

# **Masterarbeit**

## **Limitationen der ACMG-Richtlinie bei *BRCA1*- und *BRCA2*-bedingtem hereditärem Brust- und Ovarialkarzinom (HBOC)-Syndrom**

eingereicht von  
**Müslüm Gezer**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science (M.Sc.)**  
an der  
**medizinischen Universität Graz**

ausgeführt im Rahmen des Universitätslehrgangs  
**Master Medizinische Genetik**

unter der Anleitung von Betreuer

**Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. Petek Erwin**

Graz, 21.05.2021



## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die denbenutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, 21.05.2021

Müslüm Gezer



# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>11</b>
Ausgangslage und Motivation	11
<b>2 Literatur</b>	<b>13</b>
2.1 Brust- und Eierstockkrebs	13
2.1.1 Epidemiologie von Brustkrebs	13
2.1.2 Etiologie und Risikofaktoren beim Mammakarzinom	14
2.1.3 Klassifikation von Brustkrebs	15
2.1.4 Epidemiologie von Eierstockkrebs	18
2.1.5 Etiologie und Risikofaktoren bei Eierstockkrebs	18
2.1.6 Klassifikation von Eierstockkrebs	19
2.1.7 Hereditärer Brust- und Eierstockkrebs	20
2.1.8 Ethik und genetische Beratung bei Brustkrebs	21
2.2 Die <i>BRCA1</i> - und <i>BRCA2</i> -Gene	22
2.2.1 Struktur des <i>BRCA1</i> -Gens und des <i>BRCA1</i> -Proteins	25
2.2.2 Struktur des <i>BRCA2</i> -Gens und des <i>BRCA2</i> -Proteins	26
2.2.3 <i>BRCA1</i> - und <i>BRCA2</i> -Mutationen	26
2.2.4 Inzidenz von <i>BRCA1</i> - und <i>BRCA2</i> -Mutationen in verschiedenen Populationen	27
2.3 ACMG Richtlinie	28
<b>3 Methoden</b>	<b>30</b>
<b>4 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>33</b>
4.1 Funktionelle Charakterisierung der Loss-of-Function-Varianten der <i>BRCA1</i> - und <i>BRCA2</i> -Gene	33
4.2 Kriterium PS1 - bekannte Aminosäureveränderung	35
4.3 Kriterien PS2 und PM6 – <i>de novo</i> -Varianten	35
4.4 Kriterien PS3 und BS3 - Funktionelle Analysen	36
4.5 Kriterien PS4, PM2, BA1, BS1 und BS2 - Kontrollen und Populationsprojekte	40
4.6 PM1, PP2 und BP1 - Hotspot-Regionen, -Domänen und Variantenspektrum	42
4.7 Kriterien PM3, BP2, PP1 und BS4 - Cis/trans- und Segregationsanalyse	45
4.8 Kriterien PM4 und BP3 - In-frame-Indels und Stopp-Verluste	47
4.9 Kriterien PP3 und BP4 – <i>in silico</i> -Algorithmen	47
<b>5 Schlussfolgerung</b>	<b>50</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>53</b>
6.1 Abbildungsverzeichnis	53
6.2 Tabellenverzeichnis	53
6.3 Literaturverzeichnis	54

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ACMG</b>	American College of Medical Genetics
<b>AMP</b>	Association for Molecular Pathology
<b><i>BRCA1</i></b>	Brustkrebs 1
<b><i>BRCA2</i></b>	Brustkrebs 2
<b>BRCT</b>	<i>BRCA1</i> C Terminus
<b>CIP</b>	conflicting interpretations of pathogenicity
<b>CAP</b>	College of American Pathologists
<b>dbSNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism Database
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>ExAC</b>	Exome Aggregation Consortium
<b>GLOBOCAN</b>	Internationale Gesellschaft für Krebsforschung
<b>gnomAD</b>	Genome Aggregation Database
<b>GWAS</b>	Genomweite Assoziationsstudien
<b>HBOC</b>	Hereditärer Brust- und Eierstockkrebs
<b>HDR</b>	homology-directed repair
<b>HNPCC</b>	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
<b>IARC</b>	Internationalen Agentur für Krebsforschung
<b>LGR</b>	Große genomische Umlagerungen
<b>LOF</b>	Funktionsverlustvarianten
<b>LOH</b>	loss of heterozygosity
<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>NGS</b>	Next-Generation-Sequenzierung
<b>NHEJ</b>	nicht homologe Endverbindung
<b>PARPi</b>	Inhibitoren der Poly(ADP-ribose)-Polymerase
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT-PCR</b>	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
<b>SNVs</b>	Einzelnukleotidvarianten
<b>SNPs</b>	Einzelnukleotidpolymorphismen
<b>VUS</b>	Variante mit unklarer Signifikanz
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation

## Zusammenfassung

Keimbahnvarianten, die die DNA-Schutzfunktion von *BRCA1* und *BRCA2* (*BRCA1/2*) stören, führen zu einem erhöhten Risiko, einen erblichen Brust- oder Ovarialkrebs zu entwickeln. Die Identifizierung von Trägern dieser Varianten ist von klinischer Bedeutung, da dadurch Betroffene Überwachungs- und Präventionsprogrammen sowie individuell gezielten Therapien zugeführt werden können. Dies führt dazu, dass die Überlebensrate dieser Patientinnen steigt. Jedoch werden nicht alle von ihnen in der gleichen Weise profitieren, weil es noch keine exakte Wissensgrundlage zum funktionellen Einfluss der *BRCA1/2*-Varianten gibt. In diesen Fällen kann nur dann eine eindeutige Entscheidung getroffen werden, wenn die Variante offenkundig schädlich ist (Insertionen, Deletionen und Substitutionen, die für verkürzte Proteine kodieren). Wenn die Variante keinen eindeutigen Effekt auf die Proteinfunktion hat (z.B. Missense-Mutation, synonymer Austausch, Intron-Variante und Varianten der 5'- oder 3'-untranslatierten Region (5'-UTR, 3'-UTR)), kann auch unklar werden, was die beste Verfahrensweise sein könnte. Dieses Problem zu lösen, ist nicht leicht, da die experimentelle Bestimmung des Einflusses dieser Varianten auf die Aktivität von *BRCA1/2* komplexe zellbasierte Testmethoden erfordert, die für eine systematische Anwendung eine technische Herausforderung darstellen.

Panel-Genests haben zu einer großen Anzahl von „Varianten mit unklarer Signifikanz“ (VUS) geführt. Unter den 851.837 bei ClinVar eingereichten Varianten sind 412.476 als VUS klassifiziert (aufgerufen im Februar 2021). Ein erheblicher Teil der dokumentierten Varianten von *BRCA1* (55%) und *BRCA2* (49%) sind ebenfalls VUS, für die die Krebsassoziation aufgrund unzureichender Informationen nicht bewertet werden konnte.

Das American College of Medical Genetics (ACMG), die Association for Molecular Pathology (AMP) und das College of American Pathologists (CAP) haben im Jahr 2015 eine gemeinsame Konsensus-Empfehlung zur Interpretation von Sequenzvarianten veröffentlicht. Mittlerweile haben die meisten der kommerziellen genetischen Labore diese Richtlinie zumindest teilweise implementiert, obwohl sie bei der Anwendung ihrer einzelnen Kriterien zum Teil Limitationen aufweist.

Das einzige sehr starke Kriterium in der ACMG/AMP-Richtlinie für die Pathogenität einer Variante ist das Kriterium PVS1, das als LOF- (engl. loss-of-function) oder Null-Allel (Nonsense-, Frameshift-Variante, kanonische Spleißstellenvarianten  $\pm 1$  oder  $\pm 2$ , Start-Codon-Variante, Einzel- oder Multi-Exon-Deletion) definiert ist.

Bei funktionellen Analysen wurde gezeigt, dass in der Anwesenheit einer LOF-Variante durch alternatives mRNA-Spleißen alternative Transkripte entstehen können, die ihre (partielle) Funktionalität behalten. Die Überschätzung der Auswirkungen auf die jeweilige Variante könnte zu einer falschen Klassifizierung der Varianten führen. Als Beispiel sei die „hypomorphe“ *BRCA2*-Variante c.9976A>T (p.Lys3326Ter) genannt, auch bekannt als K3326X, die in der Literatur zunächst als pathogen eingestuft wurde. Die Anwesenheit der Variante in Kontrollpopulationen ohne Zunahme des Auftretens von Brust- oder Eierstockkrebs führte jedoch zu einer Neuinterpretation als benigner Polymorphismus. Neuere Studien zeigen die Assoziation der *BRCA2*-Mutation K3326X mit dem Risiko der Entwicklung von Melanomen sowie Urothel-, Pankreas-, Brust- und Eierstockkrebs.

## Abstract

Germline variants that disrupt the DNA-protective role of *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA1/2*) result in an increased risk of developing hereditary breast and ovarian cancers. Identification of the carriers of these variants is clinically relevant because it allows channeling these individuals to surveillance and prevention programs and targeted therapies. As a result, the survival rates of these patients increase; however, not all of them will benefit equally because exact knowledge of the functional impact of *BRCA1/2* variants is lacking. In these cases, a straightforward decision can only be made when the variant is overtly deleterious (insertions, deletions, and substitutions coding for truncated proteins). When the variant has an uncertain effect on the protein function (e.g., missense, synonymous, intronic, and 5'-untranslated region (5'-UTR) or 3'-UTR variants), the best course of action becomes unclear. Solving this problem is not easy because experimentally measuring the impact of these variants on the activity of *BRCA1/2* requires complex cell-based assays that are technically challenging for a systematic application.

Panel gene tests have resulted in the detection of a large number of “variants with unclear significance” (VUS). Among the 851,837 variants submitted to ClinVar, 412,476 are classified as VUS (accessed in February 2021). A major part of the documented variants of *BRCA1* (55%) and *BRCA2* (49%) are also VUS for which the association with cancer cannot be clearly determined due to insufficient information.

In 2015, the American College of Medical Genetics (ACMG), the Association for Molecular Pathology (AMP), and the College of American Pathologists (CAP) published a joint consensus recommendation regarding the interpretation of sequence variants. By now, most of the commercial genetic laboratories have, at least partially, implemented this guideline, despite its showing some limitations in the application of individual criteria.

The only very strong criterion in the ACMG/AMP guideline for the pathogenicity of a variant is the PVS1 criterion, which is defined as loss-of-function (LOF) or null allele (nonsense, frameshift variant, canonical splice site variants  $\pm 1$  or  $\pm 2$ , start codon variant, single- or multi-exon deletion).

Functional analyses showed that, in the presence of an LOF variant, alternative transcripts can be created by alternative mRNA splicing that retain (part of) their functionality. Overestimation of the possible effects on the respective variant can lead to a false classification of the variants. The hypomorphic *BRCA2* variant c.9976A>T

(p.Lys3326Ter), also known as K3326X, may serve as an example. In the literature, it was first interpreted as pathogenic; however, the presence of this variant in control populations without a concomitant increase in the incidence of breast and ovarian cancers led to its reinterpretation as benign polymorphism. More recent studies show the association of the *BRCA2* mutation K3326X with the risk of developing melanomas as well as urothelial, pancreatic, breast, and ovarian cancers.

# 1 Einleitung

## 1.1 Ausgangslage und Motivation

Die Identifizierung eines erblichen Krebsrisikos eröffnet einzelnen Menschen und ihren Familien die Möglichkeit, das Auftreten von Krebs zu vermeiden oder früh zu entdecken. Außerdem hat die Einbindung von genetischen Testresultaten in Patientenversorgungsprogrammen das Potenzial, die Behandlungsentscheidungen zu unterstützen und den Behandlungserfolg zu verbessern.

Trotz der schon länger währenden Verfügbarkeit von Tests auf erblichen Krebs, einschließlich der *BRCA1/2*-Gene, für die inzwischen seit über zwei Jahrzehnten klinische Tests bereitstehen, ist bisher nur ein kleiner Anteil der Risikopopulation getestet worden. Aktuelle Daten legen nahe, dass innerhalb der Gruppe der Krebspatientinnen weniger als 20% der Patientinnen mit Brust- und Ovarialkrebs, die den Kriterien für die Testung auf eine erbliche Krebsdisposition genügen, wirklich getestet werden, oft aufgrund fehlender Identifikation von Hochrisikopatientinnen und fehlender Empfehlungen der Anbieter.

Der Gentest für die *BRCA1*- oder *BRCA2*-Gene (*BRCA1/2*-Gene), die mit dem erblichen Brust- und Ovarialkarzinom-Syndrom assoziiert sind, wird in der klinischen Praxis weitverbreitet eingesetzt. Patientinnen mit Brust- oder Ovarialkrebs, die krankheitsassoziierte *BRCA1/2*-Keimbahnmutationen tragen, erhalten eine prophylaktische Behandlung, wie z.B. risikovermindernde Medikamente, eine risikoherabsetzende bilaterale Mastektomie und eine risikoreduzierende Salpingo-Ovariectomie (RRSO), um ein Rezidiv des Krebses zu verhindern. Außerdem können auch zielgerichtete Therapien wie Inhibitoren der Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARPi) für bestimmte Patientinnen mit *BRCA1/2*-Genmutationen eingesetzt werden.

Die Interpretation einer Variante zur Verwendung bei der klinischen Entscheidungsfindung erfordert eine umfassende Kenntnis des Phänotyps der Patientin, der Art der Vererbung des Krankheitsgens, des Mutationsmechanismus (z.B. Haploinsuffizienz, dominant negativ), der Proteinstruktur und -funktion und der Stärke der Gen-Krankheits-Beziehung.

Das American College of Medical Genetics (ACMG), die Association for Molecular Pathology (AMP) und das College of American Pathologists (CAP) haben im Jahr 2015

eine gemeinsame Konsensus-Empfehlung zur Interpretation von Sequenzvarianten veröffentlicht. Mittlerweile haben die meisten der kommerziellen genetischen Labore diese Richtlinie zumindest teilweise implementiert, obwohl sie bei der Anwendung ihrer einzelnen Kriterien zum Teil Limitationen aufweist und erkrankungsspezifische Optimierungen braucht.

Die Folgen einer Fehlinterpretation können nicht nur für den Probanden, sondern auch für seine Angehörigen schädlich sein, da deren klinisches Management geändert wird.

In dieser Arbeit werden die Limitationen der ACMG-Richtlinie und Ihrer einzelnen Kriterien diskutiert.

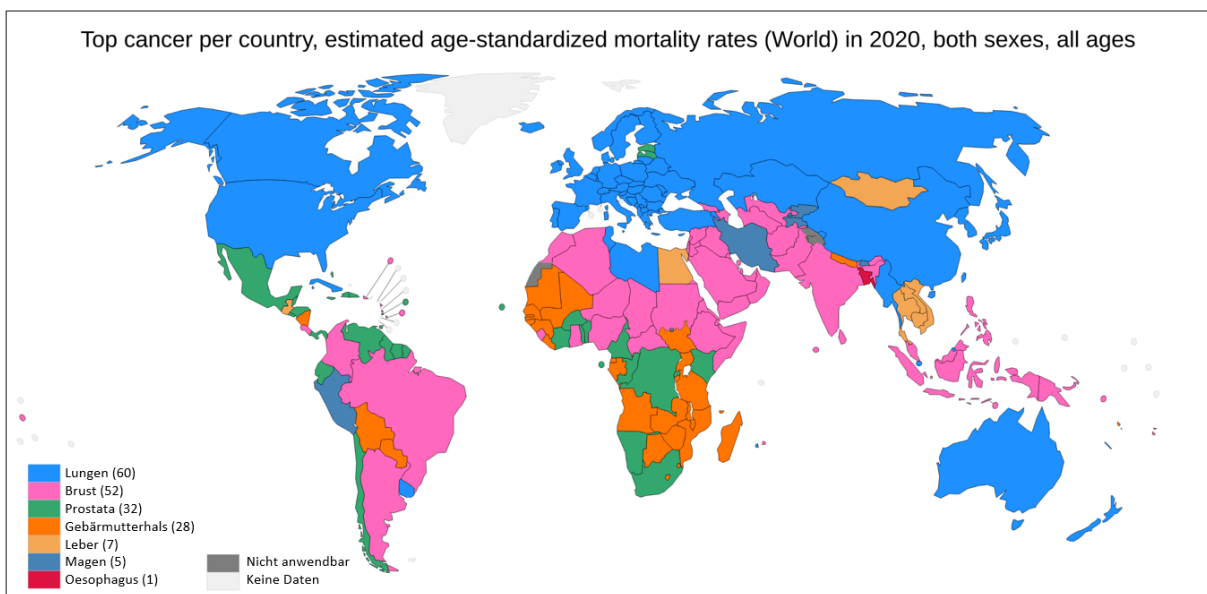
## 2 Literatur

### 2.1 Brust- und Eierstockkrebs

#### 2.1.1 Epidemiologie von Brustkrebs

Bei Brustkrebs handelt es sich um die unkontrollierte Zellteilung und maligne Entartung von Zellen in den Drüsenepithelien der Brust. Die Art des Brustkrebses lässt sich von der Lokalisation der Zellen, die sich krebsartig verändern, ableiten.

Schätzungen zufolge gab es 2018 weltweit 19,3 Millionen neue Krebsfälle und 9,9 Millionen Krebstote. Nach Angaben der GLOBOCAN (Internationale Gesellschaft für Krebsforschung) waren im Jahr 2020 die häufigsten krebsbedingten Todesursachen bei den Männern Lungenkrebs, Prostatakrebs, Leberkrebs und Magenkarzinom, in dieser Reihenfolge. Bei den Frauen waren es Brustkrebs, Gebärmutterhalskrebs und Lungenkrebs. Darüber hinaus ist Brustkrebs in 52 Ländern der Welt die häufigste Todesursache durch Krebs (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Höchste Sterblichkeitsraten abhängig von der Krebsart [1].

Laut einem gemeinsamen Bericht der World Health Organization (WHO) und der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC) entwickeln jedes Jahr weltweit 1.000.000 Frauen Brustkrebs und 370.000 Frauen sterben an dieser Krankheit. Brustkrebs ist die häufigste bösartige Erkrankung der weiblichen Bevölkerung, mit einem lebenslangen Risiko von 10% in der Allgemeinbevölkerung [2].

Allein in Europa werden jedes Jahr 340.000 neue Brustkrebsfälle gemeldet. In den USA werden jährlich 184.000 neue Brustkrebskrankungen festgestellt und Brustkrebs wird mit einer Rate von 18% unter allen Krebstoten nach Lungenkrebs als zweithäufigste Todesursache gemeldet. Die Inzidenz von Brustkrebs nimmt in der Welt zwar weiter zu – jährlich um durchschnittlich 0,5% – doch trotz dieses Anstiegs der Inzidenz konnte seit Anfang der 1990er-Jahre ein leichter Rückgang der Mortalität festgestellt werden [3-6].

### **2.1.2 Etiologie und Risikofaktoren beim Mammakarzinom**

Es gibt eine Vielzahl von Risikofaktoren, die zur Entstehung von Brustkrebs beitragen. Neben dem Geschlecht ist das Alter bei weitem der wichtigste Risikofaktor. Die Brustkrebsinzidenz nimmt mit zunehmendem Alter dramatisch zu. Die nachgewiesenen Risikofaktoren von Brustkrebs stehen in Zusammenhang mit der Fortpflanzung und den weiblichen Geschlechtshormonen: So besteht bei Frauen mit einer frühen ersten Regelblutung, einer späten Menopause und ohne Kinder oder bei Frauen mit einer Mutterschaft nach dem 30. Altersjahr ein höheres Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Diese Tatsache ist wahrscheinlich durch die Anzahl der Menstruationszyklen [7] und den höheren Östrogenspiegel bedingt [8].

Die Einnahme der Antibabypille sowie Hormonbehandlungen in der Menopause (hauptsächlich Behandlungen mit Östrogen-Progesteron-Kombinationen) steigern das Brustkrebsrisiko ebenfalls [7].

Stark übergewichtige Frauen sind gefährdeter, jedoch erst nach der Menopause, was auf die Umwandlung der Androgene in Östrogene im Fettgewebe zurückzuführen ist. Der Zusammenhang zwischen Übergewicht und Brustkrebsrisiko ist jedoch komplex, denn vor der Menopause schützt starkes Übergewicht vor Brustkrebs, wahrscheinlich weil es den Eisprung unterdrückt [7].

Großgewachsene Frauen sind vor und vermutlich auch nach der Menopause einem erhöhten Brustkrebsrisiko ausgesetzt. Außerdem besteht bei Frauen, die mit einem hohen Geburtsgewicht zur Welt kamen, ein höheres Risiko, vor der Menopause an Brustkrebs zu erkranken [7].

Alkoholkonsum, kalorienreiche Nahrung sowie mangelnde Bewegung stellen ebenfalls Risikofaktoren für eine Brustkrebskrankung dar [7].

Der Kontakt mit Röntgen- und Gammastrahlen und die Einnahme von Diethylstilbestrol (das zwischen 1940 und 1970 während der Schwangerschaft zur Vorbeugung von Fehlgeburten verschrieben wurde) fördern die Entstehung von Brustkrebs. Rauchen könnte das Brustkrebsrisiko ebenfalls steigern [9].

Ein erhöhtes Risiko besteht bei einer hohen Brustdichte, atypischen Läsionen bei früheren Biopsien sowie Brustkrebs in der Familie. Etwa 5–10% aller Brustkrebsfälle zeigen einen hereditären Hintergrund [10,11]. Frauen, die mutierte Brustkrebsgene tragen (*BRCA1* und *BRCA2*), haben ein Lebenszeitrisko von 55–85%, einen Brustkrebs zu entwickeln, und ein Risiko von 15–65% für einen Ovarialkrebs [2,12,13]

Obwohl viele Frauen einen oder mehrere der genannten Risikofaktoren haben, entwickeln sie dennoch keinen Brustkrebs, und einige Frauen können an Brustkrebs erkranken, selbst wenn sie keinen Risikofaktor aufweisen. Einige Risikofaktoren können nicht geändert oder vermieden werden, andere können durch eine Änderung des Lebensstils beeinflusst werden [14-16].

### **2.1.3 Klassifikation von Brustkrebs**

Brustkrebs wird grundsätzlich nach seinen histopathologischen Merkmalen und seiner molekularen Basis in zwei getrennte Kategorien eingeteilt.

#### **2.1.3.1 Histopathologische Klassifikation von Brustkrebs**

Brustkrebs wird histopathologisch in zwei Hauptgruppen unterteilt: *in situ*-Karzinome und invasive Karzinome. Bei einem *in situ*-Karzinom (wörtlich: Krebs am Ursprungsort) sind die Epithelzellen von der Basalmembran umgeben; ein Frühstadium eines epithelialen Tumors ohne invasives Tumorwachstum. Beim invasiven Karzinom (infiltrativ) überqueren neoplastische Zellen die Basalmembran und gehen in das Stroma über [17,18]. Die WHO klassifiziert Brustkrebs histopathologisch wie in Tabelle 1 gezeigt.

**Tabelle 1:** Histopathologische Klassifikation von Brustkrebs [17,18].

<b><i>in situ</i> -Karzinome</b>	<b>Invasives lobuläres Karzinom</b>	<b>Seltene Formen</b>
<i>in situ</i> duktales Karzinom	Invasives duktales Karzinom	Lipidreiches Karzinom
<i>in situ</i> lobuläres Karzinom	Invasives lobuläres Karzinom	Onkozytom
	Tubuläres Karzinom	Kleinzelliges Karzinom
	Invasives cribriformes Karzinom	Neuroendokrines Karzinom
	Medulläres Karzinom	
	Muzinöses Karzinom	
	Invasives papilläres Karzinom	
	Invasives mikropapilläres Karzinom	
	Apokrines Karzinom	
	Sekretorisches (juveniles) Karzinom	
	Adenoides zystisches Karzinom	
	Metaplastisches Karzinom	
	Inflammatorisches Karzinom	

### 2.1.3.2 Molekulare Klassifikation von Brustkrebs

Brustkrebs wurde 2006 nach seinen molekularen Eigenschaften in fünf Hauptgruppen unterteilt. 2010 wurde eine neue Gruppe namens „Claudin-low“ hinzugefügt. Diese Klassifizierung wurde nach Genexpressionsmustern durchgeführt [17,19,20].

**Gruppe 1: Basal-ähnliche:** In dieser Gruppe haben die Krebszellen eine ähnliche Genexpression wie basale Epithelzellen in normalem Brustgewebe. Im Gen *tumor protein 53 (TP53)* treten Mutationen auf. Die Krebszellen sind Östrogenrezeptor-negativ. Basal-ähnlicher Brustkrebs wurde bei Personen festgestellt, die eine *BRCA1*-Mutation tragen. In dieser Gruppe von Brustkrebs sind Kurzzeitrezidive und Fernmetastasen zu sehen [17,19,20].

**Gruppe 2: „Luminal A“:** In dieser Gruppe weisen die Krebszellen eine ähnliche Genexpression auf wie die luminalen Epithelzellen. Beim *TP53*-Gen ist keine Mutation vorhanden und die Zellen sind Östrogenrezeptor-positiv. Die Patientinnen in dieser Gruppe haben eine längere Lebensdauer und eine bessere Prognose. Personen mit einer *BRCA2*-Mutation entwickeln einen Luminal-Typ-A-Krebs [17,19,20].

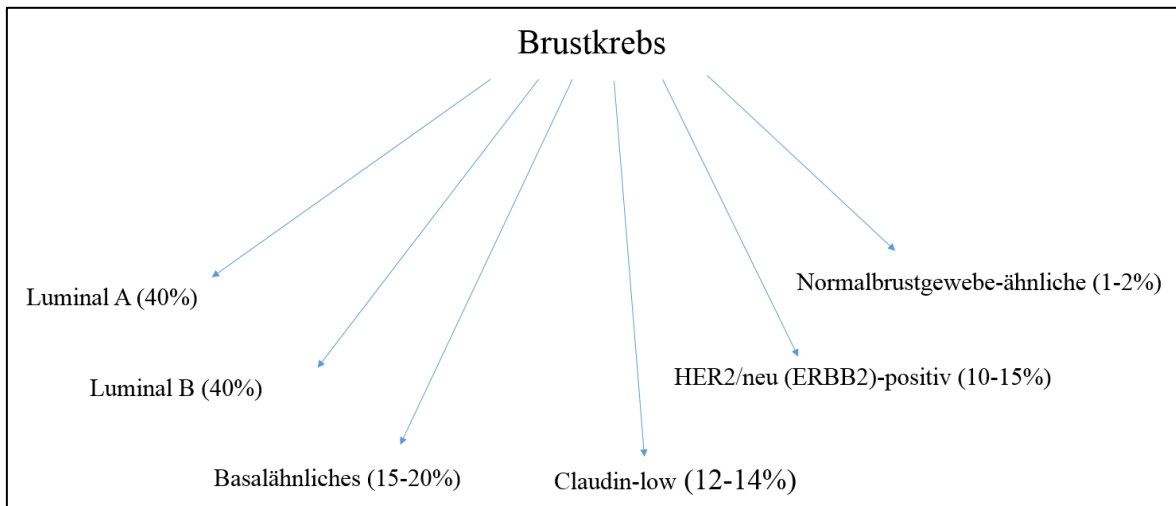
**Gruppe 3: „Luminal B“:** Ähnlich wie in der Luminal-A-Gruppe haben die Betroffenen eine mittlere Prognose [17,19,20].

**Gruppe 4: „HER2/neu (ERBB2)-positiv“:** Die Gruppe ist durch die Überexpression des *HER2/neu*-Gens in Krebszellen gekennzeichnet. Die Prognose der Patientinnen in dieser Gruppe ist schlecht, ihre Lebenserwartung ist kürzer als in den anderen Gruppen und es werden mehr Metastasen beobachtet [17,19,20].

**Gruppe 5: „Normalbrustgewebe-ähnliche“:** Die Genexpression in den Krebszellen ist ähnlich wie in den gesunden Brustgewebezellen [17].

**Gruppe 6: „Claudin-low“:** Diese Gruppe ist durch eine verminderte Expression von Claudin-3-, Claudin-4- und Claudin-7-Proteinen und E-Cadherin-Proteinen gekennzeichnet, die an der Calcium-abhängigen Zelladhäsion beteiligt sind [17,19,20].

Der Prozentsatz der Gruppen in der molekularen Klassifikation ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Molekulare Klassifikation von Brustkrebs und die Häufigkeit der Typen [19].

## **2.1.4 Epidemiologie von Eierstockkrebs**

Eierstockkrebs spielt bei weiblichen Genitalkrebserkrankungen eine wichtige Rolle, da dieser Krebs am häufigsten zum Tod führt. In Bezug auf die Todesursache belegt er nach Brust-, Darm- und Lungenkrebs den vierten Platz unter den allgemeinen Krebsarten.

Eierstockkrebs macht 20–25% aller Genitalkrebserkrankungen aus. Es wurde berechnet, dass 1–2% aller Frauen irgendwann in ihrem Leben Eierstockkrebs haben werden [21].

Weltweit wird jedes Jahr bei ungefähr 240.000 Frauen Eierstockkrebs diagnostiziert, und es wird erwartet, dass mehr als die Hälfte von ihnen an diesem Krebs sterben. Die Mortalität bei Eierstockkrebs ist etwa dreimal so hoch wie bei Brustkrebs, und Eierstockkrebs ist die tödlichste gynäkologische Malignität in den Industrieländern. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei Patientinnen im Stadium III oder IV bei etwa 25% [22].

Eierstockkrebs kann in jedem Alter auftreten. Das Durchschnittsalter beträgt 55 Jahre. Während die Krankheit vor dem 30. Lebensjahr selten ist, besteht mit steigendem Alter ein zunehmendes Risiko. Die Krankheit tritt am häufigsten im Alter zwischen 75 und 79 Jahren auf. In Anbetracht der Tatsache, dass 90% der Eierstockkrebserkrankungen im Allgemeinen epithelialer Art sind, kann gefolgert werden, dass epithelialer Eierstockkrebs die Lebensspanne in hohem Maße beeinflussen kann [22,23].

## **2.1.5 Etiologie und Risikofaktoren bei Eierstockkrebs**

Wie beim Brustkrebs stehen die Risikofaktoren mit früheren Schwangerschaften und den weiblichen Geschlechtshormonen in Zusammenhang. Eine reduzierte Anzahl an Eisprüngen (späte erste Periode, frühe Wechseljahre, Schwangerschaften) scheint eine schützende Wirkung zu haben. Eierstockkrebs kommt dementsprechend bei kinderlosen Frauen häufiger vor. Neue Studien zeigen, dass eher eine Unfruchtbarkeit das Eierstockkrebsrisiko erhöht als die Behandlung der Unfruchtbarkeit. Endometriose wird mit bestimmten Arten von Eierstockkrebs in Verbindung gebracht. Auch eine Hormonbehandlung in der Menopause steigert das Erkrankungsrisiko, während die Einnahme der Antibabypille das Risiko reduziert [7].

Als weitere Risikofaktoren gelten Rauchen [7] sowie Reizstoffe wie Talk (Talkum) oder Asbest [7]. Eine überdurchschnittliche Körpergröße im Erwachsenenalter und ein hoher Body Mass Index fördern die Entstehung von Eierstockkrebs [25]. Frauen, in deren

Familie Eierstock- und Brustkrebs aufgetreten ist, Trägerinnen von Mutationen in den *BRCA1/2*-Genen sowie Frauen, die an einem erblichen nichtpolypösen Darmkrebs (HNPCC) leiden, sind ebenfalls stärker gefährdet [7,25].

### **2.1.6 Klassifikation von Eierstockkrebs**

Nach der Tumormorphologie und Klassifizierung der WHO (2014) werden primäre Eierstocktumoren in drei Kategorien unterteilt: epitheliale (60%), Keimzell- (30%) und Gonadenstromatumoren (8%). Die überwiegende Mehrheit der bösartigen Eierstocktumoren (80–85%) werden jedoch als epitheliale Tumoren klassifiziert. Maligne Keimzell- und Gonadenstromatumoren machen etwa 10% aller malignen Ovarialtumoren aus [26].

Epithelialer Eierstockkrebs ist in zwei verschiedene histologische Subtypen unterteilt. Typ-I-Tumoren umfassen niedriggradige seröse, muzinöse, endometrioiden und klarzellige Karzinome und neigen oft dazu, langsamer zu wachsen. Im Gegensatz dazu sind Typ-II-Tumoren hochgradig und die Krankheit schreitet schnell voran. Das hochgradige seröse Ovarialkarzinom ist der häufigste Typ-II-Tumor und macht fast 75% aller epithelialen Eierstockkrebsfälle aus. Es ist eines der invasivsten Karzinome. Es gibt keine Methode zur Früherkennung und die Mehrheit der Frauen wird erst dann diagnostiziert, wenn der Krebs in andere Gewebe wie die Bauchhöhle metastasiert hat [22].

Ovarialtumoren weisen überraschend unterschiedliche pathologische Merkmale auf. Dieser Unterschied kann auf die drei Zelltypen zurückgeführt werden, aus denen der normale Eierstock besteht: das multipotente oberflächenbedeckende Epithel, die totipotenten Keimzellen und die multipotenten Stromazellen des Sexualstrangs. Oberflächenepitheltumoren machen einen großen Teil aller primären Ovarialtumoren und fast 90% aller bösartigen Typen aus. Keimzell- und Gonadenstromatumoren treten seltener auf und machen 15–20% aller Ovarialtumoren und weniger als 10% der bösartigen Tumoren aus. Die Entstehung, Häufigkeit und Altersverteilung verschiedener Ovarialneoplasmen sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Entstehung, Häufigkeit und Altersverteilung verschiedener Ovarialneoplasmen [27]

Ursprung	Oberflächenepithelzellen	Keimzellen	Gonadenstroma	Metastasierung Eierstöcke
<b>Ovariale Häufigkeit</b>	65–70%	15–20%	5–10%	5%
<b>Anteil der malignen Ovarialtumoren</b>	90%	3–5%	2–3%	5%
<b>Betroffene Altersgruppe</b>	Über 20 Jahre	Über 25 Jahre	Jedes Alter	Variabel
<b>Typen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seröser Tumor</li> <li>• Muzinöser Tumor</li> <li>• Endometrioider Tumor</li> <li>• Klarzelliger Tumor</li> <li>• Brenner-Tumor</li> <li>• Zystadenofibrom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teratom</li> <li>• Dysgerminom</li> <li>• Endodermalsinustumoren</li> <li>• Chorionepitheliom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibrom, Granulom</li> <li>• Androblastom (Sertoli-Zellen oder Leydig-Zwischenzellen)</li> </ul>	

### 2.1.7 Hereditärer Brust- und Eierstockkrebs

Das *BRCA1*- und *BRCA2*-assoziierte hereditäre Brust- und Eierstockkrebs (HBOC)-Syndrom ist eine autosomal dominante Erkrankung, die durch ein erhöhtes Risiko für weiblichen und männlichen Brustkrebs, Eierstockkrebs (einschließlich Eileiter- und primären Peritonealkrebs) und in geringerem Maße für andere Krebsarten wie Prostatakrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Melanome gekennzeichnet ist. Die genauen Krebsrisiken unterscheiden sich geringfügig, je nachdem, ob der HBOC durch eine pathogene *BRCA1*- oder *BRCA2*-Variante verursacht wird.

Diese Genmutationen sind die häufigste Ursache für erblichen Brust-/Eierstockkrebs und treten bei allen Rassen und ethnischen Gruppen auf. Die allgemeine Prävalenz von *BRCA1/2*-Mutationen variiert zwischen 1/200 und 1/800. Bei Ashkenazi-Juden ist dieser Anteil höher (1/40). *BRCA1/2*-Mutationen machen 5–10% der erblichen Brustkrebserkrankungen aus [28,29]. Träger einer Mutation in einem der beiden Gene haben ein lebenslanges Risiko von 60–85%, an Brustkrebs zu erkranken, während das allgemeine Risiko, an Krebs zu erkranken, zwischen 10% und 40% liegt [13]. Aber nicht

jeder Träger einer pathogenen *BRCA1/2*-Mutation erkrankt an Brust- und/oder Eierstockkrebs [28,29].

Epidemiologische Studien zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit, an Brustkrebs zu erkranken, 1,7–4,0-mal höher ist als bei der Allgemeinbevölkerung, falls bei einem Verwandten ersten Grades eine Brustkrebserkrankung aufgetreten ist. Daher ist die Familiengeschichte ein wichtiger Risikofaktor für die Krankheit [30].

**Tabelle 3:** Erkrankungsrisiko bei Trägerschaft einer pathogenen Keimbahnmutation in den *BRCA1/2*-Genen [28-30]

Krebsart	Allgemeines Risiko in der Bevölkerung	Risiko für Erkrankung	
		<i>BRCA1</i> -Mutation	<i>BRCA2</i> -Mutation
<b>Brustkrebs</b>	12%	46–87%	38–84%
<b>Brustkrebs beim Mann</b>	0,1%	1,2%	Bis 8,9%
<b>Eierstockkrebs</b>	1–2%	39–63%	16,5–27%
<b>Prostatakrebs</b>	6% im Alter von 69 Jahren	8,6% im Alter von 65 Jahren	15% im Alter von 65 Jahren
<b>Pankreaskrebs</b>	0,5%	1–3%	2–7%
<b>Melanoma</b>	1,6%		Erhöhtes Risiko

### 2.1.8 Ethik und genetische Beratung bei Brustkrebs

Aufgrund der rasanten Entwicklungen in der Genetik und den zugehörigen Technologien ist die Diagnose genetisch bedingter Krankheiten heute weit verbreitet. Parallel zu dieser Entwicklung haben sich die Anwendungsbereiche der genetischen Diagnostiktests rasch erweitert. Genetische Diagnostiktests, die anfangs nur zur Erkennung von Erbkrankheiten dienten, gehen über diesen Grundzweck längst hinaus und sind inzwischen auch in Bereichen wie der Bestimmung erblicher Veranlagungen, der Entscheidung über die Behandlung und der Bestimmung von Risiken lebenslanger Krankheiten üblich. Infolgedessen wurde dazu ein Leitfaden für medizinische und chirurgische Behandlungsanwendungen sowie für Anwendungen in der Präventivmedizin entwickelt. Das wachsende Spektrum genetischer Diagnoseanwendungen hat auch die Art und das Ausmaß ethischer und rechtlicher Probleme in der Medizin beeinflusst. Präsymptomatische und prädiktive Tests, die sich vor allem in den letzten Jahren verbreitet haben, haben

sowohl aufgrund der Anwendungsmethoden als auch aufgrund der Auswirkungen der darin enthaltenen Informationen neue ethische Themen geschaffen. Wie bei allen anderen Anwendungen ist es unvermeidlich, dass sich ein medizinischer und ein ethischer Ansatz gemeinsam entwickeln [31].

Menschen mit einer Krebsdiagnose sind nicht nur physiologisch oder individuell betroffen. Diese Personen und ihre Familienmitglieder stellen die Ursache der Krankheit infrage und sind psychosozial betroffen. In Fällen, in denen mehr als eine Person in der Familie mit Krebs diagnostiziert wurde, erwägen die Familienmitglieder den gesamten Krankheitsverlauf und seine Folgen, einschließlich des Todes. Viele dieser Personen suchen Unterstützung bei ihren Ärzten/innen, um ihre Bedenken auszuräumen und Informationen über präventive Maßnahmen zu erhalten. Dies wirft einige Schwierigkeiten bei der genetischen Beratung in Bezug auf ein familiäres Krebsyndrom auf. Ein korrektes Verständnis des Krebsrisikos verringert die psychische Belastung von Personen mit geringem Risiko wie auch die wirtschaftlichen Kosten aufgrund unnötiger Untersuchungen. Bei Personen mit hohem Risiko ist es dagegen sehr wichtig, sie bezüglich der Krebsprävention zu beraten, um die Inzidenz und Mortalität des Krebses zu verringern. Obwohl die Mechanismen hinter Krebs nicht vollständig geklärt sind, ist bekannt, dass es sich um eine multifaktorielle Krankheit handelt, bei der genetische Faktoren und Umweltfaktoren zusammenwirken [32-34].

## **2.2 Die *BRCA1*- und *BRCA2*-Gene**

Die *BRCA1*- und *BRCA2*-Gene wurden vor über zwei Jahrzehnten entdeckt. In diesen Jahren gab es zahlreiche Forschergruppen, die mithilfe der Kopplungsanalyse chromosomale Positionen vererbter Gene nachweisen konnten. Unter Verwendung polymorpher genetischer Marker von bekannten Loci im Genom von betroffenen Familienmitgliedern analysierten sie, welche Marker mit der untersuchten Krankheit vererbt wurden. Im Jahr 1990 wurde an der Universität von California, Berkeley bei 146 Personen mit früh auftretendem Brustkrebs aus 23 Familien eine Kopplungsstudie durchgeführt, und auf Chromosom 17 wurde eine kleine Region identifiziert, die für hereditären Brustkrebs verantwortlich ist. 1994 wurde das *BRCA1*-Gen auf Chromosom 17q21 unter Verwendung von positionellen Klonierungsmethoden und Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analysen kloniert. Anhand der Methode zum Nachweis

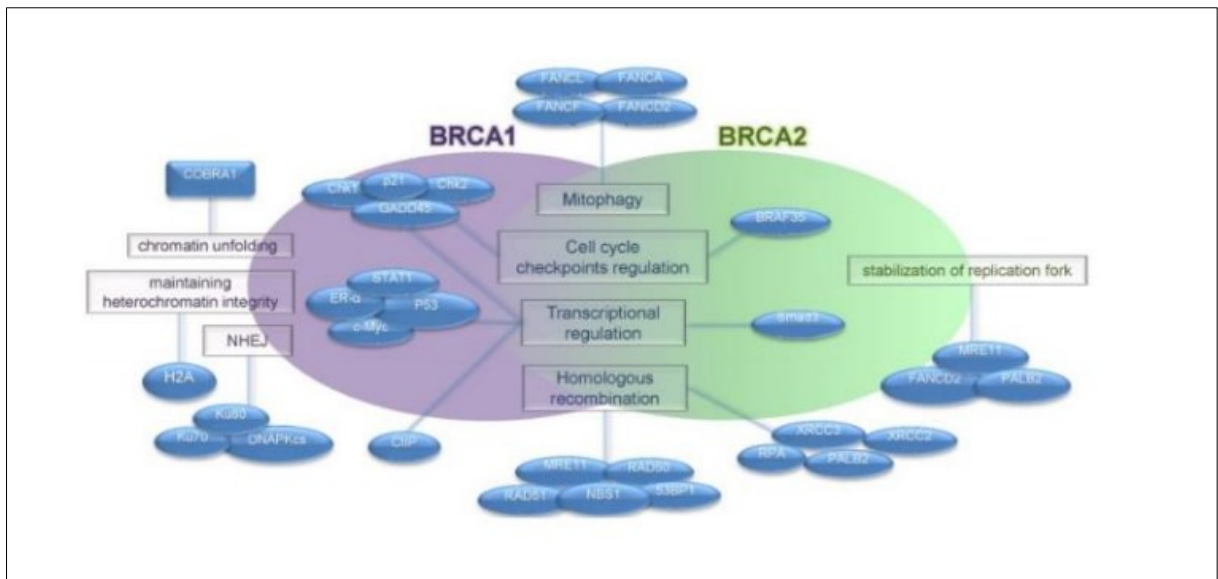
des Verlusts der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) wurde festgestellt, dass das *BRCA1*-Gen ein Tumorsuppressorgen ist [12,35]. Danach wurden bei einer Kopplungsanalyse 146 Personen mit Brustkrebs und 16 Personen mit Eierstockkrebs untersucht, und ein weiterer mit Brustkrebs assoziierter Locus wurde auf Chromosom 13 identifiziert. 1995 wurde *BRCA2*, das sich in der q12-Region von Chromosom 13 befindet, kloniert [36].

Es gibt zwei Hauptmechanismen der Tumorbildung: ein Funktionsverlust in Tumorsuppressorgen und die Aktivierung von Proto-Onkogenen. *BRCA1* und *BRCA2* sind beide Tumorsuppressorgene. Nach der Zwei-Treffer-Hypothese von Alfred G. Knudson verursachen Mutationen in beiden Allelen eines Genes Krebs. Bei Keimbahnerkrankungen ist der erste Treffer die vererbte Mutation, der zweite Treffer wird durch eine somatische Mutation des Wildtyp-Allels verursacht. In normalen Zellen ist die DNA ständig endogenen (reaktive Sauerstoffspezies und freie normale Stoffwechselradikale, intrinsische Replikationsfehler) oder exogenen (ultraviolette Strahlen, chemische Exposition) schädigenden Einflüssen ausgesetzt. DNA-Schäden werden durch verschiedene Reparaturmechanismen behoben [37].

Die *BRCA*-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA. Die homologe Rekombinationsreparatur ist ein evolutionär hochkonservierter Prozess, der die korrekte Reparatur der Doppelhelix gewährleistet. Die homologe Rekombination tritt während der späten S- und G2-Phasen des Zellzyklus auf, dann kann die intakte Schwesterchromatide als Matrize für die Reparatur verwendet werden.

Die nicht homologe Endverbindung (non-homologous end-joining, *NHEJ*) tritt in der G0- oder G1-Phase des Zellzyklus auf und repariert gebrochene DNA-Enden einfach durch Zusammenführen. Da keine Vorlage für die DNA-Reparatur verwendet wird, ist der Reparaturmechanismus selbst fehleranfällig. Infolgedessen können kleine Deletionen oder Insertionen auftreten [38,39].

Da die DNA-Reparatur bei Zellen mit pathogenen *BRCA1/2*-Mutation durch das fehleranfällige *NHEJ* durchgeführt wird, steigt das Risiko für genomische Instabilität und für eine bösartige Transformation der genomischen Information [39,39].



**Abbildung 3:** Funktionelle Eigenschaften der *BRCA*-Proteine [40]

Beim Prozess der homologen Rekombinationsreparatur stehen nicht nur *BRCA1/2*, sondern auch andere DNA-Reparaturproteine wie *ATM*, *CHEK2*, *BARD1*, *BRIP1*, *MRE11*, *RAD50*, *NSB1* (*NBN*), *RAD51C*, *RAD51D* und *PALB2* in koordinierter Wechselwirkung [39-41].

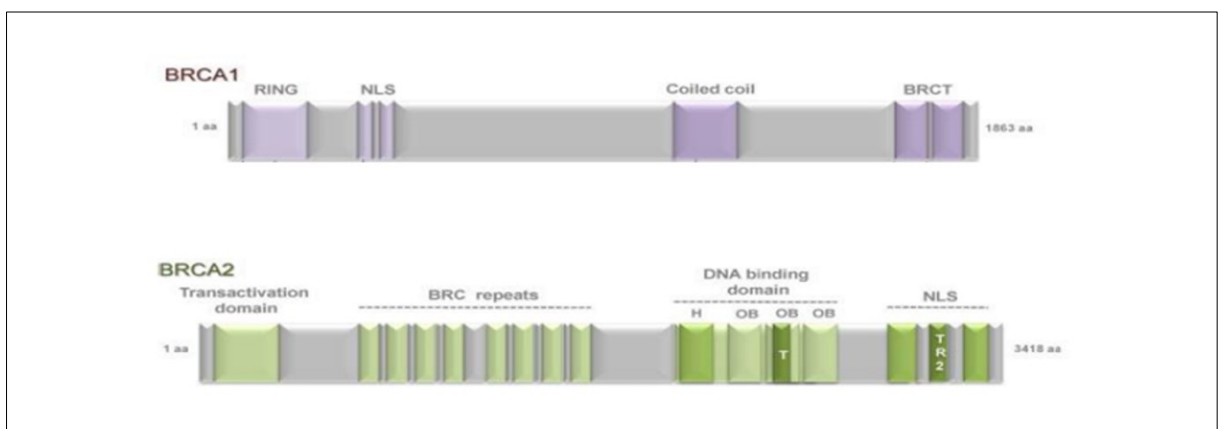
Bei diesem Prozess bindet *BRCA1* an *BARD1* und akkumuliert an der beschädigten DNA-Region. *BARD1* erkennt Poly(ADP-Ribose)-Einheiten in den beschädigten DNA-Regionen und bringt den *BRCA1/BARD1*-Heterodimerkomplex zu den DNA-Schadensstellen. Andere Reparaturkomplexe, wie der MRN-Komplex (*MRE11-RAD50-NBS1*), binden an die 5'-Enden auf beiden Seiten des DNA-Doppelstrangbruchs. *RAD51* und andere Proteine (*BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2*, *PALB2*) finden die Schwesterchromatide und ermöglichen, dass sie als DNA-Matrize verwendet werden kann. *PALB2* erleichtert die Lokalisierung von *BRCA2* im Zellkern bei einem DNA-Schaden. *BRCA1* hat noch zusätzliche Rollen: Es hilft neben der homologen Rekombinationsreparatur auch bei der Chromatinumlagerung und der Zellzyklusregulation. Bei Doppelstrangbrüchen regelt *BRCA1* die *PALB2*-abhängige Funktion der *BRCA2-RAD51*-Reparaturmaschinerie und bindet  $\gamma$ -H2AX (Histon H2AX) an die DNA-Reparaturstellen [39-41].

Bei hereditärem Brust-/Eierstockkrebs sind die Mutationen in *BRCA1* und *BRCA2* nicht für alle auftretenden Fälle verantwortlich. Die Fanconi-Anämie-Gene (*FANCD2*, *FANCA* und *FANCC*), 24 MMR-Gene (*MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* und *EPCAM*), DNA-Checkpoint-Gene (*ATM*, *ATR* und *CHEK1/2*) und Tumorsuppressorgene (*TP53*, *SKT11*

und *PTEN*) wurden mit einem erhöhten Risiko für Brust- und Eierstockkrebs und mit weiteren krebsassoziierten Syndromen in Verbindung gebracht [28].

### 2.2.1 Struktur des *BRCA1*-Gens und des *BRCA1*-Proteins

*BRCA1* (17q21, Chromosom 17: Basenpaare 43.044.294–43.125.482) umfasst 24 Exons und kodiert für ein Protein mit 1863 Aminosäuren. Das erste Exon kodiert nicht für Aminosäuren und das größte Exon ist das Exon 11. Etwa 4,8% des *BRCA1*-Gens bestehen aus Wiederholungssequenzen niedriger Dichte und ungefähr 41,5% bestehen aus Alu-Sequenzen [42]. Das *BRCA1*-Protein besteht aus mehreren Domänen, die für seine vielfältigen Funktionen besonders wichtig sind. An seinem N-Terminus besitzt *BRCA1* ein Zinkfinger-RING-Motiv (RING für Really Interesting New Gene), das eine Rolle bei der Wechselwirkung von *BRCA1* und *BARD1* (*BRCA1*-assoziiertes RING-Domänenprotein 1) spielt und für die Bildung des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes essenziell ist. Am C-terminalen Ende ermöglichen zwei phosphopeptidbindende BRCT-Domänen die Interaktion mit Proteinen wie CtIP (CtBP1 (C-terminales Bindungsprotein 1) interagierendes Protein), ABRAXAS (*BRCA1*-A Complex Subunit) und BRIP1/FACJ (Protein-C-terminale Helikase 1). Der zentrale Teil von *BRCA1* wird von den Exons 11–13 kodiert, und Mutationen in diesen Regionen treten häufig bei Brustkrebspatientinnen auf. Diese Teile bestehen aus zwei Kernlokalisierungssignalen (NLS) und einer „Doppelwendel“ (Coiled-Coil), die die Wechselwirkung zwischen *BRCA2* und seinem Partner *PALB2* reguliert [43].



**Abbildung 4:** Funktionelle Regionen (Domänen) der *BRCA1*- und *BRCA2*-Proteine [45]

### 2.2.2 Struktur des *BRCA2*-Gens und des *BRCA2*-Proteins

*BRCA2* (13q12.3, Chromosom 13: Basenpaare 32.315.479–32.399.671) enthält 27 Exons und kodiert für ein Protein, das aus 3418 Aminosäuren besteht. Wie in *BRCA1* ist das größte Exon das Exon 11 und das erste Exon kodiert nicht für Aminosäuren des Proteins [43]. Das *BRCA2*-Protein enthält eine Transkriptionsaktivierungsdomäne (TAD) an seinem N-Terminus. Der mittlere Teil wird vom Exon 11 kodiert und enthält acht konservierte Motive, sogenannte BRC-Wiederholungen, die an RAD51 binden. Die DNA-Bindungsdomäne am C-Terminus des *BRCA2*-Proteins besteht aus einer konservierten helikalen Domäne, drei Oligonukleotidbindungsstellen und einem Fragment, das die Bindung von *BRCA2* an doppelsträngige (dsDNA) und einzelsträngige DNA (ssDNA) erleichtert [43].

### 2.2.3 *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationen

Bei den *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen wurden mehr als 3000 pathogene und wahrscheinlich pathogene Mutationen beschrieben [36]. Ungefähr 10–15% der Brustkrebsfälle werden durch vererbte genetische Mutationen verursacht. Die Mutationen mit der höchsten Penetranz sind die in den *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen, die wichtige Funktionen bei der Genomstabilisierung haben. Frauen mit pathogenen Mutationen in *BRCA1* haben ein lebenslanges Brustkrebsrisiko von 72% und solche mit pathogenen *BRCA2*-Mutationen ein Brustkrebsrisiko von 69% [44]. Das Risiko, an Eierstockkrebs zu erkranken, beträgt bei Trägern einer *BRCA1*-Mutation 40–50% und bei Trägern einer *BRCA2*-Mutation 20–30%. Mutationen in *BRCA1/2* erhöhen auch das Risiko für Prostatakrebs, Melanome und Bauchspeicheldrüsenkrebs. Die Identifizierung von Trägern pathogener *BRCA*-Mutationen vor der Krebsdiagnose ist wichtig, um diese Fälle durch vorbeugende Maßnahmen, Chemoprävention und vorbeugende Operationen vor der Krebsentstehung zu schützen [44].

In den kodierenden und nichtkodierenden Regionen der *BRCA1/2*-Gene wurden verschiedene Mutationen wie Deletionen, Insertionen und Änderungen einzelner Nukleotide (Punktmutationen) berichtet. Die häufigsten Arten von Mutationen sind Frameshift-Mutationen durch kleine Deletionen und Insertionen, Nonsense-Mutationen, die zur Bildung von trunkierten Proteinen führen, und Mutationen, die das Spleißen beeinflussen und zur Bildung eines nichtfunktionellen *BRCA*-Proteins führen [45].

Abhängig von der Häufigkeit der Alu-Sequenzen wird im *BRCA1*-Gen im Vergleich zu *BRCA2* ein höheres Deletion/Insertion-Verhältnis (42% bzw. 20%) beobachtet [42]. Große genomische Umlagerungen (engl. *large genomic rearrangements*, LGR) infolge homologer Rekombination zwischen dem *BRCA1*-Gen und Pseudogenen machen etwa ein Drittel aller Mutationen im *BRCA1*-Gen aus [46]. Die meisten Mutationen im *BRCA2*-Gen treten in den Exons 10 und 11 auf [45].

Die Keimbahnmutationen in *BRCA1* und *BRCA2* sind im Vergleich zu Mutationen in anderen Genen enger mit einem erhöhten Risiko für HBOC verbunden. Ein erhöhtes Risiko für HBOC besteht auch bei Familienmitgliedern ohne Mutationen. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) haben verschiedene genetische Faktoren identifiziert, die das Risiko für HBOC erhöhen. Neben *BRCA1* und *BRCA2* gibt es Gene mit hoher Penetranz (*CDH1*, *NBS1*, *NF1*, *PTEN*, *TP53* und *STK11*), solche mit mittlerer Penetranz (*ATM*, *ATR*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2*, *CDK1* und *RAD50*) und mit niedriger Penetranz (*FGFR2*, *LSP1*, *MAP3K1*, *TGFBI*, *TOX3*, *VEGF*, *PGR*, *KRAS* und *PARP*) und Gene, die die DNA-Variante regulieren (Modifier, *modifier genes*) [28].

#### **2.2.4 Inzidenz von *BRCA1*- und *BRCA2*-Mutationen in verschiedenen Populationen**

Die Häufigkeiten pathogener Mutationen in den *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen zeigen in verschiedenen Populationen und ethnischen Gruppen Unterschiede. Die häufigsten Mutationen im *BRCA1*-Gen sind 5382insC und 185delAG, und die häufigste Mutation im *BRCA2*-Gen ist 6174delT. Dies sind die bei Ashkenazi-Juden häufig vorkommende Mutationen [47,48]. Bei der in Frankreich geborenen kanadischen Population ist die *BRCA1*-C4446T-Mutation die häufigste und die *BRCA2*-8765delAG-Mutation ist die zweithäufigste Mutation [49]. Die *BRCA1*-Variante c.212+3A>G ist die häufigste Mutation bei belgischen Familien [50]. In einer Studie in Finnland wurden die Mutationen *BRCA2*-T8555G und -999del5 als häufigste (*founder mutations*) Mutationen in dieser Gesellschaft beschrieben [51]. Eine in Polen durchgeführte Studie zeigt die Mutationen 5382insC, C61G und 4153delA von *BRCA1* als die häufigsten [52,53].

### 2.3 ACMG Richtlinie

Das ACMG, die Association for Molecular Pathology (AMP) und das College of American Pathologists (CAP) haben im Jahr 2015 eine gemeinsame Konsensus-Empfehlung zur Interpretation von Sequenzvarianten veröffentlicht. Mittlerweile haben die meisten der kommerziellen genetischen Labore diese Richtlinie zumindest teilweise implementiert [54]. Diese Richtlinie wurde von einer Arbeitsgruppe aus Mitgliedern der drei Gesellschaften ausgearbeitet, basierend auf Expertenmeinungen, Arbeitsgruppenvereinbarungen, einer Literaturübersicht mit Empfehlungen anderer professioneller Gesellschaften und Beiträgen der klinischen Laborgemeinschaft in den USA und Kanada. Nach der Bewertung in mehreren klinischen Laboratorien wurden die endgültigen ACMG-Standards und -Richtlinien in einem Workshop auf der AMP-Sitzung im November 2013 vereinbart. Neben 28 detaillierten Kriterien für die Klassifizierung von Sequenzvarianten wird in dieser Richtlinie auch die Verwendung einer bestimmten Standardterminologie empfohlen [54].

Bei der ACMG-Richtlinie wird zunächst empfohlen, die Begriffe Mutation und Polymorphismus, die zu Verwirrung führen können, durch „Variante“ zu ersetzen [54]. Zweitens wird ein fünfstufiges System zur Klassifizierung von Varianten mit den folgenden Begriffen empfohlen: (i) benigne (B), (ii) wahrscheinlich benigne (LB), (iii) unklare Signifikanz (VUS), (iv) wahrscheinlich pathogen (LP) oder (v) pathogen (P). Für die Klassifizierung einer Variante müssen gemäß den ACMG-Richtlinien umfangreiche Informationen zusammengetragen und bewertet werden.

Als pathogen/wahrscheinlich pathogen werden die potenziell klinisch umsetzbaren Varianten zusammengefasst, da sie bei Empfehlungen zum Screening, zur Behandlung und zur Reduzierung des Reproduktionsrisikos berücksichtigt werden könnten, während VUS-, LB- und B-Varianten als nicht klinisch relevant behandelt werden. Die ACMG-Richtlinien schlagen vor, dass die Begriffe „LP“ und „LB“ eine Sicherheit von mehr als 90% bedeuten sollten, dass eine Variante pathogen bzw. benigne ist [54].

In erster Linie empfiehlt die ACMG-Richtlinie einen Prozess zur Klassifizierung von Varianten in diese fünf Kategorien, indem ein Satz von 16 detaillierten Kriterien für die Bewertung der Pathogenität angewendet wird, die u.a. auf Populationsdaten, Segregationsanalysen, funktionellen Analysen, *de novo*-Vorkommen, *in silico*-

Algorithmen und anderen Daten basieren. Ein weiterer Satz von 12 ähnlichen Kriterien wird für die Klassifizierung als benigne (B) und wahrscheinlich benigne (LB) angewendet. Zur Bewertung der Pathorelevanz von Varianten werden die Allelfrequenz, *in silico*-Pathogenitätsvorhersagen, funktionelle Analysen, Segregationsanalysen, begleitende Varianten, Informationen aus Datenbanken zu Genotyp-Phänotyp-Beziehungen und sonstige Hinweise, wie z.B. der Phänotyp der Patientinnen, berücksichtigt. Die Bewertungskriterien werden unterschiedlich stark gewichtet. Kriterien zur Bewertung von pathogenen Varianten werden als PVS1 (sehr stark), PS1–PS4 (stark), PM1–PM6 (moderat) und PP1–PP5 (unterstützend) gewichtet. Kriterien zur Bewertung von gutartigen Varianten werden als BA1 (sehr stark), BS1–BS4 (stark) und BP1–BP7 (unterstützend) gewichtet. Zur Einordnung einer Variante in die Klasse pathogener, wahrscheinlich pathogener, (wahrscheinlich) gutartiger Varianten oder Varianten mit unklarer Signifikanz werden die anwendbaren Bewertungskriterien in einer der fünf Kategorien (P, LP, VUS, LB, B) kombiniert.

Beispielsweise wird im Bewertungsschema berücksichtigt, ob und mit welcher Allelfrequenz eine Variante in Populationsdatenbanken (z.B. Exome Aggregation Consortium (ExAC), gnomAD) beschrieben ist oder wie die *in silico*-Pathogenitätsvorhersagen mittels Programmen wie REVEL, M-CAP oder ClinPred ausfallen.

Beobachtungen aus funktionellen Analysen (z.B. Tiermodelle oder *in vitro*-Studien) und gegebenenfalls eine familiäre Cosegregation der Variante mit der Erkrankung werden ebenfalls bei der Bewertung berücksichtigt. Zudem wird in die Klassifizierung auch mit einbezogen, ob Varianten bereits in Genotyp-Phänotyp-Datenbanken wie z.B. HGMD, ClinVar, UMD-LSDB und LOVD beschrieben sind oder wie die *in silico*-Pathogenitätsvorhersagen mittels Programmen (wie z.B. PolyPhen-2, SIFT oder MutationTaster [55-57]) ausfallen.

Schließlich sind auch andere verfügbare Hinweise auf eine putative Beteiligung der Variante an der vorliegenden Erkrankung (z.B. der vorliegende Phänotyp ist spezifisch für Mutationen in diesem Gen) Teil des Bewertungsschemas.

### 3 Methoden

In dieser Arbeit wurden verschiedene Datenbanken auf einzelne ACMG-Kriterien (siehe Tabelle 4) hin durchsucht. Die wissenschaftlichen Artikel, die für die einzelnen Kriterien eine Ausnahme darstellen, wurden diskutiert. Insbesondere wurde das PVS1-Kriterium diskutiert, da es das einzige sehr starke Kriterium in der ACMG/AMP-Richtlinie für die Pathogenität einer Variante ist.

**Tabelle 4:** Kriterien für die Klassifizierung von Varianten nach den ACMG/AMP-Richtlinien [54]

<b>Evidenz für Pathogenität</b>		
<b>Sehr stark</b>	PVS1	Null-Allel in einem Gen mit bekanntem LOF für die untersuchte Erkrankung (Nonsense-Mutation, Leserahmenverschiebung, kanonische $\pm 1$ oder $\pm 2$ Spleißstellen, Startcodon-Verlust und Einzel- oder Multiexon-Deletion)
<b>Stark</b>	PS1	Bekannter AS-Austausch (unabhängig vom Nukleotidaustausch)
	PS2	<i>de novo</i> -Variante in einem genetischen Trio
	PS3	<i>in vivo</i> - oder <i>in vitro</i> -Funktionsanalysen
	PS4	Prävalent, in Erkrankten häufiger als in Kontrollen
<b>Moderat</b>	PM1	Varianten in einem funktionellen Hot-Spot (Domäne)
	PM2	Abwesend in Kontrollen oder extrem selten in Kontrollen
	PM3	In <i>trans</i> mit einer pathogenen Variante bei rezessiven Erkrankungen
	PM4	In-frame-Deletionen oder -Insertionen oder Stopp-Verlust in nicht repetitiven Sequenzen
	PM5	Neue Missense-Variante an einer bekannten Position
	PM6	<i>de novo</i> , ohne genetischen Nachweis der Abstammung
<b>Unterstützend</b>	PP1	Co-Segregation in mehreren betroffenen Familienmitgliedern bei Variante in bekanntem Krankheitsgen
	PP2	Missense-Variante in einem Gen mit Anreicherung solcher Varianten in Erkrankten gegenüber Kontrollen
	PP3	<i>in silico</i> -Vorhersage (pathogen) auf mehreren Ebenen
	PP4	Typischer genetischer Phänotyp und Vererbungsmodus
	PP5	Berichtete Pathogenität aus glaubhafter Quelle bei eingeschränkter Einsicht in die Originaldaten

Fortsetzung der Tabelle 4:

<b>Evidenz für benigne Variante</b>		
<b>Alleinstehend</b>	BA1	Allel-Frequenz > 5% in Kontrollen
<b>Stark</b>	BS1	Allel-Frequenz größer als für eine bestimmte Erkrankung erwartet
	BS2	Bei einem gesunden Erwachsenen beobachtete Variante mit voller Penetranz
	BS3	<i>in vivo</i> - oder <i>in vitro</i> -Funktionsanalysen
	BS4	Fehlende Co-Segregation
<b>Unterstützend</b>	BP1	Missense-Variante in einem Gen, bei dem trunkierende Varianten zu erwarten sind
	BP2	In <i>trans</i> mit einer Variante mit voller Penetranz (dominant) oder in <i>cis</i> für alle Vererbungsmodi
	BP3	In-frame-Insertionen bzw. -Deletionen in einer repetitiven Region ohne bekannte Funktion
	BP4	<i>in silico</i> -Vorhersage (benigne) auf mehreren Ebenen
	BP5	Variante in einer Patientin, bei der eine andere Ätiologie gesichert ist
	BP6	Berichtet als benigne, aus glaubhafter Quelle bei eingeschränkter Einsicht in die Originaldaten
	BP7	Synonyme Variante ohne Einfluss auf Spleißstellen und ohne hohe Konservierung

(Quelle: Meder Benjamin, Genetische Kardiomyopathien: Leitfaden für den klinischen Alltag, Walter de Gruyter GmbH, Berlin, 2017, Seite 84)

Kombination von Kriterien für die Klassifizierung einer Variante wurde in der Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5:** Kombination von Kriterien für die Klassifizierung einer Variante nach den ACMG/AMP-Richtlinien [54]

<b>Pathogen</b>	PVS1 und $\geq 1$ PS1-4
	PVS1 und $\geq 2$ PM1-6
	PVS1 und $\geq 1$ PM1-6 und 1 PP1-PP5
	PVS1 und $\geq 2$ PP1-5
	$\geq 2$ PS1-4
	PS1-4 und $\geq 3$ PM1-6
	PS1-4 und $\geq 2$ PM1-6 und $\geq 2$ PP1-5
	PS1-4 und $\geq 1$ PM1-6 und $\geq 4$ PP1-5
<b>Wahrscheinlich pathogen</b>	PVS1 und PM1-6
	PS1-4 und $\geq 1$ PM1-6
	PS1-4 und $\geq 2$ PP1-5
	$\geq 3$ PM1-6
	2 PM1-6 und $\geq 2$ PP1-5
	1 PM1-6 und $\geq 4$ PP1-5
<b>Benigne</b>	BA1
	$\geq 2$ BS1-4
<b>Wahrscheinlich benigne</b>	BS1-4 und BP1-7
	$\geq 2$ BS1-4
<b>Unklare Signifikanz</b>	Kriterien oben nicht erfüllt oder widersprüchliche Einstufung in pathogen und benigne

(Quelle: Meder Benjamin, Genetische Kardiomyopathien: Leitfaden für den klinischen Alltag, Walter de Gruyter GmbH, Berlin, 2017, Seite 85)

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Funktionelle Charakterisierung der Loss-of-Function-Varianten der *BRCA1*- und *BRCA2*-Gene

Genests bei Personen mit erhöhtem Risiko, an Brust- oder Eierstockkrebs zu erkranken, sind inzwischen klinische Routine. Mutmaßliche Loss-of-Function (LOF)-Varianten von *BRCA1* und *BRCA2*, wie Nonsense-Varianten, Frameshift-Indels und Varianten in den kanonischen Spleißstellen, gelten als mit hohem Krebsrisiko verbunden, und die Träger dieser Varianten und ihre Familienangehörigen werden entsprechend behandelt.

Das einzige sehr starke Kriterium in der ACMG/AMP-Richtlinie für die Pathogenität einer Variante ist das Kriterium PVS1, das als Null-Allel (Nonsense-Variante, Frameshift-Variante, kanonische Spleißstellenvariante  $\pm 1$  oder  $\pm 2$ , Start-Codon-Variante, Einzel- oder Multi-Exon-Deletion) definiert ist.

Kürzlich wurde festgestellt, dass einige natürlich vorkommende alternative Transkripte von *BRCA1* und *BRCA2* zu Proteinisoformen mit Tumorsuppressoraktivität führen [58-64].

Mesman et al. [58] zeigten mittels Experimenten zur homologen Reparatur (die auch als „homology-directed repair“ (HDR) bezeichnet wird) und zum RNA-Spleißen, dass die Gen-Produkte von *BRCA2* bei verschiedenen LOF-Varianten ihre (partielle) Funktionalität behalten. Es wurden mehrere alternative Transkripte identifiziert, die für (teilweise) funktionelle Isoformen des *BRCA2*-Proteins kodieren. Diese sind z.B. Genprodukte mit kompletter Deletion von einem oder mehreren Exons (z.B.  $\Delta[E4-E7]$ ,  $\Delta[E6-E7]$ ,  $\Delta E[6q39\_E8]$ ,  $\Delta[E10]$ ,  $\Delta[E12]$ ,  $\Delta E[12-14]$ ), Varianten bei kanonischen Spleißstellen (z.B. c.631+2T>G, c.517-2A>G, c.6842-2A>G, c.6937+1G>A) oder Nonsense-Varianten (z.B. c.491T>A, c.581G>A und c.6901G>T). Diese Befunde deuten darauf hin, dass alternatives mRNA-Spleißen kann die Pathogenität mutmaßlicher LOF-Varianten beim *BRCA2*-Gen abschwächen.

De la Hoya et al. [59] haben über einen Assay zum RNA-Spleißen einen Rettungsmechanismus für die *BRCA1*-Variante c.594-2A>C beschrieben, basierend auf der Produktion der In-frame-Isoform  $\Delta 9-10$ , die die funktionellen Domänen von *BRCA1* behält. Die Autoren schließen daraus, dass der Organismus/die Zelle eine wesentliche

Verringerung der Menge an normalem *BRCA1*-Transkript (d.h. Transkript in voller Länge) tolerieren kann und immer noch eine genügende Anzahl an funktionellem Protein für die normale biologische Funktion produziert. Die Autoren schlagen vor, dass ein Allel, das eine 20–30%ige Expression von funktionellem *BRCA1*-Genprodukt ermöglicht, nicht als pathogen angesehen werden sollte. Dieser Rettungsmechanismus für *BRCA1* liefert ähnliche Ergebnisse wie von Tubeuf et al. [60] beschrieben, die eine Toleranz gegenüber einer wesentlichen Abnahme des normalen *BRCA2*-Transkripts gezeigt haben.

Tubeuf et al. [60] zeigten die Aktivierung der kryptischen Spleiß-Akzeptorstelle in Anwesenheit der kanonischen *BRCA2*-Spleißstellen-Variante c.68-1G>A. Das Transkript kodiert für eine Proteinisoform mit Tumorsuppressoraktivität.

Li et al. [61] zeigten in einem funktionellen Assay, dass die *BRCA2*-Variante c.6853A>G (p.I2285V) zur Deletion von Exon 12 führt, dass die daraus resultierende Isoform ohne Exon 12 funktionell redundant ist und dass daher Missense-Varianten in diesem Exon wahrscheinlich neutral sind.

Seo et al. [62] untersuchten zwei nicht verwandte Familien, in denen vier Kinder multiple angeborene Anomalien und eine schwere chromosomale Fragilität aufwiesen. Jedes der vier Kinder war homozygot für eine Nonsense-Mutation (c.1115G>A: p.W372X und c.1292T>G: p.L431X) im *BRCA1*-Exon 11. Das translatierte *BRCA1*-Protein hatte nur 40% der normalen Länge, aber mit intakten N- und C-terminalen Sequenzen und mit partieller Funktionalität. Die Homozygotie für die Nonsense-Mutationen war dank des Vorhandenseins einer natürlich vorkommenden alternativen Spleiß-Donorstelle im *BRCA1*-Exon 11, die 5' von den Mutationen liegt, lebensfähig.

Wang et al. [63] zeigten, dass die relevanten Spleißvarianten in Exon 11 entweder zu trunkeierten Proteine führen oder zum partiellen Skipping von Exon 11. Daraus resultierende Genprodukte behalten eine Restaktivität bei und verursachen Resistenz gegen Cisplatin und Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-Inhibitoren.

Die ENIGMA Splicing Working Group (ENIGMA = Evidence-Based Network for the Interpretation of Germline Mutation Alleles) hat kürzlich eine umfassende Analyse durchgeführt, um zahlreiche „natürlich vorkommende“ mRNA-Spleiß-Isoformen beim *BRCA1*-Gen zu charakterisieren. Von Colombo et al. [64] und Romero et al. [65] wurden

bei einem *in vitro*-Spleiß-Assay 63 *BRCA1*-mRNA-Varianten unter Verwendung von RT-PCR und Kapillarelektrophorese beschrieben. Die Resultate zeigten, dass die Spleiß-Isoformen-Muster der *BRCA1*-mRNA sehr variabel sind. Das ENIGMA-Konsortium berichtete 24 Spleißereignisse bei der *BRCA2*-mRNA im Vergleich zu den 63 Ereignissen bei *BRCA1* [64, 66].

Studien zeigen, dass sowohl *BRCA1*- als auch *BRCA2*-Transkripte alternativ gespleißt werden können, und klinische und funktionelle Daten weisen darauf hin, dass alternativ gespleißte Transkripte ihre Funktion behalten können [64, 66].

#### **4.2 Kriterium PS1 - bekannte Aminosäureveränderung**

Beim PS1-Kriterium wird die gleiche Aminosäureveränderung durch eine andere Nukleotidänderung verursacht. Faktoren wie hypomorphe Varianten, fehlende funktionelle Analysen wie beim alternativen mRNA-Spleißen, falsche Klassifizierung der Varianten usw. können die Anwendung dieses Kriteriums erschweren.

Zum Beispiel wurde die *BRCA2*-Variante c.9976A>T (p.Lys3326Ter), auch bekannt als K3326X, in der Literatur zunächst als pathogen interpretiert, jedoch führte die Anwesenheit der Variante in Kontrollpopulationen ohne Zunahme des Auftretens von Brust- oder Eierstockkrebs zu einer Neuinterpretation als benigner Polymorphismus [67]. Interessanterweise wurden neue Hinweise auf einen signifikanten Zusammenhang mit dem Krebsrisiko beschrieben [67]. Neuere Studien zeigen die Assoziation der *BRCA2*-Mutation K3326X mit dem Risiko der Entwicklung von Melanom-, Urothel-, Pankreas-, Brust- und Eierstockkrebs [68-71]. Diese Variante wurde auch als Modifier (Modifikator) der genetischen Penetranz beschrieben [69].

#### **4.3 Kriterien PS2 und PM6 - *de novo*-Varianten**

Über die Jahre wurde in der Literatur eine große Anzahl von unterschiedlichen Varianten bei den *BRCA1/2*-Genen identifiziert. Weltweit wurden aber nur sehr wenige *de novo*-Fälle, nur neun beim *BRCA1*-Gen und sechs beim *BRCA2*-Gen, beschrieben [72-76]. Interessanterweise wurde die Mehrheit dieser Fälle bei Patientinnen mit Tumoren identifiziert, die vor dem 40. Lebensjahr auftraten [72,75-77].

Um die Möglichkeit eines somatischen Mosaizismus zu untersuchen, wurden andere Gewebe (Haarwurzeln und bukkale Zellen) analysiert und jeweils das Vorhandensein der Mutation bestätigt. Obwohl diese Ergebnisse die Möglichkeit eines postzygotischen Mosaizismus nicht definitiv ausschließen können, ist das Vorhandensein derselben Mutation in allen untersuchten Proben mit einer „*de novo*“-Mutation aufgrund eines Keimbahnmosaizismus vereinbar. Es ist wichtig zu betonen, dass Mosaikereignisse unter Verwendung der herkömmlichen Sanger-Sequenzierung aufgedeckt wurden. Leider kann diese Technik Mosaizismen nur bei Raten über 20% (40% der Zellen) aufdecken. In Anbetracht dessen ist die Hauptbeschränkung dieser Studie das Fehlen eines Ansatzes der Hochdurchsatz-Sequenzierung zum Nachweis von Mosaikmutationen mit niedriger Rate. Nach unserem Kenntnisstand liegen keine Informationen zur Häufigkeit des Mosaizismus für *BRCA1*- und *BRCA2*-Punktmutationen vor. Die Prävalenz dieser „*de novo*“-Mutationen wird jedoch wahrscheinlich unterschätzt, aufgrund des typischen Auswahlkriteriums, das hauptsächlich die Familiengeschichte des Probanden berücksichtigt.

Die Identifizierung von Fällen von *de novo*-Mutationen hätte direkte Auswirkungen auf die Präventions- und Behandlungsstrategien und könnte das klinische Management von Patientinnen beeinflussen. Darüber hinaus stellt das Vorhandensein dieser Keimbahnmutationen einen Schlüsselaspekt der genetischen Beratung dar, da der Status des Trägers zur Übertragung spontaner Veränderungen auf die Nachkommen beitragen kann [72-77].

#### **4.4 Kriterien PS3 und BS3 - Funktionelle Analysen**

Die meisten der in ClinVar berichteten krankheitsverursachenden Mutationen sind Punktmutationen, und derzeit beruht die Erlangung eines tieferen Verständnisses der Einzelnukleotidvarianten (SNVs) oder Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) auf der Erzeugung transgener Mäuse, was häufig sehr mühsam und zeitaufwendig ist. Zu diesem Zweck wurden mehrere *in vitro*-Funktionstests entwickelt, um krankheitsverursachende Missense-Varianten zu untersuchen, die jedoch den Krankheitsverlauf häufig nicht zusammenfassend wiedergeben [78].

Ein erheblicher Teil der dokumentierten Varianten von *BRCA1* und *BRCA2* sind Varianten mit unklarer Signifikanz (VUS), für die die Krebsassoziation aufgrund unzureichender Informationen nicht bewertet wurde oder nicht bestimmt werden konnte. In ClinVar

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), einer klinisch orientierten Datenbank, sind derzeit ca. 55% (5855/10.526) der *BRCA1*- und ca. 49% (6025/12.346) der *BRCA2*-Varianten VUS.

Die Explosion der klinischen Paneltests für Keimbahnmutationen hat zu einer Zunahme der Entdeckung von VUS geführt [79].

Laut ACMG/AMP können „gut etablierte funktionelle Assays“ verwendet werden, um ein PS3- oder BS3-Kriterium (Strong Evidence) zu erhalten. Ein „funktioneller Assay“ ist im Allgemeinen definiert als jedes *in vitro*- und *in vivo*-System, mit dem die Auswirkungen einer Variante durch Bewertung ihrer Auswirkungen auf die Proteinstabilität, -konformation und -funktion bestimmt werden können. Daher werden Assays für Spleißänderungen im Sinne dieses Manuskripts nicht als funktionelle Assays angesehen (zur Bewertung von Spleißvarianten siehe Thomassen et al. [80] und Walker et al. [81]).

Mehrere charakteristische Funktionen der *BRCA1*- und *BRCA2*-Proteine wurden bei der Entwicklung von funktionellen Tests genutzt [82-84].

Es existieren z.B. „Zellviabilitätstests“ (engl. viability assays; Tests auf Lebensfähigkeit der Zellen), um die Rolle einer Variante bei der DNA-Reparatur widerzuspiegeln. Dabei wird die zu überprüfende Variante anhand eines Vektors in die Zelle eingefügt und durch ionisierende Strahlen oder DNA-schädigende Substanzen werden in der Zelle Mutationen erzeugt. Schlussendlich wird die Reaktion der Zelle beobachtet.

Zusätzlich zu diesen Zellviabilitätstests existieren spezifische biochemische Assays, die die homologe Rekombination oder die Ubiquitinierung messen. Es existieren außerdem biochemische Assays, bei denen die Bindung an spezifische interagierende Proteine gemessen werden kann [82-84].

Die Bestimmung, welche Assays für die klinische Annotation verwendet werden sollen, hängt eher von ihrer Genauigkeit als von ihren biologischen Eigenschaften ab. Eine vorläufige Analyse hat gezeigt, dass diese Funktionstests eine hohe Empfindlichkeit und Spezifität (> 80%) aufweisen (Tab. 2).

Funktionelle Assays können anhand ihres Versuchsaufbaus (zellfrei oder zellbasiert), ihres Wirts (Mensch oder Modellorganismus) und ihrer Auslesung (read-out) in drei große Kategorien unterteilt werden. Die Interpretation der Ergebnisse erfordert eine sorgfältige

Abwägung der Annahmen, der biologischen Eigenschaften und der Einschränkungen jedes Assays.

Zellfreie Systeme testen entweder eine spezifische biochemische Aktivität *in vitro* (z.B. Phosphopeptidbindungen, Ubiquitinligase-Aktivität, DNA-Bindung, DNA-Rekombination), Protein-Protein-Wechselwirkungen (z.B. Hefe-Zwei-Hybrid-Screening, Ko-Immünpräzipitationen) oder die Wirkung verschiedener Faktoren auf die Proteinstruktur und -stabilität (z.B. Proteaseempfindlichkeit, Kalorimetrie).

Bei der Interpretation der Ergebnisse von zellfreien Assays sollte berücksichtigt werden, dass sie auf bestimmte Funktionen beschränkt sind, manchmal auf bestimmte Regionen des Proteins begrenzt sind und besonders empfindlich auf Temperatur, Pufferbedingungen und Konzentrationen exogener Substrate reagieren können.

Zellbasierte Systeme verwenden als Wirtszellen die Zellen eines Menschen oder eines Modellorganismus (z.B. Hefe, Bakterien oder Maus) als Grundlage für den Assay. Zellbasierte Systeme können weiter unterschieden werden als *in cellulo* (wenn der Assay-Kontext eine einzelne Zelle ist) oder *in vivo* (im Kontext eines gesamten Metazoen-Organismus), obwohl es derzeit keine etablierten *in vivo*-Funktionstests für VUS gibt. Wir empfehlen die periodische Authentifizierung der Zelllinien- und Stammidentität durch kurze Tandem-Wiederholungsanalyse bzw. Phänotypisierung. Zelllinien sollten regelmäßig auf Mycoplasma-Infektionen überprüft werden. Die Interpretation der Ergebnisse von Assays, die in Modellsystemen durchgeführt wurden, sollte den Grad der Abweichung von Proteinen des am Assay beteiligten Wirts, Unterschiede in der Biologie und in den Wachstumsbedingungen berücksichtigen.

Zellbasierte Assays können des Weiteren durch die Auslesung (read-out) definiert werden. Reportersysteme umfassen solche, bei denen die Auslesung für funktionelle Auswirkungen über einen ektopischen Reporter erfolgt (z.B. Transkriptionsaktivierung oder HR-Assays) oder bei denen eine ektopische Überexpression in einem heterologen System zu einem definierten Phänotyp führt (z.B. der Kleine-Kolonien-Phänotyp (small-colony phenotype) in Hefe). Schwachstellen von Reportersystemen, die auf einer ektopischen Expression basieren, können Artefakte einer Überexpression umfassen. Alternativ werden Assays, bei denen das variante Allel/Protein in voller Länge das endogene Gen/Protein ersetzt und definierte biologische Prozesse bewertet werden, als Komplementations-/Störungstests

betrachtet. Einige Assays können Reportersysteme und Komplementation kombinieren [85].

Bisher konzentrierten sich die meisten Assays auf Varianten in den RING- und BRCT-Domänen von *BRCA1* sowie in der DSS1- und DNA-Interaktionsdomäne von *BRCA2* [82, 86,87].

Für *BRCA1* und *BRCA2* wurden zwar mehrere funktionelle Assays beschrieben, aber in nur wenigen Fällen wurden große (> 30) Variantensätze getestet (Tab. 2).

Letztendlich hängt der Wert eines Assays von seiner Leistung ab, die unter Verwendung einer Reihe bekannter nicht pathogener und pathogener Kontrollvarianten als Referenz definiert wird. Angesichts der Komplexität der Wechselwirkung mehrerer biochemischer Funktionen und des Phänotyps von Brust- und Eierstockkrebs ist unklar, ob es jemals einen einzigen umfassenden und hochgenauen Funktionstest geben wird. Vielmehr dürfte die Kombination von Ansätzen unter Verwendung verschiedener Datenquellen, die mit transparenter Methodik und sorgfältiger Interpretation erhalten wurden, die Herausforderungen von VUS in HBOC-Genen lösen.

ACMG/AMP besagt, dass „gut etablierte Assays“ verwendet werden können, um ein PS3- oder BS3-Kriterium (Strong Evidence) anzuwenden. Es gibt jedoch noch keine spezifischen Richtlinien, die schließlich von Expertengremien (engl. expert panels) für jedes Gen festgelegt werden müssen. Zum Beispiel wären übereinstimmende Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen validierten Assays für PS3- oder BS3-Kriterien (stark) erforderlich, während übereinstimmende Ergebnisse in zwei unabhängigen validierten Assays ein PM1-Kriterium (moderat) erzeugen würden.

Daher müssen Beweise aus Funktionsstudien, die in einem Forschungsumfeld durchgeführt wurden, sorgfältig überprüft werden, um die Datenqualität, Zuverlässigkeit und das Maß an Vertrauen in die Ergebnisse zu bestimmen. Trotz dieser Herausforderungen wird der Wert der funktionalen Bewertung von Varianten zur Verbesserung der Krebsbehandlung auf der Grundlage internationaler und multidisziplinärer Zusammenarbeit voraussichtlich hoch sein. [83].

#### 4.5 Kriterien PS4, PM2, BA1, BS1 und BS2 - Kontrollen und Populationsprojekte

Zusätzlich zur Klassifizierung einer Variante als pathogen oder harmlos (benigne) unter Verwendung der ACMG/AMP-Richtlinien besteht der Bedarf an einer quantitativen Risikomessung [88] (z.B. die Penetranz der Variante). Größere genetische Studien, die Phänotypdaten integrieren, um das Variantenrisiko anhand der alters- und geschlechtsspezifischen Inzidenz abzuschätzen, sind erforderlich. Obwohl das Konzept dieser Arbeit in der gegenwärtigen Praxis der Genetik verankert ist, dient es dazu, die Verwendung aktueller großer Datenbanken für die allgemeine Bevölkerung zu dokumentieren, um die Klassifizierung von Varianten besser zu unterstützen. Die Beobachtung einer sehr großen Anzahl von Personen, deren genetische Risiko-Allele sowohl in gut kartierten Gensätzen (ACMG-59) als auch in anderen Ressourcen (OrphaNet) registriert sind, liefert einen nützlichen Maßstab für die Verbesserung der Annotation von Varianten.

Es ist zu erwarten, dass in der Allgemeinbevölkerung viele nicht betroffene Träger gefunden werden, da die Prävalenz von HBOC relativ hoch ist [89,90], die Krankheit bei Erwachsenen auftritt und pathogene *BRCA1/2*-Varianten unvollständig penetrant sind [91-93], insbesondere bei männlichen Trägern.

Die Prävalenz pathogener *BRCA1/2*-Varianten wurde bereits mit historischen Daten geschätzt, die auf eine Häufigkeit von ungefähr 1 von 400 Personen in der Allgemeinbevölkerung hinweisen [93-94].

In bestimmten Populationen wurde eine höhere Prävalenz beobachtet. Beispielsweise beherbergt ungefähr 1 von 42 Personen Ashkenazi-jüdischer (AJ) Abstammung eine von drei gängigen Gründervarianten (engl. founder mutations) [95,96]. Gründervarianten in anderen Populationen wurden ebenfalls beschrieben, einschließlich isländischer, französisch-kanadischer und puertorikanischer Populationen [97]. Jüngste Genom-Screening-Bemühungen, die auf unselektierten Populationen basieren, haben eine höhere als die erwartete Prävalenz von pathogenen *BRCA1/2*-Varianten bei Personen mit überwiegend europäischer Abstammung gezeigt (etwa 1 von 190), wobei nur die Hälfte dieser Personen die aktuellen Richtlinien für Gentests erfüllt [98-100] und nur 18% Vorkenntnisse über ihren *BRCA1/2*-Status durch klinische Gentests haben [101]. Das Verständnis der Prävalenz und des Beitrags von *BRCA1/2*-Varianten zum Krebsrisiko in außereuropäischen Populationen wurde durch rassische und ethnische Unterschiede in der

Genforschung eingeschränkt [102]. Zusätzlich zur verringerten Aufnahme von verschiedenen Populationen in Gentests [103-106] ist in außereuropäischen Populationen die Erkennungsrate von Varianten mit unklarer Signifikanz (VUS) höher [53,107,108].

Im Jahr 2014 veröffentlichte das Exome Aggregation Consortium (ExAC) Exom-Daten von 60.706 Personen [109]. Diese neue Datenbank wurde als neuartiger Referenzsatz für die SNP-Allelfrequenz entwickelt. ExAC enthält Daten aus dem 1000 Genomes Project (1000-Genome-Projekt) sowie konstitutionelle Daten von nicht verwandten Personen, deren Gene im Rahmen verschiedener krankheitsspezifischer und populationsgenetischer Studien sequenziert wurden. Im Jahr 2016 wurde ExAC unter Einbeziehung neuer Daten in die Genome Aggregation Database (gnomAD) umgewandelt. Dies führte zu einem Datensatz mit Informationen aus 123.136 Exom-Sequenzen und 15.496 Gesamtgenom-Sequenzen nicht verwandter Personen [110]. ExAC und gnomAD wurden häufig als Ersatz oder Ergänzung von dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database) verwendet und werden derzeit in mehreren analytischen Pipelines genutzt.

Ein Nachteil der Sequenzierung großer Bevölkerungskohorten ist die zufällige Identifizierung einer seltenen pathogenen Keimbahnvariante, die nicht mit dem Ziel der Studie zusammenhängt [111]. Die Aufnahme dieser Varianten kann zu Fehlinterpretationen führen. Diese Varianten sollten daher mit Anmerkungen versehen werden.

Kobayashi et al. [112] identifizierten 14 pathogene *BRCA1*-Varianten in der ExAC-Datenbank. Dieses Problem kann zu erheblichen Fehlern bei Genomstudien führen, da sowohl die ExAC- als auch die gnomAD-Datenbank in Pipelines verwendet werden, um häufige oder ungewöhnliche SNPs in menschlichen Populationen zu filtern [113]. Beide Datensätze wurden auch als negativer, nicht pathogener Satz verwendet, um Vorhersagealgorithmen zu trainieren [114].

Kobayashi et al. [112] fanden heraus, dass die meisten pathogenen Varianten mit Allelfrequenzen in der Kontinentalpopulation von über 0,01% bereits gut charakterisiert (benigne) sind. Dies bedeutet, dass die meisten VUS (zumindest für dominante Kolorektalkarzinom-Suszeptibilitätsgene) mit Allelfrequenzen von über 0,01% tatsächlich neutral sind.

Die Informationen aus den Populationsdatenbanken ist vorsichtig anzuwenden, da Sie folgende methodische Einschränkungen haben:

- Längere Indels werden nicht durch Sequenzierung via NGS (Next-Generation-Sequenzierung) erkannt.
- Sie verwenden einen veröffentlichten Kontrolldatensatz mit mindestens 1000 Personen.
- GC-reiche Regionen stellen ein Problem dar.
- Populationen wurden möglicherweise nicht auf den Phänotyp untersucht oder ausgeschlossen.

#### **4.6 Kriterien PM1, PP2 und BP1 - Hotspot-Regionen, -Domänen und Variantenspektrum**

Panel-Genests haben zu einer großen Anzahl von VUS geführt. Unter den 851.837 bei ClinVar eingereichten Varianten sind 412.476 als VUS klassifiziert (abgerufen im Februar 2021).

VUS sind in der Regel Missense-Varianten, da der funktionelle Effekt von Missense-Varianten im Vergleich zu Frameshift- oder Nonsense-Varianten schwieriger abzuleiten ist. Daher sind seltene Missense-Varianten eine besondere Herausforderung für die Interpretation, selbst bei hochkonservierten Genen.

Weite Regionen von *BRCA1* und *BRCA2* haben bekanntermaßen eine geringe Wahrscheinlichkeit, eine pathologische Missense-Variante zu beinhalten [115]. Von 120 pathogenen (P) oder wahrscheinlich pathogenen (LP) Missense-Varianten in *BRCA1* befindet sich keine in Exon 11. Von 55 P- oder LP-Missense-Varianten in *BRCA2* befinden sich keine in Exons 10, 11 und den BRC-Wiederholungen (Quelle: ClinVar, abgerufen im Februar 2021).

In der ACMG-Richtlinie werden Hotspot-Regionen als Beweis für Pathogenität berücksichtigt (z.B. PM1 und PP2), aber umgekehrt werden die Regionen ohne wesentliche Funktionen, die Missense-Variante tolerieren, nicht als Nachweis für die Harmlosigkeit einer Variante genommen.

In *BRCA1* werden 88% (2272/2575) der bei ClinVar eingereichten Missense-Varianten als VUS und nur 4,7% (120) als pathogen oder wahrscheinlich pathogen eingestuft (nach

Ausschluss von Varianten mit „CIP“ (conflicting interpretations of pathogenicity) or „no assertion criteria provided“ (ohne vorliegende Aussagekriterien).

**Tabelle 6:** *BRCA1*-Varianten in Clinvar, Uniprot und Pubmed (Stand: Februar 2021)

	Auswirkung					Gesamt
	Pathogen	Wahrscheinlich pathogen	VUS	Wahrscheinlich benigne	Benigne	
<b>Synonym</b>	9	1	440	866	37	1353
<b>Missense</b>	167	65	4519	110	304	5165
<b>Nonsense</b>	698	10	75	0	1	784
<b>Start-Verlust</b>	9	0	17	0	2	28
<b>Stopp-Verlust</b>	0	0	6	0	0	6
<b>Frameshift</b>	1946	43	37	1	0	2027
<b>In-frame-Indel</b>	14	2	77	3	4	100
<b>Splice Junction Loss</b>	180	33	82	3	3	301
<b>Nicht kodierend</b>	42	15	602	84	19	762
<b>Gesamt</b>	3065	169	5855	1067	370	10.526

Insgesamt sind 10.526 Variante vorhanden. Davon sind 3234 pathogen, 5855 VUS und 1437 benigne.

Kritische Domänen in *BRCA1* enthalten die Mehrzahl der P- und LP-Missense-Varianten, einschließlich der RING- (36/120, 30,0%) und BRCT-Domänen (68/120, 56,7%) (siehe Tabelle 7). Die RING-Domäne beinhaltet 1,64% (3/183) und die BRCT-Domänen zeigen 12,6% (23/183) der B- und LB-Varianten. Im Gegensatz dazu macht Exon 11 ~60% der kodierenden Sequenz aus, weist jedoch keine bestätigten P- und LP-Missense-Varianten und 63,4% (116/183) der B- und LB-Varianten auf.

Alle sechs mutmaßlichen P- und LP-Missense-Varianten in *BRCA1*, die außerhalb kritischer Domänen liegen, sind pathogen, weil sie das Spleißen beeinflussen, nicht aufgrund einer Aminosäureveränderung. *BRCA1* c.4484G>C (p.R1495T), c.4484G>A (p.R1495K) und c.4484G>T (p.R1495M) beeinflussen das Spleißen an der Exon-13-Grenze, während c.4675G>C (p.E1559Q) und c.4675G>A (p.E1559K) das Spleißen an der Exon-14-Grenze stören und c.4868C>G (p.A1623G) das Spleißen an der Exon-16-Grenze [116,117]. Somit treten 100% der P- und LP-Missense-Varianten entweder in einer kritischen Domäne auf oder sie beeinflussen das Spleißen [116,117].

Trotz des völligen Fehlens pathogener Missense-Varianten in Exon 11 gibt es keine Hinweise darauf, dass diese Information derzeit für die Variantenklassifizierung verwendet werden kann, da Missense-VUS in Exon 11 ebenso häufig wie in den kritischen Domänen berichtet werden (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7:** ClinVar-Klassifizierung von Missense-Varianten bei den *BRCA1/2*-Genen

Gen	Region	Codon	P oder LP N(%)	B oder LB N(%)	VUS N(%)	Total N(%)
<i>BRCA1</i>	Gesamt Missense	1–1863	120	183	2272	2575
	RING-Domäne	9–98	36	3	110	149
	BRCT-Repeats	1649–1859	68	23	272	363
	Exon 11	224–1366	0	116	1378	1494
	Coiled-Coil	1393–1424	3	2	45	50
<i>BRCA2</i>	Gesamt Missense	1–3418	55	232	4399	4686
	Exons 10 und 11	266–2281	0	138	2637	2775
	BRC-Repeats	1008–2082	0	67	1451	1518
	DNA-Bindungsdomäne	2481–3186	41	45	889	975

Die Transkripte sind NM\_007294.3 für *BRCA1* und NM\_000059.3 für *BRCA2*.

B oder LB = benigne oder wahrscheinlich benigne, P oder LP = pathogen oder wahrscheinlich pathogen, VUS = Variante mit unklarer Signifikanz.

Die ausgeschlossenen Missense-Varianten sind solche mit CIP (conflicting interpretations of pathogenicity), ohne Interpretation (no interpretation), ohne vorliegende Aussagekriterien (no assertion criteria provided; 0 star), mit ungenauer Annotation, mit Deletionen und Insertionen, die mehr als ein Codon beeinflussen, und Start-Verlust-Varianten. <http://simple-clinvar.broadinstitute.org/>, Stand: 20.02.2021: 19:30

Für *BRCA2* werden 93,9% der Missense-Varianten als VUS und nur 1,17% als P und LP klassifiziert. In der Analyse wurden insgesamt 55 P- und LP-, 232 B- und LB- und 4399 VUS-Missense-Varianten verwendet, wobei Varianten mit „conflicting interpretations of pathogenicity“ (CIP) oder „no assertion criteria provided“ ausgeschlossen wurden. Die Mehrzahl der P- und LP-Missense-Varianten (41/55, 74,5%) sind in der hochkonservierten DNA-Bindungsdomäne (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8:** *BRCA2*-Varianten in Clinvar, Uniprot, Pubmed

	Pathogen	Wahrscheinlich pathogen	VUS	Wahrscheinlich benigne	Benigne	Gesamt
<b>Synonym</b>	4	0	82	1660	62	1808
<b>Missense</b>	119	33	5494	204	262	6112
<b>Nonsense</b>	961	29	19	6	4	1019
<b>Start-Verlust</b>	7	1	4	0	0	12
<b>Frameshift</b>	2486	81	29	12	1	2609
<b>In-frame-Indel</b>	15	6	166	2	1	190
<b>Splice Junction Loss</b>	171	56	20	1	0	248
<b>Nicht kodierend</b>	22	4	211	100	11	348
<b>Gesamt</b>	3785	210	6025	1985	341	12.346

Insgesamt sind 12.346 Variante; davon sind 3995 pathogen, 6025 VUS und 2326 benigne.

Die ausgeschlossenen Missense-Varianten sind mit CIP (conflicting interpretations of pathogenicity), ohne Interpretation (no interpretation), ohne vorliegende Aussagekriterien (no assertion criteria provided; 0 star) assoziiert. Quelle: Clinvar, 20.02.2021.

Die *BRCA2*-Exons 10 und 11, die etwa 65% der kodierenden Sequenz ausmachen, weisen keine mutmaßlichen P- und LP-Missense-Varianten (0,0%) auf, enthalten jedoch 62,1% (138/232) der B- und LB-Varianten. Ähnlich wie bei *BRCA1* tritt die Mehrzahl der P- und LP-Missense-Varianten bei *BRCA2* entweder in einer kritischen funktionellen Domäne auf oder beeinflusst das Spleißen. Bekannte, das Spleißen störende Varianten sind c.425G>T (p.S142I) und c.475G>A (p.V159M) am letzten Nukleotid von Exon 4 bzw. 5 [118,119]

#### 4.7 Kriterien PM3, BP2, PP1 und BS4 - *Cis/trans*- und Segregationsanalyse

Die Panel-Gensequenzierung ist zu einer zunehmend wichtigeren Strategie für die Bewertung des Risikos für Erbkrankheiten geworden. Erweiterte Genpanels sind empfindlicher als Einzelgentests und häufig kostengünstiger als sequenzielle Tests, was zu zusätzlichen Diagnose- und Präventionsmöglichkeiten führt [120]. Diese Panels haben jedoch den Vorbehalt, auch seltene VUS bei einem höheren Anteil von Patientinnen zu identifizieren als bei Einzelgentests allein [121-125].

Eine VUS weist typischerweise einige Merkmale oder zugehörige Daten auf, die darauf hinweisen, dass die Variante schädlich sein kann, aber nicht genügend Informationen, um

sie endgültig als krankheitsverursachend oder pathogen zu klassifizieren. Millionen solcher Varianten sind in der Bevölkerung mit geringen Häufigkeiten vorhanden [109].

Die Identifizierung einer VUS kann für Patientinnen und Kliniker, die im Umfeld der klinischen Genetik arbeiten, problematisch sein [126-129]. Obwohl eine endgültige Neuklassifizierung einer VUS als pathogen oder harmlos vorkommen kann, beträgt die Zeitspanne in der Regel viele Jahre und kann für seltene VUS unbegrenzt sein, insbesondere wenn die Krankheit ungewöhnlich ist [130-132]. *in silico*- oder funktionelle Forschungsstudien können die klinische Bedeutung einer Variante normalerweise nicht klären [133-136]. Während Familien-Segregationsanalysen das Potenzial haben, aussagekräftige Daten zur Klassifizierung von Varianten zu liefern, ergeben sich viele Herausforderungen, die dieses Potenzial einschränken. Die Ressourcen, die erforderlich wären, um weitere Familienmitglieder zu identifizieren, um die großen Stammbäume zu erstellen und genügend Informationen für eine informative Segregationsanalyse zu erhalten, sind unzureichend [137-138]. Während Forschungsstudien zur Untersuchung seltener Varianten in Familien Einfluss auf einzelne Familien haben könnten, sind die derzeitigen Forschungsressourcen und -mittel begrenzt, und es ist unwahrscheinlich, dass sie einen großen Einfluss auf eine große Anzahl von Familien haben.

Die meisten Laboratorien für klinische Genetik, die Multigen-Krebspanel-Tests anbieten, führen Familienstudien zur Klassifizierung von Varianten durch. Die Praktiken und Richtlinien variieren jedoch.

Eine wesentliche Einschränkung von Familienstudien zur VUS-Neuklassifizierung besteht darin, dass die Größe der Familie häufig nur drei bekannte Generationen von Verwandten umfasst, was zu wenig ist, um eine VUS zu klassifizieren [139,140]. Die Mehrheit der Patientinnen wird genügend Verwandte haben, um eine VUS anhand ihrer Verwandten ersten und zweiten Grades neu zu klassifizieren [140,141]. Die Erklärung der Details familiärer Kosegregationsstudien kann jedoch den Rahmen sprengen, den man von einem Anbieter genetischer Analysen in der klinischen Routine erwarten kann.

Im aktuellen Paradigma der Multigen-Panel-Tests ist die Rückgabe eines Ergebnisses mit einer oder mehrerer VUS eine Herausforderung für genetische und andere Gesundheitsdienstleister, und letztendlich für die Patientinnen und ihre Familien. Viele Labors, mit ihren verschiedenen Protokollen und Zulassungskriterien, sind an der Durchführung von Familienstudien zur Neuklassifizierung von Varianten beteiligt.

#### 4.8 Kriterien PM4 und BP3 - In-frame-Indels und Stopp-Verluste

Die bei ClinVar eingereichten In-frame-Indel-Varianten des *BRCA1*-Gens sind zu 82% (54/66) VUS und nur zu 12% (8/66) als pathogen oder wahrscheinlich pathogen eingestuft (nach Ausschluss von Varianten mit CIP or „no assertion criteria provided“).

Alle mutmaßlichen P- und LP-Missense-Varianten in *BRCA1* kommen in den kritischen Domänen vor (eine in der RING-Domäne, sieben in den BRCT-Wiederholungen).

Für *BRCA2* werden 94,3% (134/142) der In-frame-Indel-Varianten als VUS und nur 4,2% (6/142) als P und LP klassifiziert. Bei den BRC-Wiederholungen ist nur eine Variante vorhanden (p.(Glu1879\_Asn1880delinsLysLys)), die wahrscheinlich harmlos ist. Bei der DNA-Bindungsdomäne sind drei Varianten vorhanden, die pathogen oder wahrscheinlich pathogen sind (p.(Ser2782\_Arg2784delinsGln), p.(Arg2991\_Thr3033delinsPro) und p.(Pro2992\_Thr3033del)).

#### 4.9 Kriterien PP3 und BP4 - *in silico*-Algorithmen

Bestehende *in silico*-Ansätze zur Klassifizierung von Missense-Mutationen beruhen hauptsächlich auf der Annahme, dass krankheitsassoziierte Missense-Mutationen 1.) durch einen großen Unterschied zwischen den biochemischen Eigenschaften substituierter Aminosäuren gekennzeichnet und 2.) in einer über die Arten hinweg hochkonservierten genomischen Region lokalisiert sind. Basierend auf diesen Kriterien können die verfügbaren Tools grob in die folgenden Unterkategorien unterteilt werden: sequenzbasiert, wenn die Methode ausschließlich auf Annahme 1 beruht; strukturbasiert, wenn die Methode ausschließlich auf Annahme 2 beruht; und sequenz- und strukturbasiert in Fällen, in denen beide Kriterien berücksichtigt werden.

Aufgrund fehlender Informationen über seltene genetische Varianten und deren Interpretationsanforderung ist die automatisierte Vorhersage von Auswirkungen von Missense-Mutationen zu einem häufig verwendeten Ansatz in der klinischen Diagnostik geworden. Als Beispiel für *in silico* Algorithmen sind;

- 1) Align-GVGD (Tavtigian et al., 2006 [142]) verwendet mehrere Sequenz-Alignments (MSAs) als Eingabe und berechnet einen biochemischen Abstandswert (Erweiterung der paarweisen Grantham-Differenz, GD) sowie einen

- Konservierungswert (Grantham-Variation, GV). In jeder Alignment-Säule, die eine Substitution umfasst, werden basierend auf den beobachteten Werten von GD und GV Substitutionen in sieben Klassen,  $C \in \{0, 15, 25, 35, 45, 55, 65\}$ , eingeteilt, von der geringsten bis zur höchsten Wahrscheinlichkeit, die Funktion zu stören.
- 2) Als rein sequenzbasiertes Vorhersagewerkzeug klassifiziert SIFT (Kumar, Henikoff & Ng, 2009 [143]) nichtsynonyme SNPs (nsSNPs) auf der Grundlage der evolutionären Konservierung von Aminosäuren innerhalb von Proteinfamilien. An jeder Position eines Eingabe-MSA wird eine skalierte Wahrscheinlichkeit für jede auftretende Aminosäuresubstitution berechnet (SIFT-Score). Es wird vorausgesagt, dass eine Missense-Variante die Proteinfunktion schädigt, wenn der SIFT-Score der substituierten Aminosäure unter dem Schwellenwert von 0,05 liegt.
  - 3) MutationTaster2 (Schwarz et al., 2014 [144]) verwendet regulatorische Merkmale, den Grad der evolutionären Konservierung und Vorhersagen über Spleißstellen als Eingabe für einen naiven Bayes-Klassifikator, der Varianten entweder als Krankheitsverursacher oder als harmlose Polymorphismen kategorisiert. Darüber hinaus werden Mutationen, die im 1000-Genome-Projekt oder in den HapMap-Datenbanken mehr als viermal als homozygot befunden wurden, automatisch als Polymorphismus klassifiziert, während Varianten, die in ClinVar als pathogen gekennzeichnet sind, standardmäßig als krankheitsverursachend eingestuft werden.
  - 4) PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) (Adzhubei et al., 2010 [57]) verwendet acht sequenzbasierte und drei Strukturmerkmale als Eingabe für einen naiven Bayes-Klassifikator, wobei Letztere nur in Fällen berücksichtigt werden, für die eine 3D-Struktur des untersuchten Proteins bekannt ist.

*in silico*-Algorithmen für die Pathogenität von Missense-Varianten werden als kostengünstige, einfach zu bedienende Alternative eingesetzt. Die erhaltenen Vorhersagen werden zur Priorisierung von Varianten für die experimentelle Bewertung und als Beitrag zu Entscheidungsmodellen verwendet, die verschiedene Beweisquellen integrieren [134,145-147]. Die moderate Erfolgsrate dieser Tools ist jedoch ein Hindernis für ihren erweiterten Einsatz in einer Klinik [148].

In den letzten Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht, um die Leistung und Zuverlässigkeit bestehender Ansätze von *in silico*-Algorithmen für die Vorhersage von funktionellen Auswirkungen nichtsynonymer Varianten zu bewerten [135,149-155].

Zusammenfassend zeigten diese Studien ein vielfältiges Bild der Leistung dieser Anwendungen.

Ernst et al. (2018) [156] stellen nach dem Testen der Leistung von Align-GVGD, SIFT, PolyPhen-2 und MutationTaster2 an einem Satz von 236 *BRCA1/2*-Varianten mit bekannter Wirkung fest, dass diese Werkzeuge häufig unter schlechten Spezifitäten leiden, was zu einem unakzeptabel hohen Anteil falsch positiver Ergebnisse führt.

In Bezug auf die molekulare Wirkung zeigen zwei unabhängige funktionelle Großversuche zu *BRCA1*-Varianten [87,157], dass *in silico*-Algorithmen nur eine begrenzte Sicht auf die funktionellen Auswirkungen dieser Varianten liefern. Rodrigues et al. [154] fanden heraus, dass genomische Regionen mit starker Konservierung sowie Hypervariabilität die Vorhersageergebnisse negativ beeinflussen können. Grimm et al. [150] stellten fest, dass die Bewertung mehrerer Werkzeuge unter einer Überanpassung litt, da Varianten, die zum Trainieren der Methoden verwendet wurden, auch im Bewertungssatz enthalten waren. Eine kürzlich von Tang und Thomas [155] durchgeführte Überprüfung bestehender Vorhersageansätze unterstreicht den allgemeinen Mangel an genauen Benchmark-Datensätzen für die zuverlässige Bewertung von Ansätzen auf dem neuesten Stand der Technik. Aufgrund der spezifischen Schwächen jedes Vorhersagewerkzeugs besteht eine gemeinsame Strategie darin, die Ergebnisse verschiedener Ansätze zu kombinieren, d.h. eine krankheitsverursachende Mutation anzunehmen, wenn mindestens die Hälfte mehrerer Ansätze eine Variante als schädlich einstuft. Leong et al. [152] fanden jedoch heraus, dass eine solche Strategie sogar die Zuverlässigkeit verringern könnte, wie sie für einen Satz von 113 nsSNPs im menschlichen *SCN5A*-Gen zeigten.

Zusammenfassend muss die Vorhersagekraft dieser Tools verbessert werden, wenn man ihre Verwendung im klinischen Umfeld erhöhen und ihren Wert für die Interessengruppen im Gesundheitswesen steigern möchte.

## 5 Schlussfolgerung

Panel-Genests haben zu einer großen Anzahl von VUS geführt. In *BRCA1* 88% und bei *BRCA2* 93,9% wurden bei ClinVar eingereichten Missense-Varianten als VUS klassifiziert. Es ist dringend erforderlich, die Variantenklassifizierung zu verbessern, um die Anzahl der gemeldeten VUS zu verringern.

Die ACMG-Richtlinie besagt, dass eine Variante mit unklarer Signifikanz (VUS) bei der klinischen Entscheidungsfindung nicht verwendet werden sollte. Die Folgen einer Fehldiagnose können nicht nur für den Probanden, sondern auch für seine Angehörigen schädlich sein, da deren klinisches Management geändert wird.

Die Interpretation einer Variante zur Verwendung bei der klinischen Entscheidungsfindung erfordert aber eine umfassende Kenntnis des Phänotyps der Patientinnen, der Art der Vererbung des Krankheitsgens, des Mutationsmechanismus (z.B. Haploinsuffizienz, dominant negativ), der Proteinstruktur und -funktion und der Stärke der Gen-Krankheits-Beziehung.

Eine funktionelle Bewertung der Missense-Varianten, die die Mehrheit der VUS-Varianten darstellen, ist notwendig, um die Interpretation dieser Varianten zu verbessern und somit die klinische Entscheidungsfindung für Patienten/innen zu unterstützen.

Für *BRCA1* und *BRCA2* sind mehrere funktionelle Assays beschrieben, aber in nur wenigen Fällen wurden große (> 30) Variantensätze getestet. Beweise aus Funktionsstudien, die in einem Forschungsumfeld durchgeführt wurden, müssen sorgfältig überprüft werden, um die Datenqualität, Zuverlässigkeit und das richtige Maß an Vertrauen in die Ergebnisse zu bestimmen.

Laut ACMG/AMP können „gut etablierte Assays“ verwendet werden, um ein PS3- oder BS3-Kriterium (Strong Evidence) zu erhalten. Es gibt jedoch noch keine spezifischen Richtlinien, die letztendlich von Expertengremien (engl. expert panels) für jedes Gen festgelegt werden müssen. Zum Beispiel wären übereinstimmende Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen validierten Assays für PS3- oder BS3-Kriterien (stark) erforderlich, während übereinstimmende Ergebnisse in zwei unabhängigen validierten Assays ein PM1-Kriterium (moderat) erzeugen würden.

Ein weiteres Problem für die Klassifizierung von VUS besteht darin, dass in der ACMG-Richtlinie Hotspot-Regionen als Beweis für eine Pathogenität berücksichtigt werden (z.B. PM1 und PP2), aber umgekehrt Regionen ohne wesentliche Funktionen, die Missense-

Varianten tolerieren, nicht als Nachweis für die Harmlosigkeit einer Variante genommen werden.

Die Identifizierung von Fällen von *de novo*-Mutationen hätte direkte Auswirkungen auf die Präventions- und Behandlungsstrategien und könnte das klinische Management von Patientinnen positiv beeinflussen. Weltweit sind bisher aber nur sehr wenige *de novo*-Fälle – nur neun beim *BRCA1*-Gen und sechs beim *BRCA2*-Gen – beschrieben worden.

Familien-Segregationsanalysen müssen durchgeführt werden, da sie das Potenzial haben, aussagekräftige Daten zur Klassifizierung von Varianten zu liefern.

Informationen aus Populationsdatenbanken haben folgende methodische Einschränkungen; Längere Indels werden nicht durch Sequenzierung via NGS (Next-Generation-Sequenzierung) erkannt, Populationen wurden deshalb möglicherweise nicht auf den Phänotyp untersucht oder ausgeschlossen. Zudem erschweren individuelle Unterschiede bei der Penetranz und der Expressivität (Ausprägung) der Erkrankung die Verwendung von Daten aus Populationsdatenbanken.

Beim PS1-Kriterium wird die gleiche Aminosäureveränderung durch einen anderen Nukleotidaustausch verursacht. Faktoren wie hypomorphe Varianten, fehlende funktionelle Analysen wie beim alternativen mRNA-Spleißen, eine falsche Klassifizierung der Varianten usw. können die Anwendung dieses Kriteriums erschweren.

Die Evidenzstärke kann abhängig vom Variantentyp und der Position innerhalb des Gens oder aufgrund zusätzlicher Evidenz für die Wahrscheinlichkeit eines echten Null-Effekts geändert werden.

Ein PVS1-Entscheidungsbaum wurde von der ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group (SVI WG) entwickelt, um die Interpretation von Funktionsverlustvarianten (LOF) zu unterstützen [158]. Zusätzlich zu dem LOF-Varianten (Nonsense-, Frameshift-Varianten, kanonische Spleißstellenvarianten  $\pm 1$  oder  $\pm 2$ , Start-Codon-Variante, Einzel- oder Multi-Exon-Deletion) kann auch bei einer Stopp-Verlust-Variante das Kriterium PVS1 angewendet werden, da in Abwesenheit eines In-frame-Terminationscodons in der 3'-UTR das mRNA-Transkript wahrscheinlich einem „nonstop-mediated decay“ (Nonstop-vermittelter Abbau) unterzogen wird. Beim PVS1-Kriterium ist bei der Interpretation einer 3'-Nonsense- oder Frameshift-Variante zu beachten, dass diese dem Mechanismus des

„nonsense-mediated decay“ (Nonsense-vermittelter Abbau) entkommen können oder dass alternatives mRNA-Spleißen die Pathogenität mutmaßlicher LOF-Varianten abschwächen kann.

Daher wird eine HBOC-spezifische Verfeinerung der ACMG-Richtlinie für einzelne Kriterien empfohlen, mit Berücksichtigung der oben genannten Varianten bzw. Mechanismen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Höchste Sterblichkeitsraten abhängig von der Krebsart

**Abbildung 2:** Molekulare Klassifikation von Brustkrebs und die Häufigkeit der Typen

**Abbildung 3:** Funktionelle Eigenschaften der BRCA-Proteine

**Abbildung 4:** Funktionelle Regionen (Domänen) der *BRCA1*- und *BRCA2*-Proteine

### 6.2 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Histopathologische Klassifikation von Brustkrebs

**Tabelle 2:** Entstehung, Häufigkeit und Altersverteilung verschiedener Ovarialneoplasmen

**Tabelle 3:** Erkrankungsrisiko bei Trägerschaft einer pathogenen Keimbahnmutation in den *BRCA1/2*-Genen

**Tabelle 4:** Kriterien für die Klassifizierung von Varianten nach den ACMG/AMP-Richtlinien

**Tabelle 5:** Kombination von Kriterien für die Klassifizierung einer Variante nach den ACMG/AMP-Richtlinien

**Tabelle 6:** *BRCA1*-Varianten in Clinvar, Uniprot und Pubmed

**Tabelle 7:** ClinVar-Klassifizierung von Missense-Varianten bei den *BRCA1/2*-Genen

**Tabelle 8:** *BRCA2*-Varianten in Clinvar, Uniprot und Pubmed

### 6.3 Literaturverzeichnis

1. GLOBOCAN 2020, World Health Organization, <http://gco.iarc.fr/today>, Zugang: November 2020
2. Easton D, Ford D, Peto J. Inherited susceptibility to breast cancer. *Cancer Surv.* 1993;18:95-113. PMID: 8013003
3. Krebsliga Schweiz; Krebs in der Schweiz: wichtige Zahlen, <https://www.krebsliga.ch/ueber-krebs/zahlen-fakten/>, Dez 2020, Zugang: Dezember 2020
4. Schweizer Krebsbericht 2015, Stand und Entwicklungen, <https://www.bfs.admin.ch>, Zugang: November 2020
5. Goldberg JI, Borgen PI. Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2006 Aug;6(8):1205-14. doi: 10.1586/14737140.6.8.1205. PMID: 16925486
6. Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. The fall in breast cancer mortality in Europe. *Eur J Cancer.* 2001 Jul;37(11):1409-12. doi: 10.1016/s0959-8049(01)00144-7. PMID: 11435073
7. Steward B.W., Wild C. P. Hrsg. (2014). *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, <https://www.iarc.who.int/>, Zugang: November 2020
8. *World Cancer Report, 2007*, World Health Organisation, <https://www.who.int/cancer/publications/en/>, Zugang: November 2020
9. *World Health Statistics 2009*, <https://www.who.int/whosis/whostat/2009/en/>, Zugang: November 2020
10. Newman B, Austin MA, Lee M, King MC. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 May;85(9):3044-8. doi: 10.1073/pnas.85.9.3044. PMID: 3362861; PMCID: PMC280139
11. Claus EB, Risch N, Thompson WD. Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet.* 1991 Feb;48(2):232-42. PMID: 1990835; PMCID: PMC1683001

12. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994 Sep 30;265(5181):2088-90. doi: 10.1126/science.8091231. PMID: 8091231
13. Berek JS, Hacker NF. *Practical Gynecological Oncology*. Baltimore: Williams & Wilkins 1994:327
14. Hamilton R. Genetics: breast cancer as an exemplar. *Nurs Clin North Am*. 2009 Sep;44(3):327-38. doi: 10.1016/j.cnur.2009.06.004. PMID: 19683094; PMCID: PMC2748903
15. Ewertz M, Duffy SW, Adam HO. Ege at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of studies from Nordic countries. *Int J Cancer* 1990; 4: 597- 603
16. Hislop TG, Band PR. Diet and histologic types of benign Breast disease defined by subsequent risk of breast cancer. *American Journal of Epidemiology* 1990; 2: 263 - 270
17. Malhotra GK, Zhao X, Band HBV. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 955 - 960
18. Aydinler A, Topuz E. *Meme Kanseri Tanı-Tedavi-Takip*. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2006
19. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha R, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC genomics* 2006; 7: 1 - 15
20. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 2010; 2: 60 – 64
21. Welchs PL, King MC. *BRCA1* and *BRCA2* and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*. 2001. 10(7):705-13
22. Kroeger PT, Drapkin R. Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2017;29 (1):26-34. doi:10.1097/GCO.0000000000000340
23. Krebsliga Schweiz, 2015, <https://www.krebsliga.ch>, Zugang: Dezember 2020

24. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group (2009). A review of human carcinogens – Part A to F. The Lancet Oncology; Volume 10, zitiert nach: [www.cancer-environnement.fr/212Monographies-du-CIRC--syntheses.ce.aspx](http://www.cancer-environnement.fr/212Monographies-du-CIRC--syntheses.ce.aspx)
25. Krebsliga Schweiz (2011). Eierstockkrebs Ovarialtumoren, Bern, <https://www.krebsliga.ch>, Zugang: Dezember 2020
26. Devouassoux-Shisheboran M, Genestie C. Pathobiology of ovarian carcinomas. Chin J Cancer. 2015;34 (1):50-55. doi:10.5732/cjc.014.10273
27. Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins. Pathologic Basis of Disease. WB Saunders Comp. 6th ed. 1999; 695-696
28. Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). Oncol Rep. 2013. doi:10.3892/or.2013.2541
29. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. *BRCA1*- and *BRCA2*-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. Genereviews. September 4, 1998; Last Update: December 15, 2016
30. Edlich RF, Catherine L, Wack CA, Chase ME, Kant Y. Breast Cancer and Ovarian Cancer Genetics : An Update. 2008;27 (4):245-256
31. Kulski JK. Next-Generation Sequencing - An Overview of the History, Tools, and „Omic“ Applications. Intech. 2016. doi:<http://dx.doi.org/10.5772/57353>
32. Ensenaer RE, Michels V V., Reinke SS. Genetic testing: Practical, ethical, and counseling considerations. Mayo Clin Proc. 2005;80 (1):63-73. doi:10.4065/80.1.63
33. d'Agincourt-Canning L, Baird P. Genetic testing for hereditary cancers: The impact of gender on interest, uptake and ethical considerations. Crit Rev Oncol Hematol. 2006;58 (2):114-123. doi:10.1016/j.critrevonc.2006.03.001
34. Lessick M. Genetic testing for breast and ovarian cancer: ethical, legal, and psychosocial considerations. Nurs Womens Health. 2007. doi:10.1111/j.1751-486X.2007.00204.x
35. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. Science. 1994 Oct 7;266(5182):66-71. doi: 10.1126/science.7545954. PMID: 7545954

36. Hoang LN, Gilks BC. Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome; Moving Beyond *BRCA1* and *BRCA2*. *Adv Anat Pathol* 2017;00:000–000
37. Mathews LA, Hurt EM, Cabarcas SM. DNA Repair of Cancer Stem Cells.; 2014. doi:10.1007/978-94-007-4590-2
38. Chapman JR, Taylor MRG, Boulton SJ. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol Cell*. 2012. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.029
39. Stoppa-Lyonnet D. The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: Where do we go from here? *Eur J Hum Genet*. 2016
40. Symington LS, Gautier J. Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. *Annu Rev Genet*. 2011;45:247–271, DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132435
41. Scully R, Chen J, Plug A, et al. Association of *BRCA1* with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*. 1997. doi:10.1016/S0092-8674 (00)81847-4
42. Thompson D, Easton D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004;9 (3):221-236.doi:10.1023/B:JOMG.0000048770.90334.3b
43. Gorodetska I, Kozeretska I, Dubrovskaya A. BRCA genes: The role in genome stability, cancer stemness and therapy resistance. *J Cancer*. 2019;10 (9):2109-2127
44. Bhaskaran SP, Chandratre K, Gupta H, et al. Germline variation in BRCA1/2 is highly ethnic-specific: Evidence from over 30,000 Chinese hereditary breast and ovarian cancer patients. *Int J Cancer*. 2019;145 (4):962-973. doi:10.1002/ijc.32176
45. Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer. *Biomed Res Int*. 2013;2013. doi:10.1155/2013/928562
46. Zhang J, Fackenthal JD. Searching for large genomic rearrangements of the *BRCA1* gene in a Nigerian population. 2010:573-577. doi:10.1007/s10549-010-1006-9
47. Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, et al. The Founder Mutations 185delAG and 5382insC in *BRCA1* and 61 74delT in *BRCA2* Appear in 60 % of Ovarian Cancer and 30 % of Early-Onset Breast Cancer Patients among Ashkenazi Women. 1997:505-514

48. Levy-lahad E, Catane R, Eisenberg S, et al. Founder *BRCA1* and *BRCA2* Mutations in Ashkenazi Jews in Israel : Frequency and Differential Penetrance in Ovarian Cancer and in Breast-Ovarian Cancer Families. 1997:1059-1067
49. Tonin PN, Futreal PA, Morgan K, et al. Founder *BRCA1* and *BRCA2* Mutations in French Canadian Breast and Ovarian Cancer Families. 1998:1341-1351.
50. Claes K, Machackova E, De Vos X, Poppe B, De Paepe A, Messiaen L. Mutation analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in the Belgian patient population and identification of a Belgian founder mutation *BRCA1* IVS5 + 3 A > G. Dis Markers. 1999. doi:10.1155/1999/241046
51. Pääkkönen K, Sauramo S, Sarantaus L, et al. Involvement of *BRCA1* and *BRCA2* in Breast Cancer in a Western Finnish. 2001;246 (July 2000):239-246
52. Byrski T, Huzarski T, Jakubowska A, et al. Founder Mutations in the *BRCA1* Gene in Polish Families with Breast-Ovarian Cancer. 2000:1963-1968
53. Hall MJ, Reid JE, Burbidge LA, et al. *BRCA1* and *BRCA2* mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. Cancer. 2009. doi:10.1002/cncr.24200
54. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med 2015;17:405-24
55. Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, et al. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. Nat Methods 2010;7:575-6
56. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc 2009;4:1073-81
57. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods 2010;7:248-9
58. Mesman RLS et al (2020) Alternative mRNA splicing can attenuate the pathogenicity of presumed loss-of-function variants in *BRCA2*. Genet Med 22(8):1355–1365
59. de la Hoya M et al (2016) Combined genetic and splicing analysis of *BRCA1* c.[594-2A>C; 641A>G] highlights the relevance of naturally occurring in-frame transcripts for developing disease gene variant classification algorithms. Hum Mol Genet 25(11):2256–2268

60. Tubeuf H et al (2020) Calibration of pathogenicity due to variant-induced leaky splicing defects by using *BRCA2* exon 3 as a model system. *Cancer Res* 80(17):3593–3605
61. Li L, Biswas K, Habib LA, et al. Functional redundancy of exon 12 of *BRCA2* revealed by a comprehensive analysis of the c.6853A>G (p.I2285V) variant. *Hum Mutat.* 2009;30:1543–1550
62. Seo A, Steinberg-Shemer O, Unal S, et al. Mechanism for survival of homozygous nonsense mutations in the tumor suppressor gene *BRCA1*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115:5241–5246
63. Wang Y, Bernhardt AJ, Cruz C, et al. The *BRCA1*-Delta11q alternative splice isoform bypasses germline mutations and promotes therapeutic resistance to PARP inhibition and cisplatin. *Cancer Res.* 2016;76:2778–2790
64. Colombo, M., Blok, M.J., Whiley, P., Santamarina, M., Gutierrez-Enriquez, S., Romero, A., Garre, P., Becker, A., Smith, L.D., De Vecchi, G. et al. (2014) Comprehensive annotation of splice junctions supports pervasive alternative splicing at the *BRCA1* locus: a report from the ENIGMA consortium. *Hum. Mol. Genet.*, 23, 3666-3680
65. Romero, A., Garcia-Garcia, F., Lopez-Perolio, I., Ruiz de Garibay, G., Garcia-Saenz, J.A., Garre, P., Ayllon, P., Benito, E., Dopazo, J., Diaz-Rubio, E. et al. (2015) *BRCA1* Alternative splicing landscape in breast tissue samples. *BMC Cancer*, 15, 219
66. Fackenthal JD, Yoshimatsu T, Zhang B, et al. Naturally occurring *BRCA2* alternative mRNA splicing events in clinically relevant samples. *J Med Genet.* 2016;53:548–558
67. Thompson, E.R.; Goringe, K.L.; Rowley, S.M.; Li, N.; McInerney, S.; Wong-Brown, M.W.; Devereux, L.; Li, J.; Lifepool, I.; Trainer, A.H.; et al. Reevaluation of the *BRCA2* truncating allele c.9976A > T (p.Lys3326Ter) in a familial breast cancer context. *Sci. Rep.* 2015, 5, 14800
68. Tuominen, R.; Engstrom, P.G.; Helgadottir, H.; Eriksson, H.; Unneberg, P.; Kjellqvist, S.; Yang, M.; Linden, D.; Edsgard, D.; Hansson, J.; et al. The role of germline alterations in the DNA damage response genes *BRIP1* and *BRCA2* in melanoma susceptibility. *Genes Chromosom. Cancer* 2016, 55, 601–611

69. Meeks, H.D.; Song, H.; Michailidou, K.; Bolla, M.K.; Dennis, J.; Wang, Q.; Barrowdale, D.; Frost, D.; Embrace; McGuffog, L.; et al. *BRCA2* Polymorphic Stop Codon K3326X and the Risk of Breast, Prostate, and Ovarian Cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2016, 108
70. Ge, Y.; Wang, Y.; Shao, W.; Jin, J.; Du, M.; Ma, G.; Chu, H.; Wang, M.; Zhang, Z. Rare variants in *BRCA2* and *CHEK2* are associated with the risk of urinary tract cancers. *Sci. Rep.* 2016, 6, 33542
71. Martin, S.T.; Matsubayashi, H.; Rogers, C.D.; Philips, J.; Couch, F.J.; Brune, K.; Yeo, C.J.; Kern, S.E.; Hruban, R.H.; Goggins, M. Increased prevalence of the *BRCA2* polymorphic stop codon K3326X among individuals with familial pancreatic cancer. *Oncogene* 2005, 24, 3652–3656
72. Edwards, E., C. Yearwood, J. Sillibourne, D. Baralle, and D. Eccles. 2009. Identification of a de novo *BRCA1* mutation in a woman with early onset bilateral breast cancer. *Fam. Cancer* 8:479–482
73. Friedman, E., N. Efrat, L. Soussan-Gutman, A. Dvir, Y. Kaplan, T. Ekstein, et al. 2015. Low-level constitutional mosaicism of a de novo *BRCA1* gene mutation. *Br. J. Cancer* 112:765–768
74. Golmard, L., C. Delnatte, A. Laug e, V. Moncoutier, C. Lefol, K. Abidallah, et al. 2015. Breast and ovarian cancer predisposition due to de novo *BRCA1* and *BRCA2* mutations. *Oncogene* 35:1324–1327
75. Kwong, A., E. K. Ng, E. Y. Tang, C. L. Wong, F. B. Law, C. P. Leung, et al. 2011. A novel de novo *BRCA1* mutation in a Chinese woman with early onset breast cancer. *Fam. Cancer* 10:233–237
76. Marshall, M., S. Solomon, and D. Lawrence Wickerham. 2009. Case report: de novo *BRCA2* gene mutation in a 35-year-old woman with breast cancer. *Clin. Genet.* 76:427–430
77. Antonucci, I. et al. (2017) A new case of "de novo" *BRCA1* mutation in a patient with early-onset breast cancer. *Clin Case Rep*, 5(3), 238-240
78. Monteiro AN, Bouwman P, Kousholt AN, Eccles DM, Millot GA, Masson JY, Schmidt MK, Sharan SK, Scully R, Wiesmüller L, Couch F, Vreeswijk MPG. Variants of uncertain clinical significance in hereditary breast and ovarian cancer genes: best practices in functional analysis for clinical annotation. *J Med Genet.* 2020 Aug;57(8):509-518. doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106368. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32152249; PMCID: PMC7390672

79. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, et al. Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. *JAMA Oncol.* 2017;3:1190–1196
80. Thomassen M, Blanco A, Montagna M, Hansen TvO, Pedersen iS, Gutiérrez-enríquez S, Menéndez M, Fachal L, Santamariña M, Steffensen AY, Jønson L, Agata S, whiley P, Tognazzo S, Tornero e, Jensen UB, Balmaña J, Kruse TA, Goldgar De, Lázaro C, Diez O, Spurdle AB, vega A. Characterization of *BRCA1* and *BRCA2* splicing variants: a collaborative report by enigma Consortium members. *Breast Cancer Res Treat* 2012;132:1009–23
81. Walker LC, Whiley PJ, Couch FJ, Farrugia DJ, Healey S, eccles DM, Lin F, Butler SA, Goff SA, Thompson BA, Lakhani SR, Da Silva LM, Tavgigian Sv, Goldgar De, Brown MA, Spurdle AB. Detection of splicing aberrations caused by *BRCA1* and *BRCA2* sequence variants encoding missense substitutions: implications for prediction of pathogenicity. *Hum Mutat* 2010;31:e1484–505
82. Guidugli L, Carreira A, Caputo SM, ehlen A, Galli A, Monteiro ANA, Neuhausen SL, Hansen TvO, Couch FJ, vreeswijk MPG, consortium e, eNiGMA consortium. Functional assays for analysis of variants of uncertain significance in *BRCA2*. *Hum Mutat* 2014;35:151–64
83. Millot GA, Carvalho MA, Caputo SM, vreeswijk MPG, Brown MA, webb M, Rouleau e, Neuhausen SL, Hansen TvO, Galli A, Brandão RD, Blok MJ, velkova A, Couch FJ, Monteiro ANA, on behalf of the eNiGMA (evidence- based Network for the interpretation of Germline Mutant Alleles) Consortium Functional Assay working Group. A guide for functional analysis of *BRCA1* variants of uncertain significance. *Hum Mutat* 2012;33:1526–37
84. Jhuraney A, velkova A, Johnson RC, Kessing B, Carvalho RS, whiley P, Spurdle AB, vreeswijk MPG, Caputo SM, Millot GA, vega A, Coquelle N, Galli A, eccles D, Blok MJ, Pal T, van der Luijt RB, Santamariña Pena M, Neuhausen SL, Donenberg T, Machackova e, Thomas S, vallée M, Couch FJ, Tavgigian Sv, Glover JNM, Carvalho MA, Brody LC, Sharan SK, Monteiro AN, evidence- based Network for the interpretation of Germline Mutant Alleles Consortium. *BRCA1* Circos: a visualisation resource for functional analysis of missense variants. *J Med Genet* 2015;52:224–30
85. Fernandes vC, Golubeva vA, Di Pietro G, Shields C, Amankwah K, Nepomuceno TC, de Gregoriis G, Abreu RBv, Harro C, Gomes TT, Silva RF, Suarez- Kurtz G, Couch FJ, iversen eS, Monteiro ANA, Carvalho MA. impact of amino acid substitutions at secondary structures in the BRCT domains of the tumor suppressor *BRCA1*: implications for clinical annotation. *J Biol Chem* 2019;294:5980–92

86. Starita LM, Islam MM, Banerjee T, Adamovich Ai, Gullingsrud J, Fields S, Shendure J, Parvin JD. A multiplex homology- directed DNA repair assay reveals the impact of more than 1,000 *BRCA1* missense substitution variants on protein function. *Am J Hum Genet* 2018;103:498–508
87. Findlay GM, Daza RM, Martin B, Zhang MD, Leith AP, Gasperini M, Janizek JD, Huang X, Starita LM, Shendure J. Accurate classification of *BRCA1* variants with saturation genome editing. *Nature* 2018;562:217–22
88. Walsh R, Thomson K.L, Ware J.S, Funke B.H, Woodley J, McGuire K.J, Mazarotto F, Blair E, Sellar A, Taylor J.C. et al. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genet. Med.* 2017; 19: 192-203
89. Whittemore AS, Gong G, John EM, McGuire V, Li FP, Ostrow KL, et al. Prevalence of *BRCA1* mutation carriers among U.S. non-Hispanic Whites. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2004;13(12):2078–83
90. Daly MB, Pilarski R, Axilbund JE, Berry M, Buys SS, Crawford B, et al. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, Version 2.2015. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2016;14(2):153–62
91. Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM, Healey S, Pooley KA, Schmutzler RK, et al. Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Am J Hum Genet.* 2008;82(4):937–48. doi:10.1016/j.ajhg.2008.02.008
92. Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, Dagan E, Paperna T, Kasinetz L, et al. A single nucleotide polymorphism in the *RAD51* gene modifies cancer risk in *BRCA2* but not *BRCA1* carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(6):3232–6. doi:10.1073/pnas.051624098
93. Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer.* 2000;83(10):1301–8
94. McClain MR, Palomaki GE, Nathanson KL, Haddow JE. Adjusting the estimated proportion of breast cancer cases associated with *BRCA1* and *BRCA2* mutations: public health implications. *Genet Med.* 2005;7(1):28–33
95. Hartge P, Struwing JP, Wacholder S, Brody LC, Tucker MA. The prevalence of common *BRCA1* and *BRCA2* mutations among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet.* 1999;64(4):963–70

96. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Nat Genet.* 1996; 14(2):185–7
97. Rebbeck TR, Friebel TM, Friedman E, Hamann U, Huo D, Kwong A, et al. Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with *BRCA1* or *BRCA2* mutations. *Hum Mutat.* 2018;39(5):593–620
98. Daly MB, Pilarski R, Berry M, Buys SS, Farmer M, Friedman S, et al. NCCN guidelines insights: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 2.2017. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2017;15(1):9–20
99. Hampel H, Bennett RL, Buchanan A, Pearlman R, Wiesner GL, Guideline Development Group ACoMG, et al. A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. *Genet Med.* 2015;17(1):70–87
100. Moyer VA, Force USPST. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 2014; 160(4):271–81
101. Manickam K, Buchanan AH, Schwartz MLB, Hallquist MLG, Williams JL, Rahm AK, et al. Exome sequencing-based screening for *BRCA1/2* expected pathogenic variants among adult biobank participants. *JAMA Netw Open.* 2018;1(5):e182140
102. Popejoy AB, Ritter DI, Crooks K, Currey E, Fullerton SM, Hindorff LA, et al. The clinical imperative for inclusivity: race, ethnicity, and ancestry (REA) in genomics. *Hum Mutat.* 2018;39(11):1713–20
103. Butrick M, Kelly S, Peshkin BN, Luta G, Nusbaum R, Hooker GW, et al. Disparities in uptake of *BRCA1/2* genetic testing in a randomized trial of telephone counseling. *Genet Med.* 2015;17(6):467–75
104. Cragun D, Bonner D, Kim J, Akbari MR, Narod SA, Gomez-Fuego A, et al. Factors associated with genetic counseling and BRCA testing in a population-based sample of young Black women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;151(1):169–76
105. Cragun D, Weidner A, Lewis C, Bonner D, Kim J, Vadaparampil ST, et al. Racial disparities in BRCA testing and cancer risk management across a population-based sample of young breast cancer survivors. *Cancer.* 2017; 123(13):2497–505

106. Lynce F, Graves KD, Jandorf L, Ricker C, Castro E, Moreno L, et al. Genomic disparities in breast cancer among Latinas. *Cancer Control*. 2016;23(4):359–72
107. Caswell-Jin JL, Gupta T, Hall E, Petrovchich IM, Mills MA, Kingham KE, et al. Racial/ethnic differences in multiple-gene sequencing results for hereditary cancer risk. *Genet Med*. 2018;20(2):234–9
108. Ricks-Santi L, McDonald JT, Gold B, Dean M, Thompson N, Abbas M, et al. Next generation sequencing reveals high prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* variants of unknown significance in early-onset breast cancer in African American women. *Ethn Dis*. 2017;27(2):169–78
109. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016; 536(7616):285–91. doi:10.1038/nature19057
110. <http://gnomad.broadinstitute.org/>, Zugang: Januar 2021
111. Blackburn, H. L., Schroeder, B., Turner, C., Shriver, C. D., Ellsworth, D. L., Ellsworth, R. E. (2015). Management of incidental findings in the era of next-generation sequencing *Current Genomics* 16, 159-174
112. Kobayashi, Y., Yang, S., Nykamp, K., Garcia, J., Lincoln, S. E., Topper, S. E. (2017). Pathogenic variant burden in the ExAC database: An empirical approach to evaluating population data for clinical variant interpretation. *Genome Medicine* 9,13
113. Huang, K., Mashl, R. J., Wu, Y., Ritter, D. I., Wang, J., Oh, C., Mariamidze, A. (2018). Pathogenic germline variants in 10,389 adult cancers. *Cell* 173, 355-370.e14
114. Jagadeesh, K. A., Wenger, A. M., Berger, M. J., Guturu, H., Stenson, P. D., Cooper, D. N., Bejerano, G. (2016). M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nature Genetics* 48, 1581-1586
115. Hart SN, Hoskin T, Shimelis H, et al. Comprehensive annotation of *BRCA1* and *BRCA2* missense variants by functionally validated sequence-based computational prediction models. *Genet Med*. 2019;21:71–80
116. Santos C, Peixoto A, Rocha P, et al. Pathogenicity evaluation of *BRCA1* and *BRCA2* unclassified variants identified in Portuguese breast/ovarian cancer families. *J Mol Diagn*. 2014;16:324–334

117. Wappenschmidt B, Becker AA, Hauke J, et al. Analysis of 30 putative *BRCA1* splicing mutations in hereditary breast and ovarian cancer families identifies exonic splice site mutations that escape *in silico* prediction. PLoS ONE. 2012;7:e50800
118. Brandão RD, van Roozendaal K, Tserpelis D, et al. Characterisation of unclassified variants in the *BRCA1/2* genes with a putative effect on splicing. Breast Cancer Res Treat. 2011;129:971–982
119. Machackova E, Foretova L, Lukesova M, et al. Spectrum and characterisation of *BRCA1* and *BRCA2* deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. BMC Cancer. 2008;8:140
120. Gallego, C. J., Shirts, B. H., Bennette, C. S., Guzauskas, G., Amendola, L. M., Horike-Pyne, M., Veenstra, D. L. (2015). Next-generation sequencing panels for the diagnosis of colorectal cancer and polyposis syndromes: A Cost-Effectiveness Analysis. Journal of Clinical Oncology, 33(18), 2084–91. doi:10.1200/JCO.2014.59.3665
121. Cragun,D., Radford, C., Dolinsky, J. S., Caldwell,M., Chao, E.,&Pal, T. (2014). Panel-based testing for inherited colorectal cancer: a descriptive study of clinical testing performed by a US laboratory. Clinical Genetics.doi:10.1111/cge.12359
122. Kurian, A.W., Hare, E. E.,Mills,M. A., Kingham, K. E.,McPherson, L., Whittemore, A. S., Ford, J. M. (2014). Clinical evaluation of a multiple-Gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. Journal of Clinical Oncology, 14,14
123. Maron, B. J., Maron, M. S., & Semsarian, C. (2012). Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. Journal of the American College of Cardiology, 60(8), 705–715. doi:10.1016/j.jacc.2012.02.068
124. Maxwell, K. N., Wubbenhorst, B., D’Andrea, K., Garman, B., Long, J. M., Powers, J., Nathanson, K. L. (2014). Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in *BRCA1/2*-negative patients with early-onset breast cancer. Genetics in Medicine, 11(10), 176. doi:10.1038/gim.2014
125. Tung,N., Battelli, C., Allen, B., Kaldate, R., Bhatnagar, S., Bowles, K., Hartman, A. R. (2014). Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for *BRCA1* and *BRCA2* testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. Cancer, 3(10), 29010

126. Culver, J., Brinkerhoff, C., Clague, J., Yang, K., Singh, K., Sand, S., & Weitzel, J. (2013). Variants of uncertain significance in BRCA testing: evaluation of surgical decisions, risk perception, and cancer distress. *Clinical Genetics*, 17(10), 12097. doi:10.1111/cge
127. O'Neill, S. C., DeMarco, T., Peshkin, B. N., Rogers, S., Rispoli, J., Brown, K., Schwartz, M. D. (2006). Tolerance for uncertainty and perceived risk among women receiving uninformative *BRCA1/2* test results. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 142C(4), 251–259
128. van Dijk, S., Timmermans, D. R., Meijers-Heijboer, H., Tibben, A., van Asperen, C. J., & Otten, W. (2006). Clinical characteristics affect the impact of an uninformative DNA test result: the course of worry and distress experienced by women who apply for genetic testing for breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(22), 3672–3677
129. Vos, J., Otten, W., van Asperen, C., Jansen, A., Menko, F., & Tibben, A. (2008). The counsellees' view of an unclassified variant in *BRCA1/2*: recall, interpretation, and impact on life. *Psychooncology*, 17(8), 822–830
130. Lindor, N. M., Goldgar, D. E., Tavtigian, S. V., Plon, S. E., & Couch, F. J. (2013). *BRCA1/2* sequence variants of uncertain significance: a primer for providers to assist in discussions and in medical management. *The Oncologist*, 18(5), 518–524. doi:10.1634/theoncologist.2012-0452
131. Murray, M. L., Cerrato, F., Bennett, R. L., & Jarvik, G. P. (2011). Follow-up of carriers of *BRCA1* and *BRCA2* variants of unknown significance: variant reclassification and surgical decisions. *Genetics in Medicine*, 13(12), 998–1005. doi:10.1097/GIM.0b013e318226fc15
132. O'Neill, S. C., Rini, C., Goldsmith, R. E., Valdimarsdottir, H., Cohen, L. H., & Schwartz, M. D. (2009). Distress among women receiving uninformative *BRCA1/2* results: 12-month outcomes. *PsychoOncology*, 18(10), 1088–1096. doi:10.1002/pon.1467
133. Katsonis, P., Koire, A., Wilson, S. J., Hsu, T. K., Lua, R. C., Wilkins, A. D., & Lichtarge, O. (2014). Single nucleotide variations: biological impact and theoretical interpretation. *Protein Science*, 23(12), 1650–1666. doi:10.1002/pro.2552
134. Lindor, N. M., Guidugli, L., Wang, X., Vallee, M. P., Monteiro, A. N., Tavtigian, S., Couch, F. J. (2012). A review of a multifactorial probability-based model for classification of *BRCA1* and *BRCA2* variants of uncertain significance (VUS). *Human Mutation*, 33(1), 8–21. doi:10.1002/humu.21627

135. Moghadasi, S., Hofland, N., Wouts, J. N., Hogervorst, F. B., Wijnen, J. T., Vreeswijk, M. P., & van Asperen, C. J. (2013). Variants of uncertain significance in *BRCA1* and *BRCA2* assessment of *in silico* analysis and a proposal for communication in genetic counselling. *Journal of Medical Genetics*, 50(2), 74–79. doi:10.1136/jmedgenet-2012-100961
136. Schulz, W. L., Tormey, C. A., & Torres, R. (2015). Computational approach to annotating variants of unknown significance in clinical next generation sequencing. *Laboratoriums Medizin* 46(4), 285–289. doi:10.1309/LMWZH57BRWOPR5RQ
137. Goldgar, D.E., Easton, D.F., Byrnes, G.B., Spurdle, A.B., Iversen, E.S., & Greenblatt, M. S. (2008). Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Human Mutation*, 29(11), 1265–1272. doi:10.1002/humu.20897
138. Mohammadi, L., Vreeswijk, M. P., Oldenburg, R., van den Ouweland, A., Oosterwijk, J. C., van der Hout, A. H., van Houwelingen, H. C. (2009). A simple method for co-segregation analysis to evaluate the pathogenicity of unclassified variants; *BRCA1* and *BRCA2* as an example. *BMC Cancer*, 9(211). doi:10.1186/1471-2407-9-211
139. Eggington, J.M., Bowles, K.R., Moyes, K., Manley, S., Esterling, L., Sizemore, S., Wenstrup, R. J. (2013). A comprehensive laboratory-based program for classification of variants of uncertain significance in hereditary cancer genes. *Clinical Genetics*, 8(10), 12315
140. Shirts, B. H., Jacobson, A., Jarvik, G. P., & Browning, B. L. (2013). Large numbers of individuals are required to classify and define risk for rare variants in known cancer risk genes. *Genetics in Medicine*, 19(10), 187. doi:10.1038/gim.2013.187.
141. Rosenthal E.T., Bowles K.R., Pruss D., van Kan A., Vail P.J., McElroy H., Wenstrup R.J. (2015). Exceptions to the rule: Case studies in the prediction of pathogenicity for genetic variants in hereditary cancer genes. *Clin Genet* 2015: 88: 533–541. 2015 The Authors. *Clinical Genetics* published by John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd.
142. Tavtigian, S. V., Deffenbaugh, A. M., Yin, L., Judkins, T., Scholl, T., Samollow, P. B., Thomas, A. (2006). Comprehensive statistical study of 452 *BRCA1* missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *Journal of Medical Genetics*, 43(4), 295–305. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.033878>
143. Kumar, P., Henikoff, S., & Ng, P. C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, 4(7), 1073–1081. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>

144. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deepsequencing age. *Nat Methods*. 2014;11:361–2. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
145. Karbassi, I., Maston, G. A., Love, A., Divincenzo, C., Braastad, C. D., Elzinga, C. D., Higgins, J. J. (2016). A standardized DNA variant scoring system for pathogenicity assessments in mendelian disorders. *Human Mutation*, 37(1), 127–134. <https://doi.org/10.1002/humu.22918>
146. Moghadasi, S., Eccles, D. M., Devilee, P., Vreeswijk, M. P. G., & vanAsperen, C. J. (2016). Classification and clinical management of variants of uncertain significance in high penetrance cancer predisposition genes. *Human Mutation*, 37(4), 331–336. <https://doi.org/10.1002/humu.22956>
147. Vallée, M. P., Di Sera, T. L., Nix, D. A., Paquette, A. M., Parsons, M. T., Bell, R., Tavtigian, S. V. (2016). Adding *in silico* assessment of potential splice aberration to the integrated evaluation of BRCA gene unclassified variants. *Human Mutation*, 37(7), 627–639. <https://doi.org/10.1002/humu.22973>
148. Riera, C., Padilla, N., & de laCruz, X. (2016). The complementarity between protein-specific and general pathogenicity predictors for amino acid substitutions. *Human Mutation*, 37(10), 1013–1024. <https://doi.org/10.1002/humu.23048>
149. Santacroce R, Leccese A, Trunzo R, Lassandro G, Giordano P, Ettore C, Antoncicchi S, Cantori I, Dragani A, Belvini D, Salviato R, Margaglione M. Identification of ten novel mutations in factor VIII gene: A study of a cohort of 52 haemophilia A patients. *Thromb Res*. 2015;135(5):1031–4
150. Grimm DG, Azencott CA, Aicheler F, Gieraths U, MacArthur DG, Samocha KE, Cooper DN, Stenson PD, Daly MJ, Smoller JW, Duncan LE, Borgwardt KM. The Evaluation of Tools Used to Predict the Impact of Missense Variants Is Hindered by Two Types of Circularity. *Hum Mutat*. 2015;36(5):513–23.
151. Hicks S, Wheeler DA, Plon SE, Kimmel M. Prediction of missense mutation functionality depends on both the algorithm and sequence alignment employed. *Hum Mutat*. 2011;32(6):661–8
152. Leong IU, Stuckey A, Lai D, Skinner JR, Love DR. Assessment of the predictive accuracy of five *in silico* prediction tools, alone or in combination, and two metaservers to classify long QT syndrome gene mutations. *BMC Med Genet*. 2015;16:34

153. Luxembourg B, D'Souza M, Koerber S, Seifried E. Prediction of the pathogenicity of antithrombin sequence variations by *in silico* methods. *Thromb Res.* 2015;135(2):404–9
154. Rodrigues C, Santos-Silva A, Costa E, Bronze-da-Rocha E. Performance of *in silico* Tools for the Evaluation of *UGT1A1* Missense Variants. *Hum Mutat.* 2015;36(12):1215–25
155. Tang H, Thomas PD. Tools for Predicting the Functional Impact of Nonsynonymous Genetic Variation. *Genetics.* 2016;203(2):635–47
156. Ernst, C., Hahnen, E., Engel, C., Nothnagel, M., Weber, J., Schmutzler, R. K., & Hauke, J. (2018). Performance of *in silico* prediction tools for the classification of rare *BRCA1/2* missense variants in clinical diagnostics. *BMC Medical Genomics*, 11(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12920-018-0353-y>
157. Starita, L. M., Young, D. L., Islam, M., Kitzman, J. O., Gullingsrud, J., Hause, R. J. Fields, S. (2015). Massively parallel functional analysis of *BRCA1* RING domain variants. *Genetics*, 200(2), 413–422. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.175802>
158. Abou Tayoun AN, Pesaran T, DiStefano MT, Oza A, Rehm HL, Biesecker LG, Harrison SM; ClinGen Sequence Variant Interpretation Working Group (ClinGen SVI). Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat.* 2018 Nov;39(11):1517-1524. doi: 10.1002/humu.23626. Epub 2018 Sep 7. PMID: 30192042; PMCID:PMC6185798.