

somaticGermline Patient example - Report

MIRACUM-Pipe

30. April 2021

Inhaltsverzeichnis

1 Übersicht	2
2 Mutationsanalyse	3
2.1 Detaillierte Übersicht	3
2.2 Cancer Genes	4
3 Copy Number Variations	6
3.1 Übersicht	6
3.2 Cancer Genes	7
4 Wichtige Signalwege	8
4.1 Somatische Mutationen in wichtigen Signalwegen	8
4.2 CNVs in wichtigen Signalwegen	8
5 Weitere Analysen	9
5.1 Mutationssignaturen	9
5.2 TopArt Gene für G1	9
5.3 Veränderungen in der Keimbahn	10
6 Funktionelle Analysen	10
6.1 SNVs - Hallmarks	11
6.2 CNVs	12
7 Qualitätskontrollen und Sequenzierungsstatistiken	13
7.1 Coverage	14
A Tabellen aller detektierten Mutationen	16
A.1 Somatische Mutationen	16
A.2 Loss of Heterozygosity	16
A.3 Keimbahn Mutationen	16

B	Informationen zu verwendeter Software und Paketen	18
B.1	Genom	18
B.2	Programmversionen	18
B.3	Annovar Datenbanken	18

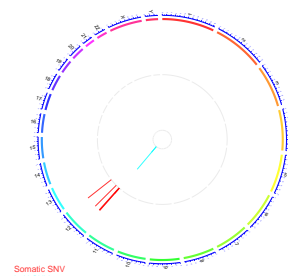
1 Übersicht

Tabelle 1: Schlüsselergebnisse der Analyse

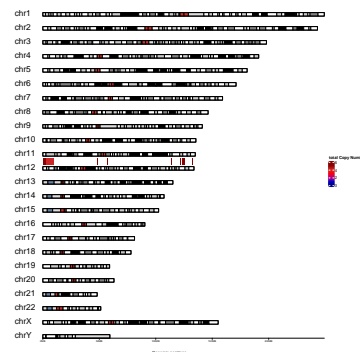
Eigenschaften	Wert
Capture Kit	Agilent SureSelect V5UTR
Abgedeckte Region	75Mb
Mutationslast (exonisch, VAF > 5%)	0.2/Mb
Anzahl somatischer Mutationen (VAF > 5%)	6
BRCAness	< 1.0%
Anzahl CNV- Regionen	10 Regionen

Tabelle 2: Zusammenfassung der identifizierten Mutationen

Mutationstyp	Anzahl	Tumorsuppressoren	Onkogene	Hotspots
SNV	5	0	1	1
InDel	0	0	0	0
LoH	1	0	0	0



(a) Übersicht aller somatischen Mutationen



(b) Übersicht aller CopyNumberVariations (CNVs)

Abbildung 1: Darstellung aller identifizierten Mutationen

Tabelle 3: Auffälligkeiten in Qualitätsmerkmalen der Proben

Probe	Auffälligkeiten
Tumor	Mittlere Coverage: 7.39, Coverage > 8: 6%, Coverage > 40: 5%
Keimbahn	Mittlere Coverage: 5.35, Coverage > 8: 6%, Coverage > 40: 4%

2 Mutationsanalyse

2.1 Detaillierte Übersicht

In der Analyse werden nur seltene Mutationen mit einer *Variant Allele Frequency* (VAF) über 5% betrachtet. Gezeigt werden Mutationen vom Typ *single nucleotide variation* (SNV), *Insertion and Deletions* (InDel) und *Loss of Heterozygosity* (LoH). Letztere sind Mutationen, die in der Keimbahn heterozygot vorliegen, im Tumor allerdings homozygot.

Im Weiteren werden die Ergebnisse der Mutationsanalyse in Tabellen dargestellt. Zunächst eine Übersicht über die Anzahl der Mutationen, aufgeteilt in verschiedene Mutationstypen (Tab 4). Es wird gelistet, wieviele dieser Mutationen in einem sogenannten *Cancergene* nach OncoKB, aufgeteilt in Tumorsuppressoren und Onkogene, identifiziert wurden. Desweiteren wird die Anzahl der sogenannten *Cancer Hotspot Mutationen* (HS) nach cancerhotspots.org angegeben.

Die Lage der Mutationen im Genom wird, aufgeteilt nach Mutationstyp (somatische SNV, somatische InDel, LoH SNV, LoH InDel), im Circosplot dargestellt (Abb 2).

Tabelle 4: Zusammenfassung der identifizierten Mutationen

Mutationstyp	Anzahl	Zygotität	Tumorsuppressoren	Onkogene	Hotspots
somatic SNV	0	homozygot	0	0	0
somatic SNV	5	heterozygot	0	1	1
LoH SNV	1	-	0	0	0
somatic InDel	0	homozygot	0	0	0
somatic InDel	0	heterozygot	0	0	0
LoH InDel	0	-	0	0	0

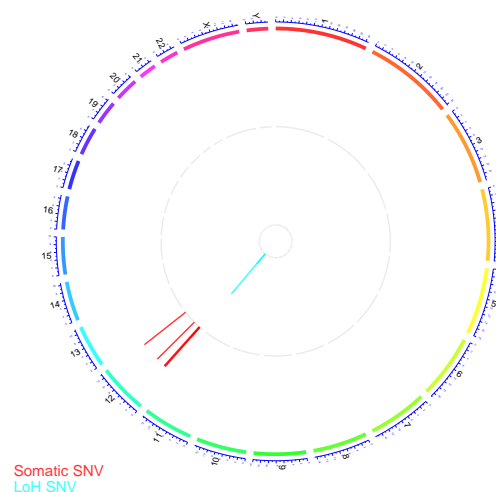


Abbildung 2: Circos Plot mit allen somatischen Mutationen

2.2 Cancer Genes

Somatische Mutationen

In folgenden Tabellen werden Gensymbol, Genname und der entsprechende Aminosäurenaustausch gelistet. Die Funktion der Mutationen werden durch Abkürzungen beschrieben:

- nsSNV - nonsynonymous SNV
- SG - stopgain
- SL - startloss
- nfsDel - nonframeshift deletion
- nfsSub - nonframeshift substitution
- fsDel - frameshift deletion
- nfsIns - nonframeshift insertion
- fsIns - frameshift insertion
- splice - splice region variant

Die VAF wird gelistet, zusammen mit den zu Grunde liegenden Readcounts. Zunächst die Anzahl an Variantenreads, danach die Gesamtcoverage an dieser Stelle. Außerdem werden nur seltene Mutationen gelistet. Selten bedeutet dabei, dass die *Minor Allele Frequency* (MAF) unter 0.001 liegen muss, basierend auf den Datenbanken gnomAD exome. Desweiteren werden Strukturanalysen via Condel und CADD zu den entsprechend mutierten Proteinen durchgeführt. Diese Ergebnisse werden für Condel in den folgenden Tabellen durch eine Klassifizierung beschrieben: D - deleterious, N - neutral. Die Analyse beinhaltet zusätzliche Annotationen bekannter Mutationen wie Cosmic, Clinvar und dbSNP. Die Ergebnisse werden nur reduziert und übersichtlich dargestellt. Es werden für die Mutationen hier nur die entsprechenden Cosmic Nummern angegeben. Am Ende wird die Zuordnung des Gens als Cancergenese nach der Klassifikation von OncoKB dargestellt. Die folgende Tabelle 5 enthält alle SNVs und InDels in Cancergenese für diese Probe.

Die Tabelle für LoH Mutationen ist analog zur vorherigen aufgebaut (Tab 6). Da LoH Mutationen sowohl im Tumor als auch in der Keimbahn detektiert werden, gibt es hier zwei Spalten zur VAF. Zunächst wird die Frequenz im Tumor gelistet und auch nach dieser geordnet. Die folgende Spalte gibt die VAF in der Keimbahn an. Analog zu oben mit den entsprechenden Coverages.

Bei den Gensymbolen ist ein Link zur Mutation entsprechenden Seite von [Genome Nexus](#) hinterlegt. Dort wird ein Lollipop-Plot zur Lage der Mutation im Gen angezeigt sowie weitere Informationen. Bei dem Aminosäurenaustausch ist ein

Link zum Eintrag der Mutation in der [The Variant Interpretation for Cancer Consortium Meta-Knowledgebase](#) verknüpft. Dieser Link funktioniert allerdings aufgrund eines Sonderzeichens in der URL nicht bei Verwendung des Dokuments mit der Vorschau von Apple, aber unter Verwendung von Acrobat Reader.

Im Anhang befinden sich Tabellen zu allen detektierten somatischen, LoH und Keimbahnmutationen (Kap A.1, A.2, A.3). Es werden allerdings nur seltene, exonische Mutationen mit einer VAF über 5% gelistet.

Tabelle 5: Alle identifizierten somatischen Mutationen in Cancergenes geordnet nach VAF.

Gen	AA-Austausch	Funktion	VAF (Coverage)	MAF	Condel	Cosmic	OG	TSG
KRAS	p.G12V	nsSNV	26.47% (36 136)	.	D	COSV55497419	1	0

LoH

Tabelle 6: Es wurden keine LoH in Cancergenes identifiziert.

Gen	AA-Austausch	Funktion	VAF: Coverage..Tumor	VAF: Coverage..Keimbahn	MAF	Condel	Cosmic	OG	TSG
.

3 Copy Number Variations

3.1 Übersicht

Im folgenden sind die 10 signifikanten Regionen mit *Copy Number Variation* (CNV) als Ideogramm dargestellt (Abb 3). Dabei wird über allen Chromosomen in den Zeilen die totale Anzahl an Kopien farbig markiert aufgetragen. Dabei wird auf das Markieren von Regionen mit normaler Ploidität verzichtet. In blau dargestellt sind Verluste, je dunkler das Blau, desto weniger Kopien gibt es von dieser Region (1 oder 0). Regionen mit gesteigerten Kopien sind rot markiert, je dunkler das Rot, desto mehr Kopien gibt es in der Region (3 aufsteigend).

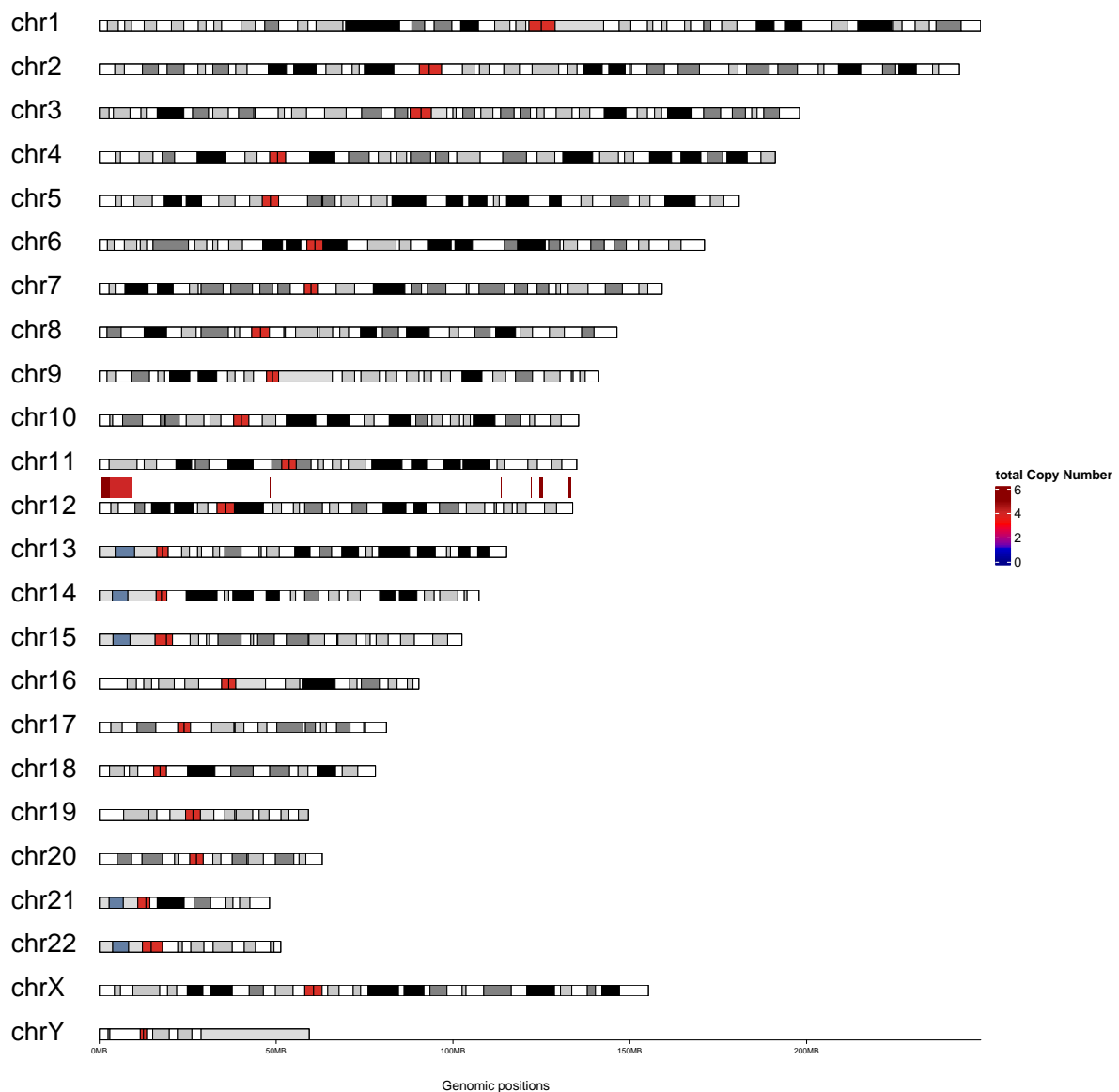


Abbildung 3: Copy Number Variation - Ideogramm

3.2 Cancer Genes

Wie bei den somatischen Mutationen werden auch bei den CNVs betroffene Cancers (Onkogene und Tumorsuppressoren) genauer betrachtet und in folgenden Tabellen dargestellt. Dabei werden für Onkogene in Tabelle 7 Losse und in Tabelle 8 Gains von Kopien dargestellt. Das Gleiche ist analog für Tumorsuppressoren in Tabelle 9, sowie Tabelle 10 zu sehen.

Onkogene

Tabelle 7: Keine Losse in Onkogenen identifiziert.

Chromosom	Kopien	Onkogene
.	.	.

Tabelle 8: Keine Gains in Onkogenen identifiziert.

Chromosom	Kopien	Onkogene
.	.	.

Tumorsuppressoren

Tabelle 9: Keine Losse in Tumorsuppressoren identifiziert.

Chromosom	Kopien	Onkogene
.	.	.

Tabelle 10: Keine Gains in Tumorsuppressoren identifiziert.

Chromosom	Kopien	Onkogene
.	.	.

4 Wichtige Signalwege

Es werden fünf wichtige Signalwege betrachtet: *RAF-MEK-ERK*, *PI3K-AKT-mTOR*, *DNA-Damage-Response*, *Cell Cycle* und *Tyrosine Kinases*. Es wird untersucht, welche Gene in diesen Signalwege eine Mutation tragen. Diese Mutationen sind analog zu Kapitel 2.2 in Tabelle 11 dargestellt. Wenn in einem Signalweg keine Mutation identifiziert wurde, taucht er in der Tabelle nicht auf.

Außerdem werden auch die CNVs auf ihre Zugehörigkeit zu den fünf wichtigen Signalwegen untersucht und in Tabelle 12 dargestellt. Dabei werden Gene mit der selben totalen Kopienanzahl in einer Zeile zusammengefasst.

4.1 Somatische Mutationen in wichtigen Signalwegen

Tabelle 11: Identifizierte somatische Mutationen in wichtigen Signalwegen

Signalweg	Gen	AA-Austausch	Funktion	VAf (Coverage)	MAF	Condel	Cosmic
RAF-MEK-ERK	KRAS	p.G12V	nsSNV	26.47% (36 136)	.	D	COSV55497419

4.2 CNVs in wichtigen Signalwegen

Tabelle 12: Es wurden keine CNVs in wichtigen Signalwegen identifiziert.

Signalweg	Status	Kopien	Gene
.	.	.	.

5 Weitere Analysen

5.1 Mutationssignaturen

Untersucht werden die Mutationssignaturen basierend auf den COSMIC Mutation Signatures (V1) für alle somatischen Mutationen in der Probe. In der folgenden Tabelle 13 werden nur Signaturen gelistet, die einen Anteil größer als 1% haben. In der Tabelle sind außer dem Anteil auch noch die Konfidenzintervalle (KI) angegeben. Die Signatur AC3 wird als *BRCAness* bezeichnet.

Der TopArt-Score besteht aus vier verschiedenen Anteilen. Die ersten beiden Kategorien P1 und P2 sind phänotypische Kriterien. Für den TopArt-Score P1 ist wichtig, ob die *BRCAness*-Signatur vorhanden ist. Ist sie nicht vorhanden, bekommt der Patient in dieser Kategorie null Punkte. Ist die Signatur vorhanden, das KI enthält aber die Null, erhält der Patient einen Punkt. Enthält das KI die null nicht, so gibt es zwei Punkte. Das zweite phänotypische Kriterium P2 können wir nicht auswerten.

Tabelle 13: Ergebnisse Mutationssignatur Analyse

Signatur	Beschreibung	Anteil in %	Konfidenzintervall in %
AC1	spontaneous	27.40	(8.35;50.52)
AC13	deamination	9.34	(0.72;19.61)
AC14	APOBEC	8.91	(-19.83;38.47)
AC20	unknown	12.15	(-17.23;45.02)
AC28	associated w. small indels at repeats	22.24	(9.16;39.28)
AC29	unknown	19.96	(-4.4;49.33)
	tobacco chewing		

5.2 TopArt Gene für G1

Die beiden anderen Kategorien G1 und G2 für den TopArt-Score sind genotypische Kriterien. Für die erste Kategorie werden die Gene mit somatischen Mutationen auf ihre Zugehörigkeit zu einer Liste aus 181 Genen geprüft. Wenn solche somatischen Mutationen detektiert werden, so sind sie in folgender Tabelle dargestellt (Tab 14). Gibt es in einem Gen eine homozygote Mutation, erhält der Patient in dieser Kategorie zwei Punkte. Gibt es eine heterozygote, so erhält er einen Punkt. Die zweite genotypische Kategorie G2 betrachtet Keimbahn-Mutationen. Diese können wir im Moment nicht auswerten.

Hat der Patient insgesamt mehr als 3 Punkte und stammt mindestens einer dieser Punkte aus den genotypischen Kriterien, so ist der TopArt-Score positiv.

Tabelle 14: Keine somatischen Mutationen in TOPART-G1-Genen.

Signalweg	Gen	AA.Austausch	Funktion	VAF.Coverage.	MAF	Condel	Cosmic
.

5.3 Veränderungen in der Keimbahn

Es werden alle Keimbahnmutationen in Cancergenes gelistet (Tab 15). Die Spalten sind analog zu Tabelle 5 in Kapitel 2.2.

Tabelle 15: Keine Mutationen in Cancergenes in der Keimbahn identifiziert.

Gen	AA.Austausch	Funktion	VAF.Coverage.	MAF	Condel	Cosmic	OG	TSG
.

Keimbahnmutationen in wichtigen Signalwegen

Analog zu Kapitel 4, Tabelle 11, werden Keimbahnmutationen in den fünf genannten Signalwegen betrachtet (Tab 16).

Tabelle 16: Keine Keimbahnmutationen in wichtigen Signalwegen identifiziert.

Signalweg	Gen	AA.Austausch	Funktion	VAF	MAF	Condel	Cosmic
.

6 Funktionelle Analysen

Für die SNVs und die CNVs werden funktionelle Analysen durchgeführt. Dabei wird untersucht, welche Signalwege aus den Hallmarks durch die Mutationen betroffen sind. Die Ergebnisse werden für die SNVs in Tabelle 17 und für die CNVs in Tabellen 18 für die Steigerungen und 19 für die Verluste dargestellt.

6.1 SNVs - Hallmarks

Tabelle 17: Keine signifikant betroffene Signalwege identifiziert.

Term	Count	Size	p.value	adj.P.Val
.

6.2 CNVs

GAIN

Tabelle 18: Ergebnisse Hallmarks Analyse - GAIN, top 20

Term	Count	Size	p-value	adj.P.Val
HALLMARK_COAGULATION	6	138	2.69e-03	1.35e-01
HALLMARK_WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING	3	42	8.52e-03	1.42e-01
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	4	87	1.14e-02	1.42e-01
HALLMARK_MTORC1_SIGNALING	6	200	1.39e-02	1.42e-01
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE	6	200	1.42e-02	1.42e-01
HALLMARK_MYC_TARGETS_V2	3	58	2.04e-02	1.70e-01
HALLMARK_HYPOXIA	5	200	4.43e-02	3.16e-01

LOSS

Tabelle 19: Ergebnisse Hallmarks Analyse - LOSS, top 20

Term	Count	Size	p-value	adj.P.Val
.	.	.	NA	NA

7 Qualitätskontrollen und Sequenzierungsstatistiken

Für die Analysen werden nur Reads mit einer durchschnittlichen Basenqualität von mehr als 28 nach der *Base Quality Score Recalibration* (BQSR) berücksichtigt. In Abbildung 4 sind die Basenqualitäten für jede Position in den Reads dargestellt. Für jede Probe einmal direkt aus dem Sequenzierer (Abb 4, obere Reihe) und einmal nach der BQSR (Abb 4, untere Reihe).

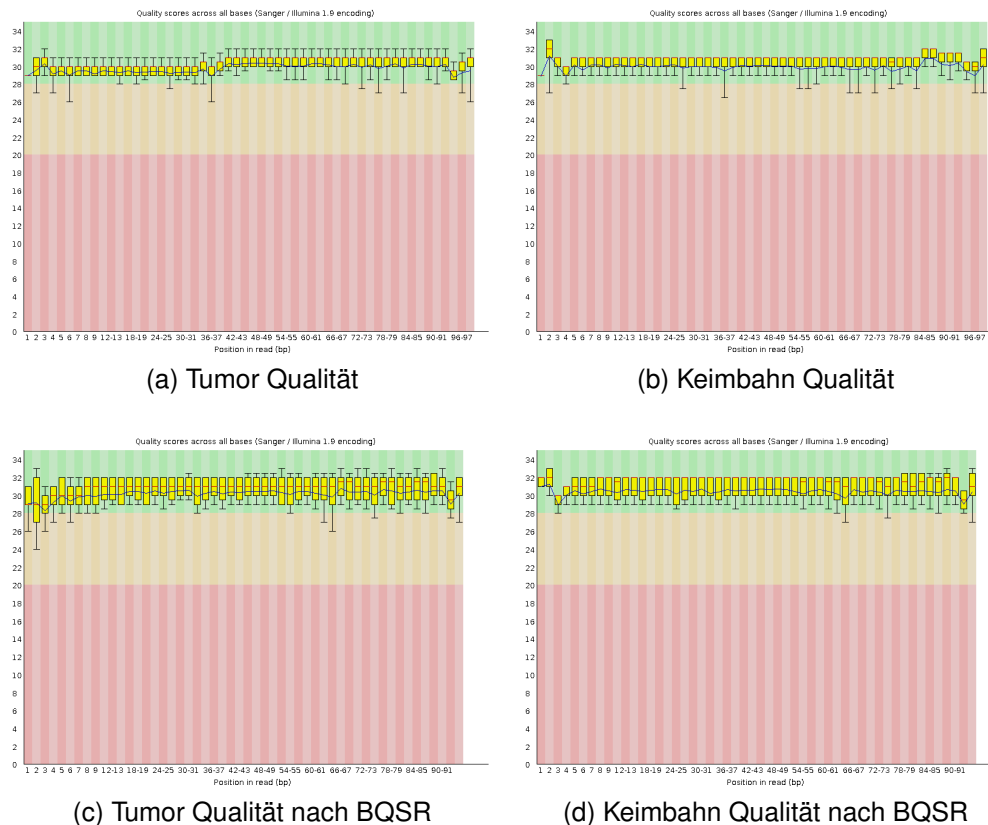


Abbildung 4: Darstellung der Sequenzierung als Output aus dem Sequenzierer, (a) und (b), und nach der BQSR, (c) und (d)

Tabelle 20: Qualitätsparameter zu den Proben

Gewebe	Tumor	Keimbahn	Soll
Mittlere Coverage	7.39 Reads	5.35 Reads	Sehr gut >100, gut: 80-100
Anteil der Basen > 8 Reads	6 %	6 %	>90%
Anteil der Basen > 40 Reads	5 %	4 %	Sehr gut: >90%, akzeptabel: >60%
Anteil der exonschen Basen > 8 Reads	5 %	5 %	>90%
Anteil der exonschen Basen > 40 Reads	5 %	5 %	Sehr gut: >90%, akzeptabel: >60%
Insertgröße	153.6 ± 47.5bp	181.5 ± 63 bp	>100 bp
GC-Anteil	52 %	48 %	40-60 %
Mittlere Qualität pro Base	30.25	30.44	> 0

7.1 Coverage

Die Mean-Coverage und die Gesamtcoverage der beiden Proben ist ein weiteres Qualitätsmerkmal. Sind die Werte zu niedrig, sind viele Stellen im Genom unzureichend abgedeckt. Abbildung 5 zeigt die kummulative Verteilung, durch die der Anteil an targeted Basen, die von einer bestimmten Anzahl an Reads abgedeckt sind, beschrieben wird.

Tabelle 21: Coverageinformation zu den Proben

Gewebe	Mean	Anzahl aller Reads
Tumor	7.39 Reads	8 Mio. Reads
Keimbahn	5.35 Reads	6 Mio. Reads

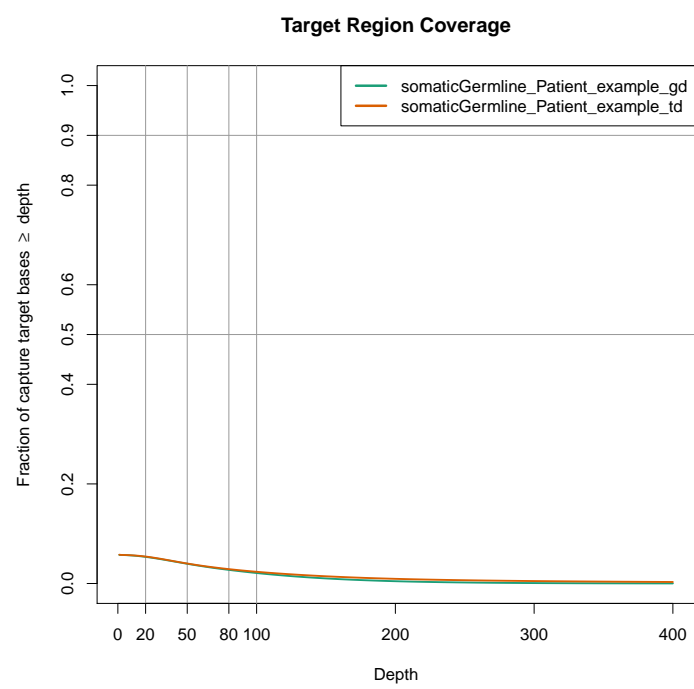


Abbildung 5: Coverage

A Tabellen aller detektierten Mutationen

A.1 Somatische Mutationen

Tabelle 22: Alle identifizierten somatischen Mutationen geordnet nach VAF

Gen	AA-Austausch	Funktion	VAF (Coverage)	MAF	Condel	Cosmic	Cancergene
CCDC62	p.E507K	nsSNV	42.86% (15 35)	.	N	COSV53435582	
PDE3A	p.N936H	nsSNV	33.33% (8 24)	.	D	.	
ARHGAP9	p.R137C	nsSNV	31.34% (21 67)	0	N	COSV62722072	
C2CD5	p.A806T	nsSNV	27.59% (8 29)	.	N	COSV61723353	
KRAS	p.G12V	nsSNV	26.47% (36 136)	.	D	COSV55497419OG	

A.2 Loss of Heterozygosity

Tabelle 23: Identifizierte Loss of Heterozygosity geordnet nach VAF in der Tumorprobe

Gen	AA-Austausch	Funktion	VAF (Coverage) Tumor	VAF (Coverage) Keimbahn	MAF	Condel	Cosmic	Cancergene
FOXJ2	p.R131Q	nsSNV	80% (92 115)	45.16% (28 62)	.	N	.	

A.3 Keimbahn Mutationen

Tabelle 24: Alle identifizierten Keimbahnmutationen geordnet nach VAF

Gen	AA-Austausch	Funktion	VAF (Coverage)	MAF	Condel	Cosmic	Cancergene
CELA1	p.Y5S	nsSNV	100% (19 19)	0	N	COSV53329344	
CELA1	p.Y5H	nsSNV	100% (19 19)	0	N	COSV53329184	

Tabelle 24: Alle identifizierten Keimbahnmutationen geordnet nach VAF (*continued*)

Gen	AA-Austausch	Funktion	VAF (Coverage)	MAF	Condel	Cosmic	Cancergene
CELA1	p.L4Afs*21	fsIns	100% (20 20)	.	.	COSV53329204	
CAPRIN2	p.E386K	nsSNV	74% (37 50)	1e-04	D	COSV51830169	
BTBD11	p.P779L	nsSNV	67.35% (33 49)	0	N	.	
LRP1	p.G3015S	nsSNV	65.69% (67 102)	9e-04	N	.	
FAM186A	p.A1368S	nsSNV	52.17% (24 46)	6.963e-05	N	.	
PRB4	p.Q109X	SG	47.62% (10 21)	.	.	.	
PRH2	p.R46H	nsSNV	47.27% (52 110)	7e-04	N	COSV67171614	
GATC	p.A66T	nsSNV	42.59% (46 108)	6.48e-05	D	.	
ATN1	p.Q502_H503insGG	ins	41.53% (49 119)	.	.	.	
KMT5A	p.D240A	nsSNV	35.48% (11 31)	.	D	COSV57863442	
KMT5A	p.L332P	nsSNV	32.68% (50 153)	.	D	COSV57862041	
PRB4	p.P123R	nsSNV	26.67% (4 15)	4e-04	N	COSV54394955	
KRT2	p.F108_S109insGGGGSGF	ins	25.58% (11 46)	1e-04	.	.	

B Informationen zu verwendeter Software und Paketen

B.1 Genom

- UCSC hg19

B.2 Programmversionen

- FastQC: 0.11.10.devel
- Trimmomatic: 0.39
- BWA: 0.7.17-r1198-dirty
- bam-readcount: 0.8.0-unstable-7-625eea2
- samtools 1.10
- GATK: 3.8-1-0-gf15c1c3ef
- picard-tools: 2.20.6
- VarScan: 2.4.4
- annovar: 2020Jun08
- bedtools: 2.28.0
- Control-FREEC: 11.6
- Java: openjdk-8-hotspot

B.3 Annovar Datenbanken

- refGene GRCh37
- dbnsfp41a
- avsnp150 (dbSNP)
- clinvar_20210223
- intervar_20180118
- cosmic91
- gnomad_genome Version 2.1.1