

## VÝSKYT A VÝZNAM MUTACE *CHEK2*\*1100DEL C U PACIENTEK S KARCINOMEM PRSU A V KONTROLNÍ SKUPINĚ ZDRAVÝCH ŽEN V ČESKÉ REPUBLICE

## THE INCIDENCE AND RELEVANCE OF THE *CHEK2*\*1100DEL C MUTATION IN BREAST CANCER PATIENTS AND IN HEALTHY WOMEN IN THE CZECH REPUBLIC

KLEIBL Z.<sup>1</sup>, NOVOTNÝ J.<sup>2</sup>, MALÍK R.<sup>2</sup>, BEZDÍČKOVÁ D.<sup>3</sup>, KLEIBLOVÁ P.<sup>4</sup>, FORETOVÁ L.<sup>5</sup>, KRUTÍLKOVÁ V.<sup>6</sup>, ČÍNEK M.<sup>7</sup>, ILENČÍKOVÁ D.<sup>8</sup>, PETRUŽELKA L.<sup>2</sup>, MATOŮŠ B.<sup>1</sup>, POHLREICH P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ÚSTAV BIOCHEMIE A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE 1. LF UK

<sup>2</sup> ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A 1. LF UK

<sup>3</sup> ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY VFN A 1. LF UK

<sup>4</sup> GYNEKOLOGICKO-PORODNICKÁ KLINIKA VFN A 1. LF UK

<sup>5</sup> ODDĚLENÍ EPIDEMIOLOGIE A GENETIKY NÁDORŮ, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

<sup>6</sup> ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY, 2. LF UK V PRAZE

<sup>7</sup> ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE V PRAZE

<sup>8</sup> NÁRODNÍ ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRATISLAVA 8

**Souhrn: Východisko:** Karcinom prsu je dlouhodobě nejčastějším maligním nádorovým onemocněním v populaci žen v ČR. Přibližně 5 – 10% nádorů vzniká na podkladě zárodečných mutací v predispozičních genech. Kromě majoritních predispozičních genů je v poslední době studována i úloha tzv. genů s nízkou penetrancí, mezi které patří i gen *CHEK2* (checkpoint kináse 2). V nedávné době byl popsán podíl mutací v genu *CHEK2* na vzniku hereditárních nádorových onemocnění, včetně karcinomu prsu. **Metody:** Provedli jsme detekci patogenní mutace c. *CHEK2* 1100delC u 1 776 osob zahrnujících 688 pacientek s karcinodem prsu, 358 osob vyšetřovaných v rámci screeningu mutací v genech *BRCA1/BRCA2* a 730 osob bez nádorového onemocnění v kontrolním souboru. Identifikace mutací byla prováděna s využitím DHPLC analýzy PCR amplifikátu zahrnujícího exon 10 genu *CHEK2*. Nalezené mutace byly ověřeny sekvenováním. **Výsledky:** V souboru jsme identifikovali celkem 6 nosičů mutací: 3 v souboru pacientek s karcinodem prsu, jednoho muže s karcinodem prsu ze souboru osob vyšetřovaných na přítomnost mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* a 2 osoby v kontrolním souboru. **Závěry:** Četnost nosičství mutace c.1100delC v České populaci je nízká. Klinická využitelnost takového vyšetření je tedy u pacientek s karcinodem prsu sporná.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, *CHEK2*, dědičná dispozice, zárodečná mutace

**Summary: Backgrounds:** Breast cancer belongs to the most serious malignant diseases in the female population in the Czech Republic. It is assumed that inherited mutations contribute to the development of 5-10% of cancers. In recent years, the role of mutations of the low penetrance genes is studied intensively. One of them is checkpoint kinase 2 (*CHEK2*). Mutations in this gene were shown to predispose to the development of several inherited cancer syndromes, including breast cancer. **Study design:** We have performed mutation analysis of pathogenic *CHEK2* allele c1100delC in 1776 subjects including 688 breast cancer patients, 358 patients screened for mutations in major predisposing genes and 730 non cancer controls. Mutation analysis was based on DHPLC prescreening, mutations were confirmed by sequencing. **Results:** We have found 6 mutation carriers: 3 in sporadic breast cancer patients' cohort, one male breast cancer patient in hereditary breast cancer patients' cohort and 2 among 730 controls. **Conclusion:** Based on our data, we can speculate that Czech Republic belongs to the countries with low occurrence of *CHEK2* c1100delC allele, which limits clinical utilization of *CHEK2* genetic analysis.

**Key words:** breast cancer, *CHEK2*, hereditary disposition, germline mutation

### Úvod

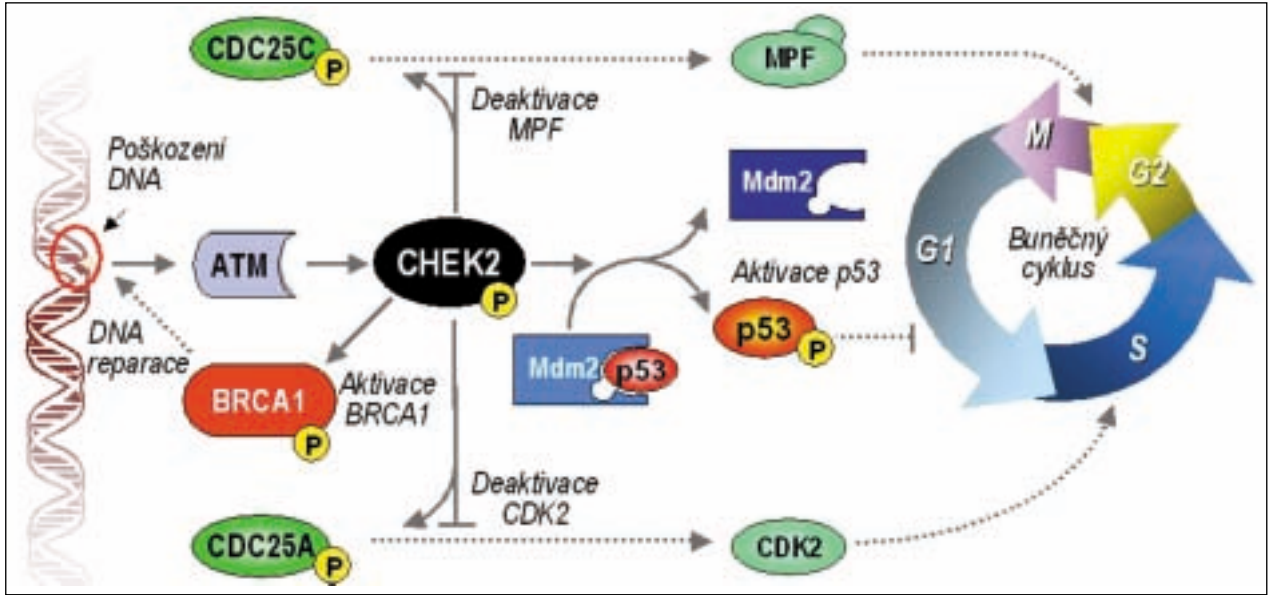
Karcinom prsu je v naší republice závažným onemocněním. Díky vysokému celoživotnímu riziku onemocní karcinodem prsu téměř každá dvanáctá žena. Z těchto důvodů je nezbytné, aby bylo vynaloženo adekvátní úsilí nejen pro hledání nových metod časné diagnostiky, ale také postupů, které by umožňovaly selekci osob se zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění. Následně tak mohou být predisponovaní jedinci zařazeni do racionálních screeningových či intervenčních preventivních programů.

Nádorová onemocnění jsou způsobena poruchami DNA postihujícími geny ovládající homeostázu buněčných populací.

Ačkoliv se ve valné většině případů jedná o polygenní onemocnění s kumulací genomových defektů v průběhu života nemocného, může být jejich vznik významně urychlen genetickými aberacemi tumor supresorových genů. Doposud byly popsány vrozené mutace několika tumor supresorových genů - *BRCA1* (OMIM 113705), *BRCA2* (OMIM 600185), *p53* (OMIM 191170), *ATM* (OMIM 191170), *PTEN* (OMIM 601728) – které způsobují dědičné nádorové syndromy v postižených rodinách s častým výskytem karcinomu prsu. Nosičství mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* tvoří kolem 90% všech případů z doposud definovaných hereditárních predispozic ke vzniku karcinomu prsu a je zodpovědná za 5 - 10% případů

Obr. 1.: Schéma aktivace CHEK2 v důsledku genotoxického poškození a proteiny regulované aktivovanou molekulou CHEK2.

Po genotoxickém poškození je protein kináza CHEK2 aktivována fosforylací zprostředkovanou proteinem ATM. Aktivovaná molekula CHEK2 přímo fosforyluje protein p53 na místě serinu 20. Tato modifikace má za následek přerušení zpětnově vazebné autoregulační smyčky degradace p53 indukované ubiquitin-ligázovou aktivitou mdm2. Aktivace a následná kumulace p53 indukuje syntézu řady proteinů s negativní regulační funkcí na buněčný cyklus (inhibitory komplexů cyklínů a CDKs) a indukcii apoptózy. Fosforylace fosfatázy CDC25c na serinu v pozici 216 vede k její inaktivaci, která znemožňuje plnou aktivaci komplexu MPF (mitosis promoting factor) a tím přechod buňky z S2 fáze do vlastní mitózy. Další fosfatázou, která je cílem CHEK2 je CDC25A. Inaktivací tohoto enzymu fosforylací serinu 123 se CHEK2 podílí na zástavě buněčného cyklu v S-fázi cestou inaktivace cdk2. Po poškození genomové DNA fosforyluje CHEK2 protein BRCA1 na místě serinu 988. V nedávné době byl rovněž popsán kooperativní podíl aktivace CHEK2 a BRCA1 a následně zástavy buněčného cyklu bez účasti proteinu p53.



vzniku karcinomu prsu v celé populaci<sup>1)</sup>. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací v těchto – tzv. hlavních predispozičních genech – vzrůstá na 60 – 90%. Odhaduje se, že na vzniku dalších 10-15% mamárních karcinomů se podílejí dědičné mutace v dalších, doposud nejednoznačně definovaných genech. Mezi ně patří i tzv. geny s nízkou penetrancí. Mutace v genech s nízkou penetrancí zvyšují celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu u nosičů výrazně méně, než je tomu u hlavních predispozičních genů (obvykle do dvojnásobku RR)<sup>2)</sup>. Ke vzniku maligního nádoru u jejich nosičů je nezbytná inaktivace dalších, opět nejednoznačně definovaných, genů.

Jedním z intenzivně studovaných genů s nízkou penetrancí je CHEK2 (checkpoint kinase 2, OMIM 604373) - protein kináza aktivovaná v odpovědi na poškození genomové DNA. Svou aktivitou se podílí na zástavě buněčného cyklu v kontrolních bodech (především na zástavě přechodu z G2 do M fáze) a indukcii apoptózy<sup>3)</sup>. Při vzniku dvouřetězcových zlomů genomové DNA (například ionizujícím zářením) je molekula CHEK2 fosforylována proteinem ATM. Aktivovaný protein CHEK2 následně fosforyluje několik substrátů, mezi které patří i protein p53 (obr. 1.). V genu CHEK2 bylo doposud popsáno několik inaktivujících mutací v souvislosti se vznikem jak sporadických maligních nádorů (karcinom prsu, kolorekta, prostaty, štítné žlázy, osteosarkom), tak i hereditárních nádorových syndromů (Li-Fraumeni syndrom). Delece cytosinu v pozici 1100 od začátku iniciačního kodonu mRNA genu CHEK2 (alela CHEK2\*1100delC), která způsobuje inaktivaci proteinu CHEK2 díky zkrácení proteinového produktu v místě kinázové domény, je nejstudovanější mutací s jasně prokázaným vztahem k řadě karcinomů<sup>4)</sup>. Na základě rozsáhlých populačních studií v různých zemích je tato mutace uváděna v souvislosti se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (RR = 2) a výskytu HBCC syndromu - rodinného výskytu karcinomu prsu a kolorekta<sup>5,6)</sup>. V nedávné době byla popsána i další mutace I157T zasahující FHA (fork head associated) doménu proteinu, která se rovněž vyskytuje signifikantně častěji u pacientek s karcinomem prsu<sup>7)</sup>.

## Cíl studie

Rozhodli jsme se provést testování četnosti alely CHEK2\*1100delC u neselektované populace pacientek s karcinomem prsu, v populaci pacientů splňujících kritéria k testování na přítomnost mutací v hlavních predispozičních genech pro vznik karcinomu prsu<sup>8,9)</sup>, a v kontrolní populaci bez přítomnosti nádorového onemocnění.

## Metody

Pacientkám zařazeným do studie bylo, po podpisu informovaného souhlasu schváleného etickou komisí, odebráno 5 ml nesrážlivé žilní krve. Genomová DNA byla izolována pomocí JetStar 96 blood kitu (Genomed, Löhne, BRD) dle protokolu výrobce. Sekvence vysoce homologní CHEK2 genu (především exonům 10-14) se nacházejí v různých oblastech genomu (chromosomy 5, 7, 10, 15, 16, 22 a X). Proto byla oblast, zahrnující exon 10 genu CHEK2, amplifikována pomocí nested PCR na základě publikovaných postupů<sup>10,11)</sup>. První amplifikace (1284 bp) byla provedena s použitím 50 – 150 ng genomové DNA, 0,4 U DynaZyme II polymerázy (Finnzymes, Turku, FI), 0,2 µl 50xdNTP's (Invitex, Berlin, BRL) 1,0 µl 10x DynaZyme II PCR buffer (Finnzymes), 0,3 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub> a 0,6 pmol primerů (CHEK04: 5'-GGAGGTGATTAGATGAAGTCA-CAAAT-3' a 5'-CHEK07: AGTCTCTTCTTGAGATGACAG-3'; Generi Biotech, Hradec Králové). Z této PCR byl amplifikován amplicon o délce 247bp za použití 0,1 µl prvního PCR produktu, 0,5 U GoldTaq DNA polymerázy (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,5 µl 50xdNTP's (Invitex, Berlin, BRL) 2,5 µl 10x GoldTaq PCR bufferu (Applied Biosystems), 0,75 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub> a 3pmol primerů (CHEK05: 5'-TGGCAAGTTCAACATTATTTCCC-3' a 5'-CHEK06: GAATAACTCCTAACTCCAGC-3'; Generi Biotech). Vážený PCR produkt byl analyzován pomocí denaturační vysokotučinné kapalinové chromatografie (DHPLC) v systému WAVE (Transgenomic, Omaha, NE) na DNASep koloně s gradientem acetonitrilu. Vzorky s aberantním elučním profilem na DHPLC byly charakterizovány sekvenováním (BigDye Terminator ver. 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA) na

sekvenátoru ABI310 (Applied Biosystems) z nezávisle amplifikovaného vzorku *de novo* izolované DNA pacienta.

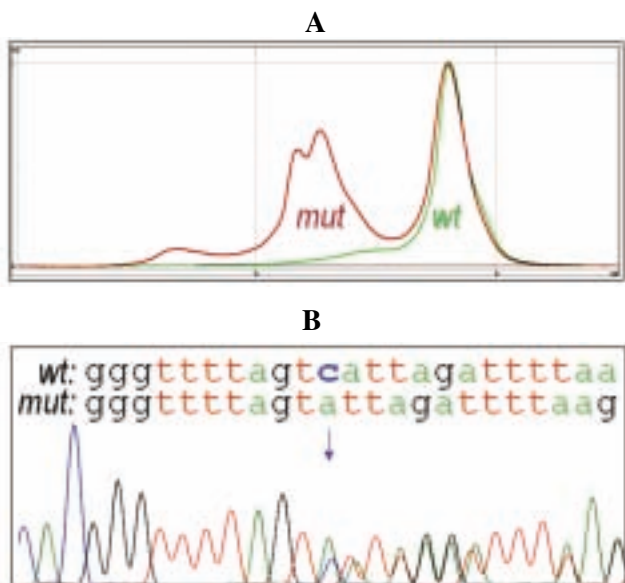
## Výsledky

Celkem byl analyzován genetický materiál od 688 patientek s karcinomem prsu, 358 pacientů(ek) testovaných na přítomnost mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* z důvodů hereditárního nebo časného výskytu (<35 let věku) karcinomu prsu či případů karcinomu prsu u muže (6 osob) a 730 kontrol – osob bez známek nádorového onemocnění.

Na základě vyšetření 1046 pacientů s hereditárním i sporadickým karcinomem prsu a 730 osob kontrolního souboru jsme našli 6 nosičů mutací. Ve skupině 688 patientek se sporadickým výskytem karcinomu prsu byly nalezeny 3 ženy s mutací *CHEK2*\*1100delC (0,44%; obr. 2). Jeden výskyt sledované alely byl nalezen ve vzorcích 358 pacientů(-tek) s karcinomem prsu (0,28%) z rodin splňujících kritéria testování na přítomnost mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. V tomto případě se jednalo o pacienta s karcinomem prsu u muže. Relevantní klinicko-patologické charakteristiky nemocných nosičů studované mutace jsou uvedeny v tabulce 1. V kontrolním souboru bylo vyšetřeno 730 vzorků a byly zaznamenány dvě analyzované mutace (0,27%). Naše výsledky ukazují, že četnost výskytu mutace *CHEK2*\*1100delC je v naší republice nízká. Díky tomu je obtížné relevantní statistické zpracování. Četnost výskytu studované alely se ve skupině osob s dědič-

Obr. 2.: Mutační analýza *CHEK2*.

A. Eluční profil zdravé (wt) a mutované (mut) alely 1100delC na DHPLC. B. Výsledek sekvenční reakce alely s deletovaným cytosinem v pozici 1100 (šipka) způsobující posun čtecího rámce.



Tab. 1: Klinické a histopatologické charakteristiky pacientů s karcinomem prsu a mutací *CHEK2*\*1100delC.

Pacient	Pohl.	Věk při dg.	Charakteristiky nádoru		Sekundární malignita	Maligní onemocnění v rodině (Věk při dg)
			Histologický typ	TNM: Grade		
A59	Ž	40	Invasivní ductální	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> GIII	0	M: Karcinom děložního čípku (Úmrtí v 48 letech)
A86	Ž	50	Invasivní ductální ER+	T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub> GIII	0	O: Karcinom plic (55)
A383	Ž	43	Invasivní ductální ER+, PR+	T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	0	Negativní
322	M	60	Invasivní ductální ER+, PR+	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub> Gx	NHL	M: Karcinom jater (73) B: Karcinom GIT (62)

Zkratky: ER – estrogenní receptor; PR – progesteronový receptor; NHL – Non-Hodgkinský lymfom; O - otec; M – matka; B – bratr

Tab. 2: Četnost mutace *CHEK2*\*1100delC u pacientů s karcinomem prsu a v kontrolní nenádorové populaci v různých státech.

Populace	Pacienti s karcinomem prsu		Kontroly		Literatura
	Celkem	1100delC (%)	Celkem	1100delC (%)	
Nizozemí*	2851	102 (3.58)	909	9 (0.99)	20)
Finsko*	1489	34 (2.28)	2332	31 (1.33)	20)
Velká Británie*	3450	42 (1.21)	4037	21 (0.52)	20)
Německo	516	8 (1.55)	1315	6 (0.46)	13)
USA	300	3 (1.00)	1665	5 (0.30)	11)
Izrael	219	1 (0.46)	146	0	18)
Česká republika	1046	4 (0.38)	730	2 (0.27)	naše údaje
Polsko	N.S.	-	1921	4 (0.21)	5)
Austrálie	1474	10 (0.68)	736	1 (0.14)	20)
Itálie	939	1 (0.11)	334	0	15)
Španělsko	456	0	400	0	14)

\* sdružené údaje

ným charakterem onemocnění nebo jeho časným nástupem liší pouze o 0,1% od četnosti zaznamenané v kontrolním souboru (hodnota  $p = 0,9999$ ; Fisherův exaktní test).

## Diskuse

Od roku 2002 bylo provedeno testování několika rozsáhlých souborů pacientů s hereditárními i sporadickými nádory na přítomnost mutace *CHEK2*\*1100delC (tab. 2.). Z výsledků těchto šetření vyplývá, že gen *CHEK2* patří mezi geny s nízkou penetrancí a specificky delece C v místě 1100 může modifikovat riziko vzniku některých nádorů. Výsledky jsou však celosvětově poměrně heterogenní. Zatímco výsledky populačních studií ze severní Evropy nacházejí poměrně vysoké četnosti výskytu studované alely (Meijers-Heijbroer a kol zaznamenali až 5,1% výskyt alely u osob z rodin testovaných na přítomnost mutací v genech *BRCA1/2*)<sup>12</sup>, výrazně nižší jsou zaznamenané nálezy z oblastí středoevropských a USA<sup>13,11</sup>). V zemích středomořské oblasti Evropy je výskyt *CHEK2*\*1100delC velmi raritní<sup>14,15</sup>). Rozporuplné výsledky se týkají i rizika vzniku karcinomu prsu u mužů – nosičů studované alely. První výsledky poukazyvaly na 10-násobné zvýšení rizika vzniku tohoto onemocnění u nosičů mutací<sup>12</sup>). Tento nález však nebyl dále potvrzen, a lze tedy předpokládat, že ačkoliv je riziko vzniku karcinomu prsu u mužů – nosičů zvýšené, nedosahuje původně uvedených hodnot<sup>16,17,18</sup>). Znalost mutačního stavu genu *CHEK2* může být přínosná pro plánování léčebného postupu u žen s rakovinou prsu, neboť v nedávno publikované práci bylo popsáno 2,5násobné zvýšení rizika metachronního kontralaterálního karcinomu prsu u žen, které podstoupily v rámci léčby prvního nádoru radioterapii<sup>19</sup>). Díky nízké četnosti studované mutace nebyl v našem souboru zaznamenán ani jeden případ výskytu bilaterálního karcinomu.

## Závěr

Výskyt mutace *CHEK2*\*1100delC je v České republice nízký. Ačkoliv četnost nálezů mutace v populaci pacientů s karcinomem prsu je vyšší, je pravděpodobné, že nosiči mutace představují méně než 0,5% všech nemocných s karcinomem prsu. Vzhledem k mírně zvýšenému riziku vzniku onemocnění a nízké penetranci alely nelze doporučit samotné vyšetření mutace *CHEK2*\*1100delC jako predispozičního znaku pro vznik karcinomu prsu. Vzhledem k rychlosti stanovení a jeho relativní jednoduchosti ve srovnání s analýzami hlavních predispozičních genů, by bylo možné uvažovat o zařazení tohoto vyšetření do bloku analýz genů *BRCA1/2*. Získání dalších výsledků by umožnilo relevantní statistické zpracování četnosti výskytu i stanovení rizika v české populaci. Hodnocení

vztahu studované alely ke vzniku dalších onemocnění, především karcinomu kolorekta je v současnosti předmětem naší další práce.

## Podpora

Projekt byl podpořen finančními prostředky z nadace Běhu Terryho Foxe a výzkumným záměrem I. LF UK # 111100004.

## Seznam zkratk

*ATM* – ataxia telangiectasia mutated; *HBCC* – hereditary breast and colorectal cancer syndrome; *BRCA1* – breast cancer gene 1; *BRCA2* – breast cancer gene 2; *FHA* – fork head associated; *CHEK2* – checkpoint kinase 2; *PCR* – polymerázová řetězová reakce; *DHPLC* – denaturační vysokoučinná kapalinová chromatografie; *PTEN* – phosphatase and tensin homolog

## Literatura

1. Thull D.L., Vogel V.G.: Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist* 9, 2004, 13-24
2. Weber B.L., Nathanson K.L.: Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *Eur J Cancer* 36, 2000, 1193-1199
3. Bartek J., Lukas J.: Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 2003, 421-429
4. Schutte M., Seal S., Barfoot R. et al.: Variants in *CHEK2* other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *Am J Hum Genet* 72, 2003, 1023-1028
5. Cybulski C., Huzarski T., Gorski B. et al.: A novel founder *CHEK2* mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 64, 2004, 2677-2679
6. Meijers-Heijboer H., Wijnen J., Vasen H. et al.: The *CHEK2* 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet* 72, 2003, 1308-1314
7. Kilpivaara O., Vahteristo P., Falck J. et al.: *CHEK2* variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer* 111, 2004, 543-547
8. Pohlreich P., Stribrna J., Kleibl Z. et al.: Mutations of the *BRCA1* gene in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic. *Med Princ Pract* 12, 2003, 23-29
9. Foretova L., Machackova E., Navratilova M. et al.: *BRCA1* and *BRCA2* mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. *Hum Mutat* 23, 2004, 397-398
10. Sodha N., Houlston R.S., Williams R. et al.: A robust method for detecting *CHK2/RAD53* mutations in genomic DNA. *Hum Mutat* 19, 2002, 173-177
11. Offit K., Pierce H., Kirchoff T. et al.: Frequency of *CHEK2*\*1100delC in New York breast cancer cases and controls. *BMC Med Genet* 4, 2003, 1-
12. 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* 31, 2002, 55-59
13. Dufault M.R., Betz B., Wappenschmidt B. et al.: Limited relevance of the *CHEK2* gene in hereditary breast cancer. *Int J Cancer* 110, 2004, 320-325
14. Osorio A., Rodriguez-Lopez R., Diez O. et al.: The breast cancer low-penetrance allele 1100delC in the *CHEK2* gene is not present in Spanish familial breast cancer population. *Int J Cancer* 108, 2004, 54-56
15. Caligo M.A., Agata S., Aceto G. et al.: The *CHEK2* c.1100delC mutation plays an irrelevant role in breast cancer predisposition in Italy. *Hum Mutat* 24, 2004, 100-101
16. Syrjakovski K., Kuukasjarvi T., Auvinen A. et al.: *CHEK2* 100delC is not a risk factor for male breast cancer population. *Int J Cancer* 108, 2004, 475-476
17. Neuhausen S., Dunning A., Steele L. et al.: Role of *CHEK2*\*1100delC in unselected series of non-*BRCA1/2* male breast cancers. *Int J Cancer* 108, 2004, 477-478
18. Ohayon T., Gal I., Baruch R.G. et al.: *CHEK2*\*1100delC and male breast cancer risk in Israel. *Int J Cancer* 108, 2004, 479-480
19. Broeks A., de Witte L., Nuijten A. et al.: Excess risk for contralateral breast cancer in *CHEK2*\*1100delC germline mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 83, 2004, 91-93
20. The *CHEK2* Breast Cancer Case-Control Consortium: *CHEK2*\*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *Am J Hum Genet* 74, 2004, 1175-1182