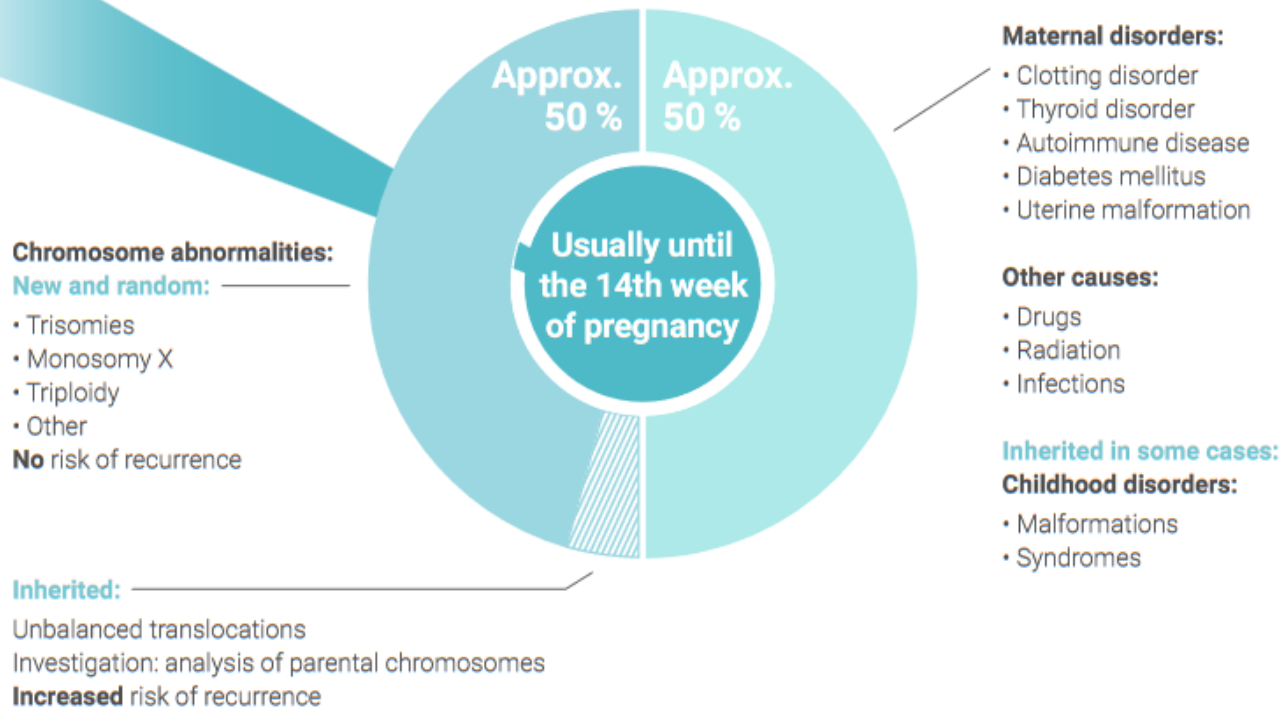
genetikum

One in six pregnancies ends in miscarriage



600 pregnancies

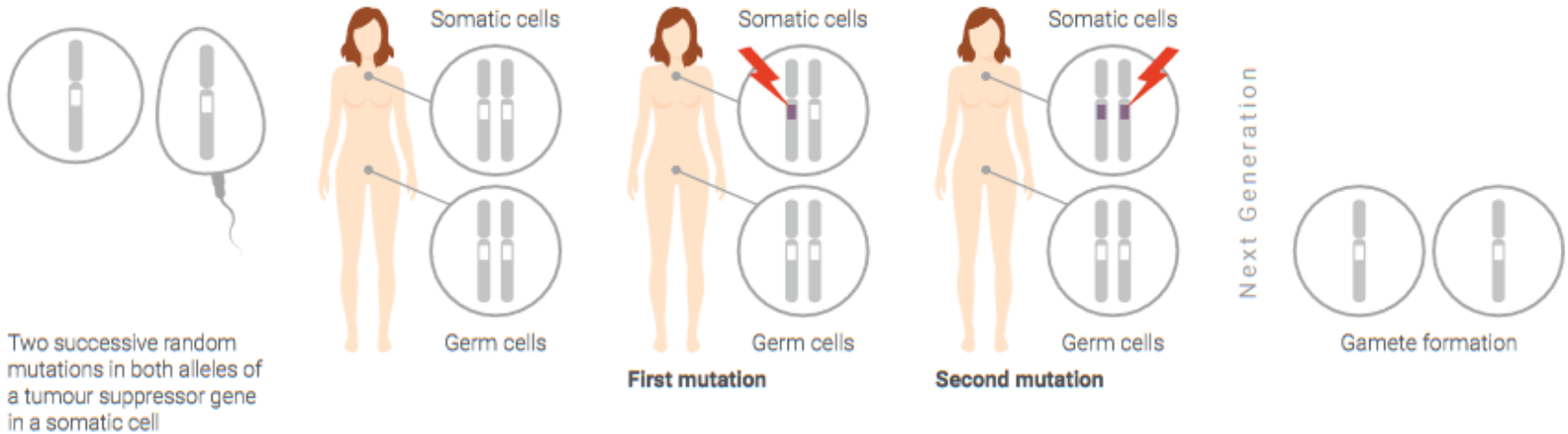
Causes of miscarriage



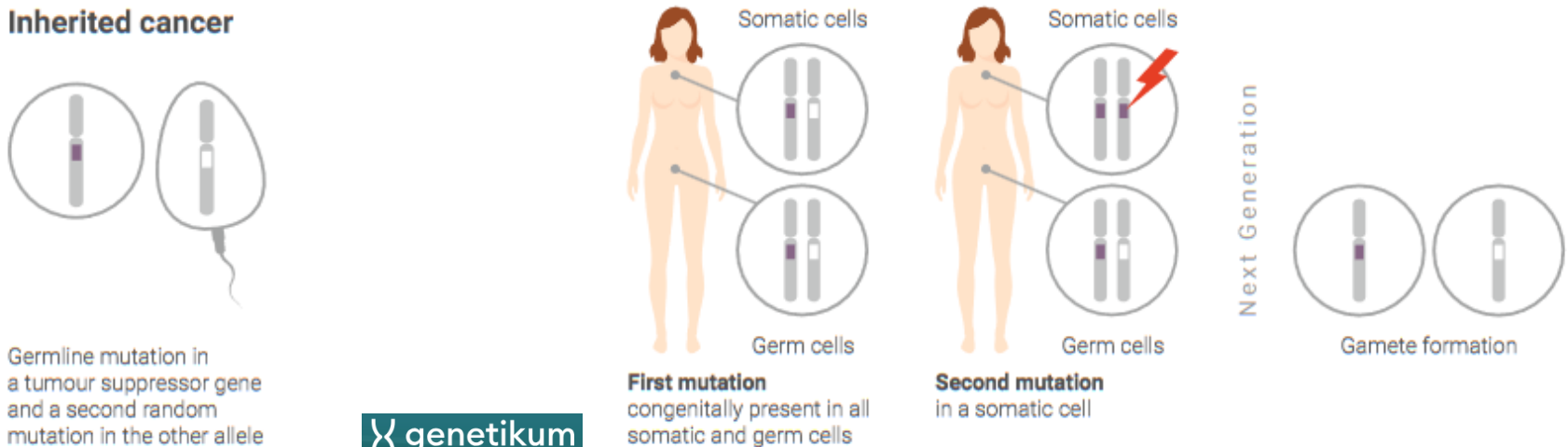
© M. Winter

Sporadic and Inherited Cancer

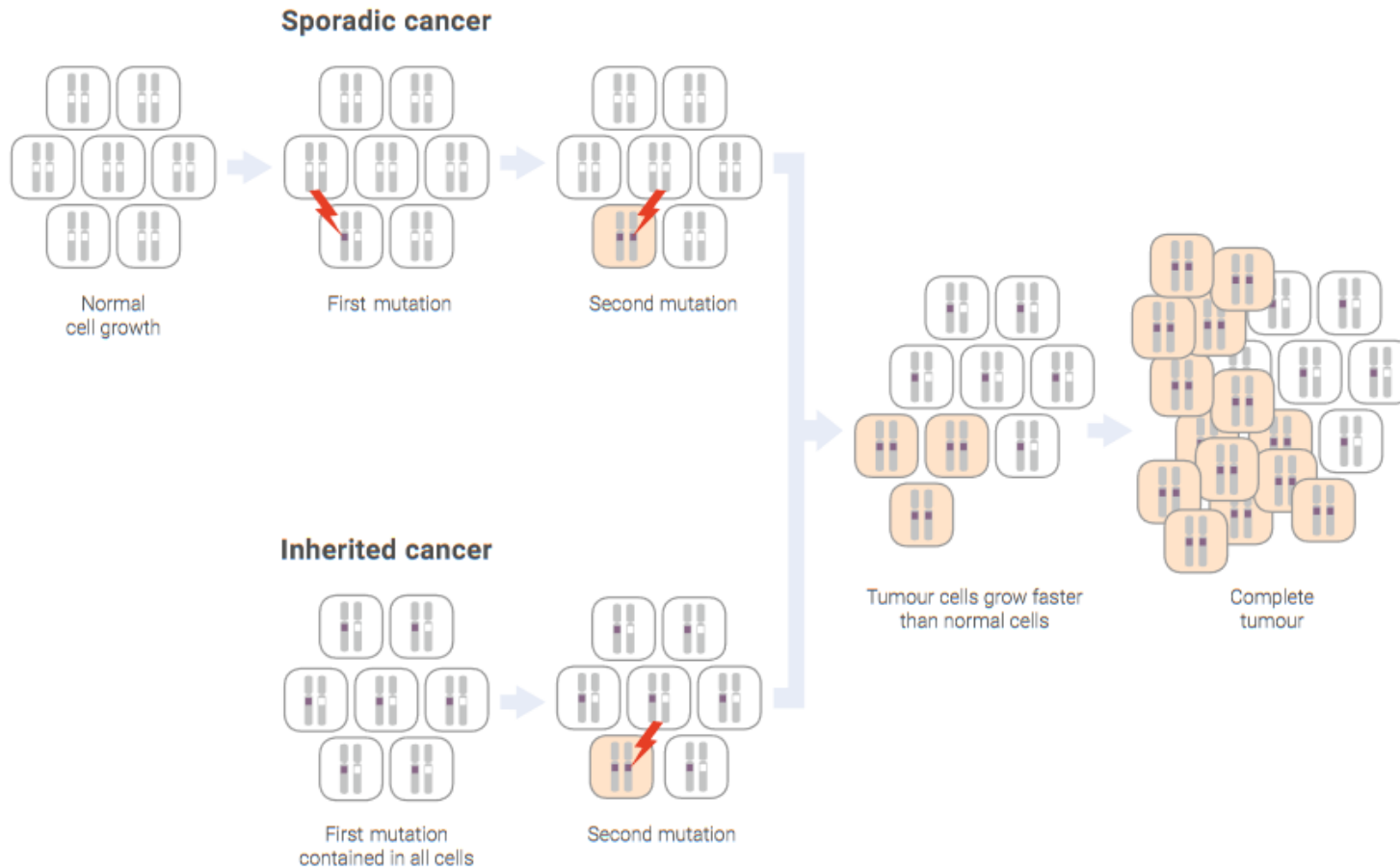
Sporadic cancer



Inherited cancer



Sporadic and Inherited Cancer





Classification System: Pathogenecity

5-tier classification system for sequence variants identified by genetic testing

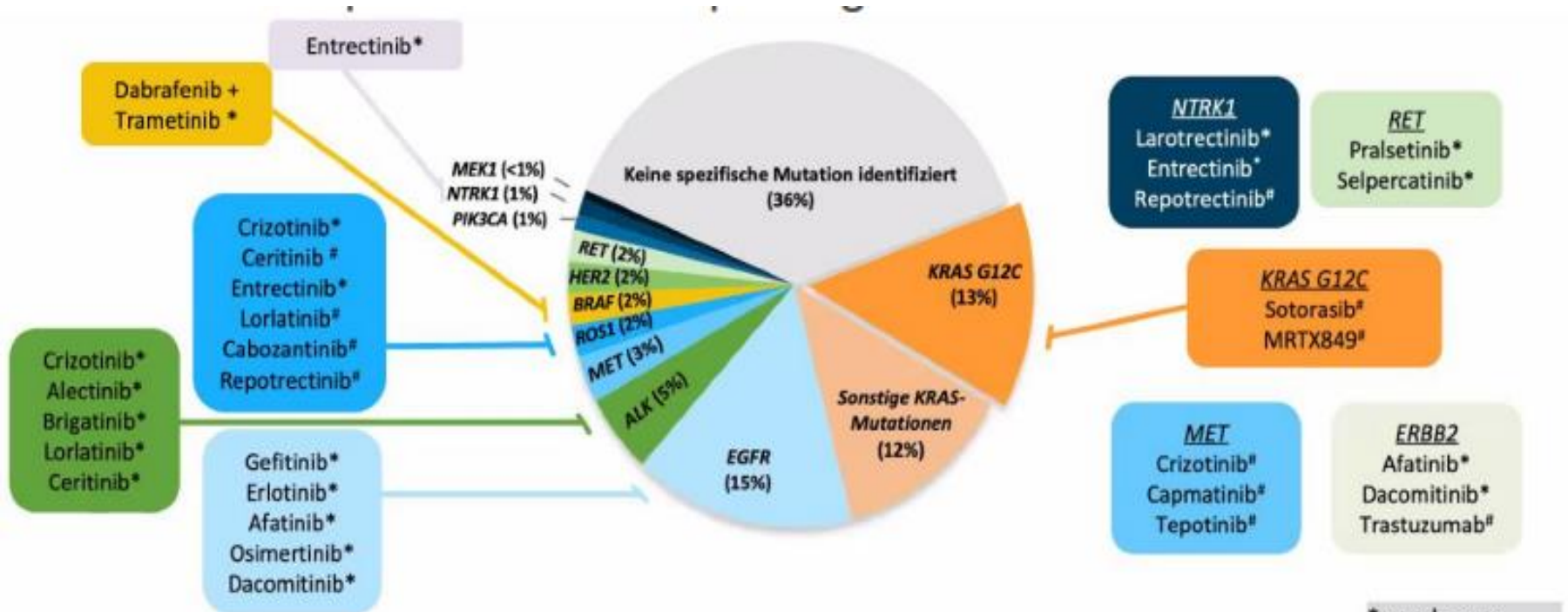
Class	Description	Probability of being pathogenic
5	Definitely pathogenic	> 0.99
4	Likely pathogenic	0.95–0.99
3	Uncertain	0.05–0.949
2	Likely not pathogenic or of little clinical significance	0.001–0.049
1	Not pathogenic or of no clinical significance	< 0.001

Plon et al., Hum Mutation 2008

ClinVar <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>

BRCA Exchange <https://brcaexchange.org/>

Personalized Medicine: Example Lung Cancer



ALK, anaplastic lymphoma kinase; BRAF, proto-oncogene B-Raf; EGFR, epidermal growth factor receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; KRAS, Kirsten rat sarcoma; MEK1, mitogen-activated protein kinase 1; MET, mesenchymal-to-epithelial transition; NSCLC, non-small cell lung cancer; NTRK1, neurotrophic tyrosine receptor kinase 1; PIK3CA, phosphoinositide 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide; RET, rearranged during transfection; ROS1, c-ros oncogene

Prävalenzen der einzelnen Biomarker: Biomacka A, Tsongalis PD, Peterson JD, et al. Cancer Genet. 2016;209(5):195-198. Pakkala S, et al. JCI Insight. 2018;3:e120858. Scheffer M, Irie MA, Hein R, et al. J Thorac Oncol. 2019;14(4):606-616.

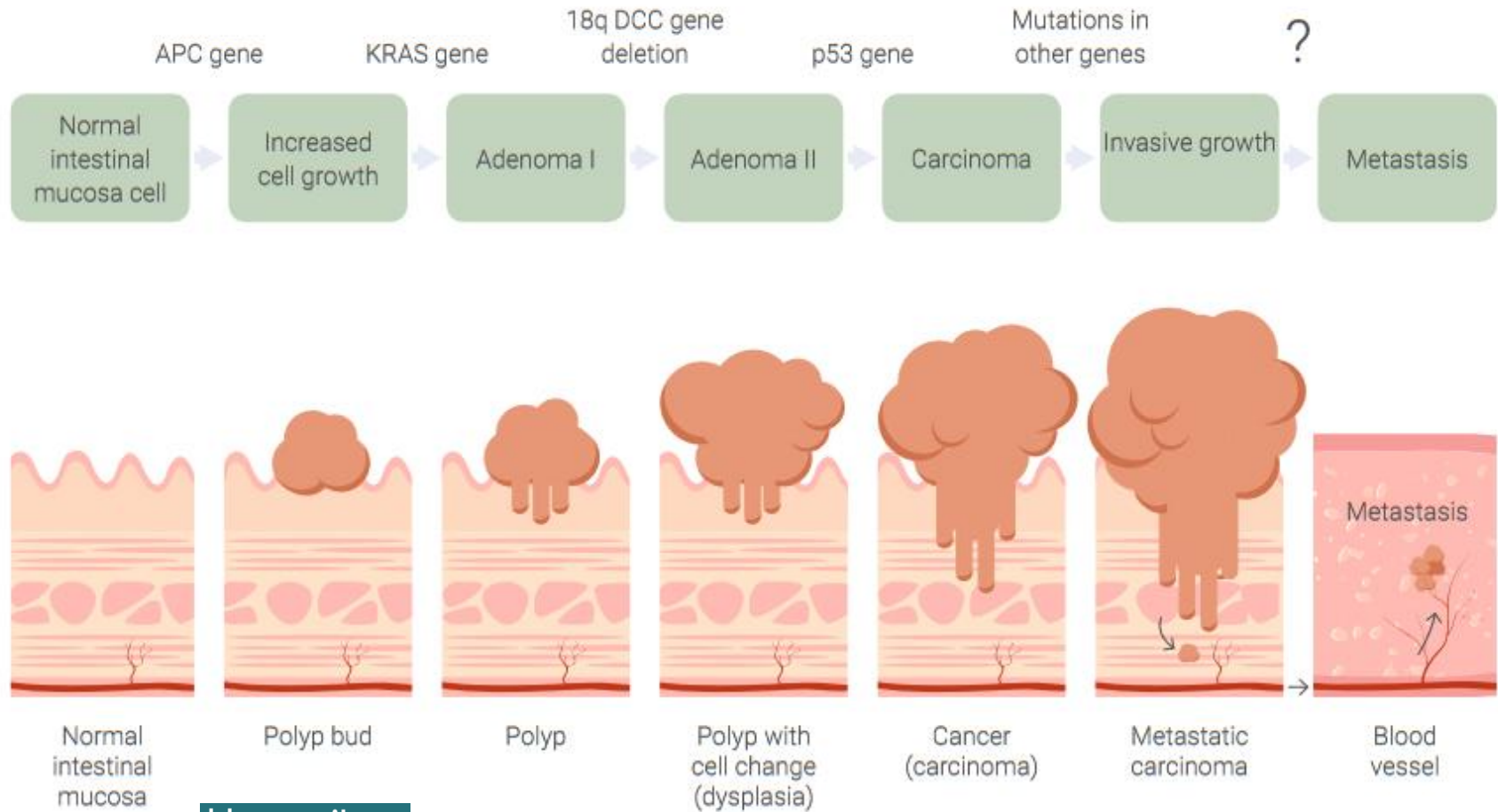
Zulassungstatus der einzelnen Therapien in der EU: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nicht-kleinzaellig-nsclcl/@@guideline.html/index.html>;

[https://www.ema.europa.eu/en/search/search?field_ema_web_categories%253Aname_field/Human/ema_group_types/ema_medicines/field_ema_med_status/authorised-367?search_api_views_fulltext%3D%253Aname_field/Human/ema_group_types/ema_medicines/field_ema_med_status/authorised-367](https://www.ema.europa.eu/en/search/search?field_ema_web_categories%253Aname_field/Human/ema_group_types/ema_medicines/field_ema_med_status/authorised-367?search_api_views_fulltext%3D%253Aname_field/Human/ema_group_types/ema_medicines/field_ema_med_status/authorised-367?search_api_views_fulltext%3D%253Aname_field/Human/ema_group_types/ema_medicines/field_ema_med_status/authorised-367) Abgerufen am Juni 2021.

* zugelassen
nicht zugelassen

Cancer Development: Bowel Cancer

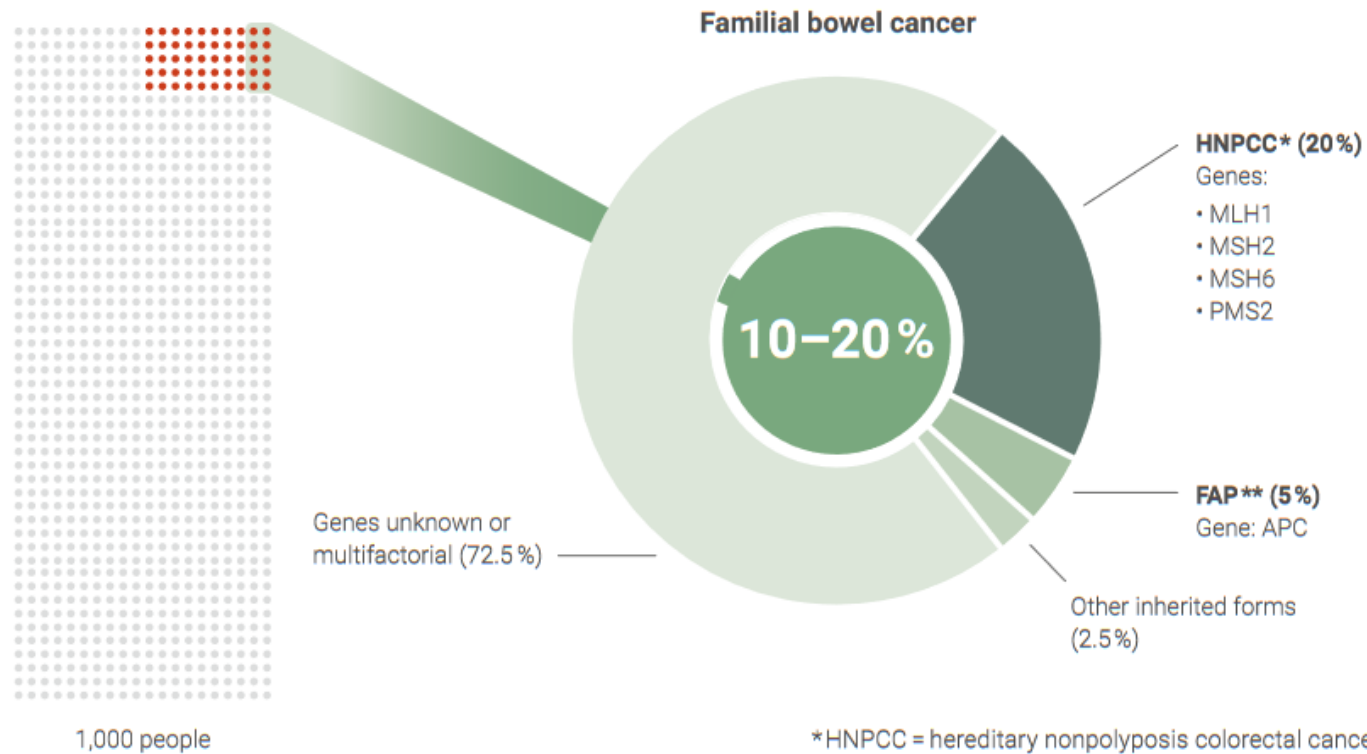
Cascade of different gene mutations





Bowel Cancer

About 50 out of 1,000 people
develop bowel cancer
(1 out of 20, or 5%)



*HNPCC = hereditary nonpolyposis colorectal cancer

**FAP = familial adenomatous polyposis

Bethesda and Amsterdam II Criteria

HNPCC = hereditary **n**onpolyposis **c**olorectal **c**ancer

Revised **Bethesda** Criteria

At least **one** criterion must apply:

- Colorectal cancer diagnosed before age 50
- Synchronous/metachronous colorectal cancer or HNPCC-related cancers (endometrium, renal pelvis/ureter, small intestine, stomach, pancreas, bile duct, ovary, hepatobiliary system and brain – usually glioblastoma, sebaceous adenoma and keratoacanthoma) regardless of age
- Colorectal cancer with the MSI-H (microsatellite instability-high) histology diagnosed before the age of 60
- Patient with colorectal cancer and at least one first-degree relative diagnosed with an HNPCC-related cancer before the age of 50
- Patient with colorectal cancer and at least two first- or second-degree relatives with HNPCC-related cancers (see above), regardless of age

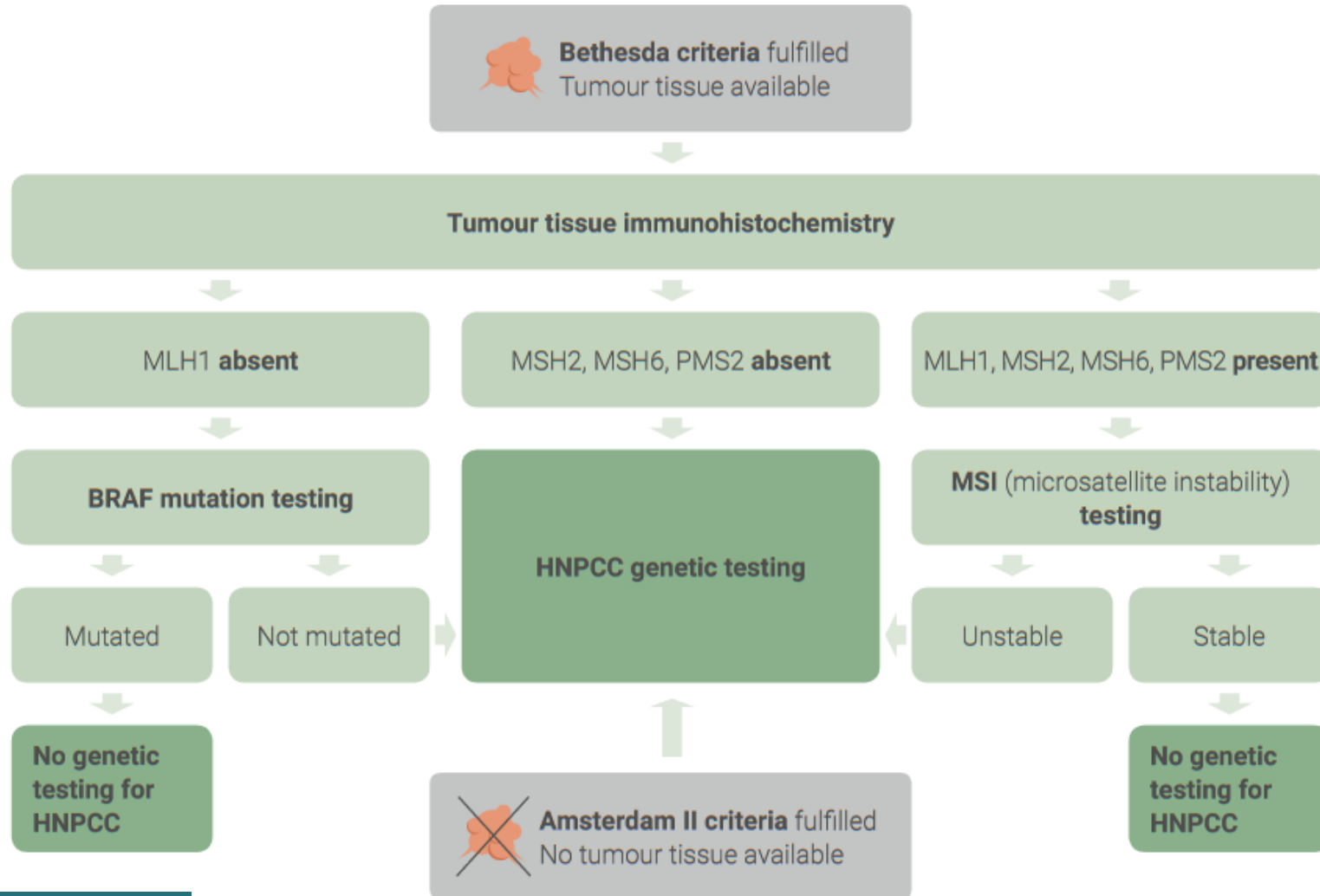
Amsterdam II Criteria

All criteria must apply:

- Three or more family members with HNPCC-related cancer (colorectal, endometrial, small bowel, renal pelvis/ureter)
- One affected person is a first-degree relative of the other two affected individuals
- Disease in two or more successive generations
- At least one affected individual was diagnosed with cancer before the age of 50
- **Familial adenomatous polyposis (FAP)** has been excluded



Bethesda Criteria



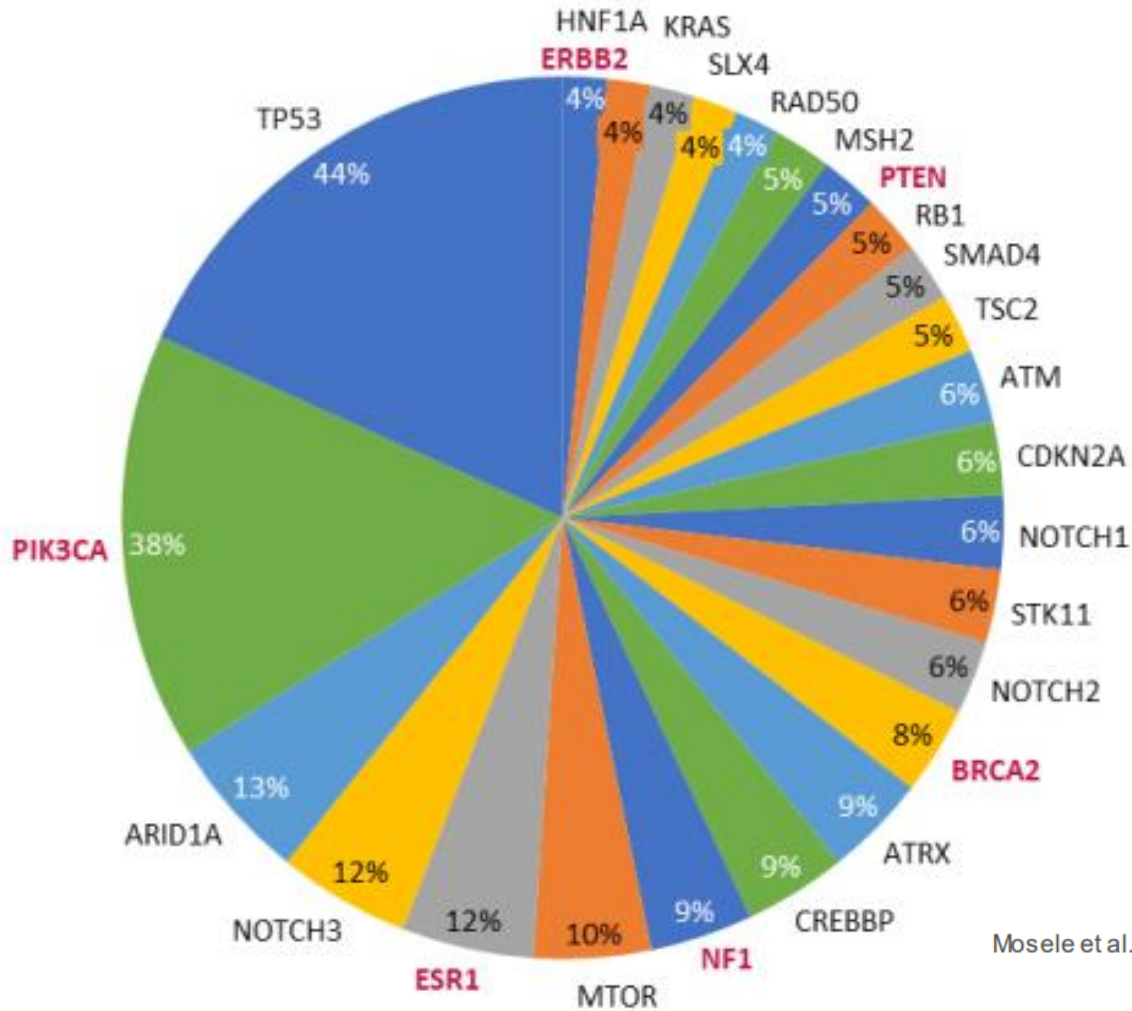


Cancer Spectrum and Lifetime Risk

Statistics for all HNPCC genes (German HNPCC Consortium data)

Cancer type	Risk
Colorectal cancer	30–60 % (women), 35–75 % (men)
Endometrial cancer	40–50 % (women)
Ovarian cancer	7–8 % (women)
Stomach cancer	1–6 %
Cancer of the renal pelvis / ureter	2–8 %
Bile duct cancer	1–4 %
Small bowel cancer	1–4 %
CNS cancers	2 %
Pancreatic cancer	4 %
Sebaceous gland tumours (Muir-Torre syndrome)	Depending on the affected gene

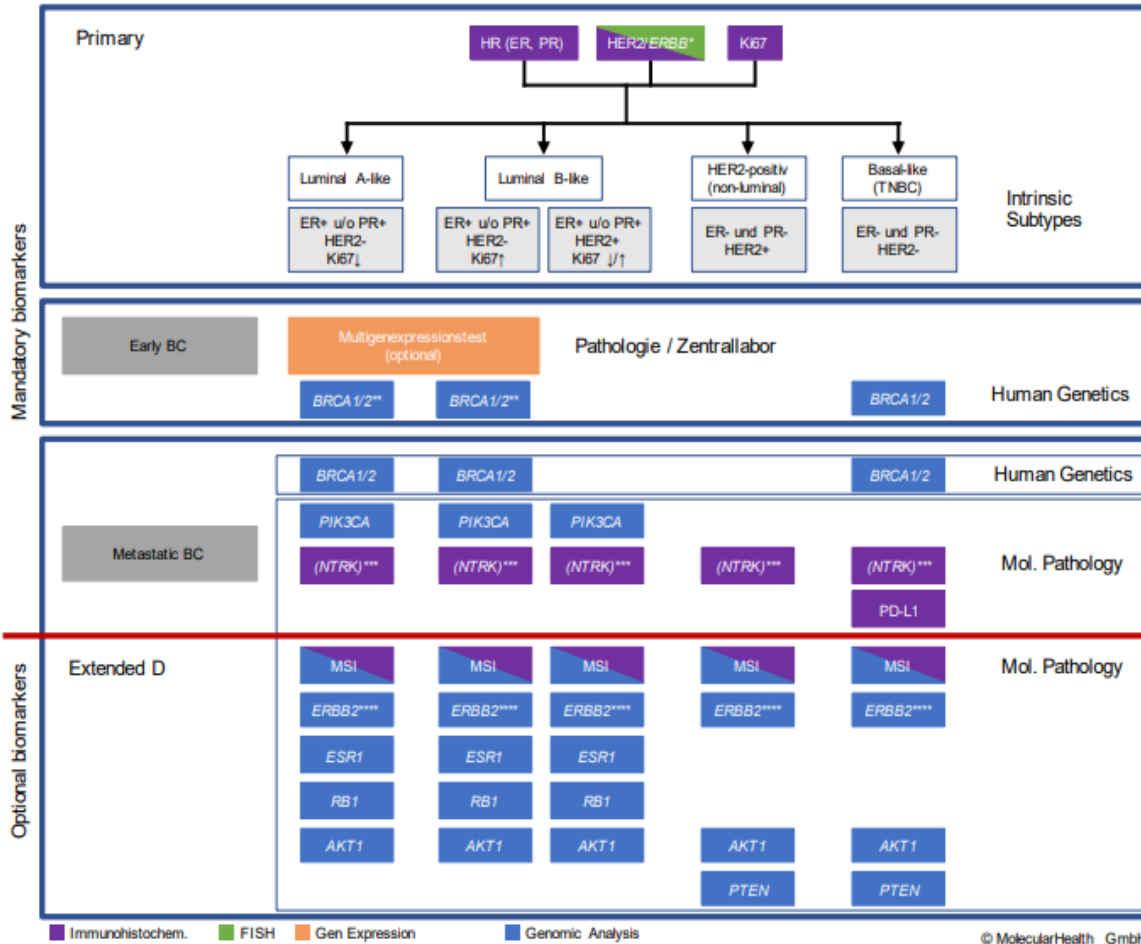
Breast Cancer Biomarkers



Mosele et al., Annals Oncol 2020



Breast Cancer Biomarkers



Immunhistochemie

References

- Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Langversion 4.3 – _Februar 2020 AWMF-Registernummer: 032-045OL.
- https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/leitlinien/kommission_mamma2021/PDF_DE/2021D%2005_Prognostische%20und%20praediktive%20Faktoren.pdf.
- Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. The Cancer Genome Atlas Network. *Nature* volume 490, pages61–70(2012).
- Goldhirsch et al, Annals of Oncology 24: 2206–2223, 2013 doi:10.1093/annonc/mdt303 (St Gallen Empfehlung).

Genomic Analysis of Mandatory Biomarkers in mBC

Gen	Test auf	Testverfahren/ Ausgangsmaterial	Therapierelevanz	Indikationen
gBRCA1/2	Mutation	NGS/Blut für Keimbahntestung	PARP-Inhibitoren (Olaparib, Talazoparib)	Zulassung von Olaparib und Talazoparib jeweils als Monotherapie beim HER2-negativen metastasierten Mammakarzinom (MCa) mit gBRCA1/2-Mutation
PIK3CA	Mutation	NGS/Primärtumor, Metastasen, Plasma	PIK3α-Inhibitor (Alpelisib)	Zulassung von Alpelisib in Kombination mit Fulvestrant beim HR-positiven, HER2-negativen lokal fortgeschrittenen oder metastasierten MCa mit PIK3CA-Mutation
NTRK	Gen-Fusion, Spleiß-Varianten	NGS an mRNA/ Tumorgewebe	TRK-Inhibitoren (Larotrectinib, Entrectinib)	Pantumorzulassung von Larotrectinib und Entrectinib als Monotherapie zur Behandlung von erwachsenen und pädiatrischen Patienten mit soliden Tumoren mit einer NTRK-Genfusion (beim MCa selten, meist beim sekretorischen MCa)
PD-L1	Genexpression	IHC/Primärtumor, Metastasen	Checkpoint-Inhibitoren (Atezolizumab, Pembrolizumab in Studie)	Zulassung von Atezolizumab in Kombination mit nab-Paclitaxel zur Behandlung des nicht rezidierbaren lokal fortgeschrittenen oder metastasierten TNBC mit PD-L1-Expression ≥1 %

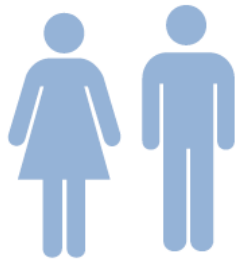
1. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e. V. (AGO), Kommission Mamma. Empfehlungen gynäkologische Onkologie. Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome, Version 202011D, 2. Fachinformation Lynparza® Filmtabletten, Stand: November 2020 3. Fachinformation Talzena®, Stand: September 2020 4. Fachinformation Piqray®, Stand: Juli 2020 5. Fachinformation Rozlytrek®, Stand: Oktober 2020 6. Turner NC et al., Lancet Oncol 2020, 21:1296– 1308 7. Fachinformation Vitrakvi® 25 mg/100 mg Hartkapseln, Stand August 2020 9. Fachinformation Vitrakvi® 20 mg/ml Lösung zum Einnehmen, Stand August 2020 10. Fachinformation Tecentriq® 1200 mg, Stand Oktober 2020

ESR1 Liquid Biopsy before ORSERDU® (Elacestrant) therapy

Neu!



BRCA1/2 Testing



(BRCA1/2)-Keimbahnmutationen
Geerbte Mutationen, in allen Körperzellen

(BRCA1/2)-Keimbahnmutationen können in
Blutproben und allen anderen
Geweben/Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden



Somatische (BRCA1/2)-Mutationen
Erworbene Mutationen, nur in Tumorzellen

Somatische (BRCA1/2)-Mutationen können nur in
Tumorproben nachgewiesen werden

1. National Cancer Institute. Erhältlich unter: <http://www.cancer.gov/dictionary?cdrid=46384>. Letzter Zugriff: Januar 2018. 2. National Cancer Institute. Erhältlich unter: <http://www.cancer.gov/dictionary?CdrID=46586>. Letzter Zugriff: Januar 2018. 3. Vergote I et al. Euro J Cancer 2016; 69: 127–131.
In Anlehnung an Slidekit AstraZeneca LYN DIA Slidekit Mai 2021 DE-34210

BRCA1/2 - Localization and Exons

- BReast CAncer 1/2
- Tumor suppressor gene
- *BRCA1* -> chromosome 17 (exon 1- 24)
- *BRCA2* -> chromosome 13 (exon 1- 27)
- Total coverage of *BRCA1* and *BRCA2* genes differs depending on the distinct sequencing panel used









Perner et al. ESUP-ESP Working Group Uropathology

High-Risk Gene Diagnostics: *BRCA1/2*

High-risk gene diagnostics advised when at least one of the following criteria applies:

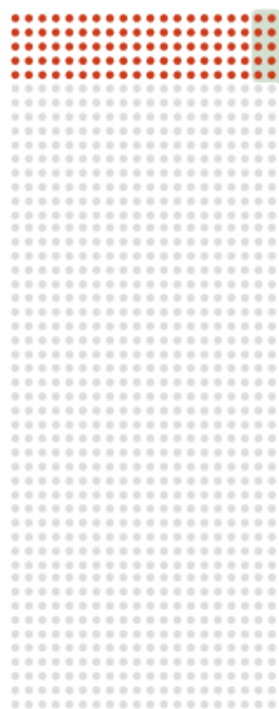
- Three women of any age with breast cancer
- Two women with breast cancer, one of whom was diagnosed before the age of 51
- One woman with breast cancer diagnosed before the age of 36
- One woman with cancer in both breasts, the first diagnosed before the age of 51
- One woman with breast and ovarian cancer
- Two women with ovarian cancer
- One man with breast cancer and one woman with breast or ovarian cancer

Cancer spectrum	BRCA1	BRCA2	Risk in general population
 Breast cancer	60–90 %	50–80 %	10 %
 Ovarian cancer	20–40 %	10–30 %	1.5 %
 Breast cancer (man)	1–2 %	5–10 %	0.1 %
Other types of cancer			
 Pancreatic cancer	1–3 %	2–7 %	0.5 %
 Prostate	20–30 %	20–40 %	15 %
 Malignant melanoma	1–2 %	1–2 %	1 %



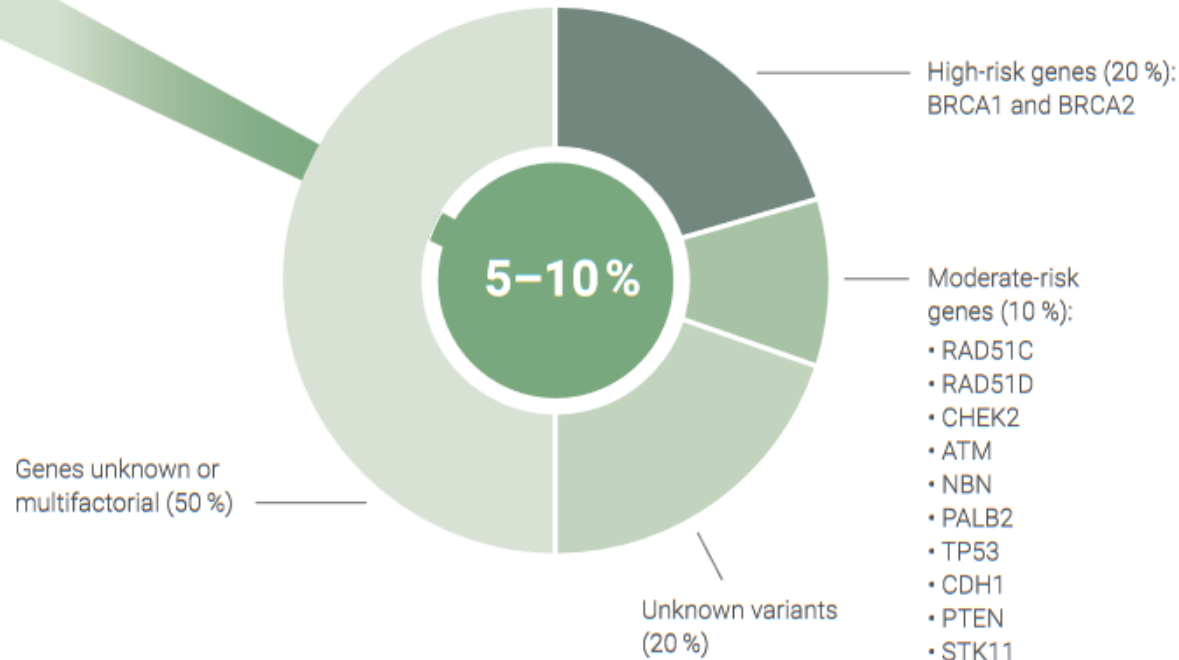
Breast Cancer

100 out of 1,000 women
get breast cancer

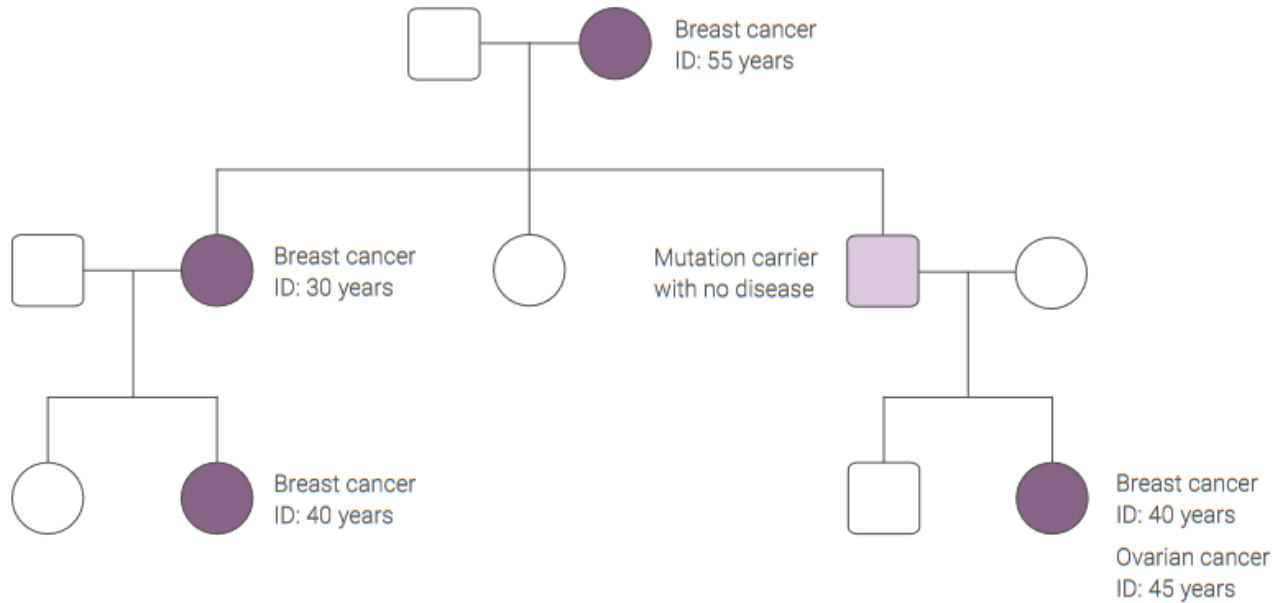


1,000 women

Familial breast cancer



Pedigree Chart

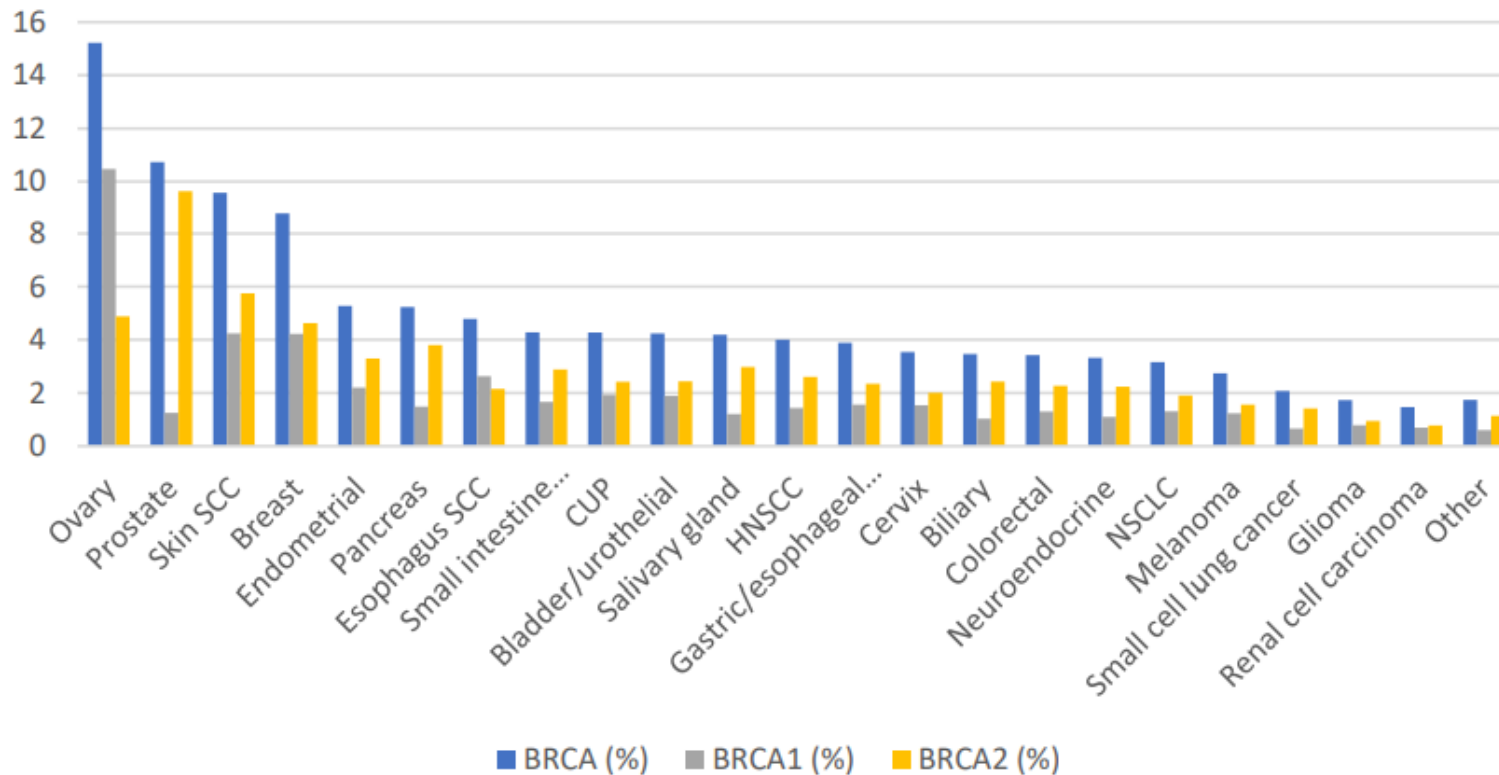


Indications of familial cancer:

- Cancers belonging to the same cancer spectrum in relatives (several generations)
- Initial diagnosis at an early age
- Second cancer in the same person (e.g. cancer in both breasts)



Prevalence of *BRCA* 1/2 Variants





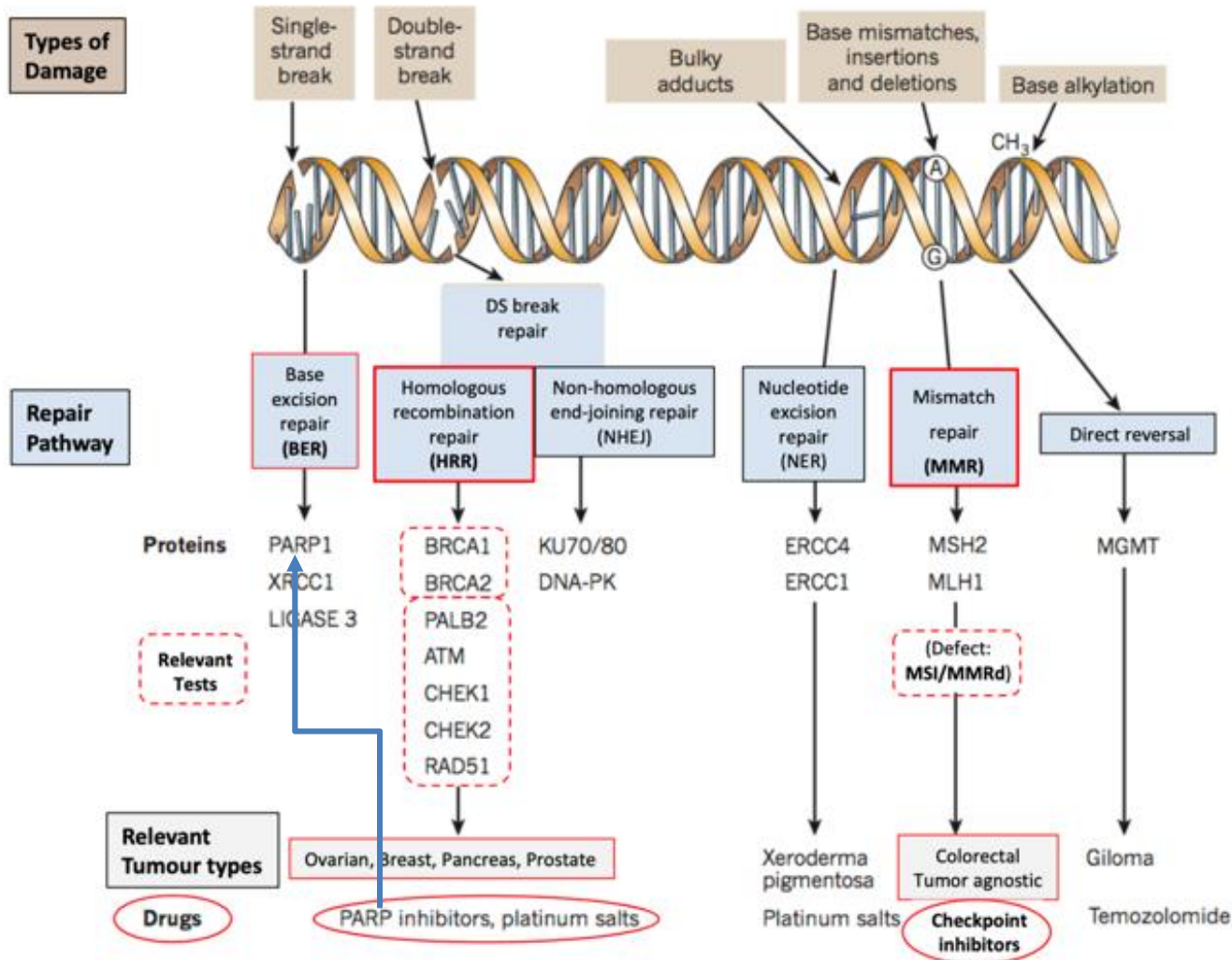
Characteristics of *BRCA1/2* Variants in the CIMBA database

Mutation Type	Designation	Definition	BRCA1 (N= 1,650)		BRCA2 (N= 1,731)	
			N	%	N	%
	Large Deletion (DL)	Genomic DNA deletion (encompassing at least 1 exon)	130	7.9	34	1.9
	Large Duplication (DP)	Genomic DNA duplication (encompassing at least 1 exon)	27	1.6	11	0.6
	Frameshift (FS)	Deletion or insertion resulting in a disruption of the open reading frame	948	57.5	1,141	65.9
	In-Frame Deletion (IFD)	Small deletions, splice site mutations or large genomic rearrangements that result in a change in the mRNA but do not change the open reading frame	1	<0.1	2	0.1
	Missense (MS)	Results in an altered amino acid	46	2.8	13	0.8
	Nonsense (NS)	Point mutation resulting in a stop codon	313	19.0	380	22.0
	Splice (SP)	Results in aberrant RNA splicing	166	10.1	131	7.6
	Multiple Types (including those listed above)		20	1.1	19	1.1

Rebbeck et al., Hum Mutation 2018

- Somatic and germline mutations can be detected

PARPi Therapy (BRCA/ BRCAness/ HRD)



© M. Winter



Molecular Pathology: Reporting of *BRCA* Results

Prof. Dr. Peter J. Wild
Senckenbergisches Institut für Pathologie

Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a.M.
Theodor-Stern-Kai 7, D-60596 Frankfurt a.M.
Tel.: 069/6301 5112 Fax: 069/6301 5241 Befundabfrage: 069/6301 5046



[Redacted Patient ID]

[Redacted Patient Name]

[Redacted Patient Address]

DFrühere Befunde- @ [Redacted]

Name:	[Redacted]	Eingang:	27.12.19	WILD/DEME
Vorname:	[Redacted]	Ausgang:	03.02.20	
Geboren:	[Redacted]	Station:	Archivkopie	
Ihre Nr.:	[Redacted]			

Molekularpathologischer NGS Befund (Panel: Oncomine Comprehensive Assay v3)

Klinische Angaben & Fragestellung: Kastrationsresistentes Prostatakarzinom, Gleason 4+4 (mCRPC), ED 09/2018. Prädiktive molekularpathologische Testung.

Materialangaben: Prostatastanzbiopsie. Basal rechts.

Proben ID: H22314-18, FFPE Block IV

Tumorzellgehalt: 50 %

Histologische Diagnostik: Prostatastanzbiopsie mit ausgedehnter Infiltration durch ein teils klein ballenförmige und strangförmig wachsendes Prostatakarzinom (Gleason-Score 8: 4+4, WHO Gruppe 4).Herbs

- Content
- Patient ID (here blinded)
 - Clinical information
 - Material
 - Tumor cell content
 - Pre- analytical/ histological findings

© M. Winter



Molecular Pathology: Reporting of *BRCA* Results

Content

- Immunohistochemical findings
- Molecular findings:
 - HGVS Annotation
 - Allel frequency
 - Classification

Immunohistochemie:

SIP (H9188-20):

CK-PAN (Clone MNF116, Dako-Agilent): positiv

B. Molekularpathologische Diagnostik:

Next-Generation Sequencing (Oncomine Comprehensive Assay v3):

1. Mutation:

-> Nachweis einer pathogenen Mutation im Gen BRCA2, c.3545_3546delTT, p.Phe1182Ter, Locus: chr13:32912035, Allelfrequenz 66,22%, Coverage 900 x (Soll ≥ 500 x). ClinVar ID: 37846 (pathogenic). gnomAD (globale Allelfrequenz): gAF 1,99e-5

-> Nachweis einer pathogenen Mutation im Gen *BRAF*, c.1801A>G, p.Lys601Glu, Locus: chr7:140453134, Allelfrequenz 24,36 %, Coverage 1995 x (Soll ≥ 500 x). ClinVar ID: 13966 (pathogenic). Cosmic ID: COSM478 (pathogenic). gnomAD (globale Allelfrequenz): gAF 3,98e-6

-> Nachweis einer Variante unklarer Signifikanz (VUS) im Gen *FANCI*, c.582604delIGGTGGAAAAAGCATTGAGCATGT, p.Val195LeufsTer40, Locus: chr15:89807166, Allelfrequenz 10,02 %, Coverage 1967 x (Soll ≥ 500 x). Keine Annotation dieser oder einer ähnlichen Variante.

2. Amplifikation:

-> Kein Nachweis einer pathogenen Amplifikation.

3. Fusion/Translokation:

-> Kein Nachweis einer Fusion.

Molecular Pathology: Reporting of *BRCA* Results

Content

- Biological interpretation

C. Biologische Bewertung:

-> **BRAF** ist ein Protoonkogen und kodiert das Protein B-RAF, eine Serin/Threonin-spezifische Kinase, die eine bedeutende Rolle in der Regulation der Zellproliferation und -teilung über den MAPK/ERK-Signalweg spielt. Die Mutation im Gen BRAF finden sich in ca. 1,5% der Patienten mit Adenokarzinom der Prostata (cBioPortal, Prostata Adenocarcinoma).

-> **BRCA2** kodiert das Tumorsuppressorprotein BRCA2, das für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA und dem Erhalt der genomischen Stabilität mitverantwortlich ist (Farmer H et al. Nature 2005). Deletionen, LOH, und loss-of-function mutations können zu einer Inaktivierung von BRCA2 führen (Walsh T et al. JAMA 2006, Wooster R et al. Nature 1995). Eine Mutation in dem Gen BRCA2 ist in ca. 3,3% der Adenokarzinome der Prostata zu detektieren (cBioPortal, Prostata Adenocarcinoma). Mutationen in den Genen BRCA1/2 sind beim Prostatakarzinom mit aggressiverem Tumorwachstum und einer höheren Rate an Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung des Tumors assoziiert (Dtsch Arztebl 2013; 110(27-28): A-1374 / B-1203 / C-1187).

-> **FANCI** ist mittels homologer an der DNA-Reparatur (Doppelstrangbrüche) beteiligt. Mutationen in dem Gen FANCI finden sich in ca. 2,11% der Prostatakarzinome (MyCancerGenome).

Molecular Pathology: Reporting of *BRCA* Results

Content

- Technical details
- Used databases

D. Spezialuntersuchung:

Pathologische Begutachtung, Makrodissektion repräsentativen Tumorgewebes, RNA-/DNA-Extraktion mittels MaxWell (Promega), Qualitätskontrolle. -> ThermoFisher S5 Workflow: Mutationsanalyse mittels Parallelsequenzierung (Next Generation Sequencing) des OncoPrint Comprehensive Assay v3. Da die DNA-/RNA-Konzentration mittels Qubit > 1,00 ng/µl ist, erfolgt die Library-Erstellung mittels Ion Chef System (ThermoFisher). Die Sequenzierung wurde auf dem Ion S5 durchgeführt. Die Daten wurden mit der „ion torrent“ Software analysiert und genomische Varianten identifiziert (Referenzgenom hg19). Nach Filtern für Artefakte und angenommene Keimbahnvarianten wurden alle relevanten somatischen proteinstrukturverändernden somatischen Varianten mit Allelfrequenzen von ≥5% berichtet. Mutationen mit niedrigerer Allelfrequenz wurden nach Ermessen in Abhängigkeit des Tumorzellgehaltes berichtet. Für die Klassifikation von genomischen somatischen Varianten als Mutationen und der Interpretation der Mutation wurden folgende Datenbanken verwendet: abSNP, COSMIC, gnomAD, ClinVar, OncoKB, CIVIC in den jeweils aktuellen Versionen.

Es wurden folgende Zielregionen untersucht:

Zielregionen des OncoPrint Comprehensive Assay v3:

Hotspot genes: AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AR, AXL, BRAF, BTK, CBL, CCND1, CDK6, CDK4, CHEK2, CSF1R, CTNNA1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, EZH2, ERCC2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, FOXL2, GATA2, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, H3F3A, HIST1H3B, IDH1, IDH2, JAK1, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KNSTRN, KRAS, MAGOH, MAP2K1, MAP2K2, MAP2K4, MAPK1, MAX, MED12, MDM4, MET, MYC, MYCN, MTOR, MYD88, NTRK1, NTRK2, NFE2L2, NRAS, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3CB, PPP2R1A, PTPN11, RAC1, RAF, RET, RHEB, ROS1, RHOA, SF3B1, SMO, SPOP, SRC, STAT3, SMAD4, U2AF1, TERT, TOP1, XPO1

Full-length genes: ATM, ARID1A, ATR, ATRX, BAP1, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, CDK12, CDKN1B, CDKN2B, CHEK1, CREBBP, FBXW7, FANCA, FANCD2, FANCI, MSH2, MLH1, MRE11A, MSH6, NBN, NOTCH2, NOTCH3, NF1, NF2, NOTCH1, PIK3R1, PTCH1, PTEN, PALB2, PMS2, POLE, RB1, SMARCB1, STK11, SETD2, SLX4, SMARCA4 TP53, TSC1, TSC2, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, RNF43

Copy number genes: AKT1, AR, AKT2, AKT3, ALK, AXL, BRAF, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDK2, CDK4, CDK6, CDKN2A, CDKN2B, ESR1, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGF19, FGF3, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, IGF1R, KIT, KRAS, MDM2, MDM4, MET, MYC, MYCL, MYCN, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PIK3CB, PPARG, RICTOR, TERT, TSC1, TSC2

Gene fusions (RNA basierend): ALK, AXL, AKT2, AR, BRAF, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, ERBB4, ESR1, EGFR, ERBB2, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, FGR, FLT3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, JAK2, KRAS, MDM4, MET, MYB, MYBL1, NF1, NOTCH1, NOTCH4, NRG1, NTRK1, NTRK2, NTRK3, NUTM1, PDGFRA, PDGFRB, PIK3CA, PRKACA, PRKACB, PTEN, PPARG, RAF1, RET, ROS1, RAD51, RB1, RELA, RSPO2, RSPO3, TERT

-> Die DNA-Sequenzierung (x200) des OncoPrint Comprehensive Assay v3 zeigt eine ausreichende Qualität: % amplicons > threshold: 93,39, % BED region > threshold: 94,87.

-> Die DNA-Sequenzierung (x500) des OncoPrint Comprehensive Assay v3 zeigt eine eingeschränkte Qualität: % amplicons > threshold: 87,04, % BED region > threshold: 89,83.

Genregionen mit einer vereinzelt Amplicon-Abdeckung von <500x:

AKT1, AKT3, AR, ARID1A, ATM, ATR, ATRX, BAP1, BRAF, BRCA1, BRCA2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CDK12, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CHEK1, CHEK2, CREBBP, EGFR, ERBB4, ESR1, FANCA, FANCD2, FANCI, FBXW7, FGF19, FGF3, FGFR1, FGFR3, FLT3, IGF1R, KDR, KIT, MAP2K2, MDM2, MDM4, MLH1, MRE11, MSH2, MSH6, MYC, MYCN, NBN, NF1, NF2, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, PALB2, PIK3CA, PIK3CB, PIK3R1, PMS2, POLE, PPARG, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51, RAD51B, RAD51C, RNF43, ROS1, SETD2, SLX4, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, STK11, TERT, TSC1, TSC2, XPO1

-> Die RNA-Sequenzierung des OncoPrint Comprehensive Assay v3 zeigt eine ausreichende Qualität: RNA: Number of mapped reads: 5.490.072 (Soll ≥500.000).

Hinweis: Insbesondere wird darauf hingewiesen, dass bei der Sequenzierung technisch bedingt einzelne Varianten durch eine geringe Abdeckung der Region oder abschnittsweise geringere Sequenzierqualität maskiert sein können. Eine Verwendung der Ergebnisse für therapeutische Entscheidungen liegt in der alleinigen Verantwortung des behandelnden Arztes.



Molecular Pathology: Reporting of *BRCA* Results

E. Zusammenfassung gefundener Alterationen:

- > *BRCA2* (NGS): positiv (p.Phe1182Ter, pathogen)
- > *BRAF* (NGS): positiv (p.Lys601Glu, pathogen)
- > *FANCI* (NGS): positiv (p.Val195LeufsTer40, VUS)

F. Abschließende Beurteilung:

Kastrationsresistentes Prostatakarzinom mit Nachweis einer pathogenen Mutation in den Genen *BRAF* und *BRCA2* als potentielles Target für eine *PARP-Inhibitor-Therapie*. Bezüglich einer Keimbahnmutation kann keine Aussage getroffen werden. Bei entsprechender Fragestellung verweisen wir auf die Humangenetik.

Zusätzlich konnte eine Variante unklarer Signifikanz im Gen *FANCI* detektiert werden.

Kein Nachweis einer Fusion.

Es werden nur pathogene Alterationen mit erfüllten Qualitätskriterien berichtet. Polymorphismen werden nicht berichtet. Der molekularpathologische Befund muss im Kontext mit den klinischen Daten diskutiert werden, gegebenenfalls besteht die Möglichkeit einer Vorstellung im molekularen Tumorboard.

Dies ist ein abschließender Befund; es folgen keine weiteren molekularpathologischen Analysen.

1 x Makrodissektion, 1 x DNA NGS (große Mutationssuche), 1 x RNA NGS (Nachweis von Fusionen), ICD-10: C61.

Prof. P.J. Wild

Dr.rer.physiol.M.Demes

Content

- Final assessment



Human Genetics: Reporting of *BRCA* Results



Dr. Senckenbergisches Institut für Humangenetik
Theodor-Stern-Kai 7 | Haus 11A | 60590 Frankfurt

Universitätsklinikum Frankfurt
FBREK-Zentrum
Dr. med. Gudrun Schmidt
Theodor-Stern-Kai 7, Haus 11A
D-60590 Frankfurt am Main

UNIVERSITÄTSMEDIZIN
FRANKFURT

**Dr. Senckenbergisches Institut
für Humangenetik**

Institutsleitung: Prof. Dr. Dr. med. Birgit Zirn
Laborleitung: Dr. rer. physiol. Melanie Winter
Theodor-Stern-Kai 7, Haus 11A
D-60590 Frankfurt am Main
T +49 (0) 69 6301 85929
F +49 (0) 69 6301 81866
humangenetik@unimedizin-ffm.de
www.unimedizin-ffm.de

Frankfurt, 28. Oktober 2024

Content

- Patient ID (here blinded)
- Indication

Molekulargenetischer Bericht (Abklärung im Rahmen des FBREK-Zentrums)

Name:	██████████	Fall-Nr.	P24-0001
Vorname:	██████████	Probenentnahmedatum:	01.10.2024
Geburtsdatum:	07.09.1990	Materialart:	EDTA Blut

Indikation: Mutter an MammaCa verstorben. Nachweis heterozygoter *BRCA2*-Variante bei Mutter, Schwester und Tante mtl.

Anforderung: Prädiktive Abklärung der familiären *BRCA2*-Variante

Human Genetics: Reporting of *BRCA* Results

Ergebnis: Auffälliger Befund

Gen	Variante	Zygotie	Erbgang	MAF (%)	Bewertung	Klasse
<i>BRCA2</i>	c.7558C>T p.Arg2520Ter	het.	AD	-	pathogen	5

Klassifizierung der Varianten entsprechend ACMG als 1=benigne, 2= wahrscheinlich benigne, 3=unklare Signifikanz, 4=wahrscheinlich pathogen, 5=pathogen. Die Beschreibung der Varianten erfolgt gemäß HGVS-Nomenklatur (<https://hgvs-nomenklature.org/stable>).

Erläuterung:

Nachweis der familiären heterozygoten pathogenen *BRCA2*-Variante, c.7558C>T, p.Arg2520Ter, chr13:32930687, Exon 15, NM_000059.4. Der Austausch eines Cytosins (C) zu einem Thymin (T) an Nukleotidposition 7558 bedingt eine Sequenzveränderung im *BRCA2*-Gen, die zu einer vorzeitigen Terminierung der Proteinbiosynthese an Aminosäureposition 2520 führt. Dies bedingt einen Funktionsverlust des Genprodukts bzw. Proteins und gilt als pathogen. Diese Variante ist in der internationalen Datenbank für Brustkrebs (<https://research.nhgri.nih.gov/bic/>) beschrieben und ist nach heutigem Kenntnisstand ursächlich für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, an Brust- und Eierstockkrebs bei Frauen, und an Brustkrebs, Pankreas oder Prostatakrebs bei Männern, zu erkranken.

Humangentische Beurteilung:

Die Disposition für familiären Brust- und Eierstockkrebs wird autosomal dominant vererbt und häufig durch Varianten im *BRCA1*-Gen oder im *BRCA2*-Gen verursacht, in seltenen Fällen aber auch durch Varianten in Genen mit einer moderaten Risikoerhöhung, wie z.B. *ATM*, *CHEK2* oder *PALB2*. Dies bedeutet, dass erstgradig Verwandte (Eltern, Geschwister, Kinder) unabhängig vom Geschlecht mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% ebenfalls Anlageträger sind.

Da eine krankheitsverursachende Variante bei der Mutter und der Schwester des Patienten bekannt ist, können sich weitere Familienangehörige ebenfalls molekulargenetisch abklären lassen. Eine prädiktive molekulargenetische Testung ist nach genetischer Beratung möglich.

- Molecular findings:
 - HGVS Annotation
 - Allel frequency
 - Classification
 - Interpretation
 - Assessment



Human Genetics: Reporting of *BRCA* Results

- Technical details
- Used databases

Hinweis:

Das Expertengremium des Deutschen Konsortiums (FBREK) führt regelmäßig eine Überprüfung der Bewertung von Sequenzvarianten anhand der aktuellen wissenschaftlichen Datenlage durch und informiert bei relevanten Veränderungen (Recall). Nach §10 GenDG soll das Ergebnis im Rahmen eines Befundgesprächs persönlich mitgeteilt werden.

Methoden:

gDNA-Extraktion (Maxwell® RSC Whole Blood DNA Kit, Promega) und Qualitätskontrolle. Illumina Workflow: Mutationsanalyse mittels Parallelsequenzierung (Next Generation Sequencing) des TruRisk®v2 Custom Genpanels. Mit einem DNA-Input von 5-1000 ng (gemessen mittel Qubit) erfolgt die Library-Erstellung laut Protokoll. Die Sequenzierung wird auf dem MiSeq oder NextSeq 500 durchgeführt. Die Sekundäranalyse der Daten wurden mit BaseSpace (Illumina) und die Tertiäranalyse mit Molecular Health *BRCA* analysiert und Keimbahnvarianten identifiziert (Referenzgenom hg19). Nach Herausfiltern von Artefakten werden alle relevanten Keimbahnvarianten mit Allelfrequenzen von $\geq 5\%$ berichtet. Mutationen mit niedrigerer Allelfrequenz werden nach Ermessen berichtet. Für die Klassifikation und Interpretation der Keimbahnvarianten werden unter Umständen folgende Datenbanken verwendet: dbSNP, COSMIC, gnomAD, ClinVar, OncoKB, CIVIC, cKB, OncoKB, *TP53* Database in den jeweils aktuellen Versionen. Klinisch relevante Veränderungen mit unzureichender Abdeckung werden mit einer zweiten unabhängigen Methode überprüft.

Zielregionen des TruRisk®v4 Custom Genpanels:

ATM (NM_000051.4), *BARD1* (NM_000465.4), *BRCA1* (NM_007294.4), *BRCA2* (NM_000059.4), *BRIP1* (NM_032043.3), *CDH1* (NM_004360.5), *CHEK2* (NM_007194.4), *MLH1* (NM_000249.4), *MSH2* (NM_000251.3), *MSH6* (NM_000179.3), *PALB2* (NM_024675.4), *PMS2* (NM_000535.7), *PTEN* (NM_000314.8), *RAD51C* (NM_058216.3), *RAD51D* (NM_002878.4), *STK11* (NM_000455.5) und *TP53* (NM_000546.6). Abdeckung =>x50

Die Bewertung der Varianten erfolgt anhand der Kriterien der VUS-Task-Force des Deutschen Konsortiums basierend auf den ENIGMA-Kriterien und den ACMG-Guidelines (<https://enigmaconsortium.org/>; Richards, S. et al., 2015, Genet Med; Hauke et al., 2021, Senologie).

Hinweis:

1x DNA Sequenzierung (FBREK)

Bei Rückfragen stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. rer. physiol. Melanie Winter
Laborleitung

Prof. Dr. Dr. med. Birgit Zirn
Institutsleitung



- Fragen?

T +49 69 6301 - 5422

M +49 176 83180368

Melanie.Winter@unimedizin-ffm.de

AG Winter (Translationale experimentelle Molekulare Diagnostik)

Homepage

<https://www.unimedizin-ffm.de/einrichtungen/institute/sph>