

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

## **Disertační práce**

**Studium úlohy genetických faktorů v prognóze a predikci účinku chemoterapie u  
pacientek s karcinomem prsu**

**Role of genetic factors in the prognosis and prediction of efficacy of chemotherapy in  
breast carcinoma patients**

Školitel: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Praha, 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 17.7.2017

Veronika Brynychová

## **Identifikační záznam**

**Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.**

BRYNYCHOVÁ, Veronika. *Studium úlohy genetických faktorů v prognóze a predikci účinku chemoterapie u pacientek s karcinomem prsu. [Role of genetic factors in the prognosis and prediction of efficacy of chemotherapy in breast carcinoma patients]*. Praha, 2017. Počet stran: 126, počet příloh: 0. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Státní zdravotní ústav v Praze. Vedoucí závěrečné práce doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, kaspázy, cytokineze, exprese, prognóza

**Keywords:** breast carcinoma, caspases, cytokinesis, expression, prognosis

## **Poděkování**

Na prvním místě bych chtěla poděkovat zejména svému školiteli doc. RNDr. Pavlu Součkovi, CSc. za odborné vedení práce, přátelský přístup, cenné rady a nekonečnou trpělivost. Poděkování patří také všem kolegyním a kolegům z laboratoře za podporu a vynikající pracovní atmosféru.

Práce byla podpořena projekty GAUK 1444313, GAČR P303/12/G163, AZV 15-25618A a 17-28470A a částečně financována z Národního programu udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy.

## ABSTRAKT

Změny v regulaci apoptózy a buněčného cyklu se uplatňují při vzniku nádoru, při jeho progresi i při rezistenci k protinádorové léčbě. Cílem této práce bylo stanovit význam kaspáz buněčné smrti a regulátorů cytokineze jako možných prognostických a prediktivních markerů u pacientek s karcinomem prsu.

Kromě stanovení transkriptu vybraných genů v nádorových a kontrolních tkáních získaných od pacientek s karcinomem prsu jsme se zaměřili na význam alternativních sestřihových variant kaspáz a jejich potenciální geneticky podmíněnou regulaci. Získaná data jsme hodnotili v souvislosti s klinicko-patologickou charakteristikou nádorů, délkou přežívání pacientek bez návratu onemocnění a s odpovědí pacientek na neoadjuvantní chemoterapeutickou léčbu. Součástí práce bylo stanovení expresních hladin na proteinové úrovni a ověření významu vybraných kandidátů pro účinek chemoterapie pomocí funkční studie.

Hladiny transkriptu kaspáz 2, 3, 7, 8, 9 a 10, specificky detekovaných sestřihových variant kaspáz 2S, 2L, 3A a B, 3S, 9A, 9B a 8L, a hladiny transkriptu regulátorů cytokineze KIF14 a CIT v karcinomech prsu nesouvisely s délkou bezpříznakového přežívání pacientek ani s odpovědí pacientek na neoadjuvantní léčbu. Zvýšená exprese alternativní antiapoptické varianty kaspázy 9B na úkor hlavní proapoptické varianty 9A, hodnocena jako poměr těchto variant, souvisela s kratší dobou bezpříznakového přežívání pacientek léčených následně adjuvantně chemoterapií. Haplotyp polymorfismů rs4645978-rs2020903-rs4646034 v genu *CASP9* navíc souvisel s hladinami transkriptu kaspázy 9 a expresí receptorů pro progesteron a HER2 v karcinomech prsu. Vysoká exprese PRC1 v karcinomech prsu souvisela s kratším bezpříznakovým přežíváním nijak selektovaných pacientek. Nicméně vysoké hladiny PRC1 v nádorech s nejvyšší pravděpodobností neovlivňují účinek léčby chemoterapií založenou na taxanech.

Vysoká exprese PRC1 v karcinomech prsu je faktorem špatné prognózy nezávisle na podtypu karcinomu nebo léčbě. Poměr sestřihových variant kaspázy 9 by měl být dále studován jako možný prognostický a prediktivní faktor u pacientek léčených chemoterapií.

## ABSTRACT

Changes in the regulation of apoptosis and cell cycle are involved in tumor development, progression, and resistance to antitumor therapy. The aim of this work was to evaluate the importance of apoptotic caspases and regulators of cytokineses as possible prognostic and predictive markers in breast carcinoma patients.

In addition to determining the transcript levels of selected genes in tumor and control tissues obtained from breast carcinoma patients, we have also focused on the importance of alternative splice variants of caspases and their potential genetically determined regulation. We analysed the obtained data in relation to the clinical-pathological characteristics of the tumors, the progression-free survival of patients and to the response of the patients to the neoadjuvant chemotherapeutic treatment. Part of the work was determination of protein expression levels and verification of the importance of selected candidates for the effect of chemotherapy by functional study.

The transcript levels of caspase 2, 3, 7, 8, 9, 10, the specifically detected splice variants caspase 2S, 2L, 3A and B, 3S, 9A, 9B, 8L, and the transcript levels of KIF14 and CIT in breast carcinomas were unrelated to the progression-free survival of patients, or to the response of patients to neoadjuvant treatment. The increased expression of caspase 9B, the alternative antiapoptotic variant of caspase 9, and downregulation of major proapoptotic variant 9A, evaluated as the ratio of these variants, was associated with a shorter progression-free survival of patients treated subsequently with adjuvant chemotherapy. Moreover, the haplotype of polymorphisms rs4645978-rs2020903-rs4646034 in the *CASP9* gene was associated with caspase 9 transcript levels and expression of receptors for progesterone and HER2 in breast carcinomas. High expression of PRC1 in breast carcinomas was associated with progression-free survival of non-selected patients. However, PRC1 most likely does not play significant role in the effect of taxane-based chemotherapy.

High expression of PRC1 in breast carcinomas is a factor of poor prognosis, independent of the carcinoma subtype or treatment of patients. The ratio of splice variants of caspase 9 should be further studied as potential prognostic and predictive factor in chemotherapy-treated patients.

## SEZNAM ZKRATEK

5-FU	5-fluorouracil
AIF	apoptosis-inducing factors
APO2L	APO2 ligand
BAD	BCL2-associated agonist of cell death
BAK	BCL2 antagonist killer
BAX	BCL2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma gene 2
BFM	BCL2-modifying factor
BID	BH3-interacting domain death agonist
BIK	BCL2-interacting killer
BIM	BCL2-interacting protein BIM
BOK	BCL2-related ovarian killer
<i>BRCA1/2</i>	breast cancer 1/2 gene
CARD	caspase activation and recruitment domain
CASP	apoptosis-related cysteine protease
CD95L	CD95 ligand
CIAP	cellular inhibitor of apoptosis protein
CIT	citron kinase
DD	death domain
DED	death effector domain
DIABLO	direct IAP protein with low pI
DNA	deoxyribonucleic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	estrogen receptor
<i>ERBB2</i>	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2 gene
<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1 gene
FAC/FEC	5-fluorouracil, adriamycin/epirubicin, cyclofosamid
FADD	FAS associated death domain
FAS-L	FAS ligand
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FSH	folikuly stimulační hormon
GATA3	GATA binding protein 3
HER2	human EGF receptor 2
HNF3	hepatocyte nuclear factor 3
HPA	Human protein atlas
HPF	high power field
HR	hormonální receptor
HRK	harakiri
HTRA2	high temperature requirement protein A2
ICD	International Classification of Diseases
IDC(IS)	invasive ductal carcinoma (in situ)
ILC	invasive lobular carcinoma

KIF	kinesin family member
LAPTM4B	lysosomal-associated transmembrane protein 4B
LH	luteinizační hormon
MCL1	myeloid cell leukemia sequence 1
MKI67	marker of proliferation Ki-67
NPI	Nottinghamský prognostický index
NST	no special type
PAM50	prediction analysis of microarray 50
PIDD	p53-induced protein with a DD
PR	progesterone receptor
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RAIDD	RIP-associated protein with a death domain
RNA	ribonucleic acid
RS	Recurrence Score
SERD	selektivní degradátor estrogenních receptorů
SERM	selektivní modulátor estrogenních receptorů
SLC39A6	solute carrier family 39 member 6
SMAC	second mitochondrial activator of caspases
SQLE	squalene epoxidase
TFF3	trefoil factor 3
TNBC	triple-negative breast cancer
TNF-R	tumor necrosis factor - receptor
TNM	Tumour, Node, Metastases
TP53	tumor protein p53
TRADD	TNF receptor associated death domain
TRAIL-R	TNF related apoptosis-inducing ligand - receptor
UTR	untranslated region
WHO	World Health Organization
XBP1	X-box binding protein 1
XIAP	X-chromosome-linked IAP



# OBSAH

<b>ABSTRAKT</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	7
1. ÚVOD .....	11
1.1. Epidemiologie karcinomu prsu .....	11
1.2. Klasifikace karcinomu prsu .....	13
1.3. Léčba karcinomu prsu .....	15
1.3.1. Chemoterapie .....	16
1.3.2. Hormonální terapie .....	17
1.3.3. Anti-HER2 terapie .....	17
1.4. Prognostické a prediktivní faktory u karcinomu prsu .....	18
1.4.1. Hlavní klinické faktory .....	19
1.4.2. Exprese hormonálních receptorů ER a PR.....	20
1.4.3. HER2/neu.....	20
1.4.4. Exprese Ki-67 .....	21
1.4.5. Molekulární podtypy karcinomu prsu.....	21
1.4.6. Prognostické a prediktivní testy.....	24
1.5. Výzkum nových prognostických a prediktivních biomarkerů .....	28
1.5.1. Programovaná buněčná smrt u nádorových onemocnění .....	29
1.5.2. Kaspázy.....	30
1.5.3. Vnější a vnitřní dráhy apoptózy .....	31
1.5.4. Kaspázy buněčné smrti, úloha v karcinogenezi a léčbě nádorů.....	33
1.5.5. Úloha KIF14, PRC1 a CIT v cytokinezi, karcinogenezi a léčbě nádorů .....	36
3. CÍLE .....	38
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	39
3.1. Seznam publikací .....	39

3.2. Článek 1 - Importance of transcript levels of caspase-2 isoforms S and L for breast carcinoma progression .....	40
3.3. Článek 2 - Transcript expression and genetic variability analysis of caspases in breast carcinomas suggests CASP9 as the most interesting target.....	52
3.4. Článek 3 - Genetic and functional analyses do not explain the association of high PRC1 expression with poor survival of breast carcinoma patients .....	76
3.5. Článek 4 - The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma.....	96
3.6. Prognostický a prediktivní význam kaspáz buněčné smrti a jejich hlavních alternativních sestříhových variant u pacientek s karcinomem prsu .....	102
3.6.1. Kaspáza 2 .....	103
3.6.2. Kaspáza 9 .....	106
3.6.3. Kaspázy 8 a 10 .....	107
3.6.4. Kaspázy 3 a 7 .....	108
3.6.5. Prognostický význam 2, 3, 8 a 9 u pacientek s karcinomem ovárií.....	109
3.7. Prognostický a prediktivní význam KIF14, PRC1 a CIT u pacientek s karcinomem prsu.....	111
3.7.1. KIF14 .....	111
3.7.2. PRC1 .....	112
3.7.3. CIT .....	113
3.7.4. Prognostický význam KIF14, PRC1 a CIT u pacientek s karcinomem ovárií.....	114
3.8. Další publikace související s tématem.....	115
5. ZÁVĚR .....	116
6. PŘEHLED LITERATURY.....	118

## 1. ÚVOD

Karcinom prsu (ICD-10, dg. C50) je bezesporu nejvíce heterogenním typem nádoru. Rychlý rozvoj molekulární biologie navíc umožnil definovat řadu nových biologických podtypů karcinomu prsu, které se chovají klinicky odlišně. Díky tomu je možné čím dál více využívat možnosti personalizované medicíny neboli cílit konkrétní léčbu danému pacientovi na míru. Kromě klasických klinických faktorů se k tomuto účelu využívají molekulární faktory, které pomáhají odhadnout pravděpodobný průběh onemocnění (prognostické faktory) a účinnost zvolené léčby (prediktivní faktory).

Předložená práce se zabývá především významem kaspáz buněčné smrti a regulátorů cytokineze jako možných prognostických a prediktivních faktorů u pacientek s karcinomem prsu. Konkrétně jsme se zaměřili hlavně na otázku, zda námi vybrané faktory ovlivňují účinek klasické chemoterapie, pro kterou zatím prediktivní faktory v klinické praxi chybí. Hlavní výsledky práce jsou obsahem publikací uvedených jako **článek 1-3** (1-3). Poslední přiložená práce - **článek 4** (4) se zabývá možným využitím studovaných faktorů pro odhad prognózy u pacientek s karcinomem ovárií (ICD-10, dg. C56).

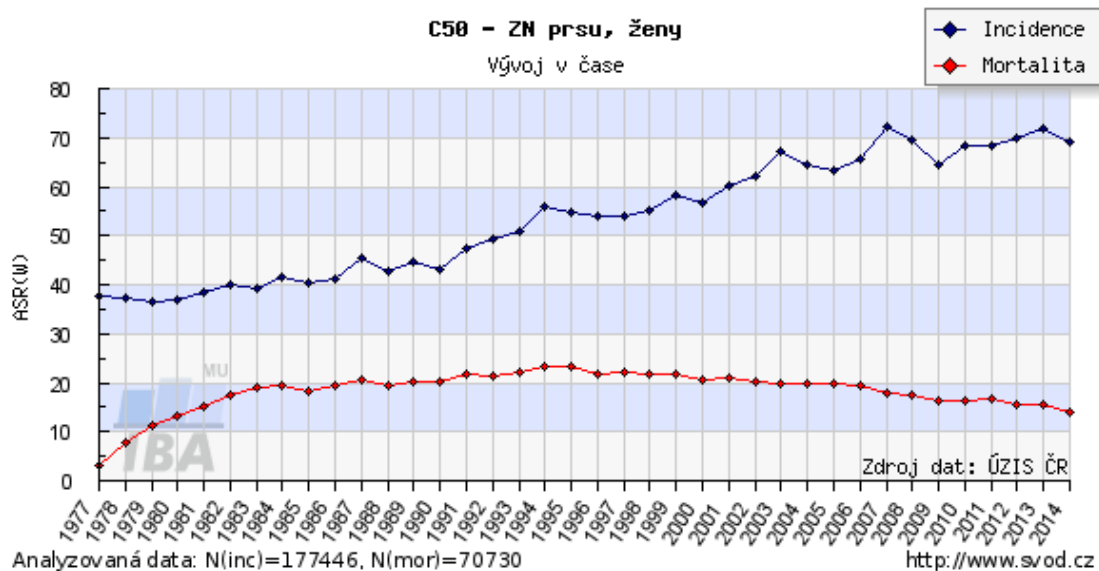
### 1.1. Epidemiologie karcinomu prsu

Karcinom prsu je celosvětově druhým nejčastěji diagnostikovaným zhoubným novotvarem a nejčastějším typem karcinomu u žen (5). Dle posledních statistických údajů bylo za rok 2012 celosvětově diagnostikováno 1,67 mil nových případů s výrazně vyšší incidencí v zemích severní Ameriky a Evropy oproti zemím Afriky či Asie. Přestože je léčba tohoto karcinomu (zvláště v raných stádiích) velmi úspěšná, je karcinom prsu bohužel celosvětově nejčastější příčinou úmrtí žen v důsledku nádorového onemocnění (celosvětově 522 tisíc úmrtí za rok 2012).

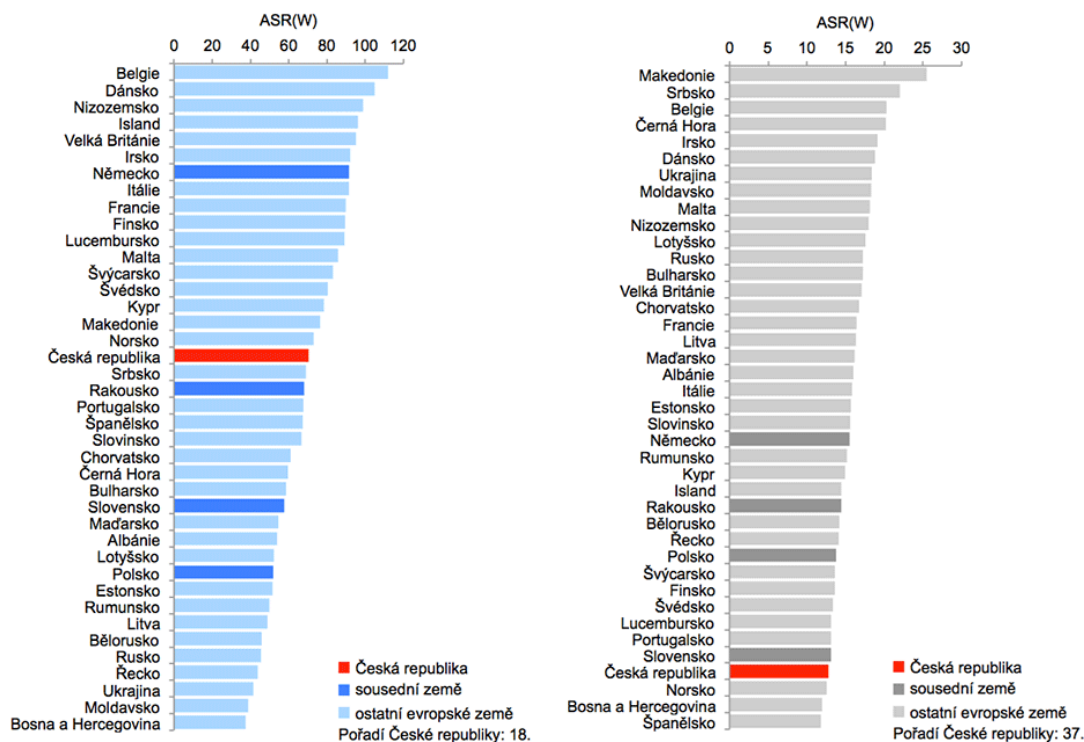
Konkrétně v České republice je od roku 2012 diagnostikováno kolem 7000 nových případů ročně a přibližně 1500 žen ročně tomuto onemocnění podlehe (**Obrázek 1**) (6). Narůstající incidence a klesající mortalita pozorovaná v posledních letech se připisuje zlepšení včasného záchytu onemocnění pomocí screeningových metod a rozvoji v léčbě (7).

**Obrázek 1: Incidence a mortalita zhoubných nádorů prsu u žen v České republice (A) a v evropském srovnání (B)**

**A**



**B**



Pozn.: ASR(W) – počet nově diagnostikovaných nádorů/počet zemřelých na nádor na 100 000 žen věkově standardizovaný na světový věkový standard.

Karcinom prsu postihuje v mnohem menší míře také muže (přibližně 1 případ na 100 tisíc mužů) (5, 6). V této práci jsme se zabývali jen případy karcinomu prsu u žen, proto dále hovoříme o pacientkách s karcinomem prsu.

## **1.2. Klasifikace karcinomu prsu**

Karcinom prsu se klasifikuje na základě určení histologického (morfologického) typu, rozsahu šíření pomocí TNM klasifikace, stupně diference (malignity) vyjádřeného gradem a na základě vyšetření molekulárních faktorů.

### **▪ Histologický typ**

Pro histologickou klasifikaci karcinomu prsu slouží klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO), aktuálně její 4. vydání (8). Tato aktualizovaná verze pozměňuje a zpřesňuje klasifikaci z roku 2003 (9), která vycházela výhradně z morfologického vzhledu karcinomu prsu, pomocí novějších poznatků z molekulární biologie.

Invazivní karcinom prsu nespeciálního typu (NST), dříve invazivní duktální karcinom (IDC) (9) tvoří 70-80 % všech invazivních forem karcinomu prsu a představuje relativně nehomogenní skupinu karcinomů oproti dalším typům, které se označují jako speciální. Karcinom je diagnostikován jako IDC pokud se vyloučí speciální typ karcinomu prsu (8). Nejčastěji se vyskytující speciální typy invazivního karcinomu prsu jsou karcinomy lobulární, tubulární, kribriformní, metaplastické, apokrinní, mucinózní, papilární, mikropapilární a karcinomy medulárního nebo neuroendokrinního typu (8, 10). Lobulární karcinom je druhým nejčastěji zastoupeným typem karcinomu prsu tvořícím 10-15 % všech karcinomů prsu. Dalších přibližně 5 % všech karcinomů prsu tvoří smíšený typ lobulárního a IDC karcinomu (11, 12).

### **▪ TNM klasifikace a stádium**

Stádium onemocnění se určuje pomocí TNM (Tumour, Node, Metastases) klasifikace, aktuálně dle 7. vydání TNM klasifikace zhoubných novotvarů, která v české verzi vyšla v roce 2011 (13). TNM klasifikace zahrnuje velikost primárního nádoru (T0, Tis – karcinom in situ, T1-4) a nepřítomnost či přítomnost metastatického šíření do regionálních (N0-3) nebo vzdálených mízních uzlin (M0/1). V praxi existují vždy dvě TNM klasifikace – klinická (předléčebná) a patologická (pooperační). Klinická klasifikace označovaná jako cTNM se stanovuje před léčbou a slouží pro výběr a hodnocení předoperační léčby, chirurgické léčby nebo paliativní léčby. Patologická klasifikace označovaná jak pTNM je založena na nálezech

získaných před léčbou, doplněných nebo pozměněných o nálezy, které byly získány při chirurgickém výkonu a z patologického vyšetření. pTNM se používá pro výběr adjuvantní terapie a k upřesnění odhadu prognózy (13). Jednotlivá stádia karcinomu prsu jsou obsahem **Tabulky 1**.

**Tabulka 1: Přehled stádií karcinomu prsu**

Stádium	T	N	M
<b>0</b>	Tis	0	0
<b>IA</b>	1	0	0
<b>IB</b>	0, 1	1mi*	0
<b>IIA</b>	0, 1	1	0
	2	0	0
<b>IIB</b>	2	1	0
	3	0	0
<b>IIIA</b>	0, 1, 2	2	0
	3	1, 2	
<b>IIIB</b>	4	0, 1, 2	0
<b>IIIC</b>	Jakékoli T	3	0
<b>IV</b>	Jakékoli T	Jakékoli N	1

Pozn.:\* mikrometastázy (větší než 0,2 mm, a/nebo více než 200 buněk, ne však větší než 2,0 mm v největším rozměru)

#### ▪ **Grade**

Grade, neboli stupeň diferenciacie, vyjadřuje míru malignity nádoru a je určován dle metody Blooma a Richardsona z roku 1957 (14) pomocí Nottinghamské klasifikace z roku 1991 (15). Grade je souhrnným vyjádřením 3 parametrů, kterými jsou 1) tvorba tubulů – čím nižší formace tubulů tím vyšší číslo na škále 1-3, 2) polymorfie jader – čím více polymorfni jádra tím vyšší číslo (1-3), a 3) počet mitóz na 10 HPF (high power field neboli pole velkého zvětšení, tzn. počet mitóz na 10 zorných polí při velkém zvětšení) – čím více mitóz tím vyšší číslo (1-3). Dle součtu cifer získaných z těchto kritérií se vypočte finální grade dle **Tabulky 2** - čím vyšší číslo tím nižší diferenciacie nádoru.

**Tabulka 2: Nottinghamská klasifikace gradu karcinomu prsu**

Grade	Součet
1	3-5
2	6-7
3	7-9

▪ **Stanovení molekulárních faktorů**

Kromě výše popsaných parametrů se u karcinomu prsu provádí detekce molekulárních faktorů. Nejdéle stanovovaným molekulárním faktorem (téměř 40 let) je exprese hormonálních receptorů (HR), estrogenového receptoru alpha ( $ER\alpha$ , dále jako ER) a progesteronového receptoru (PR). Hlavním důvodem pro zavedení stanovení exprese HR bylo, že pacientky s nádory hodnocenými jako pozitivní na expresi ER (ER+) benefitovaly z antihormonální terapie (viz kapitola **1.3. Léčba karcinomu prsu**) na rozdíl od pacientek bez exprese ER (ER-) (16). Součástí histopatologického vyšetření je dále vyšetření faktoru HER2/neu (human EGF receptor 2/neu, dále jen HER2), na který je možné cílit tzv. anti-HER2 léčbu (17). Posledním faktorem, který se stal rutinně stanovovaným až v posledních letech je exprese proliferačního faktoru Ki-67 (18). Všechny tyto faktory jsou nezbytné pro odhad prognózy pacientek s karcinomem prsu a pro predikci účinku terapie, jsou proto podrobněji probírány v kapitole **1.4. Prognostické a prediktivní faktory u karcinomu prsu**.

### **1.3. Léčba karcinomu prsu**

Karcinom prsu je biologicky i klinicky heterogenní onemocnění s odlišným přirozeným vývojem a tedy s různými léčebnými možnostmi (19-21). Léčba karcinomu prsu zahrnuje léčbu chirurgickou a radiační, tedy lokoregionální terapii působící v místě nádoru, a léčbu systémovou, kterou tvoří chemoterapie a cílená léčba. Chemoterapie obecně působí na všechny rychle dělící se buňky v těle. Oproti tomu cílená (jinak také biologická) léčba působí jen na určité buňky s konkrétními znaky. Lékaři pro zvolení optimálního léčebného režimu využívají, kromě základních klinických faktorů (stádium, grade), hlavně expresi hormonálních receptorů a stav HER2. Expese těchto receptorů definuje léčebné možnosti v neoadjuvantním i adjuvantním podání.

Zjednodušeně, pacientky s expresí HR jsou automaticky indikovány k hormonální léčbě v samostatném režimu nebo v kombinaci s chemoterapií u vyšších stádií onemocnění. Pro

pacientky s amplifikací/zvýšenou expresí HER2 je dostupná anti-HER2 terapie většinou v kombinaci s chemoterapií. Pacientky bez exprese těchto receptorů mohou být léčeny jen chemoterapií. Indikaci chemoterapie u pacientek s časným stádiem onemocnění s expresí HR se snaží řešit většina prognostických testů popsaných v kapitole **1.4. Prognostické a prediktivní faktory u karcinomu prsu.**

### **1.3.1. Chemoterapie**

Chemoterapie je systémová léčba na bázi cytostatik, kterých je dnes známá celá řada (**Tabulka 3**). Velkou skupinou cytostatik tvoří analoga, látky strukturně podobné různým přirozeným metabolitům, jejichž modifikace brání jejich enzymatickému zpracování. Z nejpoužívanějších jsou to analoga pyrimidinů, např. 5-fluorouracil (5-FU) nebo tegafur (Ftorafur), případně capecitabin (Xeloda), který je možné podávat perorálně. Význam pro léčbu karcinomu mají také analoga kyseliny listové (Methotrexat).

Jiným mechanismem působení chemoterapeutik je poškození nukleových kyselin jejich chemickou modifikací (např. alkylací) nebo vmezeřením cytostatika do struktury nukleové kyseliny (interkalace). Terciární strukturu DNA ovlivňují inhibitory topoizomeráz, což jsou proteiny, které umožňují pomocí enzymatického štěpení měnit (rozplétat) terciární strukturu DNA. Příkladem mohou být chemoterapeutika antracykliny, která interkalací do DNA a RNA inhibují syntézu nukleových kyselin a zároveň inhibují topoizomerázu II.

Třetí skupinou chemoterapeutik používaných u karcinomu prsu tvoří mitotické jedy, které brání tvorbě mikrotubulů a tím znemožňují rozdělení buňky během mitózy, takže se buněčné dělení zastavuje v metafázi. Alkaloidy izolované z barvínkovce (*Catharanthus roseus*) jako je vinkristin, vinblastin a vinorelbin se váží na tubulinové podjednotky, brání další polymerizaci a následně dochází k rozpadu mikrotubulů. Taxany, extrahované z různých druhů tisů (*Taxus brevifolia*, *Taxus baccata*), naopak vazbou na mikrotubuly blokuje degradaci již vytvořených vláken a tím brání jejich znovuvytvoření. Cyklus buňky pak končí v G2/M bloku.

V adjuvantním podání jsou výše popsaná terapeutika indikovaná nejčastěji v režimech 5-FU + doxorubicin (Adriamycin)/epirubicin + cyclofosfamid (režimy FAC, FEC). V neoadjuvanci jsou upřednostňovány taxany většinou v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky. Nicméně kombinace chemoterapeutik v režimech a jejich dávkování se v průběhu let mění vzhledem k novým poznatkům o různé účinnosti (21). Prediktivní test pro výběr nejvhodnější chemoterapeutické léčby zatím v klinické praxi neexistuje.



### 1.3.2. Hormonální terapie

Cílem hormonální (jinak také endokrinní nebo antihormonální) terapie je vyřazení signální dráhy estrogen-ER-transkripce z funkce (viz kapitola 1.5.2. **Exprese hormonálních receptorů ER a PR**). To je možné několika způsoby (**Tabulka 3**).

Prvním je inhibice estrogenového receptoru prostou kompetitivní vazbou znemožňující nasednutí estrogeneru na vazebné místo receptoru. Nejpoužívanějším selektivním modulátorem estrogenních receptorů (SERM) je tamoxifen. Kromě samotné inhibice může daný antiestrogen podněcovat degradaci ER, což je typické pro selektivní degradátory estrogenních receptorů (SERD), jako je fulvestrant.

Další možností hormonální léčby je inhibice syntézy estrogenů. U žen po menopauze se používají inhibitory aromatáz (např. anastrozol, letrozol, exemestan), které blokují enzymy konvertující steroidy na estron a estradiol-17 $\beta$  především v nadledvinkách a částečně v tukové tkáni a játrech. U premenopauzálních žen, kdy je estrogen tvořen především vaječníky pod kontrolou stimulačních účinků luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH), se přistupuje buď k trvalému odstranění vaječníků (chirurgická nebo radiační ovariectomie) nebo k dočasnému vyřazení funkce pomocí medikamentů (např. gonadoliberin neboli Zoladex).

V adjuvantním podání jsou inhibitory aromatáz indikovány primárně u postmenopauzálních žen s časným stádiem karcinomu prsu jako primární léčba, po 2-3 letech užívání tamoxifenu, po skončení pětiletého období užívání tamoxifenu nebo při významných nežádoucích reakcích na tamoxifen či jeho neúčinnosti. U premenopauzálních žen se zpravidla přistupuje k ovariální supresi v kombinaci s tamoxifenem. Vzhledem k vysoké vnímavosti ER+ nádorů k hormonální léčbě lze hormonální terapii využít i v neadjuvantním podání.

### 1.3.3. Anti-HER2 terapie

Cílená terapie monoklonálními protilátkami proti nádorům s amplifikací/zvýšenou expresí HER2 receptoru se používá už přes deset let (22). Trastuzumab (Herceptin) a pertuzumab (Perjeta) se podávají adjuvantně většinou v kombinaci s chemoterapií. Anti-HER2 terapie má také velký význam v léčbě metastatického onemocnění (23).

**Tabulka 3: Typy chemoterapie a cílené terapie nejčastěji používané u pacientek s karcinomem prsu**

Typ terapie	Možnosti terapie	Příklady
<b>Chemoterapie</b>	<b>Analoga pyrimidinů</b>	5-fluorouracil Tegafur
	<b>Analoga kyseliny listové</b>	Capecitabin Methotrexát
	<b>Alkylační látky</b>	Cyclofosfamid
	<b>Interkalační látky (antracykliny)</b>	Doxorubicin (Adriamycin) Epirubicin
	<b>Inhibitory topoizomerázy I</b>	Topotekan Irinotekan
	<b>Inhibitory topoizomerázy II</b>	Teniposid Etoposid Doxorubicin
<b>Hormonální terapie</b>	<b>Mitotické jedy</b>	Vinkristin Vinblastin Vinorelbin Paclitaxel (Taxol) Docetaxel
	<b>SERM</b>	Tamoxifen
	<b>SERD</b>	Fulvestrant
	<b>Inhibitory aromatáz</b>	Anastrozol (Arimidex) Letrozol (Femara) Formestan (Lentaron) Exemestan (Aromasin)
<b>Anti-HER2</b>		Trastuzumab (Herceptin) Pertuzumab (Perjeta)

#### 1.4. Prognostické a prediktivní faktory u karcinomu prsu

Prognostické faktory předpovídají pravděpodobný průběh (vývoj) onemocnění. Prediktivní faktory pomáhají odhadnout, zda bude určitá léčba účinná u konkrétního pacienta s konkrétním typem nádoru.

V případě karcinomu prsu je odhad prognózy nejčastěji vyjádřen rizikem relapsu (návratu onemocnění) do pěti let od diagnózy, případně do 10 až 15 let při dlouhodobých léčebných režimech. Odhad prognózy závisí na celkovém stavu pacientky a na vlastnostech nádoru. Prakticky je odhad vždy vztažen i k použití určité léčby (např. riziko relapsu při léčbě hormonální terapií a chemoterapií vs. riziko relapsu jen při léčbě hormonální terapií). Faktory pro odhad prognózy jsou tedy vždy částečně i prediktivní. Mezi hlavní prognostické faktory

karcinomu prsu patří věk při diagnóze, stádium onemocnění, stupeň diferenciacie nádoru, exprese hormonálních receptorů, stav HER2 receptoru a stav proliferčního faktoru Ki-67.

Výzkum prediktivních faktorů spočívá v odhalení biologických vlastností nádoru i daného člověka, které již při podání léčby způsobují snížení účinku léčiva nebo vznikají během léčby jako takzvaná získaná rezistence. Cílem je tedy včas a přesně tyto faktory odhalit a přizpůsobit jim danou léčbu. Jak už z předchozích kapitol vyplývá, jedinými dobře zavedenými prediktivními faktory u karcinomu prsu je exprese hormonálních receptorů (predikující pacientky k hormonální terapii) a amplifikace/zvýšená exprese HER2 receptoru (predikující k léčbě anti-HER2 terapií). Faktory pro predikci účinnosti klasických chemoterapeutik však v klinické praxi stále zcela chybí.

#### **1.4.1. Hlavní klinické faktory**

Je již velmi dobře zdokumentováno, že větší nádory prsu jsou spojeny s vyšší pravděpodobností zasažení lymfatických uzlin metastázemi nezávisle na gradu a že mortalita pacientek stoupá s velikostí nádoru a s pozitivním zasažením lymfatických uzlin (24). Podobně málo diferenciované nádory (vyšší grade) jsou obecně spojeny s horší prognózou (15). Ženy diagnostikované před 40 rokem života mají vyšší incidenci trojitě negativního podtypu karcinomu prsu (triple negative breast cancer, TNBC) a HER2 podtypu, které jsou spojovány s horší prognózou pacientek (25).

Morfologický typ karcinomu prsu je také diskutován v souvislosti s horší či lepší prognózou speciálních typů karcinomu prsu v porovnání s IDC typem (NST) (26-29). Tyto práce je nicméně těžší interpretovat kvůli nízké incidenci speciálních typů (kromě ILC) a kvůli variabilitě vycházející z měnící se diagnostické klasifikace (28). Dle prací Li et al. 2003 a 2005 měly pacientky se všemi vzácnými typy menší riziko úmrtí oproti pacientkám s IDC (26, 28). Důvodem může být, že jednotlivé speciální typy karcinomu prsu mají spíše menší vnitřní variabilitu oproti IDC. Například kolem 95 % lobulárních karcinomů vykazuje expresi hormonálních receptorů (HR+) oproti 60-70 % u IDC (29). Jednotlivé vzácné typy také spíše klastrují do jedinečných molekulárních podtypů oproti IDC, který klastruje do řady podskupin (11).

### 1.4.2. Expres hormonálních receptorů ER a PR

ER $\alpha$  (kódovaný genem *ESR1*, estrogen receptor 1) je steroidní receptor přítomný v jádře a cytoplasmě buňky v monomerním stavu. Po navázání estrogenu (estradiol-17 $\beta$ , estron) dimerizuje a jako komplex se váže na specifické regiony (estrogen-responsive elements) v promotorech genů, jejichž exprese může být regulována ER. Následně za přispění mnoha regulátorů iniciuje transkripci těchto genů (30). Estrogeny ve zdravé prsní tkáni zvyšují sekreci růstových hormonů a tím stimulují její růst. Zvýšená exprese ER receptoru u nádorových buněk tedy podporuje jejich proliferaci.

Přestože je exprese progesteronového receptoru určována vždy s ER vzhledem k jeho funkční blízkosti, klinický význam PR není zcela jasný. Prediktivní schopnost PR pro účinnost hormonální terapie není tak jednoznačná jako u ER (31). Snížení nebo ztráta exprese PR při zachování exprese ER je ale častěji spojena s horší prognózou pacientek (32, 33). Proto se míra exprese PR používá pro stanovení klinicko-molekulárního podtypu (viz kapitola **1.4.5. Molekulární podtypy karcinomu prsu**).

Přibližně 70 % nádorů prsu bez ohledu na typ vykazuje expresi estrogenového receptoru, o něco méně (kolem 65 %) expresi progesteronového receptoru. Aktuálně jsou tumory klasifikovány jako ER nebo PR pozitivní při expresi 1 % a výše daného receptoru detekovaného imunohistochemicky. I takto nízká exprese predikuje dobrou úspěšnost hormonální terapie.

### 1.4.3. HER2/neu

Receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 (HER2, HER2/neu) kódovaný genem *ERBB2* (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2) je transmembránový receptor s tyrozin kinázovou aktivitou patřící do rodiny 4 HER receptorů pro epidermální růstové faktory. HER receptory (HER1-4, *ERBB1-4*) aktivují buněčnou transformaci, proliferaci a migraci a uplatňují se při vzniku a v proliferaci nádorů (34, 35). Stavbou jsou částečně homologní s EGFR receptory (epidermal growth factor receptor), které mají rovněž význam v karcinogenezi.

*ERBB2* se nachází na dlouhém raménku chromozómu 17 v oblasti q11.2-q12 a je u řady nádorových onemocnění amplifikován. U karcinomu prsu je tato genová amplifikace detekována přibližně u 15-20 % pacientek a silně koreluje se zvýšenou expresí proteinu. Proto se pro stanovení faktoru HER2 (amplifikace/zvýšená exprese) využívá stanovení pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a stanovení hladiny proteinu imunohistochemicky.

Amplifikace a s ní spojená zvýšená exprese HER2 je spojena s horší prognózou pacientek s karcinomem prsu (36). Nicméně je u těchto pacientek možné využít léčbu monoklonální protilátkou (např. trastuzumab), která vazbou na extracelulární doménu inhibuje funkci receptoru (37). V klinice má tedy stanovení faktoru HER2 význam pro odhad prognózy pacientek i pro indikaci vhodné léčby.

#### **1.4.4. Exprese Ki-67**

Ki-67 je jaderný antigen kódovaný genem *MKI67* (marker of proliferation Ki-67), který je nezbytný pro proliferaci buněk. Ki-67 byl studován jako potenciální prognostický a proliferační faktor řadu let (38), ale až od roku 2009 je jeho stanovení doporučováno pro správnou indikaci léčby pacientek s časnými stádii karcinomu prsu (39). Stanovení exprese Ki-67 je nezbytné pro klinické rozlišení luminálních podtypů karcinomu prsu (viz další kapitola).

#### **1.4.5. Molekulární podtypy karcinomu prsu**

Na přelomu tisíciletí byla poprvé navržena taxonomie karcinomu prsu založená na odlišnostech v celkové genové expresi získané pomocí cDNA mikročipů (40). Pomocí hierarchické shlukové analýzy genové exprese stanovené u 38 vzorků (36 IDC, 2 ILC, 1 IDCIS, 1 fibroadenom, 3 vzorky normální prsní tkáně) byly odlišeny 4 základní podtypy karcinomu prsu - luminální, HER2, bazální a normal-like typ.

Následná rozšířená studie 78 vzorků získaných od pacientek bez zasažení lymfatických uzlin (71 IDC, 5 ILC, 2 IDCIS, 3 fibroadenomy) ukázala, že existují minimálně dvě skupiny luminálního typu karcinomu prsu, luminální typ A a B. Další třetí skupina označená jako luminální typ C tvořila samostatný klastr podobný expresním profilem luminálnímu podtypu B i bazálnímu a HER2 podtypu. Luminální typ C, bazální a HER2 typ vykazovaly např. vysokou frekvenci mutací TP53 (41). Tato práce ukázala jako první i odlišný prognostický význam jednotlivých podskupin.

Další rozšiřující studie a studie na nezávislých souborech pacientek potvrdily existenci dobře definovatelných 4 podtypů karcinomu prsu: luminální A a B typ, HER2 typ, a bazální typ (42, 43). Největší rozdíl v expresi genů mezi podtypy (luminální vs. ostatní) byl vyjádřen geny typickými pro luminální epiteliální buňky, včetně exprese *ESR1* genu. Bazální typ

vytvářel nejhomonější skupinu v porovnání s ostatními (jen s malou vnitřní variabilitou) a je relativně uniformní skupinou oproti větší vnitřní diverzitě pozorované u ostatních typů.

#### ▪ **Luminální typ A**

Luminální typ A je charakterizován expresí genů aktivovaných ER, jejichž exprese je typická pro epiteliální (luminální) buňky duktálního systému prsní žlázy (např. cytokeratiny 8 a 18). Geny proliferace jsou exprimovány také, ale v menší míře než u bazálního typu. Typická pro luminální typ A i B je genová exprese transkripčních faktorů GATA3 (GATA binding protein 3), XBP1 (X-box binding protein 1), HNF3 (hepatocyte nuclear factor 3) a faktoru TFF3 (trefoil factor 3), jehož funkce není úplně známa. Pro typ A je k tomu typická exprese estrogenem regulovaného transportéru SLC39A6 (solute carrier family 39 member 6, známý také jako LIV-1) a cyklinu D1 regulující buněčný cyklus (40, 41). Luminální typ A je nejčastěji zastoupeným podtypem s frekvencí okolo 50-60 % a podtypem s nejlepší prognózou.

#### ▪ **Luminální typ B**

Pro luminální typ B je stejně jako pro typ A typická exprese *ESR1* a výše popsaných transkripčních faktorů. Navíc je exprimován gen pro enzym squalen monooxygenázu (*SQLE*) a *LAPTM4B* (lysosomal-associated transmembrane protein 4B) spojovaný s rezistencí k chemoterapii. Luminální typ B je spojen s významně horší prognózou oproti typu A. Tomu odpovídá vyšší exprese genů proliferace, jako je *MKI67* a *CCNB1* (cyclin B1).

#### ▪ **HER2 typ**

HER2 podtyp je charakterizovaný amplifikací/zvýšenou expresí HER2, zvýšenou expresí genů regulovaných HER2 a nízkou expresí genů exprimovaných u luminálních typů. Tento typ spolu s bazálním typem je spojen s významně kratším přežíváním pacientek oproti luminálním typům (40, 41).

#### ▪ **Bazální typ**

Pro bazální typ (basal-like) je typická exprese cytokeratinů 5/6 a exprese genů důležitých pro proliferaci. Bazální typ tvoří nejméně heterogenní skupinu ze všech typů. Přesto se pomocí následné genové analýzy tohoto podtypu podařilo identifikovat minimálně 6 různých podskupin (44). Stejně jako HER2 typ je bazální typ spojen s horší prognózou oproti luminálním typům. Bazální typ se navíc častěji vyskytuje u pacientek s BRCA mutací

(mutace v genech *BRCA1* nebo *BRCA2*), takže riziko vzniku tohoto typu může být částečně geneticky podmíněné (43, 45).

Ne zcela jednotný metodický přístup a tím způsobené rozdíly v panelech genů, kterými se definují molekulární podtypy (označované většinou jako „intrinsic panel“), vedly k potřebě sjednocení a zjednodušení molekulární klasifikace. Hu et al. 2006 definoval panel 306 genů, se kterým je možné rozlišit a klasifikovat všechny 4 podtypy nezávisle na typu použitého mikročipu (46). Později byl definován panel 50 genů nazývaný PAM50 (47), který je přednostně používán dalšími studii (48, 49).

Druhým nedostatkem molekulární klasifikace je, že zatím nedokáže klasifikovat všechny typy karcinomu prsu (43). V práci Parker et al. 2009 použili nejširší z používaných genových panelů pro definici základních 4 podtypů (1906 genů), avšak dokázali klasifikovat jen přibližně 65 % z celkového počtu analyzovaných vzorků (47). Na tento problém navázala práce, která definovala další podtyp karcinomu „claudin-low“ (48, 50). Claudin-low podtyp je definován nízkou expresí genů, kódujících proteiny zodpovědné za buněčnou adhezi a mezibuněčné spoje (claudin-3, 4, 7 a E-cadherin). Zároveň tento podtyp vykazuje znaky typické pro nádorové kmenové buňky (48). Celkovou expresí je tento podtyp nejbližší bazálnímu podtypu, ovšem s nižší hladinou genů proliferace.

#### ▪ **Klinicko-molekulární podtypy**

Molekulární klasifikace se tedy ukázala jako biologicky relevantní a klinicky využitelná. Stanovení celkového genového profilu pro diagnózu jednotlivých podtypů u každé pacientky by však bylo finančně náročné, proto je pro stanovení základních 4 podtypů podporováno využití klinicky běžně stanovovaných faktorů.

Imunohistochemicky se luminální typ A odlišuje od bazálního a HER2 typu pozitivní expresí ER (**Tabulka 4**). Negativní exprese HER2 a exprese Ki-67 < 14 % odlišuje luminální typ A od luminálního typu B (51). Relativně nedávno se pro definici luminálního podtypu B začala využívat míra exprese PR (33). Pozitivní exprese HER2 bez exprese HR definuje HER2 typ, negativní exprese všech tří faktorů určuje trojitě negativní podtyp.

**Tabulka 4. Klinická klasifikace podtypů karcinomu prsu**

<b>Podtyp</b>	<b>Klinicko-patologická definice</b>
<b>Luminální typ A</b>	ER+ a PR+ HER2- Ki-67 < 14 %
<b>Luminální typ B</b>	
<b>HER2-</b>	ER+ HER- Ki-67 ≥ 14 % nebo PR < 20 %
<b>HER2+</b>	ER+ HER+
<b>HER2 typ</b>	ER-, PR- HER2+
<b>TNBC typ</b>	ER-, PR- HER2-

V praxi je tuto klasifikaci možné velmi snadno začlenit do klinické diagnostiky a využít pro indikaci léčby. Přesto je třeba zdůraznit, že klasifikace molekulárních podtypů na základě imunohistochemických faktorů není přesná a nemusí odpovídat molekulární klasifikaci. Např. z 625 vzorků karcinomu prsu patologicky určených jako ER+ bylo ve skutečnosti 73 % vzorků geneticky rozpoznáno jako luminální typ, 11 % jako HER2 typ, 5 % jako bazální typ a 12 % jako normal-like typ. Obdobně z patologicky ER- karcinomů bylo 11 % určeno jako luminálních, 32 % jako HER2 typ, 50 % jako bazální a 7 % jako normal-like typ. Podobné výsledky vycházely i ze srovnání molekulární klasifikace a imunohistochemicky odvozené klasifikace na základě exprese HER2 (52).

#### **1.4.6. Prognostické a prediktivní testy**

Tato kapitola shrnuje nejznámější prognostické a prediktivní testy používané u pacientek s karcinodem prsu. K dispozici jsou testy klinické (Adjuvant Online, Nottinghamský prognostický index), klinicko-molekulární (Predict) a testy zcela na molekulární bázi (MammaPrint, Oncotype a další). Cílem těchto testů je rozdělit pacientky do skupin s jasně



definovanou prognózou, ať už se jedná o neselektované pacientky s karcinomem prsu nebo o určitou podskupinu. Hlavním cílem novějších molekulárních testů je přesněji identifikovat pacientky s vysokým rizikem relapsu, pro které je nutná léčba chemoterapií od pacientek s nízkým rizikem relapsu, které se mohou léčbě chemoterapií, včetně jejich nežádoucích účinků, vyhnout. Ve výčtu jsou záměrně vynechány prognostické a prediktivní testy určené pro pacientky léčené jen hormonální terapií, protože problematika účinku léčby endokrinní terapií není obsahem této práce.

#### ▪ **Adjuvant! Online**

Adjuvant! Online je software umožňující odhadnout pravděpodobnost desetiletého přežití a pravděpodobnost výskytu relapsu u pacientek od 35-69 let (53). K výpočtu pravděpodobnosti využívá věk při diagnóze, velikost nádoru, stav lymfatických uzlin, grade, expresi ER a případné další komorbidity. Test byl několikrát validován a využíván čím dál častěji (54). Nicméně, např. Hajage et al. 2011 ukázali, že rozšíření testu o některé další molekulární faktory (HER2 nebo Ki-67) by významně pomohlo v přesnějším odhadu rizika relapsu, především u pacientek s agresivnějším typem nádorů (55). Momentálně dochází k aktualizaci tohoto nástroje vzhledem k novějším poznatkům z molekulární biologie.

#### ▪ **Nottinghamský prognostický index (NPI)**

NPI využívá kombinaci velikosti nádoru, stavu spádových lymfatických uzlin a gradu ( $NPI = \text{Grade} + \text{Node} + 0.2 * \text{Size}$ ) pro rozdělení pacientek do 3 prognosticky odlišných skupin s definovanou pravděpodobností přežití do 15 let od diagnózy (56). Pro každou skupinu existuje doporučení pro následnou léčbu. Později byl NPI revidován a aktuálně umožňuje rozdělení pacientek do pěti prognosticky odlišných skupin (57) a diskutuje se i možnost zpřesnění testu pomocí molekulárních dat (58).

#### ▪ **Predict**

Predict je online dostupný software pro odhad pravděpodobnosti dožití v rámci 5 a 10 letého období od operace bez a s využitím adjuvantní terapie (59). Matematický model využívá informace o věku při diagnóze, velikosti nádoru, gradu, počtu spádových uzlin zasažených metastázami a o stavu faktorů ER, HER2 a Ki-67.

### ▪ **MammaPrint**

MammaPrint byl prvním genetickým prognostickým testem (45). V původní práci byl využit soubor 98 pacientek diagnostikovaných v období 1983-1986 s věkem do 55 let a s nízkým stádiem karcinomu prsu. U 34 pacientek došlo k relapsu do pěti let od diagnózy a 34 pacientek bylo v rámci pětiletého sledování bez relapsu. Pomocí mikročipů byla stanovena exprese okolo 25 000 genů, z kterých bylo nejprve vybráno 231 genů a finálně 70 genů, jejichž exprese nejvíc korelovala a byla určující pro rozlišení pacientek s lepší prognózou (bez relapsu do 5 let) a s horší prognózou (s relapsem do 5 let). Výsledkem testu je korelační koeficient expresních hladin těchto 70 genů proti průměrnému korelačnímu koeficientu získanému z původní skupiny pacientek s dobrou prognózou.

Test byl následně validován na nezávislých souborech pacientek s různým typem včasných karcinomů prsu včetně pacientek s pozitivním a negativním zasažením lymfatických uzlin nebo lišících se HER2 expresí (60-63). Původní test byl primárně validován na čerstvých nebo čerstvě zamražených vzorcích, velká míra korelace byla ale dosažena i při použití archivních parafinových (FFPE) vzorků (64).

Možnost širšího klinického využití se aktuálně testuje v klinické studii MINDACT (Microarray In Node-negative and 1–3 node positive Disease may Avoid ChemoTherapy) (65-67). Do studie bylo zařazeno celkem 6693 pacientek, které v období 2007-2011 podstoupily operaci pro časný karcinom prsu. Pacientky byly následně klasifikovány na základě genetického (G) MammaPrint testu a klinického (C) Adjuvant!Online testu jako pacientky s vysokým (G-high/C-high) nebo s nízkým rizikem relapsu (G-low/C-low). Další dvě skupiny tvořily pacientky, kde se odhad obou testů lišil (G-high/C-low, G-low/C-high). Pacientkám s nízkým rizikem u obou testů nebyla indikována adjuvantní chemoterapie, naopak všem pacientkám s vysokým rizikem byla indikována adjuvantní chemoterapie. Pacientky s G-high/C-low a pacientky s G-low/C-high byly náhodně rozděleny v rámci indikace chemoterapie. Více než 94 % pacientek klasifikovaných jako G-low/C-high zůstaly v rámci pětiletého sledování bez příznaků, ať už dostaly chemoterapie či ne. Výsledky byly prozatím prezentovány v dubnu 2016 na konferencích Clinical Trials Plenary Session nebo AACR 107th Annual Meeting 2016 (68).

### ▪ **Oncotype DX**

Oncotype DX je test založený na genové expresi určený pro odhad rizika relapsu u úzce klinicky definované skupiny pacientek s karcinomem prsu a to pacientek s expresí ER, bez zasažení lymfatických uzlin metastázemi a bez amplifikace/zvýšené exprese HER2 (69). Test

je zároveň i prediktivní, protože udává pravděpodobnost, zda bude pro pacientku lepší léčba chemoterapií. Test hodnotí normalizovanou expresi 16 genů (normalizace pomocí 5 referenčních genů) ve FFPE vzorcích a výsledkem je riziko relapsu (Recurrence Score, RS) vyjádřené číslem 1-100. Na základě RS test rozděluje pacientky do tří skupin s různým rizikem relapsu:

Nízké riziko  $RS < 18$

Střední riziko  $RS \geq 18$  a  $< 31$

Vysoké riziko  $RS \geq 31$

Význam adjuvantní chemoterapie u pacientek ve skupině s vysokým rizikem (RS 31 a více) byl potvrzen již několikrát, např. klinickými studiemi NSABP B20 a SWOG 8814. Významnou probíhající prospektivní klinickou studií je TAILORx studie (The Trial Assigning Individualized Options for Treatment, Rx), která zahrnuje více jak 10 000 pacientek. Na základě RS byly pacientky rozděleny do 3 skupin. Pacientky s RS skóre  $\leq 10$  (skupina 1), pacientky s RS skóre 11-25 (skupina 2) a pacientky s RS skóre 26 a více (skupina 3). Pacientky v první skupině byly indikovány jen k hormonální terapii, pacientky ve třetí skupině k chemoterapii následovanou hormonální terapií. Pacientky druhé skupiny byly pak náhodně indikovány k chemoterapii a hormonální terapii nebo jen k hormonální terapii. První, nedávno publikované, výsledky ukázaly, že pravděpodobnost přežití do 5 let bez relapsu karcinomu prsu u pacientek s RS skóre  $\leq 10$  je 99,3 % (70). Pacientky se skóre 10 nebo menším ovšem tvořily jen 16 % z první a druhé skupiny v rámci studie (RS 1-25). Tato skupina je tedy minimálně čtyřikrát menší než skupina s nízkým rizikem, kterou se podařilo identifikovat ve studii MINDACT pomocí testu MammaPrint. Až 67 % pacientek ze skupiny 2 bylo náhodně indikováno k chemoterapii s endokrinní terapií nebo jen k endokrinní terapii a tyto pacientky jsou dále sledovány (70).

Testy MammaPrint a Oncotype DX představují dva nejznámější a aktuálně nejvíce klinicky používané genetické testy. Možnost jejich využití je uvedena i v mezinárodních doporučeních St. Gallen a European Society of Medical Oncology pro léčbu karcinomu prsu (20, 71).

### ▪ Další molekulární testy

Z dalších genetických testů pro výrazněji neselektované pacientky s karcinomem prsu je známý tzv. “**wound-response signature**”, založený na expresi genů drah aktivovaných v buňkách při procesu hojení (72). Test vychází ze zjištění, že reakcí fibroblastů a séra (*in vitro*) dochází k aktivaci genů odpovědných za proliferaci, buněčnou mobilitu a angiogenezi (“core serum response”, CSR). Tedy procesů odpovědných za proliferaci a metastatický potenciál rakovinných buněk (72).

**MapQuantDx™** (QIAGEN, Marseille, France) je založený na profilu 97 genů, převážně z oblasti buněčného cyklu a proliferace, jejichž exprese významně korelovala v práci Sotiriou et al. 2006 s gradem onemocnění. Výsledkem testu je tzv. Grade-odvozený genetický index, se kterým lze jednak jasně rozlišit pacientky s nízkým (1) nebo s vysokým (3) gradem, ale především je možné lépe klasifikovat pacientky se středním stupněm diferenciaci (grade 2) a identifikovat v této skupině pacientky s nízkým nebo vysokým rizikem relapsu (73).

Podobně jako Oncotype DX, i další testy pro odhad prognózy byly navrženy pro konkrétní (selektovaný) typ pacientek. **Rotterdamský profil exprese 76 genů** (74) byl navržen pro premenopauzální i postmenopauzální pacientky bez zasažení lymfatických uzlin metastázami a obsahuje geny z oblasti buněčného cyklu, proliferace, imunitní odpovědi či transkripčních faktorů.

## 1.5. Výzkum nových prognostických a prediktivních biomarkerů

Širší znalosti o heterogenitě nádorů prsu umožňují nalézt a definovat nové a přesnější prognostické markery. Oblast výzkumu se zaměřuje hlavně na mechanismy, které způsobují zvýšenou proliferaci nádorů, které by se mohly následně využít k nalezení nových protinádorových léčiv. Druhou velkou oblastí výzkumu jsou mechanismy podporující odolnost (rezistenci) nádorových buněk k protinádorové léčbě. Tato rezistence může vycházet již z primárních vlastností nádorových buněk (primární rezistence), které se projeví necitlivostí nádorových buněk k dané léčbě při prvním podání. Nebo může vzniknout až v průběhu léčby změnou vlastností buňky, která se tak postupně stane k terapii necitlivá (sekundární rezistence). Mezistupněm těchto kategorií je pak získaná rezistence daná heterogenitou nádoru a možnou selekcí rezistentních buněk, které byly v primárním nádoru zastoupeny minoritně.

Mechanismy, které se uplatňují ve zvýšené proliferaci a lékové rezistenci se mohou překrývat:

- **Snížení aktivace buněčné smrti**
- **Změny v buněčném cyklu a cytokinezi**
- **Změny v transportu látek včetně léčiv**
- **Změny v reparaci DNA**

Některé mechanismy jsou typické pro vznik lékové rezistence:

- **Snížení aktivace a zvýšení inaktivace léčiv**
- **Změny v cílových molekulách účinku léčiv**

Tato práce se zabývá hlavně možnými změnami v aktivaci buněčné smrti a změnami v cytokinezi, které budou obsahem následujících kapitol.

### **1.5.1. Programovaná buněčná smrt u nádorových onemocnění**

Schopnost ovlivnit aktivaci buněčné smrti je jednou z hlavních vlastností nádorových buněk, která jim dává možnost nekontrolované proliferace a šíření. Stejně tak úspěch klasické chemoterapie, například cílené na poškození DNA, je ovlivněn jak schopností reparace DNA, tak schopností aktivovat programovanou buněčnou smrt v případě, že oprava už není možná. Programovaná buněčná smrt je geneticky určený mechanismus řízeného rozpadu nepotřebných nebo poškozených buněk (75, 76). Nejdéle známou a nejčastější formou programované buněčné smrti je apoptóza, k dalším typům patří autofágie a programovaná nekróza, které lze morfologicky od apoptózy odlišit (77).

Apoptóza je charakteristická klasickými morfologickými změnami jako je kondenzace cytoplasmy a svaštění buňky, kondenzace chromatinu, rozpad jádra a následný rozpad buňky na cytoplasmou ohraničená apoptická tělíska, která jsou nakonec fagocytována. Řízený rozpad buňky do apoptických tělísek brání vylití obsahu buňky do okolí a brání vzniku zánětu a poškození okolních buněk. Na biochemické úrovni dochází ke štěpení DNA a proteolytickému štěpení, které je zprostředkováno cysteinovými proteinázami, kaspázami (76).

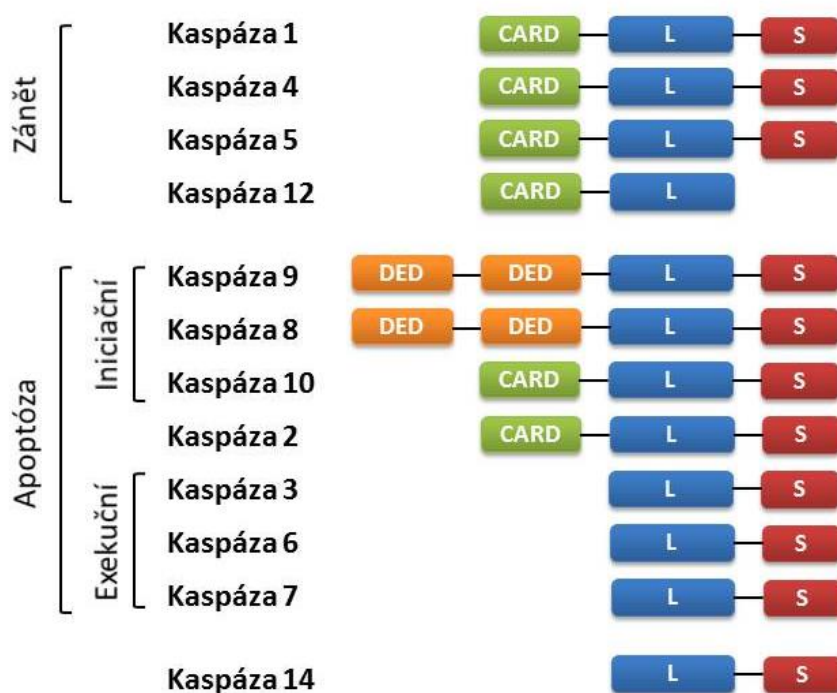
### 1.5.2. Kaspázy

Kaspázy (CASP, cysteine-aspartic protease) tvoří rodinu evolučně konzervovaných intracelulárních proteáz uplatňujících se v buněčné smrti, nekróze a zánětu. Společným znakem všech kaspáz je cysteinový zbytek v aktivním místě a schopnost štěpit peptidovou vazbu specificky za aspartátem na karboxylovém konci proteinu. V buňce jsou exprimovány většinou ve formě monomerních prokaspáz, v enzymaticky aktivním stavu tvoří homodimery. Zatím bylo popsáno 12 lidských kaspáz, kaspáza 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 a 14, které můžeme dále dělit do skupin podle struktury nebo funkce (**Obrázek 2**).

Kaspázy 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 a 12 patří do skupiny kaspáz tvořených katalytickou částí, která se skládá z malé a velké domény, a prodomény obsahující jednu nebo více domén typu CARD (caspase activation and recruitment domain) nebo DED (death effector domain). Tyto domény jim umožňují vazbu s dalšími proteiny nesoucími tzv. domény smrti DDs (death domains). Kaspázy 3, 6, 7 a 14 nesou jen malou a velkou podjednotku tvořící katalytickou část proteinu a jsou aktivovány štěpením ostatních kaspáz.

Kaspázy 1, 4 a 5 se uplatňují při indukci zánětu, naopak kaspáza 12 působí u savců proti zánětu. Kvůli mutaci způsobující vznik předčasného stop kodónu je však kaspáza 12 u lidí nefunkční. Kaspáza 14 byla popsána jen u suchozemských savců a podílí se pravděpodobně na diferenciaci keratinocytů. Do skupiny kaspáz s převážně apoptickou funkcí se řadí kaspázy 2, 3, 6, 7, 8, 9 a kaspáza 10 (75, 78). Tyto lze dále rozlišit na iniciační kaspázy (8, 9 a 10), které štěpí a aktivují kaspázy efektorové (3, 6 a 7). Efektorové kaspázy zprostředkovávají konečný krok buněčné smrti. Kaspáza 2 se může uplatňovat jako iniciační i efektorová kaspáza.

**Obrázek 2: Klasifikace lidských kaspáz**



Pozn.: L=velká podjednotka (large subunit), S=malá podjednotka (small subunit)

### 1.5.3. Vnější a vnitřní dráhy apoptózy

Apoptóza může být aktivována a dále probíhat dvěma cestami, vnější (dráha receptorů smrti) a vnitřní (mitochondriální dráha) cestou. Obě tyto dráhy spojuje aktivace iniciačních kaspáz (kaspáza 9 u vnitřní dráhy, kaspáza 8 a 10 u vnější dráhy), které dále štěpí a tím aktivují efektorové kaspázy, což končí apoptózou. Přesto, že jsou obě dráhy většinou popisovány odděleně, existují mezi nimi různé přechody, které obě dráhy propojují a vytváří další alternativní dráhy.

#### ▪ Vnější dráha apoptózy

K aktivaci vnější dráhy dochází přijetím vnějšího signálu ve formě některého z ligandů rodiny faktorů nádorové nekrózy (TNF, tumor necrosis factor), např. FAS-L (CD95L), TNF, TRAIL (APO2L), který se váže na odpovídající membránový receptor smrti (FAS, TNF-R, TRAIL-R). Tato vazba iniciuje vazbu receptoru, resp. jeho domény smrti (DDs) nacházející se na cytoplasmatické straně receptoru, s adaptorovým proteinem FADD (FAS associated death domain) případně TRADD (TNF receptor associated death domain).

Tyto proteiny obsahují další tzv. efektorové domény smrti (DED), prostřednictvím kterých mohou vázat jak DD receptory smrti tak DED domény iniciačních kaspáz 8 a 10, které po aktivaci dále štěpí exekuční kaspázy a dochází k apoptóze (75, 78).

#### ▪ **Vnitřní dráha**

K aktivaci vnitřní dráhy dochází po signálu jak ze samotné buňky (poškození DNA a cytoskeletu, oxidační stres, apod.), tak přijetím vnějšího stimulu. Tato dráha je pod kontrolou enzymů spojených s mitochondriemi. Při spuštění vnitřní dráhy dochází k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány prostřednictvím homooligomerů proteinů BAX nebo BAK z rodiny BCL-2 proteinů (odvozeno od stejnojmenného proteinu poprvé objeveného v B-buňkách maligního lymfomu, B-cell lymphoma gene 2) a uvolnění cytochromu C z mezimembránového prostoru mitochondrií do cytoplasmy. Cytochrom C váže adaptorový protein APAF1 (adapter protein apoptotic protease activating factor-1), což vyvolá konformační změny v APAF1 a oligomerizaci tohoto proteinu do kruhového komplexu nazývaného apoptozóm. Ve vnitřní části tohoto komplexu, složeného ze sedmi proteinů APAF1, leží CARD domény, na které se mohou vázat iniciační kaspázy 9 a po aktivaci štěpit exekuční kaspázy (75, 78).

#### ▪ **Regulace**

Pro spuštění vnitřní dráhy je klíčová především permeabilizace mitochondriální membrány, která je pod kontrolou BCL-2 proteinů. Každý z rodiny BCL-2 proteinů obsahuje aspoň jednu ze 4 typů BCL-2 homologních domén (BH1-4) a většina obsahuje doménu pro zakotvení v buněčných membránách na svém C konci (79). Podle struktury i funkce se BCL-2 proteiny obvykle dělí na proapoptické (BAX, BAK, BOK), antiapoptické (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL1, BCL2A1, BCL-B) a BH3-only (BIK, HRK, BIM, BAD, BID, PUMA, NOXA, BMF).

Podle jednoho z modelů spuštění permeabilizace mitochondriální membrány, proapoptické BH3-only proteiny (např. BID, BIM) přímo způsobují změny konformace BAX/BAK a následnou permeabilizaci membrány. Nicméně i jiné proteiny nebo stimuly pravděpodobně mohou spouštět aktivaci BAX/BAK, včetně přímé aktivace proteinem p53 (80). Dle jiného (nepřímého) modelu jsou na BAX/BAK v neaktivním stavu vždy navázány antiapoptické BCL-2 proteiny (např. BCL-2, BCL-XL), které proapoptické BH3-only proteiny vážou a tím uvolňují a aktivují BAX/BAK (79).



Při permeabilizaci membrány dochází k uvolnění aktivátoru apoptózy cytochromu C a dále proteinů SMAC (second mitochondrial activator of caspases), známého i jako DIABLO (direct IAP protein with low pI), HTRA2 (high temperature requirement protein A2, jinak OMI), endonukleázy G a AIF (apoptosis-inducing factors). Endonukleáza G a AIF se uplatňují hlavně při fragmentaci DNA. Smac/DIABLO a HTRA2/OMI inhibují činnost proteinů IAPs (inhibitors of apoptosis proteins), jejichž hlavní funkcí je inhibovat činnost kaspáz. K nejznámějším IAPs proteinům patří XIAP (X-chromosome-linked IAP), cIAP (cellular inhibitor of apoptosis protein) a survivin (79).

#### **1.5.4. Kaspázy buněčné smrti, úloha v karcinogenezi a léčbě nádorů**

Teoreticky existuje řada cest, jak mohou nádorové buňky inhibovat apoptózu nebo navodit rezistenci k apoptóze. Hlavní principy jsou 1) narušení rovnováhy mezi proapoptickými a antiapoptickými proteiny, 2) ovlivnění schopnosti receptorů smrti přijímat a přenášet signál a 3) snížení funkce kaspáz. Poslední bod může být způsoben snížením exprese kaspáz v nádorových buňkách, mutacemi v genech kaspáz ovlivňující funkci enzymů nebo deregulací hlavních regulátorů kaspáz.

##### **▪ Kaspáza 2**

Kaspáza 2 (ICH1, NEDD2) je nejvíce evolučně konzervovaná savčí kaspáza a nejbližší homolog kaspázy CED-3, první popsané kaspázy u *Caenorhabditis elegans* (81, 82). Přes řadu let, kdy byla kaspáza 2 studována, není její funkce v apoptóze a dalších buněčných mechanismech zcela jasná (83).

V rámci buněčné smrti se kaspáza 2 podílí na spuštění p53 indukované apoptózy vyvolané poškozením DNA, např. působením chemoterapeutik jako je 5-FU nebo antracykliny (84). Při aktivaci dochází k dimerizaci prokaspáz prostřednictvím RAIDD (RIP-associated protein with a death domain) adaptorového proteinu díky interakci CARD domén přítomných v obou proteinech. Následuje vazba proteinů PIDD (p53-induced protein with a DD) a RAIDD prostřednictvím DD-DD interakce a vzniká komplex prokaspáza 2-RAIDD-PIDD nazývaný PIDDozóm. Přiblížením prokaspáz dochází odštěpením CARD domén k jejich aktivaci a iniciaci mitochondriální apoptické dráhy (78, 85). Alternativně může být kaspáza 2 aktivována v rámci p53 indukované apoptózy i vazbou do komplexu DISC spolu s aktivací kaspázy 8 (viz níže). Kaspáza 8 s kaspázou 2 následně iniciují mitochondriální dráhu apoptózy štěpením proteinu BID (Olsson et al. 2009). Kaspáza 2 může být ale také aktivována

kaspázou 3 a fungovat tedy jako exekuční kaspáza v závislosti na typu signálu smrti a typu buněk (86).

V posledních letech byla kaspáza 2 studována pomocí *in vitro* modelů i z hlediska možné role v rezistenci nádorových buněk na taxany. Při inhibici kaspázy 2 v buněčných modelech melanomu a myších embryonálních fibroblastů (MEFs) docházelo k významné inhibici apoptózy vyvolané docetaxelem (87, 88). U buněk karcinomu prsu byla kaspáza 2 mezi nejvíce aktivovanými kaspázami po aplikaci paklitaxelu a její inhibice pomocí siRNA zvýšila počet buněk rezistentních vůči paklitaxelu a zároveň snížila štěpení iniciačních kaspáz 8 a 9 a exekučních kaspáz 3 a 7 (89, 90). Kaspáza 2 má tedy důležitou roli v apoptóze vyvolané taxany a mohla by fungovat jako apikální kaspáza této dráhy.

Stále více publikací popisuje roli kaspázy 2 v neapoptických buněčných procesech jako je regulace buněčného cyklu a DNA reparace (85). Poměrně intenzivně je kaspáza 2 studována jako potenciální tumor supresorový gen (91-93). Inhibice kaspázy 2 u myších modelů ovšem nezpůsobuje významnou změnu ve fenotypu a je možné, že význam kaspázy 2 se projevuje jen za určitých patologických podmínek (85).

Gen kódující kaspázu 2 (*CASP2*) leží v dlouhém raménku sedmého chromozomu (7q34). Alternativním sestřihem kaspázy 2 vzniká, kromě dominantního transkriptu kódujícího dlouhou variantu (kaspázu 2L) alternativní varianta, která navíc obsahuje alternativní exon 9 o délce 61 bp. Přítomností této sekvence v transkriptu vzniká nový stop kodon a krátká izoforma kaspázy 2, kaspáza 2S (82). Kaspáza 2S postrádá krátkou doménu katalytické části kaspázy a její zvýšená exprese *in vitro* působí proti apoptóze (82). Regulaci alternativního sestřihu ovlivňuje 100 nukleotidů dlouhá sekvence v intronu 9 (tzv. In100 element) (94). V práci Logette et al. 2003 následně ukázali, že obě varianty mají samostatný promotor a exprese může být ovlivněna už při iniciaci transkripce (95).

#### ▪ Kaspáza 8

Kaspáza 8 (FLICE, MACH, MCH5) je hlavní iniciační kaspáza vnější apoptické dráhy vyvolané vnějšími signály smrti, jejíž průběh je popsán výše. Při aktivaci kaspázy 8 v rámci komplexu DISC (death-inducing signaling complex) dochází k dimerizaci prokaspáz při současném odštěpení DED domén a vzniká katalyticky aktivní protein. DED domény fungují jako spojovací domény pro vazbu s adaptorovými proteiny, ale nejspíše i pro jiné typy proteinů. V práci Mielgo et al. 2009 pozorovali vysokou koncentraci DED domén ve vazbě

s mikrotubuly při apoptóze vyvolané taxany a zároveň zvýšenou aktivaci kaspázy 8 (96). Do této doby byla role kaspázy 8 v apoptóze indukované taxany považována spíše za doplňující.

Gen kódující kaspázu 8 leží v oblasti 2q33.1 a je přepisován do 8 alternativních transkriptů kódujících izoformy kaspázy 8. Dominantními a katalyticky funkčními formami jsou kaspáza 8a a 8b, které obsahují 2 DED domény a katalytickou jednotku (97). Minimálně 4 izoformy kaspázy 8 postrádají katalytickou jednotku a obsahují jen DED domény s větším či menším proteinovým zbytkem bez specifické funkce (97). Jedna z těchto variant (kaspáza 8L) obsahuje mezi exony 8 a 9 inzert dlouhý 136 bp, který v transkriptu vytváří předčasný stop kodón (98). Tato forma byla identifikována v buňkách lymfocytů a neuroblastomu, ve kterých její zvýšená exprese působila antiapopticky pravděpodobně kompetitivní vazbou do komplexu DISC (98-100).

#### ▪ Kaspáza 9

Kaspáza 9 (APAF3, MCH6) je hlavní iniciační kaspázou vnitřní apoptické dráhy, jejíž aktivace je popsána výše. Význam kaspázy 9 pro vznik nádorů není zcela jasný. Inhibice kaspázy 9 nebo Apaf-1 v myším modelu významně uspíšila vznik nádoru indukovaného zvýšenou expresí c-Myc u buněk embryonálních fibroblastů (101). Tento efekt se však zdá být specifickým jen pro určitý typ buněk (102, 103). Kaspáza 9 a Apaf-1 jsou nicméně nezbytní pro apoptózu indukovanou taxany (104).

Kaspáza 9 je kódována genem *CASP9*, který leží v oblasti p36.21 chromozomu 1. Alternativním sestřihem tohoto genu při transkripci vznikají dvě varianty kaspázy 9 - dominantní a proapoptická varianta 9A a alternativní varianta 9B postrádající celou katalytickou podjednotku (105). Kaspáza 9B působí negativně na apoptózu pravděpodobně kompetitivní vazbou na Apaf-1, která brání vytvoření funkčního apoptozómu (105).

#### ▪ Kaspáza 10

Kaspáza 10 (FLICE2, MCH4) je blízkým homologem kaspázy 8. Oba geny leží ve stejné oblasti chromozomu 2 (2q33–34). Kaspáza 10 se ale vyskytuje jen u lidí, což naznačuje pravděpodobný vznik duplikací v průběhu evoluce. Na rozdíl od kaspázy 8 je funkce kaspázy 10 v indukci apoptózy mnohem méně prostudována. Podobně jako kaspáza 8 může být aktivována v rámci DISC komplexu, nicméně její schopnost plně nahradit kaspázu 8 ve vnější apoptické dráze je diskutabilní (106, 107).

### ▪ Kaspáza 3, 6 a 7

Kaspázy 3, 6 a 7 jsou efektorové kaspázy aktivované v rámci vnitřní i vnější apoptické dráhy. Kaspáza 3 je hlavní a nejčastěji studovanou efektorovou kaspázou, o funkci zbylých dvou kaspáz existuje mnohem méně informací. Vzhledem ke stejné aktivitě k určitým syntetickým proteinovým substrátům se dlouho předpokládalo, že kaspázy 3 a 7 jsou funkčně zaměnitelné. Walsh, Cullen (108) poprvé ukázali, že tyto kaspázy vykazují odlišnou aktivitu k přirozeným substrátům (BID či XIAP).

Ztráta exprese kaspázy 3 byla popsána u buněk karcinomu prsu MCF-7 jako důsledek delece části genu (109). Obnovení exprese kaspázy 3 u těchto buněk vedlo k výraznější citlivosti MCF-7 buněk k doxorubicinu a etoposidu (110).

Alternativním sestřihem genu *CASP3* (4q34) vzniká hlavní izoforma proteinu kódovaného 2 transkripty mRNA, kaspáza 3A a 3B (liší se na 5'UTR konci), a krátká varianta 3S. Varianta 3S postrádá exon 6, který tvoří část katalytické podjednotky (111). Umělé zvýšení exprese v buněčném modelu ukázalo, že tato varianta může fungovat jako negativní regulátor apoptózy (111). Zvýšený poměr kaspázy 3S/3 souvisel se špatnou vnímavostí vůči neoadjuvantní léčbě založené na cyklofosfamidu u karcinomu prsu (112).

### 1.5.5. Úloha KIF14, PRC1 a CIT v cytokinezi, karcinogenezi a léčbě nádorů

Zvýšená proliferace resp. nekontrolované dělení nádorových buněk vychází také ze změn v regulaci buněčného cyklu a dělení nádorových buněk. Vlastní dělení buňky neboli cytokineze nastává bezprostředně po duplikaci a rozdělení jaderného materiálu, ale začíná již během anafáze (113). Mezi oddělenými chromozomy se postupně vytvoří válcovitý svazek antiparalelních mikrotubulů, jinak také centrální svazek (central spindle, midzone microtubule bundles), pocházející z obou pólů mitotického vřeténka. Působením řady aktivátorů a regulátorů cytokineze dochází ke vzniku aktinového kontraktálního prstence a k zúžení spoje mezi buňkami až do přechodné spojky zvané telofázové tělísko (midbody). Midbody v konečné fázi cytokineze zaniká, čímž dojde k oddělení buněk (113). Pro iniciaci cytokineze a vznik kontraktálního prstence je nezbytná GTPáza RhoA a aktin vazebný protein anillin (114).

### ▪ KIF14

KIF14 (kinesin family member 14) patří do velké rodiny kinesinů, která zahrnuje minimálně 640 proteinů. Kinesiny jsou molekulární motorové proteiny odpovědné za přenos molekul různého typu podél vláken mikrotubulů z jedné oblasti buňky do druhé (pohyb

chromozomů při dělení buňky, přenos neurotransmiterů axony nervových buněk). Kinesiny se typicky skládají z N-koncové motorové domény (hlavy) obsahující dvě globulární hlavičky, které se váží na mikrotubuly. Prostřednictvím hydrolýzy ATP převádí motorová doména uvolněnou chemickou energii na mechanickou a dochází k pohybu kinesinu po vláknech. C-koncová doména (koncová) obsahuje vazebná místa pro přenášené molekuly.

KIF14 je nezbytný pro formaci centrálního svazku, midbody komplexu a dokončení cytokineze (115). Protein KIF14 obsahuje vazebná místa pro PRC1 i CIT (viz dále) a je nezbytný pro správnou lokalizaci CIT během pozdní fáze cytokinézy. Podle modelu navrženého v práci Gruneberg et al. 2006 je funkce kinesinu KIF14 během cytokinézy závislá na přítomnosti PRC1 (115).

Významně zvýšená exprese KIF14 byla popsána u karcinomu prsu, plic, a retinoblastomu (116-118). Gen *KIF14* se nachází v oblasti dlouhého raménka chromozomu 1 (1q31–q32), která je významně amplifikována u celé řady nádorových onemocnění (117).

#### ▪ PRC1

PRC1 (protein regulator of cytokinesis 1) je protein schopný vázat mikrotubuly (microtubule-bundling protein) a je hlavní regulátorem vytváření centrálního svazku během cytokineze díky interakci s KIF14 a dalšími proteiny (KIF23, KIF20A, KIF4) (115, 119). PRC1 je nepostradatelný pro správný průběh cytokinézy, což bylo ověřeno *in vitro* studiemi pomocí siRNA u klasické (119, 120) i monopolární cytokineze (121).

Zvýšená exprese PRC1 byla zatím prokázána u různých typů buněčných linií karcinomu prsu, ve srovnání s nízkou expresí u většiny normálních lidských tkání, kromě tkáně varlat a štítné žlázy (122).

#### ▪ CIT

CIT (citron kinase, citron Rho-interacting kinase, CRIK) je v savčích buňkách nezbytná pro oddělení buněk ve finální fázi apoptózy, při které lokalizuje RhoA do midbody interakcí s anillinem (114). Význam CIT v karcinogenezi a pro účinek chemoterapeutické léčby nebyl zatím významně studován.

## 2. CÍLE

Cílem práce bylo přispět k porozumění významu vybraných genetických faktorů pro prognózu a účinnost chemoterapie u pacientek s karcinomem prsu. V této práci jsme se soustředili především na geny buněčné smrti a fáze proliferace spojené s dělením mikrotubulů. Dále byl hodnocen význam alternativních sestřihových variant a jejich možný genetický základ.

- Stanovit význam kaspáz buněčné smrti pro prognózu a účinek chemoterapie pacientek s karcinomem prsu.
  - Ověřit hypotézu, že se změny v expresi kaspáz 2, 3, 7, 8, 9 a 10, a sestřihových variant 2L a S, 3A, B a S a 8L v nádorových tkáních karcinomu prsu podílí na progresivitě nádorů a/nebo na jejich citlivosti k léčbě chemoterapií.
  - Stanovit vliv genetické variability v regulačních oblastech genů *CASP2* a *CASP9* na expresi a alternativní sestřih těchto genů.
  - Ověřit prognostický význam kaspázy 2, 3, 8 a 9 u pacientek s karcinomem ovárií.
- Stanovit význam proteinů cytokineze pro prognózu a účinek chemoterapie pacientek s karcinomem prsu.
  - Ověřit hypotézu, že se změny v expresi KIF14, PRC1 a CIT v nádorových tkáních karcinomu prsu podílí na progresivitě nádorů a/nebo na jejich citlivosti k léčbě chemoterapií.
  - Ověřit prognostický význam KIF14, PRC1 a CIT u pacientek s karcinomem ovárií.

### 3. VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1. Seznam publikací

##### ▪ Článek 1

**Brynychova V**, Hlavac V, Ehrlichova M, Vaclavikova R, Pecha V, Trnkova M, Wald M, Mrhalova M, Kubackova M, Pikus T, Kodet R, Kovar J, Soucek P. Importance of transcript levels of caspase-2 isoforms S and L for breast carcinoma progression. *Future Oncol.* 2013;9(3):427-438.

**IF 2.129**

##### ▪ Článek 2

**Brynychova V**, Hlavac V, Ehrlichova M, Vaclavikova R, Nemcova-Furstova V, Pecha V, Trnkova M, Mrhalova M, Kodet R, Vrana D, Gatek J, Bendova M, Vernerova Z, Kovar J, Soucek P. Transcript expression and genetic variability analysis of caspases in breast carcinomas suggests CASP9 as the most interesting target. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(1):111-122.

**IF 3.017**

##### ▪ Článek 3

**Brynychova V**, Ehrlichova M, Hlavac V, Nemcova-Furstova V, Pecha V, Leva J, Trnkova M, Mrhalova M, Kodet R, Vrana D, Kovar J, Vaclavikova R, Gut I, Soucek P. Genetic and functional analyses do not explain the association of high PRC1 expression with poor survival of breast carcinoma patients. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:857-864.

**IF 2.326**

##### ▪ Článek 4

Ehrlichova M, Mohelnikova-Duchonova B, Hrdy J, **Brynychova V**, Mrhalova M, Kodet R, Rob L, Pluta M, Gut I, Soucek P. The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma. *Genomics* 2013;102(2):96-101.

**IF 2.386**

## 3.2. Článek 1 - Importance of transcript levels of caspase-2 isoforms S and L for breast carcinoma progression

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

### Importance of transcript levels of caspase-2 isoforms S and L for breast carcinoma progression

Veronika Brynychová<sup>1,2</sup>, Viktor Hlaváč<sup>1,2</sup>, Marie Ehrlichová<sup>1</sup>,  
Radka Václavíková<sup>1</sup>, Václav Pecháček<sup>3</sup>, Markéta Trnková<sup>4</sup>, Martin Wald<sup>5</sup>,  
Marcela Mrhalová<sup>6</sup>, Kateřina Kubíčková<sup>7</sup>, Tomáš Píkus<sup>7</sup>, Roman Kodet<sup>6</sup>,  
Jan Kovář<sup>8</sup> & Pavel Souček\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Toxicogenomics Unit, Department of Toxicology & Safety, National Institute of Public Health, Šrobárova 48, 100 42, Prague 10, Czech Republic

<sup>2</sup>Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague 10, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Oncosurgery, MEDICON, Prague 4, Czech Republic

<sup>4</sup>BIOLAB Praha, Ltd, Prague 6, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Surgery, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague & Motal University Hospital, Prague 5, Czech Republic

<sup>6</sup>Department of Pathology & Molecular Medicine, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague & Motal University Hospital, Prague 5, Czech Republic

<sup>7</sup>Department of Oncology & Radiotherapy, 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague & Motal University Hospital, Prague 5, Czech Republic

<sup>8</sup>Division of Cell & Molecular Biology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague 10, Czech Republic

\*Author for correspondence: Tel.: +420 2 6708 2711 ■ Fax: +420 2 6731 1236 ■ [psoucek@szu.cz](mailto:psoucek@szu.cz)

**Aim:** A role of caspase-2 in chemotherapy-induced apoptosis has been suggested. Our study aimed to evaluate the prognostic and predictive importance of caspase-2 isoforms in breast cancer patients. **Materials & methods:** Caspase-2L and -2S transcript levels were determined in paired tumor and non-malignant control tissues from 64 patients after neoadjuvant chemotherapy and 100 pretreatment patients (general set) by real-time PCR with absolute quantification. **Results:** Low but statistically significant upregulation of caspase-2L in tumor versus control tissues was observed in both sets. Significant associations of the levels of caspase-2L, -2S or S/L ratio with clinical prognostic factors were observed. However, none of these associations were confirmed in both sets. Levels of caspase-2 isoforms or the S/L ratio did not significantly associate with progression-free survival in the general set or with chemotherapy response in the neoadjuvant set. **Conclusion:** Our results suggest that the role of caspase-2 isoforms in the progression of breast cancer may considerably differ between pre- and post-chemotherapy patients.

Anthracyclines and taxanes are among the most frequently used drugs for treatment of hormonally nonresponsive breast carcinomas in the adjuvant (post-operative) or neoadjuvant (preoperative) setting. Taxanes inhibit tubulin depolymerization, causing arrest of cells in mitosis. Apoptosis and mitotic exit are two possible fates following mitotic arrest [1].

Researchers have intensively studied taxane effects in tumor cell models. Both classical (paclitaxel and docetaxel) and novel (Stony Brook) taxanes have been involved in the induction of apoptosis in these models [2–4]. Comparing resistant (NCI/ADR-RES) versus sensitive (MDA-MB-435) tumor cells, it has been shown that pathways of apoptosis induction by taxanes could differ in certain key events; for example, G<sub>2</sub>/M block, the release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspases [2,3]. A key role of caspase-2 [10] in apoptosis induced by taxanes has been suggested by the current

authors [4] and others [5,6]. Moreover, a high level of caspase-2 was associated with a lower survival probability in patients with acute lymphoblastic leukemia [7]. Caspases are cysteine-dependent aspartate-directed proteases that play an essential role in the execution phase of apoptosis. Caspase-2 (also known as ICH-1 or NEDD2) is a unique member of its family because it shares features with both initiator and effector caspases [8]. Caspase-2 is activated in response to various apoptotic stimuli and increasing lines of evidence indicate the nonapoptotic roles of caspases; for example, DNA repair and cell cycle regulation [8]. A tumor-suppressor function for caspase-2 has also been described [9,10].

Alternative splicing of caspase-2 transcript leads to two mRNA species encoding two proteins (i.e., a long isoform caspase-2L and a short isoform caspase-2S) that have antagonistic effects on apoptosis [11,12]. A 100-nucleotide sequence element, named In100, inside intron 9

Future Oncology  
Research Article

#### Keywords

■ breast cancer ■ caspase-2  
■ prognosis ■ transcript

Future  
Medicine  part of 



represses the inclusion of alternative exon 9 into the caspase-2L mRNA [13]. The inclusion of the 61 bp exon leads to caspase-2S mRNA with a premature stop codon in exon 10 due to the frameshift. This mechanism appears to be universal and generation of enzymatically active versus inactive isoforms by alternative splicing appears to provide an excellent mechanism for fine-tuning the level of active caspases at the post-transcriptional level [14].

The aim of our study was to: explore transcript levels of caspase-2L and -2S isoforms in tumor and non-malignant control tissues from breast cancer patients treated with anticancer drugs, evaluate associations of transcript levels of caspase-2L, -2S and the caspase-2L/-2S (S/L) ratio with clinical prognostic factors and elucidate the implication of caspase-2 transcripts in tumors for chemotherapy efficacy. Importance of genetic variability in the In100 regulatory element and adjacent exonic and intronic sequences for expression of caspase-2 transcripts *in vivo* was also addressed. To date none of these aspects have been studied in breast cancer patients.

## Material & methods

### Subjects

In total, 164 samples of mammary carcinomas and 81 paired adjacent non-malignant tissues (controls) without morphological signs of carcinoma were obtained from incident breast cancer patients. Cases were consecutively diagnosed in two hospitals in Prague during the periods between February 2003 and December 2007 (general set,  $n = 100$ ; Faculty Hospital in Motol [Prague, Czech Republic] – described in detail in [15]), and between July 2007 and March 2009 (neoadjuvant set,  $n = 64$ ; Medicon Hospital [Prague, Czech Republic] – described in detail in [16]). Blood samples from 83 patients under study were also collected. The processing of samples is described in the SUPPLEMENTARY MATERIAL (see online at [www.futuremedicine.com/doi/suppl/12.200](http://www.futuremedicine.com/doi/suppl/12.200)). All patients were asked to read and sign an informed consent form in accordance with the requirements of the Ethical Commission of the National Institute of Public Health in Prague.

### DNA isolation & mutation analysis

Blood samples were collected during the diagnostic procedures using tubes with K3EDTA anticoagulant. Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by the phenol/chloroform extraction method [16]. Presence of alterations in the caspase-2 region containing

exons 8–10, splicing regulatory element In100 and adjacent intronic sequences was determined by DNA sequencing (SEE SUPPLEMENTARY MATERIAL for detailed protocol).

### Total RNA & cDNA preparation

Tissue sections (10–20 pieces of 5  $\mu\text{m}$  sections) from the general set were directly transferred to 1 ml of Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, CA, USA). Frozen tissues ( $\sim 2 \times 2 \times 2$  mm blocks) from the neoadjuvant set were first homogenized by mechanical disruption using a Precellys instrument (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) at a speed of 6500 rpm for 15 s. Total RNA was isolated from all samples using Trizol reagent according to the procedure supplied by the manufacturer and stored in 20  $\mu\text{l}$  aliquots at  $-80^\circ\text{C}$ . No DNase I treatment of total RNA was performed. Quant-iT RiboGreen RNA Quantitation Assay Kit (Invitrogen) was used to determine the total RNA concentration of the samples in duplicate. The RNA quality was assessed by measuring the RNA Integrity Number (RIN) using Agilent 2100 Bioanalyzer and Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit by Agilent Technologies, Inc. (CA, USA). The RIN value was in range (2.3–8.9) and 6.5 on average. More than 95% of all samples had a RIN over 3. cDNA was synthesized using 0.5  $\mu\text{g}$  of total RNA using random hexamer primers with the help of RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). The quality of cDNA, in terms of DNA contamination, was then confirmed by PCR amplification of ubiquitin C fragment discriminating between the product from cDNA (190 bp) and genomic DNA (1009 bp) as described [17]. All cDNA samples that were free of DNA contamination were further analyzed.

### Construction of standards for absolute quantification

Bacterial plasmids containing the respective target sequences for TaqMan Assays of caspase-2L, caspase-2S and *MRPL19* reference gene were used as standards for absolute quantification of gene expressions by real-time PCR. For this purpose, PCR fragments were prepared with the following primers: caspase-2S (see the primers for real-time PCR), caspase-2L (forward: 5'-AGCTCTTTGACAACGCCAA-3' and reverse: 5'-CAGGAACCTCGTTTGGT-GTT-3') and *MRPL19* (forward: 5'-GTGAGC-TAGCTGGCATGG-3' and reverse: 5'-TTC-GACGCTTCAATTTCCCTT-3', all from Sigma-Aldrich, MI, USA), and were subcloned

into the vector pDONR201 using gateway cloning technology, as previously described [15]. Plasmids were serially diluted in nuclease-free water (from  $10^6$  to  $10^2$  copies per reaction) for construction of the calibration curve.

#### Quantification of transcript levels by real-time PCR

TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies, CA, USA) were used for detection of transcript levels of caspase-2L isoform (Hs00895082\_m1) and reference gene *MRPL19* (Hs00608519\_m1). *MRPL19* for normalization of *CASP2L* and *S* levels was chosen based on its highest stability among 11 genes evaluated by quantitative PCR in benign and malignant primary breast cancer tissues [18]. For the detection of caspase-2S transcript a specific assay was designed. Primers and a probe were designed using Primer3 software [102] and checked for specificity by BLAST [103]. Primers or probes for quantitative PCR spanned exon-exon boundaries to avoid amplification of genomic DNA. The sequences of primers and the probe for caspase-2S transcript assessment (165 bp amplicon length) were forward: 5'-CCGTGGAGGTGCTATTGG-3', reverse: 5'-TCGCAACTTTTCTTTACCG-3' and probe: 5'-FAM-GTTCACCTGCTGCCACCGCCT-NQF-3' (Life Technologies). Specificity of caspase-2L and -2S assays was tested by real-time PCR quantification in cross reactions containing serially diluted plasmid standards. Both assays were specific above 50 copies per reaction and, thus, the limit of quantification was set to 100. Real-time PCR quantification was carried out on ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies) in a 5 µl reaction mixture containing 1 × TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies) and 1 × TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies) or 500 nM each of primers and probe (caspase-2S) and 2 µl of diluted cDNA. Cycling parameters were initial hold at 50°C for 2 min and initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 60 s. The nontemplate control contained water instead of cDNA. Negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were also employed to reveal possible carry-over contamination. Samples with variation between duplicates larger than 0.5 Cq were reanalyzed. The efficiencies of all three assays were between 90 and 100% and calibration curves had  $R^2 > 0.998$ . The quantitative

real-time PCR study design adhered to the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines [19].

#### Statistical analyses

For statistical analyses, ratios of absolute levels of caspase-2L/*MRPL19*, caspase-2S/*MRPL19* and the caspase-2S/L ratio were calculated. To determine the differences in mRNA expression between tumor and control tissues the nonparametric paired Wilcoxon signed rank test was used. Associations of transcript levels with clinical data were analyzed by nonparametric tests (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and Spearman's rank). The tested clinical data were as follows: age in years; menopausal status (pre- vs post- or peri-menopausal); stage (I or II vs III); tumor size (pT1-2 vs pT3-4); lymph node metastasis (pN0 vs pN1-3); histological type (ductal vs other); grade (G1 vs G2 vs G3); expression of estrogen and progesterone receptors, HER2, Ki-67 and p53 (negative vs positive); and response to the therapy (complete or partial response vs stable disease or progression). Progression-free survival (PFS) was defined as the time elapsed between surgical treatment and disease progression or death from any cause. Kaplan-Meier survival plots with the Log rank test were used for testing PFS as previously published [15]. p-values are departures from two-sided tests. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS v15.0 software (SPSS Inc., IL, USA).

## Results

### Patient characteristics

Comparison of clinical characteristics of both studied sets is presented in TABLE 1. The neoadjuvant set was composed of patients with a younger age at diagnosis, prevalence of premenopausal status, larger and poorly differentiated (high-grade) tumors and a higher number of patients with lymph nodes affected by metastasis in comparison with the general set. Generally, the neoadjuvant set was composed of patients with considerably more aggressive disease and, thus, worse prognosis than the general set.

### Expression levels of caspase-2 isoforms in breast carcinoma

A significant upregulation of caspase-2L in tumors versus control tissues was observed in paired samples of the general set ( $p < 0.001$ ;  $n = 43$ ; TABLE 2). However, no significant differences

**Table 1. Clinical characteristics of patients involved in the study.**

Characteristics	General set; n (%)	Neoadjuvant set; n (%)
<b>Age at diagnosis</b>		
Mean age ± standard deviation (years)	61.4 ± 10.6	50.9 ± 10.7
<b>Menopausal status</b>		
Premenopausal	10 (10.0)	30 (46.9)
Post-menopausal	90 (90.0)	34 (53.1)
<b>Family anamnesis</b>		
Positive	15 (15.2)	13 (22.4)
Negative	84 (84.8)	45 (77.6)
Not available	1	6
<b>Stage</b>		
I	36 (37.4)	22 (36.0)
II	41 (42.8)	32 (52.5)
III	18 (18.8)	7 (11.5)
IV	1 (1.0)	0
Not available	4	3
<b>Tumor size</b>		
Mean size ± standard deviation (mm)	19.5 ± 11.2	23.4 ± 14.8
<b>Nodal status</b>		
Positive (N1–3)	42 (43.8)	27 (42.2)
Negative (N0)	54 (56.2)	37 (57.8)
Not evaluated	4	0
<b>Histological type</b>		
Invasive duct carcinoma	83 (83.0)	54 (84.4)
Other type <sup>†</sup>	17 (17.0)	10 (15.6)
<b>Histological grade</b>		
1	17 (17.5)	6 (9.5)
2	60 (61.9)	28 (44.4)
3	20 (20.6)	29 (46.0)
Not available	3	1
<b>Estrogen receptor status</b>		
Positive	68 (68.0)	43 (67.2)
Negative	32 (32.0)	21 (32.8)
<b>Progesterone receptor status</b>		
Positive	59 (59.0)	44 (68.8)
Negative	41 (41.0)	20 (31.2)
<b>HER2 status</b>		
Positive	28 (28.0)	16 (25.4)
Negative	72 (72.0)	47 (74.6)
Not available	0	1
<b>p53 expression status</b>		
Positive	30 (31.3)	Not evaluated

<sup>†</sup>Other tumor types (number in general/neoadjuvant set) involved invasive lobular (9/6), mucinous (3/1), ductal in situ (1/0), medullary (1/0), comedo (1/0), papillary (1/0), metaplastic (0/2) and solid neuroendocrine (1/1) carcinomas.

Table 1. Clinical characteristics of patients involved in the study (cont.).

Characteristics	General set; n (%)	Neoadjuvant set; n (%)
<b>p53 expression status (cont.)</b>		
Negative	66 (68.7)	Not evaluated
Not available	4	Not evaluated
<b>Ki-67 expression status</b>		
Mean ± standard deviation	Not evaluated	33.4 ± 23.6
<b>Response to neoadjuvant chemotherapy</b>		
Complete or partial response	Not applicable	38 (61.3)
Stable disease or progression	Not applicable	24 (38.7)
Not available	Not applicable	2

<sup>†</sup>Other tumor types (number in general/neoadjuvant set) involved invasive lobular (9/6), mucinous (3/1), ductal in situ (1/0), medullary (1/0), comedo (1/0), papillary (1/0), metaplastic (0/2) and solid neuroendocrine (1/1) carcinomas.

were found for caspase-2S isoform and the S/L ratio. A weak but significant upregulation of caspase-2L in the tumor compared with the control tissue was also observed in the neoadjuvant set ( $p = 0.039$ ;  $n = 38$ ). The absolute level of caspase-2S and the S/L ratio did not significantly differ between the tumor and control tissue in the neoadjuvant set. The ratios of caspase-2S/L isoforms in tumor and paired control tissues of both studied sets are presented in FIGURE 1. Relative expression levels of *CASP2L* and *S* in tumors from the neoadjuvant set did not correlate with RIN ( $p > 0.05$ ,  $R^2 = 0.049$  for *CASP2L* and  $R^2 = 0.034$  for *CASP2S*, respectively) suggesting that RNA quality did not significantly influence the observed results.

#### Associations of transcript levels of caspase-2 isoforms with clinical data

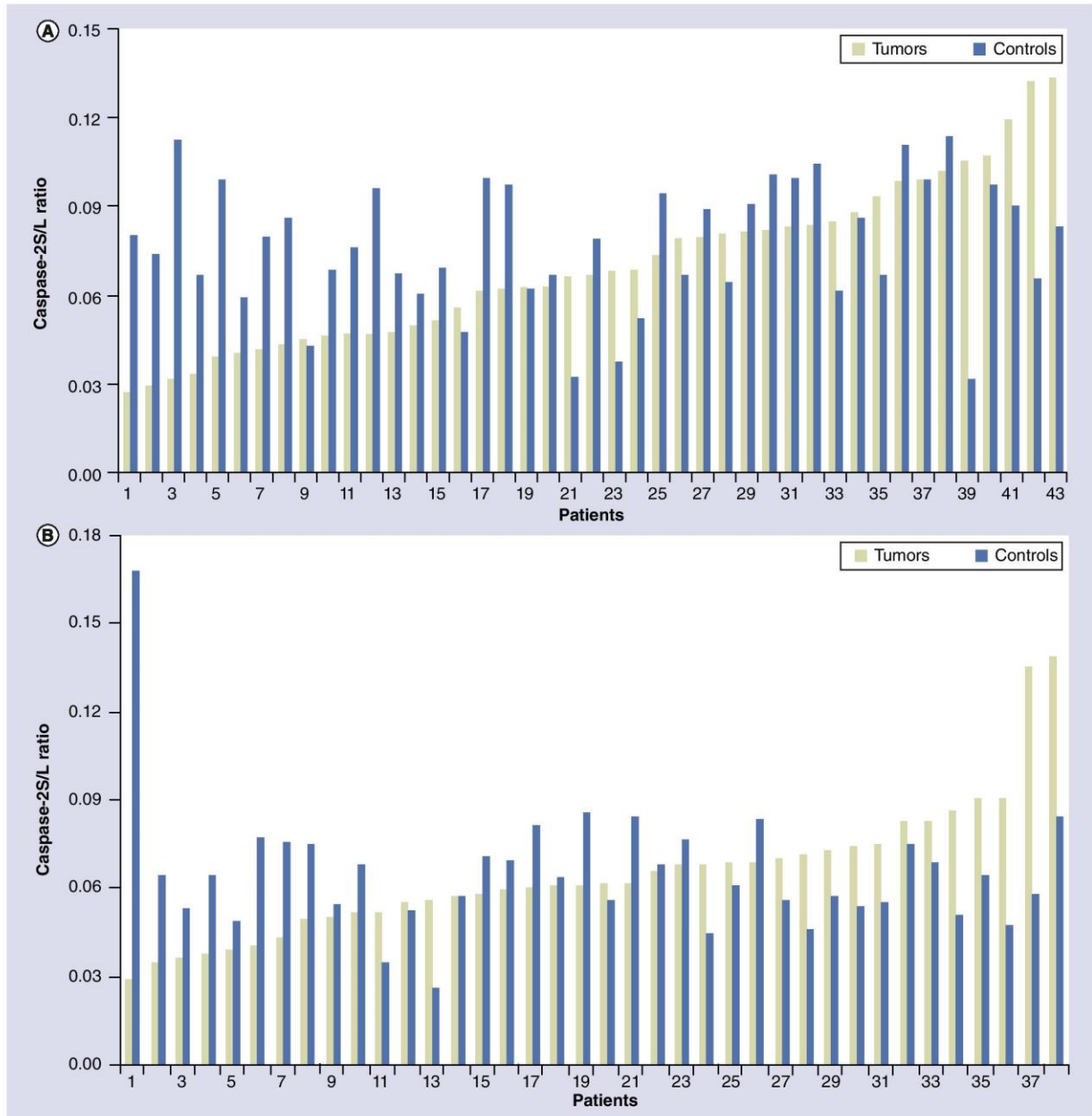
Absolute transcript levels of caspase-2L, -2S and S/L ratio in tumor samples were compared with clinical data on patients in both sets separately. A number of associations of both caspase-2L and -2S levels or their ratio with clinical data were

observed in both sets of patients. Significant associations observed in at least one set of patients are presented in TABLE 3–5. For example, transcript level of caspase-2L was significantly higher in patients from the general set with less advanced tumors (stages I or II) compared with stage III tumors (TABLE 3–5). On the other hand, patients from the neoadjuvant set with lymph nodes affected by metastasis or without expression of estrogen receptors in their tumors had a significantly higher caspase-2L level than node- or receptor-negative patients (TABLE 3–5). Nevertheless, none of these associations found in the general set were observed in the neoadjuvant set and *vice versa* (TABLE 3–5). Moreover, patients with a high immunohistochemical protein level of p53 (50% cutoff) had significantly higher caspase-2L levels than patients with a low p53 level in the general set. However, this association could not be evaluated in the neoadjuvant set due to the lack of data on p53 expression. The mean PFS of the general set was 57.1 months. As expected, the established prognostic factors significantly modified the

Table 2. Differences in the absolute transcript levels of caspase-2L and -2S isoforms between tumor and control tissues from breast carcinoma patients.

Tissue type	Caspase-2L/MRPL19 (mean ± standard deviation)	p-value <sup>†</sup>	Caspase-2S/MRPL19 (mean ± standard deviation <sup>‡</sup> )	p-value <sup>†</sup>
<b>General set</b>				
Tumors	0.53 ± 0.20	<0.001	3.88 ± 2.80	0.209
Controls	0.41 ± 0.14		3.18 ± 1.42	
<b>Neoadjuvant set</b>				
Tumors	1.00 ± 0.38	0.039	6.50 ± 3.32	0.072
Controls	0.86 ± 0.28		5.49 ± 2.24	

<sup>†</sup>p-value by two-sided Wilcoxon signed rank test.  
<sup>‡</sup>Transcript levels of caspase-2S were multiplied 100-times to demonstrate variation.



**Figure 1. Caspase-2S/L ratios in tumor and paired control samples from both studied sets.** The (A) general (n = 43) and (B) neoadjuvant (n = 38) sets of patients.

PFS of patients in the general set. Significantly worse PFS (regardless of the type of therapy) was observed in patients with tumors larger than T2 versus T1 or T2 ( $p = 0.025$ ), stage III versus I or II ( $p = 0.040$ ) and negative versus positive expression of progesterone ( $p = 0.043$ ) and estrogen ( $p = 0.037$ ) receptors. Menopausal status, tumor type, grade, lymph node metastasis and immunohistochemical expression of HER2

or p53 had no effect on PFS. Transcript levels of caspase-2L or -2S isoforms, or their ratio in tumor tissues of patients in the general set did not significantly modify PFS either in the whole group ( $n = 88$ ;  $p = 0.673$ ,  $0.955$  and  $0.348$ , respectively) or in the subgroup of patients treated by chemotherapy ( $n = 45$ ;  $p = 0.912$ ,  $0.749$  and  $0.719$ , respectively). Kaplan–Meier survival plots for *CASP2L*, *2S* and *S/L* for the

whole group are shown in FIGURE 2. Transcript levels of caspase-2 isoforms, or the S/L ratio in tumor tissues did not significantly modify the response of the tumor to neoadjuvant chemotherapy in the neoadjuvant set ( $p = 0.598$ ,  $0.919$  and  $0.795$ , respectively).

#### Genetic variability of caspase-2 & transcript levels of isoforms

By sequencing caspase-2 regions containing exon 8, alternative exon 9, intronic splicing regulatory element In100, adjacent intronic sequences and exon 10, eight heterozygous carriers of the rs4647321 polymorphism (three in the general set and five in the neoadjuvant set) were identified. No other genetic alterations in blood DNA samples of patients from both sets were found. The observed minor allele frequency for rs4647321 (minor allele frequency:  $0.048$ ;  $n = 83$ ) agreed with the published HapMap Utah residents (Center for the Study of Human Polymorphisms) with northern and western European ancestry sample (minor allele frequency:  $0.031$ ,  $n = 226$  [104]; B36 assembly). The presence of the rs4647321 polymorphism did not significantly modify absolute transcript levels of caspase-2L, -2S or S/L ratio.

#### Discussion

Poor response to chemotherapy is quite a common phenomenon in anticancer therapy. Numerous reasons are discussed in the literature but molecular markers that would predict the response are generally lacking. Previous *in vitro* studies suggested that caspase-2 may play a key role in apoptosis induced by anticancer drugs [4–6]. However, the majority of current knowledge was obtained using cell and animal models, and there is a limited amount of information about the importance of caspase-2 expression for the prognosis of individual patients and prediction of the chemotherapy efficacy. This study, therefore, aimed at characterization of the role of pro- and antiapoptotic caspase-2L and -2S transcript levels in breast cancer prognosis and therapy outcome.

The general set was composed of samples of tumors and control tissues from unselected breast cancer patients collected prior to any chemotherapy. This set served for exploring the effect of expression of caspase-2 isoforms on prognosis of patients. Additionally, the neoadjuvant set contained patients who underwent neoadjuvant chemotherapy by serial 5-fluorouracil, anthracycline and cyclophosphamide/5-fluorouracil,

**Table 3. Significant associations of transcript levels of caspase-2L/MRPL19 in tumors with clinical data of breast carcinoma patients.**

Characteristics	General set			Neoadjuvant set		
	Transcript level (mean $\pm$ standard deviation)	n	p-value <sup>t</sup>	Transcript level (mean $\pm$ standard deviation)	n	p-value <sup>t</sup>
<b>Age at diagnosis</b>						
Age	–	100 <sup>†</sup>	0.004 <sup>§</sup> R <sup>2</sup> = -0.284	–	64 <sup>†</sup>	0.192 <sup>§</sup> R <sup>2</sup> = -0.165
<b>Stage</b>						
I or II	0.53 $\pm$ 0.15	77	0.025	0.96 $\pm$ 0.35	54	0.526
III	0.47 $\pm$ 0.25	19		0.84 $\pm$ 0.03	7	
<b>Lymph node metastasis</b>						
Positive	0.51 $\pm$ 0.22	42	0.634	1.05 $\pm$ 0.40	27	0.029
Negative	0.52 $\pm$ 0.13	54		0.87 $\pm$ 0.26	37	
<b>Estrogen receptor expression</b>						
Positive	0.50 $\pm$ 0.15	68	0.069	0.88 $\pm$ 0.30	43	0.037
Negative	0.59 $\pm$ 0.22	32		1.08 $\pm$ 0.37	21	
<b>p53 expression</b>						
Positive	0.59 $\pm$ 0.19	30	0.030	Not evaluated		
Negative	0.50 $\pm$ 0.17	66		Not evaluated		

Only associations significant in either the general or neoadjuvant set of patients are included. Nonsignificant associations with tumor size, histological type and grade, and expression of Ki-67 are not shown.

<sup>t</sup>p-value by two-sided independent Kruskal–Wallis test.

<sup>†</sup>Number of patients for whom results of correlation between age and expression levels were available.

<sup>§</sup>p-value by Spearman rank correlation.

Table 4. Significant associations of transcript levels of caspase-2S/MRPL19 × 10<sup>2</sup> in tumors with clinical data of breast carcinoma patients.

Characteristics	General set			Neoadjuvant set		
	Transcript level (mean ± standard deviation)	n	p-value <sup>t</sup>	Transcript level (mean ± standard deviation)	n	p-value <sup>t</sup>
<b>Age at diagnosis</b>						
Age	–	100 <sup>‡</sup>	0.013 <sup>§</sup> R <sup>2</sup> = -0.248	–	64 <sup>‡</sup>	0.072 <sup>§</sup> R <sup>2</sup> = -0.226
<b>Menopause status</b>						
Premenopausal	5.31 ± 4.28	10	0.030	6.62 ± 3.62	30	0.223
Postmenopausal	3.39 ± 1.89	90		5.78 ± 3.19	34	
<b>Lymph node metastasis</b>						
Positive	3.56 ± 2.88	42	0.396	7.58 ± 4.01	27	0.012
Negative	3.50 ± 1.61	54		5.14 ± 2.46	37	
<b>Progesterone receptor expression</b>						
Positive	3.77 ± 2.42	59	0.174	5.81 ± 3.53	44	0.049
Negative	3.30 ± 2.07	41		6.97 ± 3.03	20	
<b>HER2/neu status</b>						
Positive	3.15 ± 3.03	28	0.019	5.35 ± 3.58	16	0.134
Negative	3.75 ± 1.92	72		6.49 ± 3.35	47	

*Only associations significant in either the general or neoadjuvant set of patients are included. Nonsignificant associations with tumor size, histological type and grade, and expression of Ki-67 are not shown.*  
<sup>t</sup>p-value by two-sided independent Kruskal–Wallis test.  
<sup>‡</sup>Number of patients for whom results of correlation between age and expression levels were available.  
<sup>§</sup>p-value by Spearman rank correlation.

epirubicin and cyclophosphamide, and taxane (paclitaxel or docetaxel) regimen, and tumor and control tissues were collected after chemotherapy. The cytofluorimetric and molecular analyses after exposure of DU145 and taxane-resistant DU145-R prostate cancer cells to doxorubicin showed a significant increase in the expression of caspase-2 and -8, CD3 and CD95, before mitochondrial membrane depolarization and caspase-3 activation in both cell lines [20]. In concert with the *in vitro* data discussed above, we aimed to explore the relevance of caspase-2L and -2S isoforms for response to both anthracyclines and taxanes *in vivo* in the neoadjuvant set.

Recently, the proposed tumor suppressor function of caspase-2 was strongly supported [9]. Caspase-2 suppressed lymphomagenesis in response to aberrant c-Myc expression in transgenic mice. Moreover, the accelerated lymphoma onset in caspase-2-lacking mice was associated with reduced rates of p53 loss and increased extranodal dissemination of lymphoma cells, suggesting a role of caspase-2 in cell migration and anoikis [10]. Caspase-2 deficiency also promoted aberrant response to DNA damage and genetic instability in mouse embryonic fibroblasts *in vitro* [21]. Moreover, involvement

of caspase-2 in cell cycle checkpoint control, a function clearly linked to cancer development, has also been suggested [22]. However, we only observed a small, although significant, upregulation of caspase-2L transcript in tumor versus control tissue in both sets in our study. Thus, specifically in human breast carcinoma, we cannot confirm the above-suggested tumor suppressor role of caspase-2. Tumor-specific action of caspase-2 in carcinogenesis cannot be ruled out and may present future research directions.

Interestingly, treatment of the human leukemic cell line U937 by various apoptotic stimuli, including paclitaxel, increased the ratio of caspase-2S/L in a time-dependent manner [23]. In addition, topoisomerase I and II inhibitors, such as camptothecin, etoposide or anthracyclines, seemed to drive inclusion of exon 9 to caspase-2S transcript and decrease caspase-2L mRNA and protein [24]. However, *in vivo* studies dealing with expression patterns of both isoforms, especially in breast tumor tissues, were missing until now. In our study, the ratio of caspase-2S/L levels did not significantly differ between tumor and control tissues of both sets. Therefore, it seems that neoadjuvant treatment by taxane- or doxorubicin-based chemotherapy

does not influence the caspase-2S/L ratio *in vivo*.

Caspase-2S was suggested as a candidate for nonsense-mediated decay and low expression of caspase-2S mRNA in comparison with the L isoform was reported *in vitro* [25]. In our experiments, the observed caspase-2L transcript level was six- to 40-times higher than the level of caspase-2S. Despite this fact, the caspase-2S transcript level was unambiguously detected in all studied samples. Caspase-2S mRNA was previously detected in all tumor and non-neoplastic control tissue samples from patients with renal cell carcinoma (n = 36) [26]. Thus, we show that caspase-2S is also expressed in breast carcinomas. Analysis of protein levels by specific antibodies to both L and S isoforms may shed more light on the discrepancy between existing *in vitro* and *in vivo* data. However, the caspase-2S protein product has yet to be conclusively detected. A minor band corresponding in size to the predicted caspase-2S protein sporadically detected by immunoblotting using anticaspase-2 may have been partially processed caspase-2L, which is expected to migrate similarly [27]. Moreover, due to the lack of commercially available antibodies specifically recognizing caspase-2S from -2L it is currently impossible to verify these results on the protein level.

By comparison of the associations of clinical data with caspase-2L, -2S and S/L observed in tumors of general and neoadjuvant sets we did not find any common effect on the prognosis of patients. A significantly higher level of proapoptotic caspase-2L was found in tumors from

patients with less advanced disease (stage I or II; i.e., in patients with better prognosis compared with stage III patients in the general set). On the contrary, a significantly higher level of caspase-2L in lymph node-positive versus negative and estrogen receptor-negative versus positive status (i.e., with worse prognosis factors) was found in the neoadjuvant set. High levels of the antiapoptotic caspase-2S were associated with the presence of lymph node metastasis and negative status of the progesterone receptor in the neoadjuvant set. However, no such associations were found in the general set. A significantly higher caspase-2S/L ratio was found in patients with versus without lymph node metastasis in the neoadjuvant set and with positive versus negative progesterone receptor status (p = 0.002) and negative versus positive HER-2/neu status (p = 0.004) in the general set. Most interestingly, levels of caspase-2 isoforms or their ratio did not significantly associate with PFS in the general set or with the response to chemotherapy in the neoadjuvant set. Taken together our results suggest that the role of caspase-2 isoforms in prognosis of breast cancer patients may differ considerably between pre- and post-treatment patients.

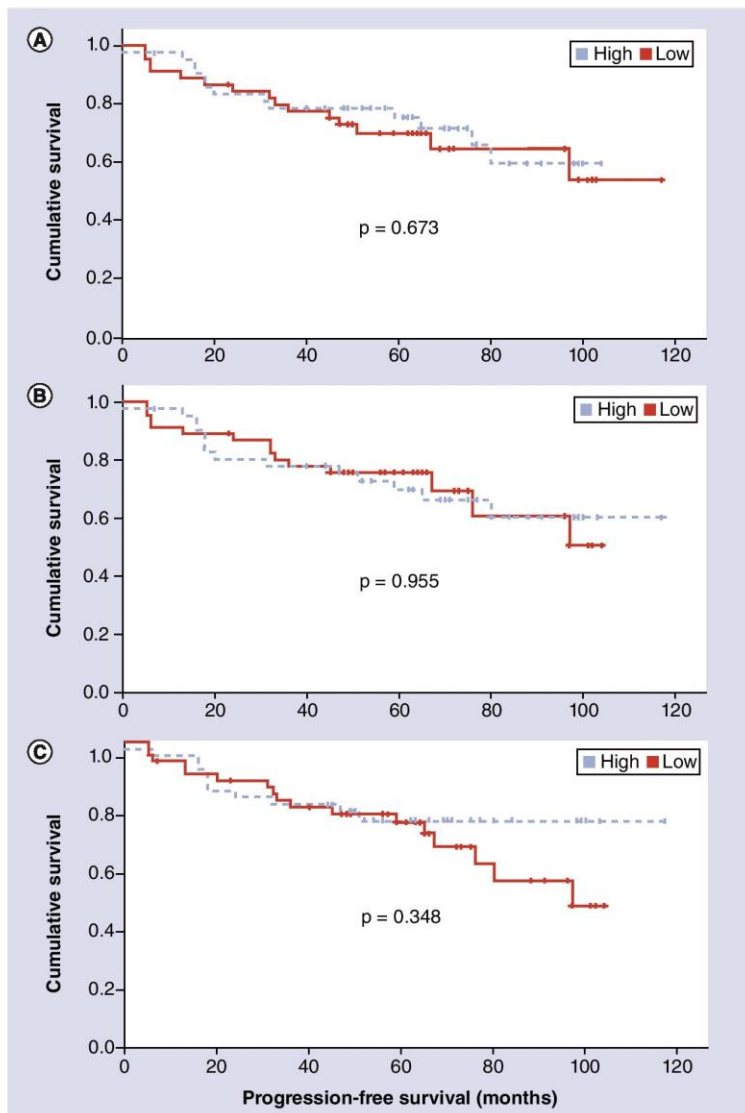
Small numbers of patients in the compared groups may be seen as a major limitation of our study and, therefore, results should be interpreted with caution. Associations between caspase-2 isoforms and clinical prognosis factors of breast cancer patients have not been reported this far and so comparison with data of other authors is impossible. A larger study has to be performed to discern the functional consequences of

Table 5. Significant associations of transcript levels of caspase-2S/L ratio  $\times 10^2$  in tumors with clinical data of breast carcinoma patients.

Characteristics	General set			Neoadjuvant set		
	Transcript level (mean $\pm$ standard deviation)	n	p-value <sup>†</sup>	Transcript level (mean $\pm$ standard deviation)	n	p-value <sup>†</sup>
<b>Lymph node metastasis</b>						
Positive	6.56 $\pm$ 2.96	42	0.590	7.19 $\pm$ 2.78	27	0.029
Negative	6.75 $\pm$ 2.58	54		5.79 $\pm$ 2.16	37	
<b>Progesterone receptor expression</b>						
Positive	7.29 $\pm$ 2.72	59	0.002	6.30 $\pm$ 2.80	44	0.202
Negative	5.74 $\pm$ 2.59	41		6.56 $\pm$ 1.81	20	
<b>HER2/neu status</b>						
Positive	5.54 $\pm$ 2.52	28	0.004	5.60 $\pm$ 1.92	16	0.249
Negative	7.09 $\pm$ 2.75	72		6.67 $\pm$ 2.68	47	

Only associations significant in either the general or neoadjuvant set of patients are included. Nonsignificant associations with tumor size, histological type and grade, and expression of Ki-67 are not shown.  
<sup>†</sup>p-value by two-sided independent Kruskal–Wallis test.





**Figure 2.** Kaplan–Meier survival plots for progression-free survival divided by high and low caspase-2L, -2S and S/L expression levels in breast cancer patients. (A) Caspase-2L, (B) -2S and (C) S/L levels in tumors of patients from the general set (n = 88) were divided into two categories according to expression levels based on percentiles (high: dotted line; vs low: solid line). Significance of the differences between survival curves was evaluated by the Log rank test.

differences between both sets of patients found here. The lack of both functional data and confirmation of gene expression results by protein analysis also present a notable limitation of our study. Immunoblotting data previously showed a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in the expression of caspase-2L, -6, -8, -9 and -3 in breast tumor tissues of different histological grades compared with adjacent uninvolved tissues (n = 10) [28]. These results on a limited sample size seem to

contradict our data on caspase-2L transcript level. Thus, a detailed study comparing caspase-2L protein and transcript levels is needed in order to assess the mechanism of regulation of expression and the potential tumor suppressor role of caspase-2L in breast carcinoma.

A growing list of studies using different reagents and cell types indicates a clear role for caspase-2 in stress-mediated and p53-dependent apoptosis [29]. We have observed a significantly higher caspase-2L transcript level in tumors with high p53 expression compared with tumors expressing low p53 levels in the general set. Thus, we may have seen a first example of such association in human tumor specimens.

Introduced mutations of the *CASP2* U/C-rich element upstream of In100 were demonstrated to change the caspase-2S/L transcript ratio [30]. We explored genetic variation of the In100 and its proximity by sequencing DNA from the blood of patients in order to discern eventual impact on caspase-2 alternative splicing. From our results it seems that genetic variability in the In100 region and its proximity does not influence the transcript levels of caspase-2L, -2S and S/L in the followed patients.

### Conclusion

Our study established methods for unambiguous screening of expression of caspase-2 isoforms by absolute quantification. Striking differences in the association of caspase-2 isoforms with clinical prognostic factors between pre- and post-treatment breast carcinoma patients were observed and should be confirmed by follow-up studies. The lack of association with chemotherapy outcome suggests that the previously reported role of caspase-2 isoforms in anticancer drug-induced apoptosis may not be relevant *in vivo*.

### Future perspective

Results of this study do not support the hypothesis that caspase-2 isoforms can be used as universal prognostic or predictive biomarker in breast carcinoma patients. We can not exclude a different prognostic or predictive importance of caspase-2 isoforms in pre- versus post-treatment patients. Thus, a larger follow-up study would be highly valuable in resolving this matter. Differences between transcript and protein levels may exist. Due to the lack of commercially available antibodies specifically recognizing caspase-2S from L we could not address this point. It is, therefore, desirable to produce anti-peptide antibodies against the C-terminus of caspase-2S and to verify our results by protein staining in tumor specimens.

## Executive summary

## Study objectives

- A key role of caspase-2 in apoptosis induced by anticancer drugs was suggested *in vitro*.
- This study examined transcript levels of caspase-2L and -2S isoforms in breast carcinoma patients and evaluated their prognostic and predictive significance.

## Methodical approach

- Specific method for absolute quantification of both isoforms was established.

## Major observations

- Genetic variability of the In100 element and its proximity in blood DNA did not modify levels of caspase-2 isoforms.
- Caspase-2L levels were slightly but significantly higher in tumor versus control tissue in pre- and post-treatment patients, whereas caspase-2S levels did not differ.
- No clear pattern of associations of caspase-2L, -2S or their ratio with clinical prognostic factors was observed in both sets of patients.
- Caspase-2 isoforms or their ratio did not significantly associate with progression-free survival in the pretreatment patients or with chemotherapy response in the post-treatment patients.

## Financial &amp; competing interests disclosure

This work was supported by grants from the Czech Science Foundation (no. 301/09/0362) to J Kovář and M Ehrlichová, by the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (no.: 13679-4) to P Souček, V Pecha and M Trnková, and by the research project of the Charles University in Prague (PRVOUK P27) to J Kovář. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

## Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

## References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
  - of considerable interest
1. Matson DR, Stukenberg PT. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol. Interv.* 11, 141–150 (2011).
  - **Review of pathways that are triggered by spindle poisons including taxanes.**

2. Ehrlichova M, Koc M, Truksa J, Naldova Z, Vaclavikova R, Kovar J. Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells. *Anticancer Res.* 25, 4215–4224 (2005).
3. Kovar J, Ehrlichova M, Smejkalova B, Zanardi I, Ojima I, Gut I. Comparison of cell death-inducing effect of novel taxane SB-T-1216 and paclitaxel in breast cancer cells. *Anticancer Res.* 29, 2951–2960 (2009).
4. Voborilova J, Nemcova-Furstova V, Neubauerova J *et al.* Cell death induced by novel fluorinated taxanes in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells. *Invest. New Drugs* 29, 411–423 (2011).
5. Wang YF, Chen CY, Chung SF, Chiou YH, Lo HR. Involvement of oxidative stress and caspase activation in paclitaxel-induced apoptosis of primary effusion lymphoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54, 322–330 (2004).
6. Ho LH, Read SH, Dorstyn L, Lambrusco L, Kumar S. Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption. *Oncogene* 27, 3393–3404 (2008).
7. Faderl S, Thall PF, Kantarjian HM *et al.* Caspase 2 and caspase 3 as predictors of complete remission and survival in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 5, 4041–4047 (1999).
8. Vakifahmetoglu-Norberg H, Zhivotovsky B. The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends Cell Biol.* 20, 150–159 (2010).
- **Comprehensive review of various caspase-2 functions and underlying regulatory mechanisms.**
9. Ho LH, Taylor R, Dorstyn L, Cakouros D, Bouillet P, Kumar S. A tumor suppressor function for caspase-2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 106, 5336–5341 (2009).
- **Experimental work indicating a tumor suppressor role of caspase-2.**
10. Manzl C, Peintner L, Krumschnabel G *et al.* PIDDosome-independent tumor suppression by caspase-2. *Cell Death Differ.* 19, 1722–1732 (2012).
11. Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan J. *Ich-1*, an *Ice/ced-3*-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell* 78, 739–750 (1994).
- **First report about isolation and characterization of caspase-2.**
12. Droin N, Beauchemin M, Solary E, Bertrand R. Identification of a caspase-2 isoform that behaves as an endogenous inhibitor of the caspase cascade. *Cancer Res.* 60, 7039–7047 (2000).
- **Discovery of alternative splicing of caspase-2.**
13. Cote J, Dupuis S, Wu JY. Polypyrimidine track-binding protein binding downstream of caspase-2 alternative exon 9 represses its inclusion. *J. Biol. Chem.* 276, 8535–8543 (2001).
14. Havlioglu N, Wang J, Fushimi K *et al.* An intronic signal for alternative splicing in the human genome. *PLoS One* 2, e1246 (2007).
15. Hubackova M, Vaclavikova R, Ehrlichova M *et al.* Association of superoxide dismutases and NAD(P)H oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 130, 338–348 (2012).
16. Vaclavikova R, Ehrlichova M, Hlavata I *et al.* Detection of frequent ABCB1 polymorphisms by high-resolution melting curve analysis and their effect on breast carcinoma prognosis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 50, 1999–2007 (2012).
17. Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M. Expression of cytochrome P450 genes in CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 23, 1417–1422 (2005).

18. McNeill RE, Miller N, Kerin MJ. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. *BMC Mol. Biol.* 8, 107 (2007).
19. Bustin SA, Benes V, Garson JA *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622 (2009).
20. Fabbri F, Zoli W, Carloni S *et al.* Activity of different anthracycline formulations in hormone-refractory prostate cancer cell lines: role of golgi apparatus. *J. Cell. Physiol.* 226, 3035–3042 (2011).
21. Dorstyn L, Puccini J, Wilson CH *et al.* Caspase-2 deficiency promotes aberrant DNA-damage response and genetic instability. *Cell Death Differ.* 19, 1288–1298 (2012).
- **Recent findings suggesting a key role of caspase-2 in maintaining genomic integrity.**
22. Ren K, Lu J, Porollo A, Du C. Tumor-suppressing function of caspase-2 requires catalytic site Cys-320 and site Ser-139 in mice. *J. Biol. Chem.* 287, 14792–14802 (2012).
23. Iwanaga N, Kamachi M, Aratake K *et al.* Regulation of alternative splicing of caspase-2 through an intracellular signaling pathway in response to pro-apoptotic stimuli. *J. Lab. Clin. Med.* 145, 105–110 (2005).
24. Solier S, Lansiaux A, Logette E *et al.* Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Mol. Cancer Res.* 2, 53–61 (2004).
25. Solier S, Logette E, Desoche L, Solary E, Corcos L. Nonsense-mediated mRNA decay among human caspases: the caspase-2S putative protein is encoded by an extremely short-lived mRNA. *Cell Death Differ.* 12, 687–689 (2005).
26. Heikaus S, Pejin I, Gabbert HE, Ramp U, Mahotka C. PIDDosome expression and the role of caspase-2 activation for chemotherapy-induced apoptosis in RCCs. *Cell. Oncol.* 32, 29–42 (2010).
27. Kitevska T, Spencer DM, Hawkins CJ. Caspase-2: controversial killer or checkpoint controller? *Apoptosis* 14, 829–848 (2009).
- **Critical review of the current state of knowledge about the biochemistry and biology of caspase-2.**
28. Vinothini G, Murugan RS, Nagini S. Mitochondria-mediated apoptosis in patients with adenocarcinoma of the breast: correlation with histological grade and menopausal status. *Breast* 20, 86–92 (2011).
29. Kumar S. Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nat. Rev. Cancer* 9, 897–903 (2009).
- **Review of the putative tumor suppressor function of caspase-2.**
30. Fushimi K, Ray P, Kar A, Wang L, Sutherland LC, Wu JY. Up-regulation of the proapoptotic caspase 2 splicing isoform by a candidate tumor suppressor, RBM5. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 15708–15713 (2008).

Websites

101. NCBI Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease; *CASP2* (2013). <http://omim.org/entry/600639>
102. Primer3 (v. 0.4.0). Pick primers from a DNA sequence. <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
103. NCBI Basic Local Alignment Tool (BLAST). <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
104. International HapMap Project. <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>

### 3.3. Článek 2 - Transcript expression and genetic variability analysis of caspases in breast carcinomas suggests CASP9 as the most interesting target

Veronika Brynychova, Viktor Hlavac, Marie Ehrlichova, Radka Vaclavikova, Vlasta Nemcova-Furstova, Vaclav Pecha, Marketa Trnkova, Marcela Mrhalova, Roman Kodet, David Vrana, Jiri Gatek, Marie Bendova, Zdenka Vernerova, Jan Kovar and Pavel Soucek\*

## Transcript expression and genetic variability analysis of caspases in breast carcinomas suggests CASP9 as the most interesting target

DOI 10.1515/cclm-2016-0271

Received April 5, 2016; accepted May 17, 2016; previously published online June 21, 2016

#### Abstract

**Background:** Apoptosis plays a critical role in cancer cell survival and tumor development. We provide a hypothesis-generating screen for further research by exploring the expression profile and genetic variability of caspases (2, 3, 7, 8, 9, and 10) in breast carcinoma patients. This study addressed isoform-specific caspase transcript expression and genetic variability in regulatory sequences of caspases 2 and 9.

**Methods:** Gene expression profiling was performed by quantitative real-time PCR in tumor and paired non-malignant tissues of two independent groups of patients. Genetic variability was determined by high resolution melting, allelic discrimination, and sequencing analysis in tumor and peripheral blood lymphocyte DNA of the patients.

**Results:** CASP3 A+B and S isoforms were over-expressed in tumors of both patient groups. The CASP9 transcript was down-regulated in tumors of both groups of patients and significantly associated with expression of hormonal receptors and with the presence of rs4645978-rs2020903-rs4646034 haplotype in the CASP9 gene. Patients with a low intratumoral CASP9A/B isoform expression ratio

(predicted to shift equilibrium towards anti-apoptotic isoform) subsequently treated with adjuvant chemotherapy had a significantly shorter disease-free survival than those with the high ratio ( $p=0.04$ ). Inheritance of CC genotype of rs2020903 in CASP9 was associated with progesterone receptor expression in tumors ( $p=0.003$ ).

**Conclusions:** Genetic variability in CASP9 and expression of its splicing variants present targets for further study.

**Keywords:** alternative splicing; breast carcinoma; caspases; prognosis; transcript.

## Introduction

Breast carcinoma is the most common cancer in women (OMIM:114480 [1]). Despite considerable progress in pharmacogenomics, valid biomarkers for prediction of the response of patients to drugs used to treat breast carcinoma (e.g. taxanes, paclitaxel, and docetaxel) are missing [2].

Deregulation of apoptosis may contribute to carcinogenesis and chemoresistance [3, 4]. Caspases are cysteine proteases critical for apoptosis. Caspase-3 (coded by CASP3 gene, OMIM:600636) executes both extrinsic (death receptor-induced) and intrinsic (mitochondrial) apoptotic

\*Corresponding author: Pavel Soucek, Toxicogenomics Unit, Department of Toxicology and Safety, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42, Prague 10, Czech Republic, Phone: +420 2 6708 2711, Fax: +420 2 6731 1236, E-mail: pavel.soucek@szu.cz; www.szu.cz

Veronika Brynychova and Viktor Hlavac: Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; and Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Marie Ehrlichova and Radka Vaclavikova: Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

Vlasta Nemcova-Furstova and Jan Kovar: Division of Cell and Molecular Biology, Third Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

Vaclav Pecha: Institute for the Care for Mother and Child, Prague, Czech Republic

Marketa Trnkova: Biolab Ltd. Praha, Prague, Czech Republic

Marcela Mrhalova and Roman Kodet: Department of Pathology and Molecular Medicine, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

David Vrana: Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic; and Department of Oncology, Palacky University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic

Jiri Gatek: Department of Surgery, Hospital Atlas, Zlin, Czech Republic; and University of Tomas Bata in Zlin, Zlin, Czech Republic

Marie Bendova: Department of Gynaecology and Obstetrics, Faculty Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic

Zdenka Vernerova: Department of Pathology, Faculty Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic

pathways. Caspase-7 (*CASP7*, OMIM:601761) is another important executive caspase [5]. Caspases-9 (*CASP9*, OMIM:602234), -8 (*CASP8*, OMIM:601763), and -10 (*CASP10*, OMIM:601762) are initiator caspases that activate caspase-3 and caspase-7. Caspase-9 is activated in the mitochondrial pathway, and caspases-8 and -10 interact with tumor necrosis factor family proteins and drive extrinsic apoptosis [3]. Caspase-2 (*CASP2*, OMIM:600639) is activated in both apoptotic pathways, and its role in cell cycle regulation and tumor suppression has been widely discussed [6]. Altered caspase expression is associated with the resistance of breast carcinoma cells towards taxanes in vitro [7–9]. From this point of view, the study of caspase expression in breast carcinoma raises a considerable interest.

We have recently found a lack of association of expression of (pro-apoptotic) isoform of caspase-2, *CASP2L*, and its alternative (anti-apoptotic) isoform *CASP2S* with the response to neoadjuvant chemotherapy in breast carcinoma patients [10]. Alternative caspase variants with pro-survival function have also been characterized in caspase-3, caspase-8, and caspase-9 [11–15]. However, the relevance of these isoforms for breast carcinoma biology and their importance for cancer therapy is underexplored.

Although genetic alterations in caspase genes are commonly found in carcinomas including breast cancer [16, 17], their effect on caspase transcription and mainly alternative splicing in breast carcinoma is virtually unknown.

This study explored transcript levels of caspases-2, -3, -7, -8, -9, and -10 in tumors and paired adjacent non-malignant tissues of breast carcinoma patients. The expressions of transcript variants *CASP3A*, *CASP3B*, *CASP3S*, *CASP8L*, *CASP9A*, and *CASP9B* were also determined. Transcript levels were compared with clinical data and patients' response to the therapy. Association of *CASP9A/B* isoform expression ratio with survival of patients was observed. Therefore, genetic alterations in regulatory regions of caspase 9 were assessed to gain functional insight into their importance for expression and alternative splicing in breast carcinoma samples. Due to the over-expression of *CASP2L* in tumors of breast carcinoma patients demonstrated in our previous work [10], we also analyzed regulatory regions of the *CASP2* gene.

## Materials and methods

### Patients

The study included 128 mammary carcinoma tissue samples and 65 paired adjacent non-malignant tissues without morphological signs

of carcinoma. Samples were collected and snap frozen during primary surgery in The Faculty Hospital Motol and Institute for the Care for Mother and Child (Prague, Czech Republic) in the period between 2003 and 2009. Blood samples from 615 patients for the genotyping validation study were collected from patients treated in The Faculty Hospital Motol, Institute for the Care for Mother and Child, The Faculty Hospital Kralovske Vinohrady (Prague, Czech Republic), and The Hospital Atlas (Zlín, Czech Republic). The processing of the tissue and blood samples was described in detail previously [10, 18]. Histological classification of carcinomas was performed according to standard diagnostic procedures [19]. Expression of estrogen and progesterone receptors was assessed immunohistochemically with the 1% cut-off value for classification of tumors as hormone receptor positive. ERBB2 (OMIM:164870) status was defined as positive in samples with immunohistochemical score 2+ or 3+ confirmed by fluorescence in situ hybridization (FISH) or silver in situ hybridization (SISH) analysis.

The patients were divided into three subtypes according to the hormone receptor expression and ERBB2 status: triple-negative (TNBC) subtype (associated with the worst prognosis), ERBB2 positive subtype, and luminal subtype [20].

Samples from 88 patients were collected during the primary surgery without any prior chemotherapy or hormonal therapy pretreatment (PS group). Samples from the second group of patients ( $n=40$ ) were collected during the primary surgery after chemotherapy by neoadjuvant cytotoxic therapy (NACT) regimen containing taxanes or taxanes in combination with 5-fluorouracil, anthracycline, and cyclophosphamide (NACT group). Disease-free survival (DFS) was defined as the time elapsed between surgery and disease recurrence. Response to the neoadjuvant therapy in the NACT group was evaluated based on ultrasonography performed before and after the therapy.

All patients were asked to read and sign an informed consent and the study was approved by the Ethical Commission of the National Institute of Public Health in Prague.

### DNA analysis of splice and regulatory sites

Genomic DNA was isolated from mammary carcinoma tissues with the help of AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Hildesheim, Germany) according to the manufacturer's protocol and from corresponding peripheral blood lymphocytes by the phenol/chloroform extraction method [21]. DNA was quantified by Quant-iT PicoGreen DNA Assay Kit (Invitrogen).

Splicing and regulatory regions analyzed in *CASP2* and *CASP9* were selected according to the previously published studies [15, 22, 23] and are summarized in Figure 1. Together, nineteen single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in these regions with minor allele frequency (MAF)  $\geq 1\%$  were included in the analysis (Supplementary Table S1). Promoter, splicing, and regulatory regions (In100) in *CASP2* were analyzed by direct sequencing as well as the SNPs in *CASP9* promoter and splicing elements, enhancers, and silencers in *CASP9* gene (Figure 1). SNPs rs4661636 and rs6685648 were determined by high resolution melting analysis (HRM). TaqMan SNP genotyping assay C\_2845923\_10 was used to determine rs2020903 in the validation study (see below). Primer sequences and PCR conditions for HRM and sequencing analyses are available upon request. PCR conditions and primers for amplification of region of alternative exon 9 and In100 region in *CASP2* were published recently [10].

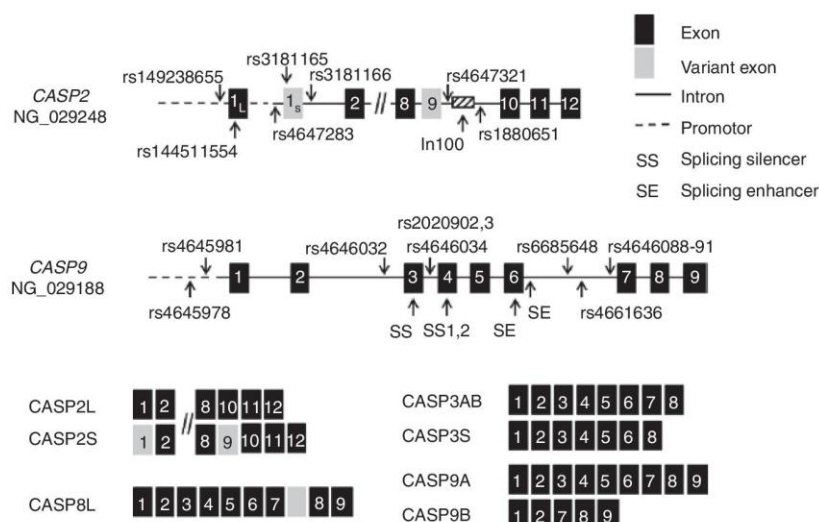


Figure 1: Genetic alterations and splice variants analyzed by the study.

PCR products for analysis by sequencing were checked on 1% agarose gel electrophoresis and then amplified using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit according to producer's protocol (Life Technologies). Sequencing was performed using ABI3100 Genetic Analyzer and evaluated by Sequencing Analysis Software v5.2 (Life Technologies). The Type It HRM kit (Qiagen) and RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) were used for HRM analysis and ViiA7 Real-Time PCR System with 384-well block (Life Technologies) for TaqMan genotyping. Ten percent of randomly selected samples were reanalyzed with 100% concordance of results. SNPs were first analyzed in a small-scale exploratory study ( $n=60$ ) and successful hits were confirmed in the large-scale validation study ( $n=615$ ).

### Isolation of total RNA and cDNA preparation

Total RNA was isolated from macrodissected fresh frozen tissues using Trizol Reagent (Invitrogen, CA, USA), quantified by Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Invitrogen) using Infinite M200 multiplate reader (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland) and RNA integrity was checked by Agilent 2100 Bioanalyzer and Agilent RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies, Inc., CA, USA). Total RNA was transcribed to cDNA with random hexamer primers as described previously [10]. Due to the limited amount of tissue samples, a multiplex PCR preamplification of post-treatment cDNA samples was performed using TaqMan PreAmp Master Mix Kit following manufacturer's instructions (Life Technologies) and preamplification uniformity was assessed as described previously [24].

### Quantitative real-time PCR

Real-time PCR quantification (qPCR) of mammary carcinomas and paired adjacent non-malignant samples was carried out in ViiA7 Real-Time PCR System with 384-well block (Life Technologies) as

described before [10]. For qPCR of caspase transcripts and reference genes *EIF2B1*, *MRPL19*, and *IPO8* [24], commercially available or newly designed TaqMan Gene Expression Assays were used (Supplementary Table S2). Specific DNA fragments (standards) of CASP2L, CASP2S, CASP3A and 3B, CASP3S, CASP8L, CASP9A, and CASP9B transcript variants were prepared from cDNA by PCR, purified from the gel according their size, and confirmed by sequencing. Specificity of isoforms-specific assays was tested by qPCR reactions containing serially diluted standards and by direct sequencing of qPCR products. Efficiencies of all assays were between 90% and 100%. Samples were amplified in duplicates and reanalyzed if the variation between duplicates was larger than 0.5 quantitation cycle (Cq). The non-template control contained water instead of cDNA. Negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were also employed to reveal possible carry-over contamination. The qPCR study design adhered to the MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments [25]).

### Statistical analysis

Differences in gene expression between tumors and non-malignant tissues were analyzed by REST 2009 Software (Qiagen) considering both normalization to selected reference genes and reaction efficiencies of all gene expression assays. Associations of transcript levels with clinical data were analyzed by non-parametric tests (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, and Spearman rank). Ratios of Cq values of genes of interest and mean value of three reference genes were calculated for this purpose. Tested variables are presented in Table 1.

For DFS analysis, transcript levels in mammary tumors were divided into groups according to median. The Kaplan-Meier plot and the log-rank test were used to compare transcript levels and ratios of splicing variants with DFS of unselected patients or patients divided by the therapy type. Analogous methods were used for DFS analysis in the validation study of genetic variability.

**Table 1:** Clinical characteristics of the studied breast carcinoma patients used for gene expression profiling.

Characteristics	PS group <sup>a</sup>	NACT group <sup>a</sup>
Mean age at diagnosis, years±SD <sup>b</sup>	62.2±10.5	52.8±8.3
Menopausal status		
Premenopausal	8 (9.1)	18 (45.0)
Postmenopausal	80 (90.9)	22 (55.0)
Histological type		
Invasive ductal carcinoma	76 (86.4)	28 (70.0)
Other type <sup>c</sup>	12 (13.6)	12 (30.0)
Stage		
I	34 (38.6)	7 (17.5)
II	39 (44.3)	21 (52.5)
III	11 (12.5)	10 (25.0)
IV	0	1 (2.5)
Not assessed	4 (4.6)	1 (2.5)
Average tumor size, mm±SD <sup>b</sup>	18.79.2	30.1±16.3
Lymph node metastasis		
Positive (pN1–3)	33 (37.5)	26 (65.0)
Negative (pN0)	51 (58.0)	14 (35.0)
pNx	4 (4.5)	0
Histological grade		
1	15 (17.1)	2 (5.0)
2	53 (60.2)	25 (62.5)
3	17 (19.3)	13 (32.5)
Not assessed	3 (3.4)	0
Estrogen receptor expression		
Positive	60 (68.2)	28 (70.0)
Negative	28 (31.8)	12 (30.0)
Progesterone receptor expression		
Positive	52 (59.1)	29 (72.5)
Negative	36 (40.9)	11 (27.5)
ERBB2 status		
Positive	25 (28.4)	11 (27.5)
Negative	63 (71.6)	29 (72.5)
Subtype		
Luminal	62 (70.5)	31 (77.5)
ERBB2	11 (12.5)	5 (12.5)
Triple negative	15 (17.0)	4 (10.0)
Response to neoadjuvant chemotherapy	Not applicable	
Complete or partial response		14 (35.0)
Stable disease or progression		17 (42.5)
Not available		9 (22.5)

<sup>a</sup>Number of patients with percentage in parentheses. <sup>b</sup>SD, standard deviation. <sup>c</sup>Other tumor types involved invasive lobular (6/8), mucinous (2/1), ductal in situ (2/0), medullary (1/0), papillary (1/0), metaplastic (0/1) and solid neuroendocrine (0/2) carcinomas.

The Mann-Whitney test was used for analysis of associations between caspase isoform transcript levels and SNPs in *CASP2* and *CASP9*. The Kruskal-Wallis and the Pearson  $\chi^2$ -tests in the exploratory SNP study and the Mantel-Haenszel common odds ratio estimate (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) in the validation SNP study were used for analysis of associations of SNPs with clinical data. Co-dominant, dominant, and recessive genetic models were evaluated in the validation SNP study. Tested variables are presented

in Supplementary Table S3. The functional relevance of the clinically relevant SNPs was analyzed in silico by HaploReg v4 [26].

All p-values were obtained from two-sided tests. A p-value of <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS v16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA [27]). The correction for false discovery rate (FDR) according to Benjamini and Hochberg [28] was applied to all analyses except the DFS analysis.

## Results

### Study population for tissue study

The tissue study population consisted of 128 patients with histologically confirmed breast carcinoma (clinical data listed in Table 1). The NACT group of patients had significantly younger age at diagnosis, prevalence of premenopausal status, larger and poorly differentiated (high grade) tumors and higher number of patients with lymph nodes affected by metastasis in comparison with the PS group.

The mean follow-up of the PS group of patients was 58.8 months. DFS was not analyzed in the NACT group of patients because of the limited number of patients in this group with complete follow-up data.

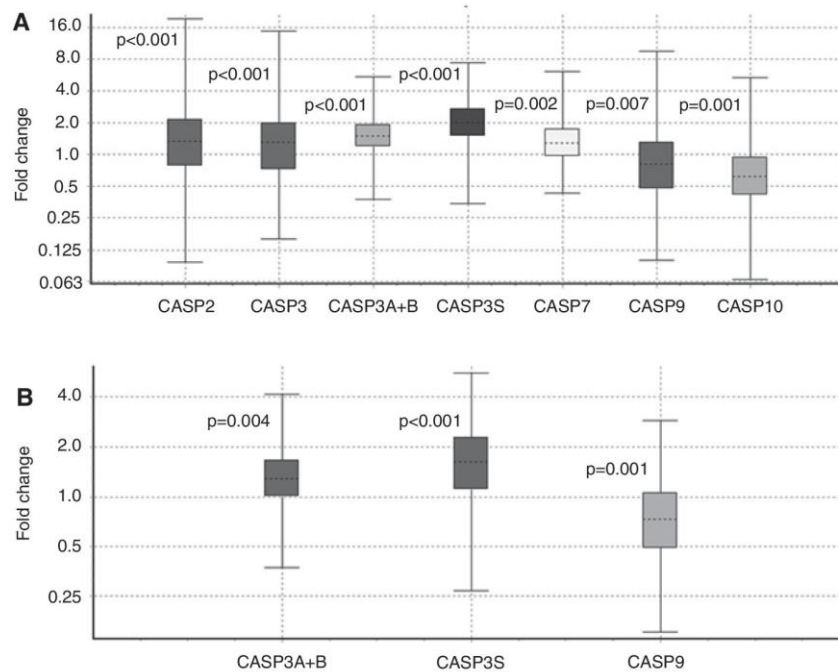
### Differences in gene expression of caspases between tumor and control tissues

Transcript levels of *CASP2*, *CASP3* (including their isoforms), and *CASP7* were significantly higher in tumors compared to paired non-malignant tissues in the PS group (Figure 2). In the opposite, *CASP9* and *CASP10* levels were significantly lower in tumors of this group of patients. The rest of evaluated caspase levels did not differ ( $p>0.05$ ).

Over-expression of *CASP3* isoforms (A+B and S) and total *CASP9* down-regulation in tumors were also found in the NACT group of patients. Other followed caspases were not deregulated in tumor tissues ( $p>0.05$ ).

### Associations of transcript levels of caspases with clinical characteristics of patients

Intratumoral levels of caspase transcripts were correlated with available clinical data of patients. All clinical data have been analyzed in both groups of patients, but to retain concise style only significant values are displayed in Table 2.



**Figure 2:** Significant differences (fold changes) in the relative transcript levels between paired samples of tumor and control tissues from breast carcinoma patients.

(A) PS group ( $p < 0.001$ , CASP2;  $p < 0.001$ , CASP3;  $p < 0.001$ , CASP3A+B;  $p < 0.001$ , CASP3S;  $p = 0.002$ , CASP7;  $p = 0.007$ , CASP9;  $p < 0.001$ , CASP10). (B) NACT group ( $p = 0.004$ , CASP3A+B;  $p < 0.001$ , CASP3S;  $p = 0.001$ , CASP9). The fold change more than 1 represents over-expression and the fold change less than to 1 represents down-regulation. The box area encompasses 50% of all observations, the dotted line represents the sample median and the error bars indicate maximum and minimum values.

Higher levels of CASP2, CASP3A+B, and CASP9B but lower levels of CASP7, CASP9, and CASP9A were found in tumors without expression of hormonal receptors when compared to tumors expressing hormonal receptors (Table 2A). Association of CASP9 level with expression of hormonal receptors was also observed in the NACT group of patients, although it did not pass the FDR test for multiple testing (Table 2B). The rest of significant associations were observed in only one of the evaluated sets of patients (Table 2A,B).

Transcript levels of caspases in tumor tissues did not significantly modify the DFS of patients in the PS group ( $n = 77$ , Supplementary Figure S1A-M). However, a subgroup of patients with lower CASP9A/B ratio than the median (i.e. shift towards anti-apoptotic isoform) subsequently treated with adjuvant chemotherapy had significantly shorter DFS than patients with a higher ratio (Figure 3). Transcript levels of caspases did not significantly modify the response to the neoadjuvant treatment in the NACT group (CASP2,  $p = 0.888$ ; CASP3,  $p = 0.905$ ; CASP3AB,  $p = 0.131$ ; CASP3S,  $p = 0.190$ ; CASP3AB/S ratio,  $p = 0.968$ ; CASP7,  $p = 0.204$ ; CASP8,  $p = 0.341$ ; CASP8L,  $p = 0.341$ ; CASP9,  $p = 0.634$ ; CASP9A,  $p = 0.874$ ; CASP9B,  $p = 0.250$ ; CASP9A/B ratio,  $p = 1.000$ ; CASP10,  $p = 0.112$ ).

### Analysis of genetic variability in CASP2 and CASP9

Genomic DNA samples from tumor tissues and peripheral blood lymphocytes of 60 breast carcinoma patients from the PS group were used for SNP analysis of CASP2 and CASP9 genes in the exploratory SNP study. All regions and SNPs analyzed in CASP2 and CASP9 (summarized in Figure 1 and Supplementary Table S1) were selected using the following criteria: (1) localization in promoters, enhancers, silencers or splicing elements (according to UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>), (2) previously published data (when available) [15, 22, 23], (3) minor allele frequency in Caucasians higher or equal to 1% (Supplementary Table S1). Sequence data of the alternative exon 9 and In100 region of CASP2 found in peripheral blood lymphocytes [10] were used to supplement the data from tumor samples obtained by this study.

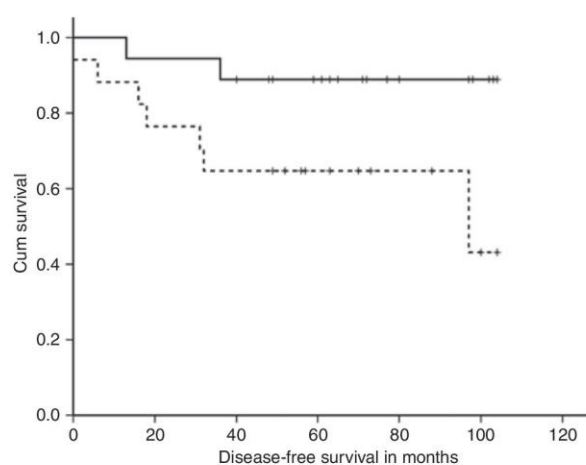
No differences in DNA alterations between samples from tumor tissues and peripheral blood lymphocytes were observed in any of the genes (Supplementary Table S4). Four new SNPs were found and characterized in CASP2 promoters (Table 3).



Table 2: Associations of transcript levels of caspases in tumors with clinical data of breast carcinoma patients.

Gene	Grade		ERBB-2 status		ER expression		PR expression		Subtype		
	1 or 2 n=68	3 n=17	Positive n=25	Negative n=63	Positive n=60	Negative n=28	Positive n=52	Negative n=36	Luminal n=62	TNBC n=15R	
(A) PS group											
<i>CASP2</i>	NS		NS		1.01±0.02 p=0.020 <sup>a</sup>	0.99±0.02	1.01±0.02 p=0.008 <sup>a</sup>	0.99±0.02	1.01±0.02 p=0.033	1.00±0.03	0.99±0.01
<i>CASP3A+B</i>	NS		NS		1.02±0.02 p=0.002 <sup>a</sup>	1.01±0.02	1.02±0.01 p=0.002 <sup>a</sup>	1.01±0.02	1.02±0.02 p=0.001 <sup>a</sup>	1.00±0.01	1.01±0.02
<i>CASP7</i>	NS		NS		1.05±0.02 p=0.002 <sup>a</sup>	1.07±0.02	1.05±0.01 p=0.008 <sup>a</sup>	1.07±0.02	1.05±0.02 p=0.008 <sup>a</sup>	1.06±0.02	1.07±0.02
<i>CASP9</i>	NS		1.06±0.02 p=0.011 <sup>a</sup>	1.05±0.02	1.05±0.02 p<0.001 <sup>a</sup>	1.07±0.02	1.05±0.02 p=0.002 <sup>a</sup>	1.06±0.02	1.05±0.02 p=0.001 <sup>a</sup>	1.07±0.02	1.07±0.02
<i>CASP9A/B</i>	0.92±0.02 p=0.011 <sup>a</sup>		NS		0.92±0.02 p<0.001 <sup>a</sup>	0.94±0.02	0.91±0.02 p<0.001 <sup>a</sup>	0.93±0.02	0.91±0.02 p<0.001 <sup>a</sup>	0.94±0.02	0.94±0.02
(B) NACT group											
<i>CASP8</i>	NS		NS		NS	NS	NS	NS	1.40±0.04 p=0.035	1.37±0.04	
<i>CASP9</i>	1.03±0.03 p=0.031		1.05±0.02		1.03±0.03 p=0.035	1.03±0.03	1.05±0.02	1.05±0.02	1.03±0.02 p=0.035	1.05±0.02	
<i>CASP9A/B</i>	NS		NS		NS	NS	NS	NS	0.93±0.02 p=0.025	0.92±0.01	

All clinical data have been analyzed in both groups of patients, but to retain concise style only significant values are displayed. Values of caspase expression are mean±standard deviation of the ratio of cycle threshold for a target gene to the arithmetic mean of cycle threshold of all reference genes. Therefore, the lower is the ratio the higher is the respective transcript level. Cycle threshold values were used directly to calculate *CASP9* variants ratios, therefore higher value means higher expression of anti-apoptotic variant than pro-apoptotic variant. n, number of patients in the group; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; TNBC, triple negative breast carcinoma. p-Values were calculated by the Kruskal-Wallis test. <sup>a</sup>These results passed the Benjamini-Hochberg FDR test for multiple testing (q=0.032). Significant results observed in both patient groups are highlighted in gray.



**Figure 3:** Association between CASP9A/B ratio in tumors and disease-free survival of breast carcinoma patients. Kaplan-Meier survival curves for patients with the intratumoral CASP9A/B ratio below or equal the median (solid line,  $n=18$ ) vs. patients with the ratio above the median (dashed line,  $n=17$ ) are displayed. The difference in the mean DFS between the compared groups of patients was significant ( $p=0.04$ , log-rank test).

Tumors from carriers of the GG genotype in rs4645978, the CC genotype in rs4646032, the CC genotype in rs2020903, and the AA genotype in rs4646034 had significantly lower *CASP9* transcript levels than tumors from carriers of the alternative alleles. Conversely, tumors from carriers of the GG genotype in rs4661636 had significantly higher *CASP9* transcript levels than tumors from carriers of the A allele (Table 4).

All clinical data have been analyzed against the followed SNPs, but to retain concise style only significant values are displayed in Tables 5, S5, and S6. From the comparison of SNPs with clinical data in the exploratory study, the most

notable association was that of rs4645978-rs2020903-rs4646034 SNPs in *CASP9* with ER/PR expression (Supplementary Table S5). This association seemed to reflect the previously established links between the *CASP9* transcript and the expression of estrogen and progesterone receptors (Table 2) and between the *CASP9* transcript and these SNPs (Table 4). The significance of the *CASP9* rs4645978-rs2020903-rs4646034 haplotype was therefore further validated in peripheral blood lymphocyte DNA samples obtained from 615 breast carcinoma patients (clinical data listed in Supplementary Table S3).

Inheritance of rs2020903 SNP in *CASP9* was significantly associated with the progesterone receptor and ERBB2 expression (but not with estrogen receptor expression, Supplementary Table S6), presence of lymph node metastasis, and TNBC subtype of breast carcinoma (Table 5). The association of rs2020903 with the progesterone receptor expression was observed in all genetic models tested, and a tendency towards a decrease in the risk of having progesterone receptor negative tumor with a number of inherited alleles was obvious ( $p=0.050$  for one C allele vs.  $p=0.003$  for both alleles, Table 5). The remaining associations reached rather marginal significances that did not pass the FDR test for multiple testing.

## Discussion

Bearing in mind a critical role of apoptosis in cancer cell survival and tumor development [4], we pursued the hypothesis-generating screen to provide candidates for further research of the prognostic and predictive role of caspases (i.e. the main executors of apoptosis) in breast carcinoma.

**Table 3:** Novel *CASP2* SNPs found in breast carcinoma patients.

SNPs	Location, type <sup>a</sup>	Genotype	n	MAF, n=60
chr.7:142984918	g.4611T>C	TT	56	C (0.03)
		TC	4	
		CC	0	
chr.7:142985189	g.4882G>A	GG	59	A (0.01)
		GA	1	
		AA	0	
chr.7:142986579	g.6272C>G	CC	59	G (0.01)
		CG	1	
		GG	0	
chr.7:142986806	g.6499G>A	GG	59	A (0.01)
		GA	1	
		AA	0	

MAF, minor allele frequency; n, number of patients. <sup>a</sup>SNP (GRCh37 assembly) position in gene reference sequence NG\_029248 from 5' to 3' end.

**Table 4:** Significant associations of *CASP9* SNPs with its transcript levels in tumors from the PS group of breast carcinoma patients.

Gene, SNP ID	Genotype	n	<i>CASP9</i>	<i>CASP9A</i>
<i>CASP9</i> , rs4645978	GG	12	1.07±0.02	
	GA or AA	48	1.05±0.02	
			p=0.017 <sup>a</sup>	
<i>CASP9</i> , rs4646032	CC	14	1.07±0.02	1.07±0.02
	CT or TT	46	1.05±0.02	1.05±0.02
			p=0.018 <sup>a</sup>	p=0.034
<i>CASP9</i> , rs2020903	CC	12	1.07±0.02	
	CT or TT	48	1.05±0.02	
			p=0.017 <sup>a</sup>	
<i>CASP9</i> , rs4646034	AA	12	1.07±0.02	
	AG or GG	48	1.05±0.02	
			p=0.017 <sup>a</sup>	
<i>CASP9</i> , rs4661636	GG	24	1.05±0.02	
	GA or AA	36	1.06±0.02	
			p=0.028 <sup>a</sup>	

Values of caspase expression are mean±standard deviation of the ratio of cycle threshold for a target gene to the arithmetic mean of cycle threshold of all reference genes. Therefore, the lower is the ratio the higher is the respective transcript level. p-Values were calculated by the Mann-Whitney U-test. <sup>a</sup>These results passed the Benjamini-Hochberg FDR test for multiple testing (q=0.029). *CASP9* haplotype is highlighted in gray.

The observed down-regulation of the initiator caspase-9 gene expression in both PS and NACT tumors could be in favor of cancer cell survival generally. Moreover, despite the lack of predictive significance of the total *CASP9* transcript in NACT patients, we found association of its splicing variants (with the reported pro-apoptotic and anti-apoptotic functions) with prognosis in PS patients with breast carcinoma. Namely, the patients with a low *CASP9A/B* isoform expression ratio in their tumors (i.e. over-expression of anti-apoptotic *CASP9B*) subsequently treated with adjuvant chemotherapy had significantly shorter DFS than those with the low ratio. We have not evaluated overall survival of the followed patients due to the fact that it did not reach median. No significant difference in *CASP9A/B* ratio between NACT patients with partial response and poor response has been found by this study. However, we cannot exclude that this comparison is underestimated because the patients with complete response could not be included to this comparison due to the lack of tumor tissue after NACT.

*CASP9B* lacks a catalytic subunit and negatively affects apoptosis, probably by competitive binding to APAF1 (apoptotic protease activating factor 1, 602233), which prevents the formation of functional apoptosome [29]. Silencing of *CASP9B* in non-small lung carcinoma cells led to an increased sensitivity towards several types of anticancer drugs [15]. The deficiency of apoptosome activity without down-regulation of caspase-9 or Apaf-1 in ovarian cancer cell lines and primary tumors has previously been linked to chemotherapy resistance

[30]. Potential role of unknown negative regulator of caspase-9 recruitment to apoptosome in this effect has been proposed, but the specific detection of *CASP9B* has not been performed [30]. According to the present study the *CASP9A/B* ratio rather than the total *CASP9* transcript deserves further study.

In order to gain further functional insight into the mechanisms behind the observed association of *CASP9* splicing variants with the prognosis of breast carcinoma patients, we performed a study of genetic variability of regulatory elements, including splicing sites and their proximity in the *CASP9* gene. Significant association of *CASP9* transcript levels with the genetic variability in *CASP9* regulatory elements revealed by the present study is important from two points of view. First, three SNPs (rs4645978-rs2020903-rs4646034) show a high linkage disequilibrium and thus form a functionally-relevant haplotype. rs4645978 lies in the *CASP9* promoter, rs2020903 is near the splice site of *CASP9* (up to 100 bp distance), and rs4646034 is in intron 3. Secondly, the expression of progesterone receptor and ERBB2 significantly associates not only with this *CASP9* haplotype but also with the *CASP9* transcript level in tumors from both studied groups of patients, suggesting a potential link to the clinical phenotype.

An influence of hormone levels on caspase 9 expression is unclear at present. Down-regulation, but also a lack of effect on the expression of caspase 9 has been described in MCF-7 breast cancer cell line after estradiol exposure in vitro [31, 32]. The down-regulation of *CASP9*

**Table 5:** Significant associations of *CASP9* rs2020903 SNP with clinical data of breast carcinoma patients in the validation study (n=615).

rs2020903	Lymph node metastasis <sup>a</sup>		OR <sup>b</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-Value
	Negative	Positive			
TT	74	39	Reference	Reference	Reference
TC	175	111	0.83	0.53–1.31	0.425
CC	134	52	1.36	0.82–2.25	0.233
C allele	309	163	0.99	0.65–1.54	0.997
T allele <sup>c</sup>	249	150	<b>0.64</b>	<b>0.44–0.94</b>	<b>0.023</b>
	PR expression <sup>a</sup>				
	Negative	Positive			
TT	45	77	Reference	Reference	Reference
TC	81	217	<b>0.64</b>	<b>0.41–0.99</b>	<b>0.050</b>
CC	41	152	<b>0.46</b>	<b>0.28–0.74</b>	<b>0.003<sup>d</sup></b>
C allele	122	369	<b>0.57</b>	<b>0.37–0.86</b>	<b>0.008</b>
T allele <sup>c</sup>	126	294	<b>1.59</b>	<b>1.06–2.37</b>	<b>0.024</b>
	ERBB2 status <sup>a</sup>				
	Negative	Positive			
TT	89	32	Reference	Reference	Reference
TC	220	72	1.10	0.68–1.78	0.703
CC	160	32	<b>1.80</b>	<b>1.03–3.12</b>	<b>0.038</b>
C allele	380	104	1.31	0.83–2.08	0.243
T allele <sup>c</sup>	309	104	<b>0.59</b>	<b>0.38–0.92</b>	<b>0.020</b>
	Subtype <sup>a</sup>				
	TNBC	Other			
TT	20	101	Reference	Reference	Reference
TC	28	268	<b>1.89</b>	<b>1.02–3.52</b>	<b>0.043</b>
CC	21	173	1.63	0.84–3.15	0.146
C allele	49	441	<b>1.78</b>	<b>1.05–3.13</b>	<b>0.044</b>
T allele <sup>c</sup>	48	369	0.93	0.54–1.61	0.803

PR, progesterone receptor; TNBC, triple negative breast carcinoma. <sup>a</sup>Numbers of patients in the compared groups. <sup>b</sup>OR, odds ratio, 95% CI=95% confidence interval. <sup>c</sup>CC genotype as reference. <sup>d</sup>This result passed the Benjamini-Hochberg FDR test for multiple testing (q=0.003). Significant results in bold.

was already observed in the other hormone-sensitive malignancies, ovarian and prostate carcinoma in comparison to non-tumor tissue [33, 34]. However, studies assessing expression levels or a prognostic relevance of *CASP9* in these carcinomas are rare. G allele of the rs4645978 SNP has been associated with an increased risk of breast and pancreatic cancer [17, 35] and also with the reduced risk of lung, gastric, colorectal, prostate, and other cancers [35]. Recent meta-analysis of rs4645978 suggested the reduced prostate cancer risk in Caucasians, but not in Asians [35]. Nevertheless, the reason for the previously observed discrepancies between different tumor types remains unresolved. Authors of the recent meta-analysis suggested that heterogeneity among studies addressing these aspects might be behind such discrepancies [35].

Moreover, the in silico analysis (HaploReg v4) showed that rs2020903 SNP in *CASP9* alters the GATA and Nanog motifs with the previously suggested link to the breast carcinoma development, progression, and stemness [36, 37].

In general, the assessment of genetic variability is an important pharmacogenetic and prognostic tool and interesting cost-effective and less invasive alternative to expression profiling of tissues. However, clinical utility of each potential genetic marker should be evaluated by assessment of the functional relevance and by validation in the prospective clinical trial.

Thus, taken together our data shows that the question of clinical relevance of rs4645978-rs2020903-rs4646034 *CASP9* haplotype for cancer presents an attractive topic

for a more detailed study on an independent set of patients and in suitable model systems.

From the other associations found, the following may attract further attention.

The previously observed over-expression of *CASP2L* in tumors compared with adjacent non-malignant tissues of both pre- and post-treatment patients [10] prompted us to perform analysis of genetic variability in the *CASP2L* promoter. We have identified four novel alterations in the *CASP2L* promoter and near the first exon of the *CASP2S* isoform. Functional relevance of new alterations was predicted with the help of the SNP Nexus Database (<http://www.snp-nexus.org>). The SNP g.4882G>A (NG\_029248) lies inside a CpG island of the *CASP2L* promoter, and the g.6499G>A is located 57 bp downstream from the 3'-end of exon 1 of *CASP2S*. Due to the low MAF, the clinical importance of these alterations should be established by a larger study.

We confirmed the previously observed [38–40] over-expression of the *CASP3* transcript in the PS group of patients. On the other hand, a strong down-regulation of the caspase-3 transcript and protein in tumors compared with non-malignant breast tissues was reported as well [41, 42]. The isoform-specific analysis of *CASP3* (A+B and S) evaluated by the present study has shown deregulation of these isoforms to a high extent compared with the overall *CASP3* transcript. Our initial protein analysis of procaspases and their cleavage products in breast carcinoma tumor samples (Supplementary Figure S2) has also shown a high variability in caspase activation and protein cleavage between samples. Thus, differences in methods used for *CASP3* expression analysis, especially uncontrolled splicing transcript or protein product detection, may be among the potential reasons for the published discrepancies. Our results do not support the previously observed association of high *CASP3S* level with poor response to the neoadjuvant therapy in breast carcinoma patients [40].

The over-expression of *CASP7* transcript in tumors expressing hormonal receptors found by the present study may be explained by the previously reported estrogen stimulation of the *CASP7* expression in MCF-7 breast cancer cells in vitro [31].

Somatic mutations in caspase genes have been described in different types of carcinomas [16]. The lack of discrepancies in the distribution of alterations in the *CASP2* and *CASP9* genes between the peripheral lymphocyte and tumor DNA supports the recent finding that somatic mutation in these caspases are uncommon in breast carcinomas [43]. Comparison of germline and somatic mutation spectra in *CASP9* also strengthens the

evidence for the observed association of its genotype with transcript expression.

## Conclusions

Results of this study support the hypothesis that altered expression of alternative variants of *CASP9* rather than the total transcript may influence the prognosis of breast carcinoma patients. This work contributes to demonstrating the significant role of alternative splicing for cancer progression as well as the importance of detection of specific transcript variants in expression studies. Evaluation of caspase-9 pro-apoptotic activity and expression of the caspase-9B isoform in tumor samples presents a prerequisite step in the further assessment of the relevance of this alternative variant for breast cancer patients. The correlations between caspase expression levels and hormone receptor status may also have an influence on the apoptosis resistance of tumor cell in hormone receptor positive versus negative patients and how they respond to chemotherapy. Role of these caspases in the response to treatment in each breast carcinoma subgroup has not been analyzed in this study due to insufficient number of patients in the subgroups.

**Author contributions:** All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

**Research funding:** This work was supported by grant of the CU Grant Agency no.: 1444313 to V.B., MH CZ – DRO (National Institute of Public Health – NIPH, 75010330) project, and grant of the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health, no.: 14055-3 to P.S.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

**Competing interests:** The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

## References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available at: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed: 30 Oct 2015.

2. Murray S, Briasoulis E, Linardou H, Bafaloukos D, Papadimitriou C. Taxane resistance in breast cancer: mechanisms, predictive biomarkers and circumvention strategies. *Cancer Treat Rev* 2009;38:890–903.
3. Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ* 2011;18:1441–9.
4. Labi V, Erlacher M. How cell death shapes cancer. *Cell Death Dis* 2015;6:e1675.
5. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:12815–9.
6. Vakifahmetoglu-Norberg H, Zhivotovsky B. The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends Cell Biol* 2010;20:150–9.
7. Kovář J, Ehrlichova M, Smejkalova B, Zanardi I, Ojima I, Gut I. Comparison of cell death-inducing effect of novel taxane SB-T-1216 and paclitaxel in breast cancer cells. *Anticancer Res* 2009;29:2951–60.
8. Mielgo A, Torres VA, Clair K, Barbero S, Stupack DG. Paclitaxel promotes a caspase 8-mediated apoptosis through death effector domain association with microtubules. *Oncogene* 2009;28:3551–62.
9. Vobořilová J, Němcová-Fürstová V, Neubauerová J, Ojima I, Zanardi I, Gut I, et al. Cell death induced by novel fluorinated taxanes in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells. *Invest New Drugs* 2011;29:411–23.
10. Brynychová V, Hlaváč V, Ehrlichová M, Václavíková R, Pecha V, Trnková M, et al. Importance of transcript levels of caspase-2 isoforms S and L for breast carcinoma progression. *Future Oncol* 2013;9:427–38.
11. Huang Y, Shin NH, Sun Y, Wang KK. Molecular cloning and characterization of a novel caspase-3 variant that attenuates apoptosis induced by proteasome inhibition. *Bioch Biophys Res Commun* 2001;283:762–9.
12. Horiuchi T, Himeji D, Tsukamoto H, Harashima SI, Hashimura C, Hayashi K. Dominant expression of a novel splice variant of caspase-8 in human peripheral blood lymphocytes. *Bioch Biophys Res Commun* 2000;272:877–81.
13. Himeji D, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hayashi K, Watanabe T, Harada M. Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood* 2002;99:4070–8.
14. Seol DW, Billiar TR. A caspase-9 variant missing the catalytic site is an endogenous inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:2072–6.
15. Shultz JC, Goehe RW, Murudkar CS, Wijesinghe DS, Mayton EK, Massiello A, et al. SRSF1 regulates the alternative splicing of caspase 9 via a novel intronic splicing enhancer affecting the chemotherapeutic sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res* 2011;9:889–900.
16. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet* 2009;46:497–510.
17. Theodoropoulos GE, Michalopoulos NV, Pantou MP, Kontogianni P, Gazouli M, Karantanos T, et al. Caspase 9 promoter polymorphisms confer increased susceptibility to breast cancer. *Cancer Genet* 2012;205:508–12.
18. Hubackova M, Vaclavikova R, Ehrlichova M, Mrhalova M, Kodet R, Kubackova K, et al. Association of superoxide dismutases and NAD (P) H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. *Int J Cancer* 2012;130:338–48.
19. Tavassoli FA, Devilee P, editors. *Pathology and genetics: tumours of the breast and female genital organs*, Vol. 4. Lyon: IARC Press, 2003.
20. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013;24:2206–23.
21. Topić E, Gluhak J. Isolation of restrictible DNA. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991;29:327–30.
22. Côté J, Dupuis S, Jiang ZH, Wu JY. Caspase-2 pre-mRNA alternative splicing: identification of an intronic element containing a decoy 3' acceptor site. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:938–43.
23. Logette E, Wotawa A, Solier S, Desoche L, Solary E, Corcos L. The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression. *Oncogene* 2003;22:935–46.
24. Hlaváč V, Brynychová V, Václavíková R, Ehrlichová M, Vrána D, Pecha V, et al. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* 2013;14:515–29.
25. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.
26. Ward LD, Kellis M. HaploReg: a resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. *Nucleic Acid Res* 2012;40:D930–4.
27. Hlaváč V, Brynychová V, Václavíková R, Ehrlichová M, Vrána D, Pecha V, et al. The role of cytochromes p450 and aldo-keto reductases in prognosis of breast carcinoma patients. *Medicine* 2014;93:e255.
28. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B Met* 1995;57:289–300.
29. Srinivasula SM, Guo AM, Zhan Y, Lazebnik Y, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:999–1002.
30. Liu JR, Opipari AW, Tan L, Jiang Y, Zhang Y, Tang H, et al. Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer implications for chemoresistance. *Cancer Res* 2002;62:924–31.
31. Lobenhofer EK, Bennett L, Cable LA, Li L, Bushel PR, Afshari CA. Regulation of DNA replication fork genes by 17 $\beta$ -estradiol. *Mol Endocrinol* 2002;16:1215–29.
32. Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KC, Lyttle CR, Katzenellenbogen BS. Profiling of estrogen up-and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. *Endocrinology* 2003;144:4562–74.
33. Rodríguez-Berriguete G, Galvis L, Fraile B, de Bethencourt FR, Martínez-Onsurbe P, Olmedilla G, et al. Immunoreactivity to caspase-3, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 forms is frequently lost in human prostate tumors. *Hum Pathol* 2012;43:229–37.
34. Ehrlichova M, Mohelnikova-Duchonova B, Hrdy J, Brynychova V, Mrhalova M, Kodet R, et al. The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma. *Genomics* 2013;102:96–101.
35. Xu W, Jiang S, Xu Y, Chen B, Li Y, Zong F, et al. A meta-analysis of caspase 9 polymorphisms in promoter and exon sequence on cancer susceptibility. *PLoS One* 2012;7:e37443.

36. Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* 2006;127:1041–55.
37. Wang D, Lu P, Zhang H, Luo M, Zhang X, Wei X, et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget* 2014;5:10803–15.
38. Vakkala M, Pääkkö P, Soini Y. Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *Br J Cancer* 1999;81:592.
39. O'Donovan N, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Caspase 3 in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:738–42.
40. Végran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Bonnetain F, Lizard-Nacol S. Overexpression of caspase-3s splice variant in locally advanced breast carcinoma is associated with poor response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:5794–800.
41. Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. *Appl Immunohisto M M* 2008;16:113–20.
42. Vinothini G, Murugan RS, Nagini S. Mitochondria-mediated apoptosis in patients with adenocarcinoma of the breast: correlation with histological grade and menopausal status. *Breast* 2011;20:86–92.
43. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* 2012;486:400–4.

---

**Supplemental Material:** The online version of this article (DOI: 10.1515/cclm-2016-0271) offers supplementary material, available to authorized users.

Online Supplementary Material DOI: 10.1515/cclm-2016-0271

Supplementary Table S1 *CASP2* and *CASP9* SNPs analyzed in the study.

SNPs ID	HGVS description	Reference MAF <sup>a</sup>	Reference population
<i>CASP2</i>			
rs149238655	NG_029248.1:g.6377G>A	0.01 (A)	1000 Genomes
rs144511554	NG_029248.1:g.5148C>A	0.01 (A)	1000 Genomes
rs4647283	NG_029248.1:g.5887A>G	0.01 (G)	1000 Genomes
rs3181165	NG_029248.1:g.6377G>A	0.08 (A)	HapMap-CEU
rs3181166	NG_029248.1:g.6591T>G	0.17 (G)	HapMap-CEU
rs4647321	NG_029248.1:g.17319T>C	0.03 (C)	HapMap-CEU
rs1880651	NG_029248.1:g.17551T>A	0.02 (A)	pilot_1_CEU_low_coverage_panel
<i>CASP9</i>			
rs4645978	NG_029188.1:g.4252G>A	0.47 (A)	pilot_1_CEU_low_coverage_panel
rs4645981	NG_029188.1:g.4803C>T	0.04 (T)	1000 Genoms
rs4646032	NG_029188.1:g.21795C>T	0.48 (T)	pilot_1_CEU_low_coverage_panel
rs2020902	NG_029188.1:g.21926T>C	0.21 (C)	HapMap-CEU
rs2020903	NG_029188.1:g.21989C>T	0.48 (T)	pilot_1_CEU_low_coverage_panel
rs4646034	NG_029188.1:g.22126A>G	0.48 (G)	pilot_1_CEU_low_coverage_panel
rs6685648	NG_029188.1:g.31091A>G	0.24 (G)	HapMap-CEU
rs4661636	NG_029188.1:g.33225G>A	0.40 (A)	HapMap-CEU
rs4646088	NG_029188.1:g.34168C>T	0.04 (T)	1000 Genomes
rs4646089	NG_029188.1:g.34169G>A	0.05 (A)	1000 Genoms
rs4646090	NG_029188.1:g.34213T>C	0.19 (C)	pilot_1_CEU_low_coverage_panel
rs4646091	NG_029188.1:g.34243A>G	0.27 (G)	HapMap-CEU

<sup>a</sup>MAF = Minor allele frequency



**Supplementary Table S2** Gene expression assays and primers / probes used in the study.

Gene	TaqMan Assay ID	Amplicon length (bp)
<i>EIF2B1</i>	Hs00426752_m1	75
<i>MRPL19</i>	Hs00608519_m1	72
<i>IPO8</i>	Hs00183533_m1	71
<i>CASP2</i>	Hs00892481_m1	56
<i>CASP3</i>	Hs00234387_m1	100
<i>CASP7</i>	Hs01029847_m1	114
<i>CASP8</i>	Hs01018151_m1	124
<i>CASP9</i>	Hs00154260_m1	71
<i>CASP10</i>	Hs01017899_m1	74
<i>CASP2L</i>	Hs00895082_m1	76
<i>CASP2S</i>	Hs00892491_m1	64
<i>CASP9A</i>	Hs00154261_m1	65
<b>Primers and TaqMan probe sequences (5' - 3')</b>		
900 nM each primer, 250 nM probe		
<i>CASP3A+B</i>	Forward: ctggactgtggcattgagaca Reverse: agtcggcctccactggtattt Probe: tgggtttgatgatgacatggcgtgtc [1]	76
<i>CASP3S</i> [2]	Forward: agaagtctaactggaaaacccaaact Reverse: caaagcgactggatgaacca Probe: attattcaggttattattcttggcg [1]	94
<i>CASP8L</i> [3]	Forward: acctcggggatactgtctga Reverse: ctctttgggttctacctgca Probe: cacagcattagggacaggaatgga	126
<i>CASP9B</i>	Forward: ggatttggatgtcagcag Reverse: catctggctcggggttact Probe: ttcccctgaagacgagtcacctgg [4]	94

## References

1. Végran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Bonnetain F, Lizard-Nacol S. Overexpression of caspase-3s splice variant in locally advanced breast carcinoma is associated with poor response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2006;12:5794-5800.
2. Huang Y, Shin NH, Sun Y, Wang KK. Molecular cloning and characterization of a novel caspase-3 variant that attenuates apoptosis induced by proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;283:762-769.
3. Himeji D, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hayashi K, Watanabe T, Harada M. Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood* 2012;99:4070-8.
4. Vu NT, Park MA, Shultz JC, Goehle RW, Hoeflerlin LA, Shultz MD, Smith SH, Lynch KW, Chalfant CH. hnRNP U enhances caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L *J Biol Chem* 2013;288:8575-8584.

**Supplementary Table S3** Clinical characteristics of studied breast carcinoma patients used for single nucleotide polymorphism profiling (n=615).

Characteristics	n (%)
<i>Mean age at diagnosis, years ± SD<sup>a</sup></i>	58.1 ± 12.0
<i>Menopausal status</i>	
premenopausal	89 (14.5)
postmenopausal	272 (44.2)
not assessed	254 (41.3)
<i>Histological type</i>	
invasive ductal carcinoma	479 (77.9)
other type <sup>b</sup>	131 (21.3)
not assessed	5 (0.8)
<i>Stage</i>	
0	44 (7.2)
I	255 (41.5)
II	326 (36.7)
III	57 (9.2)
IV	1 (0.2)
not assessed	32 (5.2)
<i>Lymph node metastasis</i>	
positive (pN1-3)	201 (32.7)
negative (pN0)	382 (62.1)
pNx	32 (5.2)
<i>Histological grade</i>	
1	140 (22.8)
2	301 (48.9)
3	151 (24.6)
not assessed	23 (3.7)
<i>Estrogen receptor expression</i>	
positive	474 (77.1)
negative	136 (22.1)
not assessed	5(0.8)
<i>Progesterone receptor expression</i>	
positive	444 (72.2)
negative	166 (27.0)
not assessed	5 (0.8)
<i>ERBB2 status</i>	
positive	136 (22.1)
negative	466 (75.8)
not assessed	13 (2.1)
<i>Molecular subtype</i>	
luminal	493 (80.1)
ERBB2	44 (7.2)
triple negative	69 (11.2)
not assessed	9 (1.5)
<i>Treatment strategy</i>	
Neoadjuvantly treated	140 (22.8)
Adjuvantly treated	414 (67.3)
not available	61 (9.9)

<sup>a</sup>Standard deviation. <sup>b</sup>Other tumor types involved invasive lobular (70), ductal in situ (19), tubular (10), mucinous (9), medullary (8), papillary (5), metaplastic (3), solid neuroendocrine (1), secretory (1) carcinomas and mixed forms (5)

**Supplementary Table S4** Distribution of analyzed SNPs in 60 PS carcinoma patients.

SNPs ID	Genotype	n	MAF <sup>a</sup>
rs149238655	GG	59	C (0.01)
	GA	1	
	AA	0	
rs144511554	CC	58	A (0.02)
	CA	2	
	AA	0	
rs4647283	AA	59	G (0.01)
	AG	1	
	GG	0	
rs3181165	GG	54	A (0.06)
	GA	5	
	AA	1	
rs3181166	TT	40	G (0.21)
	TG	15	
	GG	5	
rs4647321	TT	54	C (0.05)
	TC	6	
	CC	0	
rs1880651	TT	55	A (0.04)
	TA	5	
	AA	0	
rs4645978	GG	12	A (0.51)
	GA	35	
	AA	13	
rs4645981	CC	60	T (0.00)
	CT	0	
	TT	0	
rs4646032	CC	14	T (0.49)
	CT	33	
	TT	13	
rs2020902	TT	45	C (0.14)
	TC	13	
	CC	2	
rs2020903	TT	13	C (0.49)
	TC	35	
	CC	12	
rs4646034	AA	12	G (0.51)
	AG	35	
	GG	13	
rs6685648	AA	33	G (0.26) <sup>b</sup>
	AG	21	
	GG	5	
rs4661636	GG	24	A (0.37)
	GA	28	
	AA	8	

**Supplementary Table S4** Continued

SNPs ID	Genotype	N	MAF <sup>a</sup>
rs4646088	CC	57	T (0.02) <sup>b</sup>
	CT	2	
	TT	0	
rs4646089	GG	59	T (0) <sup>b</sup>
	GT	0	
	TT	0	
rs4646090	TT	30	C (0.28) <sup>b</sup>
	TC	25	
	CC	4	
rs4646091	AA	35	G (0.23) <sup>b</sup>
	AG	21	
	GG	3	

<sup>a</sup>DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes and paired tumor samples of the same patients. <sup>b</sup>Numbers do not add to 60 due to missing genotypes.

**Supplementary Table S5** Significant associations of *CASP9* SNPs with clinical data of the PS group of breast carcinoma patients (n=60)

Characteristics				p-Value
	<i>CASP9</i> , rs4645978			
	GG	GA	AA	
ER positive	3	26	9	0.008 <sup>a</sup>
ER negative	9	9	4	
	GG	GA	AA	
PR positive	3	23	9	0.032
PR negative	9	12	4	
	<i>CASP9</i> , rs4646032			
	CC	CT	TT	
ER positive	5	24	9	0.049
ER negative	9	9	4	
	<i>CASP9</i> , rs2020903			
	CC	CT	TT	
ER positive	3	26	9	0.008 <sup>a</sup>
ER negative	9	9	4	
	CC	CT	TT	
PR positive	3	23	9	0.032
PR negative	9	12	4	
	<i>CASP9</i> , rs4646034			
	AA	AG	GG	
ER positive	3	26	9	0.008 <sup>a</sup>
ER negative	9	9	4	
	AA	AG	GG	
PR positive	3	23	9	0.032
PR negative	9	12	4	
	<i>CASP9</i> , rs4661636			
	GG	GA	AA	
ER positive	18	18	2	0.039
ER negative	6	10	6	

p-Values were calculated by the Pearson Chi-square test. ER=estrogen receptor, PR=progesterone receptor. <sup>a</sup>These results passed the Benjamini-Hochberg FDR test for multiple testing (q=0.029). *CASP9* haplotype highlighted in gray.

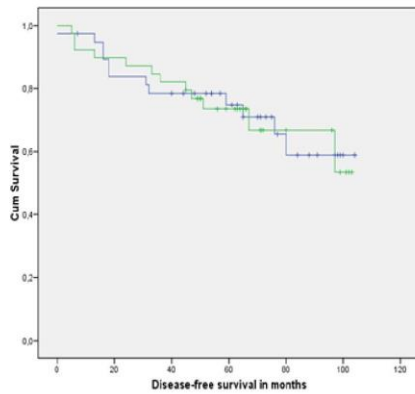
**Supplementary Table S6** Associations of *CASP9* SNP rs2020903 with expression of estrogen receptors in the validation study (n=615).

rs2020903	ER expression <sup>a</sup>		OR <sup>b</sup>	95% CI <sup>b</sup>	p-Value
	negative	positive			
TT	34	88	reference	reference	reference
TC	64	234	0.71	0.44-1.15	0.161
CC	38	155	0.63	0.37-1.08	0.093
C allele	102	389	0.68	0.43-1.07	0.093
T allele <sup>c</sup>	98	322	1.24	0.81-1.89	0.314

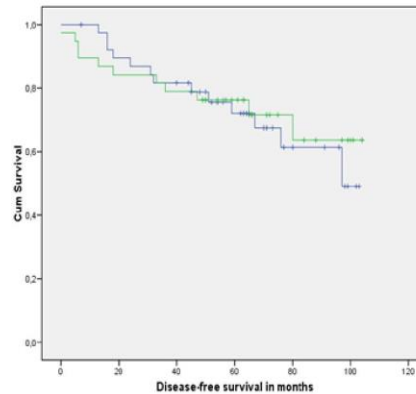
ER=estrogen receptor. <sup>a</sup>Numbers of patients in the compared groups. <sup>b</sup>OR=odds ratio, 95% CI=95% confidence interval. <sup>c</sup>CC genotype as reference.

**Supplementary Figure S1** Associations between transcript levels of caspases in tumors and disease-free survival of pre-treatment breast carcinoma patients (n=77). Kaplan–Meier survival curves for patients with the intratumoral transcript levels below or equal the median (blue line, n=39) vs. patients with the ratio above the median (green line, n=38) are displayed. The difference in the mean DFS between the compared groups of patients was not significant.

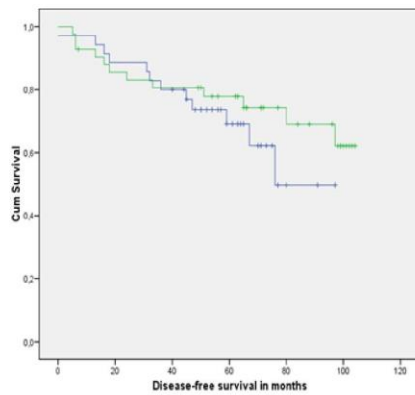
**A CASP2 ( $P=0.867$ , Log Rank test)**



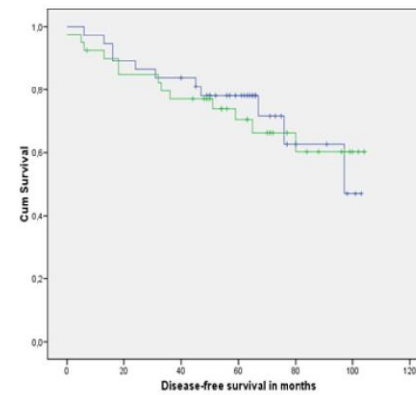
**B CASP3 ( $P=0.760$ , Log Rank test)**



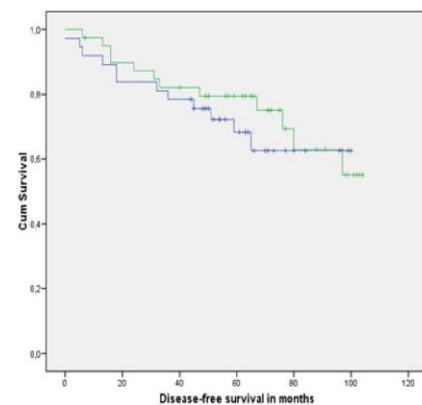
**C CASP3AB ( $P=0.358$ , Log Rank test)**



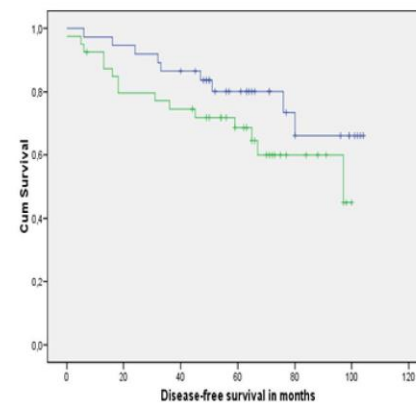
**D CASP3S ( $P=0.865$ , Log Rank test)**



**E CASP3AB/S ( $P=0.579$ , Log Rank test)**

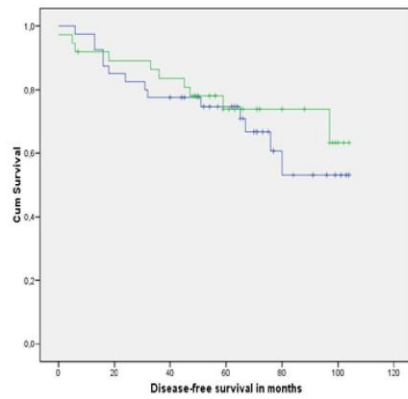


**F CASP7 ( $P=0.155$ , Log Rank test)**

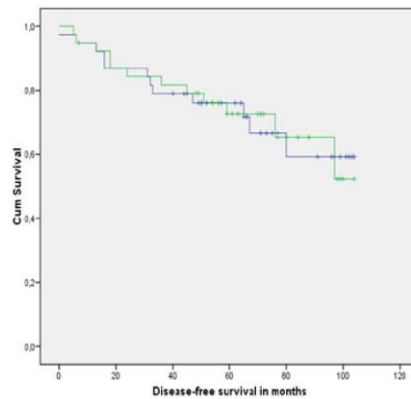


Supplementary Figure S1 Continued

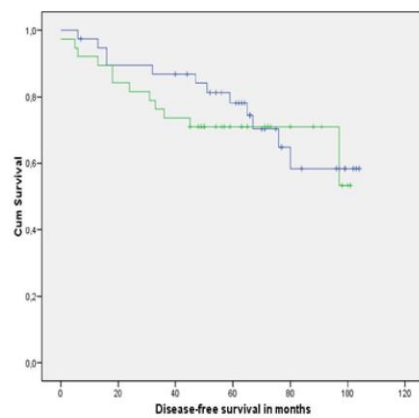
G CASP8 ( $P=0.531$ , Log Rank test)



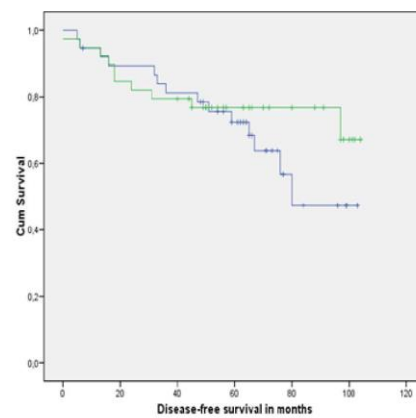
H CASP8L ( $P=0.972$ , Log Rank test)



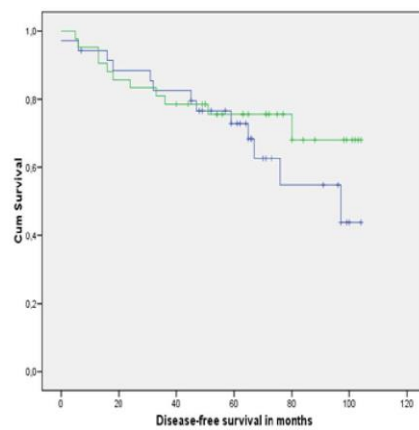
I CASP9 ( $P=0.621$ , Log Rank test)



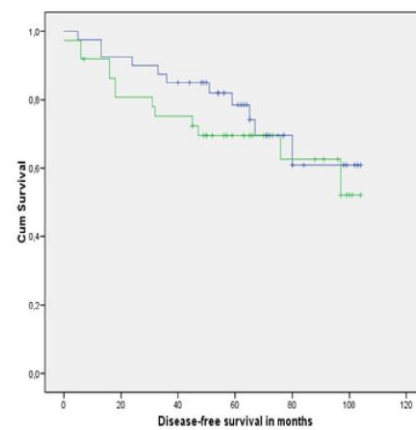
J CASP9A ( $P=0.351$ , Log Rank test)



K CASP9B ( $P=0.381$ , Log Rank test)



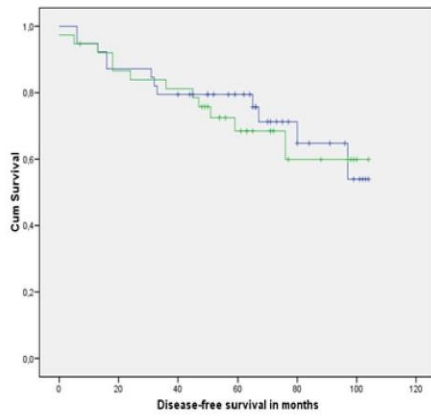
L CASP9A/B ( $P=0.431$ , Log Rank test)





Supplementary Figure S1 Continued

M CASP10 ( $P=0.742$ , Log Rank test)



**Supplementary Figure S2:** Representative results immunoblotting of procaspases and cleaved caspases in tissues from breast carcinoma patients

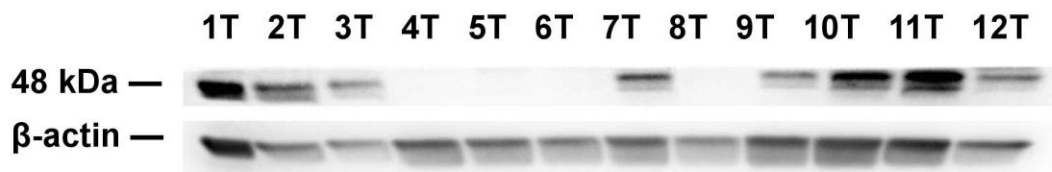
Procaspase-2 (A), procaspase-3 and cleaved form (B), procaspase-7 and cleaved form (C), procaspase-8 and cleaved form (D) procaspase-9 and cleaved form (E) levels in primary breast carcinoma tissues (T) were assessed by immunoblotting as described below.

*Protein isolation and immunoblotting*

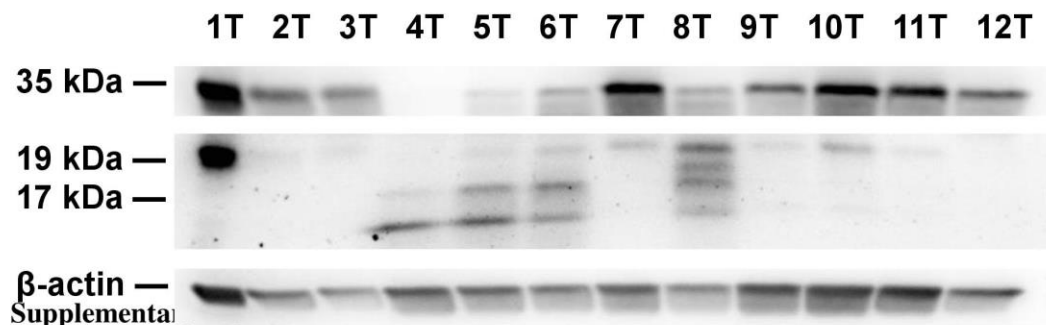
Protein was isolated from tissues by AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen). Protein concentration was determined by bicinchoninic acid assay (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL). Immunoblotting was performed as previously described [19,21] with 10 µg of protein separated by denaturing 12 % polyacrylamide gel electrophoresis.

The following primary antibodies and dilutions were used: β-actin (catalogue no.: A3853, dilution 1:1000) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), caspase-2 (ab32021, 1:1000) from Abcam (Cambridge, UK) and caspase-3 (9668, 1:1000), cleaved caspase-3 (9661, 1:750), caspase-8 (9746, 1:1000), cleaved caspase-8 (9496, 1:750), caspase-9 (9502, 1:1000), and cleaved caspase-9 (9505, 1:750), from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Horseradish peroxidase-conjugated IgG (dilution 1:6600; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) were used as secondary antibodies and protein bands were visualized with an enhanced chemiluminescence detection system (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products) employing Carestream Gel Logic 4000 PRO Imaging System (Carestream Health, New Haven, CT).

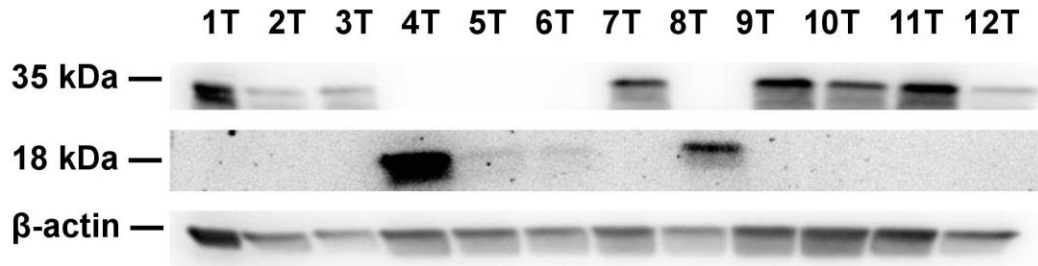
A Procaspase-2 (48 kDa)



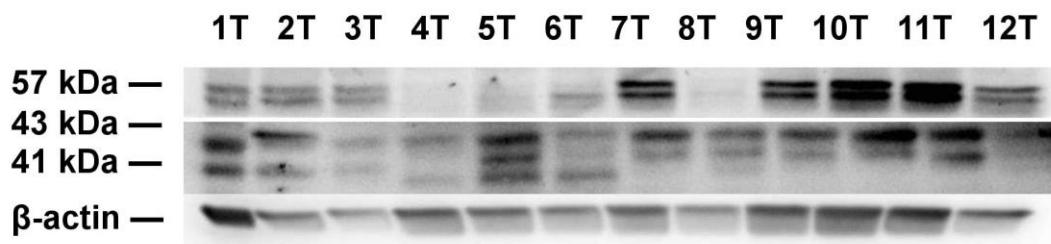
B Procaspase-3 (35 kDa) and cleaved form (17 kDa and 19 kDa)



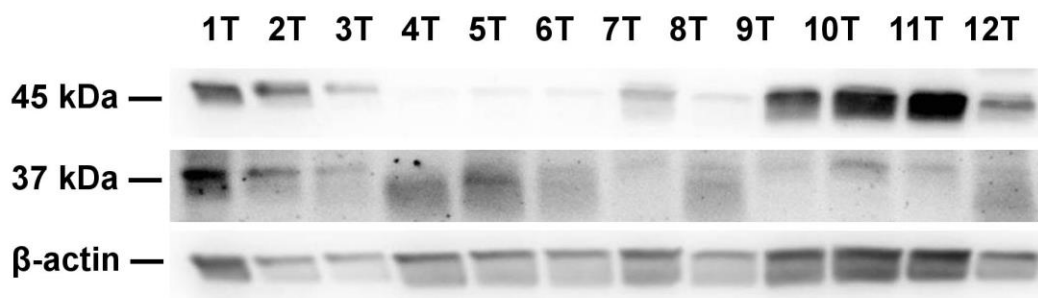
C Procaspase-7 (35 kDa) and cleaved form (18 kDa)



D Procaspase-8 (57 kDa) and cleaved form (18 kDa and 10 kDa)



E Procaspase-9 (45 kDa) and cleaved form (37 kDa)



### 3.4. Článek 3 - Genetic and functional analyses do not explain the association of high PRC1 expression with poor survival of breast carcinoma patients

Biomedicine & Pharmacotherapy 83 (2016) 857–864



Available online at  
**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com/en



## Genetic and functional analyses do not explain the association of high PRC1 expression with poor survival of breast carcinoma patients



Veronika Brynychova<sup>a,b,c</sup>, Marie Ehrlichova<sup>a,c</sup>, Viktor Hlavac<sup>a,b,c</sup>,  
Vlasta Nemcova-Furstova<sup>d</sup>, Vaclav Pecha<sup>e</sup>, Jelena Leva<sup>e</sup>, Marketa Trnkova<sup>f</sup>,  
Marcela Mrhalova<sup>g</sup>, Roman Kodet<sup>g</sup>, David Vrana<sup>h</sup>, Jan Kovar<sup>d</sup>, Radka Vaclavikova<sup>a</sup>,  
Ivan Gut<sup>a</sup>, Pavel Soucek<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup>3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup>Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic

<sup>d</sup>Division of Cell & Molecular Biology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>e</sup>Institute for the Care for Mother and Child, Prague, Czech Republic

<sup>f</sup>Biolab Praha, k.s., Prague, Czech Republic

<sup>g</sup>Department of Pathology and Molecular Medicine, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>h</sup>Department of Oncology, Palacky University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 10 June 2016

Received in revised form 12 July 2016

Accepted 21 July 2016

##### Keywords:

Breast carcinoma

Cytokinesis

Expression

Genetic

Marker

#### ABSTRACT

Microtubules are vitally important for eukaryotic cell division. Therefore, we evaluated the relevance of mitotic kinesin KIF14, protein-regulating cytokinesis 1 (PRC1), and citron kinase (CIT) for the prognosis of breast carcinoma patients.

Transcript levels were assessed by quantitative real-time PCR in tissues from two independent groups of breast carcinoma patients and compared with clinical data. Tissue PRC1 protein levels were estimated using immunoblotting, and the PRC1 tagged haplotype was analyzed in genomic DNA. A functional study was performed in MDA-MB-231 cells *in vitro*.

KIF14, PRC1, and CIT transcripts were overexpressed in tumors compared with control tissues. Tumors without expression of hormonal receptors or high-grade tumors expressed significantly higher KIF14 and PRC1 levels than hormonally-positive or low-grade tumors. Patients with high intra-tumoral PRC1 levels had significantly worse disease-free survival than patients with low levels. PRC1 rs10520699 and rs11852999 polymorphisms were associated with PRC1 transcript levels, but not with patients' survival. Paclitaxel-induced PRC1 expression, but PRC1 knockdown did not modify the paclitaxel cytotoxicity *in vitro*.

PRC1 overexpression predicts poor disease-free survival of patients with breast carcinomas. Genetic variability of PRC1 and the protein interaction with paclitaxel cytotoxicity do not explain this association.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Breast carcinoma (OMIM:114480) is the most frequent malignancy in women [1]. Therefore, it is important to identify and characterize molecular markers enabling personalized treatment and better prognostication of breast carcinoma recurrence.

Cytokinesis is the final act of the cell division and occurs immediately after mitosis [2]. Multiple mitotic kinesins and microtubule-associated proteins act together to direct cytokinesis [3]. Kinesins constitute a superfamily of microtubule-based motor proteins with diverse functions including the participation in cell division, transport of vesicles, organelles, chromosomes, protein complexes, and regulation of microtubule dynamics [4,5].

KIF14 (OMIM:611279) translocates into the positive ends of the microtubules [5] and plays an important role in mid-body formation and completion of the cytokinesis [6]. Silencing of KIF14 leads to failure of cytokinesis [7] suggesting that KIF14 is essential for this process. Overexpression of KIF14 in the 1q

\* Corresponding author at: Toxicogenomics Unit, Department of Toxicology and Safety, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42, Prague 10, Czech Republic.

E-mail address: pavel.soucek@szu.cz (P. Soucek).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.047>

0753-3322/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

chromosome region of genomic gain was observed in breast cancer cells [8]. The KIF14 transcript is overexpressed in tumors and predicts poor survival in breast carcinoma patients [9].

KIF14 interacts with protein regulating cytokinesis 1 (PRC1, OMIM:603484) and forms a complex with citron kinase (CIT, OMIM:605629) [6]. PRC1 promotes the formation of stable microtubule bundles during late mitosis [10] and is required for microtubule polarization and the recruitment of cytokinetic factors during monopolar cytokinesis.

CIT is Rho effector kinase that phosphorylates myosin light chain and acts as an important regulator of midbody formation during late cytokinesis [11,12]. CIT is required for KIF14 localization and its absence in the central spindle area correlates with failure of cytokinesis [6].

PRC1 has been proposed to be marker of worse prognosis in prostate, hepatocellular, and non-small lung carcinoma patients [13–15]. We recently reported the overexpression of KIF14, PRC1, and CIT in ovarian carcinomas versus unaffected ovarian tissues and association of intratumoral CIT levels with the time to progression of ovarian carcinoma patients ( $P < 0.0001$ ; [16]). PRC1 (and KIF14) are grade-associated probe sets identified by PAM (Prediction Analysis of Microarrays) in breast carcinoma [17], and PRC1 was recently associated with prognosis of breast carcinoma patients [18]. However, little is known about the mechanism behind these associations. For example, genetic variability may influence gene expression and analysis of germline polymorphisms presents an attractive pharmacogenetic tool. Thus, we aimed to address this question using a haplotype-tagging approach in the most interesting candidate from the expression study.

This study explored the prognostic significance of KIF14, PRC1, and CIT gene expression in breast carcinoma patients. The previously observed association of PRC1 expression with survival of patients was validated. Therefore, its protein expression and genetic variability were characterized in breast carcinoma patients. The relevance of PRC1 in paclitaxel cytotoxicity *in vitro* was assessed to further understand its mechanism of action.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Patients

Present study included 188 breast carcinoma patients of Caucasian origin diagnosed in The Motol University Hospital, Prague and Institute for the Care for Mother and Child, Prague between 2003 and 2010. Tumor tissues have been collected from 161 of these patients. Paired adjacent control tissues without morphological signs of carcinoma were available for 70 patients. The processing of the tissue samples was described elsewhere [19–21]. Blood samples from 99 of the above described patients were also collected. Blood samples from additional 615 patients for the genotyping validation study were collected from patients treated in The Faculty Hospital Motol, Institute for the Care for Mother and Child, The Faculty Hospital Kralovske Vinohrady (Prague, Czech Republic), and The Hospital Atlas (Zlin, Czech Republic).

Histological classification of carcinomas was performed according to standard diagnostic procedures (Supplementary Table S1). Mitotic counts were evaluated according to Elston and Ellis [22]. Post-treatment group of patients ( $n = 81$ ) was treated by pre-operative regimens containing 5-fluorouracil, anthracycline, cyclophosphamide, and taxanes. Response to pre-operative therapy was evaluated by RECIST criteria [23] based on ultrasonography performed before and after the treatment. The pre-treatment group ( $n = 107$ ) received adjuvant chemotherapy or hormonal therapy after surgery (for all treatments see Supplementary Table S2). Disease-free survival (DFS) was defined as the time elapsed between surgery and disease recurrence.

All patients were asked to read and sign an informed consent and the study was approved by the Ethical Commission of the National Institute of Public Health in Prague. The methods were carried out in accordance with the approved guidelines.

### 2.2. Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated, characterized and transcribed to cDNA as described previously [19]. Real-time PCR quantification (qPCR) of target and reference genes (Supplementary Table S3) was done essentially as previously described [19–21]. The qPCR study design adhered to the MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments; [24]).

### 2.3. Genotyping

Blood samples were collected during the diagnostic procedures using tubes with K3EDTA anticoagulant and genomic DNA was then isolated [19].

DNA sequence covering coding exons, interspersed introns, and sequences surrounding both 5'- and 3'-untranslated regions of PRC1 gene (Chr15:89,310,277–89,338,808; NCBI Build 36.3 version) was analyzed by HaploView v4.2 program with pair-wise tagging [25]. Together 13 single nucleotide polymorphisms (SNPs) tagging common PRC1 haplotypes at  $r^2 > 0.8$  and minor allele frequency (MAF)  $> 0.01$  in HapMap CEU data set with minimally 75% genotype data were identified (Supplementary Table S4). Additional five SNPs were included into analyses due to potentially functional relevance as miRNA binding or CpG site (Table S4). Oligonucleotide primers for these analyses were designed using the Primer3 software [26] and are available from authors upon request. SNPs were analyzed by direct DNA sequencing using Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) and by high resolution melting analysis using RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Ten percent of randomly selected samples were reanalyzed with 100% concordance of results.

PRC1 SNPs were first analyzed in a small-scale exploratory study ( $n = 99$ ) and successful hits were confirmed in the large-scale independent validation study ( $n = 615$ ).

### 2.4. Immunoblotting

Fresh frozen tissue samples from 17 breast carcinoma patients were available for protein expression study. Immunoblotting was performed as previously described [20,27]. Primary monoclonal antibodies against PRC1 (dilution 1:1200, catalogue no.: NB110-57434, Novus Biologicals Ltd, Cambridge, UK) or  $\beta$ -actin (dilution 1:1000; Sigma-Aldrich) were used. Protein bands were visualized with an enhanced chemiluminescence detection system (Thermo Scientific Pierce Protein Research Products) by Carestream Gel Logic 4000 PRO Imaging System (Carestream Health, CT, USA). Densitometry was performed using the Carestream v5.2 program (Carestream Health).

### 2.5. Functional *in vitro* study

Human breast carcinoma MDA-MB-231 cell line (without expression of hormonal receptors and HER2, *i.e.*, triple-negative) was used for PRC1 induction and siRNA-mediated knockdown experiments as previously described [27]. Cells were treated with 10, 30, or 100 nM paclitaxel or untreated for comparison. PRC1 transcript and protein levels were evaluated by qPCR and immunoblotting as described above. Cytotoxicity of paclitaxel was followed by cell cycle analysis using flow cytometry with flow cytometer FACSVersa (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) [28].

## 2.6. Statistical analysis

The results were evaluated by the statistical program SPSS v15.0 (SPSS, Chicago, IL) as previously described [19,27,29]. All *P*-values are departures from two-sided tests. A *P*-value lower than 0.05 was considered statistically significant. The correction for false discovery rate (FDR) was applied according to Benjamini and Hochberg [30] and *q*-values are provided for each comparison except survival analyses where this analysis was not performed. The functional relevance of the examined SNPs was analyzed *in silico* by Regulome DB (<http://regulome.stanford.edu>), Provean, and SIFT (both <http://sift.jcvi.org>) programs. Genetic variants and their observed associations with clinical and functional phenotype were submitted to NCBI (The National Center for Biotechnology Information) ClinVar database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) under accession numbers SCV000167256-77.

## 3. Results

### 3.1. Study population

Clinical data of breast carcinoma patients are presented in Supplementary Tables S1 and S2.

### 3.2. Differences in transcript levels between tumor and control tissues

Significantly higher transcript levels of KIF14, PRC1, and CIT were observed in tumors than controls in the post-treatment group. Significant overexpression of all three genes in tumors from the pre-treatment group of patients was also demonstrated; all results passed the FDR test (Table 1, raw data distribution in Supplementary Fig. S1).

### 3.3. Associations of transcript levels in tumors with clinical characteristics

Transcript levels of KIF14, PRC1, and CIT gradually increased with increasing tumor grade in the post-treatment group. The association for KIF14 and PRC1 in the same direction has also been observed in the pre-treatment group of patients and passed the FDR test (Table 2).

Intra-tumoral levels of all studied genes significantly associated with the expression of hormonal receptors (especially ER) in both

group of patients. Associations for KIF14 and PRC1 passed the FDR test as well as those for CIT and ER (Table 2). Patients with the triple negative breast carcinoma (TNBC) subtype had significantly higher levels of KIF14, PRC1, and CIT in their tumors than the rest of the patients in the post-treatment group. PRC1 expression was associated with the TNBC subtype in the pre-treatment group as well and this association passed the FDR test (Table 2).

In survival analyses, all patients were analyzed first. Patients with higher PRC1 levels than median had worse DFS than patients with lower PRC1 levels (mean  $\pm$  standard error,  $82.5 \pm 5.5$  vs.  $89.1 \pm 4.1$  months,  $n = 146$ ,  $P = 0.003$ , Kaplan-Meier survival plot, Fig. 1). This association was also observed in a subgroup of patients treated with chemotherapy ( $P = 0.010$ ), but not in patients treated with only hormonal therapy. Multivariate analysis using the Cox regression hazard model with pT, pN, grade, ER, PR, and HER2 as covariates confirmed the association of high PRC1 expression with poor DFS in all patients (hazard ratio, HR = 2.27, 95% confidence interval, 95% CI = 1.06–4.76, and  $P = 0.035$ ).

The prognostic significance of PRC1 was further compared with mitotic count in histological sections (by non-parametric Kruskal-Wallis test). Gene expression of PRC1 significantly correlated with mitotic count ( $P = 0.003$ ) although the trend was nonlinear. Unlike gene expression of PRC1, mitotic count did not influence the patients' DFS (Supplementary Fig. S2).

Transcript levels of studied genes did not significantly modify the response of patients to the neoadjuvant treatment in the post-treatment group as a whole (KIF14,  $P = 0.300$ ; PRC1,  $P = 0.401$ ; CIT,  $P = 0.217$ ) nor in the subgroup of patients treated by taxane-containing regimens (KIF14,  $P = 0.651$ ; PRC1,  $P = 0.687$ ; CIT,  $P = 0.600$ ;  $n = 39$ ).

### 3.4. Protein levels of PRC1 in breast tumors

Further, we aimed to determine expression levels of PRC1 protein in subset of breast carcinoma and control tissues. Intratumoral protein levels of PRC1 were assessed by immunoblotting and normalized to  $\beta$ -actin as an internal control. There was a high inter-individual variability in protein levels of PRC1 among the tumor samples (mean  $\pm$  standard deviation,  $0.43 \pm 0.30$ , range 0.06–1.00,  $n = 12$ ; Fig. 2), but it did not correlate to the transcript ( $R^2 = -0.181$ ,  $P = 0.539$ ; Pearson correlation test). PRC1 was overexpressed in tumors versus the paired control tissue samples ( $0.89 \pm 0.95$ , 0.09–3.85 vs.  $0.25 \pm 0.28$ , 0.01–0.68,  $n = 5$  pairs; Supplementary Fig. S3).

### 3.5. Associations of genetic variability of PRC1 with transcript levels and clinical characteristics of patients

We also asked whether the observed PRC1 phenotype deregulation in breast carcinomas has some obvious genetic background and whether PRC1 genotype associates with clinical data of patients. Therefore, 18 SNPs tagging the haplotype of the PRC1 gene region were genotyped in 99 breast carcinoma patients. Four additional SNPs were found in the analyzed sequences (see Supplementary Table S5 for all analyzed SNPs). MAFs of the studied SNPs did not substantially differ from HapMap-CEU population. Considering statistical power, 13 SNPs with MAF > 0.05 were used for analysis of associations with transcript levels and patients' clinical data. Associations of all SNPs with MAF > 0.05 ( $n = 13$ ) with PRC1 transcript levels were analyzed, but to retain a concise style, only significant results are reported (Tables 3 and 4).

Tumors from carriers of the CC genotype in rs10520699 or the T alleles in rs11852999 expressed significantly higher PRC1 transcript levels than tumors from carriers of the T alleles in rs10520699 or CC genotype in rs11852999 (Table 3).

**Table 1**  
Differences in transcript levels of studied genes between tumor and control tissues from breast carcinoma patients.

Post-treatment group of patients (n = 81)			
Gene	Expression difference (fold change) <sup>a</sup>	Tumor vs. control	<i>P</i> -value <sup>b</sup>
KIF14	3.3	↑	<0.001
PRC1	2.1	↑	<0.001
CIT	1.8	↑	0.001
Pre-treatment group of patients (n = 107)			
Gene	Expression difference (fold change) <sup>a</sup>	Tumor vs. control	<i>P</i> -value <sup>b</sup>
KIF14	14.1	↑	<0.001
PRC1	5.3	↑	<0.001
CIT	3.6	↑	<0.001

↑ = overexpression in tumors compared with control tissues.

<sup>a</sup> Expression differences in tumors compared with control tissues calculated by the REST2009 software (Qiagen, Hildesheim, Germany).

<sup>b</sup> *P*-values were calculated by the Mann-Whitney test; all results passed the Benjamini-Hochberg FDR ( $q = 0.017$ ).

**Table 2**

Associations of transcript levels of the examined genes in tumors with clinical data of breast carcinoma patients.

Post-treatment group of patients									
Gene	Grade (n = 74)			PR expression (n = 74)		ER expression (n = 74)		TNBC (n = 74)	
	1	2	3	negative	positive	negative	positive	negative	positive
KIF14	1.30 ± 0.07	1.32 ± 0.08 <b>P = 0.001<sup>a</sup></b>	1.24 ± 0.09	1.22 ± 0.08	1.32 ± 0.08	1.25 ± 0.10	1.30 ± 0.08	1.30 ± 0.09	1.20 ± 0.07
PRC1	1.13 ± 0.03	1.10 ± 0.05 <b>P = 0.004<sup>a</sup></b>	1.07 ± 0.06	1.05 ± 0.06	1.11 ± 0.04	1.06 ± 0.07	1.10 ± 0.05	1.10 ± 0.05	1.04 ± 0.06
CIT	1.11 ± 0.05 <i>P = 0.024<sup>a</sup></i>	1.09 ± 0.04	1.07 ± 0.05	1.06 ± 0.05 <i>P = 0.018<sup>a</sup></i>	1.09 ± 0.04	1.06 ± 0.04 <b>P = 0.008<sup>a</sup></b>	1.09 ± 0.04	1.09 ± 0.04 <i>P = 0.020<sup>a</sup></i>	1.05 ± 0.05
Pre-treatment group of patients									
Gene	Grade (n = 84)			PR expression (n = 87)		ER expression (n = 87)		TNBC (n = 87)	
	1	2	3	negative	positive	negative	positive	negative	positive
KIF14	1.27 ± 0.08	1.22 ± 0.07 <b>P = 0.009<sup>a</sup></b>	1.19 ± 0.07	1.18 ± 0.07	1.25 ± 0.07	1.20 ± 0.08	1.25 ± 0.07	NS	
PRC1	1.08 ± 0.10	1.03 ± 0.06 <b>P = 0.005<sup>a</sup></b>	1.02 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.06 ± 0.05	1.01 ± 0.05	1.06 ± 0.06	1.04 ± 0.06	1.00 ± 0.05
CIT	NS			1.03 ± 0.04 <i>P = 0.038<sup>a</sup></i>	1.05 ± 0.04	1.02 ± 0.04 <b>P = 0.002<sup>a</sup></b>	1.05 ± 0.04	1.05 ± 0.04 <i>P = 0.032<sup>a</sup></i>	1.02 ± 0.05

Values are mean ± standard deviation. For analyses of associations of clinical characteristics with transcript levels in tumors, a ratio of Ct for particular target gene to arithmetic mean of Ct for all reference genes (Target gene/REF) was calculated for each sample. Therefore, the lower is the Target gene/REF ratio the higher is the respective target gene transcript level.

Associations of transcript levels with all clinical data were analyzed, but to retain a concise style only significant results replicated in both patient groups are reported. NS = Not significant.

Associations observed in both groups of patients are depicted in grey tone.

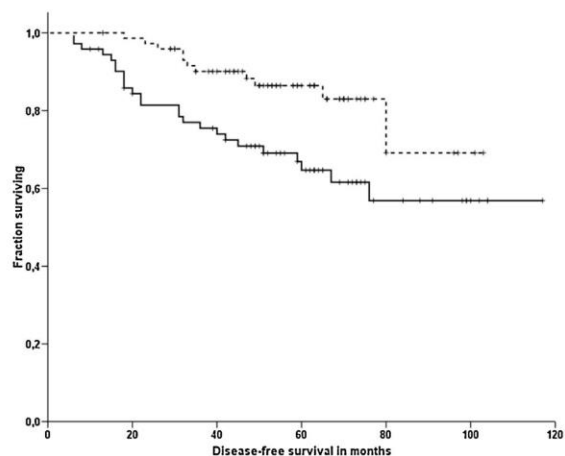
<sup>a</sup> P-values computed by the ANOVA test; results which passed the Benjamini-Hochberg FDR ( $q = 0.009$ ) in bold.

Carriers of the CC genotype in rs10520699 had more frequently large (pT2–4) tumors than T allele carriers (Table 4). Patients with the T allele in rs11852999 more frequently had tumors without expression of ER and often manifested with the TNBC molecular subtype in comparison with carriers of the CC genotype (Table 4). However, none of these associations passed the FDR test.

The genetic analyses suggested that two of the 13 analyzed PRC1 SNPs were associated with PRC1 expression and patients' clinical data. Therefore, we carried out the validation study of these two SNPs (rs10520699 and rs11852999) in an independent and larger sample of breast carcinoma patients who had clinical data for

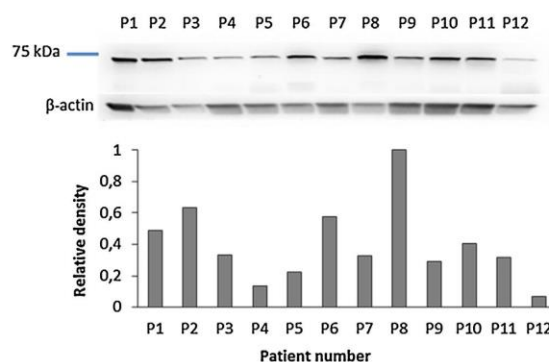
comparison ( $n = 615$ , for clinical data see Supplementary Table S6). None of the previously observed associations (Table 4) was confirmed in this validation study (Supplementary Table S7). The PRC1 SNPs did not significantly associate with the patients' DFS either.

*In silico* analysis by Regulome DB (<http://regulome.stanford.edu>), Provean, and SIFT (both <http://sift.jcvi.org>) programs revealed that the rs10520699 SNP is located close to the binding site of transcription factors from the leucine zipper family BACH1 (OMIM: 602751), MAFK (604877), MAFK (600197), and NFE2 (601490). However, this SNP was classified as having minimal binding evidence (score 4). The same was true for the rs11852999 SNP (score 5).



**Fig. 1.** Association between transcript levels of PRC1 in tumors and disease-free survival of all breast carcinoma patients.

Kaplan–Meier survival curves for patients with the intra-tumoral PRC1 transcript levels above the median (solid line,  $n = 72$ ) vs. patients with the ratio below or equal to the median (dashed line,  $n = 74$ ) are displayed. The difference in the mean DFS between the compared groups of patients was significant ( $P = 0.003$ , Breslow test).



**Fig. 2.** Protein levels of PRC1 in tissues from breast carcinoma patients. PRC1 level was assessed by immunoblotting in tumor tissues. For evaluation of the results, densitometry with normalization to  $\beta$ -actin was used. Cropped areas of blots represent protein bands with molecular weight of the corresponding antigen according to Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). kDa = kilodalton (used to describe the molecular weight of proteins), P = Patient.

**Table 3**  
Association of *PRC1* gene polymorphisms with transcript levels of *PRC1* in tumors from breast carcinoma patients.

Genotype	n	Normalized <i>PRC1</i> levels in tumors (Mean ± S.D.)
<b>rs10520699</b>		
CC	55	1.08 ± 0.06
CT or TT	18	1.11 ± 0.04
Total	73 <sup>b</sup>	–
<i>P</i> -value		0.041 <sup>a</sup>
Benjamini-Hochberg <i>q</i> -value		0.007
<b>rs11852999</b>		
CC	56	1.10 ± 0.06
CT or TT	15	1.06 ± 0.06
Total	71 <sup>b</sup>	–
<i>P</i> -value		0.026 <sup>a</sup>
Benjamini-Hochberg <i>q</i> -value		0.004

Associations of all SNPs with MAF > 0.05 (n = 13) with *PRC1* transcript levels were analyzed, but to retain a concise style only significant results are reported. S.D.=standard deviation, n= number of patients.

<sup>a</sup> Analyzed by the ANOVA test. The higher is the mean the lower is the normalized *PRC1* level (see Table 2 for explanation).

<sup>b</sup> Numbers do not add to 99 due to the missing genotypes or lack of material for *PRC1* expression analysis in some patients.

**Table 4**  
Associations of *PRC1* polymorphisms with clinical data of breast carcinoma patients.

Characteristics	rs10520699 <sup>a</sup>		<i>P</i> -value <sup>b</sup>
	CC	CT or TT	
pT1	33	21	0.009
pT2-4	34	5	
Benjamini-Hochberg <i>q</i> -value			0.005
Characteristics	rs11852999 <sup>a</sup>		<i>P</i> -value <sup>b</sup>
	CC	CT or TT	
ER-positive	64	8	0.010
ER-negative	15	9	
Benjamini-Hochberg <i>q</i> -value			0.005
Characteristics	rs11852999 <sup>a</sup>		<i>P</i> -value <sup>b</sup>
	CC	CT or TT	
TNBC	9	6	0.024
Other	70	11	
Benjamini-Hochberg <i>q</i> -value			0.009

Number of patients presented. Associations of all SNPs with MAF > 0.05 (n = 13) with all clinical data were analyzed, but to retain a concise style only significant results are reported.

pT = pathological size of tumor, ER = estrogen receptor, TNBC = triple negative breast carcinoma.

<sup>a</sup> Numbers do not add to 99 due to missing genotypes or clinical data.

<sup>b</sup> Analyzed by the Pearson's Chi Square test.

### 3.6. *in vitro* functional study

In order to evaluate potential interactions between *PRC1* expression and cancer therapy outcome, the human triple-negative breast carcinoma MDA-MB-231 cell line was incubated without (control) or with 10, 30, and 100 nM paclitaxel *in vitro*. *PRC1* transcript and protein levels were evaluated by qPCR and immunoblotting 12 and 24 h after addition of the drug. Paclitaxel induced slight overexpression of both transcript and protein levels of *PRC1* (Fig. 3).

For analysis of taxane cytotoxicity, *PRC1* knockdown was performed. 10 or 20 nM siRNA decreased cell proliferation and therefore 5 nM siRNA concentration was used (Fig. 4A). However, siRNA-directed knockdown of *PRC1* transcript expression had no substantial effect on the proliferation of MDA-MB-231 cells after treatment with two G2/M block inducing concentrations (30 and 100 nM) of paclitaxel (Fig. 4B).

## 4. Discussion

Here, we followed the prognostic significance of three principal regulators of cytokinesis [6,7,11] for breast carcinoma patients. We observed strong association of *PRC1* expression with DFS of the patients and subsequently examined the genetic and functional basis for this association.

The primary indication that *PRC1* is a putative prognostic marker in breast carcinoma is based on several observations. First, its expression is increased more than two-fold in mammary tumors compared with non-neoplastic tissues, which is consistent with the gene expression data in Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa>). It gradually increases with grade suggesting association with the aggressiveness of the disease. Moreover, its expression is significantly higher in tumors without expression of hormonal receptors and in tumors from TNBC patients (the worst prognosis group). These associations were found in two independent groups of patients and passed the FDR test for multiple comparisons.

Associations with clinical factors of poor prognosis are corroborated by the fact that patients with high intratumoral *PRC1* levels had significantly worse DFS than those with low levels. This association is highly significant in both univariate and multivariate analyses and suggests that *PRC1* is independent of clinically used prognostic factors such as stage, grade, and expression of receptors.

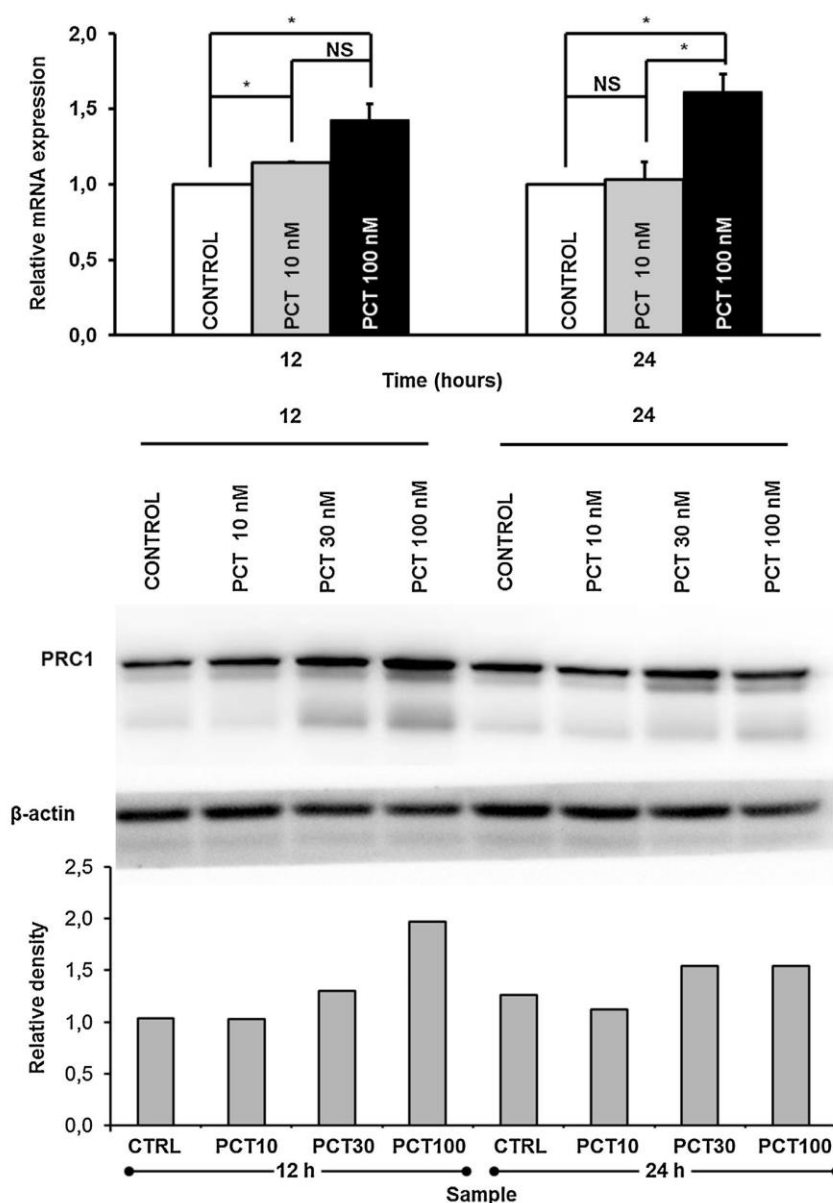
It is particularly interesting that *PRC1* is a part of the 70-gene [31] and 64-gene [32] sets previously found to have a prognostic value in breast carcinoma patients. *PRC1* (and *KIF14*) are among the top 264 statistically significant grade-associated probe sets identified by PAM in breast carcinoma [17]. Our data supports and further extends the previous study, which suggested that *PRC1* together with other four genes (*FGF18*, *OMIM:603726*; *BCL2*, *OMIM:151430*; *MMP9*, *OMIM:120361*; and *SERF1A*, *OMIM:603011*) influences prognosis of breast carcinoma patients [18]. In contrast with the previous study using FFPE preparations [18], we used fresh frozen tissues and TaqMan assays rather than SYBR Green for qPCR analysis. Despite some methodical differences, this study confirmed *PRC1* to be a putative prognostic marker in breast carcinoma patients.

Protein analysis further underlined the results of our gene expression study. The *PRC1* protein overexpression in mammary tumors has already been reported [33,34], but no study addressed the correlation between *PRC1* transcript and protein levels in breast carcinoma specimens so far. Although, due to the sample scarcity, the sample set for protein expression used by us is quite small, we observed no such correlation. The reasons for the lack of correlation between transcript and protein levels observed here include different normalization controls for qPCR and immunoblotting [35], posttranscriptional processing and protein stability issues. However, data on these *PRC1* features is missing from the literature.

All observed associations of molecular markers with clinical data should be supported by mechanistic data. Therefore, we further asked whether the genetic variability in *PRC1* gene influences its expression and whether modulation of *PRC1* expression modifies the efficacy of paclitaxel in a cell model of triple negative breast carcinoma *in vitro*.

The clinical and functional significance of genetic variation in *PRC1* was completely unknown until now. We addressed this question using a haplotype-tagging approach. Analysis of 22 SNPs covering the whole *PRC1* gene showed association of rs10520699 and rs11852999 SNPs with intra-tumoral transcript levels of *PRC1*. These two SNPs also significantly associated with clinical characteristics of breast carcinoma patients. We further aimed to validate our results in an independent large-scale study.





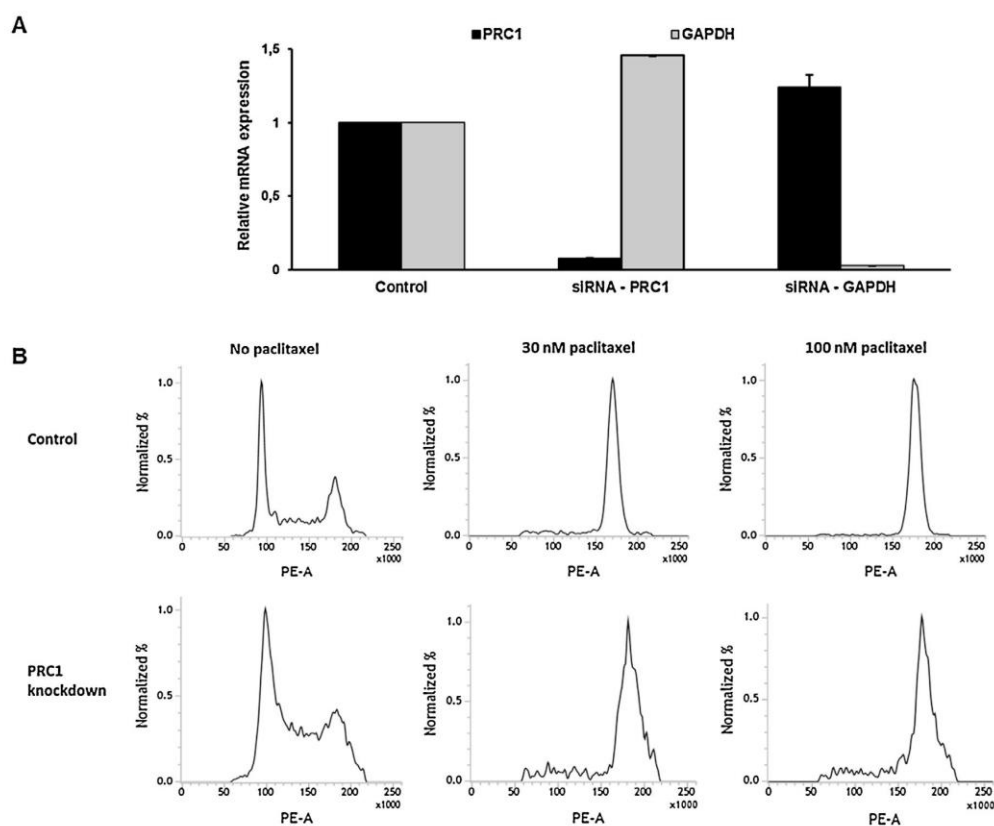
**Fig. 3.** Induction of PRC1 transcript and protein expression by paclitaxel.

Human breast carcinoma MDA-MB-231 cell line was incubated without (control) or with 10, 30, or 100 nM paclitaxel (PCT). PRC1 transcript (upper part) and protein (lower part) levels were then evaluated by qPCR and immunoblotting as described in Methods. Cropped areas of blots represent protein bands with molecular weight of the corresponding antigen according to Human Protein Atlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Two independent experiments in duplicates were performed (NS=non-significant, \* $P < 0.05$ ).

However, this validation study failed to replicate the previously observed associations with clinical data, and it has not shown a significant association with patient DFS values. Thus the validation genetic study did not explain the previously suggested link between PRC1 expression, DFS, and genotype.

Moreover, we found no confirmatory data in the Catalog of Published Genome-Wide Association Studies at NHGRI ([www.genome.gov](http://www.genome.gov)) and GWAS Central ([www.gwascentral.org](http://www.gwascentral.org)).

Additionally, no associations between PRC1 transcript levels and its SNPs have been reported by the International HapMap Project [36]. *In silico* analyses performed within the scope of the present study also showed no functional relevance of PRC1 SNPs associated with its expression and clinical phenotypes. This data presents several lines of evidence that the observed association of PRC1 expression with DFS of breast carcinoma patients most likely has no obvious genetic background.



**Fig. 4.** Influence of PRC1 expression knockdown on paclitaxel cytotoxicity. PRC1 expression was silenced by 5 nM siRNA in human breast carcinoma MDA-MB-231 cell line as documented by qPCR (a). Cells were then incubated without (control) or with 30 or 100 nM paclitaxel (PCT) and cell cycle was analyzed by flow cytometry (b) as described in Methods. Two independent experiments in duplicates were performed.

It seemed interesting to discern effects of constitutive PRC1 level from its eventual modification by anticancer drug treatment. This is challenging in *ex vivo* samples from patients due to the fact that post-treatment surgical specimens are available several weeks after last chemotherapy dose and thus eventually changed expression of the marker may level off to the pre-treatment levels. Therefore, we monitored PRC1 expression after exposure of TNBC model MDA-MB-231 human cell line to paclitaxel (frequently used in the treatment of breast carcinoma patients) *in vitro*. Paclitaxel induced both transcript and protein PRC1 levels *in vitro*. This result was surprising, because paclitaxel was clearly cytotoxic to the cells and induced formation of G2/M block, a major proof of its mechanism of action [37]. Thus, PRC1 induction by drug treatment may present one of defense mechanisms of TNBC tumor cells against paclitaxel's cytotoxicity. We thus hypothesized that PRC1 knockdown could potentiate cytotoxic effect of paclitaxel. However, siRNA-mediated knockdown of PRC1 in this model did not influence cytotoxicity of paclitaxel as G2/M block was formed in both control and silenced cells. Thus, the above functional evidence and the fact that the response of patients to the taxane-containing regimens did not differ by the PRC1 expression demonstrate that PRC1 most probably does not modify the cytotoxic effect of taxane treatment.

Taken together, our novel data shows that the observed association of PRC1 transcript expression with DFS of breast

carcinoma patients does not have plausible functional explanation. It cannot be excluded that PRC1 level just correlates with the percentage of proliferating cells that would naturally be higher in proliferating tumor cells and even higher in poorly differentiated ones in contrast to control tissue (both phenomena observed in the present study). In this case, PRC1 would be an indirect marker of proliferation without importance as predictive marker or therapy target. In our opinion, it should be further established, *e.g.*, by analysis of circulating tumor cells, whether PRC1 could serve as a marker of residual disease or expansion of aggressive tumor cell clones.

This study also confirms the previously observed overexpression of KIF14 in mammary tumors and its association with grade, but we have not found the published association of high KIF14 levels with poor DFS of breast carcinoma patients [9]. KIF14 has recently been suggested to be a putative therapeutic target in TNBC patients [38,39]. The association of KIF14 with TNBC subtype observed here agrees with the concept that further research on the role of KIF14 in the therapeutic outcome is needed specifically in TNBC patients.

CIT is overexpressed in mammary tumors and significantly associates with the ER expression of both groups of patients in the present study. Despite reports on the association of CIT with the time to progression of ovarian carcinoma [16] and its

overexpression in hepatocellular carcinoma [40], no further data on the importance of CIT for cancer progression is available.

## 5. Conclusions

This study shows that high intra-tumoral PRC1 expression is marker of poor prognosis and may be an additional prognostic classifier of breast carcinomas. Our data also shows that the observed prognostic role of PRC1 is not linked to its genetic variability and does not modify anticancer effects of paclitaxel. The study has additional possible explanations of epigenetic regulation or simple co-segregation with other molecular factors. This needs further attention.

## Disclosure of potential conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Health of the Czech Republic, (grant No. 15-25618A to P.S.), by the National Sustainability Program I (NPU I) provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic (No. LO1503 to M.E., V.B, V. H., and P.S.) and by the GAUK project (No. 1444313 to V.B.).

Authors wish to thank Dr. Anastassiya Zidkova from Institute of Biology and Medical Genetics of the First Faculty of Medicine, Charles University, Prague for STR authentication of MDA-MB-231 cell line.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.047>.

## References

- [1] J. Ferlay, H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, GLOBOCAN, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2008.
- [2] K.Y. Lee, T. Davies, M. Mishima, Cytokinesis microtubule organisers at a glance, *J. Cell. Sci.* 125 (2012) 3495–3500.
- [3] M. Glotzer, The 3Ms of central spindle assembly: microtubules motors and MAPs, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 10 (2009) 9–20.
- [4] H. Miki, Y. Okada, N. Hirokawa, Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function, *Trends Cell. Biol.* 15 (2005) 467–476.
- [5] L. Wordeman, How kinesin motor proteins drive mitotic spindle function: lessons from molecular assays, *Semin. Cell. Dev. Biol.* 21 (2010) 260–268.
- [6] U. Gruneberg, R. Neef, X. Li, E.H. Chan, R.B. Chalamalasetty, E.A. Nigg, et al., KIF14 and CITron kinase act together to promote efficient cytokinesis, *J. Cell. Biol.* 172 (2006) 363–372.
- [7] M. Carleton, M. Mao, M. Biery, P. Warrenner, S. Kim, C. Buser, et al., RNA interference-mediated silencing of mitotic kinesin KIF14 disrupts cell cycle progression and induces cytokinesis failure, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 3853–3863.
- [8] T.W. Corson, A. Huang, M.S. Tsao, B.L. Gallie, KIF14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers, *Oncogene* 24 (2005) 4741–4753.
- [9] T.W. Corson, B.L. Gallie, KIF14 mRNA expression is a predictor of grade and outcome in breast cancer, *Int. J. Cancer* 119 (2006) 1088–1094.
- [10] C. Mollinari, J.P. Kleman, W. Jiang, G. Schoehn, T. Hunter, R.L. Margolis, PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone, *J. Cell. Biol.* 157 (2002) 1175–1186.
- [11] J.E. Hornick, K. Karanjeet, E.S. Collins, E.H. Hinchliffe, Kinesins to the core: the role of microtubule-based motor proteins in building the mitotic spindle midzone, *Semin. Cell Dev. Biol.* 21 (2010) 290–299.
- [12] Z.I. Bassi, M. Audusseau, M.G. Riparbelli, G. Callaini, P.P. D'Avino, Citron kinase controls a molecular network required for midbody formation in cytokinesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110 (2013) 9782–9787.
- [13] H.W. Luo, Q.B. Chen, Y.P. Wan, G.X. Chen, Y.J. Zhuo, Z.D. Cai, et al., Protein regulator of cytokinesis 1 overexpression predicts biochemical recurrence in men with prostate cancer, *Biomed. Pharmacother.* 78 (2016) 116–120.
- [14] J. Chen, M. Rajasekaran, H. Xia, X. Zhang, S.N. Kong, K. Sekar, et al., The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway, *Gut* (2016), doi:<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310625>.
- [15] G. Tang, C. Xiao, J. Behrens, J. Schiller, C.W. Allen, et al., A 12-gene set predicts survival benefits from adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer patients, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 1577–1586.
- [16] M. Ehrlichova, B. Mohelnikova-Duchonova, J. Hrdy, V. Brynychova, M. Mrhalova, R. Kodet, et al., The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma, *Genomics* 102 (2013) 96–101.
- [17] A.V. Ivshina, J. George, O. Senko, B. Mow, T.C. Putti, J. Smeds, et al., Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer, *Cancer Res.* 66 (2006) 10292–10301.
- [18] G. Mustacchi, M.P. Sormani, P. Bruzzi, A. Gennari, F. Zanconati, D. Bonifacio, et al., Identification and validation of a new set of five genes for prediction of risk in early breast cancer, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 9686–9702.
- [19] M. Hubackova, R. Vaclavikova, M. Ehrlichova, M. Mrhalova, R. Kodet, K. Kubackova, et al., Association of superoxide dismutases and NAD(P)H oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas, *Int. J. Cancer.* 130 (2012) 338–348.
- [20] V. Brynychová, V. Hlaváč, M. Ehrlichová, R. Václavíková, V. Pecha, M. Trnková, et al., Importance of transcript levels of caspase-2 isoforms S and L for breast carcinoma progression, *Future Oncol.* 9 (2013) 427–438.
- [21] V. Hlaváč, V. Brynychová, R. Václavíková, M. Ehrlichová, D. Vrána, V. Pecha, et al., The expression profile of ABC transporter genes in breast carcinoma, *Pharmacogenomics* 14 (2013) 515–529.
- [22] C.W. Elston, I.O. Ellis, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up, *Histopathology* 19 (1991) 403–410.
- [23] P. Therasse, S.G. Arbuck, E.A. Eisenhauer, J. Wanders, R.S. Kaplan, L. Rubinstein, et al., New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States National Cancer Institute of Canada, *J. Natl. Cancer Inst.* 92 (2000) 205–216.
- [24] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, et al., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622.
- [25] J.C. Barrett, B. Fry, J. Maller, M.J. Daly, Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps, *Bioinformatics* 21 (2005) 263–265.
- [26] A. Untergrasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm, et al., Primer3—new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Res.* 10 (2012) e115.
- [27] V. Hlaváč, V. Brynychová, R. Václavíková, M. Ehrlichová, D. Vrána, V. Pecha, et al., The role of cytochromes P450 and aldo-keto reductases in prognosis of breast carcinoma patients, *Medicine (Baltimore)* 93 (2014) e255.
- [28] M. Ehrlichová, I. Ojima, J. Chen, R. Václavíková, V. Němcová-Fürstová, J. Voborilová, et al., Transport metabolism, cytotoxicity and effects of novel taxanes on the cell cycle in MDA-MB-435 and NCI/ADR-RES cells, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 385 (2012) 1035–1048.
- [29] T. Kunická, R. Václavíková, V. Hlaváč, D. Vrána, V. Pecha, K. Rauš, et al., Non-coding polymorphisms in nucleotide binding domain 1 in ABCC1 gene associate with transcript level and survival of patients with breast cancer, *PLoS One* 9 (2014) e101740.
- [30] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. Roy. Stat. Soc. B. Met.* 57 (1995) 289–300.
- [31] L.J. van't Veer, H. Dai, M.J. van de Vijver, Y.D. He, A.A. Hart, M. Mao, et al., Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature* 415 (2002) 530–536.
- [32] Y. Pawitan, J. Bjöhle, L. Amler, A.L. Borg, S. Eghazi, P. Hall, et al., Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts, *Breast Cancer Res.* 7 (2005) R953–964.
- [33] A. Shimo, T. Nishidate, T. Ohta, M. Fukuda, Y. Nakamura, T. Katagiri, Elevated expression of protein regulator of cytokinesis 1, involved in the growth of breast cancer cells, *Cancer Sci.* 98 (2007) 174–181.
- [34] H.J. Yun, Y.H. Cho, Y. Moon, Y.W. Park, H.K. Yoon, Y.J. Kim, et al., Transcriptional targeting of gene expression in breast cancer by the promoters of protein regulator of cytokinesis 1 and ribonuclease reductase 2, *Exp. Mol. Med.* 40 (2008) 345–353.
- [35] L. Wu, X. Hu, H. Tang, Z. Han, Y. Chen, Valid application of western blotting, *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 3517–3520.
- [36] V.G. Cheung, R.S. Spielman, K.G. Ewens, T.M. Weber, M. Morley, J.T. Burdick, Mapping determinants of human gene expression by regional and genome-wide association, *Nature* 437 (2005) 1365–1369.
- [37] P.B. Schiff, S.B. Horwitz, Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells, *PNAS* 77 (1980) 1561–1565.
- [38] S.M. Singel, C. Cornelius, K. Batten, G. Fasciani, W.E. Wright, L. Lum, et al., A targeted RNAi screen of the breast cancer genome identifies KIF14 and TLN1 as genes that modulate docetaxel chemosensitivity in triple-negative breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 19 (2013) 2061–2070.
- [39] S.M. Singel, C. Cornelius, E. Zaganjor, K. Batten, V.R. Sarode, D.L. Buckley, et al., KIF14 promotes AKT phosphorylation and contributes to chemoresistance in triple-negative breast cancer, *Neoplasia* 16 (2014) 247–256 (e2).
- [40] Y. Fu, J. Huang, K.S. Wang, X. Zhang, Z.G. Han, RNA interference targeting CITRON can significantly inhibit the proliferation of hepatocellular carcinoma cells, *Mol. Biol. Rep.* 38 (2011) 693–702.

## Supplementary Electronic Material

### Genetic and functional analyses do not explain the association of high PRC1 expression with poor survival of breast carcinoma patients

Veronika Brynychova<sup>1,2,3</sup>, Marie Ehrlichova<sup>1,3</sup>, Viktor Hlavac<sup>1,2,3</sup>, Vlasta Nemcova<sup>4</sup>, Vaclav Pecha<sup>5</sup>, Jelena Leva<sup>5</sup>, Marketa Trnkova<sup>6</sup>, Marcela Mrhalova<sup>7</sup>, Roman Kodet<sup>7</sup>, David Vrana<sup>8</sup>, Jan Kovar<sup>4</sup>, Radka Vaclavikova<sup>1</sup>, Ivan Gut<sup>1</sup>, and Pavel Soucek<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>*Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic*

<sup>2</sup>*3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic*

<sup>3</sup>*Biomedical Centre, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University in Prague, Plzen, Czech Republic*

<sup>4</sup>*Division of Cell & Molecular Biology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic*

<sup>5</sup>*Institute for the Care for Mother and Child, Prague, Czech Republic*

<sup>6</sup>*Biolab Praha, k.s., Prague, Czech Republic*

<sup>7</sup>*Department of Pathology and Molecular Medicine, Motol University Hospital, Prague 5, Czech Republic*

<sup>8</sup>*Department of Oncology, Palacky University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic*

**\*Address for correspondence:** Pavel Souček, PhD, Toxicogenomics Unit, Department of Toxicology and Safety, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42, Prague 10, Czech Republic, phone: +420 2 6708 2711; fax: +420 2 6731 1236; e-mail: psoucek@szu.cz

**Supplementary Table S1:** Clinical characteristics of breast carcinoma patients

<b>Characteristics</b>	<b>Post-treatment group<sup>1</sup></b>	<b>Pre-treatment group<sup>1</sup></b>
<i>Age at diagnosis, median ± S.D., years</i>	54.0 ± 11.0	59.0 ± 11.6
<i>Menopausal status</i>		
premenopausal	33 (40.7)	17 (15.9)
postmenopausal	48 (59.3)	90 (84.1)
<i>Pathological stage</i>		
I	25 (32.9)	42 (42.4)
II	38 (50.0)	46 (46.5)
III	12 (15.8)	11 (11.1)
IV	1 (1.3)	0
not available	5	8
<i>Tumor size, median ± S.D., mm</i>	20.0 ± 15.8	17.0 ± 8.8
<i>Lymph node metastasis</i>		
positive (pN1-3)	43 (54.4)	66 (64.7)
negative (pN0)	36 (45.6)	36 (35.3)
pNx	2	5
<i>Histological type</i>		
invasive duct carcinoma	67 (82.7)	89 (83.2)
other type <sup>2</sup>	14 (17.3)	18 (16.8)
<i>Histological grade</i>		
G1	10 (12.7)	23 (22.1)
G2	41 (51.9)	62 (59.6)
G3	28 (35.4)	19 (18.3)
Gx	2	3
<i>Mitotic counts</i>		
1	27 (40.3)	51 (65.4)
2	22 (32.8)	18 (23.16)
3	18 (26.9)	9 (11.5)
not available	14	29
<i>Estrogen receptor expression</i>		
positive	56 (69.1)	74 (69.2)
negative	25 (30.9)	33 (30.8)
<i>Progesterone receptor expression</i>		
positive	58 (71.6)	65 (60.7)
negative	23 (28.4)	42 (39.3)
<i>HER2 expression</i>		
positive	19 (23.8)	25 (23.6)
negative	61 (76.7)	81 (76.4)
not available	1	1
<i>Molecular subtype</i>		
TNBC	11 (13.6)	17 (15.9)
other	69 (86.4)	89 (84.1)
not available	1	1
<i>Response to neoadjuvant chemotherapy</i>		not applicable
complete or partial response	38 (46.9)	
stable disease or progression	24 (29.6)	
not available	19 (23.5)	

Footnotes:

<sup>1</sup>Number of patients with percentage in parentheses.<sup>2</sup>Other tumor types involved invasive lobular, mucinous, ductal in situ, medullary, comedo, and solid neuroendocrine carcinomas.

**Supplementary Table S2:** Chemotherapy and hormonal therapy regimens in breast carcinoma patients

Characteristics	Type	N <sup>1</sup>	%
<b>Neoadjuvant regimen (n=81)</b>	Anthracycline in combination <sup>2</sup>	77	96.3
	Taxane alone	1	1.2
	Hormonal therapy	2	2.5
<b>Adjuvant regimen (n=56)</b>	Anthracycline in combination	44	78.6
	Taxane in combination	5	8.9
	CMF only <sup>3</sup>	7	12.5
<b>Hormonal regimen (n=76)</b>	Tamoxifen only	45	59.2
	Aromatase inhibitors only	15	21.0
	Tamoxifen and aromatase inhibitors	16	26.8

Footnotes:

<sup>1</sup>Information about regimen was not available in one patient from the testing group and in five patients from the validation group.

<sup>2</sup>Usually FAC/FEC or combination with taxane (AT, ED, etc.).

<sup>3</sup>CMF=cyclophosphamide/methotrexate/5-fluorouracil combination

**Supplementary Table S3:** Gene expression assays used in the study

<b>Gene symbol</b>	<b>Assay ID</b>	<b>NCBI Gene ID</b>	<b>Gene name</b>	<b>Amplicon length (bp)</b>
<b>Reference genes</b>				
IPO8	Hs00183533_m1	10526	Importin 8	71
EIF2B1	Hs00426752_m1	1967	Eukaryotic translation initiation factor 2B	75
MRPL19	Hs00608519_m1	9801	Mitochondrial ribosomal protein L19	72
<b>Target genes</b>				
KIF14	Hs00978216_m1	9928	Kinesin family member 14	119
CIT	Hs00392339_m1	11113	Citron (rho-interacting, serin/threonine kinase 21)	68
PRC1	Hs00187740_m1	9055	Protein regulator of cytokinesis 1	66

**Supplementary Table S4: *PRCI* SNPs analyzed in the study**

**A/ Haplotype tagging SNPs**

Analyzed SNP	SNPs covered by test	HGVS description <sup>1</sup>	MAF <sup>2</sup>
rs8031684	rs8031684	NC_000015.9:g.91527451T>A	0.15
	rs8028856	NC_000015.10:g.90987590A>G	0.19
rs2301826	rs2301826	NC_000015.9:g.91525197C>T	0.17
		NP_001254509.1:p.Thr53Thr	
rs11855081	rs11855081	NC_000015.9:g.91525414T>C	0.05
	rs11857612	NC_000015.9:g.91525318C>T	0.05
rs6496742	rs6496742	NC_000015.9:g.91523036C>T	0.20
rs190852637	rs190852637	NC_000015.9:g.91522990A>G	
rs10520699	rs10520699	NC_000015.9:g.91522966G>A	0.18
rs59025289	rs59025289	NC_000015.9:g.91522965C>T	
rs186031385	rs186031385	NC_000015.9:g.91522899T>C	
rs12898311	rs12898311	NC_000015.9:g.91517780G>C	0.24
rs17636091	rs17636091	NC_000015.9:g.91517479G>A	0.05
rs11852999	rs11852999	NC_000015.9:g.91514760C>T	0.03
rs12911192	rs12911192	NC_000015.9:g.91513674T>C	0.07
		NP_001254509.1:p.Tyr470Cys	
rs12910825	rs12910825	NC_000015.9:g.91511260A>G	0.33
rs14280	rs14280	NC_000015.9:g.91509734A>G	0.12
rs7601	rs7601	NC_000015.9:g.91509592T>C	0.26

**B/ Additional functionally interesting SNPs**

Analyzed SNP	Reason	HGVS description <sup>1</sup>	MAF <sup>2</sup>
rs71463782	CpG low intragenic area	NC_000015.9:g.91517599_91517600insGGCTCCCCGTTCCACAAGCCCCGGTCCCCGCTCCCCGTTCCACAAGCCCCGGTCCCC	unknown
rs112187198	miRNA binding sequence	NC_000015.9:g.91510019T>C	unknown
rs3743450	miRNA binding sequence	NC_000015.9:g.91509920G>T	0.05
rs112770009	miRNA binding sequence	NC_000015.9:g.91509628C>T	unknown
rs15172	miRNA binding sequence	NC_000015.9:g.91509442C>A	0

Footnotes:

<sup>1</sup>Checked by Mutalyzer v2.0 (<https://mutalyzer.nl/snp>; Wildeman et al. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Hum. Mutat.*, 2008; **29**, 6-13.

<sup>2</sup>MAF=minor allele frequency according to HapMap CEU data.



**Supplementary Table S5:** Distribution of *PRCI* polymorphisms in breast carcinoma patients

SNP ID/Localization	Genotype	N	MAF <sup>1</sup>
rs11855081 intron 2	TT	88	C (0.04)
	TC	6	
	CC	1	
rs11857612 intron 2	CC	87	T (0.05)
	CT	7	
	TT	1	
rs2301826 exon 2	GG	64	A (0.18)
	GA	28	
	AA	3	
rs8028856 intron 2	GG	54	A (0.25)
	GA	33	
	AA	7	
rs8031684 intron 2	TT	66	A (0.17)
	TA	23	
	AA	4	
rs6496742 intron 6	CC	62	T (0.18)
	CT	27	
	TT	3	
rs190852637 intron 6	AA	97	A (0.0)
	AG	0	
	GG	0	
rs10520699 intron 6	CC	70	T (0.16)
	CT	22	
	TT	5	
rs59025289 intron 6	CC	97	T (0.0)
	CT	0	
	TT	0	
rs186031385 intron 6	TT	97	C (0.0)
	TC	0	
	CC	0	
rs12898311 intron 9	GG	51	G (0.27)
	CG	34	
	CC	8	
rs71463782 intron 9	Wild type	96	(0.0)
	Insertion/wild type	0	
	Insertion	0	
rs17636091 intron 9	GG	73	A (0.10)
	GA	17	
	AA	1	
rs11852999 intron 10	CC	79	T (0.09)
	CT	17	
	TT	0	

<b>rs12911192</b> <b>exon 10</b>	TT	83	C (0.07)
	TC	12	
	CC	1	
<b>rs12910825</b> <b>intron 12</b>	AA	43	G (0.33)
	AG	40	
	GG	11	
<b>rs112187198</b> <b>3'UTR</b>	TT	87	C (0.0)
	TC	0	
	CC	0	
<b>rs3743450</b> <b>3'UTR</b>	TT	75	C (0.06)
	TC	13	
	CC	0	
<b>rs14280</b> <b>3'UTR</b>	TT	73	C (0.07)
	TC	9	
	CC	1	
<b>rs112770009</b> <b>3'UTR</b>	TT	82	C (0.0)
	TC	0	
	CC	0	
<b>rs7601</b> <b>3'UTR</b>	TT	44	G (0.26)
	TC	33	
	CC	5	
<b>rs15172</b> <b>3'UTR</b>	GG	80	T (0.01)
	GT	2	
	TT	0	

Footnotes:

<sup>1</sup>MAF=minor allele frequency.

SNPs with MAF > 0.05 were further analyzed (depicted in grey) respecting the study power.

Several samples have not been determined due to the low DNA quality or quantity.

N=number of patients

**Supplementary Table S6:** Clinical characteristics of validation set of breast carcinoma patients for genetic study (n=615)

Characteristics	N (%)
<i>Mean age at diagnosis, years ± SD<sup>1</sup></i>	58.1 ± 12.0
<i>Menopausal status</i>	
premenopausal	89 (14.5)
postmenopausal	272 (44.2)
not assessed	254 (41.3)
<i>Histological type</i>	
invasive ductal carcinoma	479 (77.9)
other type <sup>2</sup>	131 (21.3)
not assessed	5 (0.8)
<i>Stage</i>	
0	44 (7.2)
I	255 (41.5)
II	326 (36.7)
III	57 (9.2)
IV	1 (0.2)
not assessed	32 (5.2)
<i>Lymph node metastasis</i>	
positive (pN1-3)	201 (32.7)
negative (pN0)	382 (62.1)
pNx	32 (5.2)
<i>Histological grade</i>	
1	140 (22.8)
2	301 (48.9)
3	151 (24.6)
not assessed	23 (3.7)
<i>Estrogen receptor expression</i>	
positive	474 (77.1)
negative	136 (22.1)
not assessed	5(0.8)
<i>Progesterone receptor expression</i>	
positive	444 (72.2)
negative	166 (27.0)
not assessed	5 (0.8)
<i>HER2 status</i>	
positive	136 (22.1)
negative	466 (75.8)
not assessed	13 (2.1)
<i>Molecular subtype</i>	
TNBC	69 (11.2)
other	537 (87.3)
not assessed	9 (1.5)
<i>Treatment strategy</i>	
Neoadjuvantly treated	140 (22.8)
Adjuvantly treated	414 (67.3)
not available	61 (9.9)

Footnotes:

<sup>1</sup>Standard Deviation

<sup>2</sup>Other tumor types involved invasive lobular (70), ductal *in situ* (19), tubular (10), mucinous (9), medullary (8), papillary (5), metaplastic (3), solid neuroendocrine (1), secretory (1) carcinomas and mixed forms (5).

N=number of patients; TNBC=triple negative breast carcinoma

**Supplementary Table S7:** Distribution of *PRCI* polymorphisms in the validation set of breast carcinoma patients for genetic study (n=615)

<b>SNP ID</b>	<b>Genotype</b>	<b>N</b>	<b>MAF<sup>1</sup></b>
<b>rs10520699</b>	CC	436	T (0.15)
	CT	168	
	TT	8	
	NA <sup>2</sup>	3	
<b>rs11852999</b>	CC	500	T (0.09)
	CT	101	
	TT	5	
	NA <sup>2</sup>	9	

Footnotes:

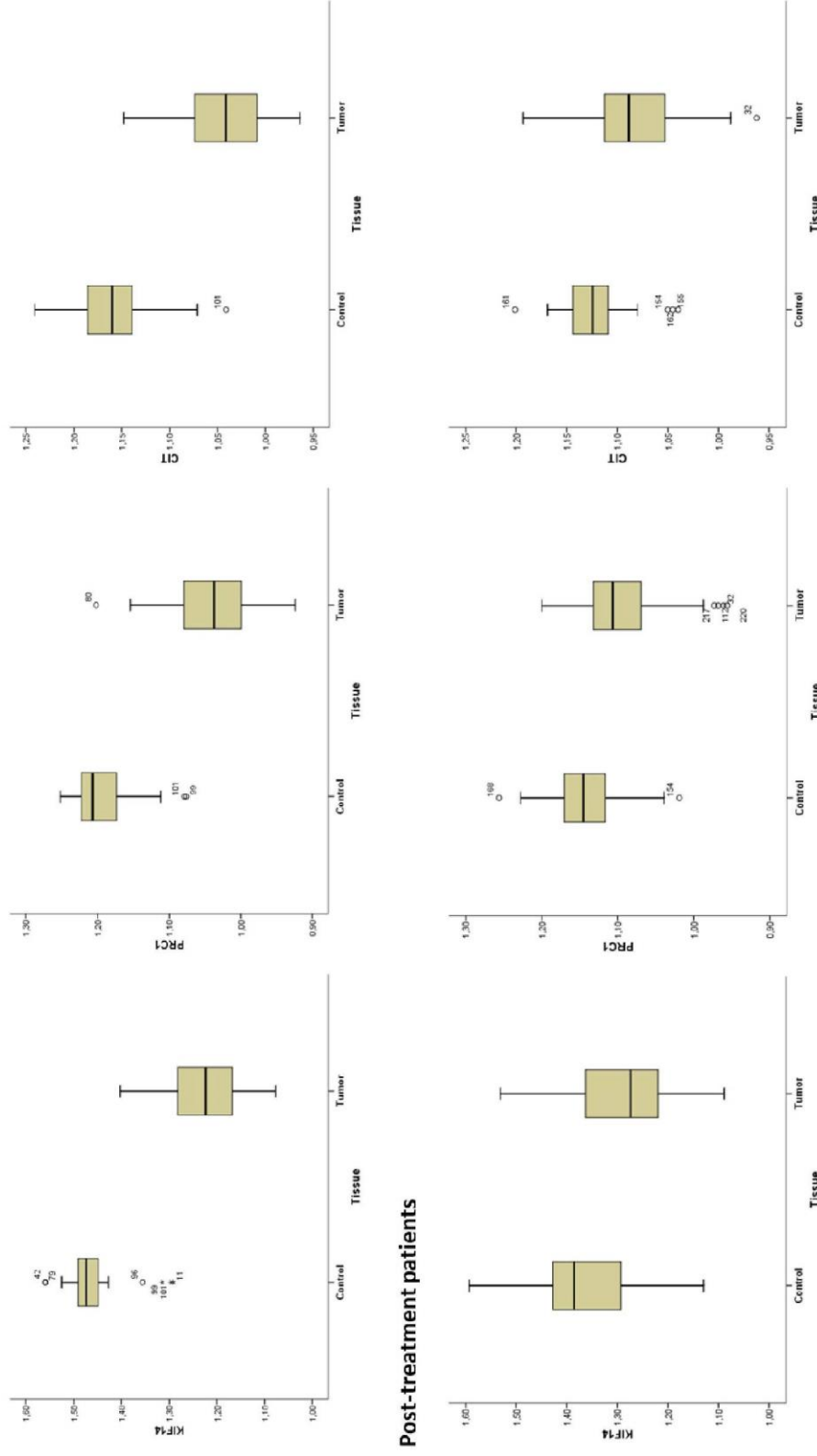
<sup>1</sup>MAF=minor allele frequency

<sup>2</sup>NA=not available due to the low quality or quantity of DNA

N=number of patients

**Supplementary Figure S1:** Distribution of transcript levels in studied groups of patients

**Pre-treatment patients**

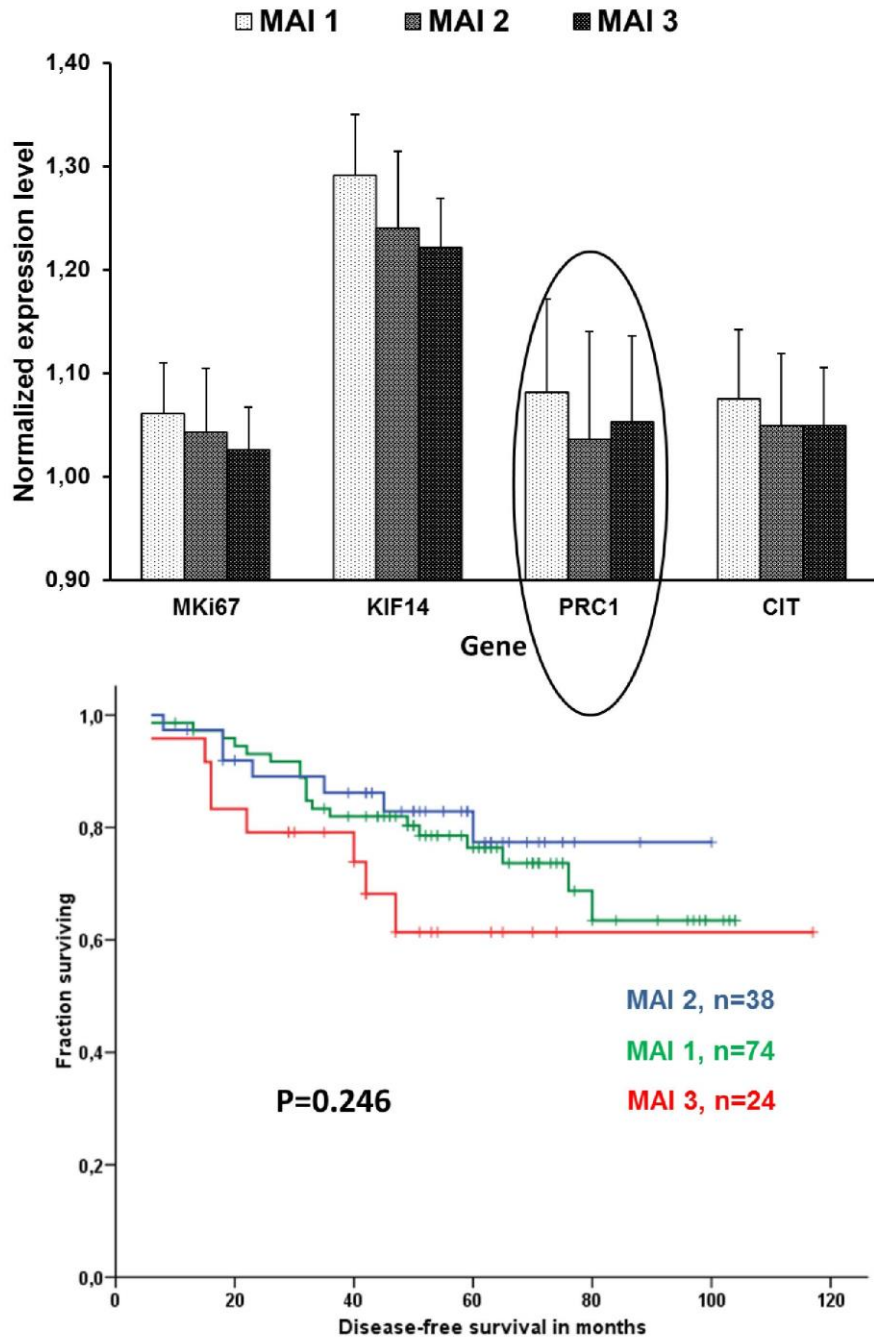


**Post-treatment patients**

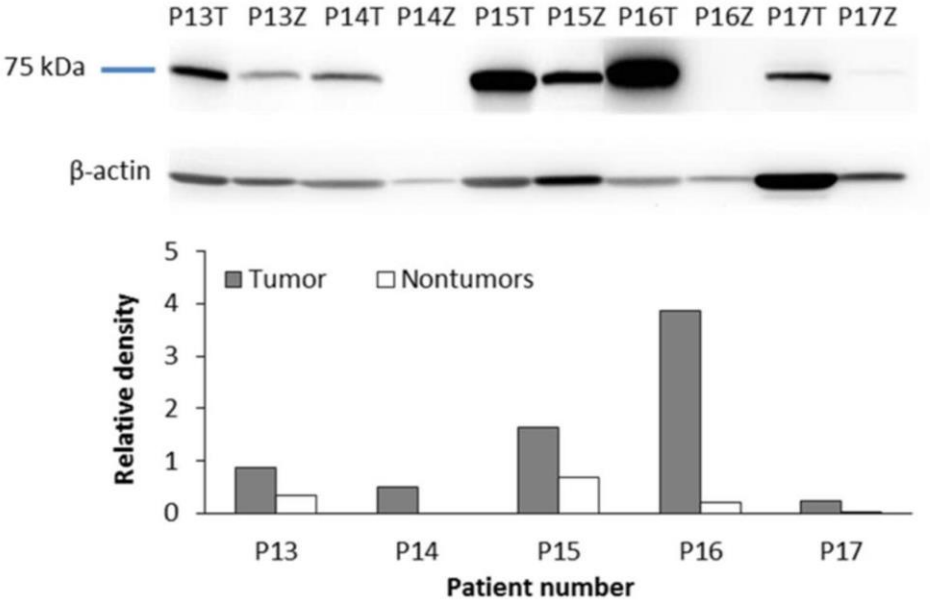
For analyses, a ratio of Ct for particular target gene to arithmetic mean of Ct for all reference genes (Target gene/REF) was calculated for each sample. Therefore, the lower is the Target gene /REF ratio the higher is the respective target gene transcript level.

**Supplementary Figure S2:** Association between mitotic score and gene expression levels in tumors and disease-free survival of all breast carcinoma patients

Gene expression levels were compared with mitotic score (MAI) using non-parametric Kruskal-Wallis test (upper part). The trend for PRC1 was non-linear. Kaplan–Meier survival curves for patients divided by MAI are displayed (lower part). The difference in the mean DFS between the compared groups of patients was non-significant ( $P=0.246$ , Breslow test).



**Supplementary Figure S3:** PRC1 level was assessed by immunoblotting in paired samples of tumor and control tissues.



## 3.5. Článek 4 - The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma

Genomics 102 (2013) 96–101



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Genomics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ygeno](http://www.elsevier.com/locate/ygeno)



### The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma



Marie Ehrlichova<sup>a</sup>, Beatrice Mohelnikova-Duchonova<sup>a,c</sup>, Jiri Hrdy<sup>b</sup>, Veronika Brynychova<sup>a,d</sup>, Marcela Mrhalova<sup>e</sup>, Roman Kodet<sup>e</sup>, Lukas Rob<sup>f</sup>, Marek Pluta<sup>f</sup>, Ivan Gut<sup>a</sup>, Pavel Soucek<sup>a</sup>, Radka Vaclavikova<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Oncology, Palacky University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic

<sup>d</sup> 3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Pathology and Molecular Medicine, Charles University in Prague, 2nd Faculty of Medicine and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>f</sup> Department of Gynecology and Obstetrics, Charles University in Prague, 2nd Faculty of Medicine and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 30 November 2012

Accepted 12 March 2013

Available online 28 March 2013

##### Keywords:

Ovarian carcinoma

Taxane

Resistance

Gene expression

Cytokinesis

Clinical course

#### ABSTRACT

Taxane and platinum-based chemotherapy regimens are standard treatment for advanced ovarian carcinoma. Expression levels of putative markers of taxane resistance in carcinoma tissues and paired peritoneal samples ( $n = 55$ ) and in 16 samples of ovaries without signs of carcinoma were compared with clinical data and the patients' time to progression. *KIF14*, *PRC1*, *CIT* and *ABCC1* genes were significantly overexpressed in carcinomas when compared with normal ovarian tissues, while *ABCB1* and *CASP9* expression was decreased. Associations of protein expression of the proliferation marker Ki-67 with *KIF14*, *PRC1*, *ABCB1* and *CASP2* were found. Lastly, it was discovered that *ABCB1* and *CASP2* levels associated with FIGO stage and that the *CIT* level associated with the time to progression of ovarian carcinoma patients ( $P < 0.0001$ ).

In conclusion, *ABCB1*, *CASP2*, *KIF14*, *PRC1* and *CIT* genes seem to associate with surrogate markers of ovarian carcinoma progression and *CIT* gene associates with therapy outcome.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Surgical tumor debulking followed by platinum-based and paclitaxel chemotherapy is the standard treatment for advanced ovarian carcinoma. Objective responses to it are observed in approximately 60–80% of patients treated in the front-line setting. However, despite the high response rate to the initial chemotherapy, the majority of patients will experience recurrence [1], with only about 44% surviving 5 years after the diagnosis [2]. The chemoresistance of ovarian carcinoma caused by multiple factors [3] contributes to this fact. Molecular markers of the efficacy and resistance of taxane-based therapies in ovarian carcinoma need to be identified and subsequently validated.

Classical taxanes paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere) are mitotic poisons that stimulate polymerization of microtubules and inhibit their depolymerization (Spencer and Faulds 1994). Microtubules play an important role in the correct function of mitotic spindle during cytokinesis and cooperate with a number of proteins involved in this process. Mitotic kinesins and microtubule-associated proteins (MAPs) act in concert to direct cytokinesis [4]. Molecular motors

from the kinesin superfamily have acquired an increasing importance [5] and may be considered as putative markers of taxane resistance. A mitotic kinesin *KIF14* (OMIM: 611279) targets the central spindle via its interaction with protein-regulating cytokinesis 1 (*PRC1*, OMIM: 603484) and has an essential function in cytokinesis [6]. Very recently, the expression of *KIF14* was found to be an independent prognostic marker in serous ovarian carcinoma [7]. Citron kinase (*CIT*, OMIM: 605629), a protein required for cytokinesis and conserved from insects to mammals, is currently considered a cytokinesis-specific regulator of active RhoA [8]. Nevertheless, the role of *KIF14*-related genes in the prognosis and chemotherapy outcome of cancer patients is not well understood.

In previous studies we have also documented the involvement of paclitaxel, docetaxel and experimental taxanes in the induction of apoptosis *in vitro* [9,10], which is mediated by the caspase family of proteases that act as effectors of cell death by cleaving various cellular substrates. The effector caspase-3 (OMIM: 600636, encoded by *CASP3*) has been identified as principal enzyme in the apoptotic cascade and is often used to detect apoptotic activity [11]. Moreover, caspases-2, -8 and -9 (OMIM: 600639, 601763 and 602234) are important initiator caspases involved in apoptosis [summarized in 11,12]. It was discovered that caspase-3 activates procaspase-2 and caspase-2-mediated apoptosis requires caspase-9 [13]. Lower expression of caspase-3 is typical for chemotherapy-resistant ovarian carcinomas [14] and may thus

\* Corresponding author at: Toxicogenomics Unit, National Institute of Public Health, Srobarova 48, 100 42, Prague 10, Czech Republic. Fax: +420 2 6731 1236.

E-mail address: [rvaclavikova@szu.cz](mailto:rvaclavikova@szu.cz) (R. Vaclavikova).

URL: <http://www.szu.cz> (R. Vaclavikova).



be considered as another putative marker of taxane-resistance. However, the gene expression patterns of *CASP2*, 8 and 9 and their roles in ovarian carcinoma clinical course have not been reported so far.

Finally, efflux of taxanes from tumor cells has been reported to be associated with function of mainly two members of the ATP binding cassette (ABC) membrane transporter family; *ABCB1* and *ABCC1* (OMIM: 171050 and 158343) [summarized in 15,16]. Studies have shown that in ovarian carcinoma, *ABCB1* gene/protein expression is associated with multidrug resistance [17,18]. *ABCC1* transcript level has also been found to be significantly higher in ovarian carcinoma lesions compared with cystadenomas and normal ovarian tissues [19] and seems to be another putative taxane resistance gene.

With regard to the above-mentioned factors, the aim of this study was to explore the role of incompletely characterized putative markers of resistance to taxanes in the clinical course of ovarian carcinoma. Particular attention was paid to the effects of *KIF14* and related genes (*PRC1* and *CIT*), apoptotic pathway effectors/initiators (*CASP2*, 3, 8 and 9) and major drug transporters (*ABCB1* and *ABCC1*) on the clinical characteristics and therapy outcome of patients.

## 2. Results

### 2.1. Characteristics of patients

The study population consisted of 55 patients with ovarian carcinomas and 16 patients without morphological/macroscopic signs of carcinoma in their ovaries (uterine leiomyoma,  $n = 9$ ; benign ovarian cyst,  $n = 2$ ; cervical carcinoma,  $n = 4$ ; sarcoma,  $n = 1$ ). Paired samples from peritoneal epithelium without morphological/macroscopic signs of carcinoma were available for 51 ovarian carcinoma patients. The clinical characteristics of patients involved in the study are described in Table 1. The median age of ovarian carcinoma patients at diagnosis ( $59.7 \pm 12.0$  years) did not significantly differ from the age of patients whose normal ovarian tissues were used for comparison ( $57.6 \pm 12.7$  years). The average Ki-67 (MKI67) expression in carcinomas was  $38.7 \pm 24.4$  while in the non-neoplastic ovarian tissues it was  $\leq 1\%$ . The majority of patients (93%) received adjuvant chemotherapy with a combination of taxane (paclitaxel) and platinum derivative (carbo-platinum or cis-platinum). Four patients (7%) received only

carbo-platinum during adjuvant chemotherapy. Eight (14.5%) patients received neoadjuvant chemotherapy with no effect on the evaluated associations (analyses with vs. without patients treated by neoadjuvant therapy) in this study.

The median follow up was  $32 \pm 2$  months. Altogether there were 20 (41%) progressions or carcinoma-related deaths (events) among the 49 patients who were evaluated. Five patients were excluded from time to progression (TTP analyses as lost to follow up ( $n = 4$ ) or due to postoperative mortality ( $n = 1$ ).

### 2.2. Transcript levels of target genes

Transcripts of the analyzed genes (Table 2) were detected by quantitative real-time PCR (qPCR) in all available tissue samples included in the study. Significantly higher transcript levels of *KIF14*, *CIT*, *PRC1* and *ABCC1* in carcinoma tissues were found, when compared with either the independent set of normal ovarian tissues (Table 3A) or the paired peritoneal tissues (Table 3B). In contrast, *ABCB1* and *CASP9* levels were significantly decreased in carcinoma tissues, when compared with either normal ovarian tissues (Table 3A) or paired peritoneal tissues (Table 3B). *CASP2*, *CASP3* and *CASP8* levels were not significantly different between carcinoma and normal ovarian tissues (Table 3A). Similarly the *CASP8* transcript levels did not differ between carcinoma and paired peritoneal tissues either (Table 3B). However, overexpression of *CASP2* and decreased expression of *CASP3* were found in carcinoma compared with paired peritoneal tissues (Table 3B). The observed differences in transcript levels of all genes between ovarian carcinoma tissues and normal ovarian tissues were not influenced by exclusion of two benign ovarian cysts from analyses.

### 2.3. Associations between transcript levels and clinical characteristics

Transcript levels of target genes in ovarian carcinoma tissues were evaluated for their associations with clinical characteristics and the TTP of patients. The results of this evaluation are as follows: A negative correlation was found between the *PRC1* level in ovarian carcinoma tissues and the age of patients at the time of diagnosis ( $P = 0.046$ , data not shown). *CASP2* levels were significantly higher in carcinoma tissues of patients with the more advanced FIGO stages III or IV when compared with stages I or II (Table 4). Conversely, the *ABCB1* level was significantly higher in patients with the less advanced FIGO stages I or II compared with patients in stages III or IV (Table 4). *KIF14* and *PRC1* levels positively correlated with the expression of Ki-67 ( $P < 0.0001$  both, Table 4). There was a negative correlation between the *ABCB1* level and the Ki-67 level, whereas *CASP2* correlated positively ( $P = 0.003$  and  $P = 0.016$ , respectively, Table 4). Transcript levels of *CIT*, *ABCC1*, *CASP3*, 8 and 9 did not associate with any of the analyzed clinical characteristics. Similarly, the histological type and grade of the ovarian carcinomas did not associate with any of the studied genes. However, a strong association was observed between *CIT* level and TTP (Fig. 1). In particular, patients with the highest intratumoral *CIT* level (cut off 75th quartile) had significantly better TTP than patients with low expression levels ( $P = < 0.0001$ ). Neoadjuvant chemotherapy did not significantly affect any of the evaluated associations (analyses with vs. without patients treated by neoadjuvant therapy).

## 3. Discussion

Ovarian carcinoma patients are often diagnosed at the advanced FIGO stages III and IV, and thus have very poor prognosis [2,20]. Currently, there are no recognized molecular markers of ovarian carcinoma prognosis. FIGO stage, grade and type of the tumor, residual tumor volume after surgery, age and performance status of patients are used clinically as prognostic markers. From experience with other epithelial carcinomas, e.g. breast carcinoma (MammaPrint or Oncotype DX), it is clear that genetic markers that could enable a

**Table 1**  
Clinical characteristics of ovarian carcinoma patients.

Characteristics	N (%) <sup>a</sup>
Median age at diagnosis, years	59.7 $\pm$ 12.0
FIGO stage	
I	3 (5.5)
II	6 (11.0)
III	40 (72.6)
IV	5 (9.1)
Not available	1 (1.8)
Histological type	
Serous adenocarcinoma	38 (69.1)
Mucinous adenocarcinoma	4 (7.3)
Clear cell adenocarcinoma	3 (5.5)
Unspecified adenocarcinoma or other	10 (18.1)
Histological grade	
1	5 (9.1)
2	11 (20.0)
3	31 (56.4)
4	7 (12.7)
Not available	1 (1.8)
Residual tumor after surgery	
Present	34 (61.8)
Absent	20 (36.4)
Not available	1 (1.8)
Ki-67 protein expression	
mean $\pm$ S.D., %	38.7 $\pm$ 24.4
Not available	2 (3.6)

<sup>a</sup> Number of patients with percentage in parentheses is shown.

**Table 2**  
Gene expression assays used in the study.

Gene symbol	Assay ID	GenBank accession no.	Gene name	Amplicon length (bp)	Molecular function
<i>Reference genes</i>					
<i>PPIA</i>	4333763F	NM_021130.3	Peptidylprolyl isomerase A	98	Cyclosporin binding protein
<i>TBP</i>	Hs00920495m1	NM_003194.4	TATA box binding protein	112	General transcription factor
<i>GUSB</i>	Hs99999908m1	NM_000181.3	Beta-glucuronidase	81	Degradation of glucuronic acid-containing glycosaminoglycans
<i>Target genes</i>					
<i>KIF14</i>	Hs00978216m1	NM_014875.2	Kinesin family member 14	119	Intracellular transport and cell division
<i>CIT</i>	Hs00392339m1	NM_001206999.1	Citron (rho-interacting, serin/threonine kinase 21)	68	Cytokinesis
<i>PRC1</i>	Hs00187740m1	NM_003981.2	Protein regulator of cytokinesis 1	66	Cytokinesis
<i>ABCB1</i>	Hs00184491m1	NM_000927.4	ATP-binding cassette transporter (subfamily B)	110	Transport of drugs across cellular membranes
<i>ABCC1</i>	Hs00219905m1	NM_004996.3	ATP-binding cassette (subfamily C)	74	Transport of drugs across cellular membranes
<i>CASP2</i>	Hs00234982m1	NM_032982.3	Caspase-2, apoptosis-related cysteine peptidase	56	Apoptosis-related factor
<i>CASP3</i>	Hs00234387m1	NM_004346.3	Caspase-3, apoptosis-related cysteine peptidase	100	Apoptosis-related factor
<i>CASP8</i>	Hs01018151m1	NM_001080124.1	Caspase-3, apoptosis-related cysteine peptidase	124	Apoptosis-related factor
<i>CASP9</i>	Hs00154260m1	NM_001229.3	Caspase-9, apoptosis-related cysteine peptidase	71	Apoptosis-related factor

more precise stratification of patients into groups with different prognoses may also exist for ovarian carcinoma patients. If such markers were to be discovered, it would enable the chemotherapy regimens for treating patients with ovarian carcinoma to be tailored to the individual. It is mostly taxane- and platinum-based regimens that are used for chemotherapy in patients with ovarian carcinoma. Therefore, it is possible to study a fairly homogeneous patient group in terms of chemotherapy. It was our aim to explore the *in vivo* importance for ovarian carcinoma clinical course of *in vitro* well established putative molecular markers that are associated with resistance toward taxanes.

**Table 3**

Differences in the relative transcript levels of target genes between ovarian carcinomas and (A) normal ovarian tissue samples or (B) adjacent peritoneal tissue samples from the same patients.

A)					
Gene	Type <sup>a</sup>	Reaction efficiency	Expression difference	<i>P</i> <sup>b</sup>	Carcinoma vs. normal ovary
<i>PPIA</i>	REF	93%	1.53		
<i>TBP</i>	REF	92%	0.80		
<i>GUSB</i>	REF	96%	0.83		
<i>KIF14</i>	TRG	96%	19.75	<0.001	Overexpression
<i>CIT</i>	TRG	100%	8.12	<0.001	Overexpression
<i>PRC1</i>	TRG	94%	6.44	<0.001	Overexpression
<i>ABCB1</i>	TRG	89%	0.37	<0.001	Decreased expression
<i>ABCC1</i>	TRG	89%	1.47	0.002	Overexpression
<i>CASP2</i>	TRG	90%	1.07	0.567	
<i>CASP3</i>	TRG	91%	1.14	0.217	
<i>CASP8</i>	TRG	98%	1.19	0.183	
<i>CASP9</i>	TRG	100%	0.31	<0.001	Decreased expression
B)					
Gene	Type <sup>a</sup>	Reaction efficiency	Expression difference	<i>P</i> <sup>b</sup>	Carcinoma vs. peritoneum
<i>PPIA</i>	REF	93%	1.05		
<i>TBP</i>	REF	92%	0.95		
<i>GUSB</i>	REF	96%	1.00		
<i>KIF14</i>	TRG	96%	7.06	<0.001	Overexpression
<i>CIT</i>	TRG	100%	2.21	<0.001	Overexpression
<i>PRC1</i>	TRG	94%	3.69	<0.001	Overexpression
<i>ABCB1</i>	TRG	92%	0.18	<0.001	Decreased expression
<i>ABCC1</i>	TRG	89%	1.38	<0.001	Overexpression
<i>CASP2</i>	TRG	90%	1.32	0.001	Overexpression
<i>CASP3</i>	TRG	98%	0.72	<0.001	Decreased expression
<i>CASP8</i>	TRG	98%	0.85	0.079	
<i>CASP9</i>	TRG	100%	0.80	0.011	Decreased expression

<sup>a</sup> REF = reference gene, TRG = target gene.

<sup>b</sup> *P*-value by REST2009 software program.

Taxanes bind to tubulin and inhibit microtubule disassembly, subsequently resulting in cell cycle arrest in the G2/M phase and impairing the mitotic activity of malignant cells. Members of the kinesin superfamily appear to be important regulatory proteins in these processes [5]. Thériault et al. [7] found a genomic gain of *KIF14* in 30% of serous ovarian carcinomas and an elevation of *KIF14* mRNA in 91% of carcinomas vs. normal epithelium (defined as four normal tubal epithelium tissues and twelve short-term cultures of primary ovarian surface epithelium samples). It indicated that a high *KIF14* transcript level in carcinomas independently predicted worse progression-free survival in patients with serous ovarian carcinomas ( $P = 0.03$ ) [7]. In agreement with these conclusions, our study found an almost 20-fold overexpression of *KIF14* transcript in ovarian carcinoma in comparison with normal ovarian tissues ( $P < 0.001$ ). Moreover, the 7-fold overexpression in carcinoma compared with paired peritoneal tissue from the same patients that we observed in our study further underlined the importance of *KIF14* overexpression in ovarian carcinogenesis. The suggested prognostic value of *KIF14* [7] was underlined in our study by its strong association with the proliferation marker Ki-67 ( $P < 0.0001$ ). *PRC1* is a microtubule-associated protein with an essential function for spindle integrity during late mitosis in mammalian cells and similarly as *CIT* interacts with *KIF14* [6]. The expression of *PRC1* and *CIT* was strongly overexpressed in ovarian carcinoma tissues in our study and *PRC1* was significantly associated with Ki-67 expression ( $P < 0.0001$ ). The expression of *CIT* was significantly elevated in our ovarian carcinoma patients with better TTP ( $P < 0.0001$ ). Given the previously reported lack of association of expression levels of *CIT* with the survival times of ovarian carcinoma patients [7] the role of *CIT* observed by us seems contradictory. However, a recent study demonstrated that low-grade serous carcinoma is less chemosensitive than its high-grade counterpart [21]. Therefore, it

**Table 4**

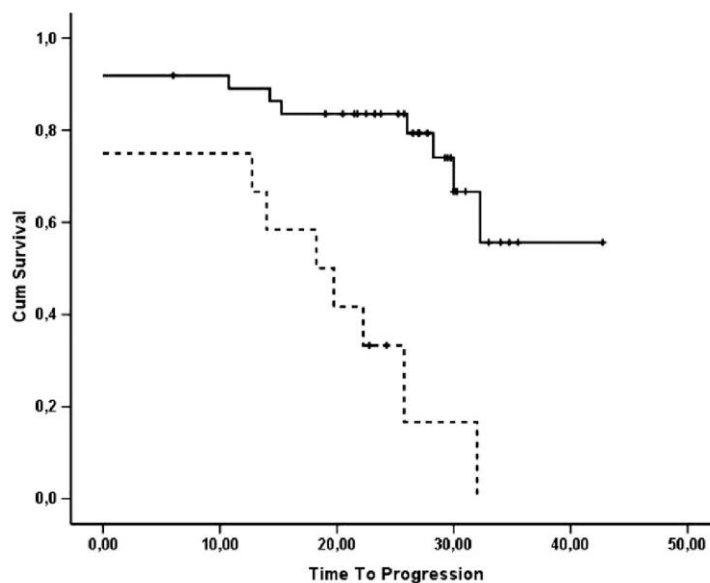
Associations between transcript levels of the investigated genes in ovarian carcinomas and clinical-pathologic data of ovarian carcinoma patients.

Gene	FIGO stage		Ki-67 protein expression
	I or II	III or IV	Significance
<i>ABCB1</i>	1.31 ± 0.03 <sup>a</sup> $P = 0.021^b$	1.35 ± 0.06	$\rho = -0.407$ $P = 0.003^c$
<i>PRC1</i>	NS		$\rho = 0.485$ $P < 0.0001^c$
<i>KIF14</i>	NS		$\rho = 0.467$ $P < 0.0001^c$
<i>CASP2</i>	1.10 ± 0.03 $P = 0.020^b$	1.06 ± 0.03	$\rho = 0.331$ $P = 0.016^c$

<sup>a</sup> Target gene/REF values ± SD.

<sup>b</sup> *P*-values by Kruskal–Wallis test.

<sup>c</sup> *P*-values by Spearman correlation;  $\rho$  = Spearman's correlation coefficient.



**Fig. 1.** Association of transcript level of *CIT* with time-to-progression of ovarian carcinoma patients. Kaplan–Meier survival curves are shown for two groups of patients divided by cut-off (75th quartile) with respect to the normalized transcript levels of *CIT* in their carcinoma tissue. Dotted line represents the group of patients with low *CIT* expression level (mean survival  $16.9 \pm 3.5$  months,  $n = 12$ ) and solid line represents the group with high *CIT* expression level (mean survival  $33.3 \pm 2.5$  months,  $n = 37$ ). The difference between the mean TTP of patients divided by the *CIT* transcript level was significant ( $P = <0.0001$ , Log Rank test).

could be speculated that our observation indicating an association of *CIT* with TTP may have reflected the higher chemosensitivity of high-grade ovarian carcinomas (almost 70% grade 3 or 4 in our patients). Based on our observations, *KIF14*, *PRC1* and *CIT* seem to constitute a part of a pathway significantly associated with surrogate markers of progression of ovarian carcinoma. Short period of the follow up of patients may be seen as limitation of the present study. Thus, the association of *CIT* with TTP of ovarian carcinoma patients should be considered as preliminary and needs further evaluation.

ABC transporters are responsible for the efflux of anticancer drugs through the cell membrane that reduces the intracellular levels of drugs in carcinoma cells. A significant elevation of four ABC transporter genes (*ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC3* and *ABCB3*) in recurrent (post-treatment,  $n = 50$ ) ovarian carcinoma lesions when compared with cystadenomas and normal ovarian tissues ( $n = 50$ ) and primary pre-treatment lesions ( $n = 50$ ) was recently reported [19]. Authors concluded that this finding supports the concept that chemotherapy resistance in ovarian carcinoma develops during the course of chemotherapy itself [19]. We have observed a significant overexpression of the *ABCC1* transcript level in ovarian carcinoma tissues before chemotherapy when compared with paired peritoneal or independent normal ovarian tissues. Our results are in line with the *ABCC1* overexpression in primary untreated ovarian carcinomas reported by Ohishi et al. [22]. In contrast, the *ABCB1* level was significantly decreased in ovarian carcinomas and associated with FIGO stage and Ki-67 in our study. However, we did not find an association with the TTP of ovarian carcinoma patients. Recently, a lack of *ABCB1* deregulation in recurrent carcinoma lesions compared with normal ovaries ( $n = 9$ ) and benign ovarian cystadenomas ( $n = 41$ ) was observed in Austrian patients [19]. Moreover, a study on Italian patients found no differences in *ABCB1*/P-gp expression levels between sensitive and resistant patients ( $n = 41$ ) [23], which seems to further support our results. On the other hand, *ABCB1* expression significantly elevated the risk of disease progression in ovarian carcinoma patients before chemotherapy ( $n = 206$ ) [17], even though it did not correlate with the overall survival. Thus, a clinical relevance of *ABCB1*/P-gp overexpression in ovarian carcinoma remains elusive. Interethnic

differences in frequencies of *ABCB1* polymorphisms are well documented [24] but their role in expression of the *ABCB1* is unknown. We may speculate that discrepancies between the results of present and previous studies could partly be due to this fact.

Apoptosis and mitotic exit are two possible fates following mitotic arrest [25]. Comparing resistant (NCI/ADR-RES) vs. sensitive (MDA-MB-435) tumor cells, we have shown that pathways of apoptosis induction by taxanes could differ in the activation of caspases [26]. Caspases are cysteine-dependent aspartate-directed proteases playing an essential role in the execution phase of apoptosis. A key role of caspase-2 in apoptosis induced by taxanes frequently used for ovarian carcinoma treatment was previously suggested *in vitro* [27]. In our study, we observed an overexpression of *CASP2* transcript in ovarian carcinoma vs. normal ovarian tissues and its association with high FIGO stage. However, it should be emphasized that this analysis was underpowered due to the low numbers of patients in the FIGO stage I/II group and thus the results should not be overestimated. On the other hand, *CASP9* functionally associated with *CASP2* expression was strongly decreased in carcinoma vs. normal ovarian tissues and did not associate with clinical factors or the TTP of ovarian carcinoma patients. Equally, our study was unable to detect any association of *CASP8* with ovarian carcinoma. A previous study found that cleaved caspase-3 but not caspase-8 level was associated with improved overall and progression-free survival in ovarian carcinoma effusions from 52 patients [28]. An increased caspase-3 expression in post-chemotherapy ovarian or tubal carcinomas compared with pre-chemotherapy specimens has also been observed ( $n = 10$ ) [29]. In another study, patients whose post-chemotherapy biopsies expressed active caspase-3 in less than 50% of carcinoma cells had worse overall and progression-free survival compared with patients expressing caspase-3 in more than 50% of carcinoma cells ( $n = 73$ ) [30]. In our study, the transcript level of *CASP3* did not associate with the clinical factors or TTP of ovarian carcinoma patients, suggesting that the protein level and/or enzymatic activity of caspase-3 rather than the transcript level may be responsible for the previously observed association with prognosis of patients with ovarian carcinomas. The gene expression profile of *CASP2* and *CASP9*, important

initiator caspases involved in apoptosis [12] of breast cancer, has not been reported so far with regard to ovarian carcinoma.

Peritoneal tissues were collected in order to compare expression differences between tumor and non-neoplastic epithelial tissues from the same patients. The presence of micrometastases in peritoneal samples could not be histologically evaluated. Therefore, non-neoplastic samples from different patient group were used for additional comparison to minimize a potential bias. Despite the fact that we have observed a gradient in expression of all genes except caspases with peritoneal samples between tumor and non-neoplastic ovaries, our data should be interpreted with caution.

In conclusion, our study has revealed significant differences in transcript levels of putative markers of resistance toward taxanes in ovarian carcinomas compared with peritoneal or normal ovarian tissues. *ABCB1*, *CASP2*, *KIF14* and *PRC1* associated with the established clinical prognostic factors as FIGO stage and Ki-67 protein expression. Furthermore, *CTT* associated with the TTP of ovarian carcinoma patients. The potential clinical utility of these markers needs to be evaluated by a larger independent follow up study.

#### 4. Materials and methods

##### 4.1. Patients

Tissue samples of human ovarian carcinomas were prospectively obtained from 55 ovarian carcinoma patients diagnosed at the Faculty Hospital Motol in Prague during the period 2009–2010. Carcinoma samples were available from 55 patients and paired epithelial tissue samples from peritoneum without morphological/macrosopic signs of carcinoma presence were available for 51 patients. Samples of ovarian tissue without histology-verified morphological/macrosopic signs of carcinoma were obtained from 16 patients who underwent gynecological surgery for diagnoses other than ovarian malignancy. The tissues collected during surgery were histopathologically investigated according to standard diagnostic procedures. Carcinoma specimens were excised from the native tissue sample, transferred into RNA later (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) and stored at 4 °C until total RNA isolation. The remaining tissue that was collected during surgery was histopathologically analyzed according to standard diagnostic procedures. The following data on patients were retrieved from medical records: the patient's age at diagnosis, FIGO stage, the histological type and grade of the tumor, the type of surgical procedure, the chemotherapy regimens and the TTP in months. Physical examinations were performed and CA-125 levels were obtained after every chemotherapy cycle. Disease progression during follow up was periodically monitored using physical, gynecological examinations and CA-125 levels every 3 months, supplemented with computer tomography or ultrasound examination of the abdomen and pelvis every six months for two years. All patients were asked to read and sign an Informed Consent in accordance with the requirements of the Ethical Commission of the National Institute of Public Health in Prague.

##### 4.2. Isolation of total RNA and cDNA preparation

Total RNA was isolated using Trizol reagent as previously published [31]. RNA was quantified using a Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit (Invitrogen) and its quality was evaluated by measuring the RNA Integrity Number (RIN) using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, California, USA). The RIN value was 6 on average (range 2–8). RNA was totally degraded in one carcinoma tissue sample and therefore was not further evaluated. cDNA was synthesized using 0.5 µg of total RNA and its quality was confirmed by PCR amplification of ubiquitin C fragment as described previously [31,32]. The prepared cDNA was subsequently diluted in ratio 1:5 with Nuclease free water (Life Technologies) and used for qPCR.

##### 4.3. Quantitative real-time PCR

qPCR was performed in RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Reaction mixtures contained 5 µl of TaqMan® Gene Expression Master Mix (part no. 4370048, Life Technologies), 0.5 µl of specific TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies, assays listed in Table 1), 2.5 µl of diluted cDNA template and water to make a final volume of 10 µl. Cycling parameters were initial hold at 50 °C for 2 min and initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 55 cycles consisting of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing/extension at 60 °C for 60 s (except *TBP* where 60 °C for 90 s and *ABCB1* and *PPIA* where 58 °C for 60 s was used). Fluorescence was acquired after each extension phase. Samples were analyzed in duplicates. Samples with larger than 0.5 Ct variation between duplicates were reanalyzed. The non-template control contained water instead of cDNA. Additionally, negative cDNA synthesis controls (RNA transcribed without reverse transcriptase) were employed to reveal possible carry-over contamination. In each run, an inter-plate calibrator was included to account for any variations between runs. The relative standard curve was generated from 5 log dilutions of cDNA sample used as a calibrator. Amplification efficiencies for each reference and target gene were calculated applying the formula  $E = 10^{1/\text{slope}} - 1$ . *PPIA*, *TBP* and *GUSB* (Table 1) were used as the reference genes in accordance with the previously reported study on ovarian tissues [33]. The qPCR study design adhered to the MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, [34]).

##### 4.4. Immunohistochemical analysis of Ki-67 protein expression in histological sections

Fresh tissue samples containing the ovarian carcinoma tissue were fixed in buffered 4% formaldehyde and embedded in paraffin. 3 µm thin histological sections were cut and the first slide was stained with hematoxylin and eosin. The most appropriate region of carcinoma tissue was chosen for immunohistochemical evaluation of proliferation activity. Primary antibody against Ki-67 antigen was used (clone MIB-1, Dako, dilution 1:100). After deparaffinization and rehydration of tissue, the histological sections were pretreated by heating in 10 mmol/l citrate buffer (pH 6.0) in water bath. Endogenous peroxidase activity was blocked in 3% hydrogen peroxide. Detection of primary antibody binding was performed using secondary biotinylated antibody, streptavidin-peroxidase complex and hydrogen peroxide/DAB (3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride). The nuclear expression of Ki-67 was evaluated under a light microscope. Besides the pattern of diffuse nuclear positivity of Ki-67, a relocation of these proteins on the surface of chromosomes was found in mitosis. The percentage of carcinoma cell positivity was scored

##### 4.5. Data analysis

For statistical analyses of transcript levels, a ratio of Ct for a particular target gene to an arithmetic mean of Ct for all reference (REF) genes (target gene/REF) was calculated for each sample. Therefore, the lower is the target gene/REF ratio the higher is the relative target gene transcript level. Mean Ct values were used for calculating of differences in transcript levels between tissue types using REST 2009 Software (Qiagen, Hildesheim, Germany), as published [35]. Associations of transcript levels with clinical data – age at diagnosis in years; histological type of ovarian carcinoma (serous vs. other); histological grade, G1 or G2 vs. G3 or G4; FIGO stage, I or II vs. III or IV and Ki-67 expression in % – was assessed by non-parametric Kruskal–Wallis and Spearman rank tests. TTP was defined as the time elapsed between the date of surgical treatment and disease progression or cancer-related death. In the first step, patients were divided into four groups using quartiles of the investigated transcript levels. For these groups, the survival functions were computed by Kaplan–Meier method. Cut-offs defined by quartiles were tested and

the “optimal cut-off” was defined as the highest statistical significance by log-rank test. All *P*-values were obtained from two-sided tests. A *P* < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS v16.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

#### Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgments

This study was supported by grant from the Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health No. NS9803–4 to R.V. and L.R. and by the project ED2.1.00/03.0076 from the European Regional Development Fund to M.E., V.B., B.M. and P.S.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.03.005>.

#### References

- [1] M. Markman, Pharmaceutical management of ovarian cancer: current status, *Drugs* 68 (2008) 771–789.
- [2] Global Cancer Facts & Figures. Available from: <http://www.cancer.org> 2007.
- [3] H. Itamochi, J. Kigawa, N. Terakawa, Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma, *Cancer Sci.* 99 (2008) 653–658.
- [4] M. Glotzer, The molecular requirements for cytokinesis, *Science* 307 (2005) 1735–1739.
- [5] V. Daire, C. Potts, Kinesins and protein kinases: key players in the regulation of microtubule dynamics and organization, *Arch. Biochem. Biophys.* 510 (2011) 83–92.
- [6] U. Gruneberg, R. Neef, X. Li, E.H. Chan, R.B. Chalamalasetty, E.A. Nigg, F.A. Barr, KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis, *J. Cell Biol.* 172 (2006) 363–372.
- [7] B.L. Thériault, S. Pajovic, M.Q. Bernardini, P.A. Shaw, B.L. Gallie, Kinesin family member 14: an independent prognostic marker and potential therapeutic target for ovarian cancer, *Int. J. Cancer* 130 (2012) 1844–1854.
- [8] M. Gai, P. Camera, A. Dema, F. Bianchi, G. Berto, E. Scarpa, G. Germea, F. Di Cunto, Citron kinase controls abscission through RhoA and anillin, *Mol. Biol. Cell* 22 (2011) 3768–3778.
- [9] M. Ehrlichová, M. Koc, J. Truksa, Z. Naldová, R. Václavíková, J. Kovár, Cell death induced by taxanes in breast cancer cells: cytochrome C is released in resistant but not in sensitive cells, *Anticancer. Res.* 25 (2005) 4215–4224.
- [10] R. Václavíková, A. Boumendjel, M. Ehrlichová, J. Kovár, I. Gut, Modulation of paclitaxel transport by flavonoid derivatives in human breast cancer cells. Is there a correlation between binding affinity to NBD of P-gp and modulation of transport? *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 4519–4525.
- [11] P.K. Ho, C.J. Hawkins, Mammalian initiator apoptotic caspases, *FEBS J.* 272 (2005) 5436–5453.
- [12] G. Viothini, R.S. Murugan, S. Nagini, Mitochondria-mediated apoptosis in patients with adenocarcinoma of the breast: correlation with histological grade and menopausal status, *Breast* 20 (2011) 86–92.
- [13] G. Paroni, C. Henderson, C. Schneider, C. Brancolini, Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21907–21915.
- [14] P. Surowiak, V. Materna, A. Maciejczyk, M. Pudelko, S. Suchocki, W. Kedzia, E. Nowak-Markwitz, M. Dumanska, M. Spaczynski, M. Zabel, M. Dietel, H. Lage, Decreased expression of p16 in ovarian cancers represents an unfavourable prognostic factor, *Histol. Histopathol.* 23 (2008) 531–538.
- [15] H. Thomas, H.M. Coley, Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein, *Cancer Control* 10 (2003) 159–165.
- [16] R. Krishna, L.D. Mayer, Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11 (2000) 265–283.
- [17] L. Lu, D. Katsaros, A. Wiley, I.A. Rigault de la Longrais, M. Puopolo, H. Yu, Expression of MDR1 in epithelial ovarian cancer and its association with disease progression, *Oncol. Res.* 16 (2007) 395–403.
- [18] F.H. Wei, X.D. Zhao, Y. Zhang, S.R. He, L. Yang, The predictive factors for the response to platinum/paclitaxel based first-line adjuvant chemotherapy in advanced ovarian cancer, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 87 (2007) 1187–1189, (Article in Chinese).
- [19] V. Auner, J. Sehouli, G. Oskay-Oezcelik, R. Horvat, P. Speiser, R. Zeillinger, ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue, *Gynecol. Oncol.* 117 (2010) 198–201.
- [20] A.P. Heintz, F. Odicino, P. Maisonneuve, M.A. Quinn, J.L. Benedet, W.T. Creasman, H.Y. Ngan, S. Pecorelli, U. Beller, Carcinoma of the ovary. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer, *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 95 (Suppl. 1) (2006) S161–S192.
- [21] D.M. Gershenson, C.C. Sun, D. Bodurka, R.L. Coleman, K.H. Lu, A.K. Sood, M. Deavers, A.L. Malpica, J.J. Kavanagh, Recurrent low-grade serous ovarian carcinoma is relatively chemoresistant, *Gynecol. Oncol.* 114 (2009) 48–52.
- [22] Y. Ohishi, Y. Oda, T. Uchiyama, H. Kobayashi, T. Hirakawa, S. Miyamoto, N. Kinukawa, H. Nakano, M. Kuwano, M. Tsuneyoshi, ATP-binding cassette superfamily transporter gene expression in human primary ovarian carcinoma, *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 3767–3775.
- [23] S. Mozzetti, C. Ferlini, P. Concolino, F. Filippetti, G. Raspaglio, S. Prislei, D. Gallo, E. Martinelli, F.O. Ranelletti, G. Ferrandina, G. Scambia, Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients, *Clin. Cancer Res.* 11 (2005) 298–305.
- [24] T. Sakaeda, T. Nakamura, K. Okumura, Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy, *Curr. Top. Med. Chem.* 4 (2004) 1385–1398.
- [25] D.R. Matson, P.T. Stukenberg, Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways, *Mol. Interv.* 11 (2011) 141–150.
- [26] J. Kovar, M. Ehrlichová, B. Smejkalová, I. Zanardi, I. Ojima, I. Gut, Comparison of cell death-inducing effect of novel taxane SB-T-1216 and paclitaxel in breast cancer cells, *Anticancer. Res.* 29 (2009) 2951–2960.
- [27] N.M. Mhaidat, Y. Wang, K.A. Kiejda, X.D. Zhang, P. Hersey, Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 752–761.
- [28] L. Kleinberg, H.P. Dong, A. Holth, B. Risberg, C.G. Trope, J.M. Nesland, V.A. Flørenes, B. Davidson, Cleaved caspase-3 and nuclear factor-kappaB p65 are prognostic factors in metastatic serous ovarian carcinoma, *Hum. Pathol.* 40 (2009) 795–806.
- [29] T. Ohta, M. Isobe, T. Takahashi, M. Saitoh-Sekiguchi, T. Motoyama, H. Kurachi, The Akt and ERK activation by platinum-based chemotherapy in ovarian cancer is associated with favorable patient outcome, *Anticancer. Res.* 29 (2009) 4639–4647.
- [30] V. Materna, P. Surowiak, E. Markwitz, M. Spaczynski, M. Drag-Zalesinska, M. Zabel, H. Lage, Expression of factors involved in regulation of DNA mismatch repair- and apoptosis pathways in ovarian cancer patients, *Oncol. Rep.* 17 (2007) 505–516.
- [31] P. Soucek, P. Anzenbacher, I. Skoumalova, M. Dvorak, Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells, *Stem Cells* 23 (2005) 1417–1422.
- [32] M. Hubackova, R. Václavíková, M. Ehrlichová, Mrhalova, R. Kodet, K. Kubackova, D. Vrána, I. Gut, P. Soucek, Association of superoxide dismutases and NAD(P)H oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas, *Int. J. Cancer* 130 (2012) 338–348.
- [33] Y.L. Li, Y. Feng, H. Ying, L. Wei-Guo, X. Xing, Identification of suitable reference genes for gene expression studies of human serous ovarian cancer by real-time polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* 394 (2009) 110–116.
- [34] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, et al., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622.
- [35] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression 865 software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR, *Nucleic Acids Res.* 3 (2002) e36.

### **3.6. Prognostický a prediktivní význam kaspáz buněčné smrti a jejich hlavních alternativních sestřihových variant u pacientek s karcinomem prsu**

Změny v regulaci apoptózy se mohou uplatňovat při vzniku nádoru, při jeho progresi i při rezistenci k protinádorové léčbě. Kaspázy hrají významnou úlohu v iniciaci a regulaci apoptózy a jejich přesnější význam při vzniku a progresi nádorů je již řadu let studován (103). Především *in vitro* studie ukázaly na významnou roli především kaspázy 2 a 9 při apoptóze nádorových buněk vyvolané chemoterapeutiky cílenými na DNA a cytoskelet (87-90). Jiné práce přinesly důkazy o částečném uplatnění kaspáz vnější apoptické dráhy při aktivaci mitochondriální dráhy buněčné smrti včetně apoptózy vyvolané taxany (96, 123). Navíc u kaspáz 2, 3, 8 a 9 byly nalezeny a popsány alternativní varianty proteinů, které vykazují opačné (antiapoptické) účinky (82, 98, 105, 111). Antracykliny a taxany patří k nejčastěji podávaným chemoterapeutikům v adjuvantním a neoadjuvantním podání u pacientek necitlivých k hormonální léčbě nebo u pacientek s pokročilými typy nádorů. Přesto zatím není znám žádný prediktivní marker, který by pomohl odhadnout, jestli budou pacientky na danou léčbu reagovat.

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že změny v expresi kaspáz a jejich alternativních variant v nádorových tkáních karcinomu prsu se podílí na progresivitě nádorů a/nebo na jejich citlivosti k léčbě chemoterapií. Dalším cílem práce bylo stanovit vliv genetické variability v regulačních oblastech genů CASP2 a CASP9 na expresi a alternativní sestřích těchto genů. Výsledky práce jsou obsahem přiložených publikací – **článek 1 a 2**. Prognostický význam kaspázy 2, 3, 8 a 9 jsme studovali také u pacientek s karcinomem ovárií. Výsledky práce jsou shrnuty v **článku 4**.

V první fázi studie jsme stanovili transkripční hladiny kaspázy 2, 3, 7, 8, 9 a 10 v nádorových tkáních karcinomu prsu a párových vzorcích přilehlé tkáně bez morfologicky prokázané přítomnosti nádorových buněk (tj. kontrolní tkáně). Kromě stanovení celkového transkriptu těchto kaspáz jsme stanovili specificky také varianty L a S kaspázy 2, varianty A, B a S kaspázy 3, variantu L kaspázy 8 a varianty A a B kaspázy 9. Hledali jsme změny v expresi transkriptu jednotlivých kaspáz v nádorových oproti kontrolním tkáním, které by mohly svědčit o významu takto deregulovaných genů v progresi nádorů.

Získané hladiny exprese jsme dále porovnali s klinicko-patologickými daty pacientek, včetně zavedených prognostických markerů jako je stádium onemocnění nebo grade.

Prognostický význam kaspáz jsme dále studovali v kontextu délky bezpříznakového přežívání pacientek, které před operací nebyly předlécené žádnou terapií a po operaci byly dále léčeny adjuvantně chemoterapií (kombinace 5-FU, antracyklin, epirubicin, cyklofosfamid, taxan), chemoterapií v kombinaci s antihormonální terapií, nebo čistě antihormonální terapií. V **článku 1** je uvedena tato skupina pod označením „General“, v **článku 2** figuruje pod označením PS (Primary surgery) skupina.

Prediktivní význam kaspáz jsme hodnotili na základě exprese těchto genů v nádorových vzorcích získaných od pacientek, které před operací prodělaly neoadjuvantní chemoterapii (**článek 1** - Neoadjuvant set, **článek 2** – Neoadjuvant chemotherapy treated group = NACT group). Neoadjuvantní terapie zahrnovala taxany (paclitaxel, docetaxel) nebo taxany v kombinaci s FAC/FEC režimy. Klinická data k oběma skupinám jsou shrnuta v **tabulce 1, str. 43 (článek 1)** a v **tabulce 1, str. 55 (článek 2)**.

### 3.6.1. Kaspáza 2

Kaspáza 2 se vyznačuje poměrně variabilním uplatněním v apoptóze a řadou dalších neapoptických funkcí. Kromě dominantní varianty kaspázy 2L vzniká alternativním sestřihem genu CASP2 varianta kaspáza 2S vykazující antiapoptické účinky (82). Při pokusu vyvolat apoptózu u buněk lymfomu U937 pomocí různých stimulů, včetně působením paklitaxelu, pozorovali Iwanaga et al. 2005 změnu v poměru exprese těchto dvou variant ve prospěch antiapoptické varianty 2S (124). Podobně inhibitory topoizomeráz a antracykliny (etoposid, doxorubicin) byly mezi látkami, které *in vitro* stimulovaly tvorbu alternativní varianty S za současného snížení koncentrace varianty L na mRNA a proteinové úrovni (125). V naší práci jsme nenalezli významný rozdíl exprese transkriptu CASP2S v nádorových tkáních oproti kontrolním tkáním u nepředléceného souboru ani u neoadjuvantní chemoterapií předléceného souboru pacientek (**tabulka 2, str. 44, článek 1**). Nalezli jsme mírné ale statisticky významné zvýšení transkripčních hladin kaspázy 2L a celkového transkriptu kaspázy 2 v nádorech pacientek nepředlécených terapií v porovnání s kontrolními tkáněmi (**tabulka 2, str. 44, článek 1 a obrázek 2, str. 56, článek 2**). Nicméně poměr variant S/L se významně nelišil mezi nádorovými a nenádorovými tkáněmi u obou souborů. Přestože v naší práci nebylo možné ověřit změny v expresi transkriptů na vzorcích před léčbou a po léčbě získaných od stejných pacientek, dle našich výsledků neoadjuvantní chemoterapeutická léčba velmi pravděpodobně nemění expresi CASP2L/S *in vivo*.

Hladiny kaspázy 2L, S a poměr variant S/L jsme následně analyzovali v kontextu s klinicko-patologickými daty (**tabulky 3-5, str. 46-48, článek 1**). Nenalezli jsme významnou souvislost mezi transkripčními variantami kaspázy 2 nebo hodnotami jejich poměru (S/L) a délkou bezpříznakového přežívání pacientek nepředléčeného souboru ani souvislost s odpovědí pacientek na neoadjuvantní léčbu u předléčeného souboru pacientek. Naopak jsme našli několik významných vztahů transkripčních hladin CASP2L, S a poměru S/L s jednotlivými klinicko-patologickými faktory. Jmenovitě významně vyšší hladiny CASP2L jsme našli v nádorech pacientek s lokálně pokročilým stádiem onemocnění (tedy spíše s lepší prognózou) u nepředléčeného souboru pacientek (**tabulka 3, str. 46, článek 1**). Naopak signifikantně vyšší hladiny CASP2L v nádorech jsme detekovali u pacientek s přítomností nádorových buněk ve spádových lymfatických uzlinách (tj. pacientky s horší prognózou) oproti pacientkám bez postižených uzlin u předléčeného souboru pacientek. Podobně neuniformní výsledky, v rámci porovnání obou souborů, jsme našli i v případě analýz transkriptu CASP2S a poměru S/L (**tabulka 4 a 5, str. 47-48, článek 1**). Tyto výsledky naznačují, že prognostický význam kaspázy 2 se liší u pacientek nepředléčených neoadjuvantní chemoterapií a pacientek po neoadjuvantní terapii. V naší studii jsme bohužel neměli dostatečný počet pacientek pro zhodnocení bezpříznakového přežívání v kontextu s expresí kaspázy 2 u předléčené skupiny pacientek, které by mohlo pomoci tuto otázku lépe objasnit.

Kaspáza 2 byla v posledních letech intenzivně studována jako potenciální tumor supresorový gen (91-93). Inhibice kaspázy 2 u myšího modelu lymfomu, indukovaného zvýšenou expresí onkogenu c-Myc, významně uspošila vznik a růst nádoru (91). Později byla role kaspázy 2 při vzniku lymfomů indukovaných c-Myc potvrzena nezávislou studií, která navíc ukázala na odlišnou funkci jednotlivých proteinů PIDDómu, tedy že funkce kaspázy 2 je v tomto procesu nejspíše nezávislá na tvorbě tohoto komplexu (92). O rok později Parsons et al. (2013) ukázali na myším modelu karcinomu prsu vyvolaného zvýšenou expresí HER2/neu, že diskutovaná tumorsupresorová funkce kaspázy 2 není specifická jen pro vznik lymfomů, resp. inhibice kaspázy 2 v této práci uspošila vznik HER2/neu vyvolaného karcinomu prsu. (93). Snížená aktivita kaspázy 2 daná delecí genu, sníženou transkripcí, translací či posttranslačními úpravami by tedy mohla mít vliv na vznik a vývoj karcinomu prsu. V naší práci jsme našli významně zvýšenou expresi celkového transkriptu kaspázy 2 (**obrázek 2, str. 56, článek 2**) a transkriptu kaspázy 2L, dominantní proapoptické formy kaspázy 2, v nádorových tkáních v porovnání s kontrolními tkáněmi u nepředléčené skupiny pacientek (**tabulka 2, str. 44, článek 1**). Tyto změny na úrovni transkriptu nepodporují



hypotézu o tumorsupresorové funkci CASP2 u karcinomu prsu. Nedávná studie neuroblastomu na Th-MYCN transgenním myším modelu ukázala, že inhibice kaspázy 2 zpomalila vývoj tohoto nádoru a pacienti s nízkými hladinami transkriptu kaspázy 2 vykazovali delší přežívání oproti pacientům s vyššími hladinami (126). Tedy tumorsupresorová funkce kaspázy 2 je nejspíše tkáňově specifická. Naše pilotní výsledky proteinové exprese celkových kaspáz a jejich štěpných variant, které svědčí o aktivaci kaspáz, u nádorových tkání navíc ukázala variabilitu v aktivaci kaspáz mezi jednotlivými vzorky nádorů (**obrázek S2, str. 74-75, článek 2**). Tumorsupresorová funkce kaspázy 2 *in vivo* by měla být dle našich výsledků dále studována spíše na úrovni aktivace enzymu.

V předešlých studiích zabývajících se kaspázou 2S je diskutována její reálná biologická funkčnost, protože struktura mRNA CASP2S by měla být cílem NMD (nonsense mediated decay), pretranslačního procesu pro degradaci aberantních transkriptů (127). Kaspáza 2S byla v naší práci minoritním transkriptem s 6× až 40× menší expresí v tkáňových vzorcích oproti kaspáze 2L. I přes nižší hladiny jsme transkript této varianty detekovali u všech studovaných vzorků. Kaspázu 2S se již dříve podařilo detekovat na mRNA úrovni ve vzorcích nádorové a kontrolní tkáně ledvin (128). Na proteinové úrovni byla kaspáza 2S detekována mnohokrát, ale jen nepřímo pomocí protilátek cílených na celkovou kaspázu 2. Varianta S je takto rozpoznávána jen dle velikosti, přičemž může být zaměněna za štěpný produkt kaspázy 2L, který má podobnou velikost (83). Bohužel zatím neexistuje specifická protilátka proti kaspáze 2S, se kterou by bylo možné specificky ověřit přítomnost proteinu ve vzorcích.

V rámci studie genetické variability *CASP2* jsme se zaměřili na promotorovou oblast, regulační oblast In100 a oblasti sestřihu varianty S (**obrázek 1, str. 54, článek 2**). Výčet polymorfismů v těchto oblastech s MAF > 1 % je shrnut v **tabulce S1, str. 64, článek 2**. V DNA získané z periferních krevních lymfocytů ani v DNA získané z nádorových tkání od stejných pacientek jsme nenalezli žádné rozdíly v genetické variabilitě daných oblastí. V promotoru kaspázy 2L a v blízkosti promotoru kaspázy 2S jsme našli 4 dosud nepopsané jednonukleotidové záměny, z nichž dvě by na základě *in silico* predikce mohly ovlivňovat funkci promotorů a tedy transkripci variant kaspázy 2 (**tabulka 3, str. 58, článek 2**). Vzhledem k malé frekvenci těchto záměn v našem souboru nebylo možné dále tuto hypotézu ověřit.

### 3.6.2. Kaspáza 9

Přestože je kaspáza 9 hlavní kaspázou vnitřní apoptické dráhy a existují stovky studií zabývající se funkcí tohoto enzymu *in vitro*, o hladinách transkriptu nebo proteinu kaspázy 9 v nádorových tkáních je k dispozici jen minimum informací. Dle výsledků exprese proteinu v nádorových a zdravých tkáních různého typu publikovaných v Atlasu lidských proteinů (HPA, Human Protein Atlas) (129) je exprese kaspázy 9 v nádorových tkáních variabilní. V naší práci jsme u obou studovaných souborů pacientek s karcinomem prsu našli statisticky významné snížení celkového transkriptu kaspázy 9 v nádorových tkáních oproti kontrolním vzorkům (**obrázek 2, str. 56, článek 2**). Přes řadu významných vztahů nalezených mezi hladinou celkového transkriptu kaspázy 9 a klinicko-patologickými daty pacientek (**tabulka 2, str. 57, článek 2**) jsme nicméně nenalezli významný vztah kaspázy 9 k bezpříznakovému přežívání pacientek nebo k odpovědi pacientek na neoadjuvantní léčbu.

Alternativním sestřihem kaspázy 9 vznikají dvě varianty, dominantní a proapoptická varianta 9A, a alternativní antiapoptická varianta 9B (105). Detekcí těchto variant specificky u pacientek s karcinomem prsu jsme zjistili, že pacientky s nízkým poměrem CASP9A/B (zvýšená exprese antiapoptické varianty v poměru k proapoptické variantě) léčené adjuvantně chemoterapií (různé režimy kombinující antracykliny, taxany, 5-FU, cyklofosfamid) vykazovaly významně kratší bezpříznakové přežívání než pacientky s vysokou hodnotou poměru (**obrázek 3, str. 58, článek 2**). Poměr CASP9A/B má tedy podle získaných výsledků prognostický význam u pacientek s karcinomem prsu léčených chemoterapií v adjuvantním podání.

Dalším cílem bylo ověřit, zda změna poměru CASP9A/B souvisí s horší odpovědí pacientek na neoadjuvantní léčbu založenou na taxanech. Nenalezli jsme ovšem významný rozdíl v hodnotě tohoto poměru mezi pacientkami s částečnou vs. špatnou odpovědí na neoadjuvantní léčbu. Zvýšená exprese CASP9B v porovnání s CASP9A tedy neovlivňuje významně účinek léčby založené na taxanech, ale může přispívat k menší citlivosti pacientek na chemoterapeutickou léčbu obecně. Na modelu buněk nemalobuněčného karcinomu plic vedla inhibice kaspázy 9B ke zvýšení citlivosti těchto buněk k různým typům protinádorových léčiv (130). Podobně u modelu buněk karcinomu ovárií rezistentního k chemoterapii byla zjištěna snížená aktivita apoptozómu bez známek snížené exprese kaspázy 9 nebo apaf-1 a zároveň diskutována možná role negativního regulátoru vazby kaspázy 9 do apoptozómu (131). Tímto negativním regulátorem by mohla být kaspáza 9B, která bohužel

v této studii specificky detekovaná nebyla. Z našich i předchozích výsledků tedy mj. vyplývá důležitost stanovování obou variant kaspázy 9.

Významně nižší poměr CASP9A/B jsme našli u méně diferencovaných nádorů (vyšší grade) oproti více diferencovaným a u nádorů typu TNBC a HER2+ oproti nádorům luminálního typu, tedy u pacientek s obecně horší prognózou. Vu et al. (2016) nedávno identifikovali přímou vazbu proteinu CASP9B na regulátor apoptózy cIAP1 (cellular inhibitor of apoptosis 1) u buněčného modelu nemalobuněčného karcinomu plic, který se dále podílí na aktivaci dráhy NF-κB, hlavní tumorgenní dráhy u tohoto typu karcinomu (132). Deregulace NF-κB se uplatňuje i při vzniku a progresi karcinomu prsu a kaspáza 9B by se teoreticky mohla podílet na aktivaci dráhy NF-κB dráhy i v tomto případě.

V rámci studie genetické variability kaspázy 9 a jejího vlivu na expresi genu a na vlastnosti nádoru jsme se zaměřili na stanovení genetické variability oblasti promotoru *CASP9*, na oblasti sestřihu *CASP9B* a exonové a intronové oblasti *CASP9* dříve identifikované jako regulátory exprese (130). Podobně jako v případě kaspázy 2 jsme nenalezli rozdíl ve variabilitě mezi DNA získanou z periferních krevních lymfocytů a DNA z nádorových tkání. Tyto výsledky jsou v souladu se zjištěními, že somatické mutace těchto kaspáz jsou u karcinomu prsu spíše výjimečné (133, 134).

V genu *CASP9* jsme našli souvislost mezi přítomností haplotypu složeného ze tří SNP polymorfismů (rs4645978-rs2020903-rs4646034), hladinami transkriptu kaspázy 9 a expresí progesteronového receptoru a HER2 receptoru (**tabulka 4 a 5, str. 59-60, článek 2**). Polymorfismus rs4645978 leží v oblasti promotoru kaspázy 9 a je spojován s rizikem vzniku různých typů karcinomu (135). Pomocí *in silico* predikce jsme zjistili, že rs2020903 mění motivy pro vazbu transkripčních faktorů GATA a Nanog, jejichž význam pro vznik karcinomu prsu a jeho progresi je rovněž diskutován (136, 137).

### 3.6.3. Kaspázy 8 a 10

Kaspázy 8 a 10 jsou kaspázy aktivované v rámci vnější apoptické dráhy, kaspáza 8 je považována v této dráze za důležitější. Přibývá však prací, které připisují těmto kaspázám významnější úlohu i v rámci aktivace mitochondriální dráhy apoptózy (96, 123, 138). Kaspáza 8 je navíc spojována s rizikem vzniku nádorových onemocnění včetně nádorů prsu a je nejčastěji mutovanou kaspázou v nádorových buňkách různého typu (viz dále) (133, 134).

V této práci jsme studovali celkový transkript kaspázy 8 a její alternativní variantu, kaspázu 8L, které je připisována antiapoptická role, podobně jako u alternativních variant

kaspázy 2S a 9B (98). V naší práci jsme nenalezli významné změny v expresi CASP8 ani CASP8L v nádorových tkáních oproti kontrolním tkáním. Podle HPA se exprese kaspázy 8 v nádorových tkáních karcinomu prsu neliší od exprese ve zdravých tkáních ani na proteinové úrovni (129). Navíc transkripční hladiny CASP8 a varianty 8L v nádorových tkáních významně nesouvisely s klinicko-patologickými daty pacientek z obou souborů a nemají tedy pro toto onemocnění žádný prognostický ani prediktivní potenciál.

Transkripční hladiny kaspázy 10 rovněž významně nesouvisely s klinicko-patologickými daty pacientek z obou skupin. Nicméně kaspáza 10 byla významně méně exprimovaná v nádorových tkáních v porovnání s kontrolami ve skupině nepředléčených pacientek (**obrázek 2, str. 56, článek 2**). Snížená exprese kaspáz 8 a 10 byla zatím popsána jen u dětských nádorů jako je meduloblastom a neuroblastom (139, 140). Stejně jako u předešlých kaspáz vzniká sestřihem genu *CASP10* několik alternativních variant, z nichž některé působí proti buněčné smrti (139, 140). V naší práci jsme studovali jen celkový expresní profil kaspázy 10, další studie cílené na jednotlivé izoformy tohoto proteinu by mohly objasnit význam snížené exprese kaspázy 10 u karcinomu prsu.

#### 3.6.4. Kaspázy 3 a 7

Kaspázy 3 a 7 jsou hlavní exekuční kaspázy aktivované v rámci vnitřní i vnější apoptické dráhy. V této práci jsme stanovili celkový transkript kaspázy 3 a 7, a specificky varianty kódující proapoptickou formu kaspázy 3 (3AB) a antiapoptickou formu 3S. U obou kaspáz jsme našli významné zvýšení exprese v tkáních karcinomu prsu v porovnání s kontrolami u nepředléčeného souboru pacientek, v případě kaspázy 3 bylo zvýšení exprese významné i u předléčeného souboru (**obrázek 2, str. 56, článek 2**). Kaspáza 3 byla ve vzorcích karcinomu detekována již několikrát, v některých pracích bylo zdokumentováno její zvýšení (112, 141, 142) a v jiných pracích naopak významné snížení (143, 144) v nádorech oproti kontrolám. Důvodem může být detekce celkového transkriptu místo jednotlivých transkripčních variant samostatně. V naší práci byly změny v expresi specificky detekovaných variant více zřejmé než u celkového transkriptu. V rámci naší pilotní analýzy proteinové exprese kaspázy 3 jsme našli vysokou variabilitu v aktivaci kaspáz ve vzorcích karcinomu prsu s různým zastoupením jednotlivých štěpných produktů (**obrázek S2, str. 74-75, článek 2**), které by mohly být při použití různých protilátek důvodem variability ve výsledcích exprese kaspázy 3 ve vzorcích karcinomu prsu.

Hladiny transkriptu CASP3A+B byly významně zvýšené u nádorů bez exprese hormonálních receptorů u nepředléčeného souboru a významně se lišily mezi jednotlivými podtypy karcinomu prsu (luminální, HER2, TNBC) (**tabulka 2, str. 57, článek 2**). Naopak expresní hladiny kaspázy 7 byly významně vyšší u nádorů exprimujících hormonálních receptory (**tabulka 2, str. 57, článek 2**). Tyto vztahy jsme nepozorovali u předléčeného souboru a nenalezli jsme ani souvislost mezi hladinami kaspáz 3 nebo 7 a délkou bezpříznakového přežívání. Naše výsledky rovněž nepodporují dříve nalezenou souvislost mezi vysokou expresí CASP3S a špatnou odpovědí pacientek s karcinomem prsu na neoadjuvantní chemoterapii (112). Souvislost mezi vysokou expresí kaspázy 7 a expresí hormonálních receptorů může odrážet schopnost estrogenu indukovat expresi kaspázy 7, což bylo ukázáno na modelu hormonálně pozitivních MCF-7 buněk karcinomu prsu (145).

### **3.6.5. Prognostický význam 2, 3, 8 a 9 u pacientek s karcinomem ovárií**

Prognostický význam hlavních kaspáz buněčné smrti jsme studovali také u pacientek s karcinomem ovárií. Pacientky s karcinomem ovárií mají obecně horší prognózu než pacientky s karcinomem prsu. Hlavním důvodem je pozdní záchyt (diagnóza) onemocnění, protože nádor ovárií má spíše nespecifické příznaky. Prognóza pacientek s karcinomem ovárií se tedy odvíjí především od stádia onemocnění při diagnóze, dále od reziduálního objemu nádoru po provedené chirurgické léčbě, věku při diagnóze a od hladin glykoproteinu CA-125 v krvi pacientek (146). Kromě chirurgického odstranění nádoru podstupují pacientky s karcinomem ovária adjuvantní chemoterapii obsahující deriváty platiny a taxany. Tato relativně uniformní léčba tedy umožňuje studovat nové prediktivní markery k odhalení rezistence nádorových buněk k taxanům a platině, která je dalším důvodem špatné prognózy pacientek s karcinomem ovaria (146). Molekulární markery, s kterými by bylo možné odlišit pacientky s odlišnou prognózou, podobně jako u pacientek s karcinomem prsu, u pacientek s karcinomem ovárií zatím neexistují.

V této práci jsme stanovili hladiny celkového transkriptu kaspázy 2, 3, 8 a 9 ve vzorcích karcinomu ovaria a v kontrolních vzorcích obdobně jako ve studiích kaspáz u karcinomu prsu. Získané transkripční hladiny jsme studovali v souvislosti s kliniko-patologickými daty a s délkou bezpříznakového přežívání pacientek. Klinická data pacientek jsou shrnuta v **tabulce 1, str. 97, článek 4**.

Stejně jako v případě karcinomu prsu jsme u pacientek s karcinomem ovárií našli významně sníženou expresi kaspázy 9 v nádorech v porovnání s kontrolními vzorky ovaria

(**tabulka 3, str. 98, článek 4**). Nenašli jsme ovšem významný vztah transkripčních hladin této kaspázy s klinicko-patologickými daty pacientek ani s délkou bezpříznakového přežívání. Teoreticky by kaspáza 9, resp. zvýšená exprese alternativní sestřihové varianty CASP9B v porovnání s klasickou variantou CASP9A, mohla mít pro prognózu pacientek s karcinomem ovárií podobný význam jako pro pacientky s karcinomem prsu. Význam genové exprese kaspázy 9 pro progresi karcinomu ovária a pro účinek léčby byl do této doby studován pouze na modelových buněčných liniích. Jak už bylo dříve uvedeno, na buněčném modelu karcinomu ovárií rezistentního k chemoterapii byla zjištěna snížená aktivita apoptozómu bez snížení exprese kaspázy 9 (131). Specifické stanovení obou variant kaspázy 9 v tkáních karcinomu ovária by mohlo objasnit význam snížené exprese kaspázy 9 u tohoto typu karcinomu v porovnání se zdravou tkání.

Zvýšené hladiny transkriptu kaspázy 2 a kaspázy 3, které jsme našli v nádorech prsu oproti kontrolním vzorkům, jsme nepozorovali v případě karcinomu ovárií, resp. exprese kaspázy 2, 3 a 8 v karcinomech ovárií se významně nelišila od nádorem nezasažených vzorků ovarialní tkáně (**tabulka 3, str. 98, článek 4**). Významně vyšší transkripční hladiny kaspázy 2 jsme našli v nádorech ovárií vyššího stádia oproti nádorům nižšího stádia (**tabulka 4, str. 98, článek 4**). V případě karcinomu prsu jsme nenašli vztah celkového transkriptu kaspázy 2 se stádiem onemocnění, nicméně v nádorech prsu vyššího stádia jsme našli významně nižší hladiny kaspázy 2L (**tabulka 3, str. 46, článek 1**). Změny v hladinách transkriptu kaspázy 2 v odlišných stádiích karcinomu prsu a ovária nebyly doposud studovány a vzhledem k nižšímu počtu pacientek se stádiem onemocnění I a II u pacientek s karcinomem ovárií resp. III a IV u pacientek s karcinomem prsu v naší práci, by tyto výsledky měly být interpretovány více kriticky. Jak již bylo diskutováno v kapitole **3.7.1. Kaspáza 2**, funkce kaspázy 2 může být mezi jednotlivými typy tkání velmi variabilní. Hladiny transkriptu kaspázy 2 byly v karcinomech prsu v porovnání s kontrolními vzorky v naší práci významně zvýšené (**obrázek 2, str. 56, článek 2**), naopak v karcinomech ovárií jsme tento rozdíl v rámci tumor vs kontrolní tkáň nepozorovali (**tabulka 3, str. 98, článek 4**). Transkripční hladiny kaspázy 2, 3 ani kaspázy 8 významně nesouvisely s délkou bezpříznakového přežívání pacientek s karcinomem ovárií.

### 3.7. Prognostický a prediktivní význam KIF14, PRC1 a CIT u pacientek s karcinomem prsu

Dalším cílem práce bylo stanovit prognostický a prediktivní význam tří hlavních regulátorů cytokineze, KIF14, PRC1 a CIT. Protokol studie byl obdobný jako v případě studií kaspáz (viz **Material and methods, str. 77, článek 3**). Hladiny transkriptů jsme stanovili v nádorových a kontrolních tkáních u dvou souborů pacientek, 1) nepředléčených žádnou léčbou před odběrem vzorku (pre-treatment group), a 2) předléčených pacientek neoadjuvantní chemoterapií (post-treatment group). Skupina předléčených pacientek byla širší v porovnání se studii kaspázových genů a léčba zahrnovala 5-FU, antracykliny, cyklofosfamid a taxany v různých režimech. Výsledky práce jsou obsahem **článku 3**. Prognostický význam KIF14, PRC1 a CIT jsme prostudovali i u pacientek s karcinomem ovárií (**článek 4**). V této práci jsme sledovali změny v hladinách transkriptu těchto tří genů v karcinomech ovária v porovnání s kontrolními nenádorovými vzorky a získané hladiny studovali v souvislosti s klinicko-patologickými daty a délkou bezpříznakového přežívání.

#### 3.7.1. KIF14

V naší práci jsme potvrdili vysokou expresi KIF14 v nádorových tkáních karcinomu prsu oproti kontrolním tkáním a pozitivní korelaci exprese KIF14 s gradem nádorů, kterou pozorovali již dříve v práci Corson et al. 2005 (117). V naší studii jsme ovšem nenašli vztah hladin transkriptu KIF14 k délce bezpříznakového přežívání pacientek. V nedávno publikované práci byla exprese KIF14 označena za významný faktor pro vznik TNBC podtypu karcinomu prsu, zvláště u pacientek s mutacemi v genech *BRCA1* nebo *BRCA2* (147). V naší práci jsme v souladu s touto hypotézou našli významně vyšší hladiny KIF14 u TNBC pacientek (**tabulka 2, str. 79, článek 3**). Vztah s mutacemi *BRCA1/2* bohužel nebylo možné ověřit, vzhledem k malému zastoupení těchto pacientek ve sledované skupině.

Nenalezli jsme ani vztah exprese KIF14 k odpovědi pacientek s karcinomem prsu na neoadjuvantní terapii. Ve výše zmíněné práci (147) vysoká exprese KIF14 významně souvisela s horší odpovědí podskupiny pacientek s TNBC nádory na neoadjuvantní léčbu. KIF14 by tak mohl mít významným prognostickým a prediktivním faktorem u podskupiny pacientek s TNBC nádory a *BRCA1/2* mutacemi, případně i zajímavou molekulou pro potenciální cílenou terapii u těchto pacientek s obecně špatnou prognózou (147).

### 3.7.2.PRC1

V naší práci jsme potvrdili, že vysoká exprese transkriptu PRC1 je významným markrem špatné prognózy u pacientek s karcinomem prsu. V první řadě jsme našli více jak dvakrát zvýšenou expresi PRC1 v nádorových tkáních oproti kontrolním tkáním u obou studovaných souborů pacientek (**tabulka 1, str. 78, článek 3**). (**tabulka 1, str. 78, článek 3**). Vysoká exprese PRC1 byla pozorována již dříve i na proteinové úrovni (122), ale nebyla dostupná data o korelaci mRNA-protein PRC1. V našem pilotním stanovení PRC1 na proteinové úrovni jsme nenašli významnou korelaci transkriptu s proteinem, i když výsledky mohou být ovlivněny menším počtem vzorků ve studii (**obrázek 2, str. 79, článek 3**). Důvodem mohou být různé metody normalizace dat využívané pro detekci transkriptů a proteinů, stejně jako posttranskripční regulace nebo posttranslační modifikace, o kterých u PRC1 zatím není mnoho informací.

Vysoká exprese PRC1 dále významně korelovala s narůstajícím gradem nádorů a byla nejvyšší u pacientek s TNBC nádory, tedy u podskupiny pacientek s nejhorší prognózou (**tabulka 2, str. 79, článek 3**). Navíc pacientky nijak neselektované dle léčby s vysokou expresí PRC1 v nádorech vykazovaly významně kratší bezpříznakové přežívání oproti pacientkám s nižšími hodnotami PRC1 (**obrázek 1, str. 79, článek 3**). Exprese PRC1 je již stanovována v rámci genetického testu Mammaprint, který využívá stanovení exprese 70 genů pro odhad prognózy neselektovaných pacientek s karcinomem prsu (45). Snaha snížit tento počet genů a získat jednodušší test vedla k selekci 20 nejvíce prognosticky zajímavých genů u neselektovaných pacientek s karcinomem prsu analýzou veřejně dostupných dat (148). Z těchto genů byl v práci Mustacchi et al. 2013 následnou analýzou 261 FFPE vzorků rozdělených jako zkušební a validační test vyselektován set 5 genů jako nejpřesnější pro odhad rizika relapsu: FGF18, BCL2, PRC1, MMP9 a SERF1A. Přes metodologické rozdíly v jednotlivých pracích, naše studie potvrdila významnou roli PRC1 pro odhad prognózy pacientek s karcinomem prsu.

Vzhledem k významu PRC1 pro prognózu pacientek s karcinomem prsu a vzhledem k jeho schopnosti asociovat s mikrotubuly nás zajímalo, zda vysoká exprese PRC1 ovlivňuje účinky taxanů na buňky karcinomu prsu. Pomocí MDA-MB-231 buněk, modelu TNBC formy karcinomu prsu, jsme sledovali změny exprese PRC1 v časovém rozmezí po podání různých koncentrací taxanu *in vitro* (**obrázek 3, str. 81, článek 3**). Překvapivě paclitaxel indukoval expresi PRC1 na mRNA i proteinové úrovni (**obrázek 3, str. 81, článek 3**). Paclitaxel je



mitotickým jedem, který zabraňuje depolymerizaci mikrotubulů, čímž působí na mitotické vřeténko dělicích se buněk a způsobuje zablokování buněčného cyklu v G2/M bloku (149). Navození exprese PRC1 by tedy mohlo být jedním z mechanismů, kterým se TNBC buňky brání působení paclitaxelu. Následně jsme sledovali vliv inhibice PRC1 na buněčný cyklus MDA-MB-231 buněk působením paclitaxelu pomocí průtokové cytometrie. Inhibice exprese PRC1 navozená pomocí siRNA však neovlivnila cytotoxicitu paclitaxelu, resp. přechod buněk do G2/M bloku se nelišil u testovaných buněk od kontrolních (**obrázek 4, str. 82, článek 3**). Vzhledem k tomu, že hladiny transkriptu PRC1 se významně nelišily u pacientek s částečnou odpovědí ve srovnání s pacientkami se špatnou odpovědí na neoadjuvantní léčbu obsahující taxany či kombinaci taxanů v režimech s jinými chemoterapeutiky, lze konstatovat, že PRC1 s největší pravděpodobností nemá význam pro účinek taxanů při léčbě karcinomu prsu.

Kromě vlivu exprese PRC1 na prognózu pacientek a účinnost chemoterapie u pacientek s karcinomem prsu nás zajímalo, zda existuje genetická variabilita v genu *PRC1*, která by mohla ovlivnit jeho expresi a případně funkci. Sekvenační analýzou haplotypů genu *PRC1* (celkem analyzováno 22 SNP polymorfizmů) jsme objevili, že variabilita dvou polymorfizmů, rs10520699 a rs11852999, významně souvisela s hladinami transkriptu PRC1 a s klinicko-patologickými daty na studovaném souboru 99 pacientek (**tabulka 4, str. 80, článek 3**). Nosičky alely T v polymorfizmu rs11852999 měly častěji nádory bez exprese estrogenového receptoru a významně častěji TNBC podtyp karcinomu prsu ve srovnání s pacientkami s genotypem CC. Následná analýza na výrazně větším nezávislém souboru pacientek s karcinomem prsu (N=615) však tyto vztahy nepotvrdila. *In silico* analýza pomocí programů Regulome DB, Provean, SIFT nenaznačila funkční význam těchto polymorfizmů např. pro vazbu transkripčních faktorů apod.

### 3.7.3. CIT

Třetím studovaným potenciálně prognostickým a prediktivním markerem byla exprese genu CIT. Stejně jako u KIF14 a PRC1 jsme našli významně zvýšenou expresi transkriptu CIT v nádorových tkáních karcinomu prsu v porovnání s kontrolními tkáněmi u předlčeného i nepředlčeného souboru pacientek. Podobně jako v případě KIF14 jsme ale nenalezli významný vztah transkripčních hladin CIT s délkou přežívání pacientek ani s odpovědí pacientek na neoadjuvantní léčbu.

### **3.7.4. Prognostický význam KIF14, PRC1 a CIT u pacientek s karcinomem ovárií**

Významně zvýšená exprese KIF14 byla popsána u karcinomu prsu, plic a retinoblastomu (116-118). V naší práci jsme našli přibližně dvacetkrát vyšší hladiny exprese KIF14 v tkáních karcinomu ovárií v porovnání s kontrolami (**tabulka 3, str. 98, článek 4**). Významně zvýšenou expresí v nádorových tkáních v porovnání s kontrolními jsme našli i v případě PRC1 a CIT. Transkripční hladiny KIF14 a PRC1 pozitivně korelovaly s expresí proliferačního markeru Ki-67 v nádorových tkáních, nicméně nenašli jsme významnou souvislost mezi expresí těchto genů a délkou bezpříznakového přežívání pacientek. Přibližně rok před publikováním této práce, Thériault et al. (2012) popsali vysokou expresi transkriptu KIF14 u karcinomu ovárií v porovnání s kontrolními tkáněmi a ukázali, že vysoké hladiny KIF14 významně souvisí s kratší dobou přežívání pacientek bez návratu onemocnění (150). Tento výsledek se v naší práci nepotvrdil, nicméně jsme našli významnou souvislost vysoké exprese CIT v nádorech ovárií s kratší dobou bezpříznakového přežívání pacientek (**obrázek 1, str. 99, článek 4**), což ukazuje na potřebu ověřování výsledků na nezávislých souborech.

### **3.8. Další publikace související s tématem**

**Brynychová V**, Václavíková R, Kubáčková K, Mrhalová M, Kodet R, Rauš K, Vrána D, Gatěk J, Bendová M, Souček P. Klinický a funkční význam vybraných polymorfismů CASP8 a CASP9 u karcinomu prsu. *Klinická onkologie*. 2016;29(6).

**Bez IF**

Hlaváč V, **Brynychová V**, Václavíková R, Ehrlichová M, Vrána D, Pecha V, Trnková M, Kodet R, Mrhalová M, Kubáčková K, Gatěk J, Vážan P, Souček P. The Role of Cytochromes P450 and Aldo-Keto Reductases in Prognosis of Breast Carcinoma Patients. *Medicine*. 2014;93(28):e255.

**IF 4.87**

Hlaváč V, **Brynychová V**, Václavíková R, Ehrlichová M, Vrána D, Pecha V, Koževnikovová R, Trnková M, Gatěk J, Kopperová D, Gut I, Souček P. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics*. 2013;14(5):515-529.

**IF 3.43**

## 4. ZÁVĚR

Tato práce se zaměřila na nalezení a charakterizaci potenciálních genetických markerů, které by sloužily pro odhad prognózy pacientek s karcinomem prsu a pro predikci účinku chemoterapie u pacientek. Konkrétně jsme se zaměřili na studium kaspáz buněčné smrti, včetně jejich alternativních sestřihových variant i genetického pozadí, a na studium hlavních regulátorů cytokineze.

Hladiny celkových transkriptů kaspáz 2, 3, 7, 8, 9 a 10 v karcinomech prsu významně nesouvisely ani s délkou bezpříznakového přežívání pacientek ani s odpovědí pacientek s karcinomem prsu na neoadjuvantní léčbu chemoterapií založenou na FAC/FEC režimy (obvykle v kombinaci s taxany). Stejný výsledek jsme získali i při studiu jednotlivých sestřihových variant kaspázy 2L a S, 3A, B a S a 8L.

Změny v poměru transkripčních hladin sestřihových variant kaspázy 9, ve prospěch alternativní antiapoptické varianty 9B na úkor hlavní proapoptické varianty 9A, detekované ve vzorcích karcinomu prsu významně souvisely s kratší dobou bezpříznakového přežívání pacientek léčených následně adjuvantně chemoterapií. Navíc jsme našli souvislost mezi haplotypem 3 SNP polymorfismů: rs4645978, rs2020903 a rs4646034 v genu *CASP9*, hladinami transkriptu kaspázy 9 v tkáních karcinomu prsu a expresí progesteronového a HER2 receptoru v karcinomech prsu. Vztah genotypu, exprese genu a klinického charakteru nádoru, pokud by byl funkčně ověřen a validován na nezávislém soboru, by mohl mít diagnostický i prognostický význam. Expese kaspázy 9 na transkripční úrovni byla významně snížena v tkáních karcinomu prsu i karcinomu ovárií oproti kontrolním, nádorem nazasaženým, tkáním získaným od stejných pacientek. Kaspáza 9 by tedy mohla mít stejný význam pro prognózu pacientek s karcinomem ovária, u kterého jednotlivé sestřihové varianty zatím specificky studovány nebyly.

Hladiny celkových transkriptů kaspáz 2, 3, 8 a 9 ve vzorcích karcinomu ovária významně nesouvisely ani s délkou bezpříznakového přežívání pacientek s karcinomem ovária léčených chemoterapií založenou na taxanech a platině.

Potvrdili jsme, že vysoká expese transkriptu PRC1 v karcinomech prsu je významným faktorem špatné prognózy u klinicky neselektovaných pacientek s karcinomem prsu. Zjistili jsme, že paclitaxel, taxan používaný v neoadjuvantní a adjuvantní léčbě karcinomu prsu, indukuje expresi PRC1 *in vitro* u MDA-MB-231 buněk, modelu TNBC podtypu karcinomu prsu. Následná funkční studie s využitím siRNA a analýza hladin PRC1 u pacientek léčených taxany v neoadjuvantním režimu ovšem ukázala, že PRC1 s největší pravděpodobností nemá

význam pro účinek taxanů při léčbě karcinomu prsu. Nepodařilo se nám potvrdit ani vliv genetické variability genu *PRC1* na expresi transkriptu tohoto genu nebo na klinický profil nádoru.

Hladiny transkriptů všech tří studovaných regulátorů cytokineze, KIF14, PRC1 a CIT, byly významně zvýšené v nádorech karcinomu prsu v porovnání s kontrolními tkáněmi. Transkripční hladiny KIF14 a CIT ale významně nesouvisely s délkou bezpříznakového přežívání pacientek s karcinomem prsu a expresní hladiny ani jednoho ze studovaných genů nesouvisely s odpovědí na neoadjuvantní léčbu. Nejvyšší expresi všech tří genů jsme detekovali u TNBC podtypu karcinomu prsu, který zatím může být léčen jen klasickou chemoterapií a je obecně spojován s nejhorší prognózou v porovnání s ostatními podtypy. KIF14, PRC1 a CIT by mohly být důležitými prognostickými a/nebo prediktivními faktory u TNBC pacientek, pokud by tato hypotéza byla potvrzena. Vysoké exprese všech tří genů jsme rovněž našli v nádorových tkáních pacientek s karcinomem ovária, u kterých vysoké hladiny transkriptu CIT byly významně spojeny s kratší dobou přežití bez návratu onemocnění, čímž jsme potvrdili výsledky předcházející nezávislé studie.

## 5. PŘEHLED LITERATURY

1. Brynychova V, Hlavac V, Ehrlichova M, Vaclavikova R, Pecha V, Trnkova M, et al. Importance of transcript levels of caspase-2 isoforms S and L for breast carcinoma progression. *Future Oncol.* 2013;9(3):427-38.
2. Brynychova V, Ehrlichova M, Hlavac V, Nemcova-Furstova V, Pecha V, Leva J, et al. Genetic and functional analyses do not explain the association of high PRC1 expression with poor survival of breast carcinoma patients. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:857-64.
3. Brynychova V, Hlavac V, Ehrlichova M, Vaclavikova R, Nemcova-Furstova V, Pecha V, et al. Transcript expression and genetic variability analysis of caspases in breast carcinomas suggests CASP9 as the most interesting target. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(1):111-22.
4. Ehrlichova M, Mohelnikova-Duchonova B, Hrdy J, Brynychova V, Mrhalova M, Kodet R, et al. The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma. *Genomics.* 2013;102(2):96-101.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet] Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013 [cited 2017 1.2.]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
6. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Kopítková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]: Masarykova univerzita; 2005 [cited 2017 1.2.]. Available from: [www.svod.cz](http://www.svod.cz).
7. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):52-62.
8. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S. WHO Classification of Tumours of the Breast, 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2012.
9. Tavassoli FA, Devilee P. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: IARC Press; 2003.
10. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care (Basel).* 2013;8(2):149-54.
11. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol.* 2010;4(3):192-208.
12. Li CI, Anderson BO, Daling JR, Moe RE. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. *JAMA.* 2003;289(11):1421-4.
13. Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2009.
14. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957;11(3):359-77.
15. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991;19(5):403-10.
16. Fisher B, Redmond C, Brown A, Wickerham DL, Wolmark N, Allegra J, et al. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 1983;1(4):227-41.
17. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013;31(31):3997-4013.

18. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol.* 2011;22(8):1736-47.
19. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. Seventh International Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2001;19(18):3817-27.
20. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2206-23.
21. Anampa J, Makower D, Sparano JA. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Med.* 2015;13:195.
22. Mass RD, Press MF, Anderson S, Cobleigh MA, Vogel CL, Dybdal N, et al. Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Clin Breast Cancer.* 2005;6(3):240-6.
23. Ross JS. Breast cancer biomarkers and HER2 testing after 10 years of anti-HER2 therapy. *Drug News Perspect.* 2009;22(2):93-106.
24. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63(1):181-7.
25. Clarke CA, Keegan TH, Yang J, Press DJ, Kurian AW, Patel AH, et al. Age-specific incidence of breast cancer subtypes: understanding the black-white crossover. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(14):1094-101.
26. Li CI, Moe RE, Daling JR. Risk of mortality by histologic type of breast cancer among women aged 50 to 79 years. *Arch Intern Med.* 2003;163(18):2149-53.
27. Komenaka IK, El-Tamer MB, Troxel A, Hamele-Bena D, Joseph KA, Horowitz E, et al. Pure mucinous carcinoma of the breast. *Am J Surg.* 2004;187(4):528-32.
28. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer.* 2005;93(9):1046-52.
29. Iorfida M, Maiorano E, Orvieto E, Maisonneuve P, Bottiglieri L, Rotmensz N, et al. Invasive lobular breast cancer: subtypes and outcome. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133(2):713-23.
30. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005;19(4):833-42.
31. Bartlett JM, Brookes CL, Robson T, van de Velde CJ, Billingham LJ, Campbell FM, et al. Estrogen receptor and progesterone receptor as predictive biomarkers of response to endocrine therapy: a prospectively powered pathology study in the Tamoxifen and Exemestane Adjuvant Multinational trial. *J Clin Oncol.* 2011;29(12):1531-8.
32. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol.* 2003;21(10):1973-9.
33. Prat A, Cheang MC, Martin M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(2):203-9.
34. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(8):553-63.
35. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell.* 2014;25(3):282-303.

36. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
37. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-92.
38. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *Lancet Oncol*. 2010;11(2):174-83.
39. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ, et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*. 2009;20(8):1319-29.
40. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
41. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.
42. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(18):10393-8.
43. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(14):8418-23.
44. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2750-67.
45. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-6.
46. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:96.
47. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.
48. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68.
49. Gnant M, Filipits M, Greil R, Stoeger H, Rudas M, Bago-Horvath Z, et al. Predicting distant recurrence in receptor-positive breast cancer patients with limited clinicopathological risk: using the PAM50 Risk of Recurrence score in 1478 postmenopausal patients of the ABCSG-8 trial treated with adjuvant endocrine therapy alone. *Ann Oncol*. 2014;25(2):339-45.
50. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76.
51. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.
52. Hess KR, Anderson K, Symmans WF, Valero V, Ibrahim N, Mejia JA, et al. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4236-44.



53. Ravdin PM, Siminoff LA, Davis GJ, Mercer MB, Hewlett J, Gerson N, et al. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(4):980-91.
54. Oakman C, Santarpia L, Di Leo A. Breast cancer assessment tools and optimizing adjuvant therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(12):725-32.
55. Hajage D, de Rycke Y, Bollet M, Savignoni A, Caly M, Pierga JY, et al. External validation of Adjuvant! Online breast cancer prognosis tool. Prioritising recommendations for improvement. *PLoS One*. 2011;6(11):e27446.
56. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;22(3):207-19.
57. Blamey RW, Ellis IO, Pinder SE, Lee AH, Macmillan RD, Morgan DA, et al. Survival of invasive breast cancer according to the Nottingham Prognostic Index in cases diagnosed in 1990-1999. *Eur J Cancer*. 2007;43(10):1548-55.
58. Rakha EA, Soria D, Green AR, Lemetre C, Powe DG, Nolan CC, et al. Nottingham Prognostic Index Plus (NPI+): a modern clinical decision making tool in breast cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(7):1688-97.
59. Wishart GC, Azzato EM, Greenberg DC, Rashbass J, Kearins O, Lawrence G, et al. PREDICT: a new UK prognostic model that predicts survival following surgery for invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(1):R1.
60. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(25):1999-2009.
61. Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, et al. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(17):1183-92.
62. Wittner BS, Sgroi DC, Ryan PD, Bruinsma TJ, Glas AM, Male A, et al. Analysis of the MammaPrint breast cancer assay in a predominantly postmenopausal cohort. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10):2988-93.
63. Orvieto E, Maiorano E, Bottiglieri L, Maisonneuve P, Rotmensz N, Galimberti V, et al. Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases from a single institution. *Cancer*. 2008;113(7):1511-20.
64. Sapino A, Roepman P, Linn SC, Snel MH, Delahaye LJ, van den Akker J, et al. MammaPrint molecular diagnostics on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2014;16(2):190-7.
65. Cardoso F, Piccart-Gebhart M, Van't Veer L, Rutgers E, Consortium T. The MINDACT trial: the first prospective clinical validation of a genomic tool. *Mol Oncol*. 2007;1(3):246-51.
66. Bogaerts J, Cardoso F, Buyse M, Braga S, Loi S, Harrison JA, et al. Gene signature evaluation as a prognostic tool: challenges in the design of the MINDACT trial. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006;3(10):540-51.
67. Rutgers E, Piccart-Gebhart MJ, Bogaerts J, Delaloge S, Van't Veer L, Rubio IT, et al. The EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial is feasible: results of the pilot phase. *European journal of cancer*. 2011;47(18):2742-9.
68. Piccart M, Rutgers E, Van't Veer L, Slaets L, Delaloge S, Viale G, editors. Primary analysis of the EORTC 10041/BIG 3-04 MINDACT study: a prospective, randomized study evaluating the clinical utility of the 70-gene signature (MammaPrint) combined with common clinical-pathological criteria for selection of patients for adjuvant chemotherapy in breast cancer with 0 to 3 positive nodes. *Proceedings of the 107th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2016.

69. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(27):2817-26.
70. Sparano JA, Gray RJ, Makower DF, Pritchard KI, Albain KS, Hayes DF, et al. Prospective Validation of a 21-Gene Expression Assay in Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(21):2005-14.
71. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2013;24 Suppl 6:vi7-23.
72. Chang HY, Nuyten DS, Sneddon JB, Hastie T, Tibshirani R, Sorlie T, et al. Robustness, scalability, and integration of a wound-response gene expression signature in predicting breast cancer survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(10):3738-43.
73. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(4):262-72.
74. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet.* 2005;365(9460):671-9.
75. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(1):238-59.
76. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012;45(6):487-98.
77. Bialik S, Zalckvar E, Ber Y, Rubinstein AD, Kimchi A. Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(10):556-64.
78. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(4):a008656.
79. Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2011;351(1-2):41-58.
80. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004;303(5660):1010-4.
81. Kumar S, Kinoshita M, Noda M, Copeland NG, Jenkins NA. Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme. *Genes Dev.* 1994;8(14):1613-26.
82. Wang L, Miura M, Bergeron L, Zhu H, Yuan J. Ich-1, an Ice/*ced-3*-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death. *Cell.* 1994;78(5):739-50.
83. Kitevska T, Spencer DM, Hawkins CJ. Caspase-2: controversial killer or checkpoint controller? *Apoptosis.* 2009;14(7):829-48.
84. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Orrenius S, Zhivotovsky B. Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage. *Oncogene.* 2006;25(41):5683-92.
85. Vakifahmetoglu-Norberg H, Zhivotovsky B. The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends Cell Biol.* 2010;20(3):150-9.
86. Paroni G, Henderson C, Schneider C, Brancolini C. Caspase-2-induced apoptosis is dependent on caspase-9, but its processing during UV- or tumor necrosis factor-dependent cell death requires caspase-3. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21907-15.
87. Mhaidat NM, Wang Y, Kiejda KA, Zhang XD, Hersey P. Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(2):752-61.

88. Ho LH, Read SH, Dorstyn L, Lambrusco L, Kumar S. Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption. *Oncogene*. 2008;27(24):3393-404.
89. Voborilova J, Nemcova-Furstova V, Neubauerova J, Ojima I, Zanardi I, Gut I, et al. Cell death induced by novel fluorinated taxanes in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells. *Invest New Drugs*. 2011;29(3):411-23.
90. Jelinek M, Balusikova K, Kopperova D, Nemcova-Furstova V, Sramek J, Fidlerova J, et al. Caspase-2 is involved in cell death induction by taxanes in breast cancer cells. *Cancer Cell Int*. 2013;13(1):42.
91. Ho LH, Taylor R, Dorstyn L, Cakouros D, Bouillet P, Kumar S. A tumor suppressor function for caspase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(13):5336-41.
92. Manzl C, Peintner L, Krumschnabel G, Bock F, Labi V, Drach M, et al. PIDDosome-independent tumor suppression by Caspase-2. *Cell Death Differ*. 2012;19(10):1722-32.
93. Parsons MJ, McCormick L, Janke L, Howard A, Bouchier-Hayes L, Green DR. Genetic deletion of caspase-2 accelerates MMTV/c-neu-driven mammary carcinogenesis in mice. *Cell Death Differ*. 2013;20(9):1174-82.
94. Cote J, Dupuis S, Jiang Z, Wu JY. Caspase-2 pre-mRNA alternative splicing: Identification of an intronic element containing a decoy 3' acceptor site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3):938-43.
95. Logette E, Wotawa A, Solier S, Desoche L, Solary E, Corcos L. The human caspase-2 gene: alternative promoters, pre-mRNA splicing and AUG usage direct isoform-specific expression. *Oncogene*. 2003;22(6):935-46.
96. Mielgo A, Torres VA, Clair K, Barbero S, Stupack DG. Paclitaxel promotes a caspase 8-mediated apoptosis through death effector domain association with microtubules. *Oncogene*. 2009;28(40):3551-62.
97. Scaffidi C, Medema JP, Krammer PH, Peter ME. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem*. 1997;272(43):26953-8.
98. Horiuchi T, Himeji D, Tsukamoto H, Harashima S, Hashimura C, Hayashi K. Dominant expression of a novel splice variant of caspase-8 in human peripheral blood lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;272(3):877-81.
99. Himeji D, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hayashi K, Watanabe T, Harada M. Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood*. 2002;99(11):4070-8.
100. Miller MA, Karacay B, Zhu X, O'Dorisio MS, Sandler AD. Caspase 8L, a novel inhibitory isoform of caspase 8, is associated with undifferentiated neuroblastoma. *Apoptosis*. 2006;11(1):15-24.
101. Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, et al. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*. 1999;284(5411):156-9.
102. Ekert PG, Read SH, Silke J, Marsden VS, Kaufmann H, Hawkins CJ, et al. Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J Cell Biol*. 2004;165(6):835-42.
103. Olsson M, Zhivotovsky B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ*. 2011;18(9):1441-9.
104. Janssen K, Pohlmann S, Janicke RU, Schulze-Osthoff K, Fischer U. Apaf-1 and caspase-9 deficiency prevents apoptosis in a Bax-controlled pathway and promotes clonogenic survival during paclitaxel treatment. *Blood*. 2007;110(10):3662-72.
105. Srinivasula SM, Ahmad M, Guo Y, Zhan Y, Lazebnik Y, Fernandes-Alnemri T, et al. Identification of an endogenous dominant-negative short isoform of caspase-9 that can regulate apoptosis. *Cancer Res*. 1999;59(5):999-1002.

106. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem.* 2001;276(49):46639-46.
107. Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *EMBO J.* 2002;21(17):4520-30.
108. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Luthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):12815-9.
109. Kurokawa H, Nishio K, Fukumoto H, Tomonari A, Suzuki T, Saijo N. Alteration of caspase-3 (CPP32/Yama/apopain) in wild-type MCF-7, breast cancer cells. *Oncol Rep.* 1999;6(1):33-7.
110. Yang XH, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2001;61(1):348-54.
111. Huang Y, Shin NH, Sun Y, Wang KK. Molecular cloning and characterization of a novel caspase-3 variant that attenuates apoptosis induced by proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283(4):762-9.
112. Vegran F, Boidot R, Oudin C, Riedinger JM, Bonnetain F, Lizard-Nacol S. Overexpression of caspase-3s splice variant in locally advanced breast carcinoma is associated with poor response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2006;12(19):5794-800.
113. Lee KY, Davies T, Mishima M. Cytokinesis microtubule organisers at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 15):3495-500.
114. Gai M, Camera P, Dema A, Bianchi F, Berto G, Scarpa E, et al. Citron kinase controls abscission through RhoA and anillin. *Mol Biol Cell.* 2011;22(20):3768-78.
115. Gruneberg U, Neef R, Li X, Chan EH, Chalamalasetty RB, Nigg EA, et al. KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *J Cell Biol.* 2006;172(3):363-72.
116. Corson TW, Gallie BL. KIF14 mRNA expression is a predictor of grade and outcome in breast cancer. *Int J Cancer.* 2006;119(5):1088-94.
117. Corson TW, Huang A, Tsao MS, Gallie BL. KIF14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers. *Oncogene.* 2005;24(30):4741-53.
118. Corson TW, Zhu CQ, Lau SK, Shepherd FA, Tsao MS, Gallie BL. KIF14 messenger RNA expression is independently prognostic for outcome in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(11):3229-34.
119. Mollinari C, Kleman JP, Saoudi Y, Jablonski SA, Perard J, Yen TJ, et al. Ablation of PRC1 by small interfering RNA demonstrates that cytokinetic abscission requires a central spindle bundle in mammalian cells, whereas completion of furrowing does not. *Mol Biol Cell.* 2005;16(3):1043-55.
120. Kurasawa Y, Earnshaw WC, Mochizuki Y, Dohmae N, Todokoro K. Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *EMBO J.* 2004;23(16):3237-48.
121. Shrestha S, Wilmeth LJ, Eyer J, Shuster CB. PRC1 controls spindle polarization and recruitment of cytokinetic factors during monopolar cytokinesis. *Mol Biol Cell.* 2012;23(7):1196-207.
122. Shimo A, Nishidate T, Ohta T, Fukuda M, Nakamura Y, Katagiri T. Elevated expression of protein regulator of cytokinesis 1, involved in the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2007;98(2):174-81.

123. Park SJ, Wu CH, Gordon JD, Zhong X, Emami A, Safa AR. Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(49):51057-67.
124. Iwanaga N, Kamachi M, Aratake K, Izumi Y, Ida H, Tanaka F, et al. Regulation of alternative splicing of caspase-2 through an intracellular signaling pathway in response to proapoptotic stimuli. *J Lab Clin Med.* 2005;145(2):105-10.
125. Solier S, Lansiaux A, Logette E, Wu J, Soret J, Tazi J, et al. Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Mol Cancer Res.* 2004;2(1):53-61.
126. Dorstyn L, Puccini J, Nikolic A, Shalini S, Wilson CH, Norris MD, et al. An unexpected role for caspase-2 in neuroblastoma. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1383.
127. Solier S, Logette E, Desoche L, Solary E, Corcos L. Nonsense-mediated mRNA decay among human caspases: the caspase-2S putative protein is encoded by an extremely short-lived mRNA. *Cell Death Differ.* 2005;12(6):687-9.
128. Heikaus S, Pejin I, Gabbert HE, Ramp U, Mahotka C. PIDDosome expression and the role of caspase-2 activation for chemotherapy-induced apoptosis in RCCs. *Cell Oncol.* 2010;32(1-2):29-42.
129. Ponten F, Jirstrom K, Uhlen M. The Human Protein Atlas--a tool for pathology. *J Pathol.* 2008;216(4):387-93.
130. Shultz JC, Goehle RW, Murudkar CS, Wijesinghe DS, Mayton EK, Massiello A, et al. SRSF1 regulates the alternative splicing of caspase 9 via a novel intronic splicing enhancer affecting the chemotherapeutic sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2011;9(7):889-900.
131. Liu JR, Opipari AW, Tan L, Jiang Y, Zhang Y, Tang H, et al. Dysfunctional apoptosome activation in ovarian cancer: implications for chemoresistance. *Cancer Res.* 2002;62(3):924-31.
132. Vu NT, Park MA, Shultz MD, Bulut GB, Ladd AC, Chalfant CE. Caspase-9b Interacts Directly with cIAP1 to Drive Agonist-Independent Activation of NF-kappaB and Lung Tumorigenesis. *Cancer Res.* 2016;76(10):2977-89.
133. Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet.* 2009;46(8):497-510.
134. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature.* 2016;534(7605):47-54.
135. Xu W, Jiang S, Xu Y, Chen B, Li Y, Zong F, et al. A meta-analysis of caspase 9 polymorphisms in promoter and exon sequence on cancer susceptibility. *PLoS One.* 2012;7(5):e37443.
136. Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell.* 2006;127(5):1041-55.
137. Wang D, Lu P, Zhang H, Luo M, Zhang X, Wei X, et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget.* 2014;5(21):10803-15.
138. Olsson M, Vakifahmetoglu H, Abruzzo PM, Hogstrand K, Grandien A, Zhivotovsky B. DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene.* 2009;28(18):1949-59.
139. Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, et al. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res.* 2002;62(20):5897-901.
140. Muhlethaler-Mottet A, Flahaut M, Bourlout KB, Nardou K, Coulon A, Liberman J, et al. Individual caspase-10 isoforms play distinct and opposing roles in the initiation of death receptor-mediated tumour cell apoptosis. *Cell Death Dis.* 2011;2:e125.

141. Vakkala M, Paakko P, Soini Y. Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *Br J Cancer*. 1999;81(4):592-9.
142. O'Donovan N, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Caspase 3 in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(2):738-42.
143. Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008;16(2):113-20.
144. Vinothini G, Murugan RS, Nagini S. Mitochondria-mediated apoptosis in patients with adenocarcinoma of the breast: Correlation with histological grade and menopausal status. *Breast*. 2011;20(1):86-92.
145. Lobenhofer EK, Bennett L, Cable PL, Li L, Bushel PR, Afshari CA. Regulation of DNA replication fork genes by 17beta-estradiol. *Mol Endocrinol*. 2002;16(6):1215-29.
146. Markman M. Pharmaceutical management of ovarian cancer : current status. *Drugs*. 2008;68(6):771-89.
147. Singel SM, Cornelius C, Zaganjor E, Batten K, Sarode VR, Buckley DL, et al. KIF14 promotes AKT phosphorylation and contributes to chemoresistance in triple-negative breast cancer. *Neoplasia*. 2014;16(3):247-56, 56 e2.
148. Mustacchi G, Sormani MP, Bruzzi P, Gennari A, Zanconati F, Bonifacio D, et al. Identification and validation of a new set of five genes for prediction of risk in early breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):9686-702.
149. Schiff PB, Horwitz SB. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(3):1561-5.
150. Theriault BL, Pajovic S, Bernardini MQ, Shaw PA, Gallie BL. Kinesin family member 14: an independent prognostic marker and potential therapeutic target for ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2012;130(8):1844-54.