Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Lekarski

mgr Monika Żuk

Analiza molekularna genów *BRCA1/2* oraz *PIK3CA* u pacjentek z rakiem jajnika.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Bartosz Wasąg

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Medycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2019

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW 3

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY 4

STRESZCZENIE 5

Wprowadzenie 5

Cele pracy 7

Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy 8

Podsumowanie 10

ABSTRACT 11

Introduction 11

The aim of the study 13

Discussing the publications included in the dissertation 14

Summary 16

WYKAZ STOSOWANEGO PIŚMIENNICTWA 17

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY 19

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BRCA1 - *breast cancer susceptibility gene 1*

BRCA2 - *breast cancer susceptibility gene 2*

ctDNA – krążące nowotworowe DNA (*circulating tumor DNA*)

DISH – *dual in situ hybrydization*

EOC – rak nabłonkowy jajnika (*epithelial ovarian cancer*)

FIGO – Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa (*Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique*)

HG-SOC – niskozróżnicowany rak surowiczy jajnika (*high-grade serous ovarian carcinoma*)

LG-SOC – dobrze zróżnicowany rak surowiczy jajnika (*low-grade serous ovarian carcinoma*)

OC – rak jajnika (*ovarian carcinoma*)

PARP – polimeraza poli (ADP-rybozy)

PIK3CA – gen kodujący podjednostkę katalityczną kinazy PI3K (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*)

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

Podstawę niniejszej rozprawy stanowi cykl trzech spójnych tematycznie publikacji:

1. Magdalena Koczkowska*, **Monika Żuk***, Adam Gorczyński, Magdalena Ratajska, Marzena Lewandowska, Wojciech Biernat, Janusz Limon, Bartosz Wasąg: **Detection of somatic *BRCA1/2* mutations in ovarian cancer - next-generation sequencing analysis of 100 cases.**
   Cancer Med. 2016; 5(7): 1640-6

   *pierwszy współautor

   Czasopismo umieszczone na Liście Filadelfijskiej, wskaźnik Impact Factor: **3.362**

   Punktacja Ministerstwa: 25.000

2. Magdalena Ratajska, Magdalena Koczkowska, **Monika Żuk**, Adam Gorczyński, Alina Kuźniacka, Maciej Stukan, Wojciech Biernat, Janusz Limon, Bartosz Wasąg: **Detection of *BRCA1/2* mutations in circulating tumor DNA from patients with ovarian cancer.**
   Oncotarget 2017; 8(60): 101325-101332

   Punktacja Ministerstwa: 35.000

3. **Monika Żuk**, Magdalena Koczkowska, Adam Gorczyński, Aleksandra Sejda, Wojciech Biernat, Bartosz Wasąg: **Significance of the *PIK3CA* mutations in the differential diagnosis of ovarian epithelial carcinoma.**
   Eur J Transl Clin Med 2018; 2: 23-30

Łączny IF prezentowanych prac: 3.362

STRESZCZENIE

Wprowadzenie

Rak jajnika (OC) to jeden z najczęstszych nowotworów ginekologicznych, który odpowiada za około 295 000 nowych przypadków i 185 000 zgonów rocznie na całym świecie [1]. Stanowi czwartą wiodącą przyczynę śmierci kobiet w krajach rozwiniętych [2]. Chociaż pięcioletni względny wskaźnik przeżywalności wzrósł z 33,7% (1975 r.) do prawie 50% (2009 r.) [3], rak ten stanowi nadal najczęstszą przyczynę śmierci pacjentek onkologicznych. Szacuje się, że pięć procent zgonów wśród kobiet jest spowodowanych rakiem jajnika [4]. U większości osób diagnozuje się guz w zaawansowany stadium (III-IV stadium wg FIGO), a 5-letni czas przeżycia nie przekracza 30% [5]. Rak jajnika jest chorobą heterogenną, zarówno pod względem histologicznym, jak i genetycznym. Nowotwory jajnika są klasyfikowane w zależności od źródła ich pochodzenia, którym mogą być komórki nabłonkowe, komórki endokrynne podścieliska lub komórki zarodkowe. Przyjmuje się, że 90% nowotworów jajnika pochodzi z transformacji komórek nabłonkowych [6]. Badania molekularne nad nabłonkowym rakiem jajnika doprowadziły do zmiany klasyfikacji choroby i wprowadzenia dualistycznego modelu karcynogenezy raka jajnika. Model ten został zaproponowany przez Kurman i Shih w 2004, a w 2014 oficjalnie uznany przez WHO w zaktualizowanych wytycznych dotyczących klasyfikacji guzów żeńskich narządów rozrodczych [7, 8, 9]. Model ten rozdziela podtypy EOC na dwie szerokie kategorie: typ I oraz II. Do nowotworów typu I zaliczono dobrze zróżnicowane raki surowicze (LG-SOC), endometrioidalne, jasnokomórkowe i śluzowe, natomiast do typu II niskozróżnicowane raki surowicze (HG-SOC), niskozróżnicowane raki endometrioidalne (high grade endometrioid carcinoma), mięsakoraki i raki niezróżnicowane (undifferentiated) [8]. Główną molekularną cechą genetyczną oddzielającą typ I od nowotworów typu II jest względna stabilność genetyczna guzów typu I w porównaniu z wyraźną niestabilnością chromosomową guzów typu II [8] oraz różne profile mutacji charakterystycznych dla danego typu [6]. Z perspektywy genetycznej guzy typu I wykazują częste zmiany onkogenne w wielu szlakach sygnalizacji komórkowej, takich jak RAS-MAPK i PI3K-AKT, natomiast typ II charakteryzuje niestabilność genomowa z powodu wad szlaków przyczyniających się do naprawy DNA [6]. Każdy podtyp histologiczny OC jest odzwierciedlony przez specyficzny podpis molekularny, który może mieć znaczenie prognostyczne [10].

Jednym z najważniejszych osiągnięć w zrozumieniu etiologii niektórych nowotworów jajnika było poznanie roli mutacji genów *BRCA*. Geny *BRCA1/2* biorą udział w naprawie pęknięć dwuniciowych DNA przez rekombinację homologiczną. Mutacje germinalne w tych genach są silnie związane ze zwiększonym ryzykiem raka piersi i jajnika [11, 12]. Na świecie, u około 13-15% pacjentek zarówno ze sporadycznym, jak i rodzinnym rakiem jajnika identyfikuje się mutacje germinalne genów *BRCA1/2* [13, 14]. Zmiany somatyczne stwierdza się u kolejnych 3-10% pacjentek [15]. W populacji polskich

pacjentek z rakiem jajnika częstość występowania mutacji genów *BRCA1/2* jest zbliżona. Mutacje germinalne i somatyczne tych genów stwierdza się odpowiednio u 15% i 4% pacjentek [16]. Identyfikacja wariantów genetycznych genów *BRCA1/2* jest istotna dla wyboru leczenia pacjentek z rakiem jajnika. Okazuje się, że u kobiet zarówno z mutacjami germinalnymi, jak i somatycznymi w genach *BRCA1/2* można zastosować leczenie z wykorzystaniem inhibitorów PARP1 (iPARP1) [17].

Poza *BRCA1/2* również inne geny wiązane są z patogenezą i postępem raka jajnika (OC). Wiele badań wskazało na ważną rolę szlaku PI3K/AKT w HG-SOC [10]. *PIK3CA* to gen kodujący katalityczną podjednostkę p110α kinazy 3 fosfatydyloinozytolu (PI3K). Warianty genu *PIK3CA,* stwierdza się w wielu różnych nowotworach, takich jak np.: rak okrężnicy, piersi, jajnika, błony śluzowej macicy, żołądka, tarczycy, szyjki macicy czy guz mózgu [18]. Mutacje punktowe lub amplifikacje genu *PIK3CA* powodują konstytutywną aktywację szlaku sygnałowego PI3K/AKT, co może prowadzić do progresji nowotworu [19]. Wyniki ostatnich badań wykazały, że identyfikacja wariantów genetycznych genu *PIK3CA* może być niezmiernie istotna w leczeniu pacjentek z rakiem jajnika. Okazuje się, iż mutacje tego genu mogą warunkować oporność na chemioterapię, a jednocześnie zmutowany gen może stanowić atrakcyjny cel dla terapii wykorzystujących inhibitory PI3K [20, 21].

Podsumowując, ostatnie badania molekularne podkreślają heterogenność raka jajnika, zarówno w przypadku nowotworów typu I, jak i typu II, wykazując, że rak jajnika jest rodziną nowotworów o znacznych różnicach w cechach molekularnych oraz kliniczno-patologicznych [8]. Poszukiwania nowych markerów diagnostycznych i testów przesiewowych muszą uwzględniać problem heterogennego pochodzenia różnych raków jajnika. Wybór odpowiedniego leczenia na podstawie fenotypu i zmieniającego się w różnych fazach choroby genotypu guza pozostaje dużym wyzwaniem, a badania skupione na identyfikacji markerów prognostycznych i predykcyjnych uważane są za jeden z głównych obszarów przyszłych badań nad rakiem jajnika.

Cele pracy

1. Ocena możliwości wykorzystania krążącego DNA (ctDNA) i/lub DNA wyizolowanego z tkanki utrwalonej w parafinie do analiz molekularnych mających na celu identyfikację wariantów germinalnych oraz somatycznych genów *BRCA1/2*.

2. Określenie częstości i rodzaju wariantów w genach *BRCA1/2* oraz *PIK3CA* w grupie pacjentek z rakiem jajnika.

Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy

"Detection of somatic *BRCA1/2* mutations in ovarian cancer - next-generation sequencing analysis of 100 cases."

Celem badania było określenie częstości i rodzaju wariantów w genach *BRCA1/2* w grupie 100 pacjentek z rakiem jajnika. Do badania wykorzystano DNA wyizolowany z bloczków parafinowych zawierających tkankę nowotworową. Identyfikację zmian przeprowadzono przy użyciu techniki sekwencjonowania następnej generacji. W badanych próbkach zidentyfikowano 27 wariantów patogennych, 20 w genie *BRCA1* oraz siedem w *BRCA2*. Cztery zmiany to warianty somatyczne. Mutacje założycielskie wykryto w sześciu przypadkach, co stanowi 22% wszystkich zidentyfikowanych wariantów patogennych. Ponadto badanej grupie wykryto sześć do tej pory nieopisanych wariantów, trzy delecje, dwie substytucje i jedną duplikację. Wszystkie te warianty genetyczne skutkowały przedwczesnym powstaniem kodonu stop.

Heterogenność wykrytych zmian potwierdza konieczność kompleksowej i jednoczesnej analizy całej sekwencji kodującej genów *BRCA1/2* u wszystkich pacjentek z surowiczym rakiem jajnika. Wykorzystanie tkanki guza do badań genetycznych pozwala na wykrycie wariantów somatycznych i germinalnych, co może zwiększyć liczbę pacjentek, które potencjalnie mogą skorzystać z terapii z wykorzystaniem inhibitorów PARP.

"Detection of *BRCA1/2* mutations in circulating tumor DNA from patients with ovarian cancer."

Celem powyższej pracy była ocena możliwości wykorzystania krążącego DNA (ctDNA) do identyfikacji zarówno wariantów somatycznych, jak i germinalnych genów *BRCA1/2* u pacjentek z rakiem jajnika. Materiał do badań stanowił ctDNA wyizolowany z osocza krwi obwodowej 131 pacjentek. Identyfikację zmian przeprowadzono przy użyciu technik sekwencjonowania następnej generacji. Przeprowadzone badania pozwoliły na wykrycie patogennych wariantów genów *BRCA1/2* u 30 (24,8%) pacjentek. 22 zmiany to warianty germinale, siedem to warianty somatyczne. U jednej pacjentki stwierdzono współwystępowanie zmiany germinalnej i somatycznej. Ponadto, u siedmiu pacjentek (5,8%) wykryto współwystępowanie dwóch lub więcej wariantów patogennych genów *BRCA1/2*.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że analiza ctDNA pozwala na identyfikację zarówno mutacji germinalnych, jak i somatycznych genów *BRCA1/2*. Ponadto, wykorzystanie ctDNA jako materiału diagnostycznego może pozwolić na skuteczne monitorowanie

skuteczności leczenia u pacjentek z rakiem jajnika, u których stwierdzono obecność mutacji genów *BRCA1/2*.

"Significance of the *PIK3CA* mutations in the differential diagnosis of ovarian epithelial carcinoma."

Celem powyższego badania było określenie częstości i rodzaju wariantów w genie *PIK3CA* w materiale wyizolowanym z tkanki utrwalonej w parafinie od pacjentek z surowiczym rakiem jajnika. Identyfikację wariantów genetycznych w genie *PIK3CA* przeprowadzono przy użyciu techniki real-time PCR. Obecność amplifikacji genu *PIK3CA* wykonano metodą podwójnej hybrydyzacji *in situ* (DISH). W badanych próbkach zidentyfikowano cztery warianty patogenne w genie *PIK3CA*. Ponadto, w siedmiu przypadkach stwierdzono amplifikację tego genu. Na podstawie wyników molekularnych i immunohistochemicznych dwie początkowo błędnie zdiagnozowane próbki poddano ponownej ocenie patologicznej i sklasyfikowano jako jasnokomórkowego raka jajnika.

W powyższym badaniu określono częstotliwość mutacji *PIK3CA* i amplifikacji w próbkach pochodzących od pacjentek z rakiem jajnika oraz wykazano, że powiązanie badań histopatologicznych z analizami molekularnymi jest kluczowe dla prawidłowej diagnostyki i optymalizacji leczenia pacjentek z rakiem jajnika.

Podsumowanie

1. Analiza zarówno ctDNA, jak i DNA wyizolowanego z tkanki nowotworowej pozwala na jednoczesną identyfikację wariantów germinalnych i somatycznych genów *BRCA1/2*.

2. Wykorzystanie ctDNA jako materiału diagnostycznego może pozwolić na monitorowanie skuteczności leczenia u pacjentek z rakiem jajnika i wariantem patogennym w genach *BRCA1/2*.

3. Ze względu na różnorodność identyfikowanych wariantów genetycznych, konieczne jest przeprowadzenie kompleksowej analizy genów *BRCA1/2* u pacjentek z rakiem jajnika.

4. Identyfikacja mutacji w genie *PIK3CA* może zoptymalizować zarówno diagnostykę, jak i leczenie pacjentek z rakiem jajnika.

ABSTRACT

Introduction

Ovarian cancer (OC) is one of the most common gynaecological cancers, accounting for approximately 295,000 new cases and 185,000 deaths worldwide every year [1]. It is the fourth leading cause of death of women in developed countries [2]. Although the five-year relative survival rate increased from 33.7% (1975) to almost 50% (2009) [3], this cancer is still the most common cause of death in cancer patients. It is estimated that five percent of deaths among women are caused by ovarian cancer [4]. Most patients are diagnosed in advanced stage of the disease (stage III-IV according to FIGO), and the 5-year survival time does not exceed 30% [5]. Ovarian cancer is a heterogeneous disease, both histologically and genetically. Ovarian cancers are classified according to their origin, which may be epithelial cells, stromal endocrine cells or germ cells. It is assumed that 90% of ovarian tumours come from the transformation of epithelial cells [6]. Molecular studies of epithelial ovarian cancer led to a change in the classification of the disease and the introduction of a dualistic model of ovarian cancer carcinogenesis. This model was proposed by Kurman and Shih in 2004, and in 2014 it was officially recognized by the WHO in updated guidelines on the classification of tumours of female reproductive organs [7, 8, 9]. This model separates the EOC subtypes into two broad categories: type I and II. Type I cancers include low grade serous ovarian carcinomas (LG-SOC), endometrioid, clear cell, and mucinous carcinomas, whereas type II cancers include high grade serous ovarian carcinomas (HG-SOC), high grade endometrioid carcinomas, carcinosarcomas and undifferentiated cancers [8]. The main molecular genetic feature separating type I from type II is the relative genetic stability of type I cancers compared to the pronounced chromosomal instability of type II tumours [8] and different profiles of mutations characteristic of a given type [6]. From the genetic perspective, type I tumours show frequent oncogenic changes in many cell signalling pathways, such as RAS-MAPK and PI3K-AKT, while type II is characterized by genomic instability due to defects in pathways that contribute to DNA repair [6]. Each histological subtype of OC is reflected by a specific molecular signature, which may have prognostic significance [10].

One of the most important achievements in the comprehension of the aetiology of some ovarian cancers was the discovery of the role of *BRCA* gene mutations. *BRCA1/2* genes are involved in the repair of double strand DNA breaks by homologous recombination. Germinal mutations in these genes are strongly associated with an increased risk of breast and ovarian cancer [11, 12]. Globally, germline mutations of *BRCA1/2* genes are identified in about 13-15% of patients with both sporadic and familial ovarian cancer [13, 14]. Somatic changes are found in further 3-10% of patients [15]. In the population of Polish patients with ovarian cancer, the incidence of *BRCA1/2* gene mutations is similar. Germinal and somatic mutations of these genes are found in 15% and 4% of patients respectively [16].

Identification of genetic variants of *BRCA1/2* genes is important for the choice of treatment applied in patients with ovarian cancer. It turns out that in women with both germline and somatic mutations in *BRCA1/2* genes, the treatment using PARP1 inhibitors (iPARP1) can be used [17].

In addition to *BRCA1/2*, other genes are also involved in the pathogenesis and progression of ovarian cancer (OC). Many studies have demonstrated the important role of the PI3K/AKT pathway in HG-SOC [10]. *PIK3CA* is a gene coding for the catalytic p110α subunit of phosphatidylinositol kinase 3 (PI3K). Variants of the *PIK3CA* gene are found in many different cancers, such as colon, breast, ovarian, endometrial, stomach, thyroid, cervical or brain cancer [18]. Point mutations or amplifications of the *PIK3CA* gene cause constitutive activation of the PI3K/AKT signalling pathway, which may lead to cancer progression [19]. The results of recent studies have shown that identifying the genetic variants of the *PIK3CA* gene may be extremely important in the treatment of patients with ovarian cancer. It turns out that mutations in this gene may affect resistance to chemotherapy, while the mutant gene may be an attractive target for therapies using PI3K inhibitors [20, 21].

In conclusion, recent molecular studies highlight the heterogeneity of ovarian cancer, both in the case of type I and type II cancers, demonstrating that ovarian cancer is a family of cancers with significant differences in molecular as well as clinical and pathological features [8]. The search for new diagnostic markers and screening tests must consider the heterogeneous origin of various ovarian cancers. Choosing the right treatment based on the tumour phenotype and genotype, which undergoes changes at different stages of the disease, remains a big challenge, and research focused on identifying prognostic and predictive markers is considered to be one of the main areas of future studies on ovarian cancer.

The aim of the study

1. The evaluation of the possibility of using circulating DNA (ctDNA) and/or DNA isolated from paraffin-fixed tissue for molecular analyses aimed at identifying germline variants and somatic *BRCA1/2* genes.

2. The determination of the frequency and type of variants in the *BRCA1/2* and *PIK3CA* genes in the group of patients with ovarian cancer.

Discussing the publications included in the dissertation

"Detection of somatic *BRCA1/2* mutations in ovarian cancer – next-generation sequencing analysis of 100 cases".

The aim of the study was to determine the frequency and type of variants in *BRCA1/2* genes in a group of 100 patients with ovarian cancer. DNA isolated from paraffin blocks containing cancer tissue was used for the study. Identification of changes was carried out using the next generation sequencing technique. Twenty seven pathogenic variants were identified in the studied samples, 20 in *BRCA1* and 7 in *BRCA2*. There were four somatic variants. Founder mutations were detected in six cases, representing 22% of all identified pathogenic variants. In addition, six variants that have not yet been described, three deletions, two substitutions and one duplication were detected in the study group. All of these genetic variants resulted in the premature creation of the stop codon.

The heterogeneity of the detected lesions confirms the need for a comprehensive and simultaneous analysis of the entire coding sequence of *BRCA1/2* genes in all patients with serous ovarian cancer. The use of tumour tissue for genetic testing allows for the detection of somatic and germline variants, which may increase the number of patients who may potentially benefit from the therapy using PARP inhibitors.

"Detection of *BRCA1/2* mutations in circulating tumor DNA from patients with ovarian cancer".

The purpose of the above study was to assess the possibility of using circulating DNA (ctDNA) to identify both somatic and germline variants in *BRCA1/2* genes in patients with ovarian cancer. The test material was ctDNA isolated from peripheral blood plasma of 131 patients. Identification of changes was carried out using the next generation sequencing techniques. The conducted study allowed for the detection of pathogenic variants in *BRCA1/2* genes in 30 (24.8%) patients. 22 changes were germline variants, seven were somatic variants. In one patient, coexistence of the germline and somatic changes was found. In addition, in seven patients (5.8%), two or more pathogenic variants of *BRCA1/2* genes were detected.

On the basis of the conducted study, it can be concluded that ctDNA analysis allows to identify both germline and somatic mutations in *BRCA1/2* genes. In addition, the use of ctDNA as a diagnostic material may allow for effective monitoring of treatment efficacy in patients with ovarian cancer who have *BRCA1/2* gene mutations.

“Significance of the *PIK3CA* mutations in the differential diagnosis of ovarian epithelial carcinoma”.

The aim of the above study was to determine the frequency and type of variants in the *PIK3CA* gene in material isolated from paraffin-fixed tissue obtained from patients with serous ovarian cancer. Identification of genetic variants in the *PIK3CA* gene was performed using real-time PCR. The presence of *PIK3CA* gene amplification was identified using double *in situ* hybridization (DISH). Four pathogenic variants in the *PIK3CA* gene were identified in the studied samples. In addition, the amplification of this gene was found in seven cases. Based on the molecular and immunohistochemical results, the two initially misdiagnosed samples were reassessed and classified as clear cell ovarian cancer.

The above study determined the frequency of *PIK3CA* mutations and amplification in samples from patients with ovarian cancer and it was shown that a combination of histopathological studies with molecular analyses is crucial for the correct diagnosis and optimization of treatment of patients with ovarian cancer.

Summary

1. The analysis of both ctDNA and DNA isolated from tumour tissue allows for the simultaneous identification of germline and somatic variants in *BRCA1/2* genes.

2. The use of ctDNA as a diagnostic material may allow for monitoring the effectiveness of treatment in patients with ovarian cancer and a pathogenic variant in *BRCA1/2* genes.

3. Due to the diversity of the identified genetic variants, it is necessary to conduct a comprehensive analysis of *BRCA1/2* genes in patients with ovarian cancer.

4. The identification of mutations in the *PIK3CA* gene can optimize both the diagnosis and treatment of patients with ovarian cancer.

WYKAZ STOSOWANEGO PIŚMIENNICTWA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R, Torre L, Jemal A, Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D.M, Forman D, Bray F. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin 2018; 68:394–424

2. Jayson GC , Kohn EC , Kitchener HC , Ledermann JA. Ovarian cancer. The Lancet, 384. (2014) , 1376–1388.

3. Howlader NA, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seercancergov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017.

4. American Cancer Society (2017) Cancer Facts and Figures 2017. Genes Dev., 21, 2525–2538.

5. Farley J, Ozbun LL, Birrer MJ. Genomic analysis of epithelial ovarian cancer. Cell Res. 2008; 18: 538-48. doi: 10.1038/cr.2008.52.

6. Lisio MA, Fu L, Goyeneche A, Gao Z, Telleria C. High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 952; doi:10.3390/ijms20040952

7. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington, CS, Young RH. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs, 4th ed.; WHO: Geneva, Switzerland, 2014.

8. Kurman RJ, Shih Ie M. The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised and Expanded. Am. J. Pathol. **2016**, 186, 733–747.

9. ShihIe M.; Kurman R.J. Ovarian tumorigenesis: A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. Am. J. Pathol. 2004, 164, 1511–1518.

10. Testa U, Petrucci E, Pasquini L, Castelli G, Pelosi E. Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. Medicines 2018, 5(1), 16.

11. Miki YJ, Swensen D, Shattuck-Eidens PA, Futreal K, Harshman S, Tavtigian, 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. Science 266:66–71.

12. Wooster RG, Bignell J, Lancaster S, Swift S, Seal J, Mangion, 1995. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. Nature 378:789–792.

13. Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, LaPolla J, Hoffman M, Martino MA, Wakeley K, Wilbanks G, Nicosia S, Cantor A, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. Cancer. 2005; 104: 2807-2816. doi: 10.1002/cncr.21536.

14. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Fan I, Tang J, Li S, Zhang S, Shaw PA, Narod SA. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. J Natl Cancer Inst. 2006; 98: 1694-1706. doi: 10.1093/jnci/ djj465

15. Dougherty BA, Lai Z, Hodgson DR, Orr MCM, Hawryluk M, Sun J, Yelensky R, Spencer SK, Roberston JD, Ho TW, Fielding A, Ledermann JA, Barrett JC. Biological and clinical evidence for somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 as predictive markers for olaparib response in high-grade serous ovarian cancers in the maintenance setting. Oncotarget. 2017; 8: 43653-43661. doi: 10.18632/ oncotarget.17613.

16. Koczkowska M, Zuk M, Gorczynski A, Ratajska M, Lewandowska M, Biernat W, Limon J, Wasag B. Detection of somatic BRCA1/2 mutations in ovarian cancer - nextgeneration sequencing analysis of 100 cases. Cancer Med. 2016; 5: 1640-1646. doi: 10.1002/cam4.748.

17.Audeh MW, Carmichael J, Penson RT, Friedlander M, Powell B, Bell-McGuinn KM, Scott C, Weitzel JN, Oaknin A, Loman N, Lu K, Schmutzler RK, Matulonis U, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. Lancet. 2010; 376: 245-251. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60893-8.

18. Samuels Y, Waldman T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. Curr Top Microbiol Immunol. 2010; 347: 21-41. doi: 10.1007/82_2010_68.

19. Dobbin ZC, Landen CN. The importance of the PI3K/AKT/MTOR pathway in the progression of ovarian cancer. Int J Mol Sci. 2013; 14: 8213-27. doi: 10.3390/ijms14048213.

20. Lee S, Choi EJ, Jin C, Kim DH. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. Gynecol Oncol. 2005; 97: 26-34. doi: 10.1016/j.ygyno.2004.11.051.

21. Banerjee S, Kaye SB. New strategies in the treatment of ovarian cancer: current clinical perspectives and future potential. Clin Cancer Res. 2013; 19: 961-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2243.

PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY

1. Magdalena Koczkowska*, Monika Żuk*, Adam Gorczyński, Magdalena Ratajska, Marzena Lewandowska, Wojciech Biernat, Janusz Limon, Bartosz Wasąg: Detection of somatic *BRCA1/2* mutations in ovarian cancer - next-generation sequencing analysis of 100 cases. Cancer Med. 2016; 5(7): 1640-6

2. Magdalena Ratajska, Magdalena Koczkowska, Monika Żuk, Adam Gorczyński, Alina Kuźniacka, Maciej Stukan, Wojciech Biernat, Janusz Limon, Bartosz Wasąg: Detection of *BRCA1/2* mutations in circulating tumor DNA from patients with ovarian cancer. Oncotarget 2017; 8(60): 101325-101332

3. Monika Żuk, Magdalena Koczkowska, Adam Gorczyński, Aleksandra Sejda, Wojciech Biernat, Bartosz Wasąg: Significance of the *PIK3CA* mutations in the differential diagnosis of ovarian epithelial carcinoma. Eur J Transl Clin Med 2018; 2: 23-30