



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The genetic etiology of familial breast cancer: Assessing the role of rare genetic variation using next generation sequencing**

Hilbers, F.S.M.

### **Citation**

Hilbers, F. S. M. (2020, July 7). *The genetic etiology of familial breast cancer: Assessing the role of rare genetic variation using next generation sequencing*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/123226>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/123226>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/123226> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Hilbers, F.S.M.

**Title:** The genetic etiology of familial breast cancer: Assessing the role of rare genetic variation using next generation sequencing

**Issue Date:** 2020-07-07

## **Nederlandse samenvatting**

## Achtergrond

Wereldwijd is borstkanker de meest voorkomende vorm van kanker en meest voorkomende kanker-gerelateerde doodsoorzaak in vrouwen.<sup>1</sup> In Nederland ontwikkelt ongeveer één op acht vrouwen borstkanker gedurende haar leven.<sup>2</sup> Ondanks dat alle borsttumoren uiteindelijk ongeveer dezelfde maligne eigenschappen ontwikkelen, is er veel variatie in de onderliggende genetische, epigenetische veranderingen en de tumormicro-omgeving die hieraan ten grondslag ligt. Vanwege deze heterogeniteit worden tumoren vaak onderverdeeld in subtypes op basis van morfologie, histologie, DNA-expressie en mutatieprofielen.

De etiologie van borstkanker is complex, onder andere genetische factoren, fysieke eigenschappen, leefstijlfactoren en reproductiefactoren hebben invloed op het borstkankerrisico.<sup>3</sup> Ook familiegeschiedenis is een belangrijke risicofactor voor deze aandoening. Vrouwen met een eerstegraads familielid gediagnosticeerd met borstkanker hebben een relatief risico (RR) van ongeveer 1.8 om zelf borstkanker te ontwikkelen.<sup>4,5</sup> Meerdere familieleden met borstkanker en een lagere leeftijd ten tijde van de diagnose zijn geassocieerd met een hoger risico.<sup>4,5</sup>

De twee bekendste borstkankergenen, *BRCA1* en *BRCA2*, zijn geassocieerd met een risico om borstkanker te ontwikkelen voor de leeftijd van 70 jaar van respectievelijk 60% en 55%.<sup>6-8</sup> Naast deze twee genen zijn er nog een aantal andere hoog-risico genen bekend. *PALB2* is een relatief recent ontdekt hoog-risico gen. Vrouwen met een pathogene genetisch variant in dit gen hebben een risico van ongeveer 35% om voor de leeftijd van 70 jaar borstkanker te ontwikkelen.<sup>9,10</sup> Daarnaast zijn er nog een aantal hoog-risico genen die geassocieerd zijn met een syndroom dat gekenmerkt wordt door een verhoogd risico op diverse vormen van kanker. Dit betreft, de genen *CDH1*,<sup>11-13</sup> *PTEN*,<sup>14</sup> *STK11*<sup>15,16</sup> en *TP53*.<sup>17</sup>

Naast hoog-risico genen zijn er ook een aantal genen geassocieerd met een matig verhoogd (RR 2-3) risico op borstkanker. Voor de Nederlandse populatie is het gen *CHEK2* het belangrijkste, omdat er een founder mutatie bestaat, c.1100delC, die in de Noordwest-Europese populatie een allel frequentie in de algemene populatie heeft van ongeveer 1%.<sup>18</sup> Daarnaast zijn ook genetische varianten in *ATM*<sup>19</sup> geassocieerd met een matig verhoogd risico op borstkanker. Tenslotte zijn er ook nog meer dan 300 laag-risico (RR <1.5) varianten geassocieerd gevonden met borstkanker.<sup>20</sup> Echter verklaren al deze hoog-, matig-, en laag-risico varianten samen minder dan de helft van het familiere risico op borstkanker.

Voor families waarin een pathogene variant is gevonden in één van de bekende hoog- of matig-risico genen bestaan richtlijnen die beschrijven vanaf welke leeftijd, met welke frequentie en met welke techniek de draagsters van pathogenen variant gescreend zouden moeten worden voor borstkanker.<sup>21-23</sup> Bovendien kan onderscheid worden gemaakt tussen vrouwen die wel en niet draagster zijn van de genetisch variant geassocieerd met borstkankerrisico. Echter, in families waarin geen verklaring is gevonden voor het clusteren van borstkanker, blijft er onzekerheid bestaan over wie er een verhoogd risico heeft en in hoeverre dit risico verhoogd is. Dit maakt beslissingen met betrekking tot screening ingewikkelder.

Een relatief nieuwe techniek, "next generation sequencing" (NGS), maakt het mogelijk om in parallel miljoenen DNA-fragmenten te onderzoeken en daarmee in korte tijd grote delen van het genoom te analyseren. Deze techniek zou belangrijke mogelijkheden kunnen bieden voor het ontdekken van nieuwe borstkankergenen, omdat het de ontdekking van genetische varianten mogelijk maakt onafhankelijk van de allelfrequentie in de algemene populatie en zonder een aanname te hoeven maken over welke genetische regio's er mogelijk geassocieerd zijn met een verhoogd borstkankerrisico. Doordat deze techniek nog relatief

kostbaar is, was het voor dit onderzoek echter niet mogelijk om grote aantallen familiere borstkankerpatiënten te onderzoeken. Dit maakt dat het grote aantal genetische varianten dat gevonden wordt in deze patiënten teruggebracht moet worden tot een behapbaar aantal voor validatiestudies zonder daarbij gebruik te kunnen maken van statistische associatietesten.

Er bestaan diverse manieren om varianten te selecteren op basis van voorspelde effecten op het functioneren van het eiwit. Deze aanpak heeft echter als nadeel dat de beschikbare predictiealgoritme niet erg precies zijn. Ook het selecteren van varianten op basis van allel frequentie in de algemene populatie is niet erg effectief, aanzien het grootste deel van de gedetecteerde varianten zeldzaam is.<sup>24,25</sup> Een potentieel interessante strategie is om te focussen op genen waarin meerdere onderzochte families een potentieel pathogene variant hebben. De grote etiologische heterogeniteit in borstkanker maakt echter dat de a priori kans hierop erg klein is. Voor sommige bekende borstkankergenen, waaronder *BRCA1*, is er een associatie gevonden met specifieke borstkanker subtypes. Daarom zou het de moeite waard kunnen zijn om familiere borstkankerpatiënten te selecteren met vergelijkbare tumorkarakteristieken in de hoop zo ook een etiologisch homogeenere populatie te selecteren.

## Doel van het onderzoek

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om bij te dragen aan de kennis van de genetische etiologie van borstkanker met behulp van NGS. Het focust op families met een duidelijk clustering van borstkanker, maar waarin geen pathogene varianten in *BRCA1* of *BRCA2* zijn gevonden. Hiermee hoopt dit onderzoek nieuwe inzichten te geven in de genetische risicofactoren die verantwoordelijk zijn voor het clusteren van borstkanker in deze families.

## Resultaten

Voor het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift hebben we zes niet-*BRCA1/2* gemuteerde families geselecteerd op basis van een “array comparative genome hybridization” profiel van de tumoren.<sup>26</sup> Linkage analyse in deze families had eerder een piek laten zien op chromosoom 4, wat suggereerde dat de clustering van borstkanker in deze families verklaard zou kunnen worden door een genetische variant in deze linkage regio. Daarom werden de exomen van twee individuen per familie onderzocht met behulp van NGS. Echter, geen enkel gen had een mogelijk pathogene variant in meer dan één familie en in het algemeen werden er geen waarschijnlijke kandidaat-risicoallelen gevonden.

Ook in het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 5** hebben we geprobeerd een homogeenere groep familiere borstkankerpatiënten te selecteren, ditmaal op basis van een mogelijk recessieve overerving binnen de families. In deze families met elk minstens drie zussen met borstkanker hebben we bij één zus het exoom geanalyseerd, terwijl we bij alle aangedane zussen de haplotypes hebben bepaald met behulp van “single nucleotide polymorphisme” (SNP) arrays. Dit maakte het mogelijk om bij de analyse van de exoom resultaten te focussen op varianten in regio's waarin alle aangedane zussen twee haplotypes delen. Ook deze studie vond echter geen waarschijnlijke kandidaat-hoog-risicoallelen. Wel werden er varianten in bekende matig-risico genen gevonden in verschillende families en werd daarnaast een verhoogd aantal laagrisico-allelen gevonden in de familiere borstkankerpatiënten in vergelijking met sporadisch borstkankerpatiënten.

Het is mogelijk dat we in deze twee studies een hoogrisico-allel gemist hebben. Het zou kunnen dat we zo'n variant niet geselecteerd hebben omdat het onwaarschijnlijk leek dat het de eiwitfunctie zou beïnvloeden of dit überhaupt niet gedetecteerd hebben omdat het zich buiten de eiwitcoderende regio's bevond. Bovendien sluiten deze twee studies niet uit dat er nog additionele hoog-risico genen bestaan met een sterke associatie met een bepaald fenotype, we zouden simpelweg het verkeerde fenotype gekozen kunnen hebben. De linkage piek in **hoofdstuk 2** had slechts een LOD-score van 2.49, terwijl een score hoger dan 3.0 typisch als significant gezien wordt. De linkage van deze families met de regio op chromosoom 4 zou daarom toeval kunnen zijn. De selectie van families in **hoofdstuk 5** had weliswaar belangrijke voordelen voor de filtering van varianten. Het is echter mogelijk dat een andere selectie van families, bijvoorbeeld op basis van jonge borstkankerpatiënten zonder familiegeschiedenis, beter verrijkt zou zijn geweest voor mogelijke recessieve allelen. In de laatste jaren zijn er diverse technieken ontwikkeld die het mogelijk maken een tumor in veel meer detail te karakteriseren. Het zou een goede eerste stap voor verder onderzoek zijn om op basis van deze nieuwe technieken uit te zoeken of er fenotypes gevonden kunnen worden die clusteren in families.

In **hoofdstuk 6** van dit proefschrift worden verschillende strategieën besproken voor het filteren van met behulp van NGS gevonden genetische varianten en het vaststellen van het borstkankerrisico geassocieerd met zeer zeldzame genetische varianten. Als er geen genen zijn waarin meerdere families een zeldzame en mogelijk pathogene variant hebben, is het filteren op basis van allel frequentie in de algemene populatie en op de functionele effecten zoals voorspeld door in silico predictiealgoritme een veel gebruikte strategie. Vaak is hiermee het aantal varianten nog niet voldoende teruggebracht om validatiestudies mogelijk te maken. Daarom wordt er vaak voor gekozen te filteren op basis van de functie van de betreffende genen en daarmee, op basis van de huidige beschikbare kennis, de waarschijnlijkheid dat een gen betrokken is bij de ontwikkeling van borstkanker.

Omdat veel van de overgebleven varianten erg zeldzaam zijn, is het vaak niet zinvol om te proberen een specifieke variant te valideren in case-controlle studies. In plaats daarvan is een "burden" analyse een betere strategie. Hierbij wordt de hele eiwitcoderende regio van een gen onderzocht en het aantal mogelijk pathogene varianten vergeleken tussen (familiaire) borstkankerpatiënten en gezonde controles. Een cruciaal aspect bij deze analyse is de definitie van een "mogelijk pathogene variant". Dit kan zowel met behulp van in silico predictiealgoritmen als met behulp van functionele testen gedaan worden. Verkeerde aanname met betrekking tot de functionele effecten van genetische varianten kunnen gemakkelijk leiden tot incorrecte conclusies met betrekking tot het borstkankerrisico geassocieerd met varianten in een specifiek gen.

**Hoofdstuk 3** en **4** geven een goed voorbeeld van hoe ingewikkeld het kan zijn om het risico geassocieerd met zeer zeldzame varianten in een gen, in dit geval *XRCC2*, vast te stellen. Een mogelijke associatie tussen *XRCC2* en borstkanker werd als eerste gepubliceerd door Park et al.<sup>27</sup> **Hoofdstuk 3** van dit proefschrift beschrijft een studie waarin wij geprobeerd hebben, in een grote internationale case-controlle studie, deze associatie te valideren. Voor de burden analyse in deze studie is gebruik gemaakt van verschillende in silico predictiealgoritmen, op basis daarvan kon echter geen associatie met borstkanker vastgesteld worden. Het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 4** van dit proefschrift heeft vervolgens met behulp van drie verschillende functionele testen vastgesteld dat de meeste gevonden varianten in *XRCC2* nauwelijks effect hebben op eiwitfunctie. Voor de varianten die wel een effect op eiwitfunctie hadden, werd geen associatie met borstkanker gevonden,

al kon voor de varianten met het sterkste functionele effect een associatie niet uitgesloten worden door de extreme zeldzaamheid van deze varianten.

Ook andere studies die gebruik maakten van NGS om nieuwe borstkankergenen te vinden hebben relatief weinig succes gehad. De meer dan 30 gepubliceerde exoom sequencing studies hebben wel een aantal mogelijke nieuwe borstkankergenen gesuggereerd, waaronder *KAT6B*,<sup>28</sup> *RINT1*,<sup>29</sup> *APOBEC3B*<sup>30</sup>, *XRCC2*<sup>27</sup> en *RCC1*.<sup>31</sup> Externe validatie van deze genen heeft echter nog niet plaatsgevonden of heeft geresulteerd in tegenstrijdige resultaten. Er zijn maar twee nieuwe genen gevonden waarbij de associatie met borstkanker ook in diverse andere studiepopulaties is gevalideerd: *FANCM*<sup>32,33</sup> en *RECQ*.<sup>34,35</sup>

In **hoofdstuk 5** hebben we naast de zoektocht naar een mogelijk recessief gen, ook de mogelijkheid verkend dat deze families verklaard worden door bekende risicogenen of polymorfismen. We hebben laten zien dat de familiare borstkankerpatiënten gemiddeld meer laagrisico-allelen hebben dan borstkankerpatiënten uit de algemene populatie. Daarnaast waren borstkankerpatiënten uit twee van deze families draagster van de bekende matig-risico variant *CHEK2*\*11000delC. In een andere studie, die geen deel uitmaakt van dit proefschrift, hebben we laten zien dat ook familiare borstkankerpatiënten die niet geselecteerd zijn voor een mogelijk recessieve overerving gemiddeld meer laagrisico-allelen bij zich dragen dan borstkankerpatiënten uit de algemene populatie.<sup>36</sup> Diverse andere exoom sequencing studies in non-*BRCA1/2* families hebben ook varianten gevonden in bekende risico genen zoals *ATM*,<sup>37-42</sup> *CHEK2*<sup>39,42-45</sup> en *PALB2*.<sup>37,39,42,45,46</sup> Dit bevestigt dat een substantieel deel van de onverklaarde familiare clustering van borstkanker waarschijnlijk verklaard wordt door een combinatie van matig en laag risico genen.

Een aantal studies heeft geprobeerd een zogenaamde “polygene risico score” (PRS) te berekenen op basis van een combinatie van bekende laag-risico varianten. De meest recente studie gebruikte hiervoor 313 verschillende genetische varianten.<sup>20</sup> Daarnaast zijn er modellen die zowel genetische als niet genetische risicofactoren meewegen. Het meest geavanceerde model is op dit moment de laatste versie van het BOADICEA model waarbij mutaties in *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2* en *PALB2*, 313 laag risico SNPS en diverse niet-genetische risicofactoren worden gebruikt in de berekening van borstkankerrisico.<sup>47</sup>

## Conclusie

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft geen nieuwe borstkankergenen kunnen identificeren. Ondanks dat er waarschijnlijk nog verscheidene extreem zeldzame hoogrisico-allelen te ontdekken zijn en er mogelijk genetische varianten buiten de eiwit-coderende regio's geassocieerd zijn met een sterk verhoogd risico op borstkanker, lijkt het onwaarschijnlijk dat deze varianten een substantieel deel van de familiare borstkanker kunnen verklaren. Zowel het onderzoek beschreven in dit proefschrift als werk van anderen suggereert dat een groot deel van de onverklaarde familiare clustering van borstkanker verklaard wordt door een combinatie van genetische varianten geassocieerd met een laag of middelmatig verhoogd risico op borstkanker.

Zoals verwacht was de grootste uitdaging bij het gebruik van NGS in familiare borstkanker de detectie van een groot aantal genetische varianten in relatief klein aantal familiare borstkankerpatiënten, waardoor het gebruik van statistische testen voor associatie niet zinvol is in de selectie van mogelijk interessante varianten. Hierdoor zal een aannemelijke strategie voor het ontdekken van nieuwe borstkankergenen alleen realiteit worden wanneer we in staat zijn studies te doen die voldoende groot zijn om tenminste op geniveau exoom-brede associatie analyses uit te kunnen voeren.

Het selecteren van een fenotypisch homogenere groep familiere borstkankerpatiënten in de hoop te selecteren voor homogenere etiologie, heeft niet geresulteerd in het ontdekken van mogelijke nieuwe risico-allelen in meer dan één familie. Echter, aangezien er nu meer geavanceerde technieken beschikbaar zijn voor het fenotypen van tumoren, kan onderzocht worden of er mogelijk toch nog waarde in deze strategie zit voor toekomstige pogingen tot het ontdekken van nieuw hoogrisico-allelen.

Onze ervaring in het valideren van *XRRC2* als een borstkankergen heeft ons er wederom geleerd dat *in silico* predictiealgoritmen van beperkte waarde zijn voor het classificeren van genetische variatie. De misclassificatie van varianten kan leiden tot misleidende resultaten in burden analyses en incorrecte conclusies over de associatie van een gen met borstkankerrisico. Hoewel functionele testen belangrijke inzichten kunnen geven in het effect van genetische varianten op het functioneren van een eiwit, is het opzetten en uitvoeren van deze testen vaak tijdrovend. Hierdoor is dit vaak alleen de moeite waard voor de meest waarschijnlijke kandidaatgenen.

Deze bevindingen tezamen leiden tot de conclusie dat als we de risicovoorspelling voor vrouwen in onverklaarde borstkankerfamilies en voor vrouwen in de algemene populatie willen verbeteren, we verder moeten focussen op het ontwikkelen en valideren van risicomodellen die alle bekende risico-allelen combineren met niet-genetische risicofactoren. Na het valideren van deze modellen, zouden we gebruik kunnen maken van deep learning technieken om deze modellen verder te verbeteren en nieuwe risicofactoren te identificeren.

Dit vooruitzicht zou ertoe kunnen leiden dat de tweedeling tussen sporadische en familiere borstkanker met betrekking tot genetische risicofactoren verdwijnt. Dit zou een aanpassing vergen in zowel het perspectief van het onderzoek naar borstkankerrisico als voor de werkwijze en benadering voor moleculair pathologisch en klinisch genetisch onderzoek.

## Referenties

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
2. IKNL. Cijfers over kanker, Nederlandse Kankerregistratie. <http://www.cijfersoverkanker.nl/>. Accessed July 23, 2017.
3. Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*. 2005;9(1):208-221.
4. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 1997;71(5):800-809.
5. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001;358(9291):1389-1399. doi:10.1016/S0140-6736(01)06524-2
6. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol*. 2007;25(11):1329-1333. doi:10.1200/JCO.2006.09.1066
7. Mavaddat N, Peock S, Frost D, et al. Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(11):812-822. doi:10.1093/jnci/djt095
8. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017;317(23):2402-2416. doi:10.1001/jama.2017.7112
9. Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is



- a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet.* 2007;39(2):165-167. doi:10.1038/ng1959
10. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med.* 2014;371(6):497-506. doi:10.1056/NEJMoa1400382
  11. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature.* 1998;392(6674):402-405. doi:10.1038/32918
  12. Keller G, Vogelsang H, Becker I, et al. Diffuse type gastric and lobular breast carcinoma in a familial gastric cancer patient with an E-cadherin germline mutation. *Am J Pathol.* 1999;155(2):337-342. doi:10.1016/S0002-9440(10)65129-2
  13. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology.* 2001;121(6):1348-1353.
  14. Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, et al. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet.* 1997;6(8):1383-1387.
  15. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature.* 1998;391(6663):184-187. doi:10.1038/34432
  16. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet.* 1998;18(1):38-43. doi:10.1038/ng0198-38
  17. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 1990;250(4985):1233-1238.
  18. Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet.* 2002;31(1):55-59. doi:10.1038/ng879
  19. Renwick A, Thompson D, Seal S, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet.* 2006;38(8):873-875. doi:10.1038/ng1837
  20. Mavaddat N, Michailidou K, Dennis J, et al. Polygenic Risk Scores for Prediction of Breast Cancer and Breast Cancer Subtypes. *Am J Hum Genet.* 2019;104(1):21-34. doi:10.1016/j.ajhg.2018.11.002
  21. STOET. Erfelijke En Familiaire Tumoren: Richtlijnen Voor Diagnostiek En Preventie.; 2017. [https://www.stoet.nl/wp-content/uploads/2017/04/STOET-Richtlijnenboekje-april2017\\_DEF.pdf](https://www.stoet.nl/wp-content/uploads/2017/04/STOET-Richtlijnenboekje-april2017_DEF.pdf).
  22. STOET, VKGN. Landelijke Richtlijn Familiaal Mamma/Ovariumcarcinoom.; 2010. <http://www.oncoline.nl/familiaal-mamma-ovariumcarcinoom>.
  23. NABON. Landelijke Richtlijn Mammacarcinoom.; 2017. <http://www.oncoline.nl/mammacarcinoom>.
  24. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285-291. doi:10.1038/nature19057
  25. Keinan A, Clark AG. Recent explosive human population growth has resulted in an excess of rare genetic variants. *Science.* 2012;336(6082):740-743. doi:10.1126/science.1217283
  26. Didraga MA, van Beers EH, Joesse SA, et al. A non-BRCA1/2 hereditary breast cancer subgroup defined by aCGH profiling of genetically related patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(2):425-436. doi:10.1007/s10549-011-1357-x
  27. Park DJ, Lesueur F, Nguyen-Dumont T, et al. Rare mutations in XRCC2 increase the risk of breast cancer. *Am J Hum Genet.* 2012;90(4):734-739. doi:10.1016/j.ajhg.2012.02.027
  28. Lynch H, Wen H, Kim YC, et al. Can unknown predisposition in familial breast cancer be family-specific? *Breast J.* 2013;19(5):520-528. doi:10.1111/tbj.12145
  29. Park DJ, Tao K, Le Calvez-Kelm F, et al. Rare mutations in RINT1 predispose carriers to breast and Lynch syndrome-spectrum cancers. *Cancer Discov.* 2014;4(7):804-815. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0212
  30. Radmanesh H, Spethmann T, Enssen J, et al. Assessment of an APOBEC3B truncating mutation, c.783delG, in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;162(1):31-37. doi:10.1007/s10549-016-4100-9
  31. Riahi A, Radmanesh H, Schurmann P, et al. Exome sequencing and case-control

- analyses identify RCC1 as a candidate breast cancer susceptibility gene. *Int J Cancer*. 2018;142(12):2512-2517. doi:10.1002/ijc.31273
32. Kiiski JI, Pelttari LM, Khan S, et al. Exome sequencing identifies FANCM as a susceptibility gene for triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(42):15172-15177. doi:10.1073/pnas.1407909111
  33. Peterlongo P, Catucci I, Colombo M, et al. FANCM c.5791C>T nonsense mutation (rs144567652) induces exon skipping, affects DNA repair activity and is a familial breast cancer risk factor. *Hum Mol Genet*. 2015;24(18):5345-5355. doi:10.1093/hmg/ddv251
  34. Cybulski C, Carrot-Zhang J, Kluźniak W, et al. Germline RECQL mutations are associated with breast cancer susceptibility. *Nat Genet*. 2015;47(6):643-646. doi:10.1038/ng.3284
  35. Sun J, Wang Y, Xia Y, et al. Mutations in RECQL Gene Are Associated with Predisposition to Breast Cancer. *PLoS Genet*. 2015;11(5):e1005228. doi:10.1371/journal.pgen.1005228
  36. Lakeman IMM, Hilbers FS, Rodriguez-Girondo M, et al. Addition of a 161-SNP polygenic risk score to family history-based risk prediction: impact on clinical management in non-BRCA1/2 breast cancer families. *J Med Genet*. 2019;56(9):581-589. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106072
  37. Cybulski C, Lubiński J, Wokołarczyk D, et al. Mutations predisposing to breast cancer in 12 candidate genes in breast cancer patients from Poland. *Clin Genet*. 2015;88(4):366-370. doi:10.1111/cge.12524
  38. Määttä K, Rantapero T, Lindström A, et al. Whole-exome sequencing of Finnish hereditary breast cancer families. *Eur J Hum Genet*. 2016;25(1):85-93. doi:10.1038/ejhg.2016.141
  39. Maxwell KN, Hart SN, Vijai J, et al. Evaluation of ACMG-Guideline-Based Variant Classification of Cancer Susceptibility and Non-Cancer-Associated Genes in Families Affected by Breast Cancer. *Am J Hum Genet*. 2016;98(5):801-817. doi:10.1016/j.ajhg.2016.02.024
  40. Tavera-Tapia A, Pérez-Cabornero L, Macías JA, et al. Almost 2% of Spanish breast cancer families are associated to germline pathogenic mutations in the ATM gene. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;161(3):597-604. doi:10.1007/s10549-016-4058-7
  41. Guo X, Lin W, Bai M, et al. Discovery of a Pathogenic Variant rs139379666 (p. P2974L) in ATM for Breast Cancer Risk in Chinese Populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(8):1308-1315. doi:10.1158/1055-9965.EPI-18-1294
  42. Lu H-M, Li S, Black MH, et al. Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. *JAMA Oncol*. August 2018. doi:10.1001/jamaoncol.2018.2956
  43. Snape K, Ruark E, Tarpey P, et al. Predisposition gene identification in common cancers by exome sequencing: insights from familial breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;134(1):429-433. doi:10.1007/s10549-012-2057-x
  44. Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, et al. Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e55681. doi:10.1371/journal.pone.0055681
  45. Shahi RB, De Brakeleer S, Caljon B, et al. Identification of candidate cancer predisposing variants by performing whole-exome sequencing on index patients from BRCA1 and BRCA2-negative breast cancer families. *BMC Cancer*. 2019;19(1):313. doi:10.1186/s12885-019-5494-7
  46. Silvestri V, Zelli V, Valentini V, et al. Whole-exome sequencing and targeted gene sequencing provide insights into the role of PALB2 as a male breast cancer susceptibility gene. *Cancer*. 2017;123(2):210-218. doi:10.1002/cncr.30337
  47. Lee A, Mavaddat N, Wilcox AN, et al. BOADICEA: a comprehensive breast cancer risk prediction model incorporating genetic and nongenetic risk factors. *Genet Med*. 2019;21(8):1708-1718. doi:10.1038/s41436-018-0406-9



