

Dědičné mutace v genu *CHEK2* jako příčina dispozice k nádorům prsu – typy mutací, jejich biologická a klinická relevance

Germline *CHEK2* Gene Mutations in Hereditary Breast Cancer Predisposition – Mutation Types and their Biological and Clinical Relevance

Kleiblová P.^{1,2}, Stolařová L.¹, Křížová K.³, Lhota F.¹, Hojný J.¹, Zemánková P.¹, Havránek O.^{4,5}, Vočka M.⁶, Černá M.¹, Lhotová K.¹, Borecká M.¹, Janatová M.¹, Soukupová J.¹, Ševčík J.¹, Zimovjanová M.⁶, Kotlas J.², Panczak A.^{2,7}, Veselá K.², Červenková J.⁸, Schneiderová M.⁹, Burócziová M.³, Burdová K.³, Stránecký V.¹⁰, Foretová L.¹¹, Macháčková E.¹¹, Tavandzis S.¹², Kmoch S.¹⁰, Macůrek L.³, Kleibl Z.¹

¹ Laboratoř onkogenetiky, Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK v Praze

² Ústav biologie a lékařské genetiky, 1. LF UK a VFN v Praze

³ Laboratoř biologie nádorové buňky, Ústav molekulární genetiky AV ČR v.v.i., Praha

⁴ BIOCEV, 1. LF UK v Praze

⁵ I. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

⁶ Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

⁷ Radiologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

⁸ Radioterapeutická a onkologická klinika FN Královské Vinohrady, Praha

⁹ I. chirurgická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

¹⁰ Laboratoř pro studium vzácných nemocí, Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze

¹¹ Oddělení nádorové epidemiologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

¹² Oddělení lékařské genetiky, Laboratoře AGEL, Praha

Souhrn

Východiska: Dědičné mutace v genu *CHEK2* kódujícím CHK2 proteinkinázu způsobují středně zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu (breast cancer – BC) a dalších nádorových onemocnění. Vysoká populační variabilita *CHEK2* mutací a výskyt vzácných missense variant nejasného významu (variants of unknown clinical significance – VUS) komplikuje odhad rizika vzniku nádorových onemocnění u nosičů germinálních variant. **Soubor pacientů a metody:** Mutační analýzu *CHEK2*, vč. analýzy velkých přestavbe, jsme provedli u 1 526 vysoce rizikových pacientek s BC a 3 360 kontrol z ČR. Nalezené VUS jsme klasifikovali pomocí funkční analýzy v modelovém systému lidské buněčné linie RPE1-*CHEK2*-KO, ve které byly obě endogenní alely inaktivovány metodou CRISPR/Cas9. **Výsledky:** Četnost 10 různých truncačních mutací *CHEK2* byla významně vyšší u pacientek s BC (2,62 %) než u kontrol (0,11 %; $p = 4,1 \times 10^{-12}$), 23 různých missense variant jsme našli u 4,5 % pacientek a 4,0 % kontrol. Nejčastější alterací představovala p.I157T se srovnatelnou četností u pacientek a kontrol (3,08 vs. 3,10 %). Funkční analýza identifikovala u 9 VUS zásadní poruchu kinázové aktivity, zatímco u dalších 9 zachovanou kinázovou aktivitu. Zbývající VUS a p.I157T byly částečně funkční. Riziko BC zvyšovaly truncační mutace (OR 8,19; 95% CI 4,11–17,75) a nefunkční missense mutace (OR 4,06; 95% CI 1,37–13,39). Částečně funkční (vč. p.I157T) a plně funkční missense varianty riziko neovlivňovaly. Pacientky s truncačními a funkčně-defektními missense variantami *CHEK2* vyvinuly BC (převážně ER-positivní s vyšším gradingem) v průměrném věku 44,4 a 50,7 roku a signifikantně častěji vyvinuly sekundární tumory než nosičky mutací v *BRCA1/BRCA2/PALB2/p53* a nenosičky. **Závěr:** Dědičné mutace v genu *CHEK2* představují významnou komponentu dědičného BC v ČR. Riziko vzniku onemocnění u nosičů patogenních mutací *CHEK2* se zvyšuje s počtem příbuzných s BC a dalšími nádory v rodině. U asymptomatických nosičů je indikována dispenzarizace (jednou ročně ultrazvuk, mamografie nebo magnetická rezonance) od 40 let věku a chirurgická prevence v závislosti na rodinné anamnéze. Prevence vzniku dalších nádorů je ke zvážení dle výskytu nádorových onemocnění v rodině.

Klíčová slova

karcinom prsu – *CHEK2* – dědičné mutace – varianty nejasného významu – funkční analýza

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Petra Kleiblová, Ph.D.

Ústav biochemie a experimentální onkologie

1. LF UK

U Nemocnice 5

120 00 Praha 2

e-mail: peklege@lf1.cuni.cz

prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Ústav biochemie a experimentální onkologie

1. LF UK

U Nemocnice 5

120 00 Praha 2

e-mail: zdeklege@lf1.cuni.cz

Obdrženo/Submitted: 2. 4. 2019

Přijato/Accepted: 14. 5. 2019

doi: 10.14735/amko2019S36

Summary

Background: Hereditary mutations in the *CHEK2* gene (which encodes CHK2 kinase) contribute to a moderately increased risk of breast cancer (BC) and other cancers. Large variations in the frequency of *CHEK2* mutations and the occurrence of variants of unknown clinical significance (VUS) complicate estimation of cancer risk in carriers of germline *CHEK2* mutations. **Patients and methods:** We performed mutation analysis of 1,526 high-risk Czech BC patients and 3,360 Czech controls. Functional analysis was performed for identified VUS using a model system based on a human RPE1-*CHEK2*-KO cell line harboring biallelic inactivation of endogenous *CHEK2*. **Results:** The frequency of ten truncating *CHEK2* variants differed markedly between BC patients (2.26%) and controls (0.11%; $p = 4.1 \times 10^{-12}$). We also found 23 different missense variants in 4.5% patients and in 4.0% of controls. The most common was p.I157T, which was found in patients and controls with the same frequency. Functional analysis identified nine functionally deleterious VUS, another nine functionally neutral VUS, and four intermediate VUS (including p.I157T). We found that carriers of truncating *CHEK2* mutations had a high BC risk (OR 8.19; 95% CI 4.11–17.75), and that carriers of functionally deleterious missense variants had a moderate risk (OR 4.06; 95% CI, 1.37–13.39). Carriers of these mutations developed BC at 44.4 and 50.7 years, respectively. Functionally neutral and functionally intermediate missense variants did not increase the BC risk. BC in *CHEK2* mutation carriers was frequently ER-positive and of higher grade. Notably, carriers of *CHEK2* mutations developed second cancers more frequently than *BRCA1/BRCA2/PALB2/p53* or mutation non-carriers. **Conclusion:** Hereditary *CHEK2* mutations contribute to the development of hereditary BC. The associated cancer risk in mutation carriers increases with the number of affected individuals in a family. Annual follow-up with breast ultrasound, mammography, or magnetic resonance imaging is recommended for asymptomatic mutation carriers from the age of 40. Surgical prevention and specific follow-up of other tumors should be considered based on family cancer history.

Key words

breast cancer – *CHEK2* – hereditary mutations – variants of unknown significance – functional analysis

Východiska

Karcinom prsu (breast cancer – BC) patří mezi nejčastější onkologické diagnózy v populaci žen v ČR. Přibližně 10 % případů se vyvíjí na základě genetické příčiny způsobené přítomností patogenní mutace v některém z genů predisponujících ke vzniku dědičné formy BC. Charakteristickou okolností vzniku většiny dědičných forem BC je jejich asociace s hereditárními mutacemi v genech kódujících proteiny podílející se na opravách genomové DNA, především na reparacích dvouřetězcových zlomů DNA cestou homologní rekombinace [1].

Dědičná forma BC se se zvýšenou četností vyskytuje v rámci syndromu dědičného karcinomu prsu a ovaria způsobeného vysoce penetrantními mutacemi v hlavních predispozičních genech *BRCA1* a *BRCA2*. Vzhledem k vysoké frekvenci patogenních mutací v těchto genech a dostatečnému množství identifikovaných nosičů existují již v současné době kvalitní indikační kritéria pro genetické testování, jakož i doporučení pro klinický management osob s mutací [2,3]. Třetím klinicky nejvýznamnějším genem s vysokou penetrancí pro vznik dědičné formy karcinomu prsu je *PALB2* [4]. Mezi další vysoce penetrantní predispoziční geny podmiňující vznik dědičné formy BC patří *TP53*, *PTEN*, *CDH1* s extrémně vzácným výskytem zárodečných mutací. Řádově čtenější jsou

mutace v genech se střední penetrancí (s relativním rizikem < 4), mezi nimiž u pacientek s BC dominují alterace genů *ATM* a *CHEK2* [5]. Četnost zárodečných mutací v genu *CHEK2* je u pacientek s BC v naší populaci třetí nejvyšší ze známých nádorových predispozičních genů. Mutace v *CHEK2* jsou spojeny i se zvýšeným rizikem výskytu dalších malignit [6].

Gen *CHEK2* (checkpoint kinase 2; OMIM: 604373) je lokalizován na chromozomu 22q12.1 a kóduje serin/treoninovou proteinkinázu CHK2 tvořenou 543 aminokyselinami. CHK2 kináza je aktivována fosforylací tyrozinu 68 zprostředkovanou proteinem ATM v rámci buněčné odpovědi na přítomnost dvouřetězcových zlomů DNA [7]. Aktivační fosforylace katalyzuje homodimerizaci dvou CHK2 molekul v oblasti FHA (forkhead-associated) domény a umožňuje následnou autofosforylaci kinázové domény podmiňující plnou katalytickou aktivitu CHK2. Aktivovaná CHK2 kináza fosforyluje řadu jaderných proteinů zapojených do oprav poškození DNA a do buněčné odpovědi na přítomnost těchto alterací směřujících k zástavě buněčného cyklu, indukci apoptózy a změně genové exprese [8]. Mezi substráty CHK2 patří *BRCA1* a *BRCA2* – klíčové proteiny reparace dvouřetězcových zlomů v DNA, transkripční faktor p53 – ovlivňující expresi genů regulujících průběh buněčného cyklu a apoptózy nebo

transkripční represor KAP1 (KRAB-asociovaný protein 1, alias TIF1 β , TRIM28) – protein řídící genovou expresí rozsáhlé skupiny genů vč. genů kódujících proteiny zapojené do oprav genomové DNA [9].

Asociace zárodečných mutací v genu *CHEK2* s karcinomem prsu byla identifikována začátkem milénia [10], ale většina zejména původních studií se zaměřila pouze na analýzu přítomnosti několika vybraných zakladatelských (founder) mutací. Mezi nejčastěji analyzované dědičné alterace patří západoevropská trunkační mutace c.1100delC (p.T367Mfs*15) a dále missense varianta c.470T>C (p.I157T), která se ve zvýšené míře vyskytuje ve slovanské populaci. Výsledky metaanalýz těchto variant u pacientek s BC opakovaně ukázaly, že v případě c.1100delC se jedná o středně penetrantní alelu [11,12], zatímco význam varianty p.I157T u BC je na úrovni nízké rizikových alterací s OR~1,5 [13]. Další typicky slovanské rekurentní mutace vyskytující se v naší populaci zahrnují sestřihovou variantu c.444+1G>A (IVS2+1G>A; p.E149Ifs*6) a velkou intragenovou delecí postihující exony 9 a 10 (c.909-2028_1095+330del5395; p.M304Lfs*15), poprvé identifikovanou u pacientů z ČR a SR [14].

Mutační analýzy celé kódující oblasti genu *CHEK2* byly u starších prací provedeny pouze výjimečně [15–18]. Jejich vý-

sledky však naznačily, že nejčastěji studované mutace představují pouze část dědičných variant *CHEK2* u pacientek s BC. S nástupem sekvenování nové generace (next generation sequencing – NGS) do rutinní diagnostiky se mutační analýza genu *CHEK2* stala standardní součástí vyšetření. Výsledky NGS analýz na velkých souborech odhalily, že prevalence zárodečných *CHEK2* variant patří mezi nejvyšší mezi dalšími ná-

dorovými predispozičními geny (mimo *BRCA1* a *BRCA2*), zejména v evropské a židovské populaci [19–22]. V rámci NGS analýz však dochází nejen k identifikaci jednoznačně patogenních mutací, ale také variant nejasného významu (variant of unknown significance – VUS), jejichž biologický a potažmo i klinický význam musí být následně vyhodnocen testováním na modelových organizmech *in vitro* a/nebo důkladnou genetickou ana-

lyzou v rodinách nosičů VUS. Tyto přístupy dalece přesahují možnosti rutinní diagnostiky a informace o přítomnosti VUS značně komplikuje klinickou využitelnost NGS analýz [23]. Nejednotné hodnocení VUS způsobuje, že téměř třetina diagnostikovaných *CHEK2* variant je reportována diskrepantně [24].

V předkládané práci jsme se zaměřili na identifikaci spektra dědičných variant genu *CHEK2* v naší populaci, které jsme

Tab. 1. Charakteristika vyšetřovaného souboru 1 526 pacientek s BC.

Pacientky počet	Unilaterální BC n = 1 298	Bilaterální BC n = 149		BC a karcinom ovaria n = 79	Všechny BC n = 1 526
		1. BC	2. BC		
věk dg. – průměr	42,9	45,8	52,9	55,7	43,9
věk dg. – medián	40,9 (17–92)	46,0 (23–81)	53,0 (32–84)	57,2 (30–78)	42,0 (17–92)
≤ 30; n (%)	165 (12,7)	13 (8,7)	0	1 (1,3)	179 (11,7)
31–40; n (%)	488 (37,6)	41 (27,5)	24 (16,1)	10 (12,7)	539 (35,3)
41–50; n (%)	360 (27,7)	50 (33,6)	45 (30,2)	16 (20,3)	426 (27,9)
51–64; n (%)	213 (16,4)	36 (24,2)	57 (38,3)	32 (40,5)	281 (18,4)
≥ 65; n (%)	72 (5,5)	9 (6,0)	23 (15,4)	20 (25,3)	101 (6,6)
histologický typ (% známých)					
duktální	964 (80,2)	90 (70,9)	115 (82,7)	48 (76,2)	1,102 (79,2)
dcis	61 (5,1)	6 (4,7)	10 (7,2)	3 (4,8)	70 (5,0)
lobulární	81 (6,7)	14 (11)	6 (4,3)	6 (9,5)	101 (7,3)
lcis	2 (0,2)	0	3 (2,2)	1 (1,6)	3 (0,2)
medulární	58 (4,8)	12 (9,4)	5 (3,6)	2 (3,2)	72 (5,2)
mucinózní	6 (0,5)	0	0	1 (1,6)	7 (0,5)
tubulární	6 (0,5)	1 (0,8)	0	1 (1,6)	8 (0,6)
jiný	24 (2,0)	4 (3,1)	0	1 (1,6)	29 (2,1)
neznámý	96	22	10	16	134
subtyp (% známých)					
luminal A	269 (26,0)	30 (33,0)	36 (30,5)	20 (42,6)	319 (27,2)
luminal B	426 (41,1)	25 (27,5)	37 (31,4)	15 (31,9)	466 (39,7)
basal-like	272 (26,3)	30 (33,0)	35 (29,7)	11 (23,4)	313 (26,7)
HER2-pozitivní	69 (6,7)	6 (6,6)	10 (8,5)	1 (2,1)	76 (6,5)
neznámý	262	58	31	32	352
menopauza (% známých)					
premenopauzální	968 (78,7)	103 (73,0)	50 (35,2)	25 (34,7)	1 096 (76,0)
postmenopauzální	262 (21,3)	38 (27,0)	92 (64,8)	47 (65,3)	347 (24,0)
neznámý	68	8	7	7	83

BC – karcinom prsu, dg. – diagnóza, n – počet

Tab. 1 – pokračování. Charakteristika vyšetřovaného souboru 1 526 pacientek s BC.

Pacientky počet	Unilaterální BC n = 1 298	Bilaterální BC n = 149		BC a karcinom ovaria n = 79 BC	Všechny BC n = 1 526
		1. BC	2. BC		
klinické stadium (% známých)					
IA	408 (35,0)	42 (32,8)	66 (52,0)	23 (34,8)	473 (34,8)
IB	27 (2,3)	1 (0,8)	3 (2,4)	3 (4,5)	31 (2,3)
IIA	308 (26,4)	41 (32,0)	30 (23,6)	28 (42,4)	377 (27,7)
IIB	236 (20,3)	24 (18,8)	10 (7,9)	9 (13,6)	269 (19,8)
IIIA	104 (8,9)	11 (8,6)	7 (5,5)	1 (1,5)	116 (8,5)
IIIB	32 (2,7)	6 (4,7)	0	1 (1,5)	39 (2,9)
IIIC	22 (1,9)	0	5 (3,9)	1 (1,5)	23 (1,7)
IV	28 (2,4)	3 (2,3)	6 (4,7)	0	31 (2,3)
neznámé	133	21	22	13	167
grade (% známých)					
1	144 (13,5)	10 (10,1)	26 (21,8)	12 (22,6)	166 (13,6)
2	450 (42,2)	51 (51,5)	41 (34,5)	25 (47,2)	526 (43,2)
3	472 (44,3)	38 (38,4)	52 (43,7)	16 (30,2)	526 (43,2)
neznámý	232	50	30	26	308
splněná indikační kritéria					
pouze osobní	456 (35,1)	49 (32,9)	48 (60,8)	553 (36,2)	
pouze rodinná	335 (25,8)	19 (12,8)	0	354 (23,2)	
osobní i rodinná	431 (33,2)	69 (46,3)	31 (39,2)	531 (34,8)	
žádná	76 (5,9)	12 (8,1)	0	88 (5,8)	

BC – karcinom prsu, n – počet

analyzovali v souboru vzorků získaných od 1 526 vysoce rizikových pacientek s BC a 3 360 kontrol. Nalezené VUS jsme podrobili funkční analýze využívající modelový systém založený na kvantifikaci fosforylace serinu 473 v proteinu KAP1 v lidské buněčné linii RPE1 s delecí endogenního *CHEK2* genu.

Soubor pacientů a metody

Vyšetřovaný soubor pacientek tvořily vzorky od 1 526 žen s BC odeslaných ke genetickému vyšetření nádorové predispozice do Laboratoře onkogenetiky (Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK v Praze) v letech 1997–2017. Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas schválený etickou komisí 1. LF UK a VFN v Praze. Anamnestická a klinicko-patologická data

byla získána ze zdravotnické dokumentace (tab. 1). Kromě souboru pacientek bylo vyšetřeno 3 360 kontrol, z nichž 1 329 vzorků bylo získáno od osob bez nádorového onemocnění v osobní anamnéze a 2 031 vzorků tvořila skupina neselektovaných jedinců (369 vzorků anonymních dárců krve a 1 662 anonymních vzorků osob vyšetřených exomovým sekvenováním v Národním centru lékařské genomiky – bez detailnějších údajů o věku, pohlaví a zdravotním stavu). Soubor pacientů i kontrol tvořily osoby české národnosti.

Vstupním materiálem pro vyšetření byla DNA izolovaná z leukocytů periferní nesrážlivé krve. S ohledem na dobu trvání projektu byla mutační analýza genu *CHEK2* prováděna s využitím různých metodických přístupů, které však

u všech vzorků zahrnovaly mutační analýzu celé kódující sekvence genu i analýzu přítomnosti velkých přestaveb (u všech pacientů a 2 271/3 360 kontrol; u zbývajících 1 089 vzorků kontrolního souboru byla provedena pouze analýza přítomnosti dvou velkých přestaveb *CHEK2* nalezených v naší populaci). Vzorky od všech pacientek s identifikovanou germinální variantou *CHEK2* genu byly vyšetřeny pomocí panelového NGS (CZECANCA) z důvodu identifikace přítomnosti případných dalších variant v dalších nádorových predispozičních genech [25,26].

U všech pacientek byla vyšetřena přítomnost mutací v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* a *TP53*, jejichž zárodečné mutace jsou spojeny s vyšším rizikem vzniku BC než mutace v genu *CHEK2*. Z 1 526 analyzova-

Tab. 2. Výskyt dědičných variant v genu *CHEK2*. Prevalence jednotlivých identifikovaných variant ve skupině žen s unilaterálním či bilaterálním BC nebo s duplicitou (BC a karcinom ovaria) a u referenční skupiny populačně specifických kontrol. Varianty jsou rozděleny do skupin: A – trunkace (delece/inzerce, nonsense mutace); B–D missense varianty klasifikované na základě výsledků RPE1-*CHEK2*-KO buňkové esej.

Varianta; cDNA	Varianta; protein	rs number	Clin Var class	Funkční analýza %wt CHK2	Unilat. BC n = 1 298	Bilat. BC n = 149	BC a karcinom ovaria n = 79	Všechny BC n = 1 526	Kontr. n = 3 360
A – <i>CHEK2</i> trunkace (a frame-shift; b in-frame)									
c.100_101delCA ^a	p.Q34Vfs*42	–	–	n.t.	–	–	1	1	–
c.277delT ^a	p.W93Gfs*17	rs786203458	5	n.t.	3	2	–	5	–
c.283C>T	p.R95*	rs587781269	5	n.t.	–	–	–	–	1
c.366delA ^a	p.E122Dfs*8	rs1555927302	5	n.t.	1	–	–	1	–
c.444+1G>A ^a	p.E149lfs*6	rs121908698	5	n.t.	4	1	–	5	2
c.846+4_846+7delAGTA ^b	p.D265_H282del	rs764884641	3	2,3	7	–	–	7	–
c.846+1888_908+987del5601 ^a	p.P283Dfs*8	–	–	n.t.	2	–	–	2	–
c.909-2028_1095+330del5395 ^a	p.M304Lfs*16	–	5	n.t.	11	1	1	13	4
c.1100delC ^a	p.T367Mfs*15	rs555607708	5	0,0	5	–	1	6	3
c.1260-8A>G ^a	p.L421lfs*4	rs863224747	3	n.t.	1	–	–	1	1
všechny trunkace (%) p = (Fisher exact test)					33 (2,54) [†] 9,4×10 ⁻¹¹	4 (2,68) 0,003	3 (3,80) 0,004	40 (2,62) [†] 4,1×10 ⁻¹²	11 (0,33) ref.
B – missense <i>CHEK2</i> varianty nefunkční (< 25 % aktivity wt proteinu)									
c.190G>A	p.E64K	rs141568342	3–4	13,3	3	–	–	3	2
c.503C>T	p.T168I	rs730881684	3	5,8	–	–	1	1	–
c.520C>G	p.L174V	rs876659400	3	0,2	1	–	–	1	–
c.917G>C	p.G306A	rs587780192	3–4	16,5	1	–	–	1	2
c.980A>G	p.Y327C	rs587780194	3	23,0	1	–	–	1	–
c.1037G>A	p.R346H	rs730881688	3	0,0	1	–	–	1	–
c.1180G>A	p.E394K	rs587780169	3	0,0	1	–	–	1	–
c.1270T>C	p.Y424H	rs139366548	3	21,5	–	1	–	1	–
c.1274C>T	p.P425L	rs1555913537	3	11,9	1	–	–	1	–
c.1421G>A	p.R474H	rs121908706	3	0,0	–	–	–	–	2
všechny nefunkční missense varianty (%) p = (Fisher exact test)					9 (0,69) 0,009	1 (0,67) 0,26	1 (1,27) 0,15	11 (0,72) 0,006	6 (0,18) ref.
všechny mutace – trunkace + nefunkční missense varianty (%) p = (Fisher exact test)					42 (3,24) 4,4 × 10 ⁻¹²	5 (3,36) 0,002	4 (5,06) 0,001	51 (3,34) 1,0 × 10 ⁻¹³	17 (0,51) ref.

[†]vč. složeného heterozygota c.277delT and c.444+1G>A;

[#]vč. dvou homozygotů p.I157T (1× unilat. a 1× bilat. BC před 50. rokem); tři další ženy s unilat. BC byly složeny heterozygoti pro: p.D265_H282del+p.D438Y, c.5601del+p.I157T, c.1100delC+p.I157T. Referenční sekvence *CHEK2*: NM_007194.3, transkripční varianta A.

BC – karcinom prsu, kontr. – populačně specifické kontroly, wt – wild-type, n – počet

Tab. 2 – pokračování. Výskyt dědičných variant v genu *CHEK2*. Prevalence jednotlivých identifikovaných variant ve skupině žen s unilaterálním či bilaterálním BC nebo s duplicitou (BC a karcinom ovaria) a u referenční skupiny populačně specifických kontrol. Varianty jsou rozděleny do skupin: A – trunkace (delece/inzerce, nonsense mutace); B–D missense varianty klasifikované na základě výsledků RPE1-*CHEK2*-KO buněčné esaje.

Varianta; cDNA	Varianta; protein	rs number	Clin Var class	Funkční analýza %wt CHK2	Unilat. BC n = 1 298	Bilat. BC n = 149	BC a karcinom ovaria n = 79	Všechny BC n = 1 526	Kontr. n = 3 360
C – missense <i>CHEK2</i> varianty částečně funkční (25–50 % aktivity wt proteinu)									
c.470T>C	p.I157T	rs17879961	3–5	48,8	38	6	3	47	104
c.688G>T	p.A230S	rs748636216	3	34,7	–	–	–	–	1
c.715G>A	p.E239K	rs121908702	3	41,8	–	–	–	–	2
c.1067C>T	p.S356L	rs121908703	3	44,1	–	–	–	–	1
c.1217G>A	p.R406H	rs200649225	2–3	38,2	–	–	–	–	1
všechny částečně funkční missense varianty (%)					38 (2,93) [#]	6 (4,03) [#]	3 (3,80)	47 (3,08) [#]	109 (3,24)
p = (Fisher exact test)					0,64	0,63	0,74	0,79	ref.
D – missense <i>CHEK2</i> varianty plně funkční (> 50 % aktivity wt proteinu)									
c.538C>T	p.R180C	rs77130927	1–3	66,6	1	–	–	1	3
c.539G>A	p.R180H	rs137853009	3	65,6	1	–	–	1	1
c.541C>T	p.R181C	rs137853010	3	116,1	–	–	–	–	3
c.542G>A	p.R181H	rs121908701	3	89,0	1	–	–	1	–
c.1091T>C	p.I364T	rs774179198	3	52,0	1	–	–	1	–
c.1309A>G	p.K437E	rs764238637	3	90,9	1	–	–	1	–
c.1312G>T	p.D438Y	rs200050883	3	69,3	3	–	–	3	2
c.1427C>T	p.T476M	rs142763740	3–4	86,4	2	–	–	2	3
c.1525C>T	p.P509S	rs587780179	3	73,2	1	–	–	1	4
všechny plně funkční missense varianty (%)					11 (0,85)	0	0	11 (0,72)	16 (0,48)
p = (Fisher exact test)					0,14	0	0	0,3	ref.

[†] vč. složeného heterozygota c.277delT and c.444+1G>A;

[#] vč. dvou homozygotů p.I157T (1× unilat. a 1× bilat. BC před 50. rokem); tři další ženy s unilat. BC byly složení heterozygoti pro: p.D265_H282del+p.D438Y, c.5601del+p.I157T, c.1100delC+p.I157T. Referenční sekvence *CHEK2*: NM_007194.3, transkripční varianta A.

BC – karcinom prsu, kontr. – populačně specifické kontroly, wt – wild-type, n – počet

ných pacientek s BC bylo 1 209 pacientek bez mutací v těchto nádorových predispozičních genech, 317 pacientek tvořily nosičky mutací v *BRCA1/2*, *PALB2* nebo *TP53*.

Varianty identifikované u pacientů byly ověřeny na úrovni RNA, resp. cDNA. Pro *in silico* predikci významu missense variant byly využity nástroje Align GVGD, MutationTaster, CADD, SIFT, PolyPhen-2, Spidex a GERP.

Funkční testy byly provedeny na lidské buněčné linii RPE1 s delecí (knock-out,

KO) endogenního *CHEK2* genu dosažené pomocí CRISPR/Cas9 systému (RPE1-*CHEK2*-KO). Jako unikátní cíl specifické CHK2 fosforylace byl identifikován serin 473 (S473) proteinu KAP1. Míra fosforylace S473 KAP1 (stanovená pomocí specifické protilátky a kvantifikovaná Scan[^]R mikroskopii) vyjadřovala enzymovou aktivitu tranzientně exprimovaných testovaných variant CHK2 v RPE1-*CHEK2*-KO buňkách [27]. Míra fosforylace S473 KAP1 byla vyjádřena jako relativní

poměr kinázové aktivity analyzované varianty k aktivitě nemutované (wild-type) formy CHK2 (100 %). Aktivita posunové mutace c.1100delC (p.T367Mfs*15) byla použita jako kontrola bez kinázové aktivity. Testované varianty byly na základě jejich kinázové aktivity klasifikovány jako nefunkční (s aktivitou < 25 % aktivity wild-type CHK2), částečně funkční (s aktivitou v rozmezí 25–50 % aktivity wild-type CHK2) a plně funkční (s aktivitou > 50 % aktivity wild-type CHK2).

Pro statistické analýzy byl soubor pacientek rozdělen do skupin v závislosti na mutačním stavu genu *CHEK2*, funkčním významu *CHEK2* variant a s ohledem na přítomnost mutací ve vysoce penetrantních národových predispozičních genech. Statistické analýzy byly provedeny s využitím Fisherova exaktního testu. Míra asociace mutací v genu *CHEK2* se sledovanými proměnnými byla vyjádřena pomocí míry rizika (odds ratio – OR). Za statisticky signifikantní byly považovány výsledky s $p < 0,05$.

Výsledky a diskuze

Četnost výskytu variant

CHEK2 u pacientek s BC a kontrol

Ve všech vzorcích jsme našli celkem 33 různých nesynonymních variant genu *CHEK2* (velké intragenové přestavby, nonsense, frame-shift, sestřihové nebo missense varianty), které se nacházely u 106/1 526 pacientek s BC (6,95 %) a u 142/3 360 kontrol (4,23 %; $p = 0,0001$; tab. 2). Významný rozdíl v četnosti výskytu jsme zaznamenali pro skupinu 10 mutací vedoucích k syntéze zkráceného CHK2 proteinu (trunkace; ověřeno na úrovni RNA). Tyto mutace jsme našli u 40/1 526 pacientek (2,62 %) a u 11/3 360 kontrol (0,33 %; $p = 4,1 \times 10^{-12}$). Pokud jsme ze souboru 1 526 pacientek vyloučili 317 nosiček mutací ve vysoce penetrantních národových predispozičních genech (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* nebo *TP53*), dosáhla ve zbývajícím souboru četnost trunkačních mutací *CHEK2* 2,89 % (35/1 209 pacientek s BC).

Frekvence trunkačních mutací *CHEK2* u pacientek s BC v různých regionech světa vykazuje značnou variabilitu. Frekvence mutací *CHEK2* srovnatelná s frekvencí v našem souboru byla zaznamenána u 507 pacientek s BC bez mutací v *BRCA1/BRCA2* z Francie (2,9 %) [15] a u 1 007 židovských pacientek z USA (2,88 %) [28]. Nižší záchyt mutací *CHEK2* byl nalezen u pacientek z Německa (1,74 % v souboru 516 pacientek [17] a 1,84 % v souboru 5 589 pacientek [22]). Je třeba zdůraznit, že ani v jedné z těchto prací nebyly hodnoceny velké intragenové přestavby *CHEK2*. Frekvence mutací v *CHEK2* je výrazně nižší v populacích neevropského původu.

V souboru 7 657 čínských pacientek s BC byla zachycena frekvence nosiček mutací v *CHEK2* pouze 0,34 % [21].

Přes výrazně nižší frekvenci patogenních mutací v našem kontrolním souboru oproti souboru pacientek s BC byla zachována podobná proporce v zastoupení jednotlivých typů trunkací tvořených přibližně stejnoměrně velkými intragenovými delecemi (37 % u pacientek, 36 % u kontrol), mutacemi postihujícími vysoce konzervativní sestřihová místa (32 % u pacientek, 27 % u kontrol) a krátkými delecemi/non-sense mutacemi (32 % u pacientek; 36 % u kontrol). Velké intragenové delece zahrnovaly u pacientek rekurentní delecí 5395 bp postihující exony 9 a 10 a nově popsanou delecí 5601 bp s oblastí kódující exon 8 (tab. 2). S ohledem na jejich frekvenci musí být hodnocení velkých přestaveb *CHEK2* v naší populaci nezbytnou součástí analýzy *CHEK2* genu. Varianty způsobující aberantní sestřih mRNA zahrnovaly kromě známé mutace c.444+1G>A variantu c.1260-8A>G (způsobující inzerci sedmi nukleotidů z přilehlé intronové oblasti do mRNA s posunem čtecího rámce; p.L421Ifs*4) a opakující se variantu c.846+4_846+7delAGTA (způsobující na úrovni mRNA potvrzený in-frame výpadek exonu 7 kódujícího 18 aminokyselin v oblasti kinázové domény proteinu CHK2; p.D265_H282del). Identický dopad na mRNA (delece exonu 7) má i recentně popsaná rozsáhlá (~7,5 kb) rekurentní intragenová delece úseku *CHEK2* genu s exonem 7 u řeckých pacientek s BC [29]. Nejčastější krátké delece v našem souboru tvořily mutace c.1100delC a c.277delT. U jedné pacientky s unilaterálním, HER2 pozitivním BC (dg. v 41 letech) byly přítomny dvě patogenní mutace (c.277delT a c.444+1G>A) v heterozygotním stavu.

Rozdíly ve frekvenci germinálních mutací *CHEK2* v různých populacích jsou patrné rovněž z přítomnosti různých founder mutací. Výskyt nejvíce studované *CHEK2* varianty c.1100delC dominuje v Německu (s frekvencí 1,41 % všech pacientek s BC bez mutace v *BRCA1/BRCA2* a 0,37 % v populačních kontrolách) [22], Francii [15], Nizozemí, Finsku, Velké Británii [30], Rusku [31] a u pacientek evropského pů-

vodu v USA [20]. V našem souboru pacientek s BC jsme identifikovali pouze šest nosiček mutace c.1100delC (0,39 % všech pacientek), které tak představovaly pouze 15 % pacientek s trunkační mutací *CHEK2*. Přesto byl výskyt varianty c.1100delC v kontrolním souboru signifikantně a více než 4× nižší (0,09 %; $p = 0,02$). Velmi raritní je c.1100delC v jižní Evropě [32] a přítomna není v Koreji [33] nebo Číně [21], kde byla nově popsána u 30 % nosiček mutací v *CHEK2* jinde neznámá founder mutace p.Y139*. V Polsku je nejčastější mutací *CHEK2* c.444+1G>A [34], která se rekurentně vyskytuje i u nás (společně s variantou c.444+1G>T [35,36]).

Z 23 zaznamenaných missense variant byla v naší populaci nejčastější varianta c.470T>C (p.I157T), přítomná u 47/1 526 (3,08 %) pacientek (u dvou z nich byla v homozygotním stavu) a u 104/3 360 (3,10 %) kontrol. Z porovnání s ostatními studii analyzujícími varianty *CHEK2* genu je patrné, že i spektrum missense variant má výraznou populační variabilitu. Z 18 různých missense variant *CHEK2*, které jsme našli v naší studii u pacientek s BC, jich 11 bylo identifikováno mezi 56 missense variantami zachycenými při analýze 5 589 pacientek s BC z Německa [22], 6 mezi 28 missense variantami nalezenými při vyšetření 1 303 pacientek s BC z USA a Austrálie [16] a 2 mezi 9 missense variantami přítomnými u 507 pacientek s BC z Francie [15].

Výsledky *in silico* analýzy missense variant nalezených v našem souboru byly pro většinu variant diskrepantní. Jejich klinický význam a interpretace v databázi ClinVar byly rovněž nejasné (16× VUS, class 3) nebo konfliktní (u šesti variant); varianta c.1309A>G nebyla v databázi popsána (tab. 2). Z uvedených důvodů jsme přistoupili k provedení funkčních analýz.

Funkční klasifikace variant *CHEK2*

Funkční analýzy jsme provedli u všech 23 missense variant nalezených v souboru pacientek s BC a v kontrolách a pro sestřihovou variantu c.846+4_846+7delAGTA. Pro funkční analýzu jsme vyvinuli systém umožňující testování kinázové aktivity studova-

Tab. 3. Relativní riziko zárodečných *CHEK2* variant způsobujících zkrácení proteinového produktu (trunkace) a funkčně klasifikovaných missense variant (nefunkční, částečně funkční, plně funkční) v souboru všech vyšetřovaných pacientek s BC a v podskupině bez přítomnosti příčinné mutace v jiném nádorovém predispozičním genu. Riziko vzniku BC bylo vyjádřeno jako OR pro jednotlivé skupiny *CHEK2* variant proti jejich frekvencím v populačně specifických kontrolách (n = 3 360).

Skupina pacientek	Všechny BC n = 1 526		BC (bez mutací v <i>BRCA1/2</i> , <i>PALB2</i> , <i>TP53</i>) n = 1 209		
	<i>CHEK2</i> skupina variant	nosičky; n (%)	OR (95% CI); p	nosičky; n (%)	OR (95% CI); p
trunkace		40 (2,62)	8,19 (4,11–17,75); $4,1 \times 10^{-12}$	35 (2,90)	9,07 (4,49–19,87); $2,4 \times 10^{-12}$
nefunkční missense		11 (0,72)	4,06 (1,37–13,39); 0,006	9 (0,74)	4,19 (1,33–14,34); 0,006
částečně funkční missense		47 (3,08)	0,95 (0,66–1,35); 0,79	40 (3,31)	1,02 (0,69–1,49); 0,92
plně funkční missense		11 (0,72)	1,52 (0,64–3,49); 0,30	10 (0,83)	1,74 (0,70–4,10); 0,18

Pozn.: Soubor bez mutací v predispozičních genech *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* slouží k porovnání s výsledky zahraničních prací, které obvykle analyzují populace pacientek s BC bez mutací v hlavních predispozičních genech.

BC – karcinom prsu, OR – odds ratio, CI – interval spolehlivosti, n – počet

ných missense variant v modelu lidské buněčné linie RPE1 s inaktivací endogenního *CHEK2* genu (RPE1-*CHEK2*-KO). V porovnání s jinými přístupy pro funkční analýzu variant v *CHEK2* na úrovni purifikovaných proteinů *in vitro* [15,18] nebo v modelech na kvasinkách [37,38] je námi vytvořený systém vhodný pro studium kinázové aktivity testovaných *CHEK2* variant v přirozeném intracelulárním prostředí lidských buněk, s přítomností aktivátorů (ATM) a substrátů (KAP1) kinázy CHK2. Stanovení fosforylace S473 proteinu KAP1 zprostředkované tranzientně exprimovanými, analyzovanými variantami v buňkách linie RPE1-*CHEK2*-KO umožnilo kvantifikaci funkční kapacity nalezených VUS s určením relativní kinázové aktivity k aktivitě wild-type CHK2 (tab. 2). Systém do budoucna umožní analyzovat i další VUS identifikované v *CHEK2*, kterých je v databázi ClinVar doposud (březen 2019) popsáno 882 [39].

Funkční analýzou v RPE1-*CHEK2*-KO buňkách jsme prokázali úplnou ztrátu katalytické aktivity u varianty c.846+4_846+7delAGTA způsobující in-frame delecii 18 aminokyselin v kinázové doméně. Podstatnou redukci (snížení na < 25 % aktivity wild-type proteinu CHK2) až ztrátu kinázové aktivity jsme dále zaznamenali u 9/23 testovaných missense variant, které byly klasifikovány jako nefunkční. Naopak pouze mírně sníženou (> 50 % aktivity wild-

-type proteinu CHK2) až plně zachovanou funkci mělo dalších 9/23 missense variant, které byly klasifikovány jako plně funkční. Mezi pěti variantami, jejichž aktivita se pohybovala v rozmezí 25–50 % wild-type formy proteinu CHK2 a které byly klasifikovány jako částečně funkční, byla také nejčastější missense varianty p.I157T. Tento výsledek je v souladu s předchozími studiemi ukazujícími, že p.I157T si sice zachovává plnou katalytickou účinnost, ale variantní isoforma vykazuje poruchu ve vazbě substrátů [40,41]. Funkční kinázová kapacita této varianty na úrovni 48,8 % wild-type CHK2 naznačuje, že u heterozygotních nosičů by reziduální celková kapacita CHK2 kinázy exprimované z obou alel (kódujících 100% aktivní wild-type CHK2 a přibližně 50% aktivní p.I157T) měla poskytovat dostatečnou funkční rezervu, avšak u homozygotních nosičů p.I157T varianty je celková funkční kapacita CHK2 snížena na úroveň aktivity u heterozygotních nosičů trunkačních mutací, jako je c.1100delC.

Asociace *CHEK2* mutací s rizikem vzniku karcinomu prsu u žen

Riziko vzniku BC u nosiček dědičných alterací v genu *CHEK2* klasifikovaných na základě typu alterace a výsledků funkčních analýz bylo hodnoceno ve srovnání s kontrolní populací jak v souboru všech 1 526 žen s BC, tak v podskupině 1 209 žen s BC bez přítomnosti příčinné

mutace v ostatních vyšetřených nádorových predispozičních genech (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* nebo *TP53*). Soubor bez mutací v těchto predispozičních genech sloužil k porovnání s výsledky zahraničních prací, které obvykle analyzují populace pacientek s BC bez mutací v hlavních predispozičních genech.

Nejvyšší riziko vzniku BC jsme zaznamenali pro varianty vedoucí ke zkrácení proteinového produktu (trunkace), a to jak při hodnocení v celém souboru 1 526 vyšetřovaných žen (OR 8,19; 95% CI 4,11–17,75; $p = 4,1 \times 10^{-12}$), tak při hodnocení v podskupině 1 209 pacientek bez mutací v ostatních vyšetřených nádorových predispozičních genech (OR 9,07; 95% CI 4,49–19,87; $p = 2,4 \times 10^{-12}$) (tab. 3). Missense varianty klasifikované pomocí funkčního vyšetření jako nefunkční byly rovněž statisticky významně spojeny se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu u žen (OR > 4), bez ohledu na přítomnost dalších mutací v ostatních predispozičních genech (tab. 3). Naproti tomu missense varianty klasifikované ve funkční analýze jako skupina variant s částečnou poruchou funkce a skupina plně funkčních variant nezvyšovaly riziko vzniku BC ve skupině všech pacientek ani v podskupině pacientek bez mutací v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* nebo *TP53* (tab. 3).

Rizika vzniku karcinomu prsu spojená s nosičstvím alterací v *CHEK2*, která jsme vyčíslili v našem souboru u všech pa-

cientek s BC a v podsouboru pacientek s BC bez mutací v hlavních predispozičních genech, jsou vyšší, než je tomu v ostatních studiích analyzujících celý gen *CHEK2* nebo vybrané founder mutace (tab. 4). Příčin tohoto rozdílu je několik.

- 1) Výskyt variant *CHEK2* genu vykazuje významné populační rozdíly. Z přehledu vyplývá, že práce, ve kterých byly k výpočtu rizik použity populační kontroly, dospěly k vyššímu odhadu OR než práce, ve kterých byly použity frekvence alterací *CHEK2* z databáze variant Exome Aggregation Consortia (ExAC) od osob z evropské populace mimo Finsko (European non-Finnish – NFE) [42]. Důvodem je pravděpodobně vysoké zastoupení vzorků od osob ze severní Evropy, kde je celosvětově nejvyšší zastoupení c.1100delC v populaci (v kohortě 33 370 vzorků ExAC-NFE je více než třetina vzorků (12 119) tvořena souborem Swedish Schizophrenia & Bipolar Studies, přičemž frekvence c.1100delC v kontrolách ve Švédsku dosahuje 0,7 % [43]).
- 2) Převážná většina i recentních analýz *CHEK2* genu nezahrnuje do vyšetření velké přestavby, které v našem souboru tvořily třetinu trunkačních variant a které jsme našli významně častěji u pacientů než u kontrol.
- 3) Odhad rizika ovlivňuje i složení (výběr) vyšetřovaných pacientů a kontrol – zatímco vyšší četnost mladých pacientek s BC, pacientek s pozitivní rodinnou anamnézou a osob bez mutací v *BRCA1/BRCA2* zvyšuje záchyt patogenních variant *CHEK2* genu ve skupině pacientů, naopak výběr starších osob bez nádorového onemocnění snižuje výskyt patogenních variant v kontrolním souboru. Vyšší četnost patogenních mutací *CHEK2* nalezená v námi vyšetřovaném souboru může být ovlivněna vyšším zastoupením pacientek z rodin s pozitivní onkologickou anamnézou. Z publikovaných prací systematicky vyplývá vyšší riziko vzniku BC pro familiární formu onemocnění než pro neselektované nebo sporadické případy (tab. 4). Naopak nižší výskyt nalezených variant *CHEK2* v kontrolním souboru může být ovlivněn vyšším podílem nená-

dorových a starších osob. Oba protichůdné faktory se pravděpodobně částečně spolupodílejí na vyšším OR zjištěném v naší práci, než je tomu v jiných studiích.

Pro přesnější určení rizika bude nezbytné provedení rozsáhlých analýz v rámci mezinárodních konsorcií zahrnujících neselektované soubory pacientek s BC a jejich porovnání se vzorky populačně-specifických kontrol. Nicméně z výsledků našich analýz a přehledu publikovaných výsledků *CHEK2* analýz u pacientek s BC je nepochybné, že nosičství patogenních trunkačních mutací genu *CHEK2* je obecně spojeno s nejméně trojnásobným zvýšením rizika vzniku karcinomu prsu. Je pravděpodobné, že vyšší riziko vzniku BC bude spojeno s nosičstvím mutací *CHEK2* u pacientek s pozitivní rodinnou anamnézou BC [44] (ale pravděpodobně i dalších nádorových onemocnění), naopak nižší riziko může představovat nosičství mutací *CHEK2* u osob bez nádorových onemocnění u příbuzných. Celoživotní riziko vzniku BC u nosiček bez pozitivní rodinné anamnézy se pohybuje kolem 20 %, zatímco u nosiček s pozitivní rodinnou anamnézou bylo vyčísleno na 40 % [45]. Odlišná míra rizika je modifikována přítomností dalších genetických faktorů, např. nízkopentrantními 313 SNP polygenně ovlivňujícími riziko vzniku BC, vyjadřujících tzv. polygenic risk score [46]. Jejich zařazení do diagnostiky může v budoucnu umožnit i lepší predikci rizika u nosičů mutací *CHEK2* [44,47].

Nedořešenou otázkou zůstává určení rizika spojeného s nosičstvím funkčně-defektních vzácných missense mutací, které v naší studii i v několika publikovaných analýzách (tab. 4) (které však definovaly „potenciálně“ patogenní missense varianty především na úrovni *in silico* predikcí) vykazovaly nižší míru rizika vzniku BC (v pásmu variant středního významu s $OR \sim 2$) než trunkační mutace (s $OR > 3$). Předpokladem dalších analýz vzácných missense variant je robustní funkční *in vitro* analýza, kterou plánujeme provést pro všechny missense varianty a in-frame delece/inzerce identifikované u pacientů a kontrol v ČR.

Asociace *CHEK2* mutací s histologickým typem BC a s dalšími nádorovými onemocněními

Hodnocení vztahu přítomnosti germinální *CHEK2* mutace (trunkací a nefunkčních missense variant) k histopatologickým charakteristikám BC bylo provedeno ve skupině 1 209 pacientek bez přítomnosti příčinné mutace v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* nebo *TP53*, ve které bylo identifikováno 44 nosiček patogenních trunkačních *CHEK2* variant nebo funkčně-defektních missense variant. U těchto nosiček jsme pozorovali vyšší četnost luminal A subtypu BC oproti pacientkám bez *CHEK2* mutace (51,4 vs. 29,4 %; $p = 6 \times 10^{-3}$). Výrazný rozdíl jsme zachytili ve výskytu triple-negativního (ER-, PR-, HER2-negativní) BC, který byl zachycen pouze u jedné nosičky *CHEK2* mutace (2,7 %) oproti 186/868 pacientkám (21,4 %) bez mutace v *CHEK2* a dalších predispozičních genech ($p = 3,0 \times 10^{-3}$). Histologický typ BC, menopauzální status ani indikační kritéria ke genetickému testování se ve vyšetřovaném souboru 1 209 pacientek bez mutací v genech *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* nebo *TP53* nelišily mezi pacientkami s/bez *CHEK2* mutací, avšak u nosiček *CHEK2* mutací byl častěji přítomen grade 2 nádoru proti ženám bez mutace (67,5 vs. 44,4 %; $p = 5,3 \times 10^{-3}$).

Výsledky našich analýz jsou v souladu s dříve publikovanými studiemi ukazujícími, že nosičky *CHEK2* mutací vykazují silnou asociaci s ER-pozitivními BC, časnějším nástupem onemocnění a pokročilejším gradingem, nosičky p.1157T (ale ne c.1100delC) také s lobulárním BC [48]. Přestože prognóza ER-pozitivních nádorů je u neselektovaného BC lepší, nosičství mutací v *CHEK2* je spojeno s horším celkovým přežitím u pacientek s BC [49,50].

Zajímavým pozorováním v našem souboru byla významně vyšší četnost výskytu sekundárních nádorů dalších typů (jiných než BC nebo ovaria), vč. karcinomu kolorekta, ledviny, štítné žlázy nebo hematologických malignit u nosiček *CHEK2* mutací, které jsme zaznamenali v 9/44 (20,5 %) případů nosiček trunkačních a funkčně-defektních missense variant *CHEK2*, v porovnání se 17/317 (5,4 %) případů u nosiček mu-

Tab. 4. Přehled publikovaných prací, analyzujících celý gen *CHEK2* (samostatně nebo v rámci panelového sekvenování) nebo vybrané founder mutace a metaanalýzy studií analyzujících pacientky s BC s vyjádřením stanovených rizik pro vznik BC u nosičů mutací.

Citace	Rok	Pop.	P: soubor pacientů C: soubor kontrol	Analýza*	OR (95% CI); p – poznámka
Nurmi [55]	2019	FI	P: 3 156 BC/karcinom ovaria C: 2 089 populační	c.319+2T>A	5,40 (1,58–18,45); 0,007 – neselektované BC 6,04 (1,65–22,10); 0,007 – familiární BC
Girard [56]	2019	FR	P: 1 207 <i>BRCA1/2</i> -negativní BC a sestry s BC C: 1 199 populační	<i>CHEK2</i> (NGS)	3,0 (1,9–5,0); 1 × 10 ⁻⁵ – všechny varianty 5,8 (2,0–16,9); 0,001 – trunkace 2,4 (1,4–4,3); 0,002 – likely–deleterious missense
Hauke [22]	2018	DE	P: 5 589 <i>BRCA1/2</i> -negativní BC C: 2 189 nenádorové	<i>CHEK2</i> (NGS)	3,72 (1,99–6,94); < 0,0001 – trunkace
Couch [20]	2017	USA	P: 29 090 BC C: ExAC-NFE non-TCGA	<i>CHEK2</i> (NGS)	2,31 (1,88–2,85); 3,04 × 10 ⁻¹⁷ – c.1100delC 2,26 (1,89–2,72); 1,75 × 10 ⁻²⁰ – patogenní (bez p.I157T a p.S428F) 1,48 (1,31–1,67); 1,75 × 10 ⁻¹⁰ – libovolná varianta (vč. p.I157T a p.S428F) 1,35 (1,12–1,63); 0,0002 – bilaterální BC
Decker [57]	2017	UK	P: 13 087 BC C: 5 488	<i>CHEK2</i> (4 geny)	3,11 (2,15–4,69); 5,6 × 10 ⁻¹¹ – trunkace 1,36 (0,99–1,87); 0,066 – všechny raritní missense 1,51 (1,02–2,24); 0,047 – raritní missense v popsáných doménách 3,27 (1,66–5,83); 0,0014 – bilaterální BC
Slavin [58]	2017	USA	P: 2 266 <i>BRCA1/2</i> -negat. BC a ≥ 2 příbuzní s BC/karcinomem ovaria do 70 (80 % běloši) C: ExAC	<i>CHEK2</i>	1,62 (1,03–2,51); 0,04 – trunkační mutace
Schmidt [59]	2016	BCAC	44 777 BC 42 977 PMC	c.1100delC	2,26 (1,90–2,69); 2,3 × 10 ⁻²⁰ – invazivní BC 2,55 (2,10–3,10); 4,9 × 10 ⁻²¹ – ER–pozitivní BC 1,32 (0,93–1,88); 0,12 – ER–negativní BC
Southey [60]	2016	BCAC	P: 42 671 C: 42 164	c.349A>G (p.R117G) c.538C>T (p.R180C) c.715G>A (p.E239K) c.1036C>T (p.R346C) c.1312G>T (p.D438Y)	2,26 (1,29–3,95); 0,02 – pro variantu p.R117G 1,33 (1,05–1,67); 0,015 – pro variantu p.R117G 1,70 (0,73–3,93); 0,210 – pro variantu p.E239K 5,06 (1,09–23,5); 0,017 – pro variantu p.R346C 1,03 (0,62–1,71); 0,910 – pro variantu p.D438Y
Cybulski [34]	2011	PL	P: 7 494 BC (negativní founder <i>BRCA1</i> mutace) C: 4 346	c.1100delC, c.444+ 1G>A, del5395	3,6 (2,6–5,1) – všechny BC 3,3 (2,3–4,7) – BC bez pozitivní RA 5,0 (3,3–7,6) – BC + BC v 1. nebo 2. linii v RA 7,3 (3,2–16,8) – BC + BC v 1. a 2. linii v RA
Desrichard [15]	2011	FR	P: 507 <i>BRCA1/2</i> -negativních BC C: 513 nenádorové	<i>CHEK2</i>	4,15 (1,38–12,50); 0,0065 – všechny <i>CHEK2</i> varianty 5,18 (1,49–18,00); 0,0042 – patogenní <i>CHEK2</i> mutace
Le Calvez-Kelm [16]	2011	US, AU	P: 1 303 BC ≤ 45 let (64,7 % bělošky) C: 1 109 nenádorové ženy (86,2 % bělošky)	<i>CHEK2</i>	6,18 (1,76–21,8) – trunkace 2,20 (1,20–4,01) – raritní missense
Liu [61]	2011	CN	P: 909 neselektovaných BC C: 1 229 zdravé	c.1111C>T (p.H371Y)	2,43 (1,07–5,52); 0,034 – neselektovaný BC 5,99 (1,98–18,89) – familiární BC
Weischer [62]	2008	DK	P: 1 101 s BC C: 4 665	c.1100delC	3,2 (1,0–9,9) – BC (prospektivní studie) 2,6 (1,3–5,4) – BC (case control studie)

**CHEK2* – celý gen (bez velkých přestaveb); vybrané hodnocené varianty vypsány

pop. – populace, OR – odds ratio, CI – interval spolehlivosti, FI – Finsko, FR – Francie, DE – Německo, USA – Spojené státy americké, UK – Spojené království Velké Británie a Severního Irska, PL – Polsko, AU – Austrálie, CN – Čína, DK – Dánsko

Tab. 4 – pokračování. Přehled publikovaných prací, analyzujících celý gen *CHEK2* (samostatně nebo v rámci panelového sekvencování) nebo vybrané founder mutace a metaanalýzy studií analyzujících pacientky s BC s vyjádřením stanovených rizik pro vznik BC u nosičů mutací.

Citace	Rok	Pop.	P: soubor pacientů C: soubor kontrol	Analýza*	OR (95% CI); p – poznámka
Cybulski [6]	2004	PL	P: 1 017 BC C: 4 000 populační	c.1100delC; c.444+1G>A; p.I157T	2,2; p = 0,02 – pro variantu c.1100delC and c.444+1G>A 1,4; p = 0,02 – pro variantu p.I157T
Dufault [17]	2004	DE	P: 516 BRCA1/2-negativních BC C: 1 315 náhodné	CHEK2	3,44 (1,19–9,95); 0,016 – pro variantu c.1100delC 3,9 (1,3–10,9) – pro varianty c.1100delC a c.1214del4
CHEK2 konsorcium [30]	2004	UK, NL, FI, DE, AU	P: 10 860 BC C: 9 065	c.1100delC	2,34 (1,72–3,20); 1×10^{-7} 2,23 (1,60–3,11) – BC bez příbuzné s BC v 1. linii 3,12 (1,90–5,15) – BC + 1 BC v 1. linii v RA 4,17 (1,26–13,75) – BC + ≥ 2 BC v 1. linii v RA
Vahteristo [63]	2002	FI	P: 1 035 neselektovaných BC C: 1 885	c.1100delC	1,48 (0,83–2,65); 0,182 neselektovaný BC 2,27 (1,11–4,63); 0,021 BC + BC v RA 6,17 (1,87–20,32); 0,007 bilaterální BC
Liang [64]	2018	meta	P: 118 735 BC C: 195 807	c.1100delC	2,88 (2,65–3,22) – BC u žen 2,87 (1,85–4,47) – BC u mladých žen 3,21 (2,41–4,29) – familiární BC 3,13 (1,94–5,07) – BC u mužů
Han [65]	2013	meta	P: 15 985 BC C: 18 609	p.I157T	1,58 (1,42–1,75); < 0,0001
Liu [13]	2012	meta	P: 19 621 BC C: 27 001	p.I157T	1,48 (1,31–1,68); < 0,0001 – neselektovaný BC 1,48 (1,16–1,89); < 0,0001 – familiární BC 1,47 (1,29–1,66); < 0,0001 – BC u mladých pac. 4,17 (2,89–6,03); < 0,0001 – lobulární BC
Yang [12]	2012	meta	P: 29 154 BC C: 37 064	c.1100delC	2,33 (1,79–3,05) – neselektovaný BC 3,72 (2,61–5,31) – familiární BC 2,78 (2,28–3,39) – mladé pacientky
Zhang [66]	2011	meta	P: 9 970/ C: 7 526 P: 13 331/ C: 10 817 P: 10 543/ C: 10 817 P: 4 1791/ C: 50 910	c.444+1G>A p.I157T del5395 c.1100delC	3,07 (2,03–4,63); $9,82 \times 10^{-8}$ – pro variantu c.444+1G>A 1,52 (1,31–1,77); $4,76 \times 10^{-8}$ – pro variantu p.I157T 2,53 (1,61–3,97); $6,33 \times 10^{-5}$ – pro variantu del5395 3,10 (2,59–3,71); < 10^{-20} – pro variantu c.1100delC
Weischer [11]	2008	meta	P: 26 488 C: 27 402	c.1100delC	2,7 (2,1–3,4) – neselektovaný BC 2,6 (1,3–5,5) – BC u mladých žen 4,8 (3,3–7,2) – familiární BC

**CHEK2* – celý gen (bez velkých přestaveb); vybrané hodnocené varianty vypsány

pop. – populace, OR – odds ratio, CI – interval spolehlivosti, meta – metaanalýza, PL – Polsko, DE – Německo, UK – Spojené království Velké Británie a Severního Irsku, NL – Nizozemí, FI – Finsko, AU – Austrálie

tací v ostatních predispozičních genech ($p = 0,002$), 2/38 (5,3 %) případů u nosiček p.I157T a 80/1127 (7,1 %) případů u pacientek s BC bez mutací v *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53* nebo *CHEK2* ($p = 0,004$). Zvýšená četnost výskytu nádorových onemocnění v dalších lokalitách dokumentuje podíl mutací v *CHEK2* genu na vzniku dědičné predispozice i k jiným typům nádorových onemocnění. Od první práce Cy-

bulského et al [6], ve které byly trunkační varianty (c.1100delC a c.444+1G>A) asociovány se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu štítné žlázy (OR 4,9; $p = 0,0006$), prsu (OR 2,2; $p = 0,02$) a prostaty (OR 2,2; $p = 0,04$) a varianta p.I157T se zvýšeným rizikem BC (OR 1,4; $p = 0,02$), kolorekta (OR 2,0; $p = 0,001$), ledviny (OR 2,1; $p = 0,006$), prostaty (OR 1,7; $p = 0,002$) a štítné žlázy (OR 1,9; $p = 0,04$) v polské populaci, byla publikována řada prací

a metaanalýz ukazujících na zvýšený výskyt těchto onemocnění u nosičů alterací genu *CHEK2*.

Přesnější odhady relativních rizik pro vznik dalších malignit u nosičů mutací *CHEK2* zatím chybějí, zejména z důvodu nedostatečného množství vyšetřených pacientů. Nicméně i další práce (tab. 5) poukazují na asociaci mutací *CHEK2* s jinými tumory, jako jsou karcinom ledviny, prostaty, štítné žlázy a kolorekta,

Tab. 5. Asociace dědičných alterací v *CHEK2* genu s dalšími nádorovými onemocněními.

Citace	Rok	Pop.	P: soubor pacientů C: soubor kontrol	Analýza*	OR (95% CI); p – poznámka
AlDubayan [67]	2019	USA/ HR	P: 205/448/231 TGCT C: ExAC/populační	<i>CHEK2</i>	3,87 (1,65–8,86); p = 0,006 – trunkace (USA pac.) 1,4; p = 0,03 – trunkace (HR pac.) 6,30 (2,34–17,31); 0,01 – trunkace (USA TGCT pac. ≥ 2 příbuznými s TGCT)
Obazee [68]	2019	PAN- DoRA kon- sor- cium	P: 2 976 ca pankreatu C: 5 855 populační	p.I157T	1,74 (1,15–2,63); 8,57 × 10 ⁻³
Zlowocka- Perlowska [51]	2019	PL	P: 835 invazivní ca ledviny C: 8 304 bez nádoru	c.1100del- C/c.444+1A>G/ 5395del c.I157T	2,0 (1,6–2,6); < 0,001 2,5 (1,5–4,1); 0,0003
Hallamies [69]	2017	FI	P: 68 ca prsu u muže C: 1 885 z ref [55]	c.1100delC	4,47 (1,51–13,18); 0,019
Carlo [70]	2018	USA	P: 254 ca ledviny (stadium III–IV) C: ExAC	<i>CHEK2</i>	3,0 (1,3–5,8); 0,03
Pritchard [71]	2016	USA, UK	P: 692 metastat. ca prostaty C: ExAC	<i>CHEK2</i>	3,1 (1,5–5,6); 0,002
Havránek [36]	2015	CZ	P: 360 NHL C: 445 nenádorové	<i>CHEK2</i>	2,86 (1,42–5,79); 0,003 – všechny varianty
Siolek [72]	2015	PL	P: 468 ca štítné žlázy C: 468 párových kontrol	c.1100delC/c.444+ 1A>G/5395del c.I157T	5,7; p = 0,006 – trunkace 2,8; p = 0,0001
Wang [73]	2015	meta	P: 6 409 ca prostaty C: 11 634	c.1100delC c.444+1G>A p.I157T	3,29 (1,85–5,85); < 0,001 1,59 (0,93–2,71); 0,09 1,80 (1,51–2,14); < 0,001
Hale [74]	2014	meta	P: 5 124 ca prostaty (1 084 familiárních) C: 9 258	c.1100delC	1,98 (1,23–3,18) – neselektovaný ca prostaty 3,39 (1,78–6,47) – familiární ca prostaty
Ma [75]	2014	meta	P: 3 874 ca kolorekta C: 11 630	c.1100delC	1,88 (1,29–2,73); 0,001
			P: 6 042 ca kolorekta C: 17 051	p.I157T	1,56 (1,32–1,84); 1,22 × 10 ⁻⁷
Han [65]	2013	meta	P: 3 166 ca kolorekta C: 9 844	p.I157T	1,67 (1,24–2,26); 0,0008
Liu [76]	2012	meta	P: 4 029 ca kolorekta C: 13 844	p.I157T	1,61 (1,40–1,87); < 0,001 – neselektovaný ca 1,48 (1,23–1,77); < 0,001 – sporadický ca 1,97 (1,41–2,74); < 0,001 – familiární ca
Weischer [77]	2012	DK, GE	P: 2 619 melanom C: 17 481	c.1100delC	1,81 (1,07–3,05)
Xiang [78]	2011	meta	P: 4 194 ca kolorekta C: 10 010	c.1100delC	2,11 (1,41–3,16); 0,0003 – všichni pac. 2,80 (1,74–4,51); < 0,0001 – familiární pac. 1,45 (0,49–4,30); 0,5 – sporadický ca

pop. – populace, OR – odds ratio, CI – interval spolehlivosti, USA – Spojené státy americké, HR – Chorvatsko, TGCT – testikulární germinální tumor, ca – karcinom, NHL – non-Hodgkinův lymfom, meta – metaanalýza, CZ – Česká republika, DK – Dánsko, FI – Finsko, PL – Polsko, UK – Spojené království Velké Británie a Severního Irsku

non-hodgkinské lymfomy, maligní melanom nebo karcinom prsu u mužů.

Integrace těchto poznatků do klinických doporučení je předmětem diskuzí [51] a pro preventivní sledování nosičů *CHEK2* mutací zatím není plošně možná a ošetřující lékaři jsou odkázáni na indikaci sledování dalších nádorů na základě výskytu onkologických onemocnění v rodině nosičů mutací či na využití dostupných screeningových vyšetření.

Současný stav klinických doporučení

Současný stav klinických doporučení pro nosiče patogenních mutací v genu *CHEK2* vychází z aktuálních mezinárodních doporučení a zahrnuje zejména přístupy umožňující časnou detekci malignit (pravidelné samovyšetření prsů, mamografie a ultrasonografie nebo magnetická rezonance jednou ročně od věku 40 let, příp. od věku 10 let, před nástupem onemocnění v rodině) [52,53].

Pro nosičky patogenních a pravděpodobně patogenních variant (class 4 a 5) v heterozygotním stavu způsobujících zkrácení proteinu CHK2 (vč. nově charakterizovaných sestřihových mutací c.846+4_846+7delAGTA a c.1260-8A>G) s absencí části či celé kinázové domény je doporučeno zařazení do preventivních gynekologických a onkologických programů zohledňujících rizika nádorů asociovaných s mutacemi v genu *CHEK2*. Prevence v tomto případě odpovídá schématu pro nejčastěji diskutovanou variantu *CHEK2* c.1100delC.

U nosiček homozygotních mutací [54] nebo složených heterozygotů (dvě prokazatelně patogenní trunkace v genu *CHEK2*, každá v heterozygotním stavu) je možné nabídnout také preventivní chirurgické zákroky snižující riziko vzniku karcinomu prsu (bilaterální mastektomie, podle závažnosti rodinné anamnézy případně i profylaktická salpingo-ooforektomie). Preventivní chirurgické výkony je vhodné zvážit i u heterozygotních nosiček trunkačních variant, s ohledem na rodinnou anamnézu a segregaci varianty *CHEK2* v rodině.

Nosičky missense variant vedoucích ke ztrátě funkce proteinu CHK2 dle do-

stupných funkčních vyšetření by měly mít stejné preventivní sledovací schéma jako v případě variant trunkačních. Pro indikaci k preventivním chirurgickým výkonům není zatím dostatek informací. Je vhodné provádět v rodinách segregací analýzy, je možné prediktivně (ale s omezeným výstupem) testovat zdravé příbuzné. Nosiče zařadit do adekvátních preventivních programů, ovšem v případě negativně testovaných osob zatím i nadále ponechat riziko vzniku nádorových onemocnění plynoucích z rodinné anamnézy.

Interpretace nálezu missense variant v genu *CHEK2* je obtížnější. Rekurentní missense varianta p.I157T je ve veřejných databázích klasifikována rozporuplně ve spektru class 3–5. V naší populaci však alelická frekvence této varianty převyšuje 1 %, což ze své podstaty vylučuje možnost, že by se mohlo jednat o vsoce nebo i středně penetrantní nádorovou predispoziční variantu. Přestože se dle funkčních analýz jedná o variantu s částečně omezenou funkcí proteinu CHK2, nebylo pozorováno klinicky významné zvýšení rizika vzniku BC u žen spojené s jejím výskytem oproti populačně specifickým kontrolám (OR~1,5). Pokud v rámci genetického testování dojde k identifikaci nosičky p.I157T v homozygotním stavu, je vhodné ji o skutečnosti informovat, avšak klinická doporučení nejsou jednoznačná. Tato skutečnost sama o sobě není důvodem k preventivním chirurgickým výkonům, probandku je však možno zařadit do preventivních sledovacích programů. Přítomnost varianty p.I157T v rodině není indikací pro prediktivní testování zdravých příbuzných.

Ostatní raritní missense varianty klasifikované funkčně jako plně či částečně funkční a v dostupných databázích klasifikované jako VUS, je nutno podrobit dalšímu testování. Jejich klinické uplatnění je v současnosti omezené.

Varianty zařazené jako benigní nebo pravděpodobně benigní (class 1 a 2) v dostupných databázích jsou bez klinického využití a obvykle nejsou probandům v rámci genetické konzultace reportovány ani nebývají reportovány laboratoři provádějící genetické vyšetření.

Práce byla podpořena granty Agentury pro zdravotnický výzkum MZČR NR 15-28830A, 16-29959A, NV19-03-00279, projekty Univerzity PROGRES Q28/LF1, GAUK 762216, SVV2019/260367, PRIMUS/17/MED/9, UNCE/MED/016, Progres Q26, LQ1604 NPU II a projektem AVČR Qualitas. Analýza souboru neselektovaných kontrol byla umožněna díky existenci a podpoře vědecké infrastruktury Národního centra lékařské genomiky (LM2015091) a jeho projektu zaměřeného na vytvoření referenční databáze genetických variant České republiky (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001634).

The work was supported by grants from the Czech Health Research Council of the Ministry of Health of the Czech Republic NR 15-28830A, 16-29959A, NV19-03-00279, projects of the PROGRES Q28/LF1, GAUK 762216, SVV2019 / 260367, PRIMUS/17/MED/9, UNCE/MED/016, Progress Q26, LQ1604 NPU II and project AVČR Qualitas. The analysis of a set of unselected controls was made possible by the existence and support of the scientific infrastructure of the National Center for Medical Genomics (LM2015091) and its project aimed at creating a reference database of genetic variants of the Czech Republic (CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001634).

Literatura

1. Kleibl Z, Kristensen VN. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast* 2016; 28: 136–144. doi: 10.1016/j.breast.2016.05.006.
2. Foretová L, Macháčková E, Palácová M et al. Doporučení rozšíření indikačních kritérií ke genetickému testování mutací v genech BRCA1 a BRCA2 u hereditárního syndromu nádorů prsu a ovarií. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 1): 9–13.
3. Petráková K, Palácová M, Schneiderová M et al. Syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovarií. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 1): 14–21. doi: 10.14735/amko2016514.
4. Janatová M, Borecká M, Soukupová J et al. PALB2 jako další kandidátní gen pro genetické testování u pacientů s hereditárním karcinomem prsu v České republice. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 1): 31–34. doi: 10.14735/amko2016531.
5. Pohlreich P, Kleibl Z, Kleiblova P et al. Klinický význam analýz genů středního rizika pro hodnocení rizika vzniku karcinomu prsu a dalších nádorů v České republice. *Klin Onkol* 2012; 25 (Suppl): 59–66. doi: 10.14735/amko20121559.
6. Cybulski C, Gorski B, Huzarski T et al. *CHEK2* is a multi-organ cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 2004; 75(6): 1131–1135. doi: 10.1086/426403.
7. Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A et al. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(19): 10389–10394. doi: 10.1073/pnas.190030497.
8. Zannini L, Delia D, Buscemi G. *CHK2* kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol* 2014; 6(6): 442–457. doi: 10.1093/jmcb/mju045.
9. Hu C, Zhang S, Gao X et al. Roles of Kruppel-associated Box (KRAB)-associated Co-repressor KAP1 Ser-473 Phosphorylation in DNA Damage Response. *J Biol Chem* 2012; 287(23): 18937–18952. doi: 10.1074/jbc.M111.313262.
10. Meijers-Heijboer H, van den OIA, 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.
11. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C et al. *CHEK2**-1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and

- 27,000 controls. *J Clin Oncol* 2008; 26(4): 542–548. doi: 10.1200/JCO.2007.12.5922.
12. Yang Y, Zhang F, Wang Y et al. CHEK2 1100delC variant and breast cancer risk in Caucasians: a meta-analysis based on 25 studies with 29,154 cases and 37,064 controls. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(7): 3501–3505.
13. Liu C, Wang Y, Wang QS et al. The CHEK2 I157T variant and breast cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(14): 1355–1360.
14. Walsh T, Casadei S, Coats KH et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA* 2006; 295(12): 1379–1388. doi: 10.1001/jama.295.12.1379.
15. Desrichard A, Bidet Y, Uhrhammer N et al. CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families. *Breast Cancer Res* 2011; 13(6): R119. doi: 10.1186/bcr3062.
16. Le Calvez-Kelm F, Lesueur F, Damiola F et al. Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in CHEK2 contribute to breast cancer susceptibility: results from a breast cancer family registry case-control mutation-screening study. *Breast Cancer Res* 2011; 13(1): R6. doi: 10.1186/bcr2810.
17. Dufault MR, Betz B, Wappenschmidt B et al. Limited relevance of the CHEK2 gene in hereditary breast cancer. *Int J Cancer* 2004; 110: 320–325. doi: 10.1002/ijc.20073.
18. Bell DW, Kim SH, Godwin AK et al. Genetic and functional analysis of CHEK2 (CHK2) variants in multiethnic cohorts. *Int J Cancer* 2007; 121(12): 2661–2667. doi: 10.1002/ijc.23026.
19. Leedom TP, LaDuca H, McFarland R et al. Breast cancer risk is similar for CHEK2 founder and non-founder mutation carriers. *Cancer Genet* 2016; 209(9): 403–407. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.08.005.
20. Couch FJ, Shimelis H, Hu C et al. Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. *JAMA Oncol* 2017; 3(9): 1190–1196. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0424.
21. Fan Z, Ouyang T, Li J et al. Identification and analysis of CHEK2 germline mutations in Chinese BRCA1/2-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2018; 169(1): 59–67. doi: 10.1007/s10549-018-4673-6.
22. Hauke J, Horvath J, Gross E et al. Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Med* 2018; 7(4): 1349–1358. doi: 10.1002/cam4.1376.
23. Young EL, Feng BJ, Stark AW et al. Multigene testing of moderate-risk genes: be mindful of the missense. *J Med Genet* 2016; 53(6): 366–376. doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103398.
24. Espenschied C, Kleiblova P, Richardson M et al. Classifying variants in the CHEK2 gene: the importance of collaboration. *Eur J Cancer* 2017; 72 (Suppl 1): S25. doi: 10.1016/S0959-8049(17)30161-2.
25. Soukupova J, Zemankova P, Lhotova K et al. Validation of CZECA (CZEch CAncer paNel for Clinical Application) for targeted NGS-based analysis of hereditary cancer syndromes. *PLoS One* 2018; 13(4): e0195761. doi: 10.1371/journal.pone.0195761.
26. Soukupová J, Zemanková P, Kleiblová P et al. CZECA: CZEch CAncer paNel for Clinical Application – návrh a příprava cíleného sekvenačního panelu pro identifikaci nádorové predispozice u rizikových osob v České republice. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 1): 46–54. doi: 10.14735/amko2016546.
27. Kleiblova P, Stolarova L, Krizova K et al. Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer* 2019. doi: 10.1002/ijc.32385.
28. Walsh T, Mandell JB, Norquist BM et al. genetic predisposition to breast cancer due to mutations other than BRCA1 and BRCA2 founder alleles among Ashkenazi Jewish women. *JAMA Oncol* 2017; 3(12): 1647–1653. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.1996.
29. Apostolou P, Fostira F, Mollaki V et al. Characterization and prevalence of two novel CHEK2 large deletions in Greek breast cancer patients. *J Hum Genet* 2018; 63(8): 877–886. doi: 10.1038/s10038-018-0466-3.
30. Consortium CBCC-C. 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* 2004; 74(6): 1175–1182. doi: 10.1086/421251.
31. Chekmariova EV, Sokolenko AP, Buslov KG et al. CHEK2 1100delC mutation is frequent among Russian breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2006; 100(1): 99–102. doi: 10.1007/s10549-006-9227-7.
32. Kleibl Z, Novotny J, Bezdickova D et al. The CHEK2 c.1100delC germline mutation rarely contributes to breast cancer development in the Czech Republic. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90(2): 165–167. doi: 10.1007/s10549-004-4023-8.
33. Choi DH, Cho DY, Lee MH et al. The CHEK2 1100delC mutation is not present in Korean patients with breast cancer cases tested for BRCA1 and BRCA2 mutation. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112(3): 569–573. doi: 10.1007/s10549-007-9878-z.
34. Cybulski C, Wokolorczyk D, Jakubowska A et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29(28): 3747–3752. doi: 10.1200/JCO.2010.34.0778.
35. Kleibl Z, Havranek O, Novotny J et al. Analysis of CHEK2 FHA domain in Czech patients with sporadic breast cancer revealed distinct rare genetic alterations. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112(1): 159–164. doi: 10.1007/s10549-007-9838-7.
36. Havranek O, Kleiblova P, Hojny J et al. Association of Germline CHEK2 gene variants with risk and prognosis of non-Hodgkin lymphoma. *Plos One* 2015; 10(10): e0140819. doi: 10.1371/journal.pone.0140819.
37. Roeb W, Higgins J, King MC. Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer. *Hum Mol Genet* 2012; 21(12): 2738–2744. doi: 10.1093/hmg/dds101.
38. Delimitsou A, Fostira F, Kalfakakou D et al. Functional characterization of CHEK2 variants in a *Saccharomyces cerevisiae* system. *Hum Mutat* 2019; 40(5): 631–648. doi: 10.1002/humu.23728.
39. ClinVar. [online]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=CHEK2.
40. Li J, Williams BL, Haire LF et al. Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2. *Mol Cell* 2002; 9(5): 1045–1054.
41. Falck J, Mailand N, Syljuasen RG et al. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 2001; 410(6830): 842–847. doi: 10.1038/35071124.
42. Lek M, Karczewski J, Minikel EV et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; 536(7616): 285–291. doi: 10.1038/nature19057.
43. Margolin S, Eiberg H, Lindblom A et al. CHEK2 1100delC is prevalent in Swedish early onset familial breast cancer. *BMC Cancer* 2007; 7: 163. doi: 10.1186/1471-2407-7-163.
44. 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. doi: 10.1038/s41436-018-0406-9.
45. Peltari LM, Kiiski J, Nurminen R et al. A Finnish founder mutation in RAD51D: analysis in breast, ovarian, prostate, and colorectal cancer. *J Med Genet* 2012; 49(7): 429–432. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-100852.
46. 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.
47. Muranen TA, Greco D, Blomqvist C et al. Genetic modifiers of CHEK2*1100delC-associated breast cancer risk. *Genet Med* 2017; 19(5): 599–603. doi: 10.1038/gim.2016.147.
48. Muranen TA, Blomqvist C, Dork T et al. Patient survival and tumor characteristics associated with CHEK2:p.1157T - findings from the Breast Cancer Association Consortium. *Breast Cancer Res* 2016; 18(1): 98. doi: 10.1186/s13058-016-0758-5.
49. Liu C, Chang H, Li XH et al. Network meta-analysis on the effects of DNA damage response-related gene mutations on overall survival of breast cancer based on TCGA database. *J Cell Biochem* 2017; 118(12): 4728–4734. doi: 10.1002/jcb.26140.
50. Weischer M, Nordestgaard BG, Pharoah P et al. CHEK2*1100delC heterozygosity in women with breast cancer associated with early death, breast cancer-specific death, and increased risk of a second breast cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(35): 4308–4316. doi: 10.1200/JCO.2012.42.7336.
51. Zlowocka-Perłowska E, Narod SA, Cybulski C. CHEK2 alleles predispose to renal cancer in Poland. *JAMA Oncol* 2019. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.0022.
52. Huzarski T, Gorecka-Szyld B, Huzarska J et al. Screening with magnetic resonance imaging, mammography and ultrasound in women at average and intermediate risk of breast cancer. *Hered Cancer Clin Pract* 2017; 15: 4. doi: 10.1186/s13053-017-0064-y.
53. Macklin S, Gass J, Mitri G et al. The role of screening MRI in the era of next generation sequencing and moderate-risk genetic mutations. *Fam Cancer* 2018; 17(1): 167–173. doi: 10.1007/s10689-017-0007-9.
54. Huijts PE, Hollestelle A, Balliu B et al. CHEK2*1100delC homozygosity in the Netherlands—prevalence and risk of breast and lung cancer. *Eur J Hum Genet* 2014; 22(1): 46–51. doi: 10.1038/ejhg.2013.85.
55. Nurmi A, Muranen TA, Peltari LM et al. Recurrent moderate-risk mutations in Finnish breast and ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 2019. doi: 10.1002/ijc.32309.
56. Girard E, Eon-Marchais S, Olaso R et al. Familial breast cancer and DNA repair genes: Insights into known and novel susceptibility genes from the GENESIS study, and implications for multigene panel testing. *Int J Cancer* 2019; 144(8): 1962–1974. doi: 10.1002/ijc.31921.
57. Decker B, Allen J, Luccarini C et al. Rare, protein-truncating variants in ATM, CHEK2 and PALB2, but not XRCC2, are associated with increased breast cancer risks. *J Med Genet* 2017; 54(11): 732–741. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104588.
58. Slavin TP, Maxwell KN, Lilyquist J et al. The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *NPJ Breast Cancer* 2017; 3: 22. doi: 10.1038/s41523-017-0024-8.
59. Schmidt MK, Hogervorst F, van Hien R et al. Age- and tumor subtype-specific breast cancer risk estimates for CHEK2*1100delC carriers. *J Clin Oncol* 2016; 34(23): 2750–2760. doi: 10.1200/JCO.2016.66.5844.
60. Southey MC, Goldgar DE, Winquist R et al. PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS. *J Med Genet* 2016; 53(12): 800–811. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-103839.
61. Liu Y, Liao J, Xu Y et al. A recurrent CHEK2 p.H371Y mutation is associated with breast cancer risk in Chinese women. *Hum Mutat* 2011; 32(9): 1000–1003. doi: 10.1002/humu.21538.
62. Weischer M, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A et al. Increased risk of breast cancer associated with CHEK2*1100delC. *J Clin Oncol* 2007; 25(1): 57–63. doi: 10.1200/JCO.2005.05.5160.
63. Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 2002; 71(2): 432–438. doi: 10.1086/341943.

64. Liang M, Zhang Y, Sun C et al. Association between CHEK2*1100delC and breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Mol Diagn Ther* 2018; 22(4): 397–407. doi: 10.1007/s40291-018-0344-x.
65. Han FF, Guo CL, Liu LH. The effect of CHEK2 variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *DNA Cell Biol* 2013; 32(6): 329–335. doi: 10.1089/dna.2013.1970.
66. Zhang B, Beeghly-Fadiel A, Long J et al. Genetic variants associated with breast-cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Lancet Oncol* 2011; 12(5): 477–488. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70076-6.
67. AlDubayan SH, Pyle LC, Gamulin M et al. association of inherited pathogenic variants in checkpoint kinase 2 (CHEK2) with susceptibility to testicular germ cell tumors. *JAMA Oncol* 2019. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.6477.
68. Obazee O, Archibugi L, Andriulli A et al. Germline BRCA2 K3326X and CHEK2 I157T mutations increase risk for sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2019; 145(3): 686–693. doi: 10.1002/ijc.32127.
69. Hallamies S, Peltari LM, Poikonen-Saksela P et al. CHEK2 c.1100delC mutation is associated with an increased risk for male breast cancer in Finnish patient population. *BMC Cancer* 2017; 17(1): 620. doi: 10.1186/s12885-017-3631-8.
70. Carlo MI, Mukherjee S, Mandelker D et al. Prevalence of germline mutations in cancer susceptibility genes in patients with advanced renal cell carcinoma. *JAMA Oncol* 2018; 4(9): 1228–1235. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.1986.
71. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF et al. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N Engl J Med* 2016; 375(5): 443–453. doi: 10.1056/NEJMoa1603144.
72. Siolek M, Cybulski C, Gasiór-Periczak D et al. CHEK2 mutations and the risk of papillary thyroid cancer. *Int J Cancer* 2015; 137(3): 548–552. doi: 10.1002/ijc.29426.
73. Wang Y, Dai B, Ye D. CHEK2 mutation and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(9): 15708–15715.
74. Hale V, Weischer M, Park JY. CHEK2 (*) 1100delC mutation and risk of prostate cancer. *prostate cancer* 2014; 2014: 294575. doi: 10.1155/2014/294575.
75. Ma X, Zhang B, Zheng W. Genetic variants associated with colorectal cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Gut* 2014; 63(2): 326–336. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304121.
76. Liu C, Wang QS, Wang YJ. The CHEK2 I157T variant and colorectal cancer susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(5): 2051–2055. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.5.2051.
77. Weischer M, Heerfordt IM, Bojesen SE et al. CHEK2*-1100delC and risk of malignant melanoma: Danish and German studies and meta-analysis. *J Invest Dermatol* 2012; 132(2): 299–303. doi: 10.1038/jid.2011.303.
78. Xiang HP, Geng XP, Ge WW et al. Meta-analysis of CHEK2 1100delC variant and colorectal cancer susceptibility. *Eur J Cancer* 2011; 47(17): 2546–2551. doi: 10.1016/j.ejca.2011.03.025.