

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

AUTOREFERÁT 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**

Mgr. Veronika Brynychová

Praha, 2017

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Státní zdravotní ústav, Praha

Autor: Mgr. Veronika Brynychová

Školitel: doc. RNDr. Pavel Souček, CSc.

Oponenti:

S disertací je možno se seznámit na děkanátu 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

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 cytokinesis 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 analyzed 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
APAF1	adapter protein apoptotic protease activating factor-1
CASP	cysteine-aspartic protease
CIT	citron kinase
DFS	disease-free survival
DISC	death-inducing signaling complex
ER	estrogenový receptor
FAC/FEC	5-fluorouracil, adriamycin/epirubicin, cyclofosamid
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
IDC	invazivní duktální karcinom
KIF14	kinesin family member 14
PIDD	p53-induced protein with a death domain
PKL	periferní krevní lymfocyty
PR	progesteronový receptor
PRC1	protein regulator of cytokinesis 1
TNBC	triple negative breast cancer
TNM	Tumour, Node, Metastases
UTR	untranslated region

OBSAH

ABSTRAKT	3
ABSTRACT.....	5
SEZNAM ZKRATEK	7
OBSAH	8
1. ÚVOD.....	10
1.1. Epidemiologie karcinomu prsu.....	10
1.2. Klasifikace karcinomu prsu	10
1.3. Léčba karcinomu prsu	11
1.4. Prognostické a prediktivní faktory u karcinomu prsu.....	12
1.5. Výzkum nových prognostických a prediktivních biomarkerů	13
1.5.1. Kaspázy buněčné smrti, úloha v karcinogenezi a léčbě nádorů	14
1.5.2. Úloha KIF14, PRC1 a CIT v cytokinezi, karcinogenezi a léčbě nádorů	17
2. CÍLE	19
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	20
1.1. Seznam publikací.....	20
1.2. Prognostický a prediktivní význam kaspáz buněčné smrti a jejich hlavních alternativních sestřihových variant u pacientek s karcinomem prsu	21
3.3.1. Kaspáza 2.....	22
3.3.2. Kaspáza 9.....	22
3.3.3. Kaspázy 8 a 10.....	23

3.3.4. Kaspázy 3 a 7	24
3.3.5. Prognostický význam 2, 3, 8 a 9 u pacientek s karcinomem ovárií	24
3.4. Prognostický a prediktivní význam KIF14, PRC1 a CIT u pacientek s karcinomem prsu	25
3.4.1. KIF14	25
3.4.2. PRC1	26
3.4.3. CIT	27
3.4.4. Prognostický význam KIF14, PRC1 a CIT u pacientek s karcinomem ovárií.....	27
4. ZÁVĚR.....	28
5. PŘEHLED LIERATURY	30

1. ÚVOD

Předložená práce se zabývá především významem kaspáz buněčné smrti a regulátorů cytokineze jako možných prognostických a prediktivních faktorů u pacientek s karcinomem prsu (ICD-10, dg. C50). 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 označených jako **článek 1-3** (1-3). Poslední 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). V České republice je od roku 2012 diagnostikováno kolem 7000 nových případů ročně a přibližně 1500 žen ročně tomuto onemocnění podlehně (6). Narůstající incidence a klesající mortalita pozorovaná v posledních letech se připisuje zlepšení včasného záchytu onemocnění pomocí screeningových metod a rozvoji v léčbě (7).

1.2. Klasifikace karcinomu prsu

Karcinom prsu se klasifikuje jednak na základě určení histologického typu jako invazivní duktální karcinom (IDC), nověji jako invazivní karcinom prsu nespeciálního typu (NST) (8), nebo jako speciální typ karcinomu prsu. IDC tvoří 70-80 % všech invazivních forem karcinomu prsu a představuje relativně nehomogenní skupinu oproti dalším typům. Nejčastěji se vyskytujícím speciálním typem je lobulární karcinom (10-15 %).

Dále se stanovuje rozsah šíření pomocí TNM (Tumour, Node, Metastases) klasifikace zahrnující velikost primárního nádoru (T0,

Tis – karcinom in situ, T1-4) a nepřítomnost či přítomnost metastatického šíření do regionálních (N0-3) nebo vzdálených lymfatických uzlin (M0/1) (9).

Grade (stupeň diferenciacie) vyjadřuje míru malignity nádoru (10, 11) a je souhrnným vyjádřením tvorby tubulů, polymorfie jader a počtu mitóz ve vzorku na stupnici 1-3. Čím vyšší číslo tím nižší diferenciacie nádoru.

Posledními běžně vyšetřovanými parametry jsou stanovení exprese estrogenového receptoru alpha (ER α , dále jako ER), progesteronového receptoru (PR), HER2/neu (human epidermal growth factor receptor 2/neu, dále jen HER2) a proliferačního faktoru Ki-67.

1.3. Léčba karcinomu prsu

Léčba karcinomu prsu zahrnuje léčbu lokoregionální (chirurgickou a radiační) a léčbu systémovou, kterou tvoří chemoterapie a cílená léčba. K nejčastěji indikovaným chemoterapeutikům u karcinomu prsu patří analoga pyrimidinů (5-fluorouracil, 5-FU), antracykliny (Doxorubicin, Epirubicin), inhibitory topoizomaráz (Doxorubicin, Etoposid), alkylační látky (Cyclofosfamid) a mitotické jedy (Paclitaxel, Docetaxel). V adjuvantním podání jsou výše popsaná terapeutika indikována 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 (12). Prediktivní test pro výběr nejvhodnější chemoterapeutické léčby pro pacientky s karcinomem prsu zatím v klinické praxi neexistuje.

U pacientek s pozitivní expresí ER (ER+) je možné využít cílenou hormonální léčbu. Cílem hormonální terapie je vyřadit

z funkce signální dráhu estrogen-ER-transkripce. To je možné inhibicí ER kompetitivní vazbou léčiva na vazebné místo receptoru (Tamoxifen) nebo léčivem podněcená selektivní degradace receptoru (Fulvestrant). Jiným přístupem je inhibice syntézy estrogenů inhibitory aromatáz (např. anastrozol) používaných u žen po menopauze nebo odstranění vaječníků u premenopauzálních žen. Vzhledem k vysoké vnímavosti ER+ nádorů k hormonální léčbě lze hormonální terapii využít i v neadjuvantním podání.

U pacientek s nádory vykazujícími amplifikací/zvýšenou expresí HER2 receptoru lze využít cílenou terapii monoklonálními protilátkami trastuzumab či pertuzumab.

1.4. Prognostické a prediktivní faktory u karcinomu prsu

Prognostické faktory předpovídají pravděpodobný průběh 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 do pěti let od diagnózy (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 ER, PR, stav HER2 receptoru a stav proliferáčního faktoru Ki-67. Na základě stavu faktorů ER, PR, HER2 a Ki-67 lze karcinomy prsu rozdělit do 4 imunohistochemických podtypů: luminální A a B (ER+/PR+), HER2 typ (ER-, PR-, HER2+) a trojitě negativní typ (triple negative breast

cancer, TNBC) (ER-, PR-, HER2-). Tato klasifikace vychází z molekulárních podtypů karcinomu prsu, které byly identifikovány a definovány pomocí cDNA mikročipů a u nichž byl popsán odlišný prognostický potenciál (13-15). Tento přístup ale v praxi není praktický vzhledem k vysoké finanční náročnosti (16).

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. 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 v klinické praxi stále zcela chybí.

1.5. Výzkum nových prognostických a prediktivních biomarkerů

Oblast výzkumu nových prognostických a prediktivních faktorů se zaměřuje hlavně na mechanismy způsobující 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) 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.

Mechanismů, které se uplatňují ve zvýšené proliferaci a/nebo lékové rezistenci nádorů je celá řada (např. snížení aktivace buněčné

smrti, změny v buněčném cyklu a cytokinezi, změny v transportu látek včetně léčiv, změny v reparaci DNA)

1.5.1. Kaspázy buněčné smrti, úloha v karcinogenezi a léčbě nádorů

Kaspázy (CASP, cysteine-aspartic protease) tvoří rodinu evolučně konzervovaných intracelulárních proteáz uplatňujících se v buněčné smrti, nekróze a zánětu. Programovaná buněčná smrt je geneticky určený mechanismus řízeného rozpadu nepotřebných nebo poškozených buněk (17, 18). Nejčastější formou programované buněčné smrti je apoptóza. Zatím bylo popsáno 12 lidských kaspáz, kaspáza 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 a 14. Do skupiny kaspáz s převážně apoptickou funkcí se řadí kaspázy 2, 3, 6, 7, 8, 9 a kaspáza 10 (17, 19). 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.

Apoptóza může být aktivována a dále probíhat dvěma cestami, vnější (dráha receptorů smrti) a vnitřní (mitochondriální dráha) cestou. Přesto, že jsou obě dráhy většinou popisovány odděleně, existují mezi nimi různé přechody, které obě dráhy propojují a vytváří další alternativní dráhy.

▪ Kaspáza 2

Kaspáza 2 (ICH1, NEDD2) je nejvíce evolučně konzervovaná savčí kaspáza a nejbližší homolog kaspázy CED-3, první popsané kaspázy u *Caenorhabditis elegans* (20, 21). Její funkce v apoptóze a dalších buněčných mechanismech není stále zcela jasná (22). Kaspáza 2 je aktivována v rámci proteinového komplexu nazývaného PIDDozóm (p53-induced protein with a death domain, PIDD) a podílí se na spuštění p53 indukované apoptóze (vnitřní dráha) vyvolané poškozením DNA, např. působením chemoterapeutik jako

je 5-FU nebo antracykliny (23). V posledních letech byla kaspáza 2 studována pomocí *in vitro* modelů i z hlediska možné role v rezistenci nádorových buněk na apoptózu vyvolanou taxany (24-27). Poměrně intenzivně je kaspáza 2 studována jako potenciální tumor supresorový gen (28-30).

Alternativním sestřihem kaspázy 2 vzniká dominantní transkript kódující kaspázu 2L a alternativní varianta kaspáza 2S. Kaspáza 2S postrádá krátkou doménu katalytické části kaspázy a její zvýšená exprese *in vitro* působí proti apoptóze (21). Regulaci alternativního sestřihu ovlivňuje 100 nukleotidů dlouhá sekvence v intronu 9 (tzv. In100 element) (31).

▪ **Kaspáza 8**

Kaspáza 8 (FLICE, MACH, MCH5) je hlavní iniciační kaspáza vnější apoptické dráhy a je aktivována v rámci proteinového komplexu DISC (death-inducing signaling complex). Nicméně některé práce přinesly důkazy i o částečném uplatnění kaspáz vnější apoptické dráhy při aktivaci mitochondriální dráhy buněčné smrti včetně apoptózy vyvolané taxany (32, 33).

Dominantními a katalyticky funkčními formami kaspázy 8 jsou kaspáza 8a a 8b. Minimálně 4 izoformy kaspázy 8 postrádají katalytickou jednotku a obsahují jen vazebné domény. Jedna z těchto variant, kaspáza 8L, obsahuje mezi exony 8 a 9 inzert dlouhý 136 bp, který v transkriptu vytváří předčasný stop kodón (34). Tato forma byla identifikována v buňkách lymfocytů a neuroblastomu, ve kterých její zvýšená exprese působila antiapopticky pravděpodobně kompetitivní vazbou do komplexu DISC (34-36).

▪ **Kaspáza 9**

Kaspáza 9 (APAF3, MCH6) je hlavní iniciační kaspázou vnitřní apoptické dráhy. Tato kaspáza je aktivována v rámci proteinového

komplexu nazývaného apoptozóm, který navíc obsahuje APAF1 (adapter protein apoptotic protease activating factor-1) a cytochrom C.

Význam kaspázy 9 pro vznik nádorů není zcela jasný. Nicméně kaspáza 9 a APAF1 jsou nezbytní pro apoptózu vyvolanou taxany (37).

Alternativním sestřihem CASP9 vzniká dominantní (proapoptická) varianta 9A a alternativní varianta 9B, která postrádá celou katalytickou podjednotku. Kaspáza 9B působí negativně na apoptózu pravděpodobně kompetiční vazbou na APAF1, která brání vytvoření funkčního apoptozómu (38).

▪ **Kaspáza 10**

Kaspáza 10 (FLICE2, MCH4) je blízkým homologem kaspázy 8, ale její funkce v indukci apoptózy je 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 (39, 40).

▪ **Kaspáza 3, 6 a 7**

Kaspázy 3, 6 a 7 jsou efektorové kaspázy aktivované v rámci vnitřní i vnější apoptické dráhy. Kaspáza 3 a kaspáza 7 se od sebe mírně liší substrátovou specifitou (41). O funkci kaspázy 6 existuje jen minimum informací.

Alternativním sestřihem genu CASP3 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 (42). Umělé zvýšení exprese v buněčném modelu ukázalo, že tato varianta může fungovat jako negativní regulátor apoptózy (42). Zvýšený poměr kaspázy 3S/3

souvisel se špatnou vnímavostí vůči neoadjuvantní léčbě založené na cyklofosfamidu u karcinomu prsu (43).

1.5.2. 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 (44). 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 kontraktilního 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 (44).

▪ KIF14

KIF14 (kinesin family member 14) patří do velké rodiny kinesinů, molekulárních motorových proteinů, odpovědných za přenos molekul různého typu podél vláken mikrotubulů (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 hydrolyzy 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 (45). 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 (45).

Významně zvýšená exprese KIF14 byla popsána u karcinomu prsu, plic, a retinoblastomu (46-48). Gen KIF14 se nachází v oblasti dlouhého raménka chromozomu 1 (1q31–q32), která je významně amplifikována u celé řady nádorových onemocnění (47).

▪ **PRC1**

PRC1 (protein regulator of cytokinesis 1) je protein schopný vázat mikrotubuly (microtubule-bundling protein) a je hlavní regulátorem vytváření centrálního svazku během cytokinézy díky interakci s KIF14 a dalšími proteiny (45, 49). PRC1 je nepostradatelný pro správný průběh cytokinézy, což bylo ověřeno *in vitro* studiemi pomocí siRNA u klasické (49) i monopolární cytokinézy (50).

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 (51).

▪ **CIT**

CIT (citron kinase, citron Rho-interacting kinase, CRIK) je v savcích buňkách nezbytná pro oddělení buněk ve finální fázi apoptózy (28, 52). 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

1.1. 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

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

V rámci 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. Specificky jsme stanovili varianty 2L, 2S, 3AB, 3S, 8L, 9A a 9B. 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 porovnali s klinicko-patologickými daty pacientek, včetně délky bezpříznakového přežití (disease free survival, DFS) u souboru pacientek, které před operací nebyly předlěčené žádnou terapií a po operaci byly dále léčeny adjuvantně chemoterapií (kombinace 5-FU, antracyklin, epirubicin, cyklofosamid, taxan), chemoterapií v kombinaci s antihormonální terapií, nebo čistě antihormonální terapií.

Prediktivní význam kaspáz jsme hodnotili na základě exprese těchto genů v nádorech získaných od pacientek, které před operací prodělaly neoadjuvantní chemoterapii zahrnující taxany (paclitaxel, docetaxel) nebo taxany v kombinaci s FAC/FEC režimy.

Dalším cílem práce bylo stanovit vliv genetické variability v regulačních oblastech genů *CASP2* a *CASP9* na expresi a alternativní sestřich těchto genů. Využili jsme DNA izolovanou z nádorové tkáně a periferních krevních lymfocytů (PKL) získaných od stejných pacientek s karcinomem prsu.

3.3.1. Kaspáza 2

Analýza transkripčních hladin CASP2, 2L a 2S s klinicko-patologickými daty pacientek s karcinomem prsu nepředlčeného a předlčeného souboru neukázala na význam kaspázy 2 jako možného prognostického nebo prediktivního faktoru. Hladiny těchto transkriptů významně nesouvisely s DFS u nepředlčeného souboru pacientek ani s odpovědí pacientek na neoadjuvantní léčbu u předlčeného souboru pacientek.

Snížená aktivita kaspázy 2 daná delecí genu, sníženou transkripcí, translací či posttranslačními úpravami by mohla mít dle předchozích studií vliv na vznik a vývoj karcinomu prsu (28-30). V naší práci jsme ale našli významně zvýšenou expresi celkového transkriptu kaspázy 2 a 2L v nádorových tkáních v porovnání s kontrolními u nepředlčené skupiny pacientek. Tyto změny na úrovni transkriptu nepodporují hypotézu o tumorsupresorové funkci CASP2 u karcinomu prsu.

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. Vzhledem k malé frekvenci těchto záměn v našem souboru nebylo možné dále tuto hypotézu ověřit. Nenalezli jsme rozdíly v genetické variabilitě studovaných oblastí CASP2 v DNA získané z nádorů a z PKL.

3.3.2. Kaspáza 9

U obou studovaných souborů pacientek s karcinomem prsu jsme našli statisticky významné snížení celkového transkriptu CASP9 v nádorových tkáních oproti kontrolním. Přes řadu významných vztahů nalezených mezi transkripčními hladinami kaspázy 9 a klinicko-patologickými daty pacientek jsme nenalezli významný vztah CASP9 k DFS nebo k odpovědi pacientek na neoadjuvantní léčbu. Nicméně našli jsme, 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. 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.

V rámci studie genetické variability kaspázy 9 jsme se zaměřili na oblasti promotoru CASP9, oblasti sestřihu CASP9B a na exonové a intronové oblasti dříve identifikované jako regulátory exprese (53). Podobně jako v případě kaspázy 2 jsme nenalezli rozdíl ve variabilitě mezi DNA získanou z PLK a DNA z nádorových tkání, což potvrzuje nízkou mutabilitu kaspázových genů u karcinomu prsu (54, 55). V genu CASP9 jsme našli souvislost mezi přítomností haplotypu tří SNP polymorfismů rs4645978-rs2020903-rs4646034, hladinami transkriptu kaspázy 9 a expresí PR a HER2 receptoru. Polymorfismus rs4645978 leží v oblasti promotoru kaspázy 9 a je spojován s rizikem vzniku různých typů karcinomu (56). 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 (57, 58).

3.3.3. Kaspázy 8 a 10

V naší práci jsme nenalezli významné změny v expresi CASP8 ani 8L v nádorových tkáních oproti kontrolním. Kaspáza 10 byla významně méně exprimována v nádorových tkáních v porovnání s kontrolami ve skupině nepředléčených pacientek. Snížená exprese kaspáz 8 a 10 byla zatím popsána jen u dětských nádorů jako je meduloblastom a neuroblastom (59, 60). Stejně jako u předešlých

kaspáz vzniká sestřihem kaspázy 10 několik alternativních variant, jejichž hladiny jsme v naší práci ovšem nesledovali.

Transkripční hladiny kaspázy 8, 8L a kaspázy 10 významně nesouvisely s klinicko-patologickými daty pacientek z obou skupin.

3.3.4. Kaspázy 3 a 7

Dále jsme stanovili celkový transkript kaspázy 3 a 7, a specificky varianty kódující proapoptickou formu kaspázy 3 (3AB) a antiapoptickou formu 3S. Transkripční hladiny ani jedné z těchto variant nesouvisely s DFS nepředléčeného souboru pacientek ani s tím, jak pacientky odpovídaly na neoadjuvantní léčbu založenou na taxanech u předléčeného souboru. Hladiny transkriptu CASP3AB byly významně zvýšené u nádorů bez exprese hormonálních receptorů u nepředléčeného souboru a významně se lišily mezi jednotlivými podtypy karcinomu prsu. Naopak expresní hladiny kaspázy 7 byly významně vyšší u nádorů exprimujících hormonálních receptory. Tento výsledek může odrážet schopnost estrogenu indukovat expresi kaspázy 7, což bylo ukázáno na modelu hormonálně pozitivních MCF-7 buněk karcinomu prsu (61).

3.3.5. Prognostický význam 2, 3, 8 a 9 u pacientek s karcinomem ovarií

Prognostický význam hlavních kaspáz buněčné smrti jsme studovali také u pacientek s karcinomem ovarií, které jsou (kromě chirurgického odstranění nádoru) léčeny adjuvantní chemoterapií 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 jedním z důvodů špatné prognózy pacientek s karcinomem ovaria (62).

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 DFS patientek.

Transkripční hladiny ani jedné ze studovaných kaspáz významně nesouvisely s délkou DFS patientek s karcinomem ovárií. Stejně jako v případě karcinomu prsu jsme u patientek s karcinomem ovárií našli významně sníženou expresi kaspázy 9 v nádorech v porovnání s kontrolními vzorky ovária. Specifické stanovení obou variant kaspázy 9 v tkáních karcinomu ovárií by mohlo objasnit význam snížené exprese kaspázy 9 u tohoto typu karcinomu v porovnání se zdravou tkání.

3.4. Prognostický a prediktivní význam KIF14, PRC1 a CIT u patientek 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. Skupina předléčených patientek byla širší v porovnání s předešlými studiemi a léčba zahrnovala 5-FU, antracykliny, cyklofosamid a taxany v různých režimech.

3.4.1. KIF14

Významně zvýšená exprese KIF14 byla popsána u karcinomu prsu, plic a retinoblastomu (46-48). 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 (47). V naší studii jsme ovšem nenalezli vztah hladin transkriptu KIF14 k délce DFS patientek. Nenalezli jsme ani vztah exprese KIF14 k odpovědi patientek s karcinomem prsu na neoadjuvantní terapii.

V nedávno publikované práci byla exprese KIF14 označena za významný faktor pro vznik TNBC podtypu karcinomu prsu, zvláště u patientek s mutacemi v genech *BRCA1* nebo *BRCA2* (63). V souladu

s touto hypotézou jsme našli významně vyšší hladiny KIF14 u podskupiny TNBC pacientek. Vztah s mutacemi v *BRCA1/2* bohužel nebylo možné ověřit, vzhledem k malému zastoupení těchto pacientek ve sledované skupině.

3.4.2. PRC1

Potvrdili jsme, že vysoká exprese transkriptu PRC1 je významným faktorem 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. 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. Navíc pacientky nijak neselektované dle léčby s vysokou expresí PRC1 v nádorech vykazovaly významně kratší bezpříznakové přežívání oproti pacientkám s nižšími hodnotami PRC1.

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. Zjistili jsme, že u MDA-MB-231 buněk, modelu TNBC formy karcinomu prsu, paclitaxel významně indukuje expresi PRC1 na mRNA i proteinové úrovni. Navození exprese PRC1 by tedy mohlo být jedním z mechanismů, kterým se TNBC buňky brání působení paclitaxelu. Inhibice exprese PRC1 navozená pomocí siRNA však neovlivnila cytotoxicitu paclitaxelu, resp. přechod buněk do G2/M bloku se nelišil u testovaných buněk od kontrolních. Navíc 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. PRC1 s největší pravděpodobností tedy nemá význam pro účinek taxanů při léčbě karcinomu prsu.

Sekvenační analýzou haplotypů genu *PRC1* (celkem analyzováno 22 SNP polymorfizmů) jsme nepotvrdili významnou souvislost genetické variability *PRC1* s hladinami transkriptu v nádorech a s klinicko-patologickými daty pacientek.

3.4.3. 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 předléčeného i nepředléčeného 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.

3.4.4. Prognostický význam KIF14, PRC1 a CIT u pacientek s karcinomem ovárií

Obdobně jako u karcinomu prsu jsme našli významně vyšší hladiny transkriptu KIF14, *PRC1* a CIT v tkáních karcinomu ovária v porovnání s kontrolami. Transkripční hladiny KIF14 a *PRC1* pozitivně korelovaly s expresí proliferčního faktoru Ki-67 v nádorových tkáních, nicméně nenalezli jsme významnou souvislost mezi expresí těchto genů a délkou bezpříznakového přežívání pacientek. 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 DFS (64). Tento výsledek se v naší práci nepotvrdil, nicméně jsme našli významnou souvislost vysoké exprese CIT v nádorech ovárií s kratší dobou DFS pacientek, což ukazuje na potřebu ověřování výsledků na nezávislých souborech.

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. Exprese 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 exprese 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 LIERATURY

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, 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.
3. 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.
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.
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. Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. Hoboken. NJ: Wiley-Blackwell; 2009.

10. 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.
11. 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.
12. Anampa J, Makower D, Sparano JA. Progress in adjuvant chemotherapy for breast cancer: an overview. *BMC Med*. 2015;13:195.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(4):a008656.
20. 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.
21. 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.
22. Kitevska T, Spencer DM, Hawkins CJ. Caspase-2: controversial killer or checkpoint controller? *Apoptosis.* 2009;14(7):829-48.
23. Vakifahmetoglu-Norberg H, Zhivotovsky B. The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends Cell Biol.* 2010;20(3):150-9.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
- 32.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.
- 33.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.
- 34.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.
- 35.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.
- 36.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.
- 37.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.
- 38.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.
- 39.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.
- 40.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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Lee KY, Davies T, Mishima M. Cytokinesis microtubule organisers at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 15):3495-500.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.

51. 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.
52. 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.
53. 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(7):889-900.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. Muhlethaler-Mottet A, Flahaut M, Bourlourd 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.

- 61.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.
- 62.Markman M. Pharmaceutical management of ovarian cancer : current status. *Drugs.* 2008;68(6):771-89.
- 63.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.
- 64.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.