

Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych



Magdalena Cechowska
ROZPRAWA DOKTORSKA

DZIEDZICZNE ASPEKTY RAKA JAJNIKA

Promotor pracy: prof. dr hab. n.med. Cezary Cybulski

Toruń 2023

*Składam serdeczne podziękowania
Panu Prof. dr hab. n. med. Cezaremu Cybulskiemu,
za okazaną życzliwość, cenne wskazówki i opiekę naukową w trakcie
przygotowywania niniejszej pracy.*

|

*Składam wyrazy wdzięczności
Pani mgr Joannie Jarkiewicz – Tretyn
Za wsparcie i możliwość realizacji pracy doktorskiej
w Pracowni Genetyki Nowotworów.*

*Dziękuję również Wszystkim pracownikom Poradni Genetyki Nowotworów
za okazaną pomoc i przyjazną atmosferę
w trakcie realizowania pracy doktorskiej.*

*Składam serdeczne podziękowania
Panu Prof. dr hab. Andrzejowi Tretynowi
za, życzliwe rady
przy opracowaniu niniejszej pracy.*

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	9
I. WSTĘP.....	11
1. ZACHOROWALNOŚĆ NA RAKA JAJNIKA	11
2. EPIDEMIOLOGIA RAKA JAJNIKA	11
2.1. Czynniki protekcyjne.....	12
2.1.1. Cięża	12
2.1.2. Karmienie piersią	12
2.1.3. Doustna antykoncepcja hormonalna	12
2.1.4. Aspiryna oraz inne niesteroidowe leki przeciwzapalne	12
2.1.5. Podwiązanie jajowodów oraz histerektomia	13
2.2. Czynniki zwiększające ryzyko	13
2.2.1. Wiek	13
2.2.2. Hormonalna terapia zastępcza	13
2.2.3. Endometrioza	13
2.2.4. Cukrzyca	14
3. OBRAZ KLINICZNY RAKA JAJNIKA	14
4. POCHODZENIE ORAZ KLASYFIKACJA HISTOLOGICZNA GUZÓW JAJNIKA	16
4.1. Guzy jajnika z nabłonka powierzchniowego i podścieliska.....	16
4.1.1. Guzy surowicze	17
4.1.2. Guzy śluzowe	17
4.1.3. Guzy endometrioidalne	18
4.1.4. Guzy jasnokomórkowe	18
4.1.5. Guzy z nabłonka przejściowego	18
4.2. Guzy jajnika z komórek sznurów płciowych i podścieliska.....	18
4.3. Guzy germinalne jajnika.....	19
4.4. Guzy przerzutowe jajnika	19

5.	PATOGENEZA RAKA JAJNIKA	20
5.1.	Teorie rozwoju raka jajnika	20
5.2.	Molekularne podłoże raka jajnika	21
5.3.	Dualistyczny model raka jajnika	22
5.3.1.	<i>KRAS</i> i <i>BRAF</i>	23
5.3.2.	<i>ERBB2</i>	23
5.3.3.	<i>PIK3CA</i>	24
5.3.4.	<i>TP53</i>	24
5.3.5.	<i>PTEN</i>	24
5.3.6.	<i>ARID1A</i>	25
5.3.7.	<i>CTNNB1</i>	25
5.4.	Naprawa DNA a rak jajnika	25
II.	DZIEDZICZNE ASPEKTY RAKA JAJNIKA	30
1.	DZIEDZICZNE ZESPOŁY RAKA JAJNIKA	31
1.1.	HOC i HBOC.....	31
1.2.	Zespół HNPCC (zespół Lyncha)	34
2.	WYBRANE GENY ZWIĄZANE Z RAKIEM JAJNIKA	36
2.1.	Charakterystyka genu oraz białka <i>BRCA1</i>	36
2.1.1.	Struktura	36
2.1.2.	Funkcje	37
2.1.3.	Mutacje w genie <i>BRCA1</i>	38
2.1.4.	Mutacje genu <i>BRCA1</i> na świecie	40
2.1.5.	Lokalizacja mutacji w genie <i>BRCA1</i> a ryzyko raka jajnika	41
2.1.6.	Rewersja mutacji	42
2.2.	Charakterystyka genu oraz białka <i>CHEK2</i>	42
2.2.1.	Struktura	42
2.2.2.	Funkcje	43

2.2.3. Mutacje w genie <i>CHEK2</i>	44
2.3. CHARAKTERYSTYKA GENU ORAZ BIAŁKA NBS1.....	46
2.3.1. Struktura	46
2.3.2. Funkcje	46
2.3.3. Mutacje w genie NBS1	47
2.4. Charakterystyka genu oraz białka PALB2	48
2.4.1. Struktura	48
2.4.2. Funkcje	49
2.4.3. Mutacje w genie <i>PALB2</i>	49
III. CEL PRACY.....	51
IV. MATERIAŁY	52
1. PACJENCI	52
1.1. Grupa badana.....	52
1.2. Grupa kontrolna.....	52
V. METODY.....	53
1. IZOLACJA DNA	53
1.1. Odczynniki do izolacji dna z krwi żyłnej	54
2. AMPLIFIKACJA	55
2.1. Odczynniki użyte do reakcji PCR.....	55
2.2. Odczynniki użyte do trawienia restrykcyjnego	56
2.3. Odczynniki użyte do elektroforezy.....	56
3. WYKRYWANIE BADANYCH WARIANTÓW METODĄ RFLP-PCR.....	57
3.1. <i>BRCA1</i> C61G (c.181T>G).....	57
3.2. <i>CHEK2</i> I157T (c.470T>C).....	58
3.3. <i>CHEK2</i> IVS2+1G>A (c.444+1G>A)	60
4. WYKRYWANIE BADANYCH WARIANTÓW METODĄ AS-PCR	61
4.1. <i>BRCA1</i> 5382insC (c.5266dupC).....	61

4.2.	<i>BRCA1</i> 4153delA (c.4035delA)	62
4.3.	<i>BRCA1</i> 185delAG (68_69delAG)	64
4.4.	<i>BRCA1</i> 3819del5 (3700_3704delGTAAA)	65
4.5.	<i>CHEK2</i> 1100delC	66
4.6.	<i>NBS1</i> 657del5 (c.657_661delACAAA).....	68
4.7.	<i>PALB2</i> 172_175 delTTGT.....	69
4.8.	<i>PALB2</i> 509_510delGA	70
4.9.	<i>CHEK2</i> del5395.....	71
5.	ANALIZA STATYSTYCZNA	73
VI.	WYNIKI.....	73
1.	Mutacje w genie <i>BRCA1</i>	73
1.1	Wariant 5382insC	73
1.2	Wariant 4153delA.....	74
1.3.	Wariant C61G.....	75
1.4.	Wariant 185delAG.....	75
1.5.	Wariant 3819del5.....	76
1.6.	Podsumowanie.....	76
2.	Mutacje w genie <i>CHEK2</i>	77
2.1.	Wariant I157T.....	77
2.2.	Warianty IVS2+1G>A, 1100delC oraz del5395	78
3.	Mutacje w genie <i>PALB2</i>	79
4.	Mutacja w genie <i>NBS1</i>	80
5.	ZWIĄZEK MUTACJI W GENACH <i>BRCA1</i> , <i>CHEK2</i> , <i>PALB2</i> ORAZ <i>NBS1</i> Z RAKIEM JAJNIKA	83
5.1.	Gen <i>BRCA1</i>	83
5.2	Gen <i>CHEK2</i>	84
5.3.	Gen <i>PALB2</i>	85

5.4. Gen <i>NBS1</i>	85
VII. DYSKUSJA	87
VIII. PODSUMOWANIE WYNIKÓW	103
IX. WNIOSKI	104
X. STRESZCZENIE	105
XI. ABSTRACT.....	106
XII. LITERATURA.....	107
XIII. ZAŁĄCZNIKI.....	141
1. WYKAZ TABEL	141
2. WYKAZ RYCIN.....	141

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BER	naprawa poprzez wycinanie zasad
COX-1	cyklooksygenaza-1
COX-2	cyklooksygenaza-2
CRP	białko C-reaktywne
CXCR4	receptor dla chemokiny SDF-1
DSBs	pęknięcią podwójnej nici
EDTA-K ₂	wersenian dwupotasowy
FSH	folitropina, hormon folikulotropowy
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
HBOC	dziedziczny rak piersi piersi i jajnika
HG-SOC	niskoźródnicowane raki surowicze jajnika
HNPCC	dziedziczny niepolipowaty rak jelita grubego
HOC	dziedziczny rak jajnika
HPV	wirus brodawczaka ludzkiego
HR	rekombinacja homologiczna
IFN α	interferon α
IGF-1	insulinopodobny czynnik wzrostu-1
IGF-2	insulinopodobny czynnik wzrostu-2
IL-1	interleukina-1
IL-1 β	interleukina-1 β
IL-3	interleukina-3
IL-6	interleukina-6
IL-8	interleukina-8
IL-10	interleukina-10
LG-SOC	dobrze źródnicowane raki surowicze jajnika
LH	lutropina, hormon luteinizujący
MCP-1	białko chemotaktyczne monocytów typu 1
MMP-9	metaloproteinaza-9
MMR	naprawa niesparowanych zasad
NER	naprawa poprzez wycinanie nukleotydów
NF κ B	jądrowy czynnik transkrypcyjny κ B
NHEJ	niehomologiczne łączenie końców

NK	komórki „naturalni zabójcy”
PARP	polimeraza poli(ADP-rybozy)
PDGF	płytkopochodny czynnik wzrostu
RJG	rak jelita grubego
RNS	reaktywne formy azotu
ROS	reaktywne formy tlenu
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu
SSBs	pęknięcia pojedynczej nici
STIC	komórki nowotworowe strzępek jajowodu
TCC	guzy z nabłonka przejściowego
TGF β	czynnik wzrostu nowotworów β
TNF α	czynnik nekrozy nowotworów α
tPA	tkankowy aktywator plazminogenu
uPA	tkankowy aktywator plazminogenu typu urokinazy
VEGF	śródbłonkowo-naczyniowy czynnik wzrostu

I. WSTĘP

1. ZACHOROWALNOŚĆ NA RAKA JAJNIKA

Rak jajnika jest siódmym co do częstości nowotworem występującym u kobiet na całym świecie i przyczyną największej liczby zgonów spośród nowotworów żeńskich narządów płciowych [1]. W 2018 roku odnotowano 296 851 nowych przypadków oraz 184 799 zgonów spowodowanych tym schorzeniem. Zapadalność na raka jajnika zależy od położenia geograficznego i statusu socjo-ekonomicznego. Najwięcej przypadków notuje się w krajach o wysokim wskaźniku rozwoju społecznego [2]. W Europie najczęściej zachorowań stwierdza się m.in. na Litwie, Łotwie, w Polsce, Bułgarii, Serbii oraz Czarnogórze. Litwa, Łotwa oraz Polska charakteryzują się również najwyższym wskaźnikiem śmiertelności [3]. Przyczyną około dwóch trzecich spośród wszystkich zgonów spowodowanych nowotworem jajnika jest rak surowiczy o niskim stopniu zróżnicowania [4].

W roku 2017 nowotwór złośliwy jajnika znalazł się na piątym miejscu pod względem częstości zachorowań na nowotwory złośliwe wśród kobiet w Polsce. Dotyczył 3775 kobiet, u około 80% wystąpił po 50 roku życia. Najwięcej zachorowań odnotowano w województwach: śląskim, łódzkim, podlaskim, podkarpackim oraz kujawsko-pomorskim. Z powodu nowotworów złośliwych jajnika w Polsce w roku 2017 zmarło 2670 kobiet. Najwięcej przypadków śmiertelnych zanotowano w województwach: małopolskim, łódzkim, pomorskim, podkarpackim oraz świętokrzyskim [5].

2. EPIDEMIOLOGIA RAKA JAJNIKA

Istnieje wiele czynników, które w różny sposób związane są z ryzykiem rozwoju raka jajnika. Należą do nich czynniki środowiskowe oraz osobnicze. Wyróżnia się takie, które wykazują działanie protekcyjne, jak i te, które to ryzyko zwiększają [6].

2.1. Czynniki protekcyjne

2.1.1. Cięża

Wykazano, że ciąża wiąże się z obniżonym ryzykiem raka jajnika. Efekt protekcyjny jest wprost proporcjonalny do liczby przeżytych ciąż. Każda, prawidłowa pod względem długości, obniża ryzyko raka jajnika o 19% [7, 8].

2.1.2. Karmienie piersią

Na podstawie wielu badań stwierdzono protekcyjny wpływ karmienia piersią na ryzyko rozwoju raka jajnika [9]. Ochronny wpływ laktacji może być spowodowany znaczną redukcją poziomu hormonów gonadotropowych w tym okresie, zwłaszcza LH oraz zahamowaniem owulacji [10]. Statystycznie istotne obniżenie ryzyka raka jajnika obserwuje się w przypadku kobiet, które karmiły piersią przez okres dłuższy niż 12 miesięcy [9].

2.1.3. Doustna antykoncepcja hormonalna

Stwierdzono, że przyjmowanie doustnej antykoncepcji hormonalnej zmniejsza ryzyko rozwoju raka jajnika. Ustalono, że każde 5 lat stosowania środków hormonalnych zmniejsza ryzyko raka jajnika o blisko 30%. Efekt protekcyjny, występuje jeszcze przez okres 30 lat po zaprzestaniu antykoncepcji hormonalnej [11]. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że ryzyko rozwoju raka jajnika jest mniejsze także wśród nosicielek mutacji genów *BRCA1* i *BRCA2* stosujących hormonalne środki antykoncepcyjne [12]. Ochronne działanie środków antykoncepcyjnych sprowadza się głównie do zahamowania owulacji oraz wydzielania hormonów gonadotropowych (FSH, LH), które stymulując proliferację komórek i blokując apoptozę mogą być przyczyną rozwoju raka jajnika [13].

2.1.4. Aspiryna oraz inne niesteroidowe leki przeciwzapalne

Wykazano, iż codzienne oraz regularne (przynajmniej raz w tygodniu) przyjmowanie aspiryny oraz innych niesteroidowych leków przeciwzapalnych wiąże się z około 20-30% niższym ryzykiem rozwoju raka jajnika. Jest to spowodowane zwłaszcza redukcją stanu zapalnego towarzyszącemu procesowi owulacji oraz występującemu

w przebiegu endometriozy. Mechanizm oparty jest prawdopodobnie na hamowaniu przez niesteroidowane leki przeciwzapalne enzymu COX-1 wykazującego znaczną nadekspresję w raku jajnika [14, 15].

2.1.5. Podwiązanie jajowodów oraz histerektomia

Stwierdzono, że podwiązanie jajowodów zmniejsza ryzyko wystąpienia raka endometroidalnego, jasnokomórkowego oraz surowiczego o niskim stopniu zróżnicowania. Efekt ten jest natomiast słabszy w przypadku guzów surowicznych o wysokim stopniu zróżnicowania, nie zaobserwowano go dla raków śluzowych. Ryzyko raka jajnika jest również obniżone w przypadku kobiet, u których przeprowadzono histerektomię [16, 17].

2.2. Czynniki zwiększające ryzyko

2.2.1. Wiek

Rak jajnika występuje najczęściej u kobiet w okresie pomenopauzalnym. Szczyt zachorowań przypada po 65 roku życia. Pięcioletnie przeżycie jest również zależne od wieku pacjentki. Poniżej 45 roku życia wynosi 70%, a powyżej 75 roku życia jedynie 20% [18, 8].

2.2.2. Hormonalna terapia zastępcza

Wykazano pozytywną korelację między stosowaniem hormonalnej terapii zastępczej, zwłaszcza estrogenowej, a ryzykiem raka jajnika. Najsilniejszy związek zaobserwowano dla raków surowicznych oraz endometroidalnych. Mechanizm tej zależności nie został jak dotąd do końca poznany. Uważa się jednak, że może on być związany z wpływem estrogenów na profilerację komórek nabłonka jajników [19].

2.2.3. Endometrioza

Endometrioza jest schorzeniem polegającym na ektopowym występowaniu błony śluzowej macicy. Stwierdzono, iż na podłożu endometriozy jajnika może dochodzić do transformacji nowotworowej i tworzenia się w szczególności guzów endometroidalnych oraz jasnokomórkowych. Związane jest to prawdopodobnie

z wysokim stężeniem estrogenów towarzyszącym endometriozie, mutacjami w genie *ARID1A* lub obecnością w cystach endometrialnych żelaza zwiększającego poziom stresu oksydacyjnego [20].

2.2.4. Cukrzyca

Stwierdzono związek między cukrzycą a ryzykiem rozwoju wielu nowotworów, w tym również raka jajnika. Wykazano, że w przypadku raka jajnika stanowi ona umiarkowany czynnik ryzyka [21]. Pozytywna korelacja może być wynikiem zwiększonego stężenia IGF-I, IGF-II, estrogenów oraz cytokin prozapalnych: IL-6, TNF α towarzyszących cukrzycy [22]. Zaobserwowano ponadto, że okres przeżycia wśród kobiet cierpiących równocześnie na raka jajnika oraz cukrzycę jest krótszy w porównaniu do pacjentek chorych, ale o prawidłowym poziomie glikemii [22, 23].

3. OBRAZ KLINICZNY RAKA JAJNIKA

Pomimo rozwoju technik diagnostycznych, rozpoznanie raka jajnika we wczesnym stadium przysparza wiele trudności. Związane jest to ze zwykle długim subklinicznym etapem choroby, a także niewielką dostępnością jajników dla badania fizykalnego, zwłaszcza w okresie około- oraz pomenopauzalnym. Również ze względu na mało specyficzne objawy, do których należą m.in. dyskomfort w podbrzuszu, ból w obrębie miednicy, utrata apetytu, wzdęcia, zaparcia, uczucie parcia na mocz, nieregularne miesiączki czy plamienia, nowotwór jajnika określany jest często mianem „cichego zabójcy” [24, 25, 8]. U ponad 30% chorych pacjentek dochodzi do nagromadzenia płynu w jamie otrzewnej, powiększenia obwodu brzucha i wystąpienia uczucia pełności. Pojawienie się wodobrzusza wiąże się z gorszą prognozą i zdecydowanym obniżeniem standardu życia. Prowadzi do osłabienia funkcjonowania układów: oddechowego, moczowego oraz pokarmowego. Płyn wypełniający jamę otrzewnej stanowi ponadto nie tylko doskonałe mikrośrodowisko dla rozwoju guza i umożliwiające tworzenie przerzutów, zapewnia także oporność na leczenie. Zawiera duże ilości limfocytów, cytokin (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10) chemokin (CXCR4, MMP9) oraz komórek rakowych [26]. Stwierdza się, że jedynie około 25% przypadków raka jajnika wykrywanych jest we wczesnej fazie zaawansowania (stadium I lub II wg FIGO - *International Federation of Gynecology and Obstetrics*) (Tab. 1) [27]. 70% wykrytych guzów jajnika znajduje się już w III lub IV stadium zaawansowania, co znacznie pogarsza

szanse na 5 - letnie przeżycie [28, 29]. Pięcioletni wskaźnik przeżycia dla pacjentek w I stadium choroby wg FIGO wynosi 70-80%, natomiast w przypadku chorych w stadium IV spada do 15% [30].

Tab. 1. Klasyfikacja kliniczno-patologiczna guzów jajnika (wg FIGO) [27, zmodyfikowano].

<p>I Guz ograniczony do jajników</p> <p>I A Guz jednego jajnika bez naciekania jego torebki</p> <p>I B Guz obu jajników bez naciekania torebki</p> <p>I C Guz jednego lub obu jajników oraz któryś z następujących stanów: przerwana torebka, komórki nowotworowe na powierzchni guza, komórki nowotworowe w jamie otrzewnej (w płynie z wodobrzusza lub płukania otrzewnej)</p>
<p>II Guz obejmuje jeden lub oba jajniki i nacieka tkanki miednicy mniejszej</p> <p>II A Naciekanie macicy i jajowodów</p> <p>II B Naciekanie innych tkanek miednicy</p> <p>III C Naciekanie tkanek miednicy mniejszej (II A lub II B) i komórki nowotworowe w jamie otrzewnej (w płynie z wodobrzusza lub płukania otrzewnej)</p>
<p>III Guz obejmuje jeden lub oba jajniki, przerzuty w otrzewnej poza miednicą mniejszą potwierdzone makroskopowo i/lub przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych</p> <p>IIIA Przerzuty w otrzewnej poza miednicą mniejszą potwierdzone mikroskopowo</p> <p>IIIB Przerzuty w otrzewnej stwierdzone makroskopowo</p> <p>IIIC Przerzuty w otrzewnej o średnicy powyżej 2 cm i/lub przerzuty do okolicznych węzłów chłonnych</p>
<p>IV Przerzuty odległe (z wyłączeniem przerzutów otrzewnowych)</p>

4. POCHODZENIE ORAZ KLASYFIKACJA HISTOLOGICZNA GUZÓW JAJNIKA

Guzy jajnika wykazują dużą różnorodność zarówno pod względem biologicznym, jak i histopatologicznym. Pierwsza teoria dotycząca pochodzenia raka jajnika narodziła się w roku 1872. Zgodnie z tą koncepcją do zapoczątkowania transformacji nowotworowej dochodzić miało w komórkach mezotelialnego nabłonka pokrywającego jajnik (OSE). Występowanie wielu typów histologicznych tłumaczono jako skutek ich wtórnego różnicowania się. Uważano, iż proces kancerogeny przebiegał w tzw. torbielach inkluzyjnych powstałych w wyniku włączenia komórek epitelialnych jajnika do jego podścieliska w trakcie owulacji (przejście epitelialno-mezenchymalne). Oddziaływanie wysokich stężeń cytokin i czynników wzrostowych wydzielanych przez komórki podścieliska na torbiele inkluzyjne miało prowadzić do ich rozrostu i neoplazji [31]. Teoria ta została poddana w wątpliwość w roku 1998. Stwierdzono wówczas, iż komórki wielu typów histologicznych raka jajnika nie przypominają komórek mezotelialnych pokrywających jajnik. Upodabniają się natomiast do komórek nabłonka jajowodu, szyjki macicy czy endometrium [32]. Analizy profilu ekspresji genów typów histologicznych guzów jajnika także wykazały podobieństwa do profilu genów ulegających ekspresji w prawidłowych nabłonkach różnych narządów [33].

Według obowiązującej do dziś klasyfikacji, wyróżnia się trzy podstawowe typy guzów jajnika: guzy z nabłonka powierzchniowego i podścieliska (*surface epithelial - stromal tumours*), guzy z komórek sznurów płciowych i podścieliska (*sex-cord stromal tumours*) oraz guzy germinalne (*germ cell tumour*) [34].

4.1. Guzy jajnika z nabłonka powierzchniowego i podścieliska

Guzy jajnika wywodzące się z nabłonka powierzchniowego i podścieliska stanowią około 60% wszystkich nowotworów jajnika oraz 90% postaci złośliwych. Poza postaciami złośliwymi (gruczolakoraki) wśród tego typu guzów wyróżnia się postaci łagodne oraz o granicznej złośliwości. Występują najczęściej wśród kobiet w średnim oraz starszym wieku. Większość to guzy sporadyczne, genetyczne podłoże choroby stwierdza się jedynie w 5-10% przypadków. Około 70-75% wykrytych przypadków znajduje się w zaawansowanym stadium klinicznym [34, 27]. Do grupy tej należą guzy

surowicze, śluzowe, endometrioidalne, jasnokomórkowe oraz guzy z nabłonka przejściowego [34].

4.1.1. Guzy surowicze

Guzy surowicze jajnika (*serous tumors*) wywodzą się z komórek nabłonka jajowodowego. Złośliwe guzy surowicze stanowią blisko połowę wszystkich nowotworów złośliwych jajnika. Pojawiają się najczęściej w szóstej dekadzie życia, w 2/3 przypadków są guzami obustronnymi [34]. Raki surowicze mogą wykazywać różny stopień zróżnicowania histologicznego. Około 90% wszystkich raków surowicznych to wysoce agresywne raki niskozróżnicowane (*high-grade serous ovarian carcinoma*, HG-SOC). Pozostałą część stanowią raki dobrze zróżnicowane (*low-grade serous ovarian carcinoma*, LG-SOC) charakteryzujące się znacznie lepszym rokowaniem niż HG-SOC [35]. Istnieją dwa mechanizmy, które mogą prowadzić do rozwoju raka surowiczego z nabłonka jajowodu. Pierwszy z nich zakłada, że złuszczone komórki strzępek jajowodu mogą ulec implantacji w miejscu gdzie wskutek owulacji naruszona zostaje ciągłość nabłonka jajowodu. Włączenie takich komórek do torbieli inkluzyjnych i poddanie ich działaniu lokalnego środowiska może prowadzić do transformacji nowotworowej. Drugi mechanizm zakłada implantację w jajniku już zezłośliwionych komórek strzępek jajowodu (*serous tubal intraepithelial carcinoma- STIC*) [36, 37]. Za drugą teorią przemawia fakt, iż u kobiet obciążonych dziedziczną predyspozycją do raka jajnika, wykrywa się również złośliwe zmiany w obrębie jajowodu [38]. Kolejnym dowodem potwierdzającym tę koncepcję jest obecność takich samych zmian molekularnych (utrata funkcji białek BRCA1/BRCA2, mutacje w genie *TP53*) w niskozróżnicowanym raku surowicznym jajnika oraz raku surowicznym jajowodu [39].

4.1.2. Guzy śluzowe

Pochodzenie guzów śluzowych jajnika (*mucinous tumors*) nie jest do końca wyjaśnione. Przypuszcza się, że mogą one wywodzić się z nabłonka przejściowego zlokalizowanego na granicy jajowodu i otrzewnej [37]. Mogą również przypominać komórki nabłonka jelitowego lub komórki gruczołowe kanału szyjki macicy [34, 37]. Złośliwe guzy śluzowe odpowiadają za 5-10% wszystkich nowotworów złośliwych jajnika. Najczęściej występują w szóstej dekadzie życia, w 6-20% przypadków są guzami

obustronnymi [34]. Zaawansowane stadia raka śluzowego wiążą się ze złym rokowaniem [40].

4.1.3. Guzy endometrioidalne

Komórki guzów endometrioidalnych jajnika (*endometrioid tumors*) wykazują podobieństwo do komórek nabłonka gruczołowego endometrium. Złośliwe guzy endometrioidalne stanowią 10-25% wszystkich nowotworów złośliwych jajnika. W większości przypadków dotyczą kobiet w szóstej dekadzie życia, charakteryzują się pomyślniejszą prognozą niż guzy surowicze oraz śluzowe. Guzy obustronne występują w około 15-30% przypadków. Guzy endometrioidalne mogą występować równocześnie z endometriozą i rakiem endometrium [34]. Wykazano, iż podwiązanie jajowodów i histerektomia obniżają ryzyko wystąpienia raka endometrioidalnego [41].

4.1.4. Guzy jasnokomórkowe

Guzy jasnokomórkowe jajnika (*clear cell tumors*) mogą rozwijać się z komórek gruczołowych kanału szyjki macicy lub ognisk endometriozy. Większość guzów jasnokomórkowych jest guzami złośliwymi, które odpowiadają za 4-5% wszystkich nowotworów złośliwych jajnika. Diagnoza pojawia się najczęściej w piątej dekadzie życia. Około 2/3 pacjentek z guzem jasnokomórkowym stanowią nieródki, u 50-70% z nich stwierdza się także endometriozę. Guzy jasnokomórkowe charakteryzują się najkrótszym 5-letnim okresem przeżycia spośród wszystkich guzów nabłonkowych [34]. Gorsza prognoza związana jest z opornością guzów na leczenie platynami [42].

4.1.5. Guzy z nabłonka przejściowego

Guzy z nabłonka przejściowego (*transitional cell tumors -TCC*) to guzy, których komórki fenotypowo przypominają komórki nabłonka urotelialnego. Stanowią mniej niż 2% wszystkich nowotworów jajnika. Rokowanie w przypadku guzów TCC jest najbardziej pomyślne spośród wszystkich guzów nabłonkowych jajnika [34, 43].

4.2. Guzy jajnika z komórek sznurów płciowych i podścieliska

Guzy jajnika wywodzące się z komórek sznurów płciowych (*sex-cord stromal tumors*) zbudowane są z komórek warstwy ziarnistej i komórek osłonkowych pęcherzyka

Graafa, komórek Leydiga, komórek Sertoliego a także komórek stromalnych. Stanowią około 8% wszystkich nowotworów jajnika oraz około 7% wszystkich guzów złośliwych jajnika. Należą do nich m.in. ziarniszczak (*granulosa cell tumour*), włókniak (*fibroma*) oraz otoczkowiak (*thecoma*) [34].

4.3. Guzy germinalne jajnika

Nowotwory germinalne (zarodkowe) jajnika (*germ cell tumor*) zbudowane są z komórek wywodzących się z pierwotnych komórek rozrodczych. Złośliwe nowotwory zarodkowe stanowią 3-5% wszystkich nowotworów złośliwych jajnika. Najczęściej spotykane są wśród dzieci i młodzieży oraz u młodych kobiet. U osób w średnim wieku i starszych występują niezmiernie rzadko, zdecydowana większość z nich to zmiany łagodne. Wśród złośliwych guzów germinalnych najbardziej rozpowszechnione są rozrodczaki (*dysgerminoma*), charakteryzują się pomyślnym rokowaniem. Drugim co do częstości wśród guzów germinalnych są raki pęcherzyka żółtkowego. Cechuje je wysoka złośliwość oraz zdolność do wczesnego przerzutowania. Zdarza się, że występują równocześnie z innym typem guza germinalnego. Diagnozuje się je zwykle w drugiej lub trzeciej dekadzie życia. Do wysoce złośliwych guzów germinalnych o dużym potencjale przerzutowania zalicza się także guzy embrionalne (*embryonal carcinoma*) oraz nabłoniaki kosmówkowe (*choriocarcinoma*). Do łagodnych guzów zarodkowych zalicza się potworniaki (*teratoma*). Zbudowane są z tkanek wywodzących się z dwóch lub trzech listków zarodkowych (ektodermy, endodermy, mezodermy) lub tylko z ektodermy albo endodermy. Do transformacji złośliwej dochodzi w 1-2% przypadków potworniaków [34].

4.4. Guzy przerzutowe jajnika

Około 6-20% guzów jajnika, które klicznie manifestują się objawami pierwotnej choroby nowotworowej, okazuje się guzami przerzutowymi [27]. Źródłem przerzutów nowotworowych do jajnika są guzy: żołądka, jelita, trzustki, wyrostka robaczkowego, piersi, trzonu macicy, płuc oraz skóry. W większości przypadków, odpowiednio 30% oraz 20% postaci przerzutowych pochodzi z żołądka i piersi. Guzy metastatyczne są najczęściej obustronne (około 70% przypadków), mniejsze niż 9 cm, naciekają naczynia krwionośne oraz chłonne, a na ich powierzchni oraz w przekroju znajdują się liczne, małe guzki. Charakteryzuje je także luteinizacja podścieliska. Do przerzutów jajnika może

dochodzić różnymi drogami, najczęściej poprzez naczynia chłonne, krwionośne, światło jajowodu, a także za pośrednictwem płynu z jamy otrzewnej [34, 44].

Przerzuty raka jajnika do innych narządów są również często spotykanym zjawiskiem. Do rozsiewu dochodzi głównie wskutek złuszczenia się pojedynczych komórek guza lub ich skupisk, tzw. sferoidów do jamy otrzewnej. W wyniku fizjologicznych ruchów płynu otrzewnowego zezłóśliwione komórki mogą kolonizować jamę otrzewnej, a także sieć. W obrębie otrzewnej najczęściej jest to prawy fragment przepony oraz krezka jelita [45]. Rak jajnika może szerzyć się także drogą naczyń limfatycznych do miednicy mniejszej i węzłów chłonnych paraaortalnych. Rozsiew poprzez naczynia krwionośne występuje rzadko i jest przypisany zaawansowanemu stadium choroby, zajęte mogą zostać wątroba, płuca oraz pierś [46, 47].

5. PATOGENEZA RAKA JAJNIKA

5.1. Teorie rozwoju raka jajnika

Rak jajnika jest heterogenną chorobą o niezwykle złożonej patogenezie. Duże znaczenie w rozwoju tej choroby przypisuje się czynnikom osobniczym, środowiskowym i genetycznym. Na przestrzeni lat powstawało wiele teorii próbujących wyjaśnić przyczynę tego schorzenia, niestety żadna z nich nie dała jednoznacznej odpowiedzi. Według jednej z hipotez tzw. owulacyjnej jajczkowanie i związane z nim naruszenie ciągłości nabłonka jajnika, towarzyszące temu zjawisku nasilone procesy naprawcze, a także tworzenie cyst inkluzyjnych mogą prowadzić do transformacji nowotworowej [48]. Proces nowotworzenia może być także inicjowany przez cofającą się do miednicy krew miesiączkową zawierającą komórki endometrium oraz erytrocyty. W wyniku hemolizy erytrocytów przez makrofagi dochodzi do uwolnienia hemu i żelaza, co znacznie zwiększa stres oksydacyjny. Działanie reaktywnych form tlenu ma działanie genotoksyczne i jest szczególnie niebezpieczne dla komórek, w których występuje mutacja genu *TP53* [49, 50]. Teoria gonadotropinowa zakłada, że rak jajnika może być wywołany wysokim poziomem hormonów gonadotropowych – FSH oraz LH, wykazujących działanie proliferacyjne i antyapoptotyczne na komórki nabłonkowe jajnika. Podwyższone stężenie gonadotropin występuje podczas owulacji, a także w okresie menopauzalnym i wywołane jest wygasaniem czynności jajników [51]. Według kolejnej teorii ryzyko raka jajnika może być związane z wysokim stężeniem

androgenów obecnych u kobiet w okresie menopauzy, kobiet otyłych oraz cierpiących na zespół policystycznych jajników [52]. Ważną rolę w patogenezie raka jajnika przypisuje się także procesowi zapalnemu towarzyszącemu endometriozie, owulacji, otyłości oraz przetrwałym infekcjom w obrębie miednicy mniejszej, spowodowanymi m.in. przez *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* oraz wirusami HPV [53, 54]. Proces zapalny wiąże się z migracją i aktywacją makrofagów, neutrofilów, limfocytów, a także komórek NK oraz nasiloną proliferacją fibroblastów oraz komórek nabłonkowych. Aktywacja komórek układu odpornościowego związana jest z wzmożoną produkcją cytokin prozapalnych, takich jak: IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, TNF α , IFN α , PDGF, TGF β czy GM-CSF. Aktywowane makrofagi i komórki NK wydzielają duże ilości reaktywnych rodników tlenowych (ROS) oraz reaktywnych form azotu (RNS), które z jednej strony mogą być używane do zwalczania patogenów, z drugiej natomiast odpowiadają za powstawanie uszkodzeń DNA [55, 54]. W przebiegu procesu zapalnego dochodzi również do aktywacji jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF κ B, czego skutkiem jest zwiększona synteza substancji o działaniu prozapalnym i proangiogennym, takich jak: CRP, COX-2, IL-8, MCP-1, VEGF, tPA, uPA [56, 57]. Stwierdzono, że proces zapalny odgrywa kluczową rolę we wszystkich etapach nowotworzenia, a także podczas procesu przerzutowania [54].

5.2. Molekularne podłoże raka jajnika

Rak jajnika, również pod względem molekularnym, jest chorobą bardzo złożoną oraz heterogenną. Guzy reprezentujące ten sam typ histologiczny mogą wykazać u różnych pacjentów odmienny profil genetyczny [58].

Wyróżnia się dwie główne grupy genów, które biorą udział w transformacji nowotworowej. Należą do nich protoonkogeny oraz geny supresorowe. W prawidłowych warunkach protoonkogeny zaangażowane są we wzrost, proliferację oraz różnicowanie komórek. Uczestniczą także w przenoszeniu sygnałów transdukcyjnych i pełnią rolę czynników transkrypcyjnych na poziomie jądra. Mutacje protoonkogenów skutkują powstaniem onkogenów, nasiloną ekspresją onkoprotein bądź ich nieprawidłowych form, co skutkuje nadmierną proliferacją komórek. Onkogeny wykazują charakter dominujący, co oznacza, że mutacja już w jednym z alleli genu odpowiada za promowanie rozwoju guza. Przykładem onkogeny jest *KRAS*. Geny supresorowe są negatywnymi regulatorami cyklu komórkowego. W przeciwieństwie do protoonkogenów, do utraty ich funkcji

konieczna jest mutacja w obu allelach danego genu. Utrata funkcji genów supresorowych prowadzi do nadmiernych, niekontrolowanych podziałów komórkowych w sytuacji kiedy cykl komórkowy powinien zostać zatrzymany, np. w przypadku uszkodzeń nici DNA. Wyłączenie obu alleli genu tłumaczy tzw. „teoria dwóch uderzeń” autorstwa Alberta Knudsona. Pierwsza zmiana genetyczna (pierwsze uderzenie) obecna jest u jednego z rodziców i może zostać przekazana potomstwu jako cecha autosomalna dominująca. „Drugie uderzenie” może być mutacją somatyczną lub wynikiem wyciszenia genu poprzez mechanizmy epigenetyczne. Przykładem genów supresorowych są: *TP53*, *PTEN*, *BRCA1*, *PALB2*, *CHEK2*, *NBS1* [59-63].

5.3. Dualistyczny model raka jajnika

Na bazie licznych badań molekularnych i morfologicznych opracowany został tzw. dualistyczny model raka jajnika, na podstawie którego raki jajnika zakwalifikowano do dwóch grup, nazwanych: typ I oraz typ II. Guzy do nich należące różnią się cechami histopatologicznymi, rokowaniem oraz profilem genetycznym. Raki reprezentujące typ I są guzami dobrze zróżnicowanymi. Wywodzą się z torbielakogruczolaków (*cystadenoma*) oraz gruczolakowłókniaków (*adenofibroma*). Charakteryzują się powolnym wzrostem, dużym rozmiarem, rozpoznawane są we wcześniejszych stadiach zaawansowania klinicznego, kiedy proces nowotworowy ograniczony jest tylko do jajników. W większości przypadków rokowanie jest pomyślne. Należą do nich dobrze zróżnicowane raki surowicze oraz raki endometrioidalne, raki jasnokomórkowe, raki śluzowe, a także złośliwe guzy Brennera. Typ II obejmuje raki słabo zróżnicowane, które rozwijają się prawdopodobnie *de novo* z nabłonka powierzchniowego oraz cyst inkluzyjnych jajnika. Wyróżnia je szybki wzrost, wysoka agresywność oraz zdolność do tworzenia przerzutów. Rozpoznawane są w późnych stadiach klinicznego zaawansowania. Do typu II zalicza się słabo zróżnicowane raki surowicze oraz raki endometrioidalne, mięsakoraki i raki niezróżnicowane. Raki typu II odpowiadają za około 75% wszystkich nabłonkowych raków jajnika [64, 36]. Istotną cechą odróżniająca od siebie typ I i typ II raka jajnika jest ich profil genetyczny. Wykazano, iż raki należące do typu I są zwykle stabilne pod względem genetycznym, rzadko charakteryzują się mutacjami w genie *TP53*. W zależności od typu histologicznego, raki typu I wykazują mutacje somatyczne w różnych genach. Około 70% dobrze zróżnicowanych raków surowicznych odznacza się mutacjami w genach: *KRAS*, *BRAF*

oraz *ERBB2*. Dobrze zróżnicowane raki endometrioidalne wykazują zmiany w genach zaangażowanych w szlak Wnt, takich jak: *CTNNB1*, *PIK3CA* oraz *PTEN*. Dla raków jasnokomórkowych charakterystyczne są mutacje aktywujące *PIK3CA*, a także mutacje w genach *ARID1A* oraz *PTEN*, natomiast dla około 50% raków śluzowych warianty w genie *KRAS*. Profil genetyczny dla guzów Brennera nie został dotychczas w pełni określony [36, 37]. W przypadku 80% guzów należących do typu II obserwowane są mutacje w genie *TP53*. Często spotykane są również zmiany ekspresji białka *BRCA1* wynikające z mutacji w genie lub metylacji jego promotora. Bardzo rzadko występują natomiast zmiany w genach charakterystyczne dla typu I [64, 37]. Stwierdzono, że mutacje germinalne w genach *BRCA1* oraz *BRCA2* obecne są we wszystkich typach histologicznych guza. Najczęściej występują w guzach surowicznych, najrzadziej w guzach śluzowych [65].

5.3.1. *KRAS* i *BRAF*

Geny *KRAS* i *BRAF* zlokalizowane są odpowiednio na chromosomach 12 i 7. Zaliczane są do protoonkogenów, a ich produkty białkowe są składnikami ścieżki sygnałowej RAS/MAPK. Odpowiadają za przekazywanie sygnałów wzrostowych z powierzchni komórki do jej jądra, a także biorą udział w różnicowaniu komórek. Mutacje somatyczne *KRAS* i *BRAF* prowadzą do podwyższonej aktywności obu białek, która nie ustaje nawet w przypadku braku sygnałów wzrostowych. Skutkiem jest niepoohamowana proliferacja komórkowa, która może prowadzić do transformacji nowotworowej. Mutacje somatyczne w genie *KRAS*, będące mutacjami punktowymi, zlokalizowane są najczęściej w kodonach 12, 13 (exon 2) oraz rzadziej w kodonie 61 (exon 3), natomiast w przypadku genu *BRAF*, 80% wszystkich mutacji występuje w exonie 15. Najczęściej spotykaną jest V600E polegająca na podstawieniu waliny glutaminą w kodonie 600. Zmiany w genach *KRAS* oraz *BRAF* obserwowane są również w raku jelita grubego [66-68].

5.3.2. *ERBB2*

Gen *ERBB2*, zwany także *HER2/neu* należy do protoonkogenów i zlokalizowany jest na chromosomie 17. Koduje białko transbłonowe o aktywności kinazy tyrozynowej i funkcjonuje jako receptor dla czynników wzrostu. Amplifikacja genu prowadzi do jego nadekspresji. Zaburzenia w funkcjonowaniu białka *HER2* związane są z nadmierną

proliferacją, a także migracją komórek. Poza rakiem jajnika nadekspresja receptora obserwowana jest często w raku piersi [69, 70].

5.3.3. PIK3CA

Gen *PIK3CA* należy do protoonkogenów i zlokalizowany jest na chromosomie 3. Koduje podjednostkę *p110alfa* enzymu - kinazy fosfatydyloinozytolowej, która odpowiada za regulację cyklu komórkowego, wzrost oraz migrację komórek. Mutacje somatyczne w genie *PIK3CA*, poza rakiem jajnika, są obecne także w raku piersi oraz jelita grubego [71-73].

5.3.4. TP53

Gen *TP53* położony jest na chromosomie 17 i funkcjonuje jako gen supresorowy. Białko p53 nazywane jest „strażnikiem genomu”. Jako czynnik transkrypcyjny kontroluje ekspresję wielu genów zaangażowanych w procesy naprawy DNA oraz indukcję apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Warunkuje poza tym prawidłowy przebieg cyklu komórkowego zapobiegając niekontrolowanemu podziałom. Mutacje somatyczne w genie *TP53* są jednymi z najczęściej występujących zmian genetycznych w wielu nowotworach, w tym także raka jajnika. Najczęściej występują w egzonach od 5 do 8, czyli w regionie genu *TP53* odpowiedzialnym za wiązanie z DNA. Prowadzą do utraty funkcji białka, a w wypadku mutacji typu *missense* mogą jednocześnie wyposażać białko w nowe właściwości warunkujące oporność na chemioterapię, a także zwiększające zdolność do tworzenia przerzutów [74, 75].

5.3.5. PTEN

PTEN jest genem supresorowym, zlokalizowanym na chromosomie 10. Białkowy produkt genu zaangażowany jest w kontrolę cyklu komórkowego i apoptozy zapobiegając niekontrolowanemu podziałom komórkowym. Białko PTEN odpowiada także za migrację i adhezję komórek oraz regulację procesu angiogenezy. Utrata funkcji genu *PTEN* może promować proces kancerogenezy. U osób chorych wiąże się również z gorszym rokowaniem. Wykazano, iż w przypadku wielu guzów mutacje genu *PTEN* prowadzą do zwiększenia aktywności PIK3CA oraz progresji guza. Zmiany w obrębie genu *PTEN* występują w raku jajnika, jelita grubego, prostaty a także w czerniaku [76, 77].

5.3.6. *ARID1A*

ARID1A jest genem supresorowym, zlokalizowanym na chromosomie 1. Białko kodowane przez ten gen - BAF250a wchodzi w skład kompleksu SWI/SNF odpowiedzialnego za remodelowanie chromatyny. Białko *ARID1A* funkcjonuje jako czynnik transkrypcyjny i odgrywa ważną rolę w kontroli proliferacji i różnicowania komórek. Ponadto bierze udział w naprawie uszkodzeń DNA na drodze niehomologicznego łączenia końców. Wykazano, iż kontrola cyklu komórkowego przez *ARID1A* jest ściśle związana z współdziałaniem białka p53. Najczęściej pojawiającymi się mutacjami genu *ARID1A* są somatyczne mutacje typu nonsens lub zmiany ramki odczytu prowadzące do utraty jego funkcji. Stwierdzono, że w przypadku raków jasnokomórkowych mutacje *ARID1A* często współistnieją z mutacjami genu *PIK3CA* [78-81].

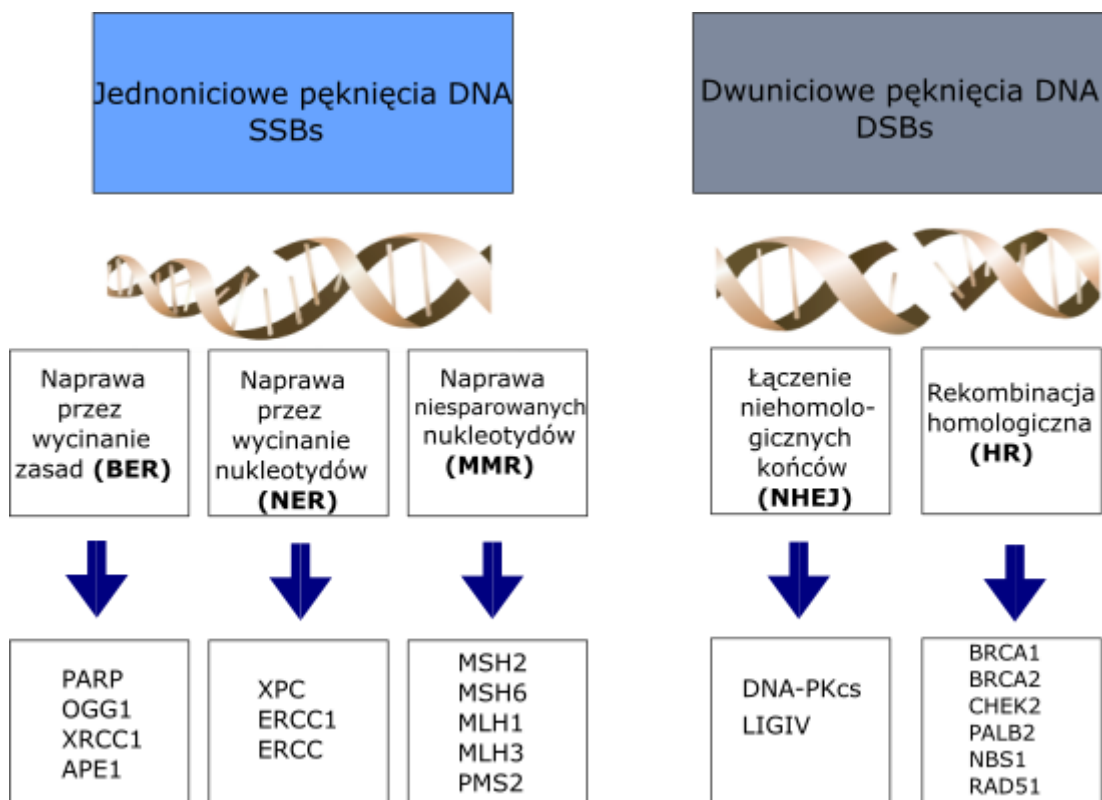
5.3.7. *CTNNB1*

Gen *CTNNB1* położony jest na chromosomie 3, koduje białko zwane β -kateniną będące częścią ścieżki sygnałowej Wnt. Funkcjonuje jako koaktywator transkrypcji oraz odpowiada za proces adhezji komórek. Większość mutacji w genie *CTNNB1* to zlokalizowane w egzonie 3 mutacje typu *missense*, które prowadzą do stałej aktywacji szlaku Wnt/ β -katenina. Aktywacja drogi Wnt/ β -katenina uruchamia transkrypcję genów kluczowych dla transformacji nowotworowej, takich jak *c-myc* czy genu *CCND1* kodującego cyklinę D1. Mutacje *CTNNB1* spotykane są, poza rakiem jajnika, w raku jelita grubego, piersi, a także czerniaku [82-83].

5.4. Naprawa DNA a rak jajnika

Naprawa uszkodzeń DNA jest jednym z kluczowych procesów przebiegających w komórce. Dzięki prawidłowym mechanizmom naprawy możliwe jest utrzymanie integralności genomu. Udowodniono, że upośledzona naprawa materiału genetycznego wynikająca z mutacji w genach naprawy DNA w wielu przypadkach prowadzi do transformacji nowotworowej. Stwierdzono także, że pewne uszkodzenia szlaku naprawy DNA mogą mieć wpływ na rodzaj stosowanej terapii antynowotworowej. Związane jest to ze zjawiskiem sztucznie wywołanej letalności (*synthetic lethality*). Wykazano, że zablokowanie jednego ze szlaków naprawy DNA przy jednoczesnym

uszkodzeniu drugiego z nich prowadzi do śmierci komórki. Uszkodzenia materiału genetycznego mogą dotyczyć zarówno jednej (SSBs - *single strand breaks*), jak i obu nici (DSBs - *double-strand breaks*). Wyróżnia się pięć mechanizmów, które w komórkach ssaków wykorzystywane są do identyfikacji i usuwania powstałych błędów. Dla uszkodzeń pojedynczej nici są to naprawa niesparowanych zasad (MMR - *mismatch repair*), naprawa poprzez wycinanie nukleotydu (NER - *nucleotide excision repair*) oraz naprawa poprzez wycinanie zasad (BER - *base excision repair*). W przypadku dwuniciowych pęknięć DNA naprawa zachodzi na drodze rekombinacji homologicznej (HR - *homologous recombination*) oraz łączenia niehomologicznych końców (NHEJ - *non homologous end joining*) (Ryc. 1) [84-86].



Ryc. 1. Mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA oraz zaangażowane w nie geny [87, zmodyfikowano].

Pierwszym krokiem w naprawie DNA jest rozpoznanie powstałych uszkodzeń przez wyspecjalizowane białka. Należą do nich kinazy ATM, ATR oraz DNA-PK. Kinaza ATM aktywowana jest w odpowiedzi na podwójne pęknięcia DNA, natomiast kinaza ATR funkcjonuje jako czujnik pęknięć pojedynczej nici oraz uszkodzeń powodujących blokadę procesu replikacji. Aktywacja obu kinaz skutkuje natychmiastową fosforylacją innych białek odpowiadających za zatrzymanie cyklu

komórkowego, uruchomienie mechanizmów naprawy lub skierowanie komórki na drogę apoptozy. Aktywacja DNA-PK jest natomiast kluczowym krokiem dla przebiegu NHEJ [88-89]. Pojedyncze pęknięcia nici DNA skutkują często poważniejszymi uszkodzeniami materiału genetycznego, jakim są pęknięcia podwójnej nici. Nienaprawione podwójne pęknięcia DNA prowadzą często do translokacji, delecji, duplikacji, utraty heterozygotyczności, a także aneuploidii. Wywołane mogą być działaniem wolnych rodników tlenowych, promieniowaniem jonizującym oraz działaniem związków chemicznych. Najbardziej skutecznym mechanizmem naprawy podwójnych pęknięć DNA jest rekombinacja homologiczna, gdzie jako matryca wykorzystywana jest siostrzana chromatyda. Szlak HR wykorzystywany jest również w konserwacji telomerów oraz naprawie międzyniciowych wiązań krzyżowych. Koryguje także błędy powstające w czasie crossing-over oraz te, zachodzące podczas replikacji (zablokowanie widełek replikacyjnych). Proces HR zachodzi w fazach G2 oraz S przy udziale co najmniej 40 białek, z których najważniejsze funkcje pełnią BRCA1 oraz BRCA2 [84, 86]. Wykazano, że upośledzenie rekombinacji homologicznej w wyniku mutacji genów lub mechanizmów epigenetycznych występuje w około 50% raków jajnika. Poza zmianami w genach *BRCA1* i *BRCA2*, negatywny wpływ na funkcjonowanie mechanizmu HR mają m.in. mutacje w takich genach jak: *CHEK2*, *NBS1*, *PALB2*, *CDK12*, *RAD50*, *RAD51C* oraz *RAD51D*. Stwierdzono, iż poza predyspozycją do nowotworów, defekty HR związane są jednocześnie z większą wrażliwością na terapię z zastosowaniem związków platyny (np. cisplatyna) oraz inhibitorów PARP (np. olaparib) [90]. Naprawa na drodze HR jest mechanizmem wtórnym, uruchamianym w wypadku upośledzenia szlaku NHEJ. Łączenie niehomologicznych końców jest mniej dokładnym i wiernym mechanizmem naprawy w porównaniu do rekombinacji homologicznej. Zachodzi głównie w fazach G0 i G1, wykazuje także pewną aktywność w fazach G2 oraz S. Zmniejszona aktywność systemu NHEJ w fazach G2 oraz S spowodowana jest zależnym od BRCA1 zahamowaniem autofosforylacji DNA-PKcs. Niehomologiczne łączenie końców jest mechanizmem potencjalnie mutagennym, gdyż może powodować utratę części sekwencji. Przypuszcza się, że proces ten jest preferowany przez wyższe eukarionty ze względu na jego szybszy przebieg w dynamicznie dzielących się komórkach. Mutacje germinalne w genach zaangażowanych w szlak NHEJ związane są z ciężkimi niedoborami odporności i nieprawidłowościami rozwojowymi. W przypadku raka jajnika stwierdzono związek między polimorfizmami w genie *LIG4* kodującym ligazę DNA IV a ryzykiem raka jajnika. Wykazano ponadto, że defekty NHEJ w liniach

komórkowych wywodzących się z raka jajnika oraz pierwotnych kulturach komórkowych związane były z opornością na leczenie inhibitorami PARP (rucaparib). Wrażliwość na rucaparib występowała tylko w przypadku jednoczesnego uszkodzenia szlaku HR [89, 91, 92, 86].

Mechanizm wycinania zasad (BER) poza udziałem w usuwaniu pojedynczych pęknięć DNA, koryguje również uszkodzenia pojedynczych zasad wywołane działaniem reaktywnych form tlenu lub poddanych alkilacji czy deaminacji. Jest aktywny we wszystkich fazach cyklu komórkowego. Kluczowym enzymem w szlaku BER jest polimeraza poli(ADP-rybozy) – PARP1. Defekty w funkcjonowaniu BER mogą prowadzić do akumulacji dalszych uszkodzeń DNA, w tym do podwójnych pęknięć nici. Stwierdzono, że polimorfizmy genów zaangażowanych w pierwszy etap naprawy BER, zwłaszcza glikozylaz DNA wiążą się, u nosicielek mutacji *BRCA1/BRCA2*, z większym ryzykiem raka jajnika. Duże znaczenie przypisuje się mutacjom w genie *OGG1* kodującym glikozylazę 8-oksoguaniny. Innymi genami biorącymi udział w procesie BER, których warianty wykazują związek z rakiem jajnika są *APE1* oraz *XRCC1* [93-96, 84].

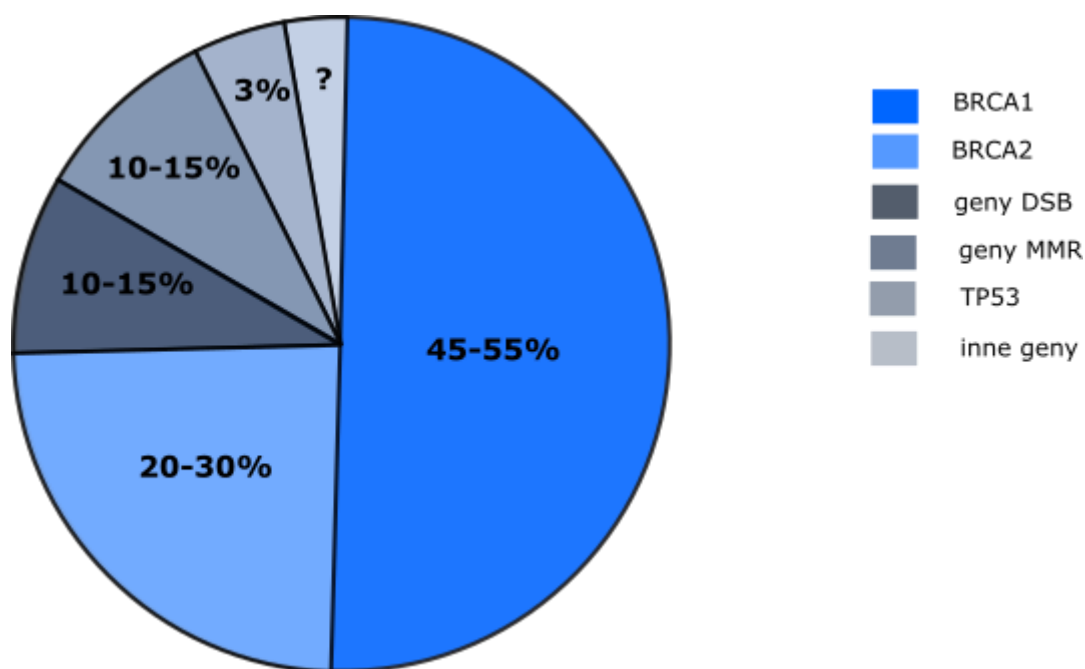
Mechanizm naprawy poprzez wycinanie nukleotydu (NER) zaangażowany jest w korygowanie zaburzeń struktury podwójnej helisy wywołanych m. in. działaniem promieni UV, a także wewnątrz- i międzyniciowych wiązań krzyżowych spowodowanych przez związki chemiczne, w tym także związki platyny. Jest aktywny w fazie G1 cyklu komórkowego. Upośledzenie funkcji białek biorących udział w procesie NER związane jest z rzadkimi zespołami recesywnymi takimi jak syndrom Cockayne, skóra pergaminowata barwnikowa oraz trichotiodystrofia. Wpływ mutacji genów szlaku NER na predyspozycję do raka jajnika nie jest do końca poznany. Przypuszcza się, iż pewną rolę mogą odgrywać polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP) w genach *ERCC1*, *ERCC2* oraz *XPC*. Stwierdzono natomiast związek między dwoma wariantami genu *ERCC1* a opornością na cisplatynę [97, 98, 84, 99].

Naprawa niesparowanych zasad (MMR) jest procesem, w którym rozpoznawane i korygowane są niekomplementarne zasady oraz insercje/delecje powstające podczas replikacji. Ponadto szlak MMR odpowiedzialny jest również za zatrzymanie cyklu komórkowego oraz skierowanie komórki na drogę apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane czynnikami fizycznymi i chemicznymi. Mechanizm aktywny jest głównie w fazie S cyklu komórkowego. Zaangażowanych jest w niego przynajmniej siedem genów supresorowych: *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *MLH1*, *MLH3*, *PMS1*

oraz *PMS2*. Hipermetylacja oraz zmiany delecyjne w genach *MMR* prowadzą do ich obniżonej ekspresji. Rezultatem nieprawidłowo przebiegającego procesu MMR jest duża liczba spontanicznych mutacji prowadząca do niestabilności mikrosatelitarnej. Mutacje genów *MMR* występują w zespole dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego (HNPCC - *hereditary non-polyposus colorectal cancer*) i związane są ze zwiększoną predyspozycją do raka jelita grubego, endometrium oraz jajnika. Większość przypadków HNPCC wywołana jest przez mutacje genów *MLH1*, *MSH2* oraz *MSH6*. Spośród wszystkich histologicznych typów raka jajnika, defekty szlaku MMR występują najczęściej w raku endometrioidalnym oraz śluzowym. Z mniejszą częstością dotyczą raków jasnokomórkowych, najrzadziej spotykane są w rakach surowicznych [100-102]. W badaniach na liniach komórkowych raka jajnika stwierdzono, że zaburzenia w funkcjonowaniu systemu MMR wiążą się z opornością na związki platyny [103].

II. DZIEDZICZNE ASPEKTY RAKA JAJNIKA

Ocenia się, że 23% wszystkich raków jajnika ma podłoże dziedziczne. Przyczyną około 10-15% dziedzicznych postaci raka jajnika są mutacje genów charakterystyczne dla zespołu HNPCC. Niewielki odsetek, ok. 3% stanowią guzy wywołane dziedzicznymi mutacjami w genie *TP53* występujące w zespole Li-Fraumeni. Większość, około 65-85% przypadków dziedzicznych raka jajnika, występuje pod postacią zespołów: dziedzicznego raka jajnika specyficznego narządowo (HOC - *hereditary ovarian cancer*) oraz dziedzicznego raka piersi/jajnika (HBOC - *hereditary breast/ovarian cancer*) spowodowanych zmianami konstytucyjnymi w genach *BRCA1* oraz *BRCA2*, które są kluczowe dla naprawy DNA na drodze rekombinacji homologicznej (Ryc. 1). Ze względu na dużą częstość defektów naprawy podwójnych pęknięć DNA, w tym głównie szlaku HR, stwierdzanych w rakach jajnika, przyczyną pozostałej części postaci dziedzicznych mogą być mutacje innych genów zaangażowanych w ten proces. Stwierdzono, że guzy wykazujące upośledzenie szlaku HR, inne niż te, wywołane mutacjami genów *BRCA*, wykazują fenotyp podobny do guzów *BRCA* pozytywnych. Charakteryzują się wrażliwością na terapię z zastosowaniem cisplatyny i karboplatyny. Dzięki „zjawisku” *synthetic lethality* są również podatne na terapię inhibitorami PARP. Raki te charakteryzują się dłuższymi okresami remisji i korzystniejszym rokowaniem co do przeżycia, odznaczają się jednak większym potencjałem do tworzenia przerzutów [104, 105, 87]. Związek między innymi defektami szlaku naprawy podwójnych pęknięć DNA a ryzykiem raka jajnika został dotychczas potwierdzony m. in. dla genów *RAD51C*, *RAD51D* oraz *BRIP1* [106-109]. Dane dotyczące udziału innych genów naprawy DSB, takich jak *NBS1*, *CHEK2* oraz *PALB2* w dziedzicznej predyspozycji do raka jajnika nie są jednoznaczne i wymagają dalszych badań [110, 111].

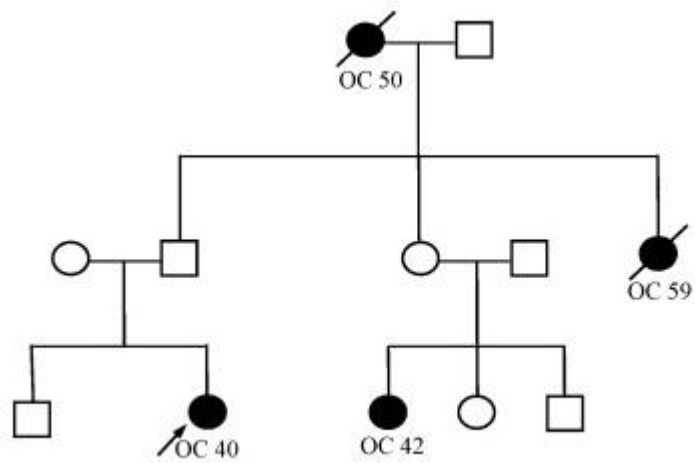


Ryc. 2. Geny związane z dziedzicznym podłożem raka jajnika [87, zmodyfikowano].

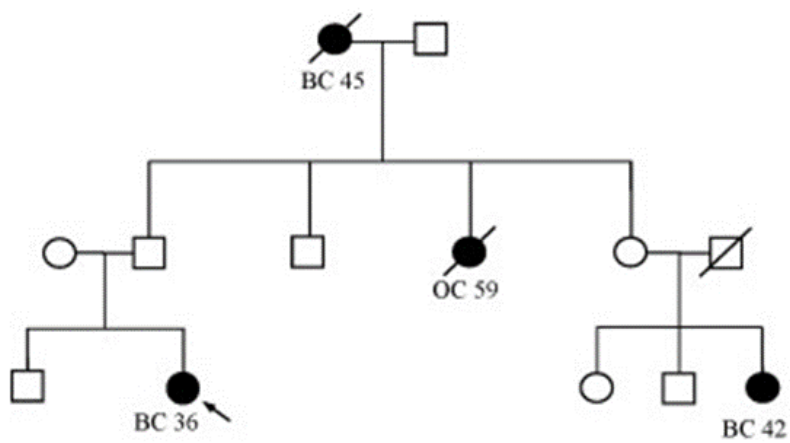
1. DZIEDZICZNE ZESPOŁY RAKA JAJNIKA

1.1. HOC i HBOC

Kliniczna predyspozycja do raka jajnika związana jest głównie z mutacjami konstytucyjnymi w genach *BRCA1* oraz *BRCA2* i występuje najczęściej pod postacią dziedzicznego raka jajnika specyficznego narządowo (HOC) oraz dziedzicznego zespołu raka piersi - jajnika (HBOC). W przypadku zespołu HOC u krewnych występują jedynie raki jajnika (Ryc. 3), podczas gdy w zespole HBOC, poza rakiem jajnika, stwierdza się również raki piersi (Ryc. 4). W oparciu o dane rodowodowo - kliniczne charakterystyczne dla raka piersi/jajnika wyodrębnione zostały kryteria pozwalające na definitywne lub z dużym prawdopodobieństwem zdiagnozowanie rodzin z zespołami HOC i HBOC (Tab. 2) [112, 113].



Ryc. 3. Rodowód rodziny ze stwierdzonym zespołem HOC (OC – rak jajnika) [112].



Ryc. 4. Rodowód rodziny ze stwierdzonym zespołem HBOC (BC – rak piersi, OC – rak jajnika) [112].

Tab. 2. Kryteria rodowodowo - kliniczne rozpoznawania zespołów HOC i HBOC [113, zmodyfikowano).

liczba przypadków raka piersi lub jajnika w rodzinie	trzy (diagnoza definitywna)	przynajmniej 3 krewnych dotkniętych rakiem piersi/jajnika rozpoznany w dowolnym wieku
	dwa (diagnoza z dużym prawdopodobieństwem)	2 raki piersi lub jajnika wśród krewnych I° (lub II° przez mężczyznę)
		1 rak piersi i 1 rak jajnika rozpoznane w dowolnym wieku wśród krewnych I° (lub II° przez mężczyznę)
	jeden (diagnoza z dużym prawdopodobieństwem)	wystąpienie raka piersi poniżej 40 roku życia
		wystąpienie raka piersi obustronnego
		wystąpienie raka piersi rdzeniastego lub atypowego rdzeniastego
		wystąpienie raka piersi i jajnika u tej samej osoby
wystąpienie raka piersi u mężczyzny		

U pacjentek, u których wykryto mutację germinalną w genie *BRCA1* ryzyko rozwoju raka jajnika uzależnione jest od wieku, wykazano, iż w Polsce do 75 roku życia wynosi ono około 40% (Tab. 3). Ważnym czynnikiem, który ma wpływ na ryzyko raka jest również stopień obciążenia rodzinnego. Wystąpienie raka jajnika u każdej krewnej I° lub II° związane jest ze wzrostem ryzyka o kolejne 60%. Charakterystyczne dla raków jajnika u kobiet będących nosicielkami mutacji *BRCA1* jest również zwiększone ryzyko raka jajowodu oraz otrzewnej. Średni wiek zachorowania na raka jajnika u kobiet z mutacją genu *BRCA1* wynosi około 54 lata. Większość raków jajnika u nosiielek

mutacji *BRCA1* to raki surowicze o niskim stopniu zróżnicowania diagnozowane w III/IV stopniu zaawansowania klinicznego wg FIGO [113].

W przypadku nosicielek mutacji w genie *BRCA2* ryzyko zachorowanie na raka jajnika wynosi 11-27%. Średni wiek zachorowania wynosi 62 lata [114, 115].

Tab. 3. Ryzyko raka jajnika u nosicielek mutacji *BRCA1* w Polsce [113].

WIEK	<30	40	50	60	70	75
RYZYKO SKUMULOWANE (%)	1	3,5	12	30	41	44

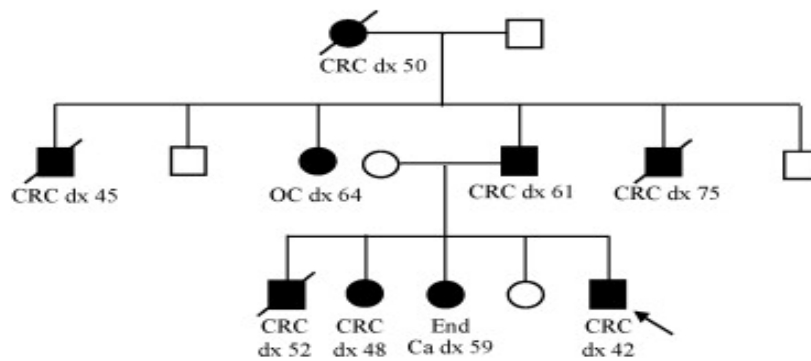
1.2. Zespół HNPCC (Zespół Lyncha)

Zespół dziedzicznego niepolipowatego raka jelita grubego charakteryzuje się rodzinną agregacją raków jelita grubego oraz innych nowotworów, takich jak: rak trzonu macicy, raki dróg moczowych oraz rak jajnika. Jest chorobą heterogenną pod względem genetycznym i jest wywołany mutacjami w jednym z genów *MMR* zaangażowanych w naprawę błędnie sparowanych nukleotydów. Największe prawdopodobieństwo wystąpienia zespołu HNPCC związane jest z mutacjami w genie *MSH2* i wynosi 60%, najmniejsze natomiast ze zmianami w genie *PMS2*. U kobiet spełniających kryteria HNPCC ryzyko życiowe raka trzonu macicy wynosi 30-70%, natomiast raka jajnika 3-20%. Średni wiek zachorowania na raka jajnika w rodzinach z zespołem Lyncha i z wykrytymi mutacjami w genach HNPCC wynosi 41 lat, natomiast u kobiet z rodzin z HNPCC bez wykrytych mutacji 66 lat [115, 113].

Podejrzenie zespołu HNPCC występuje, gdy spełnione są poniższe kryteria [116]:

1. u pacjenta lub któregośkolwiek z jego krewnych I° lub II° stwierdza się raka jelita grubego;
2. u pacjenta z RJG u niego i/lub wśród krewnych I° stwierdzono co najmniej 1 zachorowanie na RJG, raka trzonu macicy, jelita cienkiego, raka jajnika przed 50 r.ż lub dróg moczowych.;
3. co najmniej jeden z raków spełniających kryteria 1) lub 2) zdiagnozowany został poniżej 50 r.ż.;
4. wykluczono polipowatość rodzinną.

Poniżej przedstawiono rodowód rodziny z zespołem HNPCC (Ryc. 5) [112].



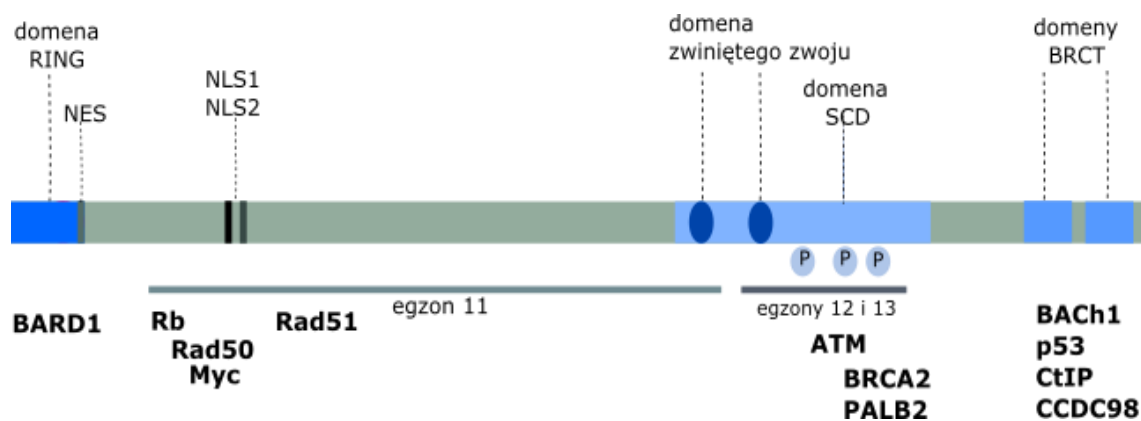
Ryc. 5. Rodowód rodziny ze stwierdzonym zespołem HNPCC (CRC – rak jelita grubego; End – rak endometrium; OC – rak jajnika) [112].

2. WYBRANE GENY ZWIĄZANE Z RAKIEM JAJNIKA

2.1. Charakterystyka genu oraz białka BRCA1

2.1.1. Struktura

Gen *BRCA1* został zidentyfikowany w roku 1994 roku. Znajduje się na długim ramieniu chromosomu 17 (17q21) [117]. Zawiera 24 egzony, dwa z nich: egzon 1 oraz egzon 4 są regionami niekodującymi [118]. Produktem genu *BRCA1* jest białko zbudowane z 1863 aminokwasów o masie 220 kDa, zlokalizowane na terenie jądra komórkowego [119], a w niektórych przypadkach także na terenie cytoplazmy [120]. W obrębie białka wyróżnia się trzy regiony niezbędne do jego prawidłowego funkcjonowania. Są to domena RING (*really interesting new gene*) występująca w N-końcowej części białka kodowana przez egzony 2-7, położone w centralnej części (egzony 11-13) sekwencje NLS (*nuclear localization sequence*) - NLS1 oraz NLS2, domenę zwiniętego zwoju (*coiled-coil domain*), domenę SCD (*serine containing domain*) oraz znajdujące się w C-końcowej części domeny BRCT (*BRCA1 C-terminal*) (egzony 16-24) [121]. Domena RING odpowiedzialna jest za tworzenie kompleksów z innymi białkami, przede wszystkim z białkiem BARD1 [122], wykazuje także aktywność ligazy ubikwitynowej E3. Aktywność ligazy warunkowana jest interakcją między BRCA1 a BARD1 [123]. Centralna część (egzony 11-13) jest kluczowa dla funkcji białka i odpowiada za interakcję z wieloma białkami, m.in. RAD50, RAD51, c-Myc, retinoblastoma (RB), ATM, BRCA2 oraz PALB2. Sekwencje NLS odpowiadają za lokalizację białka w jądrze komórkowym [124, 121]. Domeny BRCT należą do klasy I domen BRCT i są odpowiedzialne za interakcje z ufosforylowaną formą białek: p53, BACH1 CtIP, a także CCDC98 [125, 126, 121]. Odpowiadają również za translokację i akumulację białka BRCA1 w miejscu uszkodzeń DNA. Domeny BRCT zaangażowane są również w regulację procesu transkrypcji oraz wiązanie podwójnych pęknięć DNA (DSB) (Ryc. 6) [127-129, 121].



Ryc. 6. Struktura oraz interakcje białka BRCA1 [121, zmodyfikowano].

2.1.2. Funkcje

Do ekspresji białka BRCA1 dochodzi w intensywnie dzielących się i różnicujących komórkach tkanek, takich jak: piers, jajnik, jelito grube, limfocyty, grasica [117, 130, 131]. Najniższy poziom ekspresji białka BRCA1 obserwowany jest w fazie G0 oraz G1 cyklu komórkowego. Do maksymalnej ekspresji dochodzi na granicy faz G1/S, wysoki poziom występuje również w fazach S, G2 oraz M [132]. Wzrost ekspresji białka BRCA1 obserwowany jest także w komórkach poddanych działaniu czynników powodujących uszkodzenia DNA [133]. Do głównych funkcji białka BRCA1 należą: regulacja apoptozy i cyklu komórkowego w punktach kontrolnych G1/S oraz G2/M, udział w naprawie uszkodzeń DNA, głównie podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs) stanowiących najbardziej toksyczne i poważne w skutkach uszkodzenia DNA, ale także usuwanie fotoadduktów DNA powodujących zatrzymanie widełek replikacyjnych [134-136]. Naprawa DSBs przy udziale białka BRCA1 odbywa się w późnej fazie S oraz G2 na drodze rekombinacji homologicznej (HR) oraz niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) we wszystkich fazach cyklu komórkowego. Wykazano, że białko BRCA1 jest jednym z pierwszych, które pojawiają się w miejscu uszkodzenia nici DNA. W procesie rekombinacji homologicznej białko BRCA1 ściśle oddziałuje z innymi białkami, takimi jak: RAD51 odpowiedzialnym za rozpoznawanie homologicznej sekwencji DNA oraz wymianę nici, a także z białkiem RAD50 wchodzącym w skład kompleksu MRN (M11/RAD50/NBS1) [131, 137, 138]. Kompleks MRN funkcjonuje jako sensor dwuniciowych uszkodzeń DNA rekrutując w ich miejsce inne, zaangażowane w proces naprawy białka, takie jak: kinazy ATM oraz ATR [139]. Białko BRCA1 wraz z białkami: BRCA2 oraz BARD1 tworzy kompleks

o aktywności ligazy ubikwitynowej regulujący przebieg procesu naprawy DNA [135]. Rola BRCA1 w przypadku NHEJ sprowadza się do promowania przez białko mniej podatnego na błędy szlaku NHEJ [140]. Proces ten warunkowany jest poprzez fosforylację seryny w pozycji 988 przez białko CHEK2 [138]. W przypadku gdy, naprawa uszkodzonego DNA okaże się nieefektywna, białko BRCA1 zostaje eksportowane do cytoplazmy, gdzie zapoczątkowuje proces apoptozy [120]. Białko BRCA1 zaangażowane jest także w regulację cyklu komórkowego, współdziałając m.in. z białkiem RB, cykliną B oraz białkiem p53. Interakcja BRCA1 z hipofosforylowaną formą białka RB powoduje zahamowanie cyklu komórkowego w punkcie G1/S [141]. Z kolei, inhibicja transkrypcji cykliny B przez białko BRCA1 uniemożliwia aktywację CDC2 i prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w punkcie G2/M. Ten sam efekt obserwowany jest w wyniku interakcji BRCA1 z białkiem GADD45, które odpowiada za inaktywację kompleksu CDC2/cyklina B [142]. Prawidłowy przebieg cyklu komórkowego uzależniony jest również od współdziałania białka BRCA1 z białkiem p53. Wykazano, że BRCA1 funkcjonuje jako koaktywator i stabilizator p53 [143].

2.1.3. Mutacje w genie *BRCA1*

W obrębie genu *BRCA1* zidentyfikowano dotychczas ponad 1700 wariantów (mutacji punktowych oraz dużych rearanżacji genowych), z czego 858 o znaczeniu istotnym klinicznie [144, 121]. Większość mutacji genu *BRCA1* to małe mutacje wewnątrzgenowe prowadzące do zmiany ramki odczytu lub powodujące wystąpienie kodonu nonsensownego i skutkujące przedwczesną terminacją translacji. Ponadto często spotykane są substytucje *missense* oraz mutacje splincingowe [145]. Poza tym w genie *BRCA1*, z małą częstością wynoszącą około 1%, występują duże delecje. Ich występowanie wynika w części z obecności sekwencji *Alu* w intronach genu *BRCA1* [118]. Długość sekwencji *Alu* w genie *BRCA1* waha się od 0,5 kpz do 28,3 kpz [146]. Powtórzenia *Alu* uważane są za „gorące miejsca” (*hot spots*) rekombinacji, co może prowadzić do powstawania dużych rearanżacji genowych, zwłaszcza dużych delecji [147, 148]. Duże rearanżacje mogą powstawać również w wyniku rekombinacji z pseudogenem i skutkować nawet delecją całego genu *BRCA1* [149].

Występowanie mutacji w genie *BRCA1* w populacjach homogenych genetycznie związane jest z tzw. „efektem założyciela”. Zjawisko to dotyczy populacji pochodzących od wspólnego przodka oraz izolowanych pod względem geograficznym. W populacji

takiej, w związku z niską różnorodnością genetyczną, często dochodzi do utrwalenia i przekazywania potomstwu określonych alleli genów [150]. W przypadku genu *BRCA1* przykładem populacji założycielskiej jest m.in. populacja Żydów Aszkenazyjskich. Charakterystyczne dla populacji Żydów Aszkenazyjskich są dwie mutacje *BRCA1* skracające białko: 5382insC (c.5266dupC) oraz 185delAG (c.68_69 delAG). Stwierdzono, że około 1% populacji Aszkenazyjskiej jest nosicielem wariantu 68_69 delAG, a 0,13% wariantu c.5266dupC [151]. Mutacje 5382insC oraz 185delAG, poza populacją żydowską, obecne są również w populacji hiszpańskiej, a także innych grupach etnicznych z podobną częstością [152]. Wśród rodzin obciążonych wysokim ryzykiem raka piersi i/lub jajnika mutacja 5382insC występuje z najwyższą częstością w: Polsce (34%) [153], na Węgrzech (14%) [154], w Słowenii (13%) [155], Rosji (11%) [156], Grecji (8%) [157], Ukrainie (6%) [158], Niemczech (4%) [159] oraz Włoszech (3%) [160], a poza Europą, w Kanadzie (13%) [161]. Niezwykle rzadko spotykana jest natomiast w Belgii, Holandii oraz krajach Skandynawskich [162]. Uważa się, że wariant 5382insC powstał około 1800 lat temu na terenie dzisiejszej Skandynawii lub północnej Rosji, a następnie na przestrzeni wieków objął kolejne populacje. Na podstawie analizy haplotypów ustalono, że prawdopodobnie nosiciele mutacji 5382insC zarówno w Europie jak i Ameryce Północnej wywodzą się od wspólnego przodka [163, 162, 164]. Wariant 5382insC polega na insercji cytozyny w kodonie 1756 egzonu 20 prowadząc do zmiany ramki odczytu. Zastąpienie glutaminy proliną powoduje pojawienie się przedwczesnego sygnału terminacji translacji. Poprzez skrócenie białka dochodzi do utraty jego funkcji [1a].

Mutacja 185delAG obserwowana jest w Polsce ze znacznie niższą częstością niż wariant 5382insC. Wśród kobiet obciążonych ryzykiem raka piersi i/lub jajnika występuje najczęściej na terenie Polski północno-wschodniej, północnej oraz południowo-zachodniej [165, 166, 145]. Szacuje się, iż powstała ona około 46 pokoleń temu [167]. Zlokalizowana jest w kodonie 23 egzonu 2 wynika z delecji adeniny i guaniny w pozycji 185. Delecja powoduje zmianę ramki odczytu oraz zastąpienie kwasu glutaminowego waliną w kodonie 23 co skutkuje przedwczesnym pojawieniem się kodonu STOP. W efekcie dochodzi do utraty funkcji białka BRCA1 w wyniku jego skrócenia i/lub na drodze NMD (*Nonsense-Mediated Decay*) [168, 2a].

Dla populacji polskiej, poza wariantami 5382insC oraz 185delAG, charakterystyczne są również zmiany 4153delA (c.4035delA), C61G (c.181T>G). Wykazano, że mutacje: 5382insC, C61G oraz 4153delA stanowią w Polsce 83% mutacji

genu *BRCA1* [165]. Zmiana C61G najczęściej spotykana jest w województwie Śląskim [169]. Poza Polską występuje również w innych krajach Europy Centralnej, takich jak: Czechy [170], Niemcy [171], Litwa [172], a także Ukraina [173]. Mutacja C61G zlokalizowana jest w egzonie 5 i polega na zamianie cysteiny na glicynę w kodonie 61[3a]. Zmiana zlokalizowana jest w domenie RING redukując heterodimeryzację BRCA1/BARD1 oraz upośledzając aktywność ligazy ubikwytynowej E3 białka BRCA1 [174, 175]

Wariant 4153delA jest trzecim co do częstości występowania po 5382insC oraz c. C61G wariantem wśród polskich rodzin z rodzinną agregacją raków piersi i/lub jajnika [165]. Mutacja najczęściej spotykana jest w Małopolsce [176] oraz na Mazowszu [177], nie stwierdzono jej natomiast na Górnym Śląsku [166]. Wariant 4153delA, zwany bałtycko-czarnomorskim, charakterystyczny jest także dla krajów Europy Wschodniej, zwłaszcza Litwy [178], Rosji [179] oraz Białorusi [180]. Zmiana 4153delA spowodowana jest utratą adeniny oraz skutkuje przesunięciem ramki odczytu. Dochodzi do zamiany kwasu glutaminowego na lizynę w kodonie 1346 egzonu 11 i pojawienia się przedwczesnego sygnału terminacji translacji. Skutkuje to eliminacją białka w procesie NMD lub utratą jego funkcji w wyniku braku obu domen BRCT [4a].

Wśród populacji polskiej występuje również wariant 3819del5 (c.3700_3704del5), spotykany z relatywnie wysoką częstością na Pomorzu oraz w regionie opolskim [145, 181, 182]. Jego obecność stwierdzono również w populacji czeskiej [170] oraz niemieckiej [171]. Mutacja 3819del5 wywołana jest delecją pięciu zasad (GTAAA) w egzonie 11 powodując zmianę ramki odczytu. Walina zostaje zastąpiona glutaminą w kodonie 1234 prowadząc do terminacji translacji. Powstałe białko jest niezdolne do pełnienia normalnych funkcji lub zostaje wyeliminowane na drodze NMD [5a].

Poza wariantami 5382insC, C61G, 4153delA, 185delAG, 3819del5, na terenie Polski stwierdza się również inne mutacje powtarzalne genu *BRCA1*: 5370C>T (c.5251C>T) oraz 1806C>T (c.1687C>T) [182].

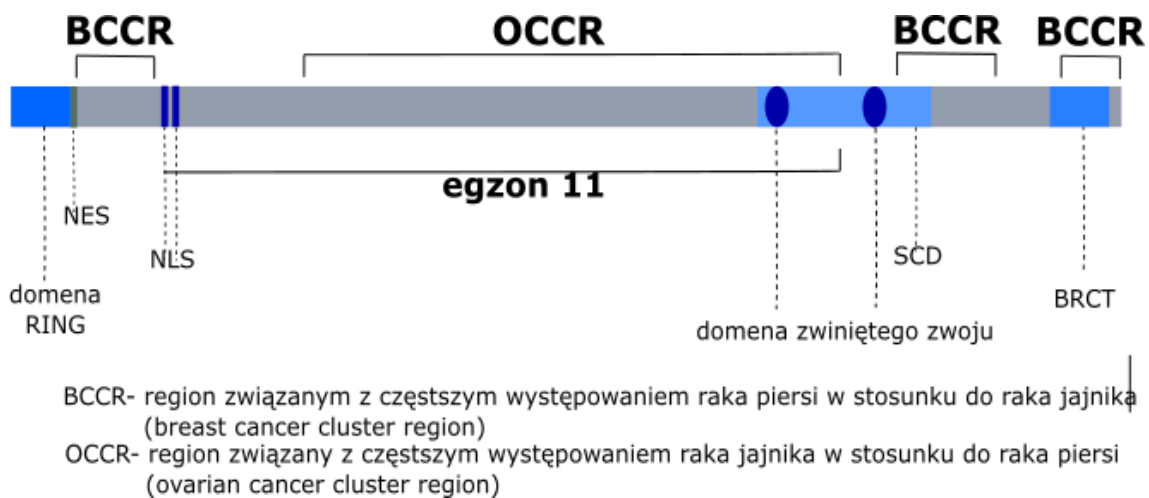
2.1.4. Mutacje genu *BRCA1* na świecie

Mutacje założycielskie genu *BRCA1* dotyczą również innych populacji europejskich, w tym: populacji austriackiej, szwedzkiej, holenderskiej, belgijskiej, niemieckiej, słoweńskiej, a także estońskiej, litewskiej i łotewskiej. Wykazano,

że w populacji austriackiej najczęściej występującymi mutacjami są: c.181T>G, c.5266dupC, c.1687C>T, c.3016_3019del4 oraz c.2676_2679del4 [183]. Wariant c.1687C>T spotykany jest ponadto w Szwecji [184] oraz Słowenii [155]. Do wariantów występujących w Szwecji zalicza się także: najbardziej rozpowszechniony wariant c.3171insC oraz warianty c.2475delC i c.1082_1092del11 [184, 185]. Dla populacji holenderskiej oraz belgijskiej charakterystyczna jest zmiana c.2685_2686delAA, nie odnotowana w żadnym innym regionie [186]. W populacji holenderskiej stwierdzono także występowanie dużych rearanżacji w genie *BRCA1*: delecję 3,8 kbp w egzonie 13 oraz delecję 510 bp w egzonie 22 [187]. Duże rearanżacje obserwowane są również w populacji niemieckiej. Najczęściej występującymi są: delecja egzonów 17 i 22 oraz duplikacja egzonu 13 [188]. W przypadku krajów bałtyckich, Litwy, Łotwy i Estonii, efekt założyciela związany jest głównie z występowaniem wariantów c.5266dupC oraz c.4053delA [189-191]. Na Islandii mutacją założycielską jest c.5074G>A [192]. Poza Europą, efekt założyciela w genie *BRCA1* stwierdzono także u francuskich Kanadyjczyków zamieszkujących Quebec, u których większość mutacji genu *BRCA1* stanowią cztery zmiany: c.4327C>T, c.3756_3759delGTCT, c.962G>A oraz c.2834_2836delGTAAinsC [193].

2.1.5. Lokalizacja mutacji w genie *BRCA1* a ryzyko raka jajnika

Na podstawie wielu publikacji oszacowano, że skumulowane ryzyko rozwoju raka jajnika u kobiet-nosicielek mutacji w genie *BRCA1* do 70 roku życia, waha się w granicach 36-66%, natomiast raka piersi 45-87% [194, 195]. Stwierdzono jednak, iż nie każdy z wariantów *BRCA1* związany jest z takim samym ryzykiem rozwoju raka jajnika jak raka piersi. Pierwsze doniesienia na ten temat pochodzą z roku 1995. Wykazano, że mutacje zlokalizowane w kierunku 3'UTR genu związane są z niższym ryzykiem raka jajnika w porównaniu do raka piersi [196, 197]. W 2002 wykazano, iż najwyższe ryzyko raka jajnika występuje w przypadku mutacji występujących w centralnej części egzonu 11 [194]. Podobna prawidłowość została również zaobserwowana w pracy Rebbeck i in. z 2015 roku. Ponadto, zmniejszone ryzyko raka jajnika w porównaniu do raka piersi stwierdzono dla wariantów zlokalizowanych w pobliżu regionów 3'UTR (domena RING) oraz 5'UTR (domeny BRCT) (Ryc. 7) [198].



Ryc. 7. Lokalizacja mutacji w genie *BRCA1* a ryzyko raka [199, zmodyfikowano].

2.1.6. Rewersja mutacji

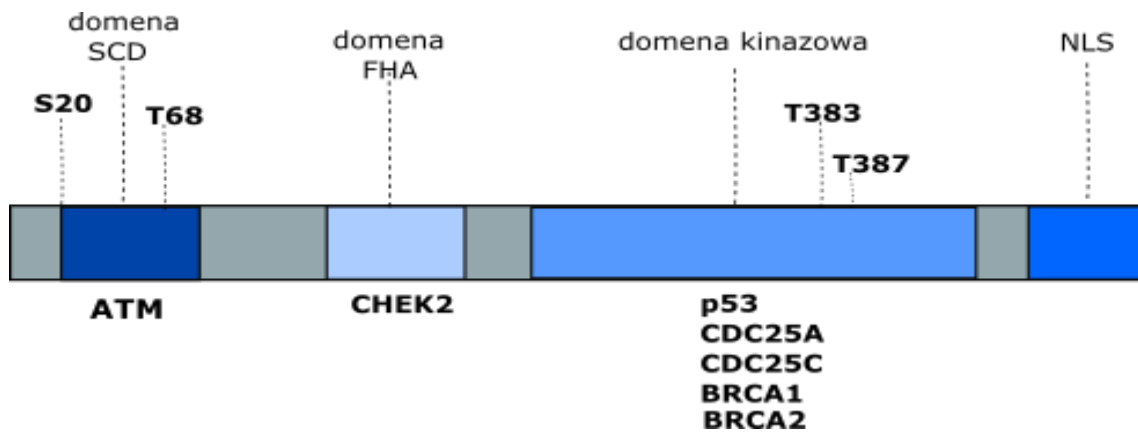
Rewersja jest wynikiem wtórnej zmiany, która zachodzi w zmutowanej odziedziczonej formie genu przywracając mu jego pierwotną prawidłową funkcję. Jest dość często obserwowana w przypadku genu *BRCA1*, zachodzi w zaawansowanym stadium procesu nowotworowego. W wyniku rewersji, poprzez reaktywację szlaku HR, komórki rakowe zyskują oporność na uszkodzenia DNA. Ocenia się, że w przypadku raka jajnika rewersja zachodzi u 25-50% guzów *BRCA1* pozytywnych i może być przyczyną oporności na leczenie [200, 201].

2.2. Charakterystyka genu oraz białka *CHEK2*

2.2.1. Struktura

Gen *CHEK2* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 22 i koduje białko – kinazę serynowo-treoninową będącą ludzkim analogiem białek Cds1 oraz Rad53 występujących u grzybów, odpowiednio *Schizosaccharomyces pombe* oraz *Saccharomyces cerevisiae* [202]. Gen *CHEK2* zbudowany jest z 14 egzonów i pełni funkcję genu supresorowego. Białko kodowane przez gen *CHEK2* zbudowane jest z 543 aminokwasów. W jego obrębie wyróżnia się trzy funkcjonalne domeny: zlokalizowaną na N-końcu białka domenę regulatorową SCD bogatą w motywy SQ/TQ (*SQ/TQ cluster domain*), oraz zawierającą miejsce fosforylacji Thr-68 dla kinazy ATM, centralnie

położoną domenę FHA (*fork-head associated domain*) odpowiadająca za interakcję z domeną SCD drugiej cząsteczki białka CHEK2 oraz położoną w C-końcowej części białka domenę o aktywności kinazy, a także sygnał lokalizacji jądrowej – NLS (Ryc. 8) [203-205].



Ryc. 8. Struktura i interakcje białka CHEK2 [206, zmodyfikowano].

2.2.2. Funkcje

Ekspresja białka CHEK2 obserwowana jest w większości tkanek ludzkiego organizmu we wszystkich fazach cyklu komórkowego. Szczególnie wysoki poziom ekspresji występuje w intensywnie dzielących się komórkach skóry oraz jelita, a także w komórkach gruczołów dokrewnych oraz gruczołu piersiowego. Brak ekspresji lub cytoplazmatyczną lokalizację CHEK2 stwierdza się w komórkach mięśni, chrząstki oraz mózgu [207]. Białko CHEK2 pełni kluczową rolę w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, zwłaszcza DSB, bierze również udział w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy [208]. W odpowiedzi na uszkodzenia podwójnej helisy DNA w wyniku promieniowania gamma dochodzi do fosforylacji nieaktywnej monomerycznej cząsteczki CHEK2 przez kinazę ATM w pozycji Thr-68 [209]. Fosforylacja Thr-68 warunkuje oligomeryzację białka CHEK2 poprzez interakcję domeny SQ/TQ jednej cząsteczki CHEK2 z domeną FHA drugiej. Do pełnej aktywacji białka CHEK2 niezbędna jest także jego autofosforylacja w pozycjach Thr-383 i Thr-387 znajdujących się w obrębie domeny katalitycznej [210, 211]. Aktywowane białko CHEK2 fosforyluje z kolei inne białka efektorowe zaangażowane w kontrolę podziału komórkowego, takie jak p53, BRCA1, CDC25A czy CDC25C [202, 212, 213]. Fosforylacja CDC25A (Ser-123) oraz CDC25C (Ser-216) hamuje aktywację kinaz zależnych od cyklin CDK2 oraz CDK1 prowadząc do

zatrzymania cyklu komórkowego odpowiednio w punktach kontrolnych G1/S oraz G2/M [214-215]. Fosforylacja białka p53 przez CHEK2 w pozycji S20 sprzyja jego stabilizacji i zwiększeniu jego aktywności jako czynnika transkrypcyjnego. W efekcie dochodzi do zwiększenia zależnej od p53 transkrypcji czynnika p21 funkcjonującego jako inhibitor kinaz zależnych od cyklin: CDK2 oraz CDK4 [216, 217]. Do fosforylacji białka BRCA1 przez CHEK2 dochodzi w pozycji S988 [213]. Wykazano, iż modyfikacja ta niezbędna jest do promowania naprawy DSB na drodze rekombinacji homologicznej lub mniej podatnego na błędy szlaku NHEJ. Fosforylacja białka BRCA2 w kompleksie BRCA2/RAD51 przez białko CHEK2 powoduje uwolnienie RAD51 i jego przemieszczenie do miejsc uszkodzenia DNA [218; 138, 219].

2.2.3. Mutacje w genie *CHEK2*

Pierwsze doniesienia dotyczące związku genu *CHEK2* z predyspozycją do rozwoju nowotworów pochodzą z roku 1999. Stwierdzono wówczas obecność wariantów germinalnych *CHEK2* u pacjentów z zespołem Li-Fraumeni charakteryzującym się występowaniem w młodym wieku nowotworów, szczególnie mięsaków i raka piersi [59]. W toku dalszych badań wykazano, iż *CHEK2* jest genem o umiarkowanej penetracji, którego mutacje predysponują do występowania wielu raków, takich jak rak piersi, prostaty, tarczycy, jelita grubego, nerki oraz żołądka [220-226].

Charakterystyczne dla populacji polskiej są cztery mutacje genu *CHEK2*: mutacja typu *missense* I157T (c.470T>C) oraz trzy mutacje skracające białko: IVS2+1G>A (c.444+1G>A), 1100delC oraz del5395. Spośród wymienionych, z największą częstością występuje wariant I157T – 4,8% [221]. Poza populacją polską, wariant obecny jest także w populacji fińskiej (5,3%) [227], białoruskiej (1,3%) oraz niemieckiej (0,6%-1,6%) [228, 229]. Wariant I157T spowodowany jest zastąpieniem izoleucyny treoniną w pozycji 157 i zlokalizowany jest w obrębie domeny FHA, co upośledza zdolność białka CHEK2 do fosforylacji i wiązania ważnych dla prawidłowego przebiegu cyklu komórkowego białek CDC25A, p53 oraz BRCA1 [215; 230; 231]. Wykazano, że mutacja I157T wywiera efekt dominujący negatywny - formując dimery z prawidłową wersją białka upośledza jego funkcję [232]. Stwierdzono, iż w porównaniu do populacji ogólnej, wariant I157T wiąże się z 1,5-krotnie większym ryzykiem raka piersi [233] oraz jelita grubego [234], 1,7-krotnie większym ryzykiem raka prostaty [235] oraz z 2-krotnie

większym ryzykiem raka tarczycy, a nawet 13-krotnie wśród homozygotycznych nosicieli [236]. Wykazano również, iż u heterozygot złożonych - pacjentek będących nosicielkami jednocześnie wariantu I157T oraz jednej z mutacji skracających białko, ryzyko raka piersi jest 7-krotnie wyższe [237].

Trzy pozostałe mutacje występują w populacji polskiej z mniejszą częstością. Wariant IVS2+1G>A obserwowany jest u 0,3% populacji [221]. Stwierdzono, iż w innych populacjach występuje on niezmiernie rzadko [221, 229]. Zmiana wywołana jest substytucją pierwszego nukleotydu intronu 2 (A>G), co skutkuje przesunięciem miejsca splincingowego 5' oraz insercji 4 dodatkowych nukleotydów. Obecność dodatkowych nukleotydów powoduje przesunięcie ramki odczytu i wprowadzenie przedwczesnego kodonu STOP w egzonie 3. Białko, powstałe w wyniku nieprawidłowego splicingu, pozbawione jest części domeny FHA oraz całkowicie domeny o aktywności kinazy. W ten sposób w wyniku mutacji IVS2+1G>A dochodzi do utraty funkcji białka CHEK2 i znacznej redukcji poziomu białka w komórkach [238]. Wykazano, iż zmiana IVS2+1G>A związana jest z podwyższonym ryzykiem raka piersi (OR=3,6) [233] oraz prostaty (OR=3,4) [235].

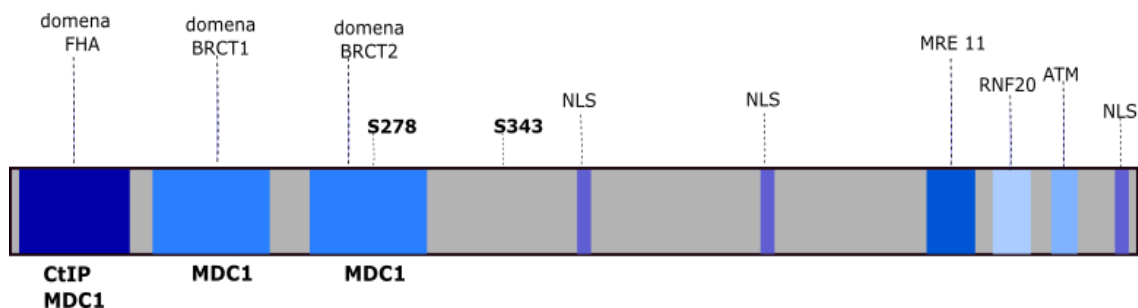
Zmiana 1100delC dotyczy 0,2% populacji polskiej [221]. Identyfikowana jest również w innych krajach europejskich: Finlandii [239], Holandii [240], Rosji [241], a także Wielkiej Brytanii [242]. Poza Europą wariant 1100delC notowany był również w Stanach Zjednoczonych [243]. Analiza haplotypów wykazała, iż nosiciele zmiany 1100delC pochodzą od wspólnego przodka [242]. Wariant 1100delC spowodowany jest delecją cytozyny w pozycji 1100 w egzonie 10. Brak nukleotydu prowadzi do zmiany ramki odczytu i powstania przedwczesnego kodonu STOP i skutkuje utratą domeny o aktywności kinazy [244, 238]. Nosicielstwo wariantu 1100delC wiąże się z 2-4,8-krotnie większym ryzykiem rozwoju raka piersi u kobiet oraz 10-krotnie u mężczyzn [240, 233], a także z 1,5-2-krotnie większym ryzykiem raka jelita grubego [245].

Wariant del5395 spotykany jest w populacji polskiej z częstością 0,4% [246]. Występuje również w populacji czeskiej i słowackiej [247, 246] oraz litewskiej (Plonis, 2016). Analiza haplotypów wykazała, iż nosiciele zmiany del5395 wywodzą się od wspólnego przodka [247]. Mutacja spowodowana jest delecją 5395pz obejmującą egzony 9 oraz 10. Prowadzi do przedwczesnej terminacji translacji w kodonie 381, pozbawiając białko domeny kinazowej [247, 248]. Nosicielstwo zmiany del5395 wiąże się z 2-krotnie większym ryzykiem raka prostaty oraz piersi. Wśród mężczyzn z rodzin obciążonych rakiem prostaty, ryzyko wzrasta 4-krotnie [248].

2.3. CHARAKTERYSTYKA GENU ORAZ BIAŁKA NBS1

2.3.1. Struktura

Gen *NBS1* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 8, składa się z 16 egzonów [249-251]. Kodowane przez gen białko – nibryna zbudowane jest z 754 aminokwasów [250]. W obrębie białka wyróżnia się trzy regiony: N-końcowy (od 1 do 196 aminokwasu) zawierający domeny FHA oraz BRCT1, odpowiadające za interakcję z białkiem CtIP, centralny (od 278 do 346 aminokwasu), w którym występują motywy SQ (seryna w pozycji 278 oraz 343) oraz domena BRCT2, odpowiadający za transdukcję sygnału oraz C-końcowy (od 665 do 693 aminokwasu) odpowiedzialny za interakcję z białkiem MRE11, rekrutację kinazy ATM, a także wiązanie białka RNF20 niezbędnego dla remodelowania chromatyny. W obrębie białka znajdują się również trzy sygnały lokalizacji jądrowej NLS (Ryc. 9) [250-256].



Ryc. 9. Struktura i interakcje białka NBS1 [256, zmodyfikowano].

2.3.2. Funkcje

Białko NBS1 zaangażowane jest w naprawę podwójnych pęknięć DNA, głównie w procesie rekombinacji homologicznej, a także kontrolę cyklu komórkowego [250]. W wyniku uszkodzeń DNA dochodzi do interakcji NBS1 poprzez domenę FHA/BRCT z histonem γ H2AX. W miejsce uszkodzenia rekrutowane są zlokalizowane dotąd na terenie cytoplazmy białka RAD50 oraz MRE11, o właściwościach niezbędnych w procesie naprawy podwójnych pęknięć DNA. Białka RAD50 oraz MRE11 formują wraz z białkiem NBS1 tzw. kompleks MRN (*MRN complex*) [257, 258]. Rola NBS1 w prawidłowym przebiegu cyklu komórkowego sprowadza się do punktu kontrolnego w fazie S oraz G₂/M [257, 259, 260]. Wykazano, iż białko NBS1 jest niezbędne do aktywacji kinaz ATM oraz CHEK2 po ekspozycji na promieniowanie γ [261, 262].

Białko NBS1 zaangażowane jest również w niezależny od p53 proces apoptozy oraz remodelowanie chromatyny dzięki interakcji z białkiem RAF20 [263, 256].

2.3.3. Mutacje w genie NBS1

Mutacja 657del5 (c.657-661del) jest najczęściej występującą zmianą w Polsce oraz innych krajach Europy Wschodniej, takich jak Czechy i Ukraina. We wszystkich trzech populacjach występuje z częstością 0,57% [264]. Zmiana wywołana jest delecją 5 nukleotydów w egzonie 6 genu w rejonie między domeną BRCT1 a BRCT2. Skutkuje zmianą ramki odczytu i wprowadzeniem przedwczesnego kodonu STOP. W efekcie powstają dwie skrócone formy białka o masie 26 kDa (p26) oraz 70 kDa (p70). Forma p26 zawiera domenę FHA oraz domenę BRCT1, natomiast p70 domenę BRCT2 i pozostałą część dzikiej formy białka [254]. W przypadku wariantu p70 niezaburzona zostaje zdolność białka do wiązania RAD51 oraz MRE11, a także zdolność aktywacji kinazy ATM [265, 266].

Stwierdzono, że wariant 657del5 związany jest z podwyższonym ryzykiem raka prostaty [267] oraz raka piersi [268, 269]. Homozygotyczne nosicielstwo wariantu 657del5 jest przyczyną zespołu Nijmegen charakteryzującego się mikrocefalią, opóźnieniem wzrostu oraz zwiększoną skłonnością do rozwoju chłoniaków oraz białaczek [264-257].

Poza zmianą 657del5 znane są również inne mutacje w genie *NBS1*, należą do nich I171V (c.551A>G) oraz R215W (c.643C>T). Wariant I171V zlokalizowany jest w egzonie 5 w domenie BRCT. Polega na tranzycji adeniny na guaninę w pozycji 511 i skutkuje zamianą izoleucyny na walinę [252]. Dane dotyczące wpływu zmiany na funkcję nibryny są sprzeczne. Podczas gdy w jednej z prac nie wykazano związku z upośledzoną funkcją białka [270], w innych stwierdzono niestabilność chromosomową [271-272]. U nosicieli mutacji stwierdzono zwiększone ryzyko ostrej białaczki limfoblastycznej u dzieci [273], raka piersi [274], krtani [275], a także płuc [276].

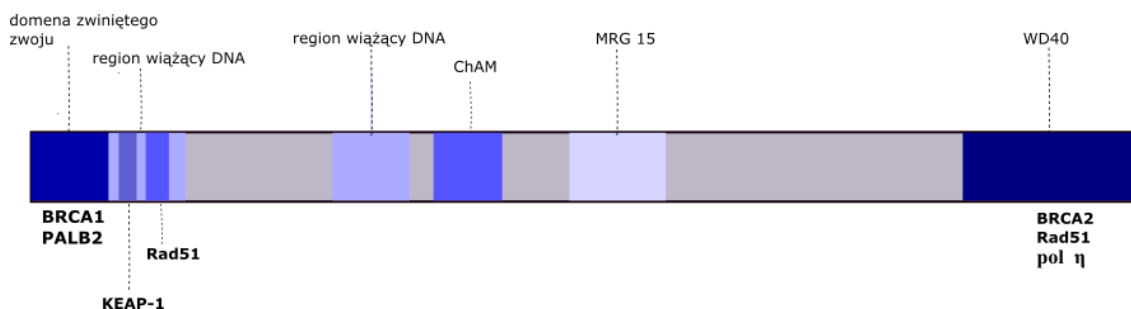
Mutacja R215W występuje w egzonie 6 genu w domenie BRCT, powoduje zastąpienie argininy tryptofanem w pozycji 215. Prowadzi do powstania niestabilnej formy białka oraz upośledza jego zdolność wiązania do histonu γ H2AX [277]. Heterozygoty złożone pod względem mutacji 657del5 oraz R215W wykazują objawy zbliżone do zespołu Nijmegen, takie jak zaawansowana mikrocefalia oraz opóźnienie wzrostu. Wykazują ponadto inne cechy nieobecne u pacjentów cierpiących na zespół

Nijmegen, do których należą częściowa lisencefalia, poważne upośledzenie umysłowe oraz brak niestabilności chromosomowej. Stwierdzono, że u heterozygot złożonych 657del5 oraz R215W dochodzi do upośledzonej fosforylacji kinazy ATM oraz białka p53 [278]. Przeprowadzone dotychczas badania nie wykazują związku między wariantem R215W a rozwojem chorób nowotworowych [279].

2.4. Charakterystyka genu oraz białka PALB2

2.4.1. Struktura

Gen *PALB2* (*Partner and Localiser of Brca2*), zwany także *FANCN* zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 16 (16p12.2) i zawiera 13 egzonów. Kodowane przez niego białko, odkryte w roku 2006, zbudowane jest z 1186 aminokwasów [280, 281]. W strukturze białka PALB2 wyróżnia się zlokalizowane na N-końcu (aminokwasy 1-394): domenę zwiniętego zwoju odpowiedzialną za homodimeryzację białka PALB2 oraz heterodimeryzację z białkiem BRCA1, region odpowiadający za zwiększenie aktywności rekombinazy RAD51, motyw wiążący białko KEAP-1 oraz dwa regiony wiążące DNA [282-286]. W centralnej części (aminokwasy 395-790) wyróżnia się motyw wiążący chromatynę – ChAM – (*chromatin-association motif*) oraz region wiążący białko MRG15 [287, 288, 286]. W C-końcowej części białka (aminokwasy 791-1186) występuje domena WD40 zawierająca sygnał eksportu jądrowego i oddziałującą z białkami BRCA2, RAD51 oraz polimerazą η (Ryc. 10) [289-292, 62].



Ryc. 10. Struktura i interakcje białka PALB2 [281, zmodyfikowano].

2.4.2. Funkcje

Białko PALB2 funkcjonuje jako supresor nowotworowy. Współpracując z wieloma białkami, w tym z innymi białkami szlaku anemii Fanconiego (FA) bierze udział w naprawie międzyniciowych wiązań krzyżowych (ICLs- *DNA interstrand crosslinks*) oraz podwójnych pęknięć DNA na drodze rekombinacji homologicznej [293, 294]. Upośledzenie działania białka PALB2 prowadzi do naruszenia integralności genomu [295]. Białko PALB2 funkcjonuje jako łącznik między białkami BRCA1 oraz BRCA2. Stabilizuje BRCA2 i umożliwia jego przemieszczenie do miejsc uszkodzeń DNA i rekrutację kluczowego dla procesu naprawy białka RAD51 [280]. Relokacja kompleksu BRCA2/PALB2 zależna jest od białka BRCA1. Ponadto stwierdzono, iż proces naprawy pęknięć DNA przy udziale białka BRCA2 uwarunkowany jest interakcją między białkami PALB2 oraz BRCA1 [282]. Całość procesu rekombinacji homologicznej stymulowana i regulowana jest dzięki interakcji białka PALB2 z białkiem MRG15 [296]. Wykazano również, iż poza udziałem w naprawie HR, współdziałanie białek BRCA1-PALB2-BRCA2 odpowiada za prawidłową kontrolę cyklu komórkowego w punkcie G2/M [297, 298] oraz warunkuje oporność na mitomycynę C [283]. Stwierdzono, że komórki pozbawione białek MRG15, BRCA2 oraz PALB2 charakteryzowały się zaburzeniami procesu HR, a także nadwrażliwością na czynniki sieciujące DNA [296]. Samodzielnie białko PALB2 oddziałuje także z białkiem KEAP-1, co ma wpływ na redukcję ilości wolnych rodników tlenowych będących jedną z wielu przyczyn uszkodzeń DNA [299].

2.4.3. Mutacje w genie *PALB2*

Brak mutacji w genach *BRCA1* oraz *BRCA2* u kobiet z rakiem piersi pozwoliło na zidentyfikowanie genu *PALB2* jako nowego czynnika predysponującego do rozwoju tego rodzaju nowotworu [300]. Podobnie jak w przypadku genu *BRCA2*, bialleliczne mutacje w genie *PALB2* są również przyczyną rzadkiego syndromu zwanego anemią Fanconiego [301]. Charakterystyczną cechą pacjentów cierpiących na tę chorobę są zaburzenia układu krwiotwórczego, mikrocefalia, wady układu szkieletowego, nieprawidłowości w budowie organów wewnętrznych, zwłaszcza serca i nerek oraz zwiększona predyspozycja do rozwoju ostrej białaczki szpikowej, a także nowotworów skóry oraz przewodu pokarmowego [302]. W toku dalszych badań stwierdzono także,

iż, poza rakiem piersi, heterozygotyczne mutacje w genie *PALB2* związane są ze zwiększonym ryzykiem raka trzustki [303; 226].

Duża część znanych jak dotąd patogennych mutacji genu *PALB2* jest mutacjami skracającymi białko i wiążącymi się z brakiem lokalizacji jądrowej białka, a także utratą części jego funkcji. Zlokalizowane są we wszystkich regionach kodujących genu [304-306]. Znane są także mutację typu *missense*, które upośledzają proces rekombinacji homologicznej oraz wpływają negatywnie na stabilność białka. Występują one w rejonie N-końcowym białka w pobliżu oraz w obrębie domeny zwiniętego zwoju, a także w rejonie C-końcowym i dotyczą domeny WD40 [306].

Dla populacji polskiej charakterystyczne są dwie mutacje w genie *PALB2*: 172_175delTTGT oraz 509_510delGA [307-309]. Poza Polską występowanie obu wariantów odnotowano także w populacji niemieckiej oraz czeskiej [310-312]. Zmiana 509_510delAG w egzonie 4 spowodowana jest delecją dwóch nukleotydów, prowadzi do zmiany ramki odczytu i zamiany argininy na izoleucynę w pozycji 170 białka, co wiąże się z przedwczesnym wprowadzeniem kodonu STOP. Funkcjonalnie wariant wykazuje znacznie zmniejszoną zdolność wiązania DNA oraz brak stymulacji białka RAD51 [307, 62]. Mutacja 172_175delTTGT w egzonie 3, wywołana delecją 4 nukleotydów powoduje zmianę ramki odczytu - zastąpienie glutaminy arginina oraz przedwczesną terminację translacji [313, 304].

Wykazano, że u nosicielek wariantów 509_510delAG oraz 172_175delTTGT ryzyko raka piersi wzrasta odpowiednio 4- oraz 5-krotnie. Nosicielstwo jednej ze zmian u kobiet chorujących na raka piersi wiąże się ponadto z krótszym czasem przeżycia w porównaniu do kobiet chorych, u których nie stwierdzono ich występowania [309].

III. CEL PRACY

- Analiza częstości polskich mutacji założeńielskich w genie *BRCA1* u pacjentek z rakiem jajnika w województwie kujawsko-pomorskim.
- Analiza związku mutacji germinalnych w genach *CHEK2*, *PALB2* oraz *NBS1* z ryzykiem zachorowania na raka jajnika.

IV. MATERIAŁY

1. PACJENCI

1.1. Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 393 nieselekcjonowanych kobiet z regionu Kujawsko-Pomorskiego, chorych na raka jajnika, które w latach 2004-2019 zgłosiły się do Poradni Genetycznej Niepublicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej Pracowni Genetyki Nowotworów w Toruniu. Od wszystkich pacjentek zebrano dane rodowodo-kliniczne dotyczące histologicznego typu guza, innych przebytych nowotworów oraz zachorowań na raka wśród krewnych pierwszego i drugiego stopnia. Spośród wszystkich pacjentek, 34 (8,6%) z nich oprócz raka jajnika chorowało także na inny rodzaj nowotworu. Najczęściej był to rak piersi, który dotyczył 18 pacjentek, rzadziej występowały rak jelita grubego (8 przypadków) oraz macicy (5 przypadków). 34 pacjentki (8,6%) deklarowały wystąpienie raka jajnika u krewnych I° lub II° (zespół HOC), natomiast 109 (27,7%) raka piersi i/lub raka jajnika (zespół HBOC). W rodzinach czterech pacjentek dotkniętych rakiem piersi i jajnika nie występowały inne przypadki raków piersi i jajnika, mimo to spełniały również kryteria HBOC [113]. W przypadku 246 kobiet (62,6%) stwierdzono występowanie sporadycznego raka jajnika. Średni wiek zachorowania na raka jajnika wynosił 54 lata. Najmłodsza pacjentka miała 16 lat, najstarsza 81. U 130 kobiet (33%) guz pojawił się przed ukończeniem 50 roku życia. Najwięcej zachorowań odnotowano w przedziale wiekowym 50-60 lat (39%). U 111 kobiet (28%) rak jajnika został zdiagnozowany powyżej 60 roku życia.

Zgodę na udział w badaniu uzyskano od wszystkich włączonych do niego pacjentek. Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (KB611/2018).

1.2. Grupa kontrolna

W celu określenia występowania w populacji ogólnej częstości wybranych zmian w genach *BRCA1*, *CHEK2*, *NBS1*, *PALB2*, w pracy użyto trzech grup kontrolnych składających się ze zdrowych osób z populacji polskiej. Pierwsza grupa liczyła 6233 osób

(4359 dorosłych oraz 1874 noworodki) [237], druga i trzecia, odpowiednio 4702 [308] oraz 4000 [226].

V. METODY

Badania molekularne przeprowadzono w pracowni genetycznej Niepublicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej Pracowni Genetyki Nowotworów w Toruniu. Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana od wszystkich kobiet biorących udział w badaniu. Z limfocytów krwi obwodowej wyizolowano genomowe DNA oraz przebadano w kierunku obecności najczęściej występujących w Polsce mutacji założycielskich genów *BRCA1* (5382insC, 185delAG, 300T>G, 4153delA, 3819del5), *CHEK2* (I157T, IVS2+1G>A; 1100delC, del5395), *NBS1* (657del5) oraz *PALB2* (172_175delTTGT, 509_510delGA).

W celu wykrycia wyżej wymienionych wariantów zastosowano warianty techniki PCR (*polymerase chain reaction*): RFLP-PCR (*restriction fragment-length polymorphism* PCR), AS-PCR (*allele specific* PCR). Produkty amplifikacji rozdzielano następnie elektroforetycznie w żelu agarozowym z użyciem barwnika kwasów nukleinowych oraz markera wielkości DNA.

Po otrzymaniu wszystkich wyników przeprowadzono analizę statystyczną.

1. IZOLACJA DNA

DNA genomowe izolowano z krwi żyłnej (7-8 ml) pobranej do probówki zawierającej antykoagulant (EDTA-K₂). Pobraną krew przelewano do probówek typu Falcon o pojemności 50 ml. W celu zajęcia hemolizy do probówek dodawano 20 ml 5% roztworu NONIDET. Całość intensywnie mieszano do uzyskania jednorodnej piany. Hemolizat wirowano 10 minut przy 3900 obrotach na minutę (rpm). Otrzymany supernatant odrzucano, natomiast uzyskany osad zawieszano w 15 ml buforu 1 x TKM (10 mM KCl, 2 mM EDTA, 4 mM MgCl₂, 10 mM Tris pH = 7,6) i ponownie wirowano przez 10 minut przy 3900 rpm. Supernatant ponownie odrzucano, a osad zawieszano w 10 ml 1 x TKM i wirowano przez 5 minut. Uzyskany supernatant odrzucano. Biały oczyszczony osad zawieszano w 3 ml roztworu TKM i po dodaniu 550 µl 10% roztworu SDS mieszano. Próby inkubowano przez 30 minut w cieplarni w temperaturze 55 °C, po czym dodawano do nich 1 ml 5 M NaCl. Roztwór mieszano i wirowano przez 20

minut przy 3900 rpm. Następnie, w celu wytrącenia DNA, otrzymany supernatant przelewano do nowych probówek, do których dodawano ok. 1 ml 98% etanolu i delikatnie mieszano. Następnie wytrącony DNA przenoszono za pomocą sterylnej końcówki do probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml zawierających 1 ml 98% etanolu. Próby wirowo przez 5 minut w temperaturze 12 °C przy 12000 rpm. Supernatant zlewano, a otrzymany osad ponownie płukano w 1 ml 98% etanolu i wirowano w takich samych warunkach. Supernatant zlewano, a osad suszono w temperaturze ok. 43 °C przez 1 godzinę. Osuszony osad zawieszano w 200 µl buforu TE o pH=8 i pozostawiano w temperaturze pokojowej do całkowitego rozpuszczenia DNA.

1.1. Odczynniki do izolacji dna z krwi żyłnej

- **Bufor 10 x TKM** (skład na 1000 ml):
 - 7,45 g KCl (MP Biomedicalis, Inc.)
 - 7,196 g MgCl₂ (MP Biomedicalis, Inc.)
 - 7,44 g EDTA (MP Biomedicalis, Inc.)
 - 7,88 g Tris x HCl (MP Biomedicalis, Inc.)
 - 6,05 g Tris Base (MP Biomedicalis, Inc.)
 - woda destylowana

- **Bufor 1 x TKM** (skład na 1000 ml):
 - 100 ml 10% TKM
 - woda destylowana

- **NONIDET:**
 - 900 ml 1% TKM
 - 45 ml IGEPAL CA-630 (MP Biomedicalis, Inc.)

- **10% SDS** - dodecylsulfian sodu (skład na 100 ml):
 - 10 g SDS (MP Biomedicalis, Inc.)
 - woda dejonizowana

- **5M NaCl** (skład na 500 ml):
 - 146,1 g NaCl (MP Biomedicalis, Inc.)
 - woda dejonizowana
- **Etanol 98%**
- **Bufor TE pH 8** (skład na 500 ml):
 - 0,605 g Tris Base (MP Biomedicalis, Inc.)
 - 0,19 g EDTA (MP Biomedicalis, Inc.)
 - woda dejonizowana

2. AMPLIFIKACJA

Amplifikacja jest to namnożenie materiału DNA z użyciem reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). W skład mieszaniny reakcyjnej wchodzi: bufor reakcyjny, trójfosforany deoksyrybonukleotydów (dNTP), startery specyficznego dla analizowanego regionu genów, polimeraza DNA oraz matrycowe DNA. Mieszanina poddawana jest zmianom temperatury w specjalnym urządzeniu - termocyklerze, co prowadzi do uzyskania nowych komplementarnych nici na jednoniciowej matrycy. Każdy cykl amplifikacji składa się z trzech etapów: denaturacji, przyłączania starterów oraz syntezy. W metodzie AS-PCR poza starterami flankującymi, stosuje się starter, który jest w pełni komplementarny do allela z mutacją lub dwa startery, z których jeden jest w pełni komplementarny do allela z mutacją, a drugi do allela dzikiego. Startery są tak zaprojektowane, by w wyniku reakcji PCR powstały produkty, które różnią się długością zależnie od genotypu badanej próbki DNA. W technice RFLP-PCR namnożony w reakcji PCR produkt poddaje się trawieniu enzymami restrykcyjnymi, które rozpoznają specyficzne sekwencje zasad w DNA, tzw. miejsca restrykcyjne i przecinają nici DNA w określonym miejscu. Fragmenty DNA otrzymane w wyniku reakcji AS-PCR oraz RFLP-PCR rozdzielane są następnie na żelu agarozowym przy użyciu barwnika kwasów nukleinowych (bromek etydy, Midori Green) [314, 113].

2.1. Odczynniki użyte do reakcji PCR

- dH₂O
- bufor do amplifikacji (Thermo Scientific)

- mieszanina deoksyrybonukleotydów (Thermo Scientific)
- polimeraza Taq (Thermo Scientific)
- startery (TipMolBiol)

2.2. Odczynniki użyte do trawienia restrykcyjnego

- dH₂O
- bufor reakcyjny (Thermo Scientific; New England BioLabs)
- enzym restrykcyjny (Thermo Scientific; New England BioLabs)

2.3. Odczynniki użyte do elektroforezy

- **Bufor obciążający 6x** (skład na 1 ml):
 - 150 mg Ficoll 400 (MP Biomedicalis, Inc.)
 - 12,5 µl cyjanianu ksylenu o stężeniu 20 mg/ml (Sigma)
 - 125 µl błękitu bromofenolowego o stężeniu 20 mg/ml (Sigma)
 - woda destylowana
- **Bufor 10X TBE** (skład na 1000 ml):
 - 108 g Tris Base (MP Biomedicalis, Inc.)
 - 55 g kwasu borowego (MP Biomedicalis, Inc.)
 - 7,5 g EDTA (MP Biomedicalis, Inc.)
 - woda destylowana
- **Żel agarozowy 3%:**
 - 3 g agaroz (PRONA)
 - 100 ml TBEx1
 - Midori GreenDNA Stain (Nippon Genetics Europe)
- **Marker wielkości DNA (ThermoScientific)**

3. WYKRYWANIE BADANYCH WARIANTÓW METODĄ RFLP-PCR

3.1. *BRCA1* C61G (c.181T>G)

- AMPLIFIKACJA PRODUKTU

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby:

- 11,7 µl wody destylowanej
- 1,5 µl buforu do amplifikacji 10 x stęż.
- 0,3 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,2 µl startera F1 (10 pM)
- 0,2 µl startera R (10 pM)
- 0,1 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 14,0 µl całkowita objętość +1 µl DNA

Sekwencje użytych starterów:

- F 5'-CTCTTAAGggCAgTTgTgAg-3'
R 5'-TTCCTACTgTggTTgCTTCC-3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

Temperatura	Czas	Cykle
94 °C	10 minut	
94 °C	25 sekund	9
68 °C w każdym następnym cyklu temperatura obniża się o 1,4 °C	25 sekund	
72 °C	35 sekund	
94 °C	25 sekund	31
55 °C	30 sekund	
72 °C	35 sekund	
72 °C	7 minut	
4 °C	∞	

• TRAWIENIE RESTRYKCYJNE PRODUKTU PCR ORAZ ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym AVaII, inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 38 °C, a następnie zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V. W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby:

- 13,0 µl wody destylowanej
- 2,0 µl buforu do reakcji 10xstęż.
- 0,4 µl enzymu AvaII
- 15,4 µl całkowita objętość + całość produktu PCR

3.2. *CHEK2 I157T (c.470T>C)*

• AMPLIFIKACJA PRODUKTU

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby:

- 11,3 µl wody destylowanej
- 1,5 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,5 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,2 µl startera F (10 pM)
- 0,2 µl startera R (10 pM)
- 0,3 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 14,0 µl całkowita objętość + 1 µl DNA

Sekwencje użytych starterów

- F 5'-ACCCATgTATCTAggAgAgCTg-3'
R 5'-CCACTgTgATCTTCTATgTATgCA-3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
95°C	5 minut	
94°C	30 sekund	38
60°C	40 sekund	
72°C	30 sekund	
72°C	5 minut	
4°C	∞	

• TRAWIENIE RESTRYKCYJNE PRODUKTU PCR ORAZ ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym Bts^oI, inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37 °C, a następnie zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V. W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby:

- 13,25 µl wody destylowanej
- 1,5 µl buforu do reakcji 10xstęż.
- 0,15 µl enzymu BtsI
- 14,9 µl całkowita objętość + całość produktu PCR

3.3. *CHEK2* IVS2+1G>A (c.444+1G>A)

• AMPLIFIKACJA PRODUKTU

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby:

- 11,65 µl wody destylowanej
- 1,5 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,3 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,2 µl startera F (10 pM)
- 0,2 µl startera R (10 pM)
- 0,15 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 14,0 µl całkowita objętość + 1 µl DNA

Sekwencje użytych starterów

F 5'-ATTTATgAgCAATTTTAAACg-3'

R 5'-TCCAgtAACCATAAgATAATAATATTA-3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
94 °C	5 minut	
95 °C	30 sekund	38
58 °C	30 sekund	
72 °C	30 sekund	
72 °C	5 minut	
4 °C	∞	

• TRAWIENIE RESTRYKCYJNE PRODUKTU PCR ORAZ ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym Hpy188III, inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37 °C, a następnie zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V. W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby:

- 13,0 µl wody destylowanej
- 1,5 µl buforu do reakcji 10xstęż.
- 0,4 µl enzymu HpyIII188
- 14,9 µl całkowita objętość + całość produktu PCR

4. WYKRYWANIE BADANYCH WARIANTÓW METODĄ AS-PCR

4.1. *BRCA1* 5382insC (c.5266dupC)

• AMPLIFIKACJA PRODUKTU

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próbki:

- 20,2 µl wody destylowanej
- 2,4 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,3 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,2 µl startera F (10 pM)
- 0,2 µl startera R (10 pM)
- 0,2 µl startera R₁ (10 pM)
- 0,2 µl polimerazyTaq (5 U/ µl)
- 23,0 µl całkowita objętość + 1µl DNA

Sekwencje użytych starterów

- F 5'-ATAgACgTgTCTgCTCCAC -3'
R 5'- gggAATCCAAATTACACAgC-3'
R1 5'-CCTTTCTgTCCTggggATT -3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
94 °C	2 minuty	
94 °C	10 sekund	10
68 °C w każdym następnym cyklu temperatura obniża się o 1,5 °C	20 sekund	
72 °C	20 sekund	
94 °C	10 sekund	
55 °C	30 sekund	30
72 °C	30 sekund	
72 °C	5 minut	
4 °C	∞	

• ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V.

W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

4.2. *BRCA1* 4153delA (c.4035delA)

• AMPLIFIKACJA

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próbki:

- 15,5 µl wody destylowanej
- 2,0 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,3 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,3 µl startera F (10 pM)
- 0,3 µl startera R (10 pM)
- 0,5 µl startera R1 (10 pM)
- 0,1 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 19,0 µl całkowita objętość + 1 µl DNA

Sekwencje użytych starterów

F 5'-TCCTAgCCCTTTCACCCATACA -3'

R 5'- gTgCTCCCCAAAAGCATAAC-3'

R1 5'-CAAgCCCGTTCCTCTTTCTCA -3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
94 °C	4 minuty	
94 °C	20 sekund	10
68 °C w każdym następnym cyklu temperatura obniża się o 1,2 °C	25 sekund	
72 °C	35 sekund	
94 °C	20 sekund	
55 °C	25 sekund	32
72 °C	35 sekund	
72 °C	7 minut	
4 °C	∞	

• ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V.

W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

4.3. *BRCA1* 185delAG (68_69delAG)

• AMPLIFIKACJA PRODUKTU

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próbki:

- 16,25 µl wody destylowanej
- 2,0 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,2 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,2 µl startera F (10 pM)
- 0,2 µl startera R (10 pM)
- 0,2 µl startera R₁ (10 pM)
- 0,1 µl polimerazyTaq (5 U/µl)
- 19,15 µl całkowita objętość + 1 µl DNA

Sekwencje użytych starterów

F 5'-gggTTggCAgCAATATgTGAAAAA -3'

R 5'- AgTgggAgAggCAgAgTggATggA-3'

R1 5'-TgACTTACCAgATgggACACTA -3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
94 °C	4 minuty	
94 °C	20 sekund	10
68 °C w każdym następnym cyklu temperatura obniża się o 1,2 °C	25 sekund	
72 °C	35 sekund	
94 °C	20 sekund	
53 °C	25 sekund	32
72 °C	35 sekund	
72 °C	7 minut	
4 °C	∞	

- **ELEKTROFOREZA**

Produkty amplifikacji zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V.

W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

4.4. *BRCA1* 3819del5 (3700_3704delGTAAA)

- **AMPLIFIKACJA PRODUKTU**

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próbki:

- 11,75 µl wody destylowanej
- 1,5 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,2 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,2 µl startera F (10 pM)
- 0,2 µl startera R (10 pM)
- 0,2 µl startera del (10 pM)
- 0,15 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 14,0 µl całkowita objętość + 1 µl DNA

Sekwencje użytych starterów

- F 5'-TCCTAgCCCTTTCACCCATACA -3'
- R 5'- AgATgCCCTTgCCAATATTACCTg-3'
- R1 5'-CTgAgAAggTATATTgTTTACCAA -3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
94 °C	4 minuty	
94 °C	20 sekund	10
68 °C w każdym następnym cyklu temperatura obniża się o 1,2 °C	20 sekund	
72 °C	25 sekund	
94 °C	10 sekund	30
58 °C	20 sekund	
72 °C	25 sekund	
72 °C	7 minut	
4 °C	∞	

• ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V.

W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

4.5. *CHEK2* 1100DELC

• AMPLIFIKACJA PRODUKTU

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próbki:

- 14,6 µl wody destylowanej
- 2,0 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,3 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,3 µl startera F₁ (10 pM)
- 0,2 µl startera R₁ (10 pM)
- 0,3 µl startera R₂ (10 pM)
- 0,4 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 18,1 µl całkowita objętość + 1,5 µl DNA

Sekwencje użytych starterów

F 5'-TTAATTTAAgCAAATTAATgTC-3'

R 5'-ggCATggTggTgTgCATC-3'

R1 5'-TggAgTgCCCAAATCATA-3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
94 °C	10 minut	
94 °C	25 sekund	9
68 °C w każdym następnym cyklu temperatura obniża się o 1,4 °C	35 sekund	
72 °C	25 sekund	
94 °C	25 sekund	
53 °C	30 sekund	31
72 °C	35 sekund	
4 °C	∞	

• ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V.

W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

4.6. NBS1 657del5 (C.657_661delACAAA)

- **AMPLIFIKACJA PRODUKTU**

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próbki:

- 11,75 µl wody destylowanej
- 1,5 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,2 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,2 µl startera F₁ (10 pM) (Tabela 13)
- 0,2 µl startera F₂ (10 pM) (Tabela 13)
- 0,2 µl startera R₁ (10 pM) (Tabela 13)
- 0,15 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 14,2 µl całkowita objętość + 1 µl DNA

Sekwencje użytych starterów

- F 5'-CACCTCTTgATgAACCATCT-3'
R 5'-CgTTAACA ACTACTgATAAgAg-3'
F1 5'-CggCAggAAAgAAATCTT-3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
94 °C	10 minut	
94 °C	25 sekund	9
62 °C w każdym następnym cyklu temperatura obniża się o 0,6 °C	30 sekund	
72 °C	35 sekund	
94 °C	25 sekund	
56 °C	30 sekund	31
72 °C	35 sekund	
4 °C	∞	

- **ELEKTROFOREZA**

Produkty amplifikacji zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V.

W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

4.7. *PALB2* 172_175 delTTGT

- **AMPLIFIKACJA PRODUKTU**

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próbki:

- 10,95 µl wody destylowanej
- 1,5 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,2 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,4 µl startera F₁ (10 pM)
- 0,4 µl startera R₁ (10 pM)
- 0,4 µl startera F₂ (10 pM)
- 0,3 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 14,15 µl całkowita objętość + 1 µl DNA

Sekwencje użytych starterów

- F 5'-TTCTTgACTCTATAAACTTTAAAgAAAAC-3'
- R 5'-CTgggAAATgAATAATAAAgCAgg-3'
- F1 5'-AAACAgtAgAAgAACAAgATTgTCTCA -3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
95°C	5 minut	
95°C	25 sekund	31
66°C	30 sekund	
72°C	30 sekund	
72°C	5 min	
4°C	∞	

• ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V.

W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

4.8. *PALB2 509_510delGA*

• AMPLIFIKACJA

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próbki:

- 10,95 µl wody destylowanej
- 1,5 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,2 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,4 µl startera F₂ (10 pM)
- 0,4 µl startera R₁ (10 pM)
- 0,4 µl startera R₂ (10 pM)
- 0,3 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 4,15 µl całkowita objętość + 1 µl DNA

Sekwencje użytych starterów

F 5'-AACAgATgACACCCAAGAACATTTTC-3'
R 5'-gTTCTggAgAATCTggAAgTTCAG-3'
R1 5'-gTCTTTTCCCAgACAATgAgTgA -3'

Profil temperaturowy reakcji PCR

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
95°C	5 minut	
95°C	25 sekund	31
65°C	30 sekund	
72°C	30 sekund	
72°C	5 min	
4°C	∞	

• ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 20-25 minut przy napięciu 220V.

4.9. *CHEK2* del5395

• AMPLIFIKACJA

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próbki:

- 15,5 µl wody destylowanej
- 2,0 µl buforu do amplifikacji 10xstęż.
- 0,3 µl mieszaniny dNTP (2 mM)
- 0,25 µl startera F₁ (10 pM)
- 0,25 µl startera R₁ (10 pM)
- 0,25 µl startera F₂ (10 pM)
- 0,25 µl startera R₂ (10 pM)
- 0,2 µl polimerazy Taq (5 U/µl)
- 19,0 µl całkowita objętość + 1 µl

Sekwencje użytych starterów

F1 5'-TgTAATgAgCTgAgATTgTgC-3'

R1 5'-CAgAAATgAgACAaggAAgTT-3'

F2 5'-CTCTgTTgTgTACAAgTgAC-3'

R2 5'-gTCTCAAACCTTggCTgCg-3'

Profil temperaturowy reakcji

TEMPERATURA	CZAS	CYKLE
94 °C	10 minut	
94 °C	25 sekund	9
68 °C w każdym cyklu temperatura obniża się o 1,4 °C	25 sekund	
72 °C	35 sekund	
94 °C	25 sekund	
55 °C	30 sekund	30
72 °C	35 sekund	
4 °C	∞	

• ELEKTROFOREZA

Produkty amplifikacji zwizualizowano na 3% żelu agarozowym, zawierającym barwnik kwasów nukleinowych Midori GreenDNA Stain. Przed nałożeniem prób na żel, do każdej z nich dodano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono 25-30 minut przy napięciu 220V.

W celu określenia wielkości otrzymanych prążków użyto markera wielkości.

5. ANALIZA STATYSTYCZNA

W celu zbadania związku mutacji w genach *BRCA1*, *CHEK2*, *PALB2* i *NBS1* z rakiem jajnika oszacowano ilorazy szans. Porównano częstość mutacji w przypadku kobiet chorych na raka jajnika i zdrowych kontrolach. Ilorazy szans zastosowano do ustalenia ryzyka względnego. Ilorazy szans zostały wygenerowane z tabel „dwa na dwa”, a istotność statystyczną oceniono przy użyciu testu dokładnego Fischera.

VI. WYNIKI

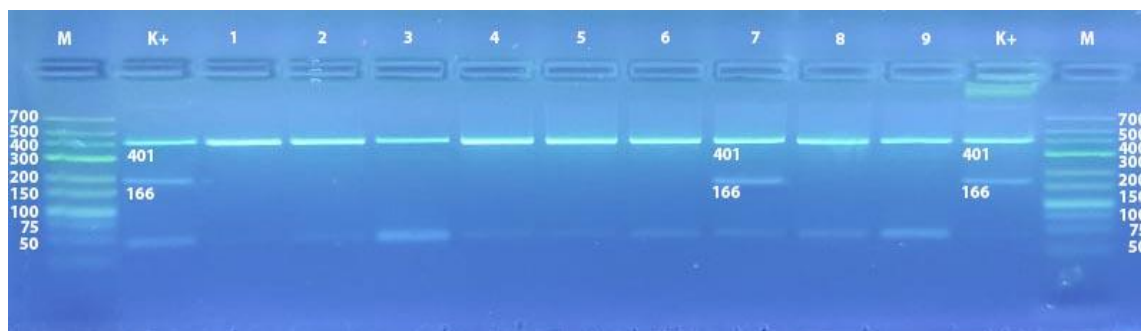
1. MUTACJE W GENIE *BRCA1*

Mutacje w genie *BRCA1* stwierdzono łącznie u 38 spośród 393 kobiet z rakiem jajnika (9,7%). Średni wiek zachorowania na raka jajnika wśród nosicielek mutacji *BRCA1* wynosił 51 lat, w porównaniu do 54 u pacjentek bez mutacji. Najmłodsza pacjentka, u której stwierdzono mutację miała 31 lat, natomiast najstarsza 73. W obu przypadkach był to wariant 5382insC.

1.1 Wariant 5382insC

Wariant 5382insC został wykryty u 22 spośród 393 pacjentek z rakiem jajnika (5,6%) i był najczęściej występującą zmianą spośród wszystkich badanych mutacji w genie *BRCA1*. Najliczniej (15 przypadków) występował w grupie pacjentek spełniających kryteria rodowodowo-kliniczne zespołu HBOC co stanowiło 13,2% tej grupy. Zmiana 5382insC stwierdzona została także u 3 spośród 34 (8,8%) pacjentek z rodzinną agregacją raka jajnika (zespół HOC), a także u 4 z 246 (1,6%) kobiet, u których nie rozpoznano dziedzicznych zespołów raka jajnika oraz raka piersi i/lub jajnika (Tab. 4). Jedna z nosicielek wariantu 5382insC poza rakiem jajnika chorowała również na raka piersi.

Poniżej zamieszczono elektroforegram, na którym uwidoczniono mutację 5382insC. Do wykrycia zmiany użyto metody AS-PCR, z zastosowaniem kontroli dodatnich oraz markera długości. U pacjentek nie będących nosicielkami wariantu występuje pojedynczy prążek liczący 401 nukleotydów. W przypadku mutacji obserwowany jest dodatkowy prążek liczący 166 nukleotydów (Ryc. 11).



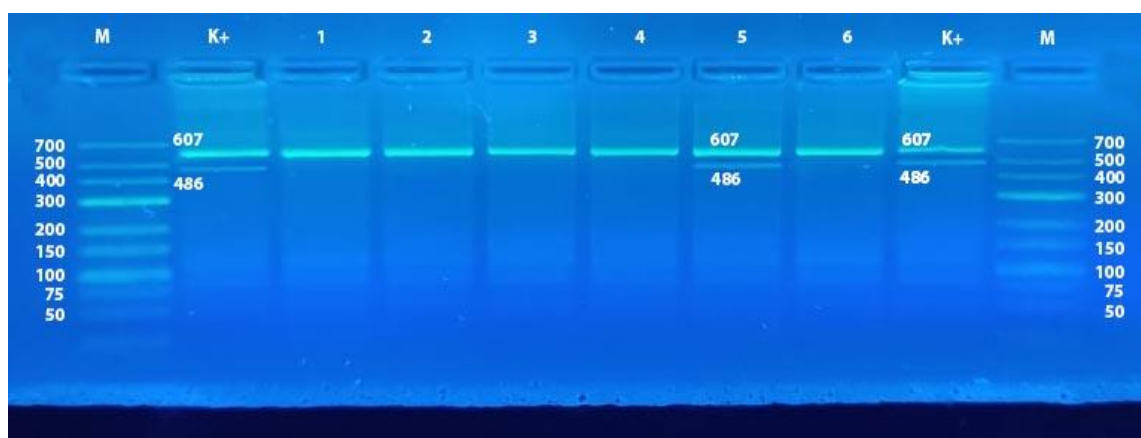
Ryc. 11. Elektroforegram przedstawiający zmianę 5382insC w genie *BRCA1*.

M- marker wielkości, K+ -kontrola dodatnia, 1-6 - próby ujemne, 7- mutacja 5382insC

1.2 Wariant 4153delA

Zmianę 4153delA wykryto u 7 z 393 (1,6%) pacjentek z rakiem jajnika. Z najwyższą częstością wariant 4153delA obserwowany był u pacjentek spełniających kryteria zespołu HBOC. Stwierdzono go u 4 ze 113 pacjentek z tej grupy (3,5%). Zmianę wykryto również u 2 z 34 kobiet (5,9%) z rodzinną agregacją raka jajnika oraz u jednej spośród 246 (0,4%) pacjentek bez dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku raka piersi i/lub jajnika. Dwie nosicielki wariantu 4153delA poza rakiem jajnika chorowały również na raka piersi (Tab. 4).

Poniżej zamieszczono elektroforegram przedstawiający wariant 4153delA. W celu wykrycia zmiany posłużono się metodą AS-PCR, z zastosowaniem kontroli dodatnich oraz markera długości. U pacjentek, u których nie stwierdzono mutacji 4153delA obserwowano pojedynczy prążek liczący 607 nukleotydów, w przypadku mutacji występował dodatkowy prążek liczący 486 nukleotydów (Ryc. 12).



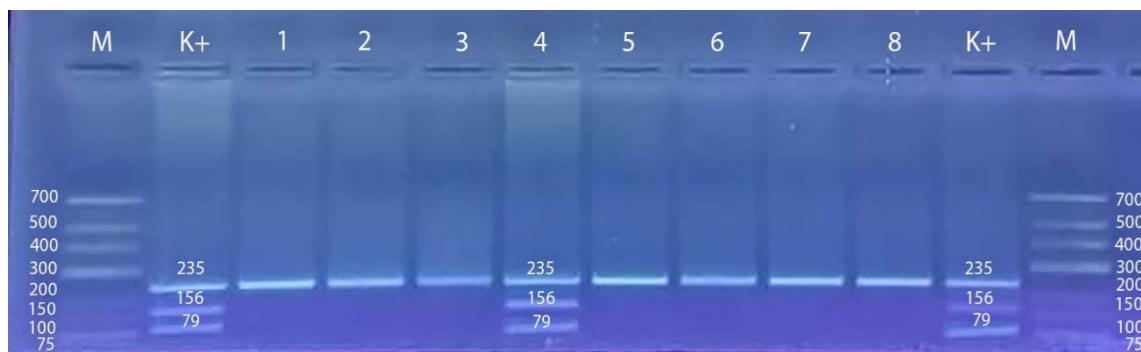
Ryc. 12. Elektroforegram przedstawiający zmianę 4153delA w genie *BRCA1*.

M- marker wielkości, K+ -kontrola dodatnia, 1-4, 6 - próby ujemne, 5- mutacja 4153delA

1.3. Wariant C61G

Mutację C61G stwierdzono łącznie u 8 z 393 (2,0%) kobiet z rakiem jajnika. Najliczniej wariant ten (4 przypadki) występował w grupie pacjentek spełniających kryteria rodowodowo-kliniczne zespołu HBOC co stanowiło 2% tej grupy. Zmianę wykryto także u 3 z 34 kobiet (8,8%) z rodzinną agregacją raka jajnika oraz u jednej spośród 246 (0,4%) pacjentek bez dodatniego wywiadu rodzinnego w kierunku raka piersi i/lub jajnika. Jedna z nosicielek wariantu C61G cierpiała również na raka piersi (Tab. 4).

Poniżej przedstawiono elektroforegram obrazujący zmianę C61G. Do wykrycia wariantu C61G użyto metody RFLP-PCR, z zastosowaniem kontroli dodatnich oraz markera długości. U kobiet nie będących nosicielkami mutacji C61G obecny był pojedynczy prążek liczący 235 nukleotydów. U nosicielek mutacji występowały dwa dodatkowe prążki liczące 156 i 79 nukleotydów (Ryc. 13).



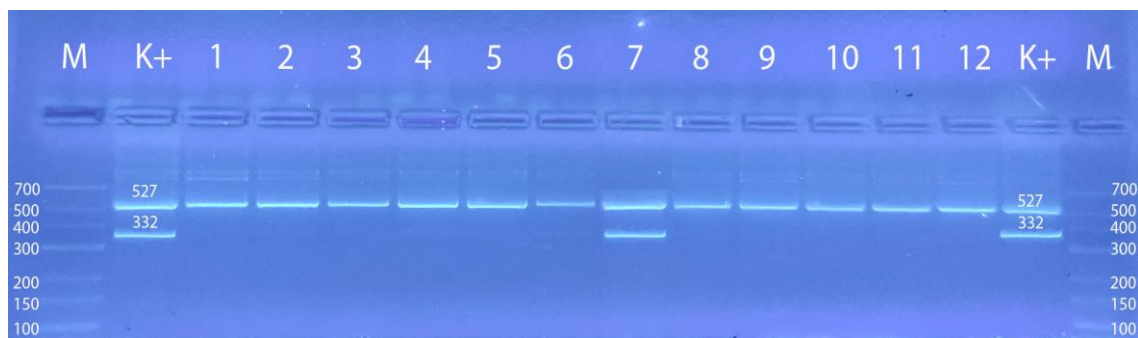
Ryc. 13. Elektroforegram przedstawiający zmianę C61G w genie *BRCA1*.

M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1-3; 5-8 - próby ujemne, 4- mutacja C61G

1.4. Wariant 185delAG

Zmianę 185delAG stwierdzono u jednej z 393 pacjentek na raka jajnika, która spełniała kryteria rodowodowo-kliniczne zespołu HBOC (Tab. 4).

Poniżej zamieszczono elektroforegram przedstawiający zmianę 185delAG. Wariant 185delAG wykrywany był z użyciem metody AS-PCR z zastosowaniem kontroli dodatnich oraz markera długości. W przypadku braku zmiany obecny był pojedynczy prążek liczący 527 nukleotydów, natomiast w przypadku mutacji dodatkowy liczący 332 nukleotydy (Ryc. 14).

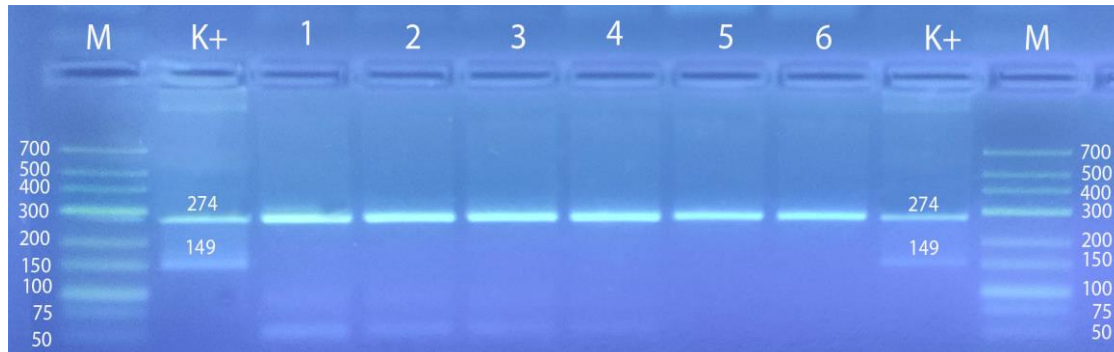


Ryc. 14. Elektroforegram przedstawiający zmianę 185delAG w genie *BRCA1*.
M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1-6; 8-12 - próby ujemne, 7- mutacja 185delAG

1.5. Wariant 3819del5

Mutacji 3819del5 nie wykryto u żadnej z 393 pacjentek (Tab.4).

Poniżej przedstawiono elektroforegram obrazujący mutację 3819del5. Do wykrycia zmiany 3819del5 użyto metody AS-PCR, z zastosowaniem kontroli dodatnich oraz markera długości. W przypadku braku mutacji widoczny był pojedynczy prążek liczący 274 nukleotydy, a w przypadku próby kontrolnej dodatkowo liczący 149 nukleotydów (Ryc. 15).



Ryc. 15. Elektroforegram przedstawiający zmianę 3819del5 w genie *BRCA1*.
M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1-6 próby ujemne

1.6. Podsumowanie

Mutacje w genie *BRCA1* stwierdzono łącznie u 38 z 393 (9,7%) pacjentek z rakiem jajnika. Warianty założycielskie *BRCA1* najczęściej występowały w grupie kobiet spełniających kryteria rodowodowo-kliniczne zespołu HBOC. W grupie tej liczącej 113 pacjentek mutacje wykryto u 24 kobiet (21%). Większość z nich (15 pacjentek- 13,2%) była nosicielkami zmiany 5382insC. Zmiany 4153delA i C61G wystąpiły z taką samą częstością (po 4 przypadki), co stanowiło łącznie 7% tej grupy.

Wariant 185delAG wykryty został u jednej pacjentki (0,8%). W grupie 34 pacjentek spełniających kryteria HOC stwierdzono łącznie 8 mutacji *BRCA1* (23,5%). U trzech pacjentek wykryto wariant C61G (8,8%), u kolejnych trzech zmianę 5382insC (8,8%), u dwóch mutację 4153delA (5,9%). Wśród 246 pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika, wykryto łącznie sześć mutacji (2,4%) w genie *BRCA1*. Cztery kobiety były nosicielkami zmiany 5382insC (1,6%). Stwierdzono po jednym przypadku zmiany C61G (0,4%) oraz 4153del (0,4%).

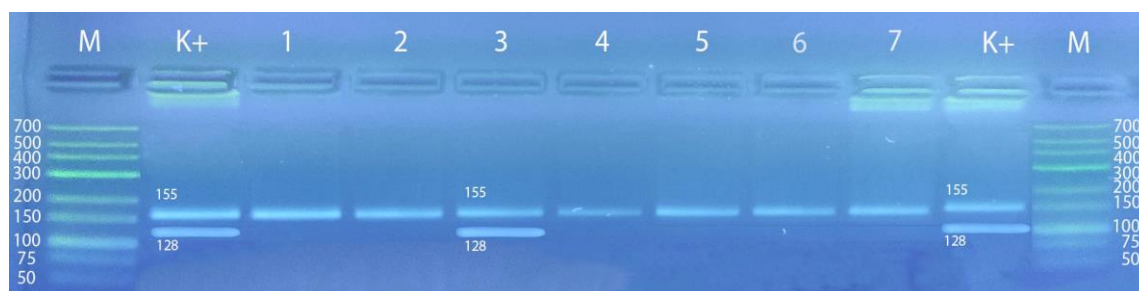
2. MUTACJE W GENIE *CHEK2*

Wśród 393 kobiet z rakiem jajnika wykryto 17 mutacji w genie *CHEK2*. Średni wiek zachorowania na raka jajnika wśród nosicielek mutacji *CHEK2* wynosił 51 lat, w porównaniu do 54 u pacjentek bez mutacji. Najstarsza pacjentka miała 66 lat, najmłodsza 25.

2.1. Wariant I157T

Zmianę I157T stwierdzono u 17 z 393 pacjentek z rakiem jajnika (4,3%). Z najwyższą częstością mutację I157T stwierdzono u 10 z 246 (4,3%) kobiet bez rodzinnej historii w kierunku raka piersi i/lub jajnika. Wariant wystąpił także u 5 ze 113 (5,5%) pacjentek spełniających kryteria zespołu HBOC oraz jednej, w której rodzinie odnotowano jedynie przypadki raka jajnika (Tab.4).

Poniżej przedstawiono elektroforegram obrazujący zmianę I157T. W celu wykrycia wariantu I157T użyto metody RFLP-PCR, z zastosowaniem kontroli dodatnich oraz markera długości. U pacjentek bez mutacji obecny był pojedynczy prążek liczący 155 nukleotydów, natomiast u nosicielek mutacji występował dodatkowy liczący 128 nukleotydów (Ryc. 16).



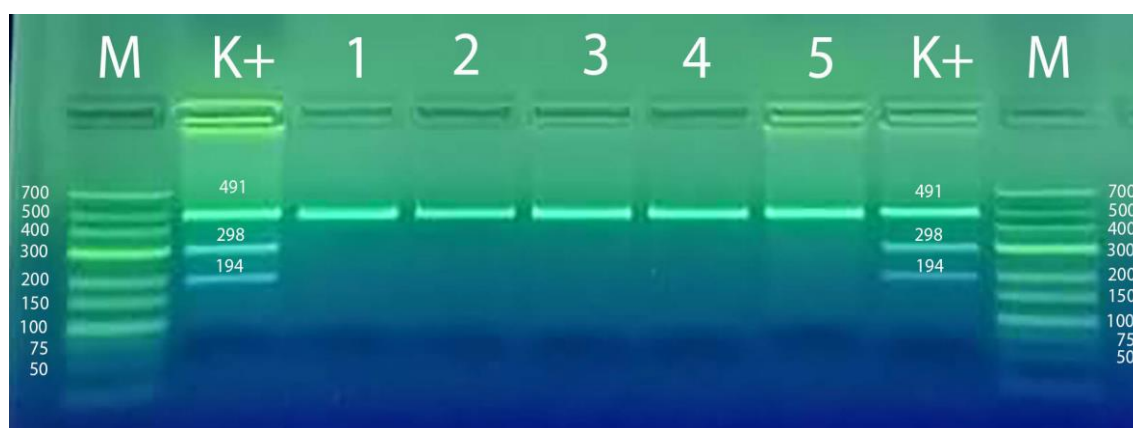
Ryc. 16. Elektroforegram przedstawiający zmianę I157T w genie *CHEK2*.

M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1,2; 4-7- próby ujemne, 3- mutacja I157T

2.2. Warianty IVS2+1G>A, 1100delC oraz del5395

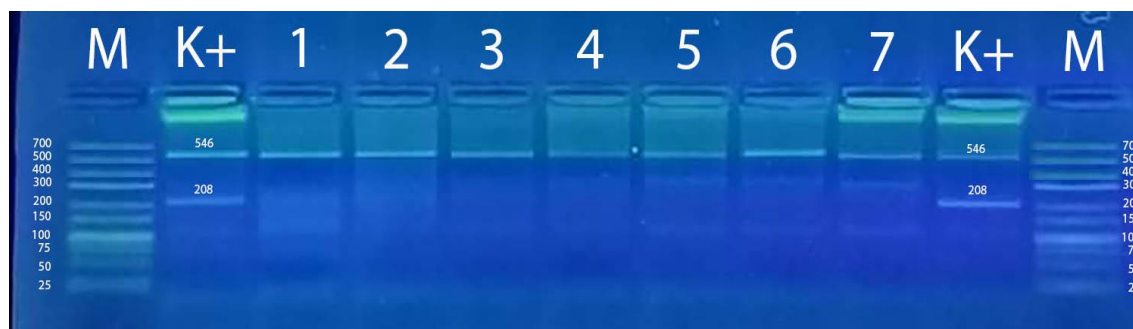
U żadnej z 393 pacjentek nie wykryto ani jednej z trzech zmian w genie *CHEK2* skracających białko. W celu wykrycia wariantu IVS2+1G>A użyto metody RFLP, natomiast w celu wykrycia zmian 1100delC oraz del5395 metody AS-PCR. W obu przypadkach zastosowano kontrole dodatnie oraz marker długości. Poniżej przedstawiono elektroforegramy obrazujące zmiany IVS2+1G>A, 1100delC oraz del5395.

U pacjentek nie będących nosicielkami zmiany IVS2+1G>A widoczny był pojedynczy prążek liczący 491 nukleotydów. U nosicieli zmiany obecne są dwa dodatkowe prążki liczące 298 oraz 194 nukleotydy (Ryc. 17).



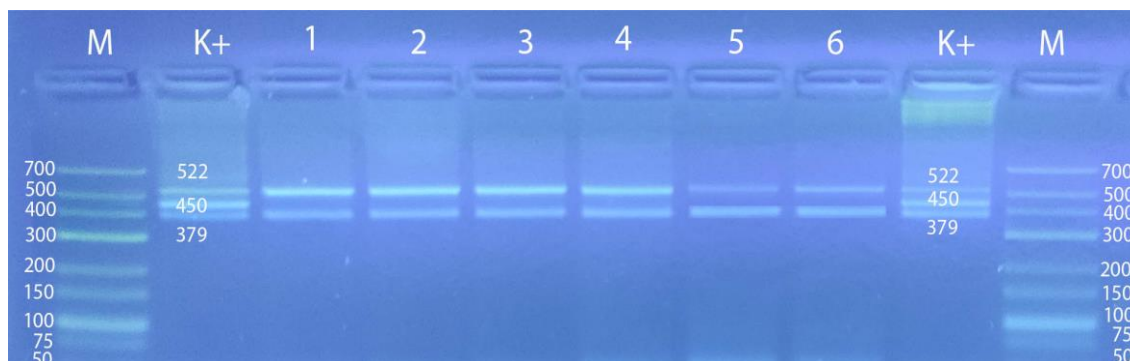
Ryc. 17. Elektroforegram przedstawiający zmianę IVS2+1G>A w genie *CHEK2*.
M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1-5 - próby ujemne

U pacjentek, u których nie stwierdzono wariantu 1100delC obserwowano był pojedynczy prążek liczący 546 nukleotydów. U heterozygot pod względem zmiany 1100delC obecny jest dodatkowy prążek liczący 208 nukleotydów (Ryc. 18).



Ryc. 18. Elektroforegram przedstawiający zmianę 1100delC w genie *CHEK2*.
M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1-7 - próby ujemne

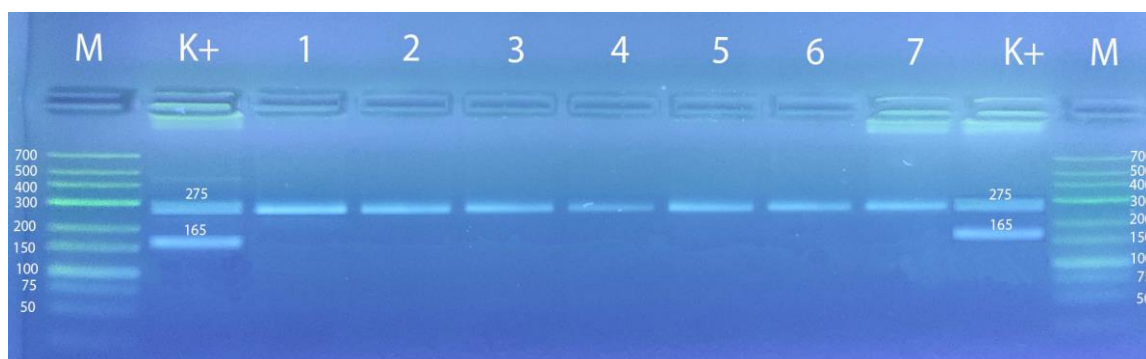
U pacjentek, które nie są nosicielkami wariantu del5395 obecne były dwa prążki liczące 522 oraz 379 nukleotydów. U nosicieli zmiany stwierdza się dodatkowy trzeci prążek liczący 450 nukleotydów (Ryc. 19).



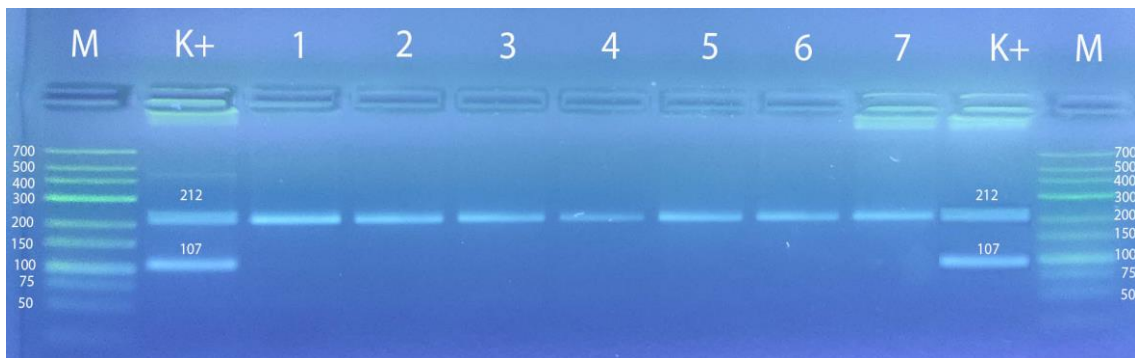
Ryc. 19. Elektroforegram przedstawiający zmianę del5395 w genie *CHEK2*.
M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1-7 - próby ujemne

3. MUTACJE W GENIE *PALB2*

U żadnej z 393 pacjentek z rakiem jajnika nie wykryto badanych wariantów genu *PALB2*. W celu wykrycia patogennych wariantów 509_510delGA oraz 172_175delTTGT użyto metody AS-PCR, zastosowano kontrole dodatnie oraz marker wielkości. Poniżej przedstawiono elektroforegramy obrazujące warianty 509_510delGA oraz 172_175delTTGT. W przypadku braku mutacji 509_510delGA obecny był pojedynczy prążek (275 nukleotydów). Przy obecności mutacji w próbce kontrolnej widoczny jest dodatkowy prążek (165 nukleotydów) (Ryc. 20). U pacjentek nie będących nosicielkami wariantu 172_175delTTGT występował pojedynczy prążek liczący 212 nukleotydów, natomiast w przypadku grupy kontrolnej dodatkowy liczący 107 nukleotydów (Ryc. 21).



Ryc. 20. Elektroforegram przedstawiający zmianę 509_510delGA w genie *PALB2*.
M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1-7 - próby ujemne

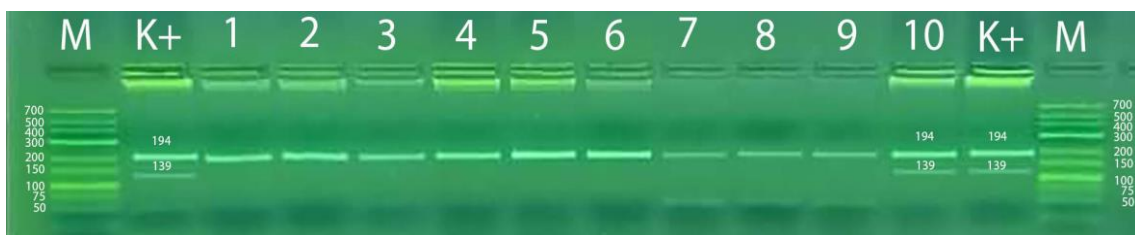


Ryc. 21. Elektroforegram przedstawiający zmianę 172_175delTTGT w genie *PALB2*.
M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1-7 - próby ujemne

4. MUTACJA W GENIE *NBS1*

Wariant 657del5 wykryty został u 5 z 393 (1,2%) pacjentek z rakiem jajnika. Najliczniej (3/246 przypadków - 1,2%) dotyczył kobiet, w rodzinach których nie występowały raki jajnika i/lub piersi. Jedna ze 113 (0,9%) pacjentek spełniała kryteria rodowodowo-kliniczne zespołu HBOC. Zmianę stwierdzono również u jednej z 34 (2,9%) pacjentek z dodatnim wywiadem w kierunku raka jajnika. Średni wiek zachorowania wśród nosicielek wariantu 657del5 wynosił 53 lata w porównaniu do 55, u pacjentek, u których jej nie wykryto. Najstarsza pacjentka, u której stwierdzono mutację miała 68 lat, najmłodsza 31.

Obecność zmiany 657del5 badano przy użyciu techniki AS-PCR, z zastosowaniem kontroli dodatnich oraz markera wielkości. W przypadku pacjentek bez mutacji na elektroforegramie widoczny jest pojedynczy prążek liczący 194 nukleotydy, natomiast w jej obecności dodatkowy liczący 139 nukleotydów (Ryc. 22).



Ryc. 22. Elektroforegram przedstawiający zmianę 657del5 w genie *NBS1*.
M- marker wielkości, K+ - kontrola dodatnia, 1-9 - próby ujemne, 10- mutacja 657del5

U 60 z 393 kobiet wykryto mutacje załóżycielskie w genach *BRCA1*, *CHEK2*, *NBS1* oraz *PALB2* wykryto łącznie 60 zmian. Z największą częstością (30 przypadków) dotyczyły one grupy kobiet spełniających kryteria zespołu HBOC. W grupie kobiet z rodzinną agregacją raka jajnika stwierdzono łącznie 10 nosicielek mutacji, natomiast w grupie pacjentek ze sporadycznym rakiem jajnika 20 nosicielek mutacji.

Tab. 4. Częstość wybranych mutacji u kobiet z rakiem jajnika.

Gen	Wariant	Liczba nosicieli (częstość)	Liczba nosicieli z rodzinną agregacją raka piersi i/lub jajnika (częstość)	Liczba nosicieli z rodzinną agregacją raka jajnika (częstość)	Liczba nosicieli ze sporadycznym rakiem jajnika (częstość)
BRCA 1	C61G	8/393 (2,0%)	4/113 (3,5%)	3/34 (8,8%)	1/246 (0,4%)
	4153delA	7/393 (1,8%)	4/113 (3,5%)	2/34 (5,9%)	1/246 (0,4%)
	5382insC	22/393 (5,6%)	15/113 (13,2%)	3/34 (8,8%)	4/246 (1,6%)
	3819del5	0/393 (0%)	0/113 (0%)	0/34 (0%)	0/246 (0%)
	185delAG	1/393 (0%)	1/113 (0,8%)	0/34 (0%)	0/246 (0%)
	SUMA	38/393 (9,7%)	24/113 (21,0%)	8/34 (23,5%)	6/246 (2,4%)
CHEK 2	I157T	17/393 (4,3%)	5/113 (4,4%)	1/34 (2,9%)	11/246 (4,1%)
	IVS2+1G>A	0/393 (0%)	0/113 (0%)	0/34 (0%)	0/246 (0%)
	1100delC	0/393 (0%)	0/113 (0%)	0/34 (0%)	0/246 (0%)
	del5395	0/393 (0%)	0/113 (0%)	0/34 (0%)	0/246 (0%)
	SUMA	17/393 (4,3%)	5/113 (4,4%)	1/34 (2,9%)	11/246 (4,5%)
PALB2	509_510delG A	0/393 (0%)	0/113 (0%)	0/34 (0%)	0/246 (0%)
	172_175del TTGT	0/393 (0%)	0/113 (0%)	0/34 (0%)	0/246 (0%)
	SUMA	0/393 (0%)	0/113 (0%)	0/34 (0%)	0/246 (0%)
NBS1	657del5	5/393 (1,2%)	1/113 (0,9%)	1/34 (2,9%)	3/246 (1,2%)
	SUMA	5/393 (1,2%)	1/113 (0,9%)	1/34 (2,9%)	3/246 (1,2%)

5. ZWIĄZEK MUTACJI W GENACH *BRCA1*, *CHEK2*, *PALB2* ORAZ *NBS1* Z RAKIEM JAJNIKA

W celu zbadania związku wybranych mutacji w genach *BRCA1*, *CHEK2*, *PALB2* oraz *NBS1* z rakiem jajnika oszacowano ilorazy szans wykorzystując trzy grupy kontrolne (Tab. 5-8) [237, 308, 226].

5.1. Gen *BRCA1*

Silny związek z ryzykiem raka jajnika zaobserwowano dla trzech wariantów patogennych w genie *BRCA1*. Mutacja 5382insC została wykryta w 22 z 393 (5,6%) przypadków raka jajnika w porównaniu do 14 z 6233 (0,2%) przypadków w grupie kontrolnej (OR=26,42; $p<0,0001$). Zmianę C61G stwierdzono u 8 kobiet z grupy badanej (2,0%) w porównaniu do 2 osób z grupy kontrolnej (0,0003%) (OR=64,74; $p<0,0001$). Wariant 4153delA występował u 7 pacjentek z grupy badanej (1,8%) oraz 1 osoby z grupy kontrolnej (0,0002%) (OR=113,02; $p<0,0001$) (Tab. 5). Zmiana 185delAG obecna była u jednej pacjentki z grupy badanej. Ze względu na brak danych dotyczących częstości występowanie wariantu 185delAG w populacji polskiej, nie jest znane ryzyko raka jajnika związane z jej nosicielstwem. W grupie badanej nie wykryto zmiany 3819del5, w związku z tym nie oceniono jej wpływu na ryzyko raka jajnika (Tab. 5).

Tab. 5. Mutacje w genie *BRCA1* w grupie badanej i kontrolach.

	PRZYPADKI	KONTROLE	OR	95%CI	p
	<i>N</i> =393	<i>N</i> =6233			
C61G	8 (2,0%)	2 (0,0003%)	64,74	13,70 – 306,00	<0,0001
4153delA	7 (1,8%)	1 (0,0002%)	113,02	13,86 – 921,36	<0,0001
5382insC	22 (5,6%)	14 (0,2%)	26,42	13,37 – 51,99	<0,0001
185delAG	1 (0,003%)	bd	-	-	-
SUMA	38	19	34,00*	19,98 – 61,36	<0,0001

bd – brak danych

* – ze względu na brak danych populacyjnych, przy obliczeniu OR nie uwzględniono wariantu 185delAG

5.2 Gen *CHEK2*

Spośród czterech badanych wariantów w genie *CHEK2* w grupie badanej wykryto 17 przypadków mutacji I157T (4,3%) w porównaniu do 320 z 6233 (5,1%) w grupie kontrolnej. Zmiana I157T nie była istotnie statystycznie związana z ryzykiem raka jajnika (OR=0,84; $p=0,560$). Ze względu na brak wariantów skracających białko w grupie badanej (IVS2+1G>A, 1100delC, del5395) w pracy nie stwierdzono ich wpływu na ryzyko raka jajnika (Tab. 6).

Tab. 6. Mutacje w genie *CHEK2* w grupie badanej i kontrolach.

	PRZYPADKI	KONTROLE	OR	95%CI	p
	<i>N=393</i>	<i>N=6233</i>			
I157T	17 (4,3%)	320 (5,1%)	0,84	0,51 – 1,38	0,56
IVS2+1G>A	0	26 (0,4%)	-	-	0,39
1100delC	0	11 (0,2%)	-	-	0,85
del5395	0	24 (0,4%)	-	-	0,42
SUMA	17 (4,3%)	376 (6,0%)	0,70	0,43 – 1,16	0,20

5.3. Gen *PALB2*

W pracy nie wykryto wariantów patogennych genu *PALB2* i nie wykazano ich związku z ryzykiem raka jajnika (Tab. 7).

Tab.7. Mutacje w genie *PALB2* w grupie badanej i kontrolach.

	PRZYPADKI	KONTROLE	OR	95%CI	p
	<i>N=393</i>	<i>N=4702</i>	-	-	
delTTGT	0 (0%)	3 (0,06%)	-	-	0,62
delAG	0 (0%)	7 (0,14%)	-	-	0,95
SUMA	0 (0%)	10 (0,20%)	-	-	0,75

5.4. Gen *NBS1*

Wariant założycielski 657del5 w genie *NBS1* stwierdzono u 5 pacjentek z grupy badanej (1,3%) w porównaniu do 22 z 4000 (0,6%) w grupie kontrolnej. Ryzyko raka jajnika związane z mutacją 657del5 było podwyższone, jednak nieistotne statystycznie (OR=2,33; $p=0,16$) (Tab. 8).

Tab.8. Mutacje w genie *NBS1* w grupie badanej i kontrolach.

	PRZYPADKI	KONTROLE	OR	95%CI	<i>p</i>
	<i>N=393</i>	<i>N=4000</i>			
657del5	5 (1,3%)	22 (0,6%)	2,33	0,88 – 6,19	0,16
SUMA	5 (1,3%)	22 (0,6%)	2,33	0,88 – 6,19	0,16

VII. DYSKUSJA

W niniejszej pracy analizowano udział pięciu wariantów germinalnych genu *BRCA1* w predyspozycji do raka jajnika wśród kobiet w województwie kujawsko-pomorskim. Analizowano także związek dziedzicznych mutacji w genach *CHEK2*, *PALB2* oraz *NBS1* z ryzykiem raka jajnika w tej samej populacji. Cechą wspólną analizowanych genów jest kluczowa rola ich białkowych produktów w zachowaniu stabilności i integralności genomu. Białko *BRCA1* jest jednym z głównych ogniw biorących udział w naprawie DNA. Uczestniczy zarówno w procesie rekombinacji homologicznej, jak i łączeniu niehomologicznych końców. Bierze również udział w usuwaniu fotoadduktów DNA. Odpowiada za aktywację wszystkich punktów kontrolnych cyklu komórkowego dając komórkom czas na naprawę ewentualnych błędów. Funkcjonuje także jako regulator aktywności wielu czynników transkrypcyjnych, takich jak receptor progesteronu oraz estrogeny. Stymulując ekspresję białek *OGG1* oraz *APE1* pośrednio uczestniczy także w naprawie typu BER [129, 315]. Białko *PALB2* działa jako łącznik między *BRCA1* oraz *BRCA2*. Stabilizuje białko *BRCA2* i odpowiada za jego rekrutację na teren jądra komórkowego w odpowiedzi na uszkodzenia DNA. Relokacja kompleksu *BRCA2/PALB2* zależna jest od białka *BRCA1* [280, 282]. Białko *CHEK2* funkcjonuje jako regulator cyklu komórkowego, w przypadku nieprawidłowości DNA hamuje przebieg mitozy i powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G1. Działalność *CHEK2* nie jest ograniczona jedynie do jednego punktu kontrolnego. Poprzez fosforylację białka *BRCA1*, *CHEK2* powoduje zahamowanie podziału komórkowego w fazie G2/M [316, 317]. Funkcje białka *NBS1* w utrzymaniu integralności genomu są niezwykle złożone. Jego rolą jest m.in. wykrycie uszkodzenia DNA, przekazanie informacji o uszkodzeniu poprzez rekrutację kinazy *ATM* oraz udział w naprawie dzięki interakcji z białkiem *MRE11* [256].

W niniejszej pracy badano pięć mutacji genetycznych w genie *BRCA1* u 393 pacjentek z rakiem jajnika charakterystycznych dla populacji polskiej oraz spotykanych w innych krajach słowiańskich: 5382insC, 4153delA, C61G, 185delAG oraz 3819del5. Wykazano, iż częstość występowania poszczególnych wariantów genetycznych jest różna, zależnie od populacji i związana z tzw. efektem założyciela [318, 319]. Najbardziej powszechną zmianą w genie *BRCA1* występującą w Europie jest 5382insC [320-322, 319, 323]. W badniu własnym wśród 393 pacjentek z rakiem jajnika stwierdzono łącznie 38 (9,7%) nosicielek mutacji genu *BRCA1* w porównaniu do 19 z 6233 (0,003%)

przypadków stwierdzonych w grupie kontrolnej (OR=34,00; $p<0,0001$). Zgodnie z wcześniejszymi danymi [324], również w badanej grupie pacjentek najczęściej występującą zmianą była insercja cytozyny w egzonie 20 genu. Wykryto ją u 22 z 393 (5,6%) przypadków raka jajnika w porównaniu do 14 z 6233 (0,2%) przypadków w grupie kontrolnej (OR=26,42; $p<0,0001$). Stwierdzono, że w krajach słowiańskich wariant 5382insC obecny jest w 9,4% wszystkich odnotowanych raków jajnika [164]. Trzy kolejne mutacje *BRCA1* (C61G, 4153delA, 185delAG) wykryte zostały w grupie badanej z mniejszą częstością. Wariant C61G stwierdzono u 8 kobiet z grupy badanej (2,0%) w porównaniu do 2 osób z grupy kontrolnej (0,0003%) (OR=64,74; $p<0,0001$). Przeprowadzona analiza wykazała, że zmiany 5382insC oraz C61G odpowiadają za ponad 70% wszystkich mutacji *BRCA1* w grupie badanej, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi dla populacji polskiej [325; 145]. Wariant 4153delA został wykryty u 7 pacjentek z grupy badanej (1,8%) oraz 1 osoby z grupy kontrolnej (0,0002%) (OR=113,02; $p<0,0001$). Jest trzecią co do częstości zmianą w genie *BRCA1* obserwowaną na terenie Polski w rodzinach z agregacją raka piersi i/lub jajnika [165]. Mutację 185delAG wykryto u jednej pacjentki z grupy badanej. Zmiana ta została opisana po raz pierwszy wśród Żydów Aszkenazyjskich. Wykazano, iż w tej populacji spotykana jest relatywnie często u kobiet z rakiem jajnika [326, 327]. W Polsce jej obecność stwierdza się w pojedynczych rodzinach z rakiem piersi i/lub jajnika [134, 166 145, 167]. W związku z rzadkim występowaniem wariantu 185delAG, nie określono ryzyka raka jajnika jakie związane jest z jego nosicielstwem. Stwierdzono, że wśród Żydów Aszkenazyjskich ryzyko raka jajnika jest dwukrotnie większe w przypadku nosicielek mutacji 185delAG niż 5382insC [328]. W grupie badanej u żadnej z pacjentek nie wykryto zmiany 3819del5. Według innych doniesień, w Polsce wariant ten obserwowany jest na Pomorzu i Opolszczyźnie [145, 185].

Wykazano, iż nosiciele mutacji w genie *BRCA1* są z reguły narażeni na pojawienie się raka jajnika w młodszym wieku w porównaniu do osób, u których mutacja nie występuje [329]. Według własnej analizy średni wiek zachorowania na raka jajnika wśród nosicielek mutacji *BRCA1* wynosił 51 lat. Wyniki te pokrywają się z wcześniej przeprowadzonym badaniem [324, 330] i są zbliżone również do danych przedstawionych w innym doniesieniu, gdzie wiek zachorowania wynosił 50 oraz 54 lata [198, 113].

W badaniu własnym nosicielstwo patogennych wariantów genu *BRCA1* stwierdzono u 9,7% kobiet z rakiem jajnika. Jest to zgodne z danymi literaturowymi,

które mówią, iż mutacje w genie *BRCA1* są przyczyną ok. 10% dziedzicznych raków jajnika [110]. Wykazano również, iż wykryte zmiany wiążą się z 34-krotnie wyższym ryzykiem raka jajnika. Stwierdzono, iż najsilniejszy związek z rakiem jajnika wiąże się z nosicielstwem mutacji 4153delA. Zmiana 4153delA zlokalizowana jest w egzonie 11 i leży w regionie genu charakteryzowanym jako region związany z częstszym występowaniem raka jajnika w stosunku do raka piersi w porównaniu do mutacji zlokalizowanych poza tym regionem [194-198]. Podobna prawidłowość dotycząca silnej korelacji lokalizacji wariantu 4153delA z rakiem jajnika została zaobserwowana również przez innych autorów [190, 331, 332]. Egzon 11 stanowi około 60% sekwencji genu *BRCA1* i mieści się w całości w obrębie regionu OCCR, odpowiedzialny jest za interakcję białka *BRCA1* z innymi białkami, stanowiąc w dużej części o jego roli jako supresora nowotworowego. Za pośrednictwem regionu kodowanego przez egzon 11 białko *BRCA1* oddziałuje z białkiem *RB* co prowadzi do zahamowania cyklu komórkowego [333]. Interakcja z białkiem *c-Myc* hamuje jego aktywność transkrypcyjną [334], natomiast z białkami *RAD51*, *RAD50* oraz *PALB2* zapewnia udział *BRCA1* w naprawie uszkodzeń DNA [335, 336]. Domena SCD kodowana w części przez egzon 11 zawiera wiele miejsc fosforylacji dla kinaz *ATM* i jest niezbędna dla lokalizacji *BRCA1* w miejscu *DSBs* [337]. W obrębie egzonu 11 znajdują się również dwie sekwencje lokalizacji jądrowej – *NLS*, które odpowiadają za translokację białka z cytoplazmy do jądra komórkowego [121]. Większa częstość raka jajnika związana z mutacjami zlokalizowanymi w egzonie 11 nie została do końca wyjaśniona. Wykazano, iż większość transkryptów mRNA genu *BRCA1* zawierająca przedwczesny sygnał terminacji translacji zostaje usunięta na drodze *NMD*, zapobiegając w ten sposób powstaniu białek o ograniczonych funkcjach [338].

W pracy stwierdzono, iż warianty 5382insC oraz C61G wiążą się z mniejszym ryzykiem raka jajnika w porównaniu do wariantu 4153delA. Obie mutacje zlokalizowane są w regionach *BCCR*, które związane są z częstszym występowaniem raka piersi w porównaniu do raka jajnika [198]. Zmiana C61G jest zmianą typu *missense*, zlokalizowaną w domenie *RING*. Prowadzi do zahamowania heterodimeryzacji z białkiem *BARD1* oraz wyłączenia funkcji *E3* ligazy ubikwitynowej, co ogranicza rerutację *BRCA1* do uszkodzeń DNA i udział w ich naprawie [339; 175]. Zmiana C61G jako zmiana typu *missense* nie podlega procesowi *NMD* [338]. Wariant 5382insC zlokalizowany jest w egzonie 20. Insercja cytozyny powoduje przesunięcie ramki odczytu i wprowadzenie w egzonie 24 przedwczesnego sygnału terminacji translacji.

Ze względu na wystąpienie kodonu STOP w ostatnim egzonie genu, zmutowany transkrypt nie jest eliminowany na drodze NMD [338]. Skrócona o 73 aminokwasy forma białka powoduje utratę domeny BRCT, co wiąże się z zaburzeniem relokacji BRCA1 do jądra komórkowego, upośledzonym wiązaniem białek BACH1 oraz CtIP i może uniemożliwiać udział BRCA1 w naprawie uszkodzeń DNA [340-342]. Badania na liniach komórkowych wykazały, że utrata C-końcowej części białka wskutek mutacji 5382insC wiąże się z brakiem apoptozy [343].

Dowiedziano, że niektóre zmutowane postacie białka BRCA1 mogą, poprzez wiązanie prawidłowych „dzikich” form BRCA1 lub regulację alternatywnych genów, wywierać efekt dominująco negatywny i zaburzać jego funkcje jako supresora nowotworowego [344-346]. Być może jest to w pewnym stopniu związane z pojawieniem się raka jajnika u nosicielek mutacji *BRCA1* w młodszym wieku i czyni je bardziej podatne na chorobę jeszcze przed wystąpieniem tzw. „drugiego uderzenia”. Wykazano, że brak utraty heterozygotyczności locus dla genu *BRCA1* obecny jest w 7% rakach jajnika [347].

Większość pacjentek (32 przypadki), u których wykryto mutację genu *BRCA1* pochodziła z rodzin, u których wystąpiła agregacja raka piersi i/lub jajnika. W przypadku sześciu pacjentek wywiad rodzinny dotyczący zachorowań na raka piersi i/lub jajnika był ujemny. Może to być spowodowane małą liczbą krewnych, przewagą męskich krewnych w rodzinie i/lub dziedziczeniem mutacji w linii męskiej, a także adopcją.

Pierwsze doniesienia o istnieniu zespołu dziedzicznego raka jajnika pochodzą z roku 1866, gdy Pierre Paul Broca zrelacjonował rodzinne występowanie raków piersi i jajnika wśród krewnych swojej żony. Jednak dopiero po blisko 130 latach, w roku 1994, gdy zidentyfikowano gen *BRCA1*, udało się określić molekularne podłoże tego zjawiska [348]. Mimo, iż na przestrzeni lat zasugerowano również związek mutacji *BRCA1* z ryzykiem raka żołądka, trzustki czy jelita grubego [349-350], większość guzów *BRCA1* pozytywnych stanowią nadal guzy piersi oraz jajnika. Zjawisko to związane jest z działaniem estrogenów, któremu podlegają oba narządy [351]. W przypadku raka jajnika negatywny wpływ estrogenów na ryzyko choroby wiąże się z wczesnym pojawieniem się pierwszej miesiączki i późnym wystąpieniem menopauzy [352, 353]. Przypuszcza się, że na rozwój raka jajnika znacznie większy wpływ mają głównie estrogeny obecne w jajniku, niż te obecne w krążeniu obwodowym, co może tłumaczyć protekcyjny charakter antykoncepcji hormonalnej [354]. Stwierdzono, że poziom estrogenów w jajniku jest około 100 razy wyższy niż w krążeniu obwodowym [355].

U kobiet z mutacją w genie *BRCA1* efekt działania estrogenów może być silniejszy. Wykazano, że w fazie lutealnej nosicielki wariantów genetycznych w genie *BRCA1* mają podwyższone stężenie estradiolu w porównaniu do kobiet, u których mutacje nie występują [351]. Wykazano, że prawidłowe białko *BRCA1* hamuje ekspresję genu *CYP19A* kodującego enzym aromatazę, która odpowiada za przekształcenie androgenów do aktywnych estrogenów. W obecności mutacji genu *BRCA1* ekspresja *CYP19A1* ulega zwiększeniu i prowadzi do podwyższenia stężenia estrogenów [356, 357]. Wyższe stężenie estrogenów u *BRCA1* pozytywnych kobiet może tłumaczyć częstsze występowanie u nich raka jajnika w młodszym wieku, jeszcze w okresie przedmenopauzalnym w porównaniu do kobiet nie będących nosicielkami zmutowanej formy genu *BRCA1*, u których guzy jajnika pojawiają się w okresie menopauzy i później [358]. Również u kobiet w okresie postmenopauzalnym, mimo wygasania czynności jajników, estrogeny są nadal produkowane w tkance tłuszczowej. Stwierdzono, że otyłość związana z podwyższonym stężeniem estrogenów może również w niewielkim stopniu stanowić ryzyko raka jajnika [359]. Wykazano, iż karcynogeny wpływ estrogenów może być skutkiem ich bezpośredniego oddziaływania z jądrowym receptorem estrogenowym alfa lub śródbłonowym receptorem estrogenowym (GPER), a także być związany z produktami ich metabolizmu. Poprzez receptor estrogenowy alfa estrogeny uruchamiają transkrypcję wielu genów odpowiedzialnych za proces proliferacji komórkowej, takich jak *c-myc* czy *Her2-neu*. Zwiększona proliferacja może prowadzić do powstania mutacji, a w wyniku ich akumulacji do transformacji nowotworowej [360]. Poprzez stymulację receptora E_{α} estrogeny odgrywają również rolę w procesie przerzutowania, hamując wzajemną adhezję komórek [361]. Oddziaływanie poprzez receptor GPER prowadzi do aktywacji kinaz ERK-1 oraz ERK-2 odpowiedzialnych za proliferację oraz różnicowanie komórek. Stwierdzono, że aktywacja ścieżki ERK-1/2 wiąże się ze zwiększoną ekspresją *BRAF* i odgrywa ważną rolę w patogenezie raka jajnika [362]. Estrogeny mogą wywierać swoje działania również za pośrednictwem jądrowego receptora β , którego ekspresja zachodzi głównie w jajniku oraz prostaty [360]. Wykazano, iż stymulacja receptora beta przez estrogeny może mieć charakter antyproliferacyjny ujawniający się w hamowaniu ekspresji cykliny D, cykliny A oraz ER α [363, 364]. Stopniowe zmniejszanie ekspresji receptora beta obserwowane jest wraz z progresją guza, od najwyższej w zdrowej tkance, po najniższą w przerzutach raka jajnika i być może jest jednym z ważniejszych zjawisk w procesie zezłośliwienia [365, 366]. Niska ekspresja ER β wiąże się również z gorszym rokowaniem [367]. W wyniku

przemian metabolicznych estrogenów, a dokładniej hydroksylacji, powstają ich katecholowe formy: 2-hydroksyestradiol oraz 4-hydroksyestradiol, które następnie ulegają utlenieniu przez cytochromy P450 (CYP1A, CYP3A4, CYP1B1) do form semichinonowych oraz chinonowych. Metabolizmowi estrogenów towarzyszy powstawanie dużych ilości wolnych rodników, które indukując stres oksydacyjny mogą prowadzić do modyfikacji zasad azotowych oraz pęknięć pojedynczej nici DNA. Ponadto chinonowe pochodne hydroksyestrogenów, zwłaszcza 4-hydroksyestradiolu, mogą reagować z zasadami purynowymi DNA tworząc addukty DNA (N3Ade, N7Gua). Estrogenowe addukty są usuwane z nici DNA tworząc miejsca apurynowe i wydalne z moczem, co może być wykorzystywane jako biomarker ryzyka chorób nowotworowych. Generowane miejsca apurynowe podlegają mechanizmom naprawczym, głównie NER, a w przypadku ich niewydolności mogą stać się źródłem niestabilności genomowej [360, 368]. Wykazano, że katecholowe pochodne estrogenów mogą powodować dwuniciowe pęknięcia DNA, głównie w fazie S cyklu komórkowego, a w ich naprawie uczestniczy białko BRCA1. Stwierdzono również, iż BRCA1 hamuje ekspresję enzymów odpowiedzialnych za przemiany estrogenów - CYP1A1 oraz CYP3A4 oraz stymuluje ekspresję dehydrogenazy NAD(P)H (chinon1) (NQO1) odpowiedzialnej za redukcję stresu oksydacyjnego. Mutacje w genie *BRCA1* mogą być zatem przyczyną nasilonego powstawania DSB wywołanego z jednej strony nadmierną ekspresją enzymów biorących udział w metabolizmie estrogenów, a z drugiej ograniczeniem potencjału detoksykacyjnego [369]. Związek białka BRCA1 z metabolizmem estrogenów może tłumaczyć rolę mutacji genu *BRCA1* w rozwoju raka w narażonych na duże stężenia estrogenów narządów jakimi są jajnik i piersi [355, 370]. Stwierdzono, iż zminimalizowanie powstawania estrogenowych adduktów DNA poprzez odpowiednią dietę, zawierającą resweratrol może zapobiegać rozwojowi choroby nowotworowej [360, 368].

Mutacje w genie *BRCA1* stanowią większość dziedzicznych postaci raka jajnika. Są również ściśle związane z występowaniem raka piersi. Poza genem *BRCA1* w patogenezie raka piersi ważną rolę odgrywają również inne geny zaangażowane w utrzymanie integralności genomu i pozostające w ścisłym związku z genem *BRCA1*. Należą do nich *CHEK2*, *PALB2* oraz *NBS1*. Związek wymienionych genów z ryzykiem raka jajnika nie został jednoznacznie wyjaśniony. Z tego powodu w pracy podjęto próbę analizy ich potencjalnego związku z rozwojem raka jajnika w populacji polskiej, a dokładniej zamieszkującej region kujawsko-pomorski.

W niniejszej pracy, w przypadku genu *PALB2* analizowano dwa warianty założycielskie charakterystyczne dla polskiej populacji: 509_510delGA oraz 172_175delTTGT [307, 308]. Stwierdzono, że nie są one związane z ryzykiem raka jajnika w badanej populacji. W grupie badanej nie zanotowano żadnego z analizowanych wariantów. W grupie kontrolnej liczącej 4702 osoby, wariant 509_510delGA obecny był u siedmiu, natomiast 172_175delTTGT u trzech osób. W innej pracy dotyczącej związku genu *PALB2* z rakiem jajnikiem w polskiej populacji, zmianę 509_510delGA wykryto u 2 z 339 pacjentek z rakiem jajnika w porównaniu do 1 spośród 1310 kontroli ($p=0,1$). Poza zmianą 509_510delGA odnotowano również inne zmiany (c.2135C>T, c.3300T>G, c.2014G>C) o nieznanym wpływie na ryzyko raka jajnika [307]. Wariant 172_175delTTGT stwierdzono u jednej z 78 kobiet ze zdiagnozowanym rakiem jajnika. W pracy nie przedstawiono danych związanych z częstością występowania wariantu w grupie kontrolnej i nie oceniono jego ryzyka z rakiem jajnika. Poza zmianami 172_175delTTGT wśród kobiet z rakiem jajnika w genie *PALB2* wykryto również inne warianty typu *missense* (c.2014G>C, c.2135C>T, c.1010T>C, c.1676A>G, c.2816T>G), których rola w patogenezie raka jajnika nie została dotychczas wyjaśniona [371]. Mimo granicznego poziomu statystycznej istotności, związek między dwoma polskimi mutacjami założycielskimi 509_510delGA oraz 172_175delTTGT w genie *PALB2* z rakiem jajnika został stwierdzony w badaniu obejmującym 2095 pacjentek oraz 1743 osoby z grupy kontrolnej. Zmiany stwierdzono u 12 (0,6%) kobiet chorych na raka jajnika i 3 osób należących do grupy kontrolnej (OR=3,34; $p=0,06$) [372]. W analizie wykonanej w Niemczech mutacje genu *PALB2* wykryto u 6 z 523 pacjentek z rakiem jajnika. Wśród badanych zmian znalazły się: c.509_510delGA, c.755_758del(CT)2insCT, c.2296_2297delTC, c.3113+5G>C, c.3361_3362del(G)2insG, c.3441T>A. W pracy nie zawarto informacji dotyczących częstości wykrytych zmian w grupie kontrolnej [373]. W badaniu przeprowadzonym na 14542 białych kobietach pochodzenia europejskiego chorych na raka jajnika stwierdzono 3 warianty genu *PALB2*: c.1592delT, c.2816T>G, c.3113G>A. Zmiany c.2816T>G, c.3113G>A występowały z podobną częstością wśród 23491 kontroli i nie miały wpływu na ryzyko raka jajnika ($p=0,81$; $p=0,61$). Wariant c.1592delT stwierdzany był w grupie badanej z nieco wyższą częstością, choć nieistotną statystycznie ($p=0,45$). Wiązał się z ponad dwukrotnie wyższym ryzykiem raka jajnika (OR=2,50) [374]. Stwierdzono, że wariant c.1592delT jest zmianą predysponującą do raka piersi [375]. Wpływ mutacji w genie *PALB2* na ryzyko raka jajnika analizowano również w Stanach Zjednoczonych.

Gen *PALB2* został wytypowany jako możliwy gen-kandydat dla raka jajnika w związku z wykryciem dwóch mutacji (c.757delAG, c.1050delAACA) w 360-osobowej grupie pacjentek z rakiem jajnika [110]. W innej pracy zmiany *PALB2* stwierdzono w 9 z 3248 przypadków raka jajnika w porównaniu do 3 z 3444 kontroli ($p=0,08$). Wśród mutacji wykrytych w grupie badanej znalazły się następujące warianty: c.509_510delGA, 1227_1231delTGTTA, c.3113G>A, c.3507_3508delTC oraz c.3549C>A, natomiast w grupie kontrolnej: c.3113G>A i c.3113+5G>C. Ze względu na niską częstość obserwowanych zmian, nie stwierdzono jasnego związku mutacji w genie *PALB2* z rakiem jajnika [111]. Podobne wyniki wskazujące na brak związku genu *PALB2* z rakiem jajnika uzyskano analizując grupę 2051 pacjentek i 3988 kontroli (OR=2,1; $p=0,31$) [376]. Odmienne rezultaty otrzymano w innym amerykańskim badaniu. Częstość mutacji w genie *PALB2* w nieselekcjonowanych rakach jajnika była wyższa niż częstość populacyjna i wiązała się z istotnie statystycznie wyższym ryzykiem raka jajnika. Wśród 1915 pacjentek warianty genetyczne *PALB2* stwierdzono u 12 kobiet w porównaniu do 2 przypadków z 4300-osobowej grupy kontrolnej (OR=10,2; $p<0,001$). Wśród wykrytych wariantów znalazły się m.in. c.757delAG, c.1050del4, c.3256C>T, c.1479delC, c.1240C>T, c.3113G>A oraz 509_510delGA [377]. W kolejnym badaniu mutację *PALB2* wykryto u 1 z 466 kobiet cierpiących na raka jajnika. W pracy nie zamieszczono informacji dotyczących grupy kontrolnej oraz rodzaju wykrytej zmiany znalezionej w grupie badanej [378]. Ponad czterokrotnie wyższe ryzyko związane z ryzykiem raka jajnika zaobserwowano w jednej z kanadyjskich prac. W grupie badanej, liczącej 1421 chorych na raka jajnika odnotowano 3 warianty w genie *PALB2* zmieniające ramkę odczytu (2 delecje oraz 1 insercję) w porównaniu do 2 spośród 4300 kontroli (OR=4.55; $p=0,10$) [379]. W innym kanadyjskim badaniu nie znaleziono związku między wariantami genu *PALB2* a rakiem jajnika. Żadna z 429 chorych na raka jajnika nie była nosicielką mutacji w genie *PALB2* [380]. Ze względu na sprzeczne wyniki nie można jednoznacznie ocenić roli mutacji genu *PALB2* jako czynnika predysponującego do rozwoju jajnika. W populacji polskiej w dwóch niezależnych pracach znaleziono dwie powtarzające się zmiany typu: c.2014G>C, c.2135C>T, co mogłoby sugerować ich potencjalny udział w patogenezie raka jajnika. W bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information) oba warianty określane są jednak jako łagodne lub prawdopodobnie łagodne.

Mimo, iż wiele z dotychczasowych prac sugeruje, że mutacje w genie *PALB2* zwiększają ryzyko raka jajnika, w celu precyzyjnego jego określenia wymagane są dalsze badania.

Gen *CHEK2* jest genem predysponującym do wielu nowotworów [221]. W pracy analizowano związek trzech mutacji skracających białko IVS2+1G>A, 1100delC, del5395 oraz jednej zmiany typu *missense* I157T z rakiem jajnika. Wymienione warianty występują w populacji polskiej z relatywnie wysoką częstością – 5,7%. Najczęściej obserwowaną zmianą jest I157T (4,8%). Warianty del5395, IVS2+1G>A oraz 1100delC dotyczą odpowiednio 0,4%, 0,3% i 0,2% populacji [235, 246]. W pracy własnej nie stwierdzono wpływu mutacji genu *CHEK2* na ryzyko raka jajnika. Wśród 393 pacjentek z rakiem jajnika, u 17 (4,5%) wykryto zmianę I157T. W grupie kontrolnej wariant *missense* stwierdzono u 320 z 6233 kontroli (5,1%) (OR=0,87; $p=0,67$). Żadna z pacjentek nie była nosicielką zmian skracających białko. W Polsce związek genu *CHEK2* z rakiem jajnika badano dotychczas w dwóch pracach. W pierwszej z nich 1108 chorych na raka jajnika oraz 4000 kontroli przebadano na obecność trzech wariantów genu *CHEK2* (I157T, IVS2+1G>A i 1100delC). Stwierdzono, że wariant I157T związany jest z występowaniem torbielakogruczolaków jajnika (OR=1,7; $p=0,005$), guzów jajnika o granicznej złośliwości (OR=2,6; $p=0,002$) oraz raków inwazyjnych o wysokim stopniu zróżnicowania (OR=2,1; $p=0,04$) [381]. W kolejnej pracy dotyczącej populacji polskiej analizowano związek zmian I157T, IVS2+1G>A, del5395 oraz 1100delC z rakiem jajnika wśród 113 chorych kobiet oraz 287 kontroli. Wariant I157T został wykryty u 18 kobiet z grupy kontrolnej (6,3%) oraz 3 (2,6%) z grupy badanej (OR=0,41; $p=0,14$). Zmiana IVS2+1G>A obecna była u 2 kobiet z grupy kontrolnej (0,7%) i 1 z grupy badanej (0,9%), co nie wiązało się ze statystycznie istotnym podwyższeniem ryzyka raka jajnika (OR=1,27; $p=0,84$). Brak związku z ryzykiem raka jajnika stwierdzono także dla wariantu del5395 (OR=2,56; $p=0,49$). Wykryto go u 1 osoby z grupy badanej (0,9%) oraz 1 z grupy kontrolnej (0,3%). W żadnej z grup nie wykryto zmiany 1100delC [382]. Brak związku z wariantami założycielskimi I157T, IVS2+1G>A oraz 1100delC w genie *CHEK2* stwierdzono również w badaniu Łukomskiej i in.. Warianty skracające białko oraz zmianę *missense* wykryto odpowiednio wśród 17 z 2095 kobiet z rakiem jajnika i 10 osób z 1743- osobowej grupy kontrolnej (OR=1,42; $p=0,38$) [372]. Brak związku dla zmiany 1100delC z rakiem jajnika stwierdzono także w badaniu przeprowadzonym w Rosji. Delecję cytozyny w egzonie 10 wykryto u 2 z 268 (0,8%) kobiet z rakiem jajnika w porównaniu do 1 z 448-osobowej

grupy kontrolnej (0,2%) [383]. W kolejnym badaniu wykonanym wśród populacji rosyjskiej wariantu 1100delC nie stwierdzono ani w grupie badanej, ani kontrolnej [384]. W innej pracy obejmującej 290 przypadków raka jajnika z terenu północno-wschodniej Rosji oraz 64 z południowej części kraju wykryto 2 mutacje 1100delC. Ryzyko związane z nosicielstwem mutacji 1100delC a rakiem jajnika nie zostało ocenione ze względu na brak grupy kontrolnej [319]. Częstość mutacji w omawianym genie u kobiet z rakiem jajnika badano także w Niemczech. U dwóch z 523 chorych na raka jajnika stwierdzono obecność wariantów 1100delC oraz c.85C>T. W pracy nie przeprowadzono analizy częstości wariantów genu *CHEK2* w grupie kontrolnej [373]. Brak wpływu na ryzyko raka jajnika wykazano w przypadku wariantu del5395 w badaniu przeprowadzonym na Łotwie. Zmianę wykryto u 4 z 399 kobiet z rakiem jajnika w porównaniu do 4 z 524 kontroli (OR=1,32; $p=0,73$) [385]. Analiza przeprowadzona w Czechach wykazała brak związku mutacji skracających białko, w tym także 1100delC i IVS2+1G>A z rakiem jajnika wśród 354 pacjentek oraz 3360 kontroli ($p=0,14$). Wariant I157T również nie zwiększał ryzyka raka jajnika ($p=0,63$). Granicznie zwiększone ryzyko stwierdzono natomiast dla trzech innych wariantów typu *missense*: c.190G>A, c.1183G>C, c.1421G>A (OR=4,77; $p=0,047$) [386]. Mutacja c.190G>A zlokalizowana jest w domenie SQ/TQ, wykazano, iż prowadzi do obniżonej autofosforylacji białka CHEK2, obniżonej fosforylacji CDC25 i wiąże się brakiem odpowiedzi na uszkodzenia DNA [387, 388]. Warianty c.1183G>C oraz c.1421G>A zlokalizowane są w domenie katalitycznej i prowadzą do zmniejszenia aktywności kinazowej białka CHEK2 [386]. W badaniu amerykańskim gen *CHEK2* był jednym z 12 genów, których mutacje zaobserwowano w grupie badanej obejmującej 360 przypadków raka jajnika. Spektrum wykrytych mutacji obejmowało p.V25A, p.S55F, p.H186R, p.R223C, p.S400F oraz c.del83-87. Dwie z nich: p.H186R oraz p.S400F zostały sklasyfikowane jako patogenne [110]. Pozytywną korelację z rakiem jajnika uzyskano dla dwóch polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w genie *CHEK2*: rs17507066 ($p=4,74 \times 10^{-7}$) oraz rs6005807 ($p=1,1 \times 10^{-7}$) wśród 15397 chorych kobiet oraz 30817 kontroli [389]. W kolejnym doniesieniu obejmującym 1915 przypadków raka jajnika i 4300 kontroli nie stwierdzono, by gen *CHEK2* był genem predysponującym do zachorowania na raka jajnika. Warianty *CHEK2* wykryto u 11 chorych kobiet i u 25 przypadków z grupy kontrolnej (OR=0,6; $p=0,37$) [377]. Brak związku wykazano także w pracy obejmującej 5020 przypadków raka jajnika oraz 64649 osób z grupy kontrolnej. Wśród grupy badanej wykryto 24 mutacje genu *CHEK2*, natomiast w grupie kontrolnej warianty *CHEK2* stwierdzono

u 434 osób ($OR=0,86$, $p=0,5$) [390]. Poza wpływem genu *CHEK2* na ryzyko rozwoju raka jajnika, analizowano również jego związek z przebiegiem choroby. Stwierdzono, że o ile mutacje genu *CHEK2* nie predysponują do raka jajnika, to jednak ich obecność u chorych na niskozróżnicowanego raka jajnika wiąże się z opornością na leczenie cisplatyną oraz gorszą prognozą, zwłaszcza jeżeli występują one w regionie kodującym sygnał lokalizacji jądrowej. Stwierdzono, że w rakach jajnika stosowanie cisplatyny prowadzi do obniżonej ekspresji białka CHEK2 i związanego z tym upośledzenia kontroli cyklu komórkowego oraz mniejszej podatności komórek na apoptozę. W związku z tym obecność mutacji w genie *CHEK2* może potęgować oporność komórek rakowych na cisplatynę [391, 392].

Gen *NBS1* jest składnikiem kompleksu (MRE11/RAD50/NBN) zaangażowanego w naprawę dwuniciowych pęknięć DNA. W populacji słowiańskiej powszechnie występującą zmianą jest 657del5 [264]. Heterozygotyczni nosiciele zmiany 657del5 narażeni są na wyższe ryzyko raka piersi i prostaty [268; 267]. Rola genu *NBS1* w patogenezie raka jajnika nie została jak dotąd ostatecznie wyjaśniona. W doniesieniu z 2002 zaobserwowano obecność mutacji 657del5 u 2 spośród 117 (1,7%) pacjentek z rakiem jajnika. Z uwagi na wyższą niż populacyjna częstość występowania (0,5%) zasugerowano, iż wariant może predysponować do raka jajnika [393]. W analizie własnej mutację 657del5 wykryto u 5 z 393 (1,2%) pacjentek z rakiem jajnika w porównaniu do 21 przypadków w 4000-osobowej grupie kontrolnej (0,5%). Nie stwierdzono jej związku z ryzykiem raka jajnika ($OR=2,33$; $p=0,16$). W innym badaniu przeprowadzonym w populacji polskiej analizowano obecność mutacji genu 657del5 oraz R215W wśród 131 pacjentek z rakiem jajnika oraz 1620 kontroli. W grupie badanej nie wykryto wariantu 657del5 w porównaniu do 10 przypadków w grupie kontrolnej. Wariant R215W obecny był w jednym przypadku raka jajnika oraz u 4 osób z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono, by obie mutacje miały wpływ na ryzyko raka jajnika [279]. Podobne rezultaty opisano w innej polskiej pracy, gdzie u 250 pacjentek z rakiem piersi i/lub jajnika (181 kobiet z rakiem piersi, 28 z rakiem jajnika i 41 z rakiem piersi i jajnika) oprócz zmiany 657del5 analizowano również wariant I171V. Zmiana 657del5 wystąpiła u 2 kobiet z rakiem piersi, nie wykryto jej u żadnej chorej na raka jajnika. W grupie kontrolnej wystąpiła z częstością 21/4000 kontroli. Wariant I171V zaobserwowano natomiast u 6 kobiet, a dokładniej 4 z rakiem piersi, 1 z obustronnym rakiem piersi oraz 1 z rakiem jajnika w porównaniu do 18 z 1300 kontroli. Nie wykazano związku mutacji genu *NBS1* z rakiem jajnika [394]. Badanie przeprowadzone w populacji rosyjskiej

również nie wykazało aby gen *NBS1* był genem predysponującym do raka jajnika. Zmiana 657del5 została zaobserwowana u 1/354 kobiet chorych na, co nie różniło się od jej częstości populacyjnej (0,57%) [319]. W Niemczech wariant 657del5 został stwierdzony w dwóch z 523 przypadków rakach jajnika [373]. Związek mutacji genu *NBS1* z rakiem jajnika był również analizowany w Stanach Zjednoczonych. Wśród grupy badanej liczącej 3248 pacjentek z rakiem jajnika wykryto 9 wariantów genu *NBS1* w porównaniu do 8 znalezionych w 3439-osobowej grupie kontrolnej. Najliczniej występującą zmianą był wariant słowiański, obecny u dwóch pacjentek z rakiem jajnika i czterech osób z grupy kontrolnej. Analiza nie wykazała wpływu mutacji *NBS1* na ryzyko raka jajnika ($p=0,61$) [111]. Podobnie w innej amerykańskiej pracy nie stwierdzono by warianty genetyczne *NBS1* odgrywały rolę w patogenezie raka jajnika. Wykryto je u 9 z 1915 chorych na raka jajnika i 6 z 4300 osób z grupy kontrolnej ($OR=2,2$; $p=0,26$) [377].

W niniejszej pracy wykazano, iż spośród analizowanych genów, jedynie gen *BRCA1* związany jest ze zwiększonym ryzykiem raka jajnika. Mimo, że pozostałe geny pozostają w ścisłym związku z *BRCA1* i razem z nim uczestniczą w kontroli cyklu komórkowego i naprawie uszkodzeń DNA, nie stwierdzono by predysponowały do rozwoju raka jajnika w badanej populacji. By jednoznacznie ocenić rolę analizowanych mutacji w genach *PALB2*, *CHEK2* oraz *NBS1* w patogenezie raka jajnika konieczne są badania na większej liczbie chorych. Z trzech analizowanych najbardziej prawdopodobnym genem kandydatem dla raka jajnika może okazać się gen *NBS1*. W badanej populacji oraz w badaniu Norquist i in., stwierdzono, że mimo, iż występował on w grupach badanych i kontrolnych z podobną częstością wiązał się z około dwukrotnie podwyższonym ryzykiem raka jajnika. W przypadku genu *NBS1* analizę związku z rakiem jajnika należałoby również poszerzyć o wariant c.553G>C (E185Q). Wykazano, iż nosiciele mutacji 657del5 o genotypie GG odnośnie polimorfizmu E185Q w tym samym genie narażeni są na ponad czterokrotnie wyższe ryzyko raka prostaty oraz około czterokrotnie wyższe ryzyko raka piersi. Genotypy inne niż GG (GC, CC) nie modyfikowały wpływu zmiany 657del5 na ryzyko raka prostaty oraz piersi [395, 396].

Dziedziczne podłoże raka jajnika związane jest z wieloma genami, między innymi tymi zaangażowanymi w naprawę uszkodzeń DNA. Przyczyną dużej części dziedzicznych postaci raka jajnika są mutacje w genie *BRCA1*. W niniejszej pracy stwierdzono, iż z czterech analizowanych genów, jedynie zmiany germinalne w genie *BRCA1* predysponowały do zwiększonego ryzyka raka jajnika. Spośród 393 analizowanych

raków jajnika, 147 kobiet spełniało kryteria zespołów HOC oraz HBOC. Mutacje genu *BRCA1* zaobserwowano u 32 z nich. Dodatkowo warianty *BRCA1* wykryto u 6 chorych kobiet bez rodzinnej historii uwzględniającej raka piersi i/lub jajnika, co sugeruje męską linię dziedziczenia w tych przypadkach. Łącznie mutacje *BRCA1* wykryto w 38 ze 153 przypadków dziedzicznego raka jajnika. Przyczynę pozostałych zachorowań mogą zatem stanowić mutacje w innych genach. Dobrze udokumentowanym czynnikiem genetycznym raka jajnika są mutacje w genach *MMR*. Jest jednak mało prawdopodobne, by mogły one tłumaczyć odsetek analizowanych przypadków, choćby ze względu na brak w grupie badanej kobiet, które spełniały kryteria zespołu HNPCC. Duże znaczenie w patogenezie raka jajnika przypisuje się genom zaangażowanym w mechanizm naprawy uszkodzeń DNA, a zwłaszcza w proces rekombinacji homologicznej. Defekty HR stwierdzone są we wszystkich typach histologicznych raka jajnika. Najczęściej pojawiają się w guzach surowicznych, endometrioidalnych oraz mięsakorakach [397-400]. Obok genu *BRCA1* jednym z genów odgrywających kluczową rolę podczas rekombinacji homologicznej jest zlokalizowany na chromosomie 13 gen *BRCA2*. Stwierdzono, iż ryzyko raka jajnika do 70 roku życia dla nosicielek mutacji *BRCA2* wynosi 11% [358]. Rola białka BRCA2 w procesie HR polega na zależnej od PALB2 rekrutacji w miejsce uszkodzenia białka RAD51 [401]. Podobnie jak w przypadku genu *BRCA1*, większość przypadków raka jajnika związana jest z mutacjami występującymi w centralnej części genu *BRCA2*, czyli w egzonie 11 [402, 403]. W egzonie 11 zlokalizowana jest zmiana 6174delT obecna u około 1% Żydów Aszkenazyjskich [404] i odpowiadająca za 16% raków jajnika w tej populacji [405]. W Polsce spektrum wykrywanych wariantów genu *BRCA2* wśród kobiet z rakiem jajnika jest bardzo szerokie. Zmiany *BRCA2* stwierdzone są z wysoką częstością w rodzinach, w których poza rakiem jajnika występują także raki żołądka oraz raki piersi. Do odnotowanych dotychczas w Polsce zmian w raku jajnika należą m.in.: 4075delGT, 5946delCT, 4862delT, 3271A/T, c.6267_6269delinsC, IVS2-7T/A, IVS6-2A/G. Pięć pierwszych zlokalizowanych jest w egzonie 11 [406, 407]. Ostatnie badania sugerują, iż poza genami *BRCA1* i *BRCA2* w patogenezie raka jajnika ważną rolę odgrywają geny *RAD51C*, *RAD51D* oraz *BRIP1*. Stwierdza się, że łącznie odpowiadają za około 10% przypadków dziedzicznego raka jajnika i w przeciwieństwie do *BRCA1* oraz *BRCA2* nie wiążą się z ryzykiem raka piersi [109]. Białka kodowane przez geny *RAD51C* oraz *RAD51D* położone na chromosomie 17 są paralogami białka RAD51, a mutację ich genów, podobnie jak *RAD51* prowadzą do zaburzeń rekombinacji homologicznej i mogą stać się przyczyną niestabilności genomowej. Ich rola w HR

polega na rozpoznaniu uszkodzenia, stabilizacji jednoniciowych fragmentów DNA, pośredniczeniu w inwazji nici, przemieszczaniu się ramion i rozwiązaniu struktury Holliday'a [408, 409]. Zaobserwowano, że brak funkcjonalnego białka RAD51D skutkuje naprawą DSBs na drodze NHEJ i prowadzi do utraty dużych fragmentów chromosomów [410]. Poza udziałem w naprawie uszkodzeń DNA, białko RAD51C uczestniczy również pośrednio w kontroli cyklu komórkowego. Wykazano, iż od jego obecności uzależniona jest fosforylacja białka CHEK2 przez kinazę ATM [411]. Mutacje w genach *RAD51C* oraz *RAD51D* wiążą się odpowiednio z około sześć- i siedmiokrotnie wyższym ryzykiem raka jajnika [412, 372]. W badaniu przeprowadzonym w Czechach, stwierdzono, że mutacje *RAD51C* oraz *RAD51D* występują również u kobiet chorych na raka jajnika, w rodzinach których nie odnotowano innych przypadków raka jajnika i/lub piersi [413]. Gen *BRIP1* jest genem supresorowym, zlokalizowanym na chromosomie 17, koduje białko o właściwościach ATP-azy zależnej od DNA oraz 5'-3' helikazy DNA. Białko BRIP1 współdziała z wieloma białkami zaangażowanymi w proces naprawy uszkodzeń DNA, m.in. BRCA1, MRE11, FANCD2. Wykazano, iż oddziaływanie białka BRIP1 z BRCA1 jest niezbędne dla pełnienia przez białko BRCA1 kluczowej roli w naprawie uszkodzeń DNA [414, 415]. BRIP1 poprzez interakcję z białkiem TopBp1 i aktywację kinazy ATR zaangażowane jest także w kontrolę cyklu komórkowego w fazie S [416]. Bierze ponadto udział w usuwaniu dupleksów i kwadradupleksów DNA, które mogą prowadzić do zaburzeń replikacji i transkrypcji [415]. Wykazano, iż u nosicielek mutacji w genie *BRIP1* ryzyko raka jajnika jest niemalże pięciokrotnie wyższe niż populacyjne [412]. Spektrum mutacji związanych z ryzykiem raka jajnika w przypadku genów *RAD51C*, *RAD51D* oraz *BRIP1* jest niezwykle szerokie. Najczęściej występującymi zmianami są mutacje typu zmiany ramki odczytu oraz mutacje typu nonsense. Ze względu na rozproszenie wariantów patogennych na całej długości sekwencji kodującej, zaleca się aby do ich wykrywania zastosować metodę sekwencjonowania [412].

Poza dobrze udokumentowaną rolą mutacji w genach *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C*, *RAD51D* oraz *BRIP1* w patogenezie raka jajnika, wciąż trwają poszukiwania innych genów, biorących udział w naprawie DNA, które mogłyby stanowić molekularne podłoże tego schorzenia. Genami kandydatami dla raka jajnika, które wiążą się z umiarkowanym wzrostem ryzyka choroby są: *BARD1*, *ATM* oraz *FANCM* [377; 417, 418].

Rak jajnika jest jednym z najczęstszych powodów zgonów nowotworowych wśród kobiet na całym świecie. Z powodu braku oczywistych objawów często

rozpoznawany jest w późnym stadium zaawansowania klinicznego i wiąże się ze złym rokowaniem. Dogłębne poznanie genetycznego podłoża raka jajnika, mogłoby przyczynić się do zwiększenia możliwości przeprowadzenia profilaktycznej adnexektomii i zmniejszenia odsetka zgonów spowodowanych tym schorzeniem. Warto zauważyć, iż poznanie genetycznych podstaw raka jajnika wiąże się nie tylko z oceną ryzyka choroby, ale także z wprowadzeniem efektywniejszej i zindywidualizowanej terapii. Jednym z najważniejszych zaleceń obowiązujących dla kobiet, u których stwierdzono mutację germinálną w genach *BRCA1* lub *BRCA2* jest wykonanie profilaktycznej adnexektomii po ukończeniu 35 roku życia. Wykazano, że zabieg wiąże się z 80% redukcją zachorowalności na raka jajnika, jajowodu oraz otrzewnej. Stwierdzono także, iż przyjmowanie doustnej antykoncepcji hormonalnej po 30 roku życia u pacjentek *BRCA* pozytywnych znacząco obniża ryzyko raka jajnika [419, 420, 113]. U nosicielek mutacji w genach *BRCA* zastosowanie znajduje terapia z użyciem związków platyny oraz inhibitorów PARP (olaparib). Związki platyny tworzą addukty DNA, które przy braku poprawnie działającego białka BRCA1 prowadzą do akumulacji uszkodzeń DNA, zatrzymania cyklu komórkowego i śmierci komórki [421]. Mutacje w genach *BRCA* upośledzając proces rekombinacji homologicznej wiążą się także z uruchomieniem alternatywnych mechanizmów naprawy DNA. Jednym z nich jest naprawa poprzez wycinanie zasad (BER), w którym kluczową rolę odgrywają polimerazy poli(ADP-rybozy). Zastosowanie inhibitorów PARP zaburza proces BER, prowadzi do nagromadzenia jednoniciowych, a w dalszej kolejności dwuniciowych pęknięć DNA. Przy braku możliwości ich naprawy, komórka ulega śmierci na drodze syntetycznej letalności [422]. Stwierdzono, że zastosowanie inhibitorów PARP efektywne jest również, gdy mutacje lub modyfikacje epigenetyczne dotyczą innych genów biorących udział w rekombinacji homologicznej, a więc między innymi *RAD51C*, *RAD51D*, *BRIP1*, *NBS1* [397, 423, 424]. Związki platyny oraz inhibitory PARP stosowane są u pacjentek z mutacją *BRCA* w przypadku platynowrażliwego raka jajnika [424]. Badania wskazują, że pomimo niejasnej jak dotąd roli mutacji genów *CHEK2* oraz *NBS1* w patogenezie raka jajnika, nosicielstwo mutacji w genie *CHEK2* może także mieć wpływ na terapię i być przyczyną oporności na leczenie platynami [391, 392].

W związku z tym, że około 10% dziedzicznych postaci raka jajnika wywołana jest mutacjami w genie *BRCA1*, a także występowaniem raka jajnika u kobiet *BRCA* pozytywnych bez rodzinnej historii zachorowań na raka piersi/jajnika oraz możliwością użycia zindywidualizowanej terapii, test na obecność zmian *BRCA1* powinien być

przeprowadzony u każdej kobiety. W niniejszej pracy badano pięć najczęściej występujących w populacji polskiej wariantów patogennych genu *BRCA1*. W przyszłości analizę należałoby rozszerzyć również o warianty, które spotykane są w populacji polskiej z niższą częstością, takie jak 5370C>T oraz 1806C>T, a w przypadku ich braku także o analizę NGS (*Next Generation Sequencing*) obejmującą całe reginy genów *BRCA1* i *BRCA2*. Mimo, że ostatnie badania sugerują, iż mutację w genie *PALB2* odpowiadają za około trzykrotny wzrost ryzyka raka jajnika, by jednoznacznie określić jego rolę oraz rolę mutacji w genach *CHEK2* oraz *NBS1* w patogenezie raka jajnika potrzebne są dodatkowe badania przeprowadzone na większej liczbie pacjentek. O ile nawet dalsze analizy nie wskażą na geny *CHEK2* oraz *NBS1* jako geny predysponujące do raka jajnika, to ze względu na ich potencjalny wpływ na wybór terapii, wskazane byłoby przeprowadzenie testów genetycznych w kierunku mutacji *CHEK2*, *NBS1* u pacjentek z już stwierdzonym rakiem jajnika. Pacjentki, u których wykryto wariant słowiański w genie *NBS1*, należałoby również poddać badaniu na obecność wariantu E185G, w celu sprawdzenia, czy tak jak w przypadku raka piersi i prostaty, stanowi on czynnik modyfikujący ryzyko raka jajnika. Obecnie wśród kobiet z rakiem jajnika i tych z rodzinnym obciążeniem rakiem jajnika najczęściej stosowanymi testami są testy na obecność mutacji w genach *BRCA*. Być może kobiety te powinny również rutynowo zostać objęte badaniem wykrywającym mutacje w genach *BRIP1*, *RAD51C* oraz *RAD51D*.

VIII. PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Wśród 393 pacjentek z rakiem jajnika u 38 z nich (9,7%) stwierdzono jedną z czterech mutacji założycielskich genu *BRCA1* (5382insC, C61G, 4153delA, 185delAG). W większości przypadków mutację wystąpiły u kobiet z obciążonym wywiadem rodzinnym w kierunku raka jajnika oraz piersi i/lub jajnika. U 6 nosicielek mutacji *BRCA1* w rodzinie nie wystąpiły przypadki raka jajnika oraz piersi i/lub jajnika. Najczęściej występującą zmianą była mutacja 5382insC (22 przypadki), natomiast z największym ryzykiem raka jajnika związany był wariant 4153delA (OR=113,02; $p<0,0001$). U żadnej z pacjentek nie wykryto wariantu 3819del5.

W badanej grupie nie znaleziono charakterystycznych dla populacji polskiej mutacji założycielskich w genie *PALB2*.

W przypadku genu *CHEK2* jedyną występującą mutacją wśród badanej grupy była zmiana I157T. Stwierdzono ją u 17 z 393 pacjentek (4,3%). Wariant nie wiązał się z podwyższonym ryzykiem raka jajnika (OR=0,84; $p=0,56$). Warianty skracające białko nie były obecne wśród kobiet z rakiem jajnika.

Mutację 657del5 w genie *NBS1* wykryto u 5 kobiet z rakiem jajnika (1,3%). Wariant wiązał się z dwukrotnie większym, choć nieistotnym statystycznie ryzykiem raka jajnika (OR=2,33; $p=0,16$).

IX. WNIOSKI

Gen *BRCA1* jest genem związanym z podwyższonym ryzykiem zachorowania na raka jajnika. W badanej populacji cztery mutacje genu *BRCA1* (5382insC, 4153delA, C61G, 185delAG) wystąpiły u 9,7% kobiet z rakiem jajnika. W związku z tym wszystkie chore z rakiem jajnika z województwa kujawsko-pomorskiego, również te bez obciążonego wywiadu rodzinnego w kierunku raka jajnika i/lub piersi, powinny zostać poddane badaniu na obecność czterech wariantów założycielskich w genie *BRCA1* (5382insC, C61G, 4153delA oraz 185delAG). W przypadku otrzymania ujemnego wyniku, najprawdopodobniej u kobiet tych należy przeprowadzić rozszerzoną diagnostykę w kierunku mutacji genu *BRCA1* przy użyciu techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS).

W niniejszej pracy nie wykazano związku między polskimi mutacjami założycielskimi w genie *PALB2* a zwiększonym ryzykiem raka jajnika. W związku z innym przeprowadzonym badaniem zmiany te mogą odpowiadać za niewielki odsetek raków jajnika (0,6%) w populacji polskiej, dlatego by jednoznacznie ocenić udział genu *PALB2* w jego patogenezie konieczne są dalsze badania.

Gen *CHEK2* nie jest genem związanym ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka jajnika.

Gen *NBS1* nie stanowi istotnego ryzyka dla zachorowania na raka jajnika. Nie można wykluczyć go jednak jako modyfikatora, który w obecności innych wariantów genetycznych może mieć wpływ na ryzyko zachorowania.

X. STRESZCZENIE

Rak jajnika jest z jedną z najczęstszych przyczyn zgonów nowotworowych wśród kobiet na świecie. Patogeneza raka jajnika nie została jak dotąd w pełni wyjaśniona. Duży wpływ przypisuje się czynnikom środowiskowym, reprodukcyjnym, a także genetycznym. W niniejszej pracy badano związek wariantów założycielskich dla populacji polskiej w genach: *BRCA1*, *CHEK2*, *PALB2* oraz *NBS1* oraz ryzykiem raka jajnika. Wcześniejsze badania wykazały ich związek m.in z rakiem piersi oraz prostaty. Dowiedziono, iż produkty białkowe analizowanych genów zaangażowane są w proces naprawy uszkodzeń DNA, kluczowy w kwestii zachowania stabilności i integralności genomu, a tym samym zapobiegający transformacji nowotworowej.

W niniejszej pracy badaniem objęto 393 kobiet z rakiem jajnika. U 147 z nich rozpoznano dziedziczne zespoły HOC oraz HBOC. W przypadku 246 kobiet nie odnotowano rodzinnej agregacji raka jajnika i/lub piersi (sporadyczny rak jajnika). Warianty założycielskie wykryto łącznie u 60 pacjentek. Najczęściej występującymi zmianami były mutacje w genie *BRCA1* (38 przypadków). Warianty *CHEK2* i *NBS1* stwierdzono odpowiednio u 17 i 5 pacjentek. Większość mutacji dotyczyła pacjentek z dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku raka piersi i/lub jajnika. Nie wykryto wariantów założycielskich w genie *PALB2*. Potwierdzono silny związek mutacji w genie *BRCA1* z ryzykiem raka jajnika (OR=34,00; $p < 0,0001$). Nie wykazano natomiast, aby mutacje w genie *CHEK2* wiązały się z ryzykiem raka jajnika (OR=0,84; $p=0,56$). W przypadku zmiany 657del5 w genie *NBS1* stwierdzono około 2,5-krotny wzrost ryzyka, nie był on jednak istotny statystycznie (OR=2,33; $p=0,16$). By jednoznacznie wykluczyć wpływ mutacji w genach *CHEK2*, *PALB2* oraz *NBS1* na ryzyko raka jajnika wymagane są dalsze badania przeprowadzone na większej grupie pacjentek.

XI. ABSTRACT

Ovarian cancer is one of the most common causes of death from malignancies among women worldwide. The pathogenesis of ovarian has not yet been clearly established. Environmental, reproductive and genetic factors have a large impact on ovarian cancer risk. In this study, the association between founder variants which are present in the Polish population in the *BRCA1*, *CHEK2*, *PALB2* and *NBS1* genes and the risk of ovarian cancer was investigated. Previous studies showed their role in the development of breast and prostate cancer. It has been evaluated that proteins encoded by the above-mentioned genes play an important role in the maintenance of genome stability and integrity and thus prevent malignant transformation.

In this study, 393 women with ovarian cancer were tested for twelve most common founder alleles in *BRCA1*, *CHEK2*, *PALB2* and *NBS1* genes. 147 patients fulfilled criteria for HOC and HBOC syndromes. There were 246 ovarian cancer cases who reported negative family history of breast and ovarian cancer (sporadic cases). In total, twelve founder variants were detected in 60 patients. The most common alternations were mutations in the *BRCA1* gene (38 cases). *CHEK2* and *NBS1* variants were found in 17 and 5 patients, respectively. Most of the detected mutations affected women who reported positive family history for ovarian and/or breast cancer. None of the two tested *PALB2* truncating mutations was observed among 393 women with ovarian cancer.

The study confirmed a strong association between mutations in the *BRCA1* gene and the risk of ovarian cancer (OR=34, $p<0,0001$). It was shown that genetic variants in *CHEK2* gene do not affect ovarian cancer risk (OR=0,84; $p=0,56$). In the case of the 657del5 alternation in the *NBS1* gene, an approximately 2,5-fold increase in risk for ovarian cancer was found, but it was not statistically significant (OR=2,33; $p=0,16$).

To investigate the impact of mutations in the *CHEK2*, *PALB2* and *NBS1* genes on the risk of ovarian cancer, further studies on a larger group of patients are required.

XII. LITERATURA

1. Coburn S., Bray F., Sherman M. i in.: 2017. *International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype*. Int J Cancer; 140(11): 2451-2460.
2. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. i in.: 2018. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin; 68(6): 394-424.
3. Khazaei Z., Mosavi Jarrahi A., Sohrabivafa M. i in.: 2019. *The incidence and mortality of ovarian cancer, its association with Body Mass Index and Human Development Index: an ecological study*. WCRJ; 6: e1317.
4. Andrews L., Mutch D. G.: 2017 *Hereditary ovarian cancer and risk reduction*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.; 41: 31-48.
5. Didkowska J., Wojciechowska U., Czaderny K. i in.: 2019. *Nowotwory złośliwe w Polsce w 2017 roku*. Krajowy Rejestr Nowotworów. Centrum Onkologii- Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie. Warszawa.
6. Al Bakir M., Gabra H.: 2014. *The molecular genetics of hereditary and sporadic ovarian cancer: implications for the future*. Br Med Bull.; 112(1): 57-69.
7. McGuire V., Hartge P., Liao L. M. i in.: 2016. *Parity and Oral Contraceptive Use in Relation to Ovarian Cancer Risk in Older Women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.; 25(7): 1059-1063.
8. Momenimovahed Z., Tiznobaik A., Taheri S. i in.: 2019. *Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors*. Int J Womens Health.; 30 (11): 287-299.
9. Li D. P., Du C., Zhang Z. M. i in.: 2014. *Breastfeeding and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis of 40 epidemiological studies*. Asian Pac J Cancer Prev.; 15(12): 4829-4837.
10. McNeilly A. S.: 2001. *Lactational control of reproduction*. Reprod Fertil Dev.; 13: 583-590.
11. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral V., Doll R. i in.: 2008. *Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23, 257 women with ovarian cancer and 87,303 controls*. Lancet; 371(9609): 303-314.
12. Antoniou A. C., Rookus M., Andrieu N. i in.: 2009. *Reproductive and hormonal factors, and ovarian cancer risk for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results*

- from the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*; 18: 601-610.
13. Cibula D., Gompel A., Mueck A. O. i in.: 2010. *Hormonal contraception and risk of cancer*. *Hum Repr Update*; 16: 631-650.
 14. Tribart B., Ness R. B., Lo-Ciganic W. i in.: 2014. *Aspirin, Nonaspirin Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug, and Acetaminophen Use and Risk of Invasive Epithelial Ovarian Cancer: A Pooled Analysis in the Ovarian Cancer Association Consortium*. *J Natl Cancer Inst.*; 106(2): djt431.
 15. Khunnarong J., Tangjitgamol S., Manusirivithaya S. i in.: 2008. *Expression of cyclooxygenase-1 in epithelial ovarian cancer: a clinicopathological study*. *Asian Pac J Cancer Prev.*; 9(4): 757-762 .
 16. Gaitskell K., Green J., Pirie K. i in.: 2016. *Tubal ligation and ovarian cancer risk in a large cohort: Substantial variation by histological type*. *Int J Cancer*; 138(5): 1076-1084.
 17. Rice M. S., Murphy M. A., Tworoger S. S.: 2012. *Tubal ligation, hysterectomy and ovarian cancer: A meta-analysis*. *J Ovarian Res.*; 5: 13.
 18. Stempczyńska J., Potemski P.: 2003. *Nowotwory jajnika*. 190-195 (w:) *Onkologia-podręcznik dla studentów i lekarzy*, Kordek R., Jassem J., Krzakowski M., Jeziorski A. (red.), Medical Press, Gdańsk.
 19. Liu Y., Ma L., Yang X. i in.: 2019. *Menopausal Hormone Replacement Therapy and the Risk of Ovarian Cancer: A Meta-Analysis*. *Front Endocrinol (Lausanne)*; 10: 801.
 20. Brilhante A. V. M., Augusto K. L., Portela M. C. i in.:2017. *Endometriosis and Ovarian Cancer: an Integrative Review (Endometriosis and Ovarian Cancer)*. *Asian Pac J Cancer Prev.*; 18(1): 11-16.
 21. Zhang D., Li N., Xi Y. i in.: 2017 *Diabetes mellitus and risk of ovarian cancer. A systematic review and meta-analysis of 15 cohort studies*. *Diabetes Res Clin Pract.*; 130 :43-52.
 22. Shah M. M., Erickson B. K., Matin T. i in.: 2014. *Diabetes mellitus and ovarian cancer: more complex than just increasing risk*. *Gynecol Oncol.*; 135(2): 273-277.
 23. Akhavan S., Ghahghaei-Nezamabadi A., Modaresgilani M. i in.: 2018. *Impact of diabetes mellitus on epithelial ovarian cancer survival*. *BMC Cancer.*;12; 18(1): 1246.

24. Gubbels J. A. A., Claussen N., Kapur A. i in.: 2010. *The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer*. J Ovarian Res.; 3: 1-11.
25. Ebell M. H., Culp M. B., Radke T. J.: 2016. *A Systematic Review of Symptoms for the Diagnosis of Ovarian Cancer*. Am J Prev Med.; 50(3): 384-394.
26. Kipps E., Tan D. S. P., Kaye S. B.: 2013. *Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research*. Nat Rev Cancer; 13(4): 273-282.
27. Wcisło G., Szczylik C.: 2011. *Rak jajnika – patobiologia, diagnostyka i przegląd współczesnych metod leczenia*. Termedia Wydawnictwo Medyczne. Poznań.
28. Permut-Wey J., Sellers T.: 2009. *Epidemiology of ovarian cancer*. Methods Mol Biol 472: 413-437.
29. Jelovac D., Armstrong D. K.: 2016. *Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer*. CA Cancer J Clin.; 61(3): 183-203.
30. Lalwani N., Prasad S. R., Vikram R. i in.: 2011. *Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment*. Radiographics; 31(3): 625-646.
31. Kujawa K. A., Lisowska M. K. M.: 2015. *Rak jajnika – od biologii do kliniki*. Postepy Hig Med Dosw (online); 69: 1275-1290.
32. Dubeau L.: 1999. *The cell of origin of ovarian epithelial tumors and the ovarian surface epithelium dogma: does the emperor have no clothes?* Gynecol Oncol. 1999; 72(3): 437-442.
33. Marquez R. T., Baggerly K. A., Patterson A. P. i in.: 2005. *Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium, and colon*. Clin. Cancer Res.; 11: 6116-6126.
34. Chen V. W., Ruiz B., Killeen J. L. i in.: 2003. *Pathology and classification of ovarian tumors*. Cancer; 97(10 Suppl): 2631-2642.
35. McCluggage W. G.: 2011. *Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis*. Pathology; 43(5): 420-432.
36. Kurman R. J., Shih I. M.: 2010. *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. Am. J. Surg. Pathol.; 34: 433-443.
37. Kurman R. J., Shih I. M.: 2011. *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer - shifting the paradigm*. Hum. Pathol.; 42: 918-931.

38. Callahan M. J., Crum C. P., Medeiros F. i in.: 2007. *Primary fallopian tube malignancies in BRCA-positive women undergoing surgery for ovarian cancer risk reduction*. J Clin Oncol.; 25(25): 3985-3990.
39. Kindelberger D. W., Lee Y., Miron A. i in.: 2007. *Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship*. Am J Surg Pathol.; 31(2): 161-169.
40. Zaino R. J., Brady M. F., Lele S. M. i in.: 2011. *Advanced stage mucinous adenocarcinoma of the ovary is both rare and highly lethal: a Gynecologic Oncology Group study*. Cancer; 117(3): 554-562.
41. Rosenblatt K. A, Thomas D. B.: 1996. *Reduced risk of ovarian cancer in women with a tubal ligation or hysterectomy. The World Health Organization Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 5: 933-935.
42. Takano M., Kikuchi Y., Yaegashi N. i in.: 2006. *Clear cell carcinoma of the ovary: a retrospective multicentre experience of 254 patients with complete surgical staging*. Br J Cancer; 94:1369-1374.
43. Kommos F., Kommos S., Schmidt D. i in.: 2005. *Survival benefit for patients with advanced-stage transitional cell carcinomas vs. other subtypes of ovarian carcinoma after chemotherapy with platinum and paclitaxel*. Gynecol Oncol.; 97(1): 195-199.
44. Antila R., Jakanen J., Heikinheimo O.: 2006. *Comparison of secondary and primary ovarian malignancies reveals differences in their pre and perioperative characteristics*. Gynecol Oncol.; 101: 97-101.
45. Lengyel E.: 2010. *Ovarian Cancer Development and Metastasis*. Am J Pathol.; 177(3); 1053-1064.
46. Recine M. A., Deavers M. T., Middleton L. P. i in.: 2004. *Serous carcinoma of the ovary and peritoneum with metastases to the breast and axillary lymph nodes. A potential pitfall*. Am. J. Surg. Pathol.; 28: 1646-1651.
47. Bast R. C. Jr., Hennessy B., Mills G. B. 2009.: *The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation*. Nat Rev Cancer; 9: 415–428.
48. Fathalla M. F.: 1971. *Incessant ovulation – a factor in ovarian neoplasia?* Lancet; 2: (7716): 163.

49. Vercellini P., Crosignani P., Somigliana E. i in.: 2011. *The 'incessant menstruation' hypothesis: a mechanistic ovarian cancer model with implications for prevention.* Hum Reprod.; 26: 2262-2273.
50. Seidman J. D.: 2013. *The presence of mucosal iron in the fallopian tube supports the "incessant menstruation hypothesis" for ovarian carcinoma.* Int J Gynecol Pathol; 32: 454-458.
51. Cramer D. W., Welch W. R.: 1983. *Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis.* J Natl Cancer Inst; 71: 717-721.
52. Risch H.: 1998. *Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone.* JNCI Cancer Spectrum; 90: 1774 -1786.
53. Ingerslev K., Hogdall E., Schnack T. H. i in.: 2017. *The potential role of infectious agents and pelvic inflammatory disease in ovarian carcinogenesis.* Infect Agent Cancer; 18; 12: 25.
54. Savant S. S., Sriramkumar S., O'Hagan H. M.: 2018. *The Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in the Development, Progression, Metastasis, and Chemoresistance of Epithelial Ovarian Cancer.* Cancers (Basel); 30; 10(8).
55. Gajewski, T.F.; Schreiber, H.; Fu, Y.X.: 2013. *Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment.* Nat. Immunol.; 14: 1014-1022.
56. Freedman R., Deavers M., Liu J. i in.: 2004 *Peritoneal inflammation - A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC).* J Transl Med.; 2: 23.
57. Dalal V., Kumar R.; Kumar S. i in.: 2018. *Biomarker potential of IL-6 and VEGF-A in ascitic fluid of epithelial ovarian cancer patients.* Clin. Chim. Acta; 482; 27-32.
58. Bast R. C.: 2003. *Status of tumor markers in ovarian cancer screening.* Journal of Clinical Oncology; 21: 200-205.
59. Bell, D. W., Varley, J. M., Szydlo, T. E. i in.: 1999. *Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome.* Science; 286: 2528-2531.
60. Deng C. X., Scott F.: 2000. *Role of the tumor suppressor gene Brca1 in genetic stability and mammary gland tumor formation.* Oncogene;19: 1059-1064.
61. Kopczyński P., Krawczyński M. R.: 2012. *Rola onkogenów i genów supresji nowotworów w onkogenezie.* Nowiny Lekarskie; 81: 679-681.

62. Pauty J., Couturier A. M., Rodrigue A. i in.: 2017. *Cancer-causing mutations in the tumor suppressor PALB2 reveal a novel cancer mechanism using a hidden nuclear export signal in the WD40 repeat motif*. *Nucleic Acids Res.*; 45: 2644-2657.
63. Kim J. H., Penson A. V., Taylor B. S. i in.: 2019. *Nbn–Mre11 interaction is required for tumor suppression and genomic integrity*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 116 (30): 15178-15183.
64. Shih I. M., Kurman R. J.: 2004. *Ovarian Tumorigenesis: A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis*. *Am J Pathol.*; 164(5): 1511-1518.
65. Mavaddat N., Barrowdale D., Andrulis I. L. i in.: 2012. *Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA)*. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*; 21: 134-147.
66. Mayr D., Hirschmann A., Löhrs U. i in.: 2006. *KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants*. *Gynecol Oncol.*; 103(3): 883-887.
67. Nodin B., Zendehrokh N., Sundström M. i in.: 2013. *Clinicopathological correlates and prognostic significance of KRAS mutation status in a pooled prospective cohort of epithelial ovarian cancer*. *Diagnostic Pathology*; 8: 106.
68. Midthun L., Shaheen S., Deisch J. i in.: 2019. *Concomitant KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer*. *J Gastrointest Oncol.*; 10(3): 577-581.
69. Engel R. H., Kaklamani V. G.: 2007. *HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies*. *Drugs* 67: 1329-1341.
70. Gutierrez C., Schiff R.: 2011. *HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications*. *Arch Pathol Lab Med.*; 135(1): 55-62.
71. Levine D. A., Bogomolny F. Yee C. J.: 2005. *Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers*. *Clinical Cancer Research*; 11: 2875-2878.
72. German S., Aslam H. M., Saleem S. I in.: 2013. *Carcinogenesis of PIK3CA*. *Hered Cancer Clin Pract.*; 11(1): 5.
73. Gasparri M. L., Bardhi E., Ruscito I. i in.: 2017. *PI3K/AKT/mTOR Pathway in Ovarian Cancer Treatment: Are We on the Right Track?* *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*; 77(10); 1095-1103.
74. Brosh R., Rotter V.: 2009. *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*. *Nat Rev Cancer*; 9: 701-713.

75. Zhang Y., Cao L., Nguyen D. i in.: 2016. *TP53 mutations in epithelial ovarian cancer*. *Transl Cancer Res.*; 5(6): 650-663.
76. Sansal I., Sellers W. R.: 2004. *The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway*. *J Clin Oncol.*; 22: 2954-2963.
77. Bazzichetto C., Conciatori F., Palloca M. i in.: 2019. *PTEN as a Prognostic/Predictive Biomarker in Cancer: An Unfulfilled Promise?* *Cancers (Basel)*; 11(4): 435.
78. Guan B., Wang T. L., Shih I. M.: 2011. *ARID1A, a factor that promotes formation of SWI/SNF-mediated chromatin remodeling, is a tumor suppressor in gynecologic cancers*. *Cancer Res.*; 71: 6718-6727.
79. Yamamoto S., Tsuda H., Takano M. i in.: 2012. *Loss of ARID1A protein expression occurs as an early event in ovarian clear-cell carcinoma development and frequently coexists with PIK3CA mutations*. *Modern Pathology*; 25: 615-624.
80. Watanabe R., Ui A., Kanno S. i in.: 2014. *SWI/SNF factors required for cellular resistance to DNA damage include ARID1A and ARID1B and show interdependent protein stability*. *Cancer Res.*; 74 (9): 2465-2475.
81. De P. Dey N.: 2019. *Mutation-Driven Signals of ARID1A and PI3K Pathways in Ovarian Carcinomas: Alteration Is An Opportunity*. *Int J Mol Sci*; 20(22): 5732.
82. Gao C., Wang Y., Broaddus R. i in.: 2018. *Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review*. *Oncotarget*; 9(4): 5492-5508.
83. Kim S., Jeong S.: 2019. *Mutation Hotspots in the β -Catenin Gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases*. *Mol. Cells*; 31; 42(1): 8-16.
84. Gee M. E., Faarahi Z., McCormick A. i in.: 2018. *DNA damage repair in ovarian cancer: unlocking the heterogeneity*. *J Ovarian Res.*; 11: 50.
85. Damia G., Brogginini M.: 2019. *Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of DNA Repair*. *Cancers*; 11(1): 119.
86. Tomasova K., Cumova A., Seborova K. i in.: 2020. *DNA Repair and Ovarian Carcinogenesis: Impact on Risk, Prognosis and Therapy Outcome*. *Cancers*; 12: 1713.
87. Toss A., Tomasello C., Razzaboni E. i in.: 2015. *Hereditary Ovarian Cancer: Not Only BRCA 1 and 2 Genes*. *Biomed Res Int.*; 2015: 341723.
88. Matsuoka S., Ballif B. A., Smogorzewska A. i in.: 2007. *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage*. *Science*; 316: 1160-1166.

89. Davis A. J., Chi L., So S. i in.: 2014. *BRCA1 modulates the autophosphorylation status of DNA-PKcs in S phase of the cell cycle*. *Nucleic Acids Res.*; 42: 11487-11501.
90. Mukhopadhyay A., Plummer E. R., Elattar A. i in.: 2012. *Clinicopathological features of homologous recombination deficient epithelial ovarian cancers: sensitivity to PARP inhibitors, platinum and survival*. *Cancer Res.*; 72(22): 5675-5682.
91. Schildkraut J. M., Iversen E. S., Wilson M. A. i in.: 2010. *Association between DNA damage response and repair genes and risk of invasive serous ovarian cancer*. *PLoS One*; 5(4): e10061.
92. McCormick A., Donoghue P., Dixon M. i in.: 2017. *Ovarian Cancers Harbour Defects in Non-Homologous End Joining Resulting in Resistance to Rucaparib*. *Clin Cancer Res.*; 15; 23(8): 2050-2060.
93. Zhang X., Xin, X., Zhang, J. i in.: 2013. *Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 polymorphisms are associated with ovarian cancer susceptibility in a Chinese population*. *Int J Gynecol Cancer*; 23: 1393-1399.
94. Osorio A., Milne R. L., Kuchenbaecker K. i in.: 2014. *DNA glycosylases involved in base excision repair may be associated with cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. *PLoS Genet.*; 10(4): e1004256.
95. Michalska M. M., Samulak D., Romanowicz H. i in.: 2015. *Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of hOGG1 and XRCC1 DNA repair genes and the risk of ovarian cancer in Polish women*. *Tumour Biol.*; 36: 9457-9463.
96. Benitez-Buelga C., Vaclova T., Ferreira S. i in.: 2016. *Molecular insights into the OGG1 gene, a cancer risk modifier in BRCA1 and BRCA2 mutations carriers*. *Oncotarget*; 3; 7(18): 25815-25825.
97. Marteiijn J. A., Lans H., Vermeulen W. i in.: 2014. *Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing*. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 15: 465-481.
98. Zhao Z., Zhang A., Zhao Y. i in.: 2018. *The association of polymorphisms in nucleotide excision repair genes with ovarian cancer susceptibility*. *Biosci Rep.*; 38(3): BSR20180114.
99. Bao Y., Yang, B., Zhao, J. i in.: 2020. *Role of common ERCC1 polymorphisms in cisplatin-resistant epithelial ovarian cancer patients: A study in Chinese cohort*. *Int J Immunogenet.*; 47(5): 443-453.

100. Li G. M.: 1999. *The role of mismatch repair in DNA damage-induced apoptosis*. *Oncol Res.*; 11: 393-400.
101. Li G. M.: 2008. *Mechanisms and functions of DNA mismatch repair*. *Cell Res.*; 18: 85-98.
102. Murphy M. A., Wentzensen N.: 2011. *Frequency of mismatch repair deficiency in ovarian cancer: A systematic review*. *Int J Cancer*; 129(8): 1914-1922.
103. Martin L. P., Hamilton T. C., Schilder R. J.: 2008. *Platinum Resistance: The Role of DNA Repair Pathways*. *Clin Cancer Res.*; 14(5): 1291-1295.
104. Gien L. T., Mackay H. J. i in.: 2010. *The emerging role of PARP inhibitors in the treatment of epithelial ovarian cancer*. *J Oncol.*; 2010: 151750.
105. Rigakos G., Razis E.: 2012. *BRCAness: finding the achilles heel in ovarian cancer*. *The Oncologist*; 17(7): 956-962.
106. Meindl A., Hellebrand H., Wiek C. i in.: 2010. *Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene*. *Nature Genetics*; 42(5): 410-414.
107. Loveday C., Turnbull C., Ramsay E. i in.: 2011. *Germline mutations in RAD51D confer susceptibility to ovarian cancer*. *Nature Genetics*; 43(9): 879-882.
108. Weber-Lassalle N., Hauke J., Ramser J. i in.: 2018. *BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer*. *Breast Cancer Res.*; 20(1): 7.
109. Suszyńska M., Klonowska K., Jasińska A. J. i in.: 2019. *Large-scale meta-analysis of mutations identified in panels of breast/ ovarian cancer-related genes — Providing evidence of cancer predisposition genes*. *Gynecol Oncol.*; 153: 452-462.
110. Walsh T., Casadei S., Lee M. K. i in.: 2011. *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing*. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 108(44): 18032-18037.
111. Ramus S. J., Song H., Dicks E. i in.: 2015 *Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer*. *J Natl Cancer Inst.*; 107(11): djv214.
112. Lubiński J.: 2013. *Genetyka kliniczna nowotworów 2013.*; Monografia. Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie.
113. Lubiński J.: 2018. *Genetyka kliniczna nowotworów 2018.*; Monografia. Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie.

114. Russo A., Calo V., Bruno L. i in. 2009. *Hereditary ovarian cancer*. Crit Rev in Oncol Hematol.; 69: 28-44.
115. Lynch H. T., Casey M. J., Snyder C. L. i in.: 2009. *Hereditary ovarian carcinoma: Heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management*. Molecular Oncology; 3: 97-137.
116. Kładny J., Mösllein G., Myrhoj T. i in.: 2003. *Nuclear pedigree criteria of suspected HNPCC*. Her Can in Clin Pract; 1: 34-38.
117. Miki Y., Swensen J., Shattuck - Eidens D. i in.: 1994. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*, Science; 266(5182): 66-71.
118. Smith T. M., Lee M. K., Szabo C. I. i in.: 1996. *Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1*, Genome Res.; 6(11): 1029-1049.
119. Chen Y., Farmer A. A., Chen C. F. i in.: 1996. *BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner*, Cancer Res.; 56: 3168-3172.
120. Yang S. E., Xia F.: 2010. *BRCA1 16 years later: DNA damage-induced BRCA1 shuttling*. FEBS J.; 277(15): 3079-3085.
121. Clark S. L., Rodriguez A. M., Snyder R. R. i in.: 2012. *Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1*. Comput Struct Biotechnol J.; 1: e201204005.
122. Wu L. C., Wang Z. W., Tsan J. T. i in.: 1996. *Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product*, Nat Genet.;14(4): 430-440.
123. Brzovic P. S., Keefe J. R., Nishikawa H. i in.: 2003. *Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex*, Proc Natl Acad Sci USA; 100: 5646-5651.
124. Deng C. X., Brodie S. G.:2000. *Roles of BRCA1 and its interacting proteins*, Bioessays; 22: 728-737.
125. Yu X., Chini C. C., He M. i in.: 2003. *The BRCT domain is a phospho-protein binding domain*. Science; 302(5645): 639-642.
126. Kim H., Huang J., Chen J.: 2007. *CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response*. Nat Struct Mol Biol.; 14: 710-715.
127. Chapman M. S., Verma I. M.: 1996. *Transcriptional activation by BRCA1*. Nature; 382: 678-679.

128. Yoshida K., Miki Y.: 2004. *Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage*, *Cancer Sci.*; 95(11): 866-871.
129. Wu J., Lu L., Yu X.: 2010. *The role of BRCA1 in DNA damage response*. *Protein Cell*; 1(2): 117-123.
130. Blackshear P. E., Goldsworthy S. M., Foley J. F. i in. 1998. *Brca1 and Brca2 expression patterns in mitotic and meiotic cells of mice*. *Oncogene*; 16(1): 61-68.
131. Welsh P. L., Owens K. N., King M. C.: 2000. *Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2*. *Trends Genet.*; 16(2): 69-74.
132. Gudas J. M., Li T., Nguyen H. i in.: 1996. *Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells*. *Cell Growth Differ.*; 7(6): 717-723.
133. MacLachlan T. K., Dash B. C., Dicker D. T. i in.: 2000. *Repression of BRCA1 through a feedback loop involving p53*. *J Biol Chem.*; 275(41): 31869-31875.
134. Jasińska A., Krzyżosiak W. J.: 2001. *Funkcja genów BRCA1 i BRCA2 związanych z dziedziczną predyspozycją do raka piersi*. *Postępy Biochemii*; 47(2): 146-159.
135. Gudmundsdottir K., Ashworth A.: 2006. *The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability*. *Oncogene*; 25(43): 5864-5874.
136. Pathania S., Nguyen J., Hill S. J. i in.: 2011. *BRCA1 is Required for Post-replication Repair After UV-induced DNA Damage*. *Mol Cell.*; 44(2): 235-251.
137. Zhang J., Powell S. N.: 2005. *The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair*. *Mol Cancer Res.*; 3(10): 531-539.
138. Zhuang J., Zhang J., Willers H. i in.: 2006. *Checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the fidelity of nonhomologous end-joining*. *Cancer Res.*; 66(3): 1401-1408.
139. Lamarche B. J., Orazio N. I., Weitzman M. D. i in.: 2010. *The MRN complex in Double-Strand Break Repair and Telomere Maintenance*, *FEBS Lett.*; 584(17): 3682-3695.
140. Wang H-C., Chou W-C., Shieh S-Y. i in.: 2006. *Ataxia telangiectasia mutated and checkpoint kinase 2 regulate BRCA1 to promote the fidelity of DNA end-joining*. *Cancer Res.*; 66: 1391-1400.
141. Deng C. X.: 2006. *BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution*. *Nucleic Acids Res.*; 34(5): 1416-1426.

142. Mullan P. B., Quinn J. E., Harkin D. P. i in.: 2006. *The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control*. *Oncogene*; 25(43): 5854-63.
143. Ouchi T., Monteiro A. N., August A. i in.: 1998. *BRCA1 regulates p53-dependent gene expression*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95(5): 2302-2306.
144. Palma M. D., Domchek S., M., Stopfer J. i in.: 2008. *The relative contribution of point mutations and genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in high risk breast cancer families*. *Cancer Res.*; 1; 68(17): 7006-7014.
145. Ratajska M., Brożek I., Senkus-Konefka E. i in.: 2008. *BRCA1 and BRCA2 point mutations and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland*. *Oncol Rep.*: 19: 263-268.
146. Montagna M., Santacatterina M., Torri A. i in.: 1999. *Identification of a 3 kb Alu-mediated BRCA1 gene rearrangement in two breast/ovarian cancer families*. *Oncogene*; 18: 4160-4165.
147. Kolomietz E., Meyn M. S., Pandita A. i in.: 2002. *The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors*. *Genes Chromosomes Cancer*; 35: 97-112.
148. Ewald I. P., Ribeiro P., L., I.,Palmero E. i in.: 2009. *Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review*. *Genet Mol Biol.*; 32(3): 437-446.
149. Puget N., Gad S., Perrin-Vidoz L. i in.: 2002. *Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot*. *Am J Hum Genet.*; 70: 858-865.
150. Janavicius R.: 2010. *Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control*, *EPMA J.*; 1(3): 397-412.
151. Roa B. B., Boyd A. A., Volcik K. i in.: 1996. *Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2*. *Nat Genet.*; 14: 185-187.
152. Fackenthal J. D., Olopade O. I.: 2007. *Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations*. *Nat Rev Cancer*; 7: 937-948.
153. Górski B., Jakubowska A., Huzarski T. i in.: 2004. *A high proportion of founder BRCA1 mutations in Polish breast cancer families*. *Int J Cancer.*; 110: 683-686.
154. Ramus S. J., Kote-Jarai Z., Friedman L. S. i in.: 1997. *Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Hungarian families with breast or breast-ovarian cancer*. *Am J Hum Genet.*; 60: 1242-1246.

155. Krajc M., Teugels E., Zgajnar J. i in.: 2008. *Five recurrent BRCA1/2 mutations are responsible for cancer predisposition in the majority of Slovenian breast cancer families*. BMC Med Genet.; 9: 83.
156. Sokolenko A. P., Mitiushkina N. V., Buslov K. G. i in.: 2006. *High frequency of BRCA1 5382insC mutation in Russian breast cancer patients*. Eur J Cancer.; 42: 1380-1384.
157. Ladopoulou A., Kroupis C., Konstantopoulou I. i in.: 2002. *Germ line BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed*. Cancer Lett.; 185: 61-70.
158. Gorodetska I., Serga S., Levkovich N. i in.: 2015. *The frequency of BRCA1 founder mutation c.5266dupC (5382insC) in breast cancer patients from Ukraine*. Hered Cancer Clin Pract.; 13; 13: 19.
159. Backe J., Hofferbert S., Skawran B. i in.: 1999. *Frequency of BRCA1 mutation 5382insC in German breast cancer patients*. Gynecol Oncol.; 72: 402-406.
160. Caligo M. A., Ghimenti C., Cipollini G. i in.: 1996. *BRCA1 germline mutational spectrum in Italian families from Tuscany: a high frequency of novel mutations*. Oncogene; 13: 1483-1488.
161. Simard J., Tonin P., Durocher F. i in.: 1994. *Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families*. Nat Genet.; 8: 392-398.
162. Ferla R., Calq V., Cascio S. i in.: 2007. *Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes*. Ann Oncol.; 18 (6): vi93-98.
163. Neuhausen S. L., Mazoyer S., Friedman L. i in.: 1996. *Haplotype and phenotype analysis of six recurrent BRCA1 mutations in 61 families: results of an international study*. Am J Hum Genet.; 58: 271-280.
164. Hamel N., Feng B-J., Foretova L. i in.: 2011. *On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations*. Eur J Hum Genet.; 19(3): 300-306.
165. Górski B., Byrski T., Huzarski T. i in.: 2000. *Founder mutations in the BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer*. Am J Hum Genet.; 66: 1963-1968.
166. Grzybowska E., Siemińska M., Zientek H. i in.: 2002. *Germline mutations in the BRCA1 gene predisposing to breast and ovarian cancers in Upper Silesia population*. Acta Biochem Pol; 49: 351-356.
167. Hartwig M., Janiszewska H., Bąk A. i in.: 2013. *Prevalence of the BRCA1 c.68_69delAG (BIC: 185delAG) mutation in women with breast cancer from north-*

- central Poland and a review of the literature on other regions of the country. Contemp Oncol (Pozn).; 17(1): 34-37.*
168. Offit K., Gilewski T., McGuire P. i in.: 1996. *Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer. Lancet; 347(9016): 1643-1645.*
 169. Brożek I., Cybulska C., Ratajska M. i in.: 2011. *Prevalence of the most frequent BRCA1 mutations in Polish population. J Appl Genet.; 52(3): 325-330.*
 170. Machackova E., Foretova L., Lukesova M. i in.: 2008. *Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. BMC Cancer; 8: 140.*
 171. Meindl A., German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer: 2002. *Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. Int J Cancer; 97: 472-480.*
 172. Janavicius R.: 2012. *BRCA1 testing in Lithuania. Hered Cancer Clin Pract.; 10(4): A9.*
 173. Gorodetska I., Serga S., Lahuta T. i in.: 2017. *Prevalence of two BRCA1 mutations, 5382insC and 300T>G, in ovarian cancer patients from Ukraine. Fam Cancer; 16(4): 471-476.*
 174. Ruffner H., Joazeiro C. A., Hemmati D. i in.: 2001. *Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. Proc Natl Acad Sci USA; 98(9): 5134-5139.*
 175. Drost R., Bouwman P., Rottenberg S. i in.: 2011. *BRCA1 RING function is essential for tumor suppression but dispensable for therapy resistance. Cancer Cell.; 20(6): 797-809.*
 176. Blecharz P., Szatkowski W., Klimek M. i in.: 2009. *The prevalence of BRCA1 mutations among families at high-risk of breast and ovarian cancer in province of Malopolska between 2004-2009. Przegl Lek.; 66(12): 1046-8.*
 177. Gaj P., Kluska A., Nowakowska D. i in.: 2012. *High frequency of BRCA1 founder mutations in Polish women with nonfamilial breast cancer. Fam Cancer; 11: 623-628.*
 178. Gronwald J., Elsakov P., Górski B. i in.: 2005. *High incidence of 4153delA BRCA1 gene mutations in Lithuanian breast- and breast-ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat.; 94(2): 111-113.*

179. Krylova N. Y., Lobeiko O. S., Sokolenko A. P. i in.: 2006. *BRCA1 4153delA founder mutation in Russian ovarian cancer patients*. Hered Cancer Clin Pract.; 4(4): 193-196.
180. Savanevich A., Oszurek O., Lubiński J. i in.: 2014. *BRCA1 founder mutations compared to ovarian cancer in Belarus*. Fam Cancer; 13(3): 445-447
181. Brożek I., Ochman K., Debniak J. i in.: 2008. *High frequency of BRCA1/2 germline mutations in consecutive ovarian cancer patients in Poland*. Gynecol Oncol.; 8: 433-437.
182. Szwiec M., Jakubowska A., Górski B. i in.: 2015. *Recurrent mutations of BRCA1 and BRCA2 in Poland: an update*. Clin Genet.; 87: 288-292.
183. Wagner T. M., Möslinger R. A., Muhr D. i in.: 1998. *BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics*. Int J Cancer; 77: 354-360.
184. Johannsson O., Ostermeyer E. A., Hakansson S. i in.: 1996. *Founding BRCA1 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden*. Am J Hum Genet.; 58: 441-450.
185. Einbeigi Z., Bergman A., Kindblom L. G. i in.: 2001. *A founder mutation of the BRCA1 gene in Western Sweden associated with a high incidence of breast and ovarian cancer*. Eur J Cancer; 37: 1904-1909.
186. Peelen T., van Vliet M., Petrij - Bosch A. i in.: 1997. *A high proportion of novel mutations in BRCA1 with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families*, Am J Hum Genet.; 60(5): 1041-1049.
187. Petrij - Bosch A., Peelen T., van Vliet M. i in.: 1997. *BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients*, Nat Genet.; 17(3): 341-345.
188. Engert S., Wappenschmidt B., Betz B. i in.: 2008. *MLPA screening in the BRCA1 gene from 1, 506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases*. Hum Mutat.; 29: 948-958.
189. Csokay B., Tihomirova L., Stengrevics A. i in.: 1999. *Strong founder effects in BRCA1 mutation carrier breast cancer patients from Latvia*. Mutation in brief no. 258. Online. Hum Mutat.; 14: 92

190. Elsakov P., Kurtinaitis J., Petraitis S. i in.: 2010. *The contribution of founder mutations in BRCA1 to breast and ovarian cancer in Lithuania*. Clin Genet.; 78(4): 373-376.
191. Tamboom K., Kaasik K., Arsavskaja J. i in.: 2010. *BRCA1 mutations in women with familial or early-onset breast cancer and BRCA2 mutations in familial cancer in Estonia*. Hered Cancer Clin Pract.; 8(1): 4.
192. Rafnar T., Benediktsdottir K. R., Eldon B. J. i in.: 2004. *BRCA2, but not BRCA1, mutations account for familial ovarian cancer in Iceland: a population-based study*. Eur J Cancer; 40: 2788-2793.
193. Ghadirian P., Robidoux A., Zhang P. i in.: 2009. *The contribution of founder mutations to early-onset breast cancer in French - Canadian women*. Clin Genet.; 76(5): 421-426.
194. Thompson D., Easton D. and the Breast Cancer Linkage Consortium: 2002. *Variation in BRCA1 Cancer Risks by Mutation Position*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.; 11: 329-336.
195. Kotsopoulos J., Gronwald J., Karlan B. i in.: 2018. *Age-specific ovarian cancer risks among women with a BRCA1 or BRCA2 mutation*, Gynecol Oncol.; 150(1): 85-91.
196. Gayther, S. A., Warren, W., Mazoyer, S. i in.: 1995. *Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation*. Nat. Genet.; 11: 428-433.
197. Antoniou A. C., Pharoah P. Narod S. i in.: 2005. *Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies*. J Med Genet.; 42: 602-603.
198. Rebbeck T. R., Mitra N., Wan F. i n.: 2015. *Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer*. JAMA; 313(13): 1347-61.
199. Hollis R. L., Churchman M., Gourley C.: 2017. *Distinct implications of different BRCA mutations: efficacy of cytotoxic chemotherapy, PARP inhibition and clinical outcome in ovarian cancer*. Onco Targets Ther.; 10: 2539-2551.
200. Swisher E. M., Sakai W., Karlan B. Y. i in.: 2008. *Secondary BRCA1 mutations in BRCA1-mutated ovarian carcinomas with platinum resistance*. Cancer Res.; 68: 2581-2586.

201. Norquist B., Wurz K. A., Pennil C. C. i in.: 2011. *Secondary somatic mutations restoring BRCA1/2 predict chemotherapy resistance in hereditary ovarian carcinomas.* J Clin Oncol.; 29: 3008-3015.
202. Blasina A., de Weyer I. V., Laus M.C. i in.: 1999. *A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase.* Curr. Biol.; 9: 1-10.
203. Bartek J., Lukas J.: 2003. *Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer.* Cancer Cell.; 3(5): 421-429.
204. Zannini L., Lecis D., Lisanti S. i in.: 2003. *Karyopherin- 2 Protein Interacts with Chk2 and Contributes to Its Nuclear Import.* J. Biol. Chem.; 278: 42346-42351.
205. Berge E.O., Staalesen V., Straume A.H. I in.: 2010. *Chk2 splice variants express a dominant - negative effect on the wild-type Chk2 kinase activity,* Biochim Biophys Acta; 1803(3): 386-395.
206. Bartek J., Falck J., Lukas J. : 2001. *Chk2 kinase — a busy messenger.* Nat Rev Mol Cell Biol; 2: 877-886.
207. Lukas, C., Bartkova, J., Latella, L. i in.: 2001. *DNA damage-activatedkinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology.* Cancer Res.; 61: 4990-4993.
208. Ahn J., Urist M., Prives C.: 2004. *The Chk2 protein kinase.* DNA Repair (Amst); 3(8-9): 1039-1047.
209. Matsuoka S., Rotman G., Ogawa A. i in.: 2000. *Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro.* Proc Natl Acad Sci USA; 97: 10389-10394.
210. Ahn J. Y., Li X., Davis H. L. i in.: 2002. *Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain.* J Biol Chem.; 277(22): 19389-19395.
211. Xu X., Tsvetkov L., Stern D.: 2002. *Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization.* Mol. Cell. Biol.; 22: 4419-4432.
212. Chehab N. H., Malikzay A., Appel M. i in.: 2000. *Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G₁ by stabilizing p53,* Genes Dev.; 14: 278-288,
213. Lee, J. S., Collins, K. M., Brown, A. L., i in.: 2000. *hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response.* Nature; 404: 201-204.
214. Matsuoka S., Huang M., Elledge S. J.: 1998. *Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase.* Science; 282: 1893-1897.

215. Falck J., Mailand N., Syljuasen R. G. i in.: 2001. *The ATM–Chk2–Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis*. Nature; 410: 842-847.
216. Hirao A., Kong Y. Y., Matsuoka S. i in.: 2000. *DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2*. Science; 287(5459): 1824-1827.
217. He G., Siddik Z. H., Huang Z. i in.: 2005. *Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities*. Oncogene; 24(18): 2929-2943.
218. Zhang J., Willers H., Feng Z. i in.: 2004. *Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair*. Mol Cell Biol.; 24: 708-718.
219. Zannini L., Delia D., Buscemi G.: 2014. *CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond*. J Mol Cell Biol.; 6(6): 442-457.
220. Kilpivaara O., Laiho P., Aaltonen L. A. i in.: 2003. *CHEK2 1100delC and colorectal cancer*. J Med Genet.; 40: e110.
221. Cybulski C., Górski B., Huzarski T. i in.: 2004. *CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene*. Am J Hum Genet.; 75(6): 1131-1135.
222. Desrichard A., Bidet Y., Uhrhammer N. i in.: 2011. *CHEK2 contribution to hereditary breast cancer in non-BRCA families*. Breast Cancer Res.; 13(6): R119.
223. Teodorczyk U., Cybulski C., Jakubowska A. i in.: 2012. *The CHEK 2 gene mutations and the risk of Gastric cancer*. Hered Cancer Clin Pract.; 10(Suppl 1): A10.
224. Siołek M., Cybulski C., Gašior-Perczak D. i in.: 2015. *CHEK2 mutations and the risk of papillary thyroid cancer*. Int J Cancer; 137(3): 548-552.
225. Wang Y., Dai B., Ye D.: 2015. *CHEK2 mutation and risk of prostate cancer: a systematic review and meta-analysis*. Int J Clin Exp Med.; 8(9): 15708-15715.
226. Lener M. R., Kashyap A., Kluźniak W. i in.: 2017. *The prevalence of founder mutations among individuals from families with familial pancreatic cancer syndrome*. Cancer Res Treat.; 49(2): 430-436.
227. Kilpivaara O., Vahteristo P., Falck J. i in.: 2004. *CHEK2 variant I157T may be associated with increased breast cancer risk*. Int J Cancer; 111: 543-547.
228. Dufault M. R., Betz B., Wappenschmidt B. i in.: 2004. *Limited relevance of the CHEK2 gene in hereditary breast cancer*. Int J Cancer; 110(3): 320-325.
229. Bogdanova N., Enssen-Dubrowinskaja N., Feshchenko S. i in.: 2005. *Association of two mutations in the CHEK2 gene with breast cancer*. Int J Cancer; 116(2): 263-2666.

230. Falck J., Lukas C., Protopopova M. i in.: 2001. *Functional impact on concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway*. *Oncogene*; 20: 5503-5510.
231. Li J., Williams B. L., Haire L. F. i in.: 2002. *Structural and functional versatility of the FHA domain in DNA-damage signaling by the tumor suppressor kinase Chk2*. *Mol Cell*; 9: 1045-1054.
232. Kilpivaara O., Vahteristo P., Falck J. i in.: 2004. *CHEK2 variant I157 may be associated with increased breast cancer risk*. *Int J Cancer*; 111: 543-547.
233. Cybulski C., Wokołorczyk D., Jakubowska A. i in: 2011. *Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer*, *J Clin Oncol.*; 29(28): 3747-3752.
234. Cybulski C., Wokołorczyk D., Kładny J. i in.: 2007. *Germline CHEK2 mutations and colorectal cancer risk: different effects of a missense and truncating mutations?* *Eur J Hum Genet.*; 15(2): 237-241.
235. Cybulski C., Huzarski T., Górski B. i in.: 2004. *A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk*. *Cancer Res.*; 64(8): 2677-2679.
236. Kaczmarek-Ryś M., Ziemnicka K., Hryhorowicz S. T. i in.: 2015. *The c.470 T > C CHEK2 missense variant increases the risk of differentiated thyroid carcinoma in the Great Poland population*. *Hered Cancer Clin Pract.*; 13(1): 8.
237. Cybulski C., Górski B., Huzarski T. i in.: 2009. *Effect of CHEK2 missense variant I157T on the risk of breast cancer in carriers of other CHEK2 or BRCA1 mutations*. *J Med Genet.*; 46(2): 132-135.
238. Dong X., Wang L., Taniguchi K. i in.: 2003. *Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk*. *Am J Hum Genet.*; 72(2): 270-280.
239. Seppala E. H., Ikonen T., Mononen N., i in.:2003. *CHEK2 variants associate with hereditary prostate cancer*. *Br J Cancer* 2003; 89: 1966-1970.
240. Meijers-Heijboer H., van den Ouweland A., Klijn J. i in.: 2002. *Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2*1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations*. *Nat Genet* 2002; 31: 55-59.
241. Chekmariova E. V., Sokolenko A. P., Buslov K. G. i in.: 2006. *CHEK2 1100delC mutation is frequent among Russian breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat.*; 100(1): 99-102.
242. CHEK2 Breast Cancer Case - Control Consortium.: 2004. *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(6): 1175-1182.
243. Offit K., Pierce H., Kirchoff T. i in.: 2003. *Frequency of CHEK2*1100delC in New York breast cancer cases and controls. BMC Med Genet.*; 15; 4:1.
244. Lee S. B., Kim S. H., Bell D. W. i in.: 2001 *Destabilization of CHEK2 by a missense mutation associated with Li-Fraumeni syndrome. Cancer Res.*, 61: 8062-8067.
245. de Jong M. M., Nolte I. M., Te Meerman G. J. i in.: 2005; *Colorectal cancer and the CHEK2 1100delC mutation. Genes Chromosomes Cancer*; 43(4): 377-382.
246. Cybulski C., Wokołarczyk D., Huzarski T. i in.: 2007. *A deletion in CHEK2 of 5,395 bp predisposes to breast cancer in Poland. Breast Cancer Res Treat.*; 102(1): 119-122.
247. Walsh T., Casadei S., Coats K. H. i in.: 2006. *Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. JAMA*; 295(12): 1379-1388.
248. Cybulski C., Wokołarczyk D., Huzarski T. i in.: 2006. *A large germline deletion in the Chek2 kinase gene is associated with an increased risk of prostate cancer. J Med Genet.*; 43(11): 863-866.
249. Saar K., Chrzanowska K. H., Stumm M. i in.: 1997. *The gene for the ataxia-telangiectasia variant, Nijmegen breakage syndrome, maps to a 1-cM interval on chromosome 8q21. Am J Hum Genet.*; 60(3): 605-610.
250. Matsuura S., Tauchi H., Nakamura A. i in.: 1998. *Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. Nat Genet.*; 19(2): 179-81.
251. Tauchi H., Matsuura S., Isomura M. i in.: 1999. *Sequence analysis of an 800-kb genomic DNA region on chromosome 8q21 that contains the Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1. Genomics*; 55: 242-247.
252. Varon R., Vissinga C., Platzer M. i in.: 1998. *Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. Cell*; 93(3): 467-476.
253. Falck J, Coates J, Jackson SP.: 2005. *Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. Nature*; 434: 605-611.
254. Becker E., Meyer V., Madaoui H. i in.:2006. *Detection of a tandem BRCT in Nbs1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response. Bioinformatics*; 22(11): 1289-1292.

255. Saito Y., Komatsu K.: 2015. *Functional role of NBS1 in radiation damage response and translesion DNA synthesis*. *Biomolecules*; 5(3): 1990-2002.
256. Komatsu K.: 2016. *NBS1 and multiple regulations of DNA damage response*. *J Radiat Res.*; 57(S1): i11-i17.
257. Tauchi H., Matsuura S., Kobayashi J. i in. 2002. *Nijmegen breakage syndrome gene, NBS1, and molecular links to factors for genome stability*. *Oncogene*; 16; 21(58): 8967-8980.
258. Kobayashi J., Tauchi H., Sakamoto S. i in.: 2002. *NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain*. *Curr Biol.*; 12(21): 1846-1851.
259. Falck J., Petrini J. H., Williams B. R. i in.: 2002. *The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways*. *Nat Genet.*; 30(3): 290-294.
260. Carson C. T., Schwartz R. A., Stracker T. H. i in.: 2003. *The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint*. *EMBO J.*; 22(24): 6610-6620.
261. Buscemi G., Savio C., Zannini L. i in.: 2001. *Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage*. *Mol Cell Biol.*; 21(15): 5214-5222.
262. Lee J. H, Paull T. T.: 2005. *ATM activation by DNA double-strand breaksthrough the MRE11-RAD50-NBS1 complex*. *Science*; 308: 551-554.
263. Iijima K., Muranaka C., Kobayashi J. i in.: 2008. *NBS1 regulates a novel apoptotic pathway through Bax activation*. *DNA Repair (Amst)*; 7(10): 1705-1716.
264. Varon, R., Seemanova, E., Chrzanowska, K. i in.: 2000. *Clinical ascertainment of Nijmegen breakage syndrome (NBS) and prevalence of the major mutation, 657del5, in three Slav populations*. *Eur J Hum Genet.*; 8: 900-902.
265. Tauchi H., Kobayashi J., Morishima K. i in.: 2001. *The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50/hMRE11/NBS1 complex DNA repair activity*. *J Biol Chem.*; 276: 12-15.
266. Difilippantonio S., Celeste A., Fernandez-Capetillo O. i in.: 2005. *Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models*. *Nat Cell Biol.*; 7: 675-685.
267. Cybulski C., Górski B., Debniak T. i in.: 2004. *NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene*. *Cancer Res.*; 15; 64(4): 1215-1219.

268. Górski B., Dębniak T., Masojć B. i in.: 2003. *Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients*. Int J Cancer; 106: 379-381.
269. Steffen J., Nowakowska D., Niwińska A. i in.: 2006. *Germline mutations 657del5 of the NBS1 gene contribute significantly to the incidence of breast cancer in Central Poland*. Int J Cancer; 119(2): 472-475.
270. Dzikiewicz-Krawczyk A., Mosor M., Januszkiewicz D., i in.: *Impact of heterozygous c.657-661del, p.I171V and p.R215W mutations in NBN on nibrin functions*. Mutagenesis; 27(3): 337-343.
271. Shimada H., Shimizu K., Mimaki S. i in.: 2004. *First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability*. Hum Genet.; 115(5): 372-376.
272. Yamamoto Y., Miyamoto M., Tatsuda D. i in.: 2014. *A rare polymorphic variant of NBS1 reduces DNA repair activity and elevates chromosomal instability*. Cancer Res.; 74(14): 3707-3715.
273. Varon R., Reis A., Henze G. i in.: 2001. *Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL)*. Cancer Res.; 61(9): 3570-3572.
274. Roźnowski K., Januszkiewicz-Lewandowska D., Mosor M. i in.: 2008. *I171V germline mutation in the NBS1 gene significantly increases risk of breast cancer*. Breast Cancer Res Treat.; 110: 343-348.
275. Ziółkowska I., Mosor M., Wierzbicka M. i in.: 2007. *Increased risk of larynx cancer in heterozygous carriers of the I171V mutation of the NBS1 gene*. Cancer Sci.; 98(11): 1701-1705.
276. Kałużna E. M., Rembowska J., Ziółkowska-Suchanek I. i in.: 2015. *Heterozygous p.I171V mutation of the NBN gene as a risk factor for lung cancer development*. Oncol Lett.; 10(5): 3300-3304.
277. Schröder-Heurich B., Bogdanova N., Wieland B. i in.: 2014. *Functional deficiency of NBN, the Nijmegen breakage syndrome protein, in a p.R215W mutant breast cancer cell line*. BMC Cancer; 14: 434.
278. Seemanova E., Sperling K., Neitzel H. i in.: 2006. *Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability*. J Med Genet.; 43: 218-224.
279. Steffen J., Varon R., Mosor M. i in.: 2004. *Increased cancer risk of heterozygotes with NBS1 germline mutations in Poland*. Int J Cancer; 111(1): 67-71.

280. Xia B., Sheng Q., Nakanishi K. i in.: 2006. *Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2*. Mol Cell; 22: 719-729.
281. Nepomuceno T. C., De Gregoriis G., de Oliveira F. M. B. i in.: 2017. *Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition*. Int J Mol Sci.; 31; 18(9).
282. Zhang F., Ma J., Wu J. i in.: 2009. *PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response*. Curr. Biol.; 19: 524–529.
283. Zhang F.; Fan, Q.; Ren K. i in.: 2009. *PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2*. Mol. Cancer Res.; 7: 1110-1118.
284. Buisson R.; Dion-Côté, A-M.; Coulombe Y. i in.: 2010. *Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination*. Nat Struct Mol Biol.; 17: 1247-1254.
285. Dray E.; Etchin J., Wiese, C. i in.: 2011. *Enhancement of the RAD51 Recombinase Activity by the Tumor Suppressor PALB2*. Nat. Struct. Mol. Biol.; 17: 1255-1259.
286. Park J. Y., Zhang F., Andreassen P. R.: 2014. *PALB2: the hub of a network of tumor suppressors involved in DNA damage responses*. Biochim Biophys Acta; 1846(1): 263-275.
287. Sy S. M., Huen M. S., Chen J.: 2009. *MRG15 is a novel PALB2-interacting factor involved in homologous recombination*. J Biol Chem.; 284(32): 21127-21131.
288. Bleuyard J.-Y.; Buisson R.; Masson J.-Y. i in.: 2012. *ChAM, a novel motif that mediates PALB2 intrinsic chromatin binding and facilitates DNA repair*. EMBO Rep.; 13: 135-141.
289. Smith T. F., Gaitatzes C., Saxena K. i in.: 1999. *The WD repeat: A common architecture for diverse functions*. Trends Biochem Sci.; 24: 181-185.
290. Oliver A. W., Swift, S., Lord, C. J. i in.: 2009. *Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2*. EMBO Rep.; 10: 990-996.
291. Wu X. H., Chen R. C., Gao Y. i in.: 2010. *The effect of Asp-His-Ser/Thr-Trp tetrad on the thermostability of WD40-repeat proteins*. Biochemistry; 49: 10237-10245.
292. Buisson R., Niraj J., Pauty J. i in.: 2014. *Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase eta in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks*. Cell reports; 6: 553-564.
293. Deans A. J., West S. C.: 2011. *DNA interstrand crosslink repair and cancer*. Nat Rev Cancer; 24;11(7): 467-480.

294. Koczorowska A. M., Białkowska A., Kluzek K. i in.: 2014. *Rola białek szlaku niedokrwistości Fanconiego w naprawie DNA i utrzymaniu stabilności genomu*. Postępy Hig Med Dosw (online); 68: 459-472.
295. Hartford S. A., Chittela R., Ding X. i in.: 2016. *Interaction with PALB2 Is Essential for Maintenance of Genomic Integrity by BRCA2*. PLoS Genet.; 12(8): e1006236.
296. Hayakawa T., Zhang F., Hayakawa N. i in.: 2010. *MRG15 binds directly to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks*. J Cell Sci.; 123(Pt 7): 1124-1130.
297. Menzel T., Nähse-Kumpf V., Kousholt A. N.: 2011. *A genetic screen identifies BRCA2 and PALB2 as key regulators of G2 checkpoint maintenance*. EMBO Rep.; 12(7): 705-712.
298. Simhadri S., Vincelli G., Huo Y. i in.: 2019. *PALB2 connects BRCA1 and BRCA2 in the G2/M checkpoint response*. Oncogene; 38(10): 1585-1596.
299. Ma J., Cai H., Wu T. i in.: 2012. *PALB2 interacts with KEAP1 to promote NRF2 nuclear accumulation and function*. Mol Cell Biol.; 32(8): 1506-1517.
300. Rahman N., Seal S., Thompson D. i in.: 2007. *PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene*. Nat Genet.; 39(2): 165-167.
301. Reid S., Schindler D., Hanenberg H. i in.: 2007. *Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer*. Nat Genet.; 39(2): 162-164.
302. D'Andrea A. D., Grompe M.: 1997. *Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy*. Blood; 90: 1725-1736.
303. Tischkowitz M. D., Sabbaghian N., Hamel N. i in.: 2009. *Analysis of the gene coding for the BRCA2-interacting protein PALB2 in familial and sporadic pancreatic cancer*. Gastroenterology; 137: 1183-1186.
304. Antoniou A. C., Casadei S., Heikkinen T. i in.: 2014. *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. N Engl J Med.; 371: 497-506.
305. Kluska A., Balabas A., Piątkowska M. i in.: 2017. *PALB2 mutations in BRCA1/2-mutation negative breast and ovarian cancer patients from Poland*. BMC Med Genomics; 9; 10(1): 14.
306. Rodrigue A., Margailan G., Torres Gomes T. i in.: 2019. *A global functional analysis of missense mutations reveals two major hotspots in the PALB2 tumor suppressor*. Nucleic Acids Res.; 47(20): 10662-10677.

307. Dansonka-Mieszkowska A., Kluska A., Moes J. i in.: 2010. *A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients*. BMC Med Genet.; 11: 20.
308. Cybulski C., Lubiński J., Wokołorczyk D. i in.: 2015. *Mutations predisposing to breast cancer in 12 candidate genes in breast cancer patients from Poland*. Clin Genet.; 88(4): 366-370.
309. Cybulski C., Kluzniak W., Huzarski T. i in.: 2015. *Clinical outcomes in women with breast cancer and a PALB2 mutation: a prospective cohort analysis*. Lancet Oncol.; 16(6): 638-644.
310. Hellebrand H., Sutter C., Honisch E. i in.: 2011. *Germline mutations in the PALB2 gene are population specific and occur with low frequencies in familial breast cancer*. Hum Mutat.; 32(6): E2176-2188.
311. Janatova M., Kleibl Z., Stribrna J. i in.: 2013. *The PALB2 gene is a strong candidate for clinical testing in BRCA1- and BRCA2-negative hereditary breast cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.; 22(12): 2323-2332.
312. Noskowicz M., Bogdanova N., Bermisheva M. i in.: 2014. *Prevalence of PALB2 mutation c.509_510delGA in unselected breast cancer patients from Central and Eastern Europe*. Fam Cancer.; 13(2): 137-142.
313. Jones S., Hruban R. H., Kamiyama M. i in.: 2009. *Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene*. Science.; 324(5924): 217.
314. Liczbańska A., Woźniak A., Wawrocka A. i in.: 2006. *Techniki wykorzystywane w diagnostyce chorób jednogenowych*. Nowiny Lekarskie; 75(5): 486-489.
315. Rosen E. M.: 2013. *BRCA1 in the DNA damage response and at telomeres*. Front Genet.; 4: 85.
316. Nevanlinna H., Bartek J.: 2006. *The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility*. Oncogene; 25: 5912-5919.
317. Parameswaran B., Chiang H., Lu Y. i in.: 2015. *Damage-induced BRCA1 phosphorylation by Chk2 contributes to the timing of end resection*. Cell Cycle; 14(3): 437-448.
318. Szabo C. I., King M. C.: 1997. *Population genetics of BRCA1 and BRCA2*. Am J Hum Genet.; 60: 1013-1020.
319. Suspitin E. N., Sherina N. Y., Ponomariova D. N. I in.: 2009. *High frequency of BRCA1, but not CHEK2 or NBS1 (NBN), founder mutations in Russian ovarian cancer patients*. Hered Cancer Clin Pr.; 7: 5.

320. Gayther S. A., Harrington P., Russell P. i in.: 1997. *Frequently occurring germ-line mutations of the BRCA1 gene in ovarian cancer families from Russia*. Am J Hum Genet.; 60: 1239-1242.
321. Oszurek O., Górski B., Gronwald J. i in.: 2001. *Founder mutations in the BRCA1 gene in west Belarusian breast-ovarian cancer families*. Clin Genet.; 60: 470-471.
322. Górski B., Cybulski C., Huzarski T. i in.: 2005. *Breast cancer predisposing alleles in Poland*. Breast Cancer Res Treat.; 92: 19-24.
323. Kowalik A., Siołek M., Kopczyński J. i in.: 2018. *BRCA1 founder mutations and beyond in the Polish population: A single-institution BRCA1/2 next-generation sequencing study*. PLoS One; 13(7): e0201086.
324. Menkiszak J., Gronwald J., Górski B. i in.: 2003. *Hereditary ovarian cancer in Poland*. Int J Cancer; 106: 942-945.
325. Perkowska M., Brożek I., Wysocka B. i in.: 2003. *BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in breast-ovarian cancer families from northeastern Poland*. Hum Mutat; 21(5): 553-554.
326. Struewing, J. P., Abeliovich D., Peretz T. i in.: 1995. *The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals*. Nature Genet.; 11: 198-200.
327. Abeliovich D., Kaduri L., Lerer I. i in.: 1997. *The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women*. Am J Hum Genet; 60: 505-514.
328. Satagopan J. M., Boyd J., Kauff N. D. i in.: 2002. *Ovarian Cancer Risk in Ashkenazi Jewish Carriers of BRCA1 and BRCA2 Mutations*. Clin Cancer Res.; 8(12): 3776-3781.
329. Menkiszak J., Jakubowska A., Gronwald J. i in.: 1998. *Hereditary ovarian cancer: summary of 5 years of experience*. Ginekol Pol; 69: 283-287.
330. Kotsopoulos J., Gronwald J., Karlan B. i in.: 2018. *Age-specific ovarian cancer risks among women with a BRCA1 or BRCA2 mutation*. Gynecol Oncol.; 150(1): 85-91.
331. Bogdanova N. V., Antonenkova N. N., Rogov Y. I. I in.: 2010. *High frequency and allele-specific differences of BRCA1 founder mutations in breast cancer and ovarian cancer patients from Belarus*. Clin Genet.; 78(4): 364-372.

332. Plakhins G., Irmejs A., Gardovskis A. i in.: 2011. *Genotype-phenotype correlations among BRCA1 4153delA and 5382insC mutation carriers from Latvia*. BMC Med Genet.; 12:147.
333. Aprelikova O. N., Fang B. S., Meissner E. G. i in.: 1999. *BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(21): 11866-11871.
334. Wang Q., Zhang H., Kajino K. i in.: 1998. *BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells*. Oncogene; 17: 1939–1948.
335. Scully R., Chen J., Plug A. i in.: 1997. *Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells*. Cell; 88(2): 265-275.
336. Zhong Q., Chen C. F., Li S. i in.: 1999. *Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response*. Science; 30; 285(5428): 747-750.
337. Cortez D., Wang Y., Qin J. i in.: 1999. *Requirement of ATM-dependent phosphorylation of Brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks*. Science; 286(5442): 1162-1166.
338. Perrin-Vidoz L., Sinilnikova O. M., Stoppa-Lyonnet D. i in.: 2002. *The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons*. Hum Mol Genet.; 11(23): 2805–2814.
339. Nelson A. C., Holt J. T. 2010. *Impact of RING and BRCT Domain Mutations on BRCA1 Protein Stability, Localization, and Recruitment to DNA Damage*. Radiat Res.; 174(1): 1–13.
340. Rodriguez J. A., Au W. E. Y., Henderson B. R.: 2004. *Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain*. Exp Cell Res.; 293 (1): 14-21.
341. Peng M., Litman R., Jin Z. i in.: 2006. *BACH1 is a DNA repair protein supporting BRCA1 damage response*. Oncogene; 25: 2245–2253.
342. Aparicio T., Gautier J. i in.: 2016. *BRCA1-CtIP interaction in the repair of DNA double-strand breaks*. Mol Cell Oncol.; 3(4): e1169343.
343. Thangaraju M., Kaufmann S. H., Couch F. J.: 2000. *BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines*. J Biol Chem; 275(43): 33487–33496.
344. Sylvain V., Lafarge S., Bignon Y. J.: 2002. *Dominant negative activity of a Brca1 truncation mutant: effects on proliferation, tumorigenicity in vivo, and chemosensitivity in a mouse ovarian cancer cell line*. Int J Oncol.; 20: 845–853.

345. Indraccolo S., Tisato V., Agata S. i in.: 2006. *Establishment and characterization of xenografts and cancer cell cultures derived from BRCA1 –/– epithelial ovarian cancers*. Eur J Cancer; 42: 1475–1483.
346. Linger R. J., Kruk P. A.: 2020 *BRCA1 16 years later: risk-associated BRCA1 mutations and their functional implications*. FEBS J.; 277: 3086–3096.
347. Maxwell, K. N.; Wubbenhorst, B.; Wenz, B.M. i in.: 2017. *BRCA locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers*. Nat Commun.; 8(1): 319.
348. Neff R. T., Senter L., Salani R.: 2017. *BRCA mutation in ovarian cancer: testing, implications and treatment considerations*. Ther Adv Med Oncol.; 8: 519–531.
349. Friedenson B. : 2005. *BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian*. MedGenMed; 29; 7(2): 60.
350. Sopik V., Phelan C., Cybulski C. i in.: 2015. *BRCA1 and BRCA2 mutations and the risk for colorectal cancer*. Clin Genet.; 87(5): 411-418.
351. Widschwendter M., Rosenthal A. N., Philpott S. i in.: 2013. *The sex hormone system in carriers of BRCA1/2 mutations: a case-control study*. Lancet Oncol.; 14: 1226–1232.
352. Chiaffarino F., Pelucci C., Parazzini F. i in.: 2001. *Reproductive and hormonal factors and ovarian cancer*. Ann Oncol.; 12(3): 337-341.
353. Folkard E. J., Dowsett M.: 2010. *Influence of sex hormones on cancer progression*. J. Clin. Oncol.; 28: 4038–4044.
354. Ho S.: 2003. *Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone*. Reprod Biol Endocrinol.; 1: 73.
355. Lindgren P. R., Backstrom T., Cajander S. i in.: 2002. *The pattern of estradiol and progesterone differs in serum and tissue of benign and malignant ovarian tumors*. Int J Oncol.; 21: 583–589.
356. Hu Y., Ghosh S., Amleh A. i in.: 2005. *Modulation of aromatase expression by BRCA1: a possible link to tissue-specific tumor suppression*. Oncogene; 24(56): 8343–8348.
357. Chand A. L, Simpson E. R, Clyne C. D.: 2009. *Aromatase expression is increased in BRCA1 mutation carriers*. BMC Cancer; 9: 148.
358. Antoniou A., Pharoah P. D. P., Narod S. i in.: 2003. *Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series*

- unselected for family history: A combined analysis of 22 studies. Am J Hum Genet.*; 72(5): 1117–1130.
359. Reeves G. K., Pirie K., Beral V. i in.: 2007. *Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. BMJ*; 335(7630): 1134.
360. Mungenast F., Thalhammer T.: 2014. *Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. Front Endocrinol (Lausanne)*; 5: 192.
361. Park S. H., Cheung L. W., Wong A. S. i in.: 2008. *Estrogen regulates snail and slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. Mol Endocrinol*; 22: 2085–2098.
362. Steinmetz R., Wagoner H. A., Zeng P. i in.: 2004. *Mechanisms regulating the constitutive activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway in ovarian cancer and the effect of ribonucleic acid interference for ERK1/2 on cancer cell proliferation. Mol Endocrinol.*; 18(10): 2570-2582.
363. Liu M. M., Albanese C., Anderson C. M. i in.: 2002. *Opposing action of estrogen receptors α and β on cyclin D1 gene expression. J Biol Chem.*; 277: 24353–24360.
364. Bossard C., Busson M., Vindrieux D. i in.: 2012. *Potential role of estrogen receptor beta as a tumor suppressor of epithelial ovarian cancer. PLoS One*; 7: e44787.
365. Rutherford T., Brown W. D., Sapi E. i in.: 2000. *Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer. Obstet Gynecol.*; 96: 417–421.
366. Chan K. K., Wei N., Liu S. S. i in.: 2008. *Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. Obstet Gynecol*; 111: 144–151.
367. Halon A., Nowak-Markwitz E., Maciejczyk A. i in.: 2011. *Loss of estrogen receptor beta expression correlates with shorter overall survival and lack of clinical response to chemotherapy in ovarian cancer patients. Anticancer Res.*; 31: 711–718.
368. Cavalieri E. L., Rogan E. G.: 2016. *Depurinating estrogen-DNA adducts, generators of cancer initiation: their minimization leads to cancer prevention. Clin Transl Med.*; 5(1): 12.
369. Savage K. I., Matchett K. B., Barros E. M., i in.: 2014. *BRCA1 deficiency exacerbates estrogen induced DNA damage and genomic instability. Cancer Res.*; 74(10): 2773-2884.

370. Lonning P. E., Helle H., Duong N. K. i in.: 2009. *Tissue estradiol is selectively elevated in receptor positive breast cancers while tumour estrone is reduced independent of receptor status*. J Steroid Biochem Mol Biol.; 117: 31–41.
371. Myszka A., Nguyen-Dumont T., Karpiński P. i in.: 2019. *Targeted massively parallel sequencing characterises the mutation spectrum of PALB2 in breast and ovarian cancer cases from Poland and Ukraine*. Fam Cancer; 17(3): 345–349.
372. Łukomska A., Menkiszak J., Gronwald J. i in.: 2021. *Recurrent Mutations in BRCA1, BRCA2, RAD51C, PALB2 and CHEK2 in Polish Patients with Ovarian Cancer*. Cancers; 13(4): 849.
373. Harter P., Hauke J., Heitz F. i in.: 2017. *Prevalence of deleterious germline variants in risk genes including BRCA1/2 in consecutive ovarian cancer patients (AGO-TR-1)*. PLoS One; 12(10): e0186043.
374. Southey M. S., Goldgar D. E., Winqvist R. i in.: 2016. *PALB2, CHEK2 and ATM rare variants and cancer risk: data from COGS*. J Med Genet.; 53(12): 800–811.
375. Erkkö H., Xia B., Nikkila J. i in.: 2007. *A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families*. Nature; 446(7133): 316-319.
376. Lu H., Li S., Black M. H. i in.: 2019. *Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing*. JAMA Oncol. 2019; 5(1): 51–57.
377. Norquist B. M., Harrell M. I., Brady M. F. i in.: 2016. *Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma*. JAMA Oncol.; 2(4): 482-490.
378. Minion L. E., Dolinsky J. S., Chase D. M. i in.: 2015. *Hereditary predisposition to ovarian cancer, looking beyond BRCA1/BRCA2*. Gynecol Oncol.; 137(1): 86-92.
379. Kotsopoulos J., Sopik V., Rosen B. i in.: 2017. *Frequency of germline PALB2 mutations among women with epithelial ovarian cancer*. Fam Cancer; 16(1): 29-34.
380. Metcalfe K. A., Akbari M. R., Narod S. i in.: 2017. *PALB2 mutations in high-risk women with breast and ovarian cancer*. Journal of Clinical Oncology; 35: 1527-1527.
381. Szymańska-Pasternak J., Szymańska A., Mędrek K. i in.: 2006. *CHEK2 variants predispose to benign, borderline and low-grade invasive ovarian tumors*. Gynecol Oncol.; 102(3): 429-423.

382. Myszka A. , Karpinski P., Ślęzak R. i in.: 2011. *Irrelevance of CHEK2 variants to diagnosis of breast/ovarian cancer predisposition in Polish cohort*. J Appl Genet.; 52(2): 185-191.
383. Krylova N. Y., Ponomariova D. N., Sherina N. Y. i in.: 2007. *CHEK2 1100delC mutation in Russian ovarian cancer patients*. Hered Cancer in Clinical Practice; 5(3): 153-156.
384. Fedorova O. E., Lyubchenko L. N., Payanidi Y. G. i in.: 2007. *Biochip analysis of BRCA1/2 and CHEK2 common mutations in ovarian cancer and primary multiple tumors involving the ovaries (Russian population)*. Mol Biol; 41: 32–36.
385. Plonis J., Kalniete D., Nakazawa-Miklasevica M. i in.: 2016. *The CHEK2 del5395 is a founder mutation without direct effects for cancer risk in the latvian population*. Balkan J Med Genet.; 18(2): 33-36.
386. Kleiblova P., Stolarova L., Krizova K. i in.: 2019. *Identification of deleterious germline CHEK2 mutations and their association with breast and ovarian cancer*. Int J Cancer; 145: 1782–1797.
387. Wu X., Dong X., Liu W. i in.: 2006. *Characterization of CHEK2 mutations in prostate cancer*. Hum Mutat.; 27: 742–747.
388. Roeb W., Higgins J., King M-C.: 2012. *Response to DNA damage of CHEK2 missense mutations in familial breast cancer*. Hum Mol Genet.; 21(12): 2738-2744.
389. Lawrenson K., Iversen E. S., Tyrer J. i in.: 2015. *Common variants at the CHEK2 gene locus and risk of epithelial ovarian cancer*. Carcinogenesis; 36(11): 1341–1353.
390. Kurian A. W, Hughes E., Handorf E. i in.: 2017. *Breast and ovarian cancer penetrance estimates derived from germline multiple-gene sequencing results in women*. JCO Precis Oncol.; 1: 1-12.
391. Zhang P., Gao W., Li H. i in.: 2005. *Inducible degradation of checkpoint kinase 2 links to cisplatin-induced resistance in ovarian cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun.; 328(2): 567-572.
392. Ow G. S., Ivshina A. V., Fuentes G. i in.: 2014. *Identification of two poorly prognosed ovarian carcinoma subtypes associated with CHEK2 germ-line mutation and non-CHEK2 somatic mutation gene signatures*. Cell Cycle; 13(14): 2262–2280.

393. Plisiecka-Hałasa J., Dansonka-Mieszkowska A., Rembiszewska A. i in.: 2002. *Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) alterations and its protein (nibrin) expression in human ovarian tumours*. *Ann Hum Genet.*; 66 (Pt 5-6): 353-359.
394. Kanka C., Brozek I., Skalska B. i in.: 2007. *Germline NBS1 mutations in families with aggregation of Breast and/or ovarian cancer from north-east Poland*. *Anticancer Res.*; 27(4C): 3015-3018.
395. Rusak B., Kluźniak W., Wokołorczyk D. i in.: 2019. *Inherited NBN mutations and prostate cancer risk and survival*. *Cancer Res Treat.*; 51(3): 1180–1187.
396. Rusak B., Kluźniak W., Wokołorczyk D. i in.: 2014. *Allelic modification of breast cancer risk in women with an NBN mutation*. *Breast Cancer Res Treat.*; 178(2): 427-431.
397. Pennington K. P., Walsh T., Harrell M. I. i in.: 2014. *Germline and Somatic Mutations in Homologous Recombination Genes Predict Platinum Response and Survival in Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Carcinomas*. *Clin Cancer Res.*; 20: 764–775.
398. Elvin J. A., He Y., Sun J. i in.: 2017. *Comprehensive genomic profiling (CGP) with loss of heterozygosity (LOH) identifies therapeutically relevant subsets of ovarian cancer (OC)*. *J Clin Oncol.*; 34 (15 Suppl): 5512.
399. Carter N. J., Marshall M. L., Susswein L. R. i in. 2018. *Germline pathogenic variants identified in women with ovarian tumors*. *Gynecol Oncol.*; 151(3): 481-488.
400. Santos S. S., Lallemand F., Petitalot A. i in: 2020. *HRness in Breast and Ovarian Cancers*. *Int J Mol Sci.*; 21(11): 3850.
401. Roy R., Chun J., Powell S. N.: 2012. *BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection*. *Nat Rev Cancer*; 12(1): 68–78.
402. Thompson D., Easton D. F., The Breast Cancer Linkage Consortium.: 2001. *Variation in risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers*. *Am J Hum Genet.*; 68: 410–419.
403. Lubinski J., Phelan C. M., Ghadirian P.: 2004. *Cancer variation associated with the position of the mutation in the BRCA2 gene*. *Fam Cancer*; 3: 1–10.
404. Oddoux C., Streuwing J. P., Clayton C. M. i in.: 1996. *The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%*. *Nature Genetics*; 14: 188–190.

405. Moslehi R., Chu W., Karlan B.: 2000. *BRCA1 and BRCA2 mutation analysis of 208 Ashkenazi Jewish women with ovarian cancer*. *Am J Hum Genet*; 66: 1259–1272.
406. Jakubowska A., Scott R., Menkiszak J. i in.: 2003. *A high frequency of BRCA2 gene mutations in Polish families with ovarian and stomach cancer*. *Eur J Human Genetics*; 11: 955–958.
407. Wójcik P., Jasiowska M., Strycharz E. i in.: 2016. *Recurrent mutations of BRCA1, BRCA2 and PALB2 in the population of breast and ovarian cancer patients in Southern Poland*. *Hered Canc Clin Pract.*; 14: 5.
408. Masson J. Y., Tarsounas M. C., Stasiak A. Z. i in.: 2001. *Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs*. *Genes Dev.*; 15(24): 3296-307.
409. Rajesh C., Gruver A. M., Basrur V. i in. 2009. *The interaction profile of homologous recombination repair proteins RAD51C, RAD51D and XRCC2 as determined by proteomic analysis*. *Proteomics*; 9: 4071–4086.
410. Reh W. A., Nairn R. S., Lowery M. P. i in.: 2017. *The homologous recombination protein RAD51D protects the genome from large deletions*. *Nucleic Acids Res.*; 45(4): 1835–1847.
411. Badie S., Liao C., Thanasoula M. i in.: 2009. *RAD51C facilitates checkpoint signaling by promoting CHK2 phosphorylation*. *J Cell Biol.*; 185, 587–600.
412. Suszyńska M., Ratajska M., Kozłowski P.: 2020. *BRIP1, RAD51C, and RAD51D mutations are associated with high susceptibility to ovarian cancer: mutation prevalence and precise risk estimates based on a pooled analysis of ~30,000 cases*. *J Ovarian Res.*; 13: 50.
413. Janatova M., Soukupova J., Stribrna J. i in.: 2015. *Mutation analysis of the RAD51C and RAD51D genes in high-risk ovarian cancer patients and families from the Czech Republic*. *PLoS One*; 10(6): e0127711.
414. Cantor S. B., Bell D. W., Ganesan S. i in.: 2001. *BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function*. *Cell*; 105, 149–160.
415. Brosh R. M., Cantor S. B.: 2014. *Molecular and cellular functions of the FANCD1 DNA helicase defective in cancer and in Fanconi anemia*. *Front Genet.*; 5: 372.
416. Gong Z., Kim J. E., Leung C. C. i in.: 2010. *BACH1/FANCD1 acts with TopBP1 and participates early in DNA replication checkpoint control*. *Mol Cell*; 37(3): 438-446.

417. Dicks E., Song H., Ramus S. J. i in.: 2017. *Germline whole exome sequencing and large-scale replication identifies FANCM as a likely high grade serous ovarian cancer susceptibility gene*. *Oncotarget*; 8(31): 50930-50940.
418. Arvai K. J. Roberts M. E.; Torene R. I. i in.: 2019. *Age-Adjusted association of homologous recombination genes with ovarian cancer using clinical exomes as controls*. *Hered Cancer Clin Pract.*; 17: 19.
419. Narod S. A., Risch H. Moslehi R. i in.: 1998. *Oral contraceptives and the risk of hereditary ovarian cancer*. *Hereditary Ovarian Cancer Clinical Study Group*. *N Engl J Med.*; 339(7): 424-428.
420. Finch A. P., Lubinski J., Møller P. i in.: 2014. *Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation*. *J Clin Oncol.*; 32(15): 1547-1553.
421. Quinn J. E., Carsen J. E., James C. R. i in.: 2009. *BRCA1 and implications for response to chemotherapy in ovarian cancer*. *Gynecol Oncol.*; 113(1): 134-142.
422. Kaufman B., Shapia-Frommer R., Schmutzler R. K. i in. 2015. *Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation*. *J Clin Oncol.*; 33(3): 244-520.
423. Jiang X., Li X., Li W. i in.: 2019. *PARP inhibitors in ovarian cancer: Sensitivity prediction and resistance mechanisms*. *J Cell Mol Med.*; 23(4): 2303–2313.
424. Bian L., Meng Y., Zhang M. i in.: 2019. *MRE11-RAD50-NBS1 complex alterations and DNA damage response: implications for cancer treatment*. *Mol Cancer*; 18: 169.

STRONG INTERNETOWE

- 1a. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/17677/evidence/>; 28.10.2020
- 2a. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/17662/evidence/>; 28.10.2020
- 3a. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/37560/evidence/>; 28.10.2020
- 4a. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/37560/evidence/>; 31.10.2020
- 5a. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/37542/evidence/>; 31.10.2020

XIII. ZAŁĄCZNIKI

1. WYKAZ TABEL

Tab. 1. Klasyfikacja kliniczno-patologiczna guzów jajnika (wg FIGO).

Tab.2. Kryteria rodowodowo - kliniczne rozpoznawania zespołów HOC i HBOC.

Tab. 3. Ryzyko raka jajnika u nosicielek mutacji *BRCA1* w Polsce.

Tab. 4. Częstość wybranych mutacji u kobiet z rakiem jajnika.

Tab. 5. Mutacje w genach *BRCA1* w grupie badanej i kontrolach.

Tab. 6. Mutacje w genie *CHEK2* w grupie badanej i kontrolach.

Tab. 7. Mutacje w genie *PALB2* w grupie badanej i kontrolach

Tab. 8. Mutacje w genie *NBS1* w grupie badanej i kontrolach.

2. WYKAZ RYCIN

Ryc. 1. Mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA oraz zaangażowane w nie geny.

Ryc. 2. Geny związane z dziedzicznym podłożem raka jajnika.

Ryc. 3. Rodowód rodziny ze stwierdzonym zespołem HOC.

Ryc. 4. Rodowód rodziny ze stwierdzonym zespołem HBOC.

Ryc. 5. Rodowód rodziny ze stwierdzonym zespołem HNPCC.

Ryc. 6. Struktura oraz interakcje białka *BRCA1*.

Ryc. 7. Lokalizacja mutacji w genie *BRCA1* a ryzyko raka jajnika.

Ryc. 8. Struktura i interakcje białka *CHEK2*.

Ryc. 9. Struktura i interakcje białka *NBS1*.

Ryc. 10. Struktura i interakcje białka *PALB2*.

Ryc. 11. Elektroforegram przedstawiający zmianę 5382insC w genie *BRCA1*.

Ryc. 12. Elektroforegram przedstawiający zmianę 4153delA w genie *BRCA1*.

Ryc. 13. Elektroforegram przedstawiający zmianę C61G w genie *BRCA1*.

Ryc. 14. Elektroforegram przedstawiający zmianę 185delAG w genie *BRCA1*.

Ryc. 15. Elektroforegram przedstawiający zmianę 3819del5 w genie *BRCA1*.

Ryc. 16. Elektroforegram przedstawiający zmianę I157T w genie *CHEK2*.

Ryc. 17. Elektroforegram przedstawiający zmianę IVS2+1G>A w genie *CHEK2*.

Ryc. 18. Elektroforegram przedstawiający zmianę 1100delC w genie *CHEK2*.

Ryc. 19. Elektroforegram przedstawiający zmianę del5395 w genie *CHEK2*.

Ryc. 20. Elektroforegram przedstawiający zmianę 509_510delGA w genie *PALB2*

Ryc. 21. Elektroforegram przedstawiający zmianę 172_175delTTGT w genie *PALB2*.

Ryc. 22. Elektroforegram przedstawiający zmianę 657del5 w genie *NBS1*.