

Rezistence na (chemo)terapii

Rezistence – inherentní (pre-existující)
– získaná

Nádor 1 cm³ – cca 1x10⁹ buněk.

Lze předpokládat 1 rezistentní buňku na 10⁶-10⁷ buněk (genom. instabilita, větší mutační rychlost)

– cca 1000-10000 inherentně rezistentních buněk/1 cm³ nádoru?

Pravděpodobnost úspěchu léčby je dána velikostí nádoru.

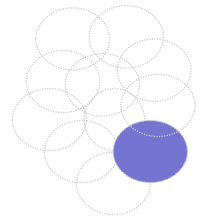
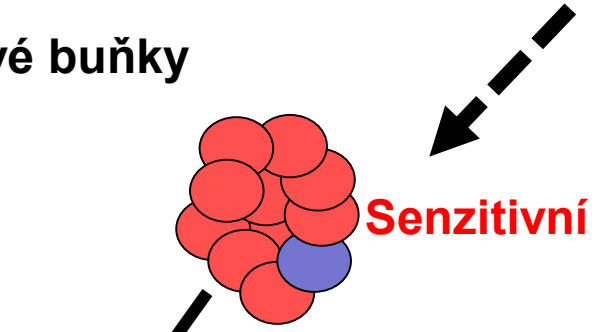
Vzniká rezistence „de-novo“ a/nebo je to selekce rezistentních klonů?

⇒ **Kombinační terapie** – omezují vznik rezistence a snižují toxicitu a zvyšují účinnost léčby

(CAF - cyklofosfamid, adriamycin (doxorubicin), fluoruracil v terapii ca prsu)

Protinádorové látky

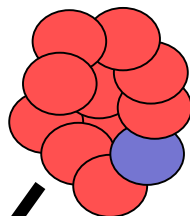
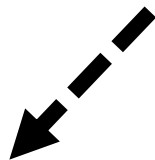
Nádorové buňky



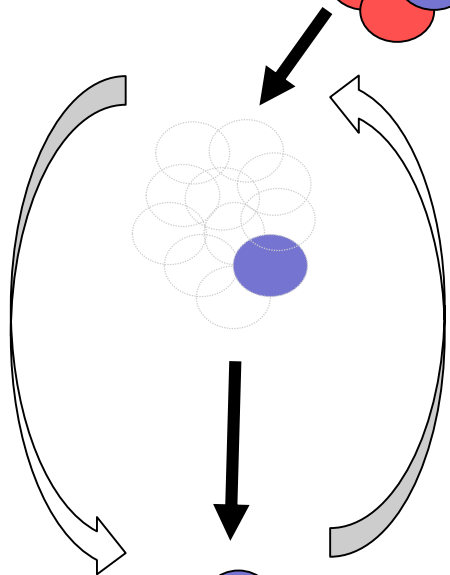
Selekce
rezistentního
klonu

Protinádorové látky

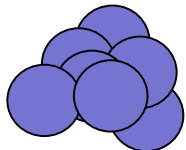
Nádorové buňky



Senzitivní



Horizontální přenos
informace? (pro-survival
signaling)



Rezistentní

Selekce
rezistentního
klonu

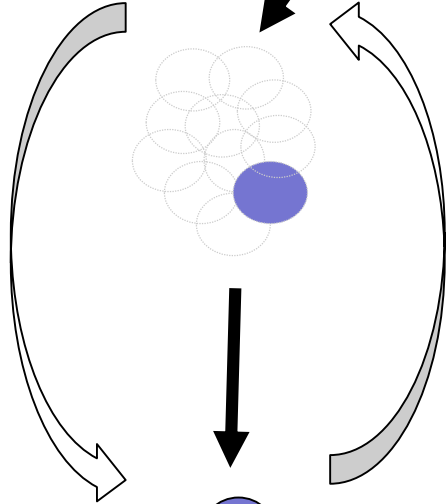
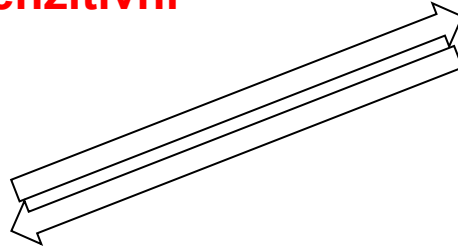
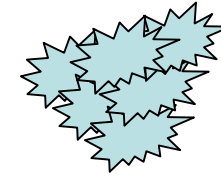
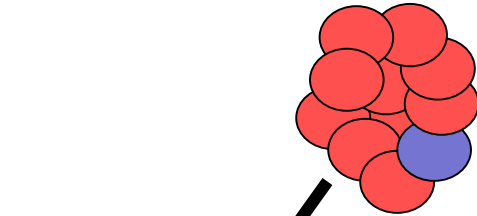
Horizontální přenos informace
(růstové faktory, proteiny, mRNA, μ RNA, exosomy....)

Protinádorové látky

Nádorové buňky

Buňky prostředí nádoru
(stroma, kostní dřeň...)

Senzitivní



Horizontální přenos
informace? (pro-survival
signaling)

Rezistentní

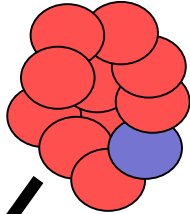
Selekce
rezistentního
klonu

**Horizontální přenos
informace**
(růstové faktory, proteiny,
mRNA, μ RNA, exosomy....)

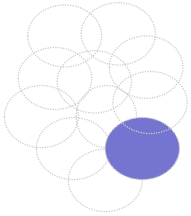
Protinádorové látky

Nádorové buňky

Senzitivní

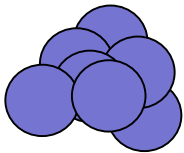


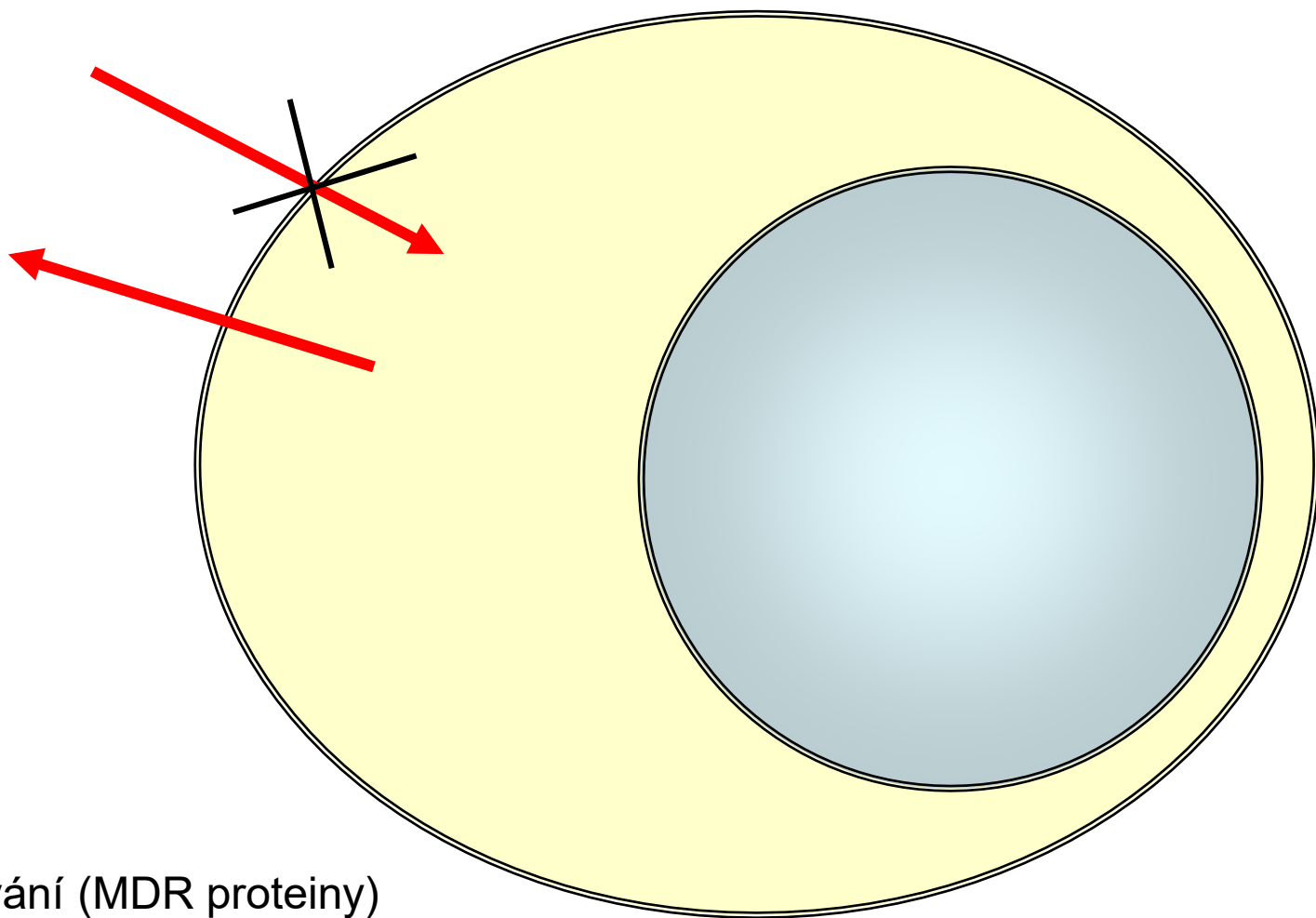
Jak se může buňka/buněčná populace toxickým účinkům protinádorové látky bránit?



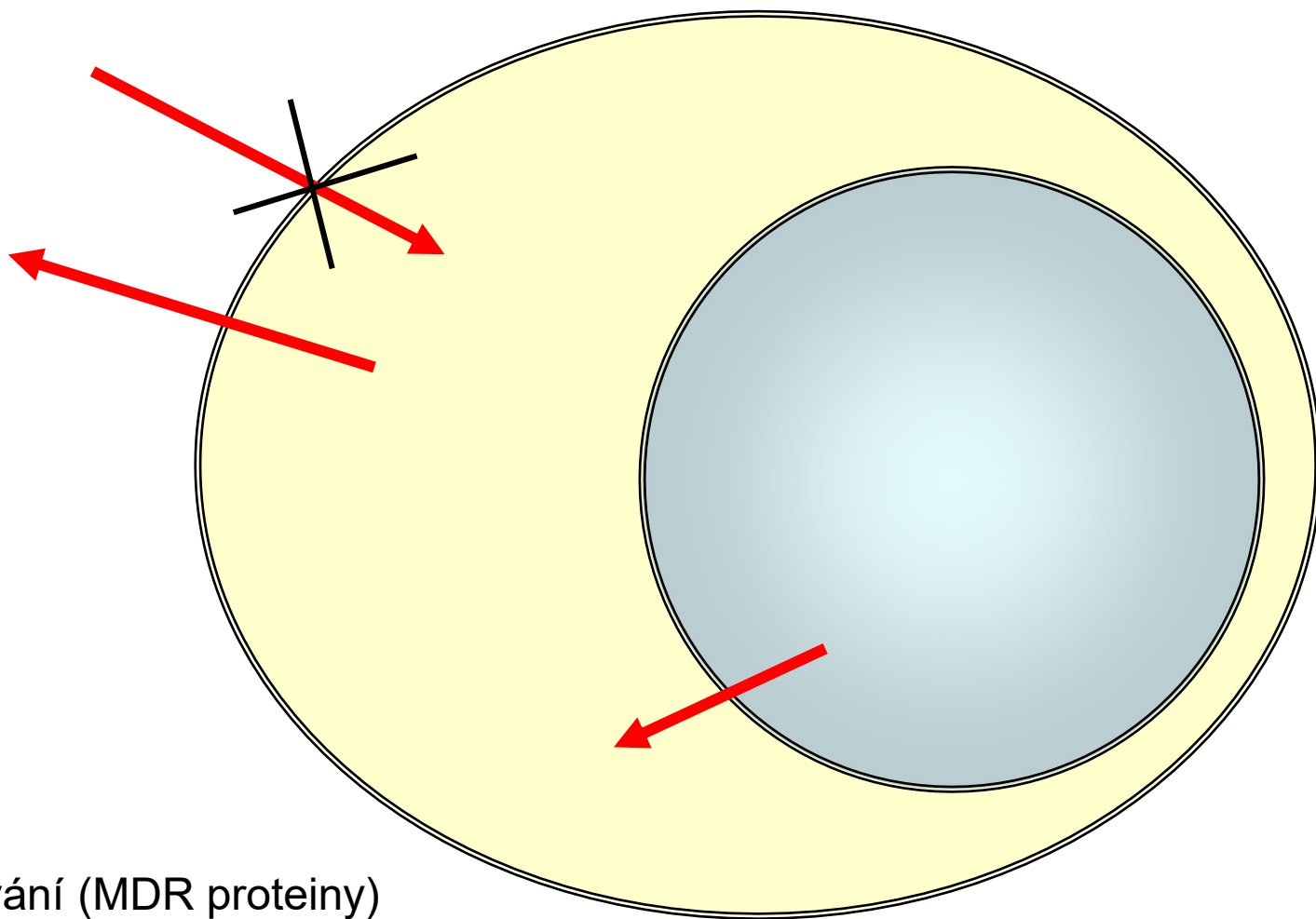
Rezistentní

Selekce rezistentního klonu

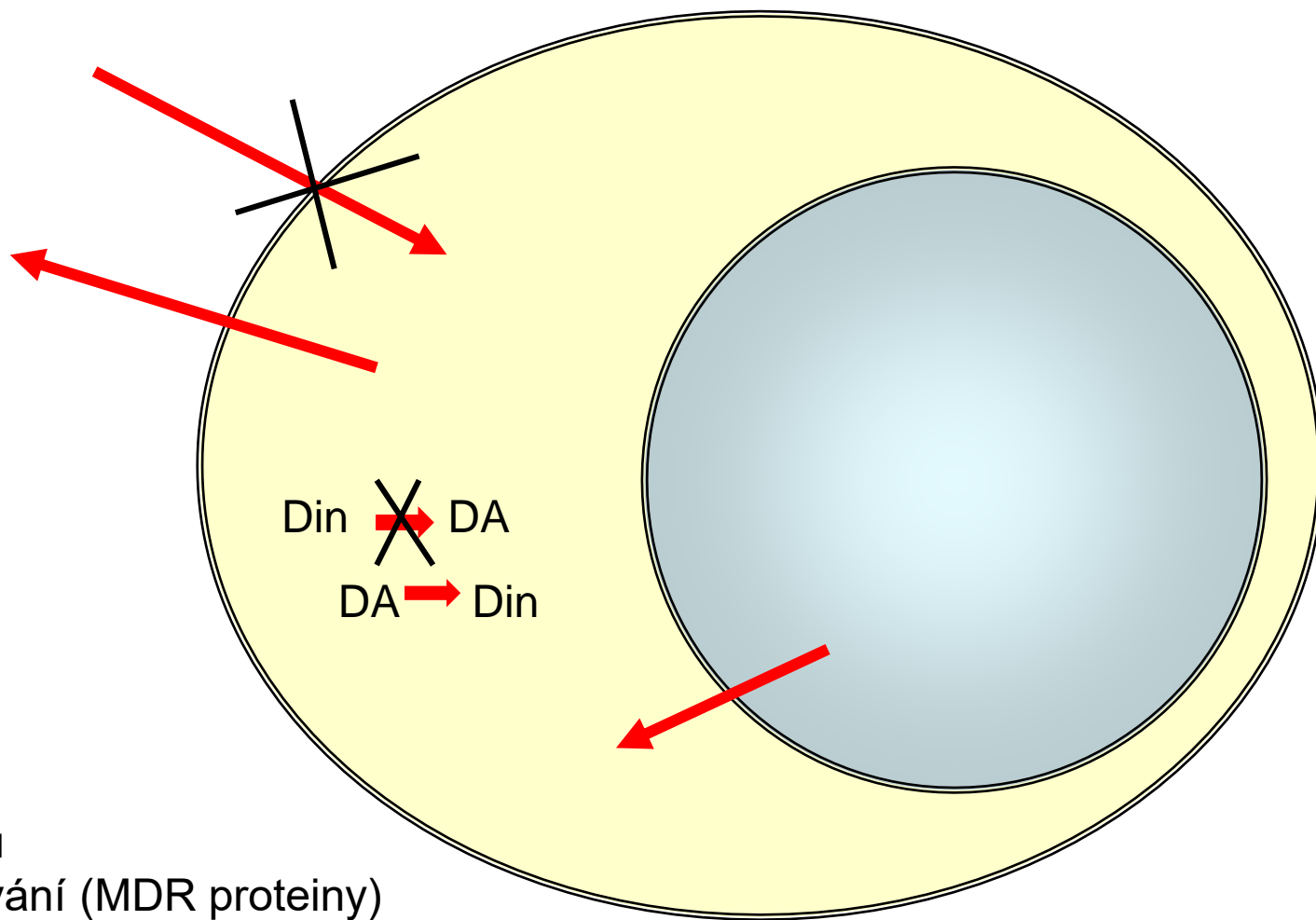




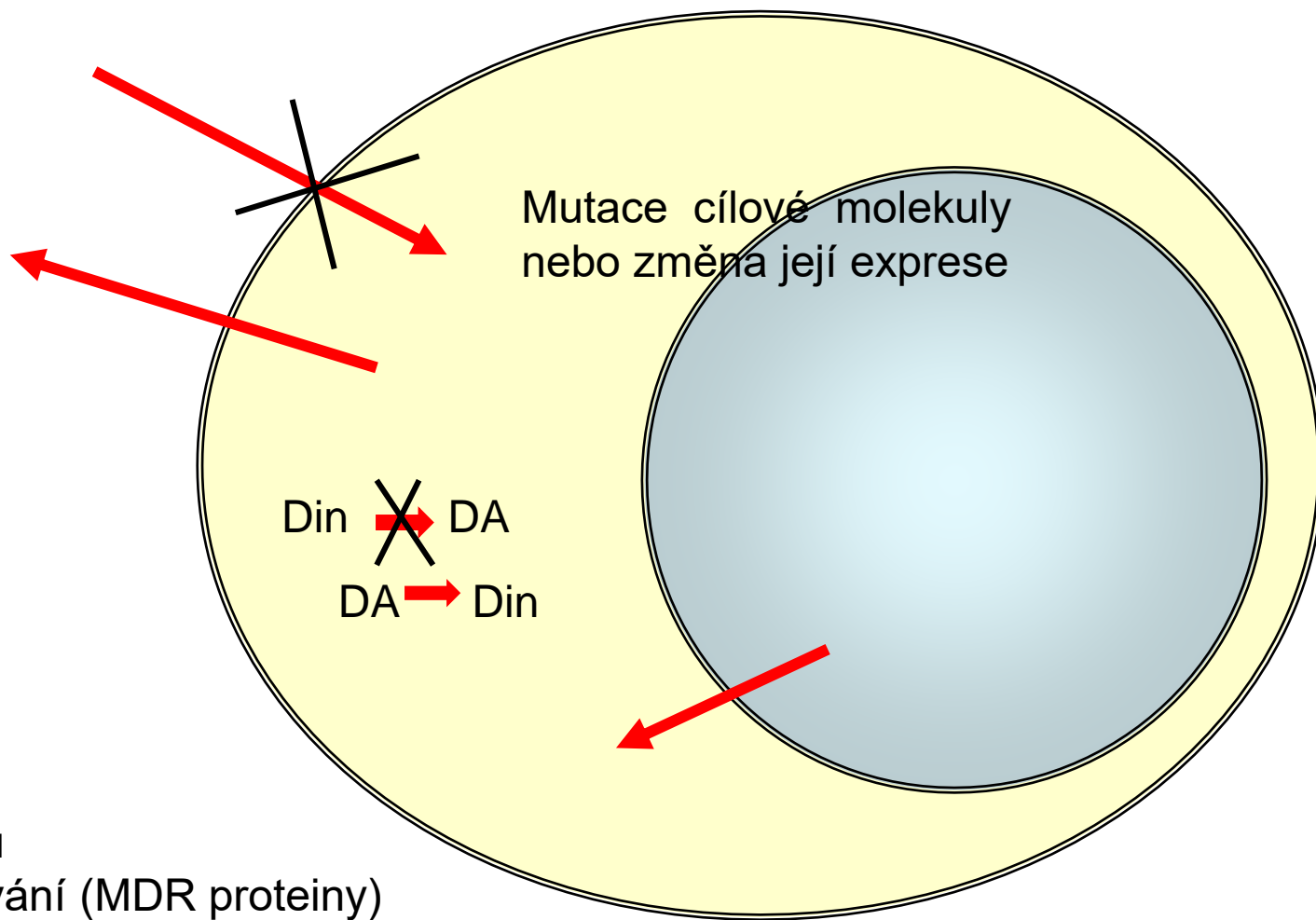
- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)



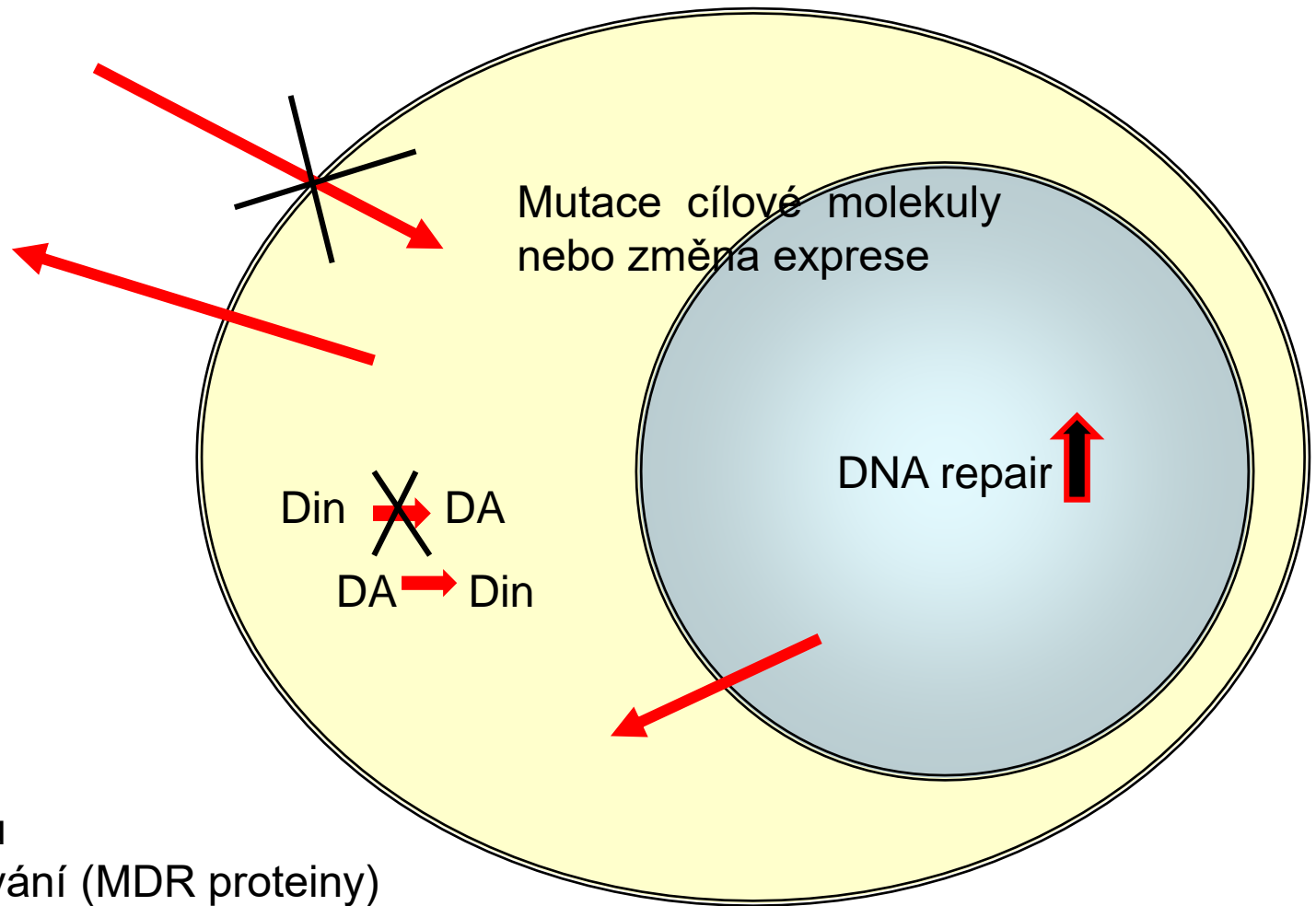
- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)
- porušení nitrobuněčného transportu



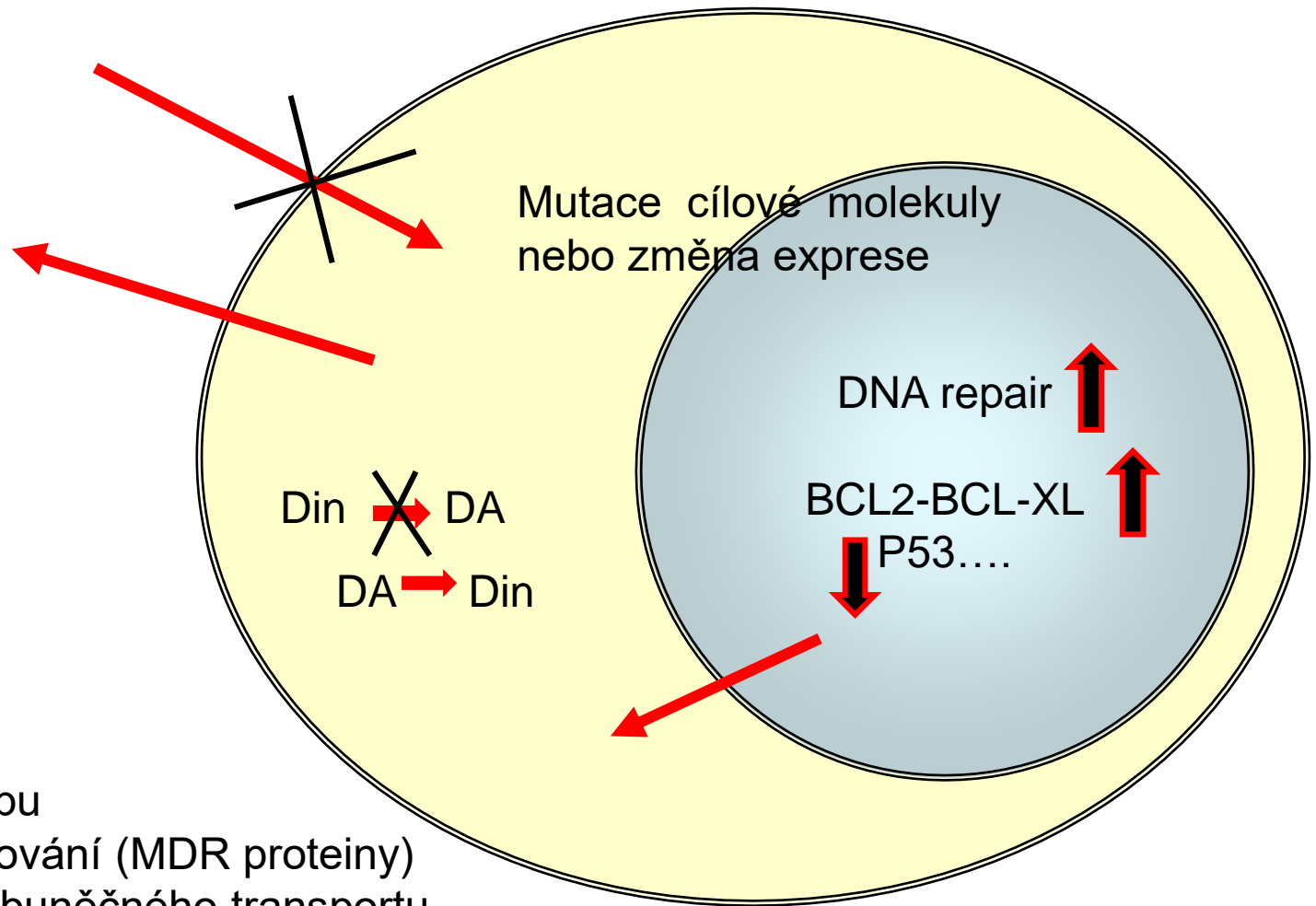
- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)
- porušení nitrobuněčného transportu
- snížení aktivace, zvýšení deaktivace



- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)
- porušení nitrobuněčného transportu
- snížení aktivace, zvýšení deaktivace
- **mutace cílového proteinu nebo změna exprese**



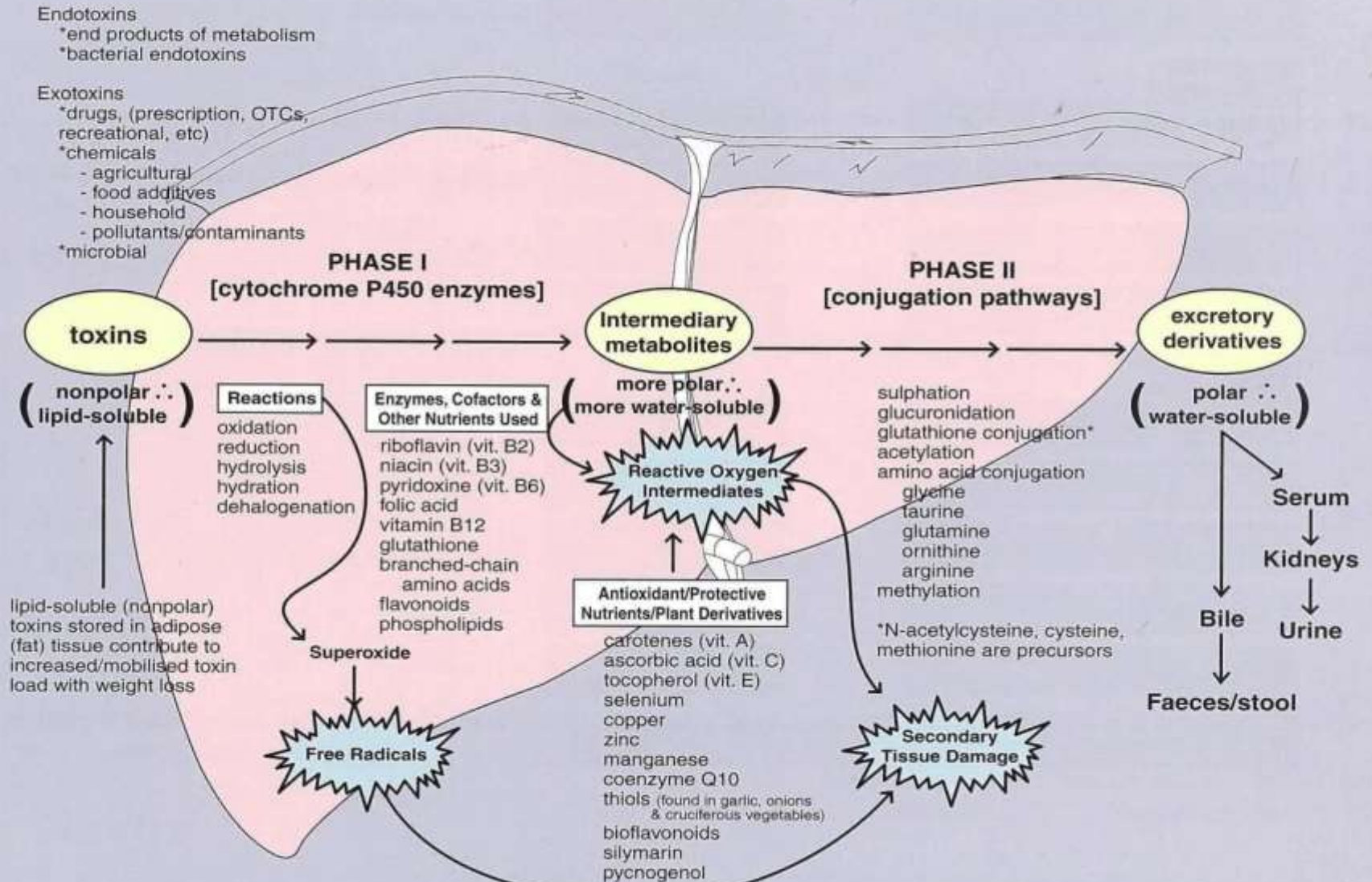
- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)
- porušení nitrobuněčného transportu
- snížení aktivace, zvýšení deaktivace
- mutace cílového proteinu
- **zvýšení kompenzačních mechanismů (DNA repair, antioxidantivní ochrana...)**



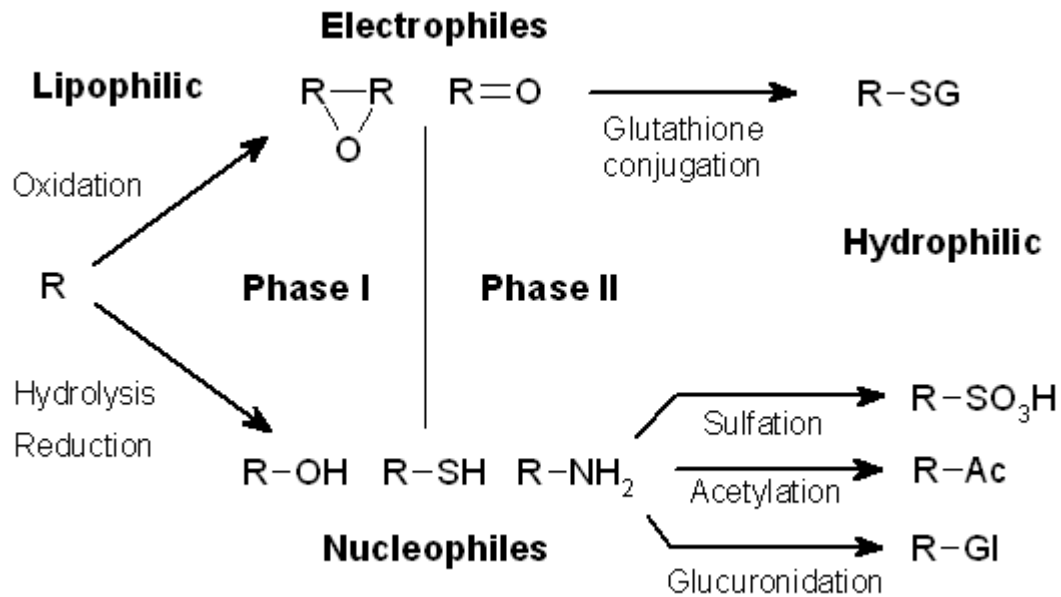
- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)
- porušení nitrobuněčného transportu
- snížení aktivace, zvýšení deaktivace
- mutace cílového proteinu
- zvýšení kompenzačních mechanismů (DNA repair, antioxidantní ochrana...)
- **kinázový crosstalk, aktivace alternativních proliferačních signálů**
- **aktivace anti-apoptotických procesů**

Detoxifikace xenobiotik (fáze I-II)

Liver Detoxification Pathways & Supportive Nutrients



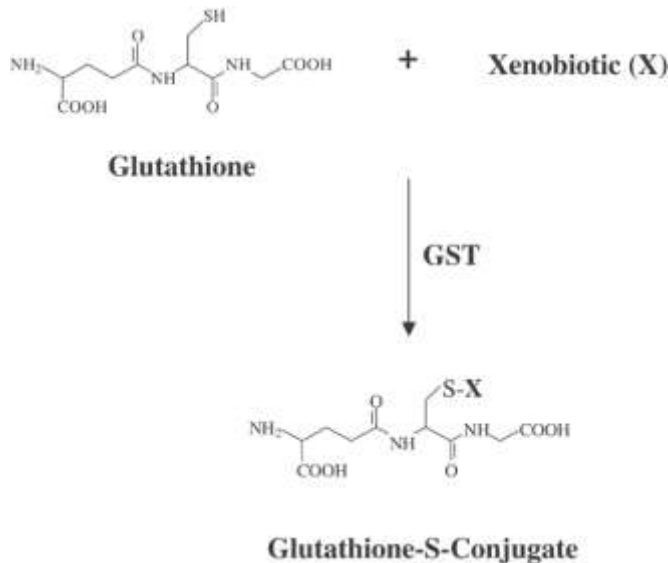
Detoxifikace xenobiotik (fáze I-II)



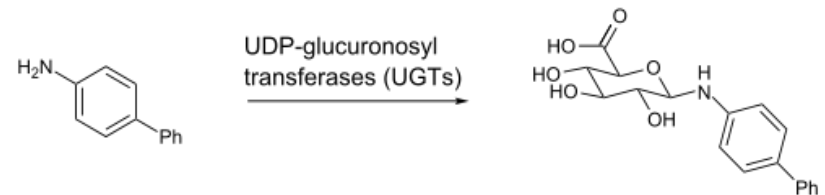
Detoxifikace xenobiotik (fáze I-III)

- I. **detoxifikace *via* cytochrom p450** (zvýšení rozpustnosti, hlavně játra)
- II. **konjugace s glutathionem, k. glukuronovou apod.**
(dosažení rozpustnosti pro exkreci, anionický konjugát rozeznávají exportéry katalyzuje GST, UDP-glukuronosyl transferáza,)
- III. **export pomocí specifických transportérů** (ABC a Vaults)

Konjugace s glutathionem



Konjugace s kys. glukuronovou



Export xenobiotik z buňky

ABC transportéry – ATP Binding Cassette rodina (Multi - drug-resistance proteins (MDRs))

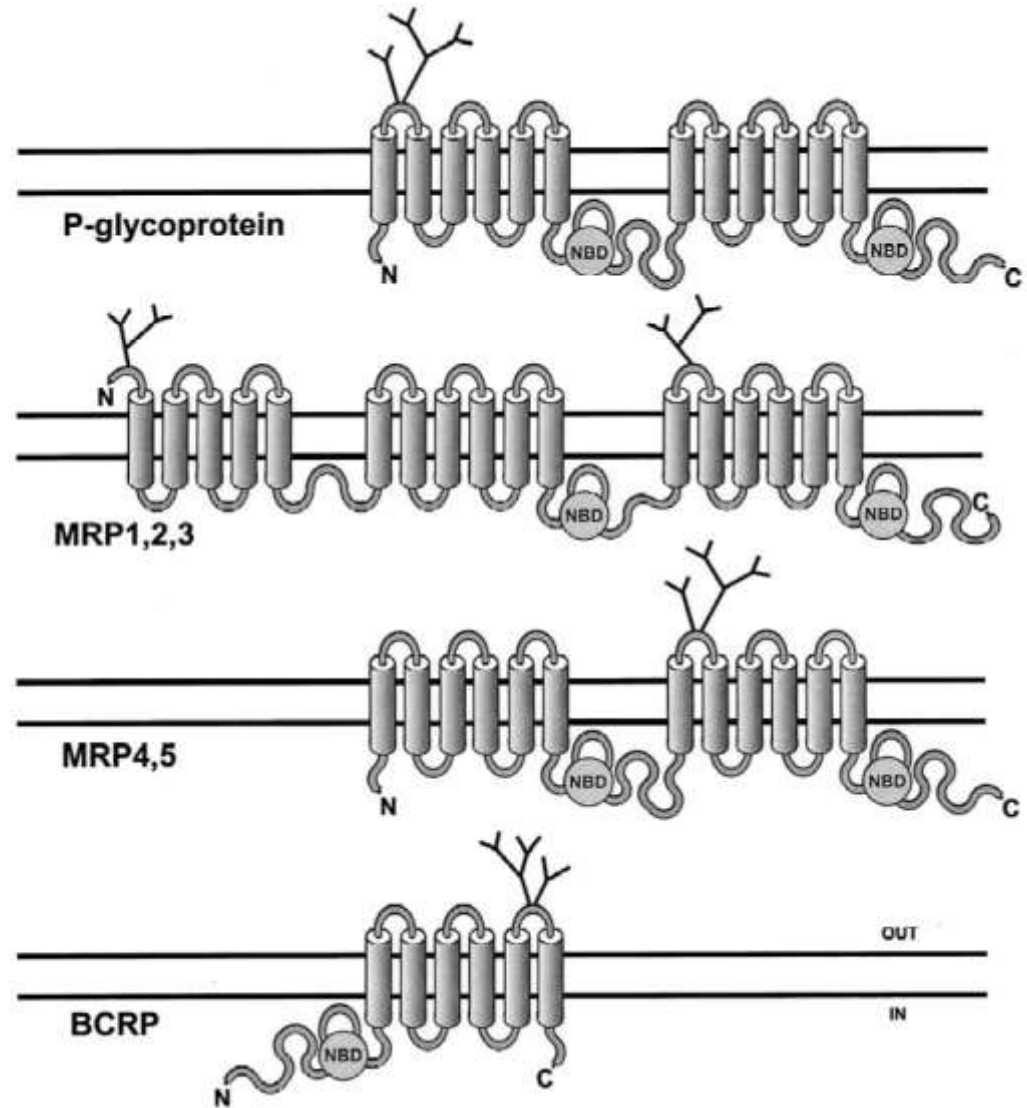
- ABC rodina — cca 50 proteinů
- na plazmatické membráně
- **exportují xenobiotika** (malé hydrofobní molekuly) a jejich konjugáty **ven z buňky** typicky antimetabolita, antracykliny, TOPO inhibitory a další...
- overexprese je jednou z hlavních příčin rezistence na chemoterapii, MDR
- podílejí se na činnosti hemato-encefalické bariéry (endotel) a rozhraní oběhů v placentě (syncytiotrofoblasty)
- inhibitory ABC transportérů – terapeutický potenciál

P-glykoprotein
(MDR1, ABCB1)

MRP 1-3
(ABCC1-3)
(multidrug resistance protein)

MRP 4-5
(ABCC4-5)

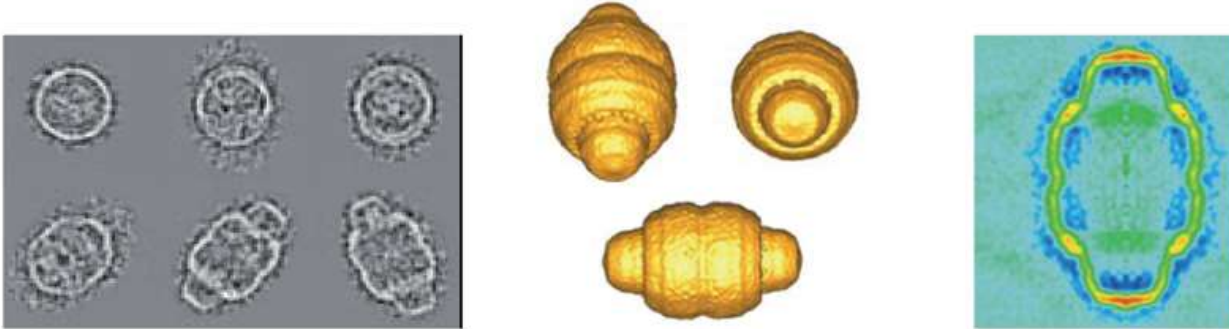
BCRP4
(ABCG2)
(breast cancer resistance protein)



„half transporter“ asi funguje jako homodimer

VAULTS

Duté ribonukleopartikule (70x40 nm, 13 MDa)



VAULTS – dynamické kargo mezi jádrem a cytosolem

VAULTS - 3 proteiny a několik nekódujících RNA

Hlavní složka: **MVP/LRP (major vault protein, lung resistance-related protein)**

MVP/LRP overexprimován v mnoha typech rezistentních nádorových buněk
Inaktivace MVP vede ke kumulaci doxorubicinu v jádře a zvýšené toxicitě

Exportují vaults xenobiotika z jádra do cytosolu???

Poškození DNA nebo inhibice syntézy

Alkylanty, deriváty Pt, interkalanty a inhibitory topoizomeráz, antimetaboly a hydroxyurea

Epigenetická cytostatika

inhibitory DNMTs, HDACs

Účinek na mitotické vřeténko

vinka-alkaloidy, taxany

Hormonální terapie

tamoxifen

Ostatní

bortezomib

TKIs

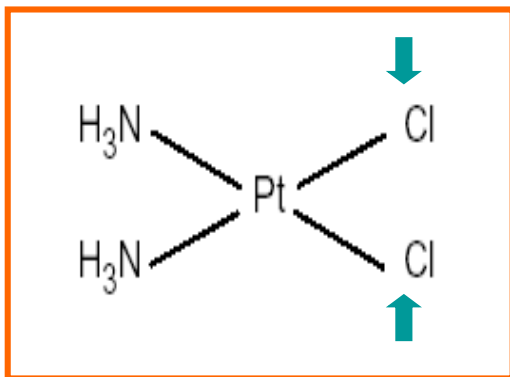
imatinib

Rezistence na deriváty platiny

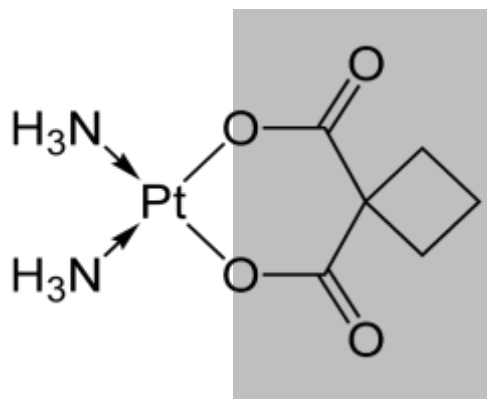
Deriváty platiny s protinádorovým účinkem

Vstupují do buňky pasivně
a/nebo transportérem CTR1

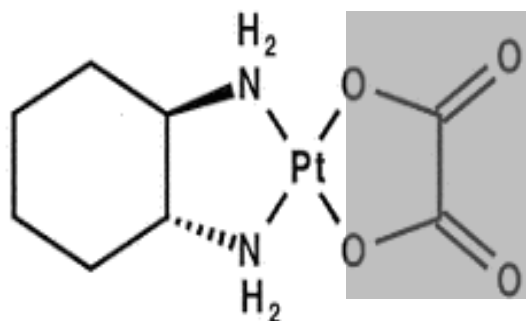
*(trans G-G)
jen vzácně!*



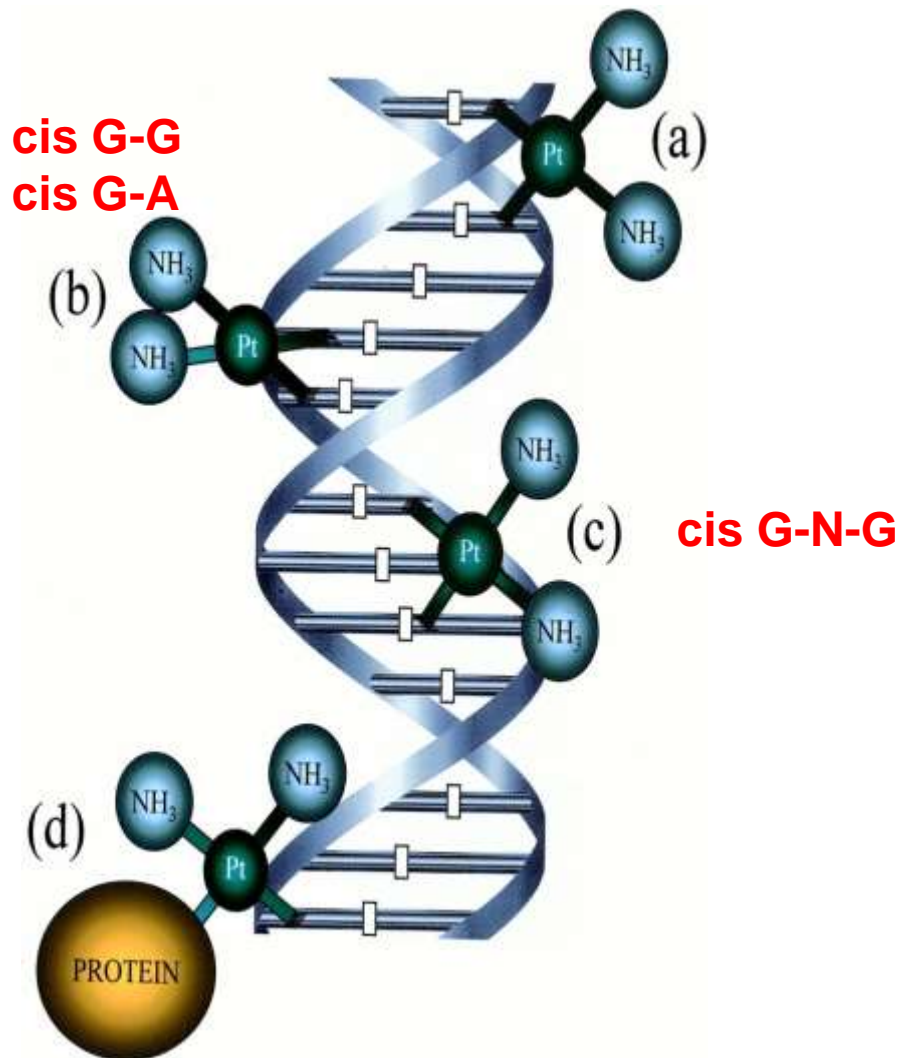
Cisplatina



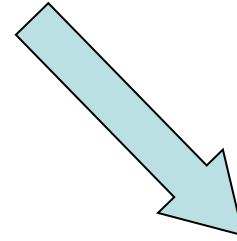
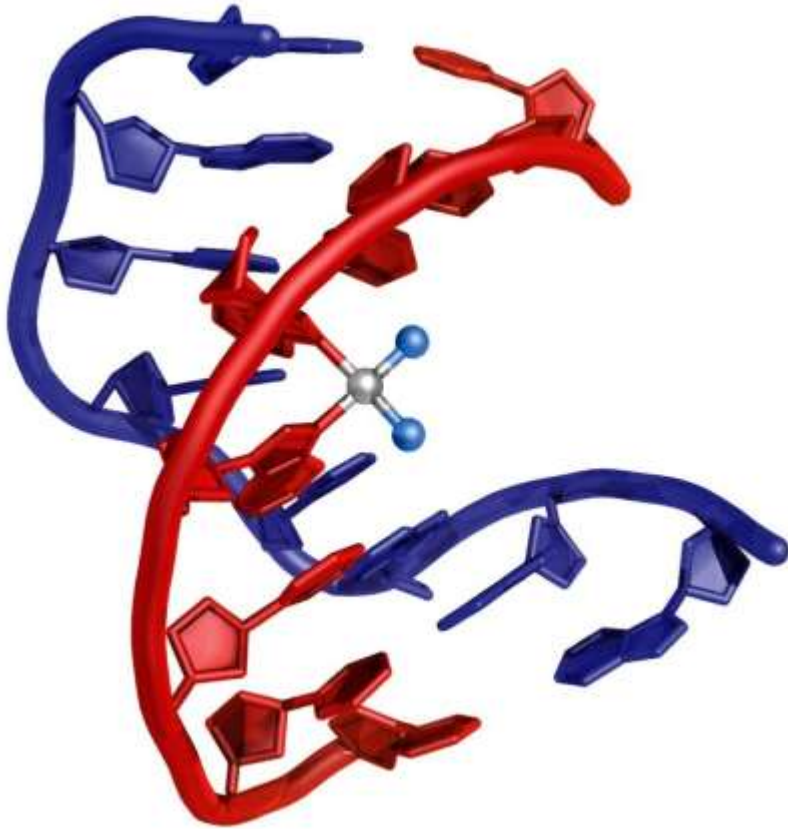
Karboplatina



Oxaliplatina



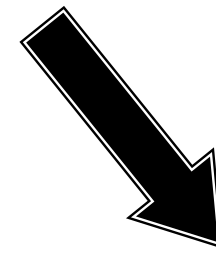
Pt-ady (intrastrand) vedou k distorzi dvoušroubovice DNA (včetně mtDNA)



Inhibici replikace
Inhibici transkripce
Poškození telomer (bohaté na G)

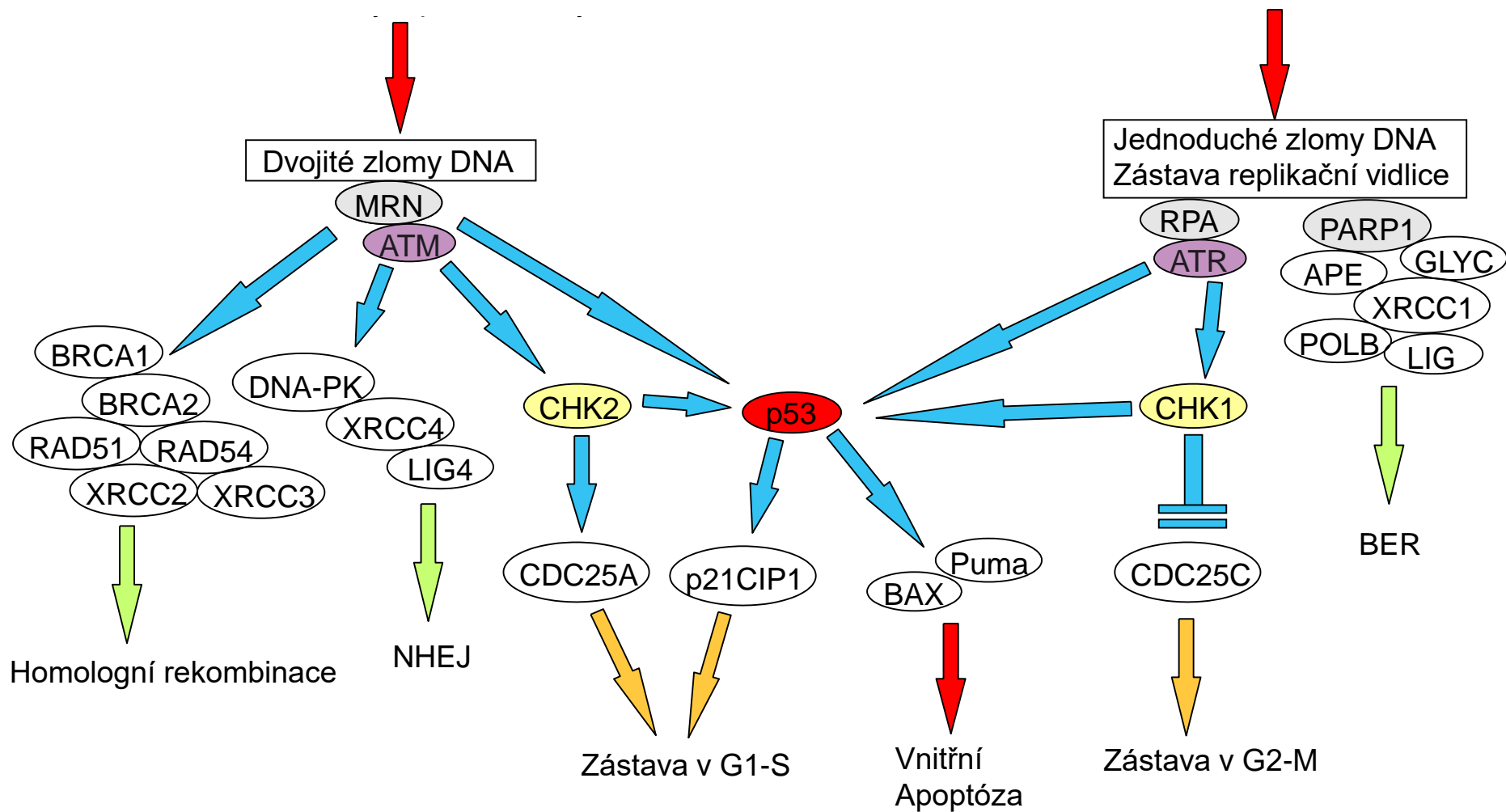


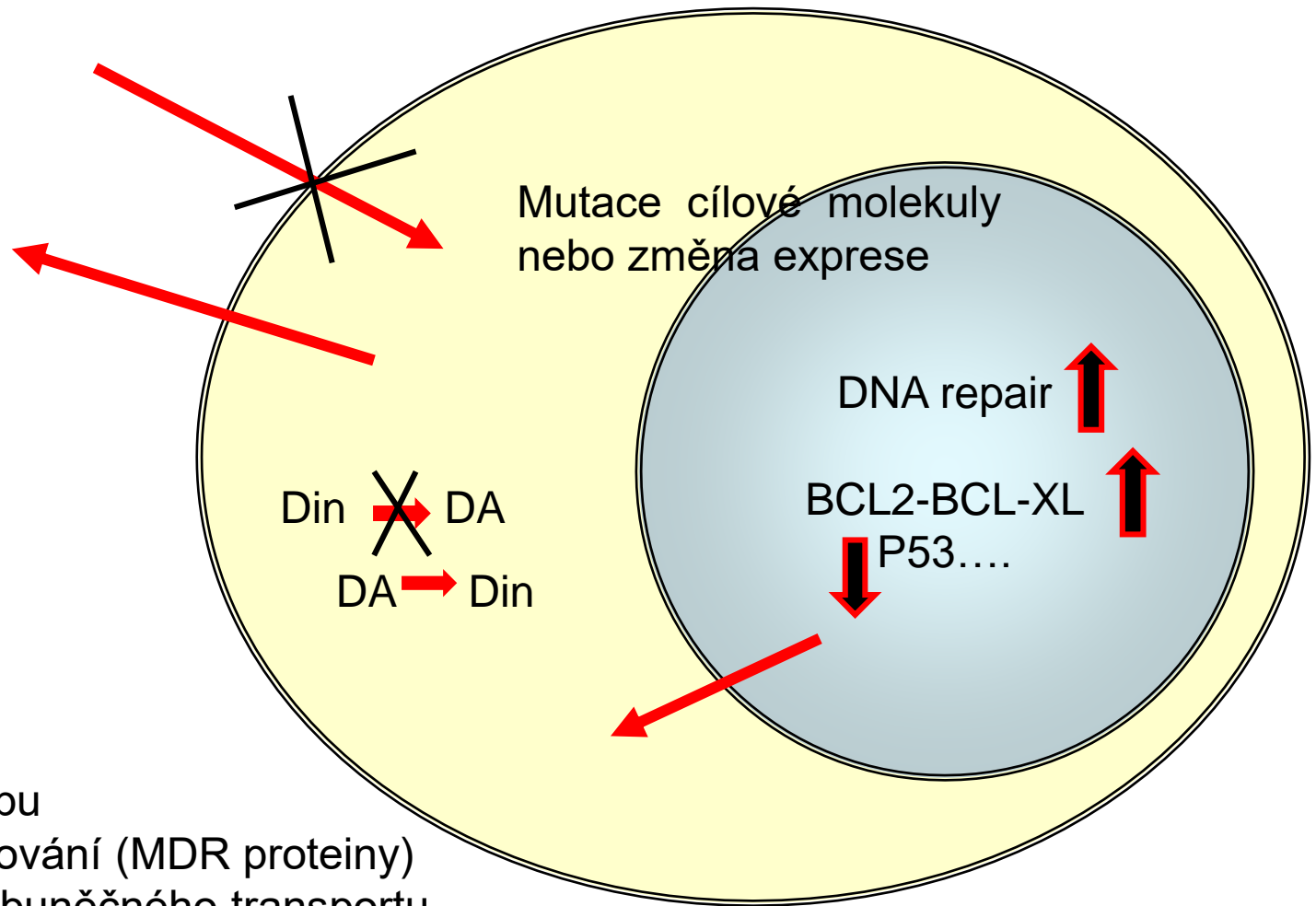
Aktivace DNA oprav



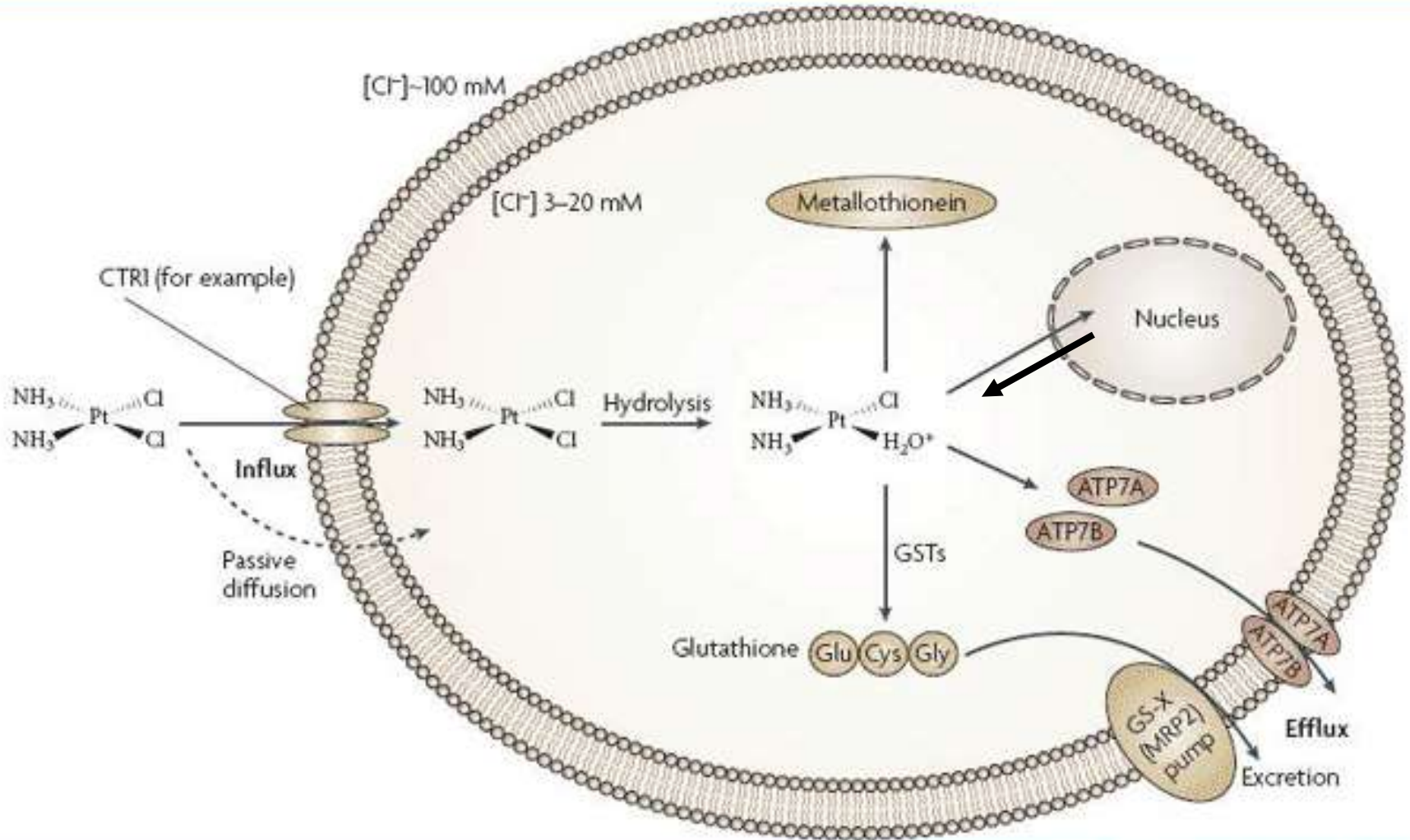
Apoptóza

POŠKOZENÍ DNA, ATM, ATR, p53 a buněčná smrt





- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)
- porušení nitrobuněčného transportu
- snížení aktivace, zvýšení deaktivace
- mutace cílového proteinu
- zvýšení kompenzačních mechanismů (DNA repair, antioxidantní ochrana...)
- **kinázový crosstalk, aktivace alternativních proliferačních signálů**
- **aktivace anti-apoptotických procesů**



Jaké má buňka možnosti?

Rezistence na deriváty platiny



Downregulace transportéru CTR1



Upregulace ATP7A, ATP7B (exportéry mědi)



MDR proteiny



Zvýšená detoxifikace - konjugace s glutathionem nebo MT



Změny v DNA repairu (NER, upregulace ERCC1)



Změny v apoptotických drahách (overexprese BCL2, BCL-XL...)
vyřazení p53

Rezistence na alkylující látky

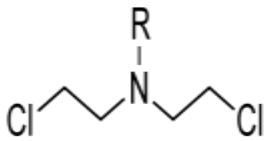
Alkylační činidla

Látky schopné alkylovat (modifikovat připojením uhlíku nebo uhlíkatého zbytku) především dusíkaté báze (C, A, ale hlavně G). Reaktivní modifikace vede nejčastěji ke vzniku G-G crosslinku (inter-chain nebo intra-chain) následkem je omezení replikace a transkripce → signalizace poškození DNA

Vstup do buňky????

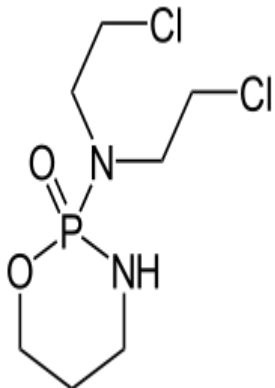
Oprava

APOPTÓZA

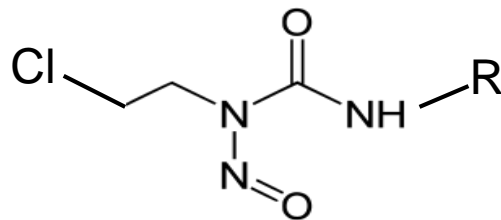


nitrogen mustard

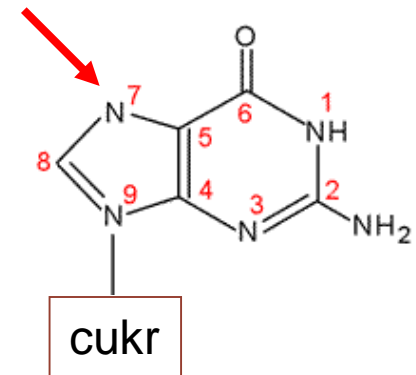
Cyklofosfamid



Chlorethyl nitrosourea



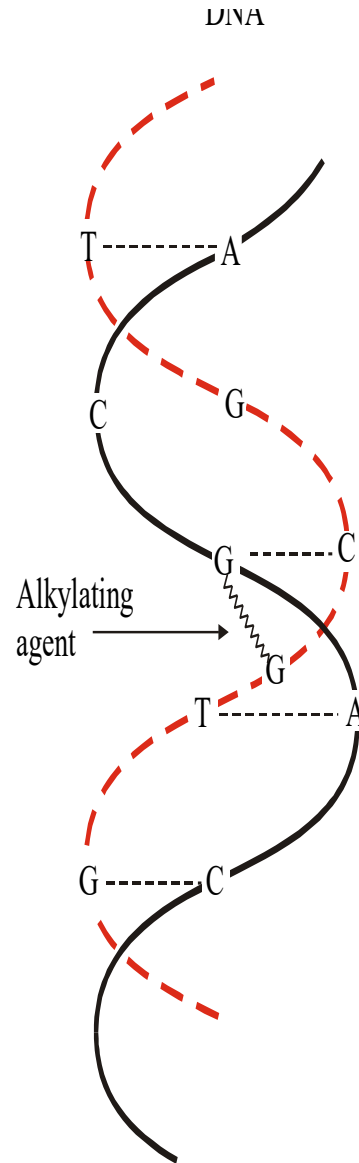
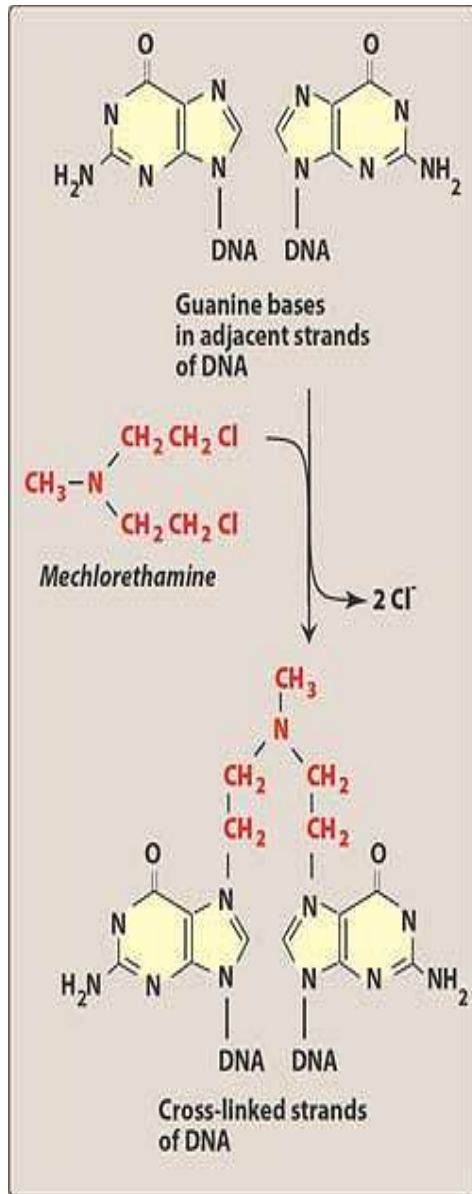
Adukty nejčastěji na G
(v poloze N7)



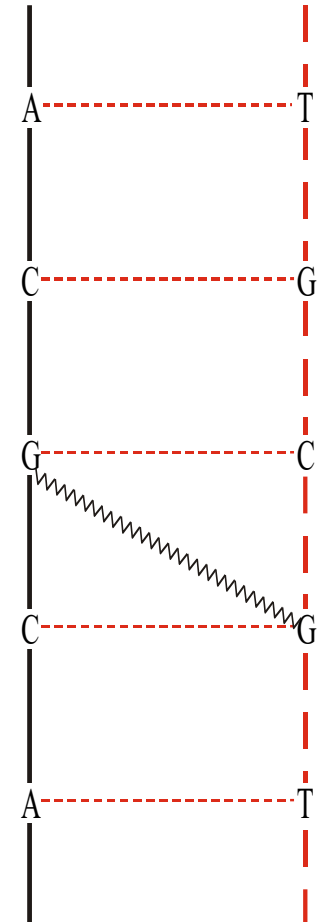
Alkylují ale také proteiny.

Mechanismus účinku alkylačních látek

Vznik INTERSTRAND (meziřetězcového) crosslinku

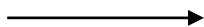


i.e.

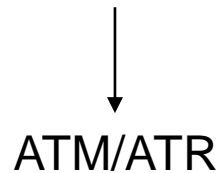


A = adenine
C = cytosine
G = guanine
T = thymidine

Tvorba krosslinků
(intra- nebo inter-strand)



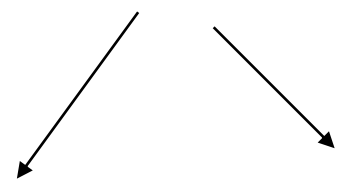
Rozeznání poškození
DNA



ATM/ATR



p53



Zástava buněčného cyklu

Bax, Puma...

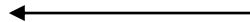


DNA repair



APOPTÓZA

Přežití a návrat
do cyklu



Rezistence na alkylanty (cyklofosfamid)

Cyklofosfamid je prodrug – musí být nejprve aktivován cytochrom p450 oxidázou



Aldehyd dehydrogenáza (cyklofosfamid a další)

Enzym který detoxifikuje aktivní metabolit cyklofosfamidu



Detoxifikace (konjugace glutathionu -GST,GSH)



DNA repair

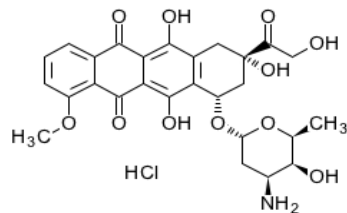
Nejsou substrátem pro MDR proteiny

Rezistence na antracykliny a inhibitory topoizomeráz

Interkalační látky (antracykliny)

Doxorubicin

(komerční název adriamycin,
idarubicin)

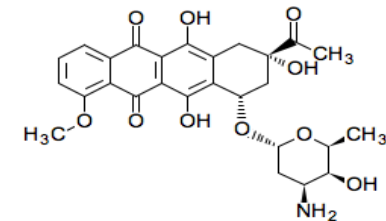


D01275



Interkalují se a inhibují TOPOII
⇒ dvouřetězcové zlomy
+ generují volné radikály

Daunorubicin

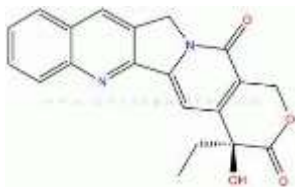


C01907

Inhibitory topoizomeráz

TOPOI

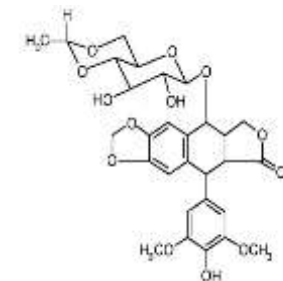
Irinotekan a topotekan



⇒ Jednořetězcové zlomy

TOPOII

Etoposid



⇒ Dvouřetězcové zlomy

Rezistence na inhibitory topoizomeráz a antracykliny

Irinotekan, topotekan
TOPOI

etoposid
TOPOII

antracykliny
TOPOII
+ generace radikálů

 glukuronidace

 glukuronidace

 glukuronidace

 TOPOI + mutace

 TOPOII + mutace

 TOPOII + mutace

 DNA repair


 DNA repair


 DNA repair

 MDR proteiny

 MDR proteiny

 MDR proteiny

 Antiapoptotické
procesy

 Antiapoptotické
procesy

 Antiapoptotické
procesy

 SOD, MnSOD, GSTs

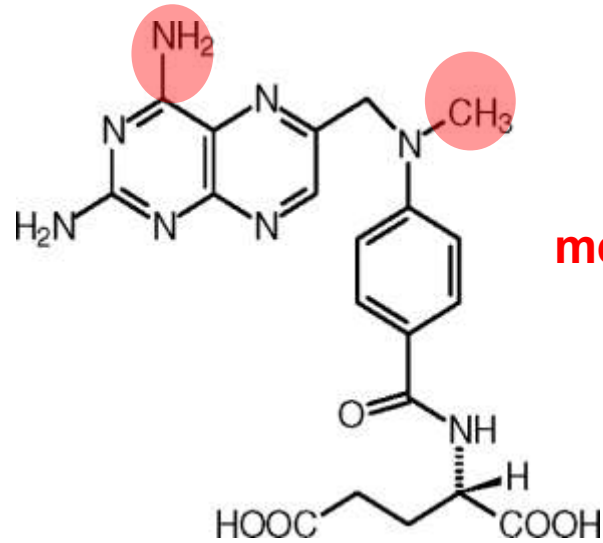
Rezistence na antimetabolity

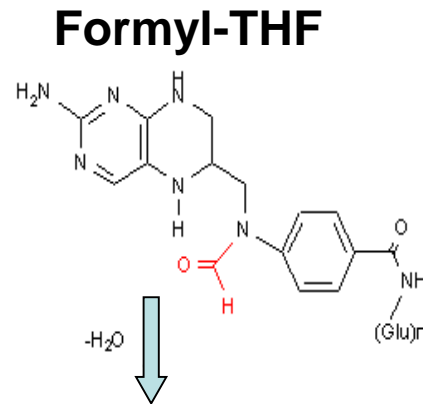
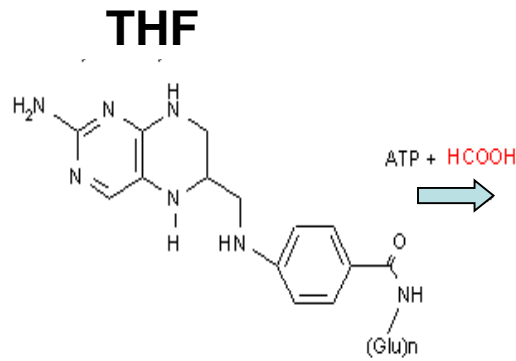
- **antifoláty**
- **antibáze**
- **antinukleosidy**

Antifoláty – inhibitory DHFR

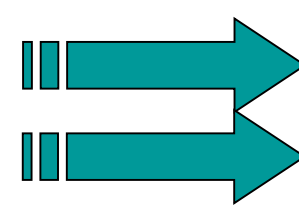


Sidney Farber

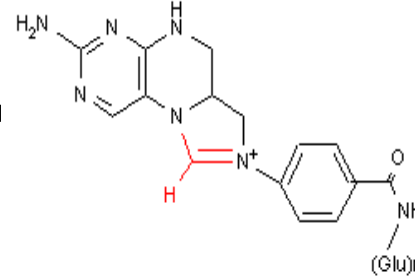
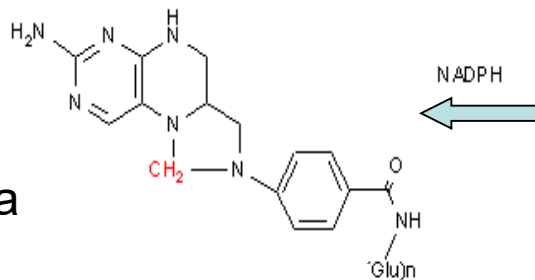




De novo
syntéza
purinů



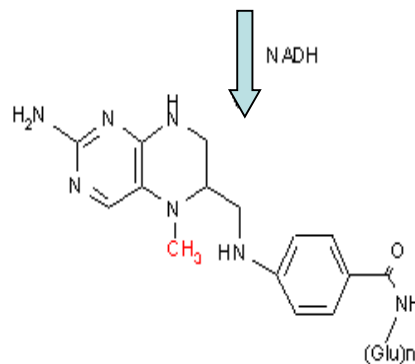
↓
IMP



Metylen-THF

Metenyl-THF

Tymidylát syntéza
dUMP → dTMP

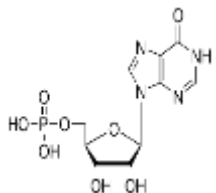


Metyl-THF

THF je donor jednéuhlíkových
zbytků (nesených N5 a N10) pro
několik biochemických reakcí

PURINY

Syntéza De novo



IMP

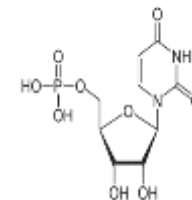
PRPP

Ribózo 5-P

karbamoyl fofsát

PYRIMIDINY

Syntéza De novo



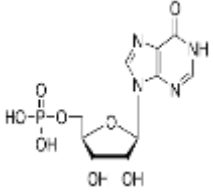
UMP

P_Pi



PURINY

Syntéza De novo



IMP

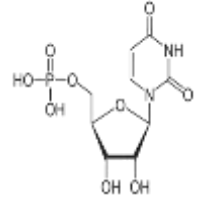
Ribózo 5-P

PRPP

karbamoyl fofsát

PYRIMIDINY

Syntéza De novo



UMP

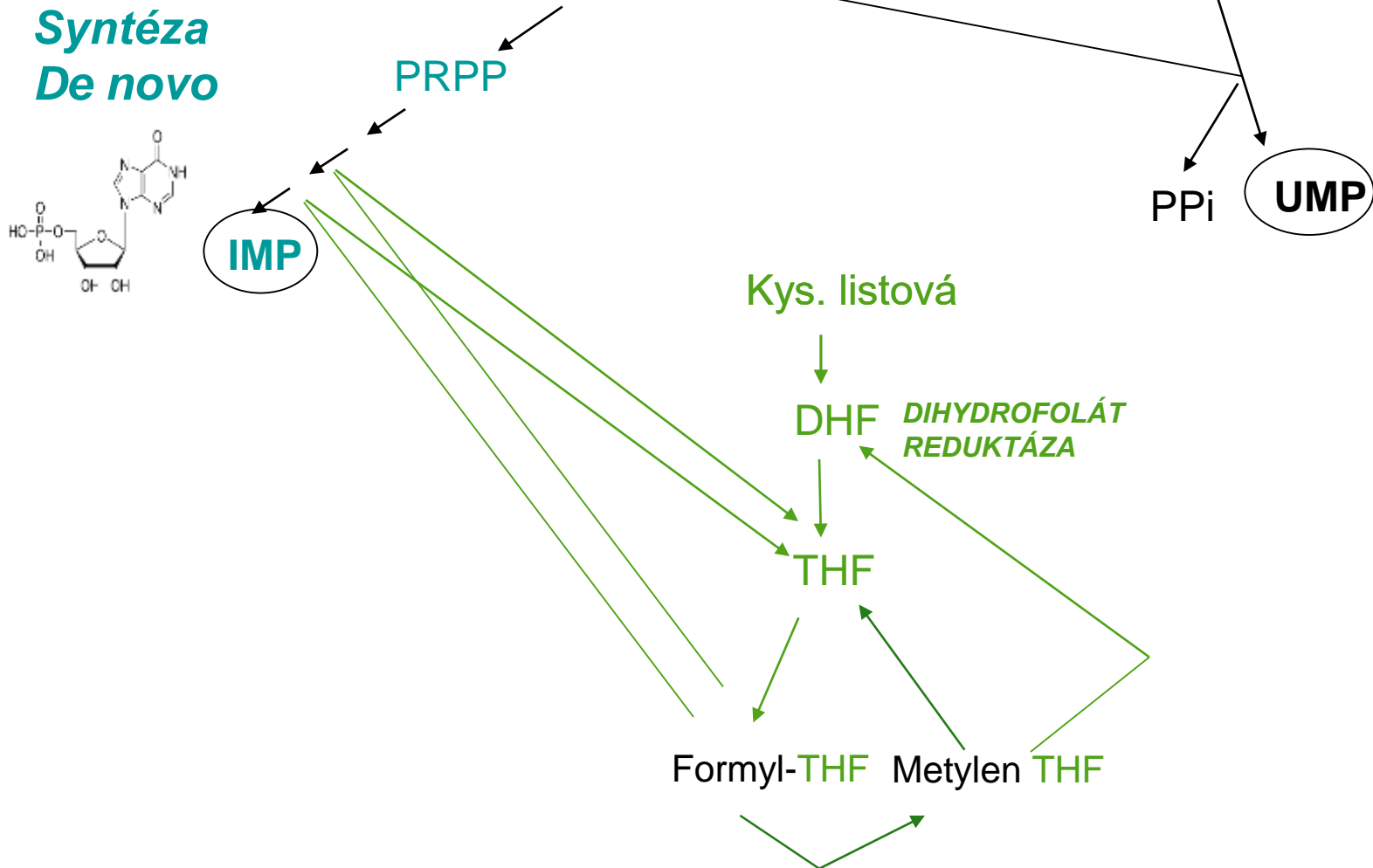
P_Pi

Kys. listová

DHF *DIHYDROFOLÁT REDUKTÁZA*

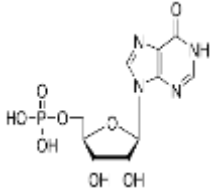
THF

Formyl-THF Metylen THF



PURINY

Syntéza De novo



IMP

AMP

GMP

ADP

GDP

ATP

GTP

PRPP

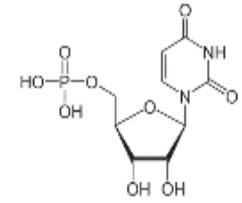
Ribózo 5-P

karbamoyl fofsát

P_Pi

UMP

Syntéza De novo



Kys. listová

DHF

*DIHYDROFOLÁT
REDUKTÁZA*

THF

Formyl-THF

Metylen THF

*RIBONUKLEOTID
REDUKTÁZA*

dGDP

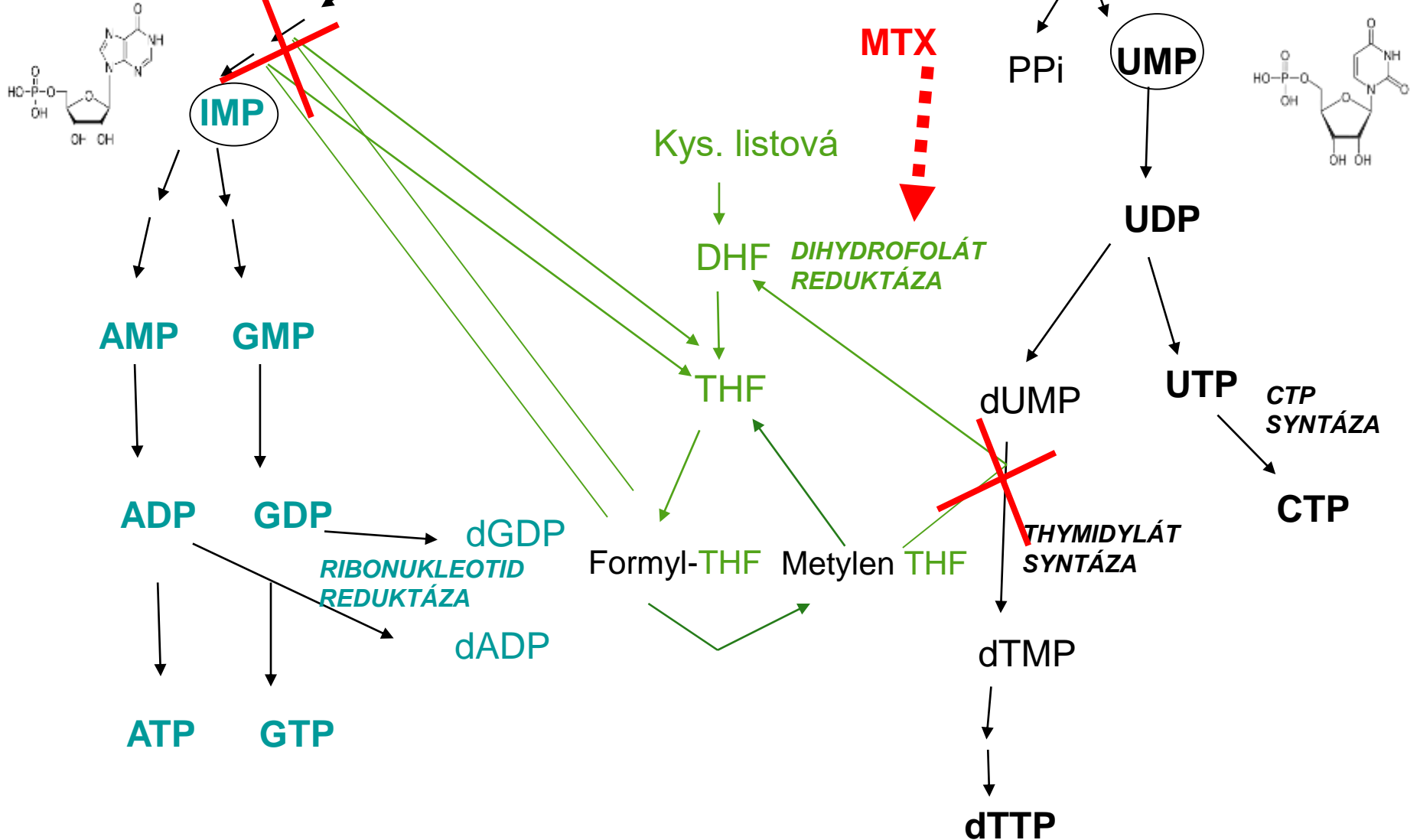
dADP

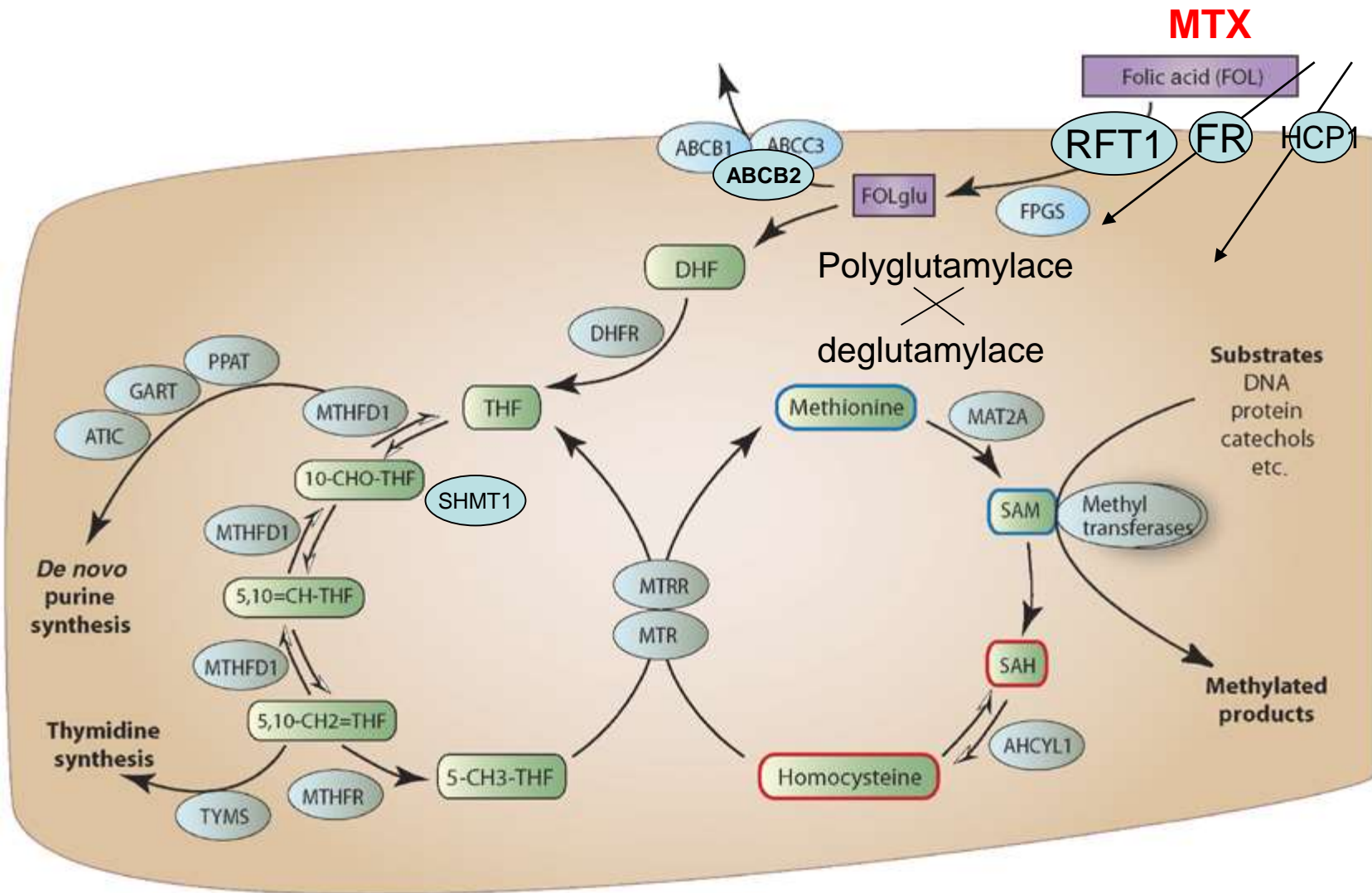
PURINY

PYRIMIDINY

Syntéza De novo

Syntéza De novo





FPGS – folát polyglutamyl syntáza

SHMT1 – serinhydroxymetyl transferáza

DHFR - dihydrofolát reduktáza

MTHFD1 - trifunkční methylenetetrahydrofolát dehydrogenáza

MTHF- methylenetetrahydrofoláte reduktáza



RFC (reduced folate transporter) – mutace, exprese, specificita
Folátové receptory (FRalpha, beta) a **HCP1** – částečná úloha v transportu



MDR proteiny (ale jen pro málo glutamylované, 1-3 zbyků)



POLYGLUTAMYLACE pro udržení v buňce, zabránění effluxu
folát polyglutamyl syntáza (FPGS), snížená exprese, změna specifity



DEGLUTAMYLACE lysozomálními **gamma-glutamyl hydrolázami**



DHFR (amplifikace, overexprese, mutace)



TS (amplifikace, overexprese)

?

GARFT (AICAR) změny nenalezeny

Rezistence na antimetabolity

- antifoláty
- **antibáze**
- antinukleosidy

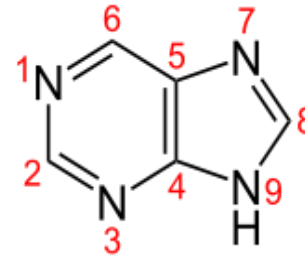
ANTIBÁZE (antipuriny)

6-merkaptopurin

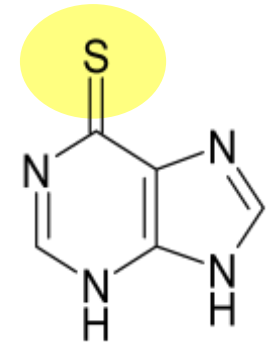
(analog hypoxantinu, inhibuje salvage dráhu)

Terapie ALL u dětí

1950s



PURIN



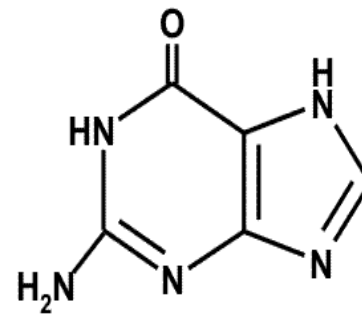
6-merkaptopurin

thioguanin

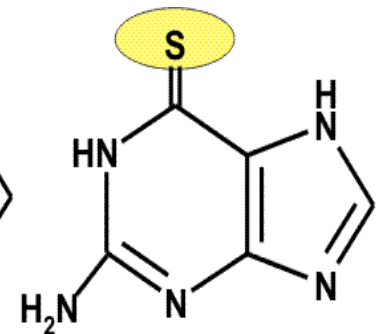
(analog guaninu, inhibuje salvage dráhu)

Terapie leukemií

1950s

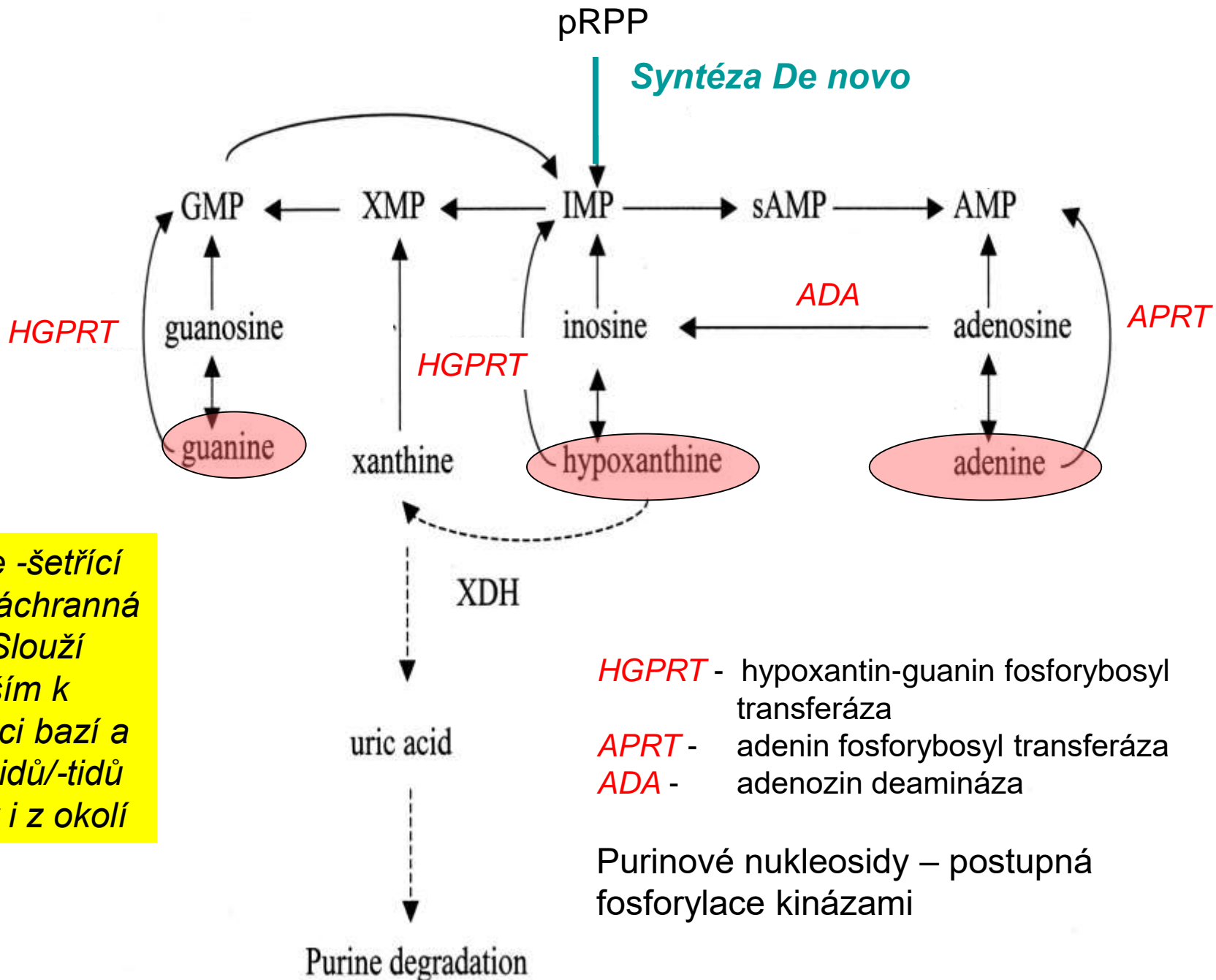


Guanine



6-Thio-Guanine

Purinová „salvage“ dráha



Inkorporace do RNA

6-thio GTP

6-thioGMP

RNR

6-thio dGTP

Inkorporace do DNA

De novo

pRPP

Inhibice fosforibosyl pyrofosfát amidotransferázy

HGPRT

6-thioguanin

guanosine
↕
guanine

HGPRT

xanthine

XDH

uric acid

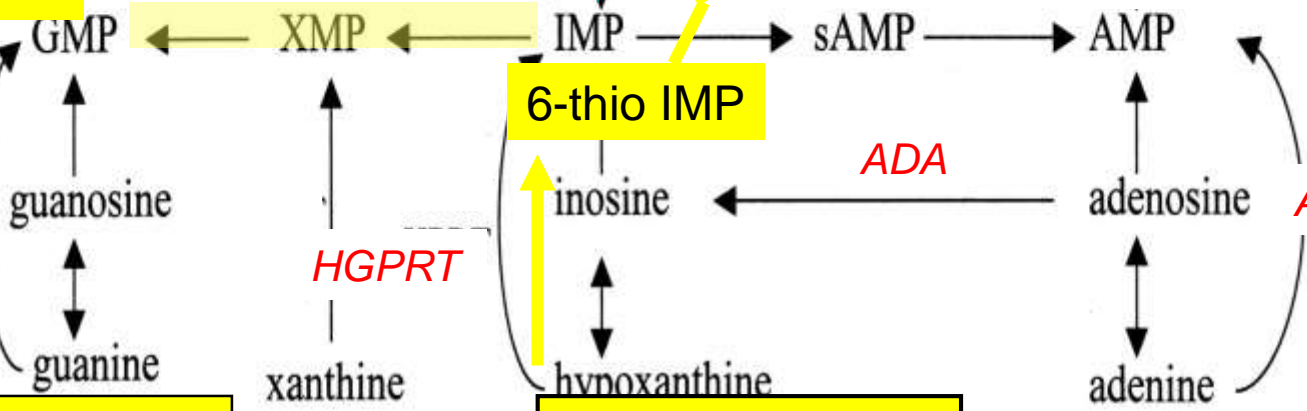
Purine degradation

6-thio IMP

6-merkaptopurin

HGPRT - hypoxantin-guanin fosforybosyl transferáza
APRT - adenin fosforybosyl transferáza
ADA - adenzin deamináza
RNR - ribionukleotid reduktáza

**6-merkaptopurin
6-thio guanin**



Rezistence na purinové anti-báze (6-mercaptopurin, thioguanin)



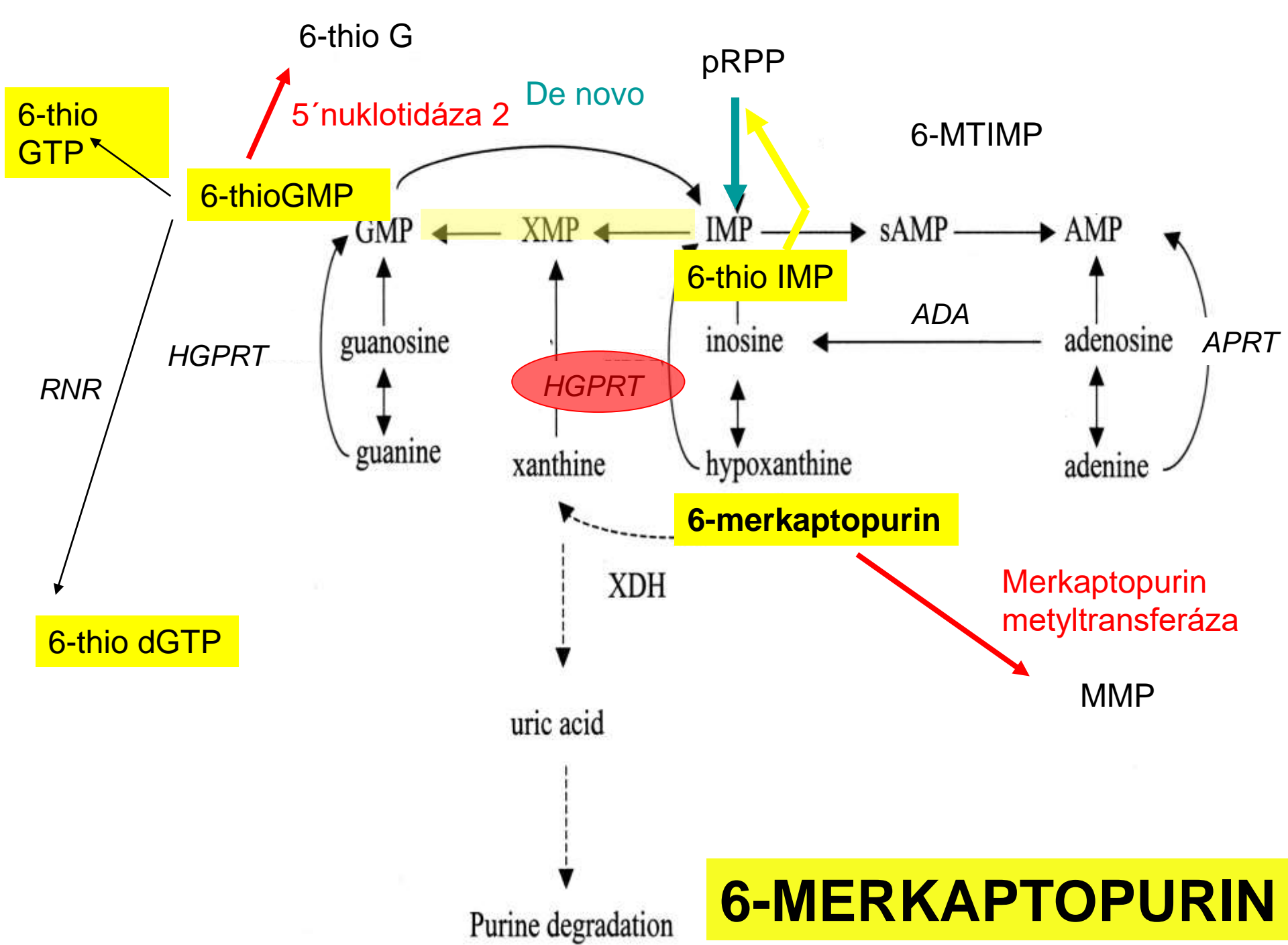
Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza (HGPRT)



merkaptopurin (thiopurin) methyltransferáza
(S-metylace inaktivuje 6MP, ThioG)



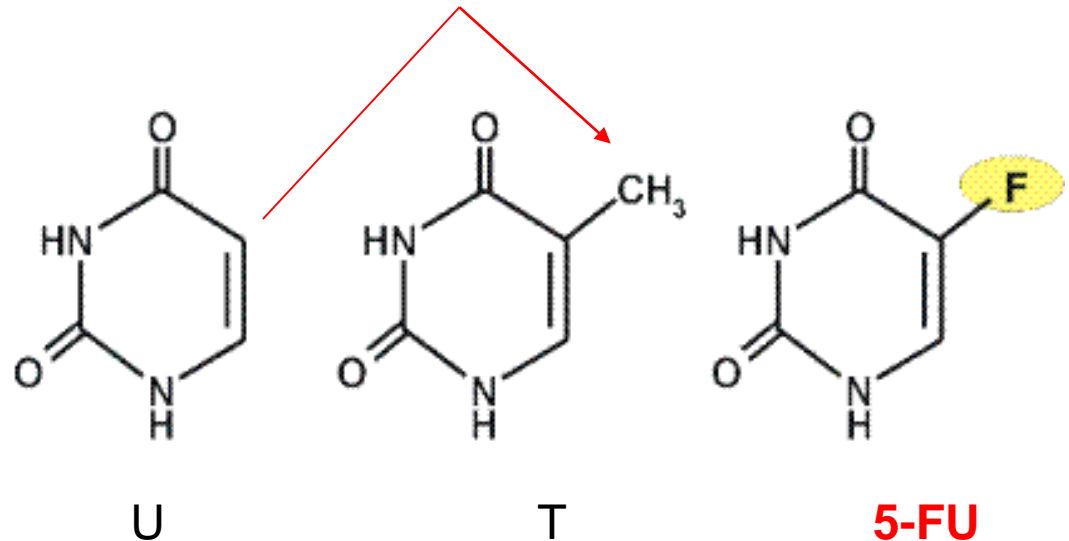
5´Nukelotidáza 2



ANTIBÁZE (antipuriny)

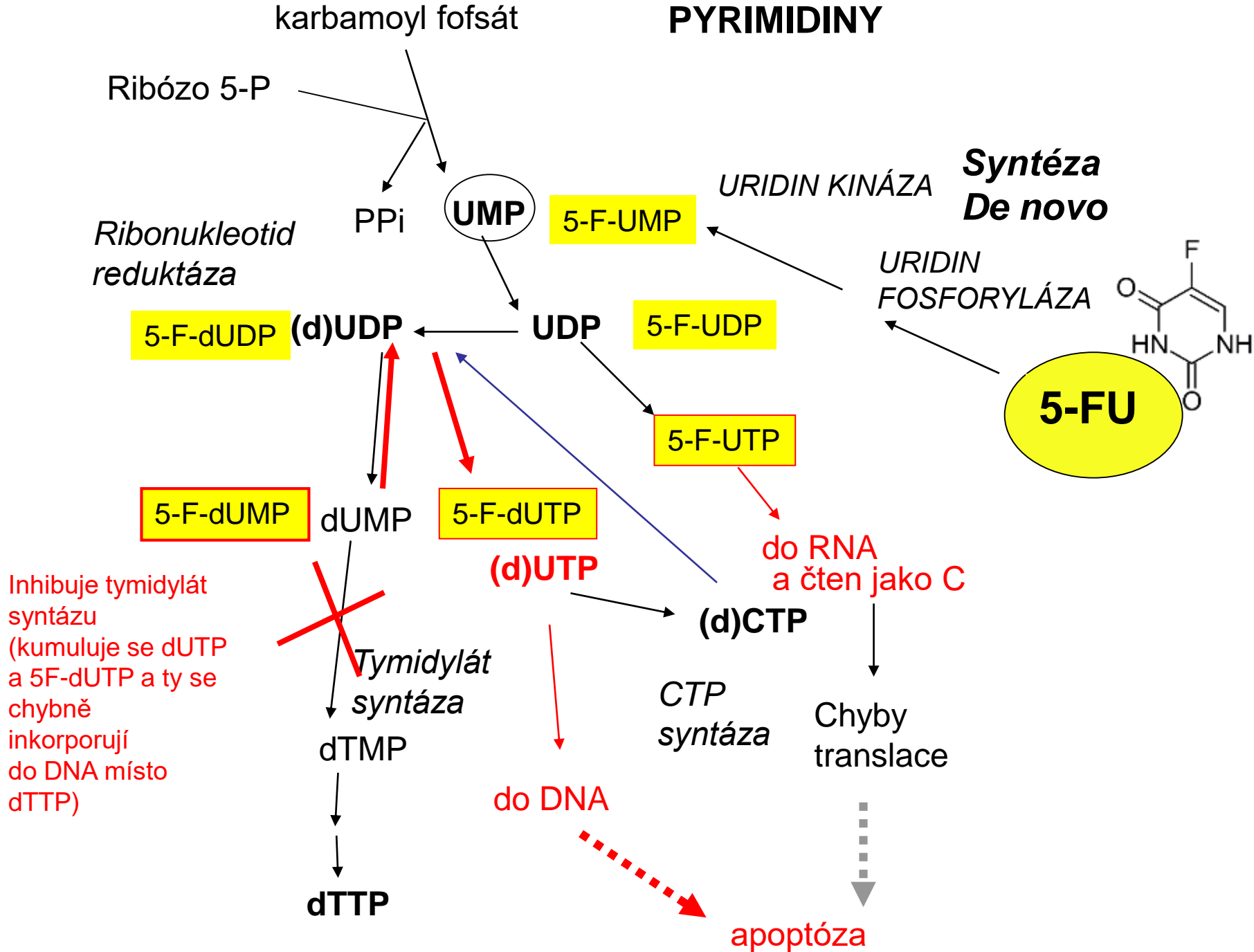
5-FU (5-fluorouracil)

Funguje jako **Inhibitor tymidylát syntázy**, která při reakci dUMP na dTMP nahrazuje vodík na pozici 5 metylovou skupinou.



Léčba solidních nádorů: **5-FU** nebo se podává se jako prodrug (musí být nejprve metabolizován) - **Kapecitabin, Tegafur**

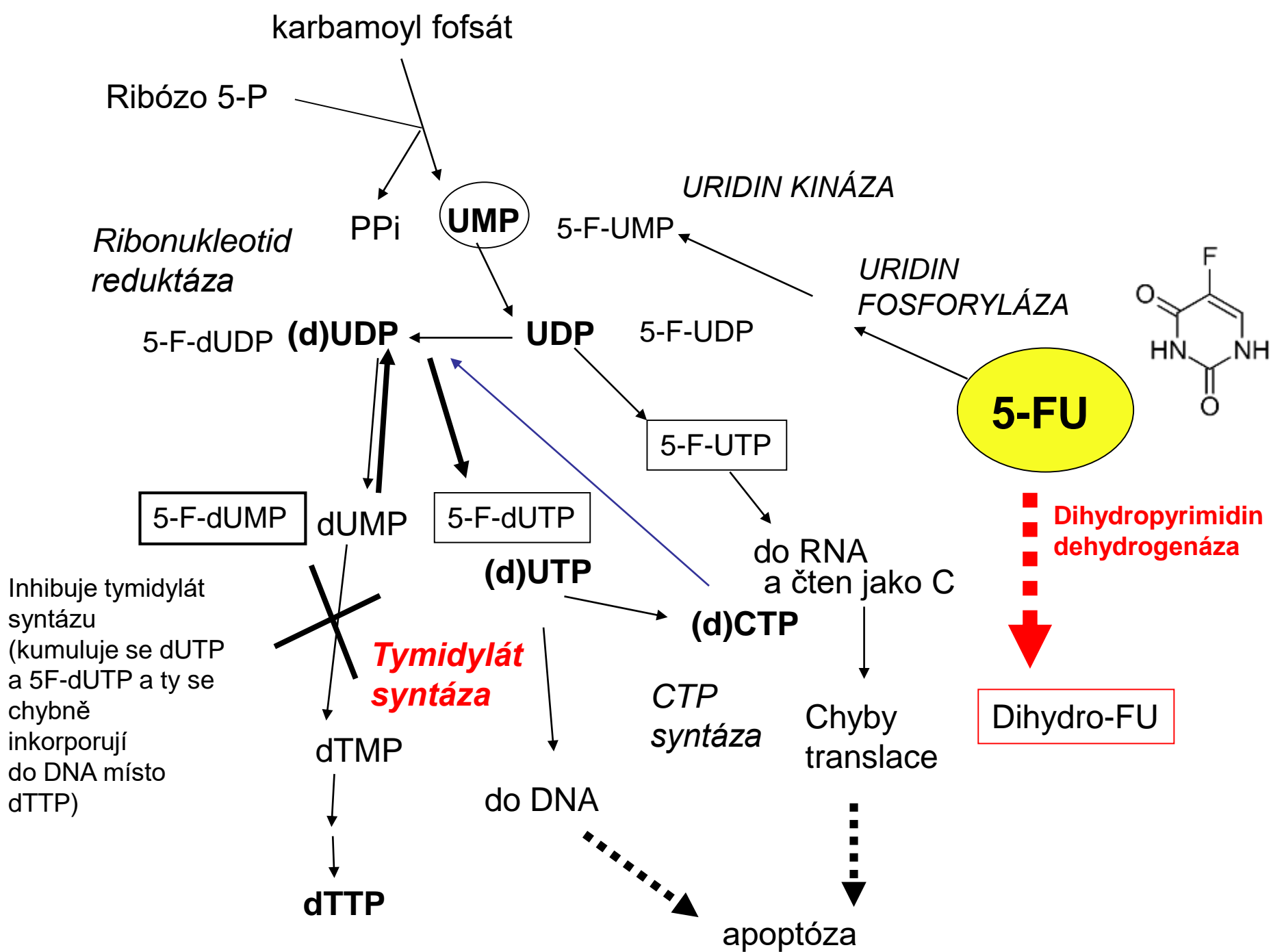
PYRIMIDINY



Rezistence (5-FU)



Thymidilát syntáza (amplifikace, overexprese, mutace)



Rezistence (5-FU)



Thymidilát syntáza (amplifikace, overexprese, mutace)



Dihydropyrimidin dehydrogenáza (metabolizuje 5-FU)



BCL2-/BCL-XL

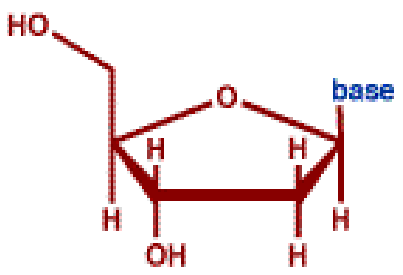
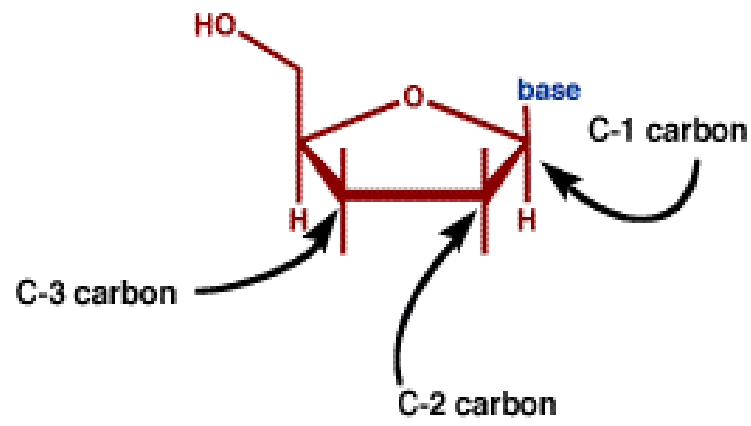
?

MDR proteiny ???

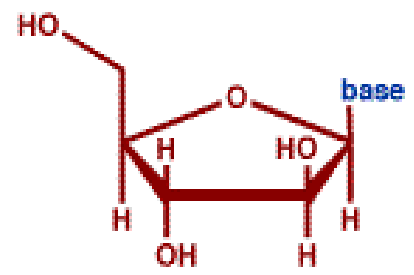
Rezistence na antimetabolity

- **antifoláty**
- **antibáze**
- **antinukleosidy**

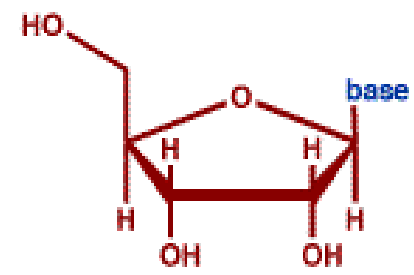
(DEOXY) NUKLEOSIDOVÉ ANTIMETABOLITY



deoxyribose
DNA backbone

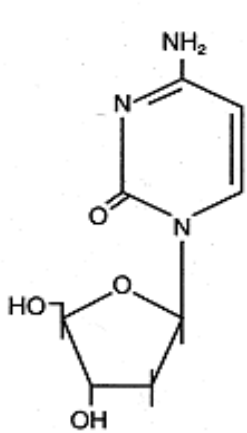


arabinose

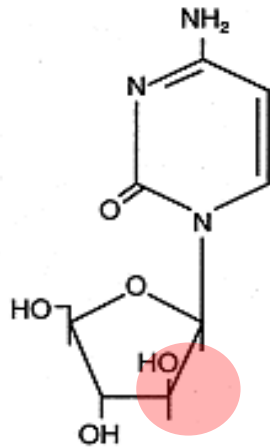


ribose
RNA backbone

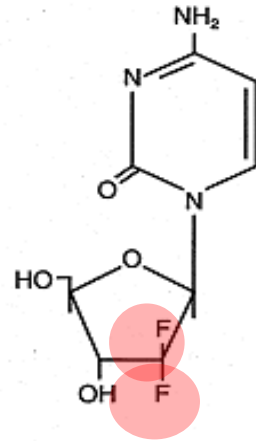
Pyrimidinové analogy cytarabin a gemcitabin



Deoxycytidine

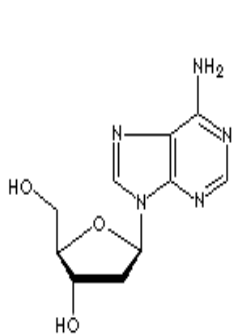


Cytarabin

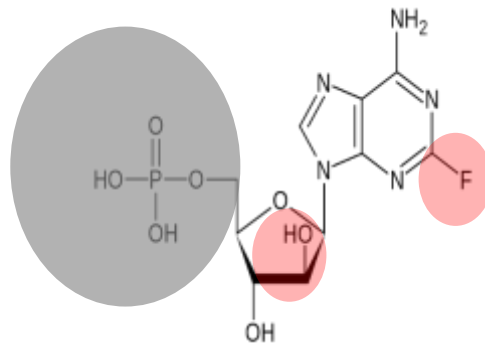


Gemcitabin

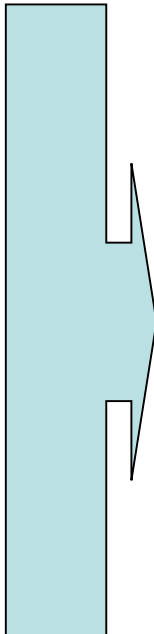
Purinový analog fludarabin



deoxyadenozin



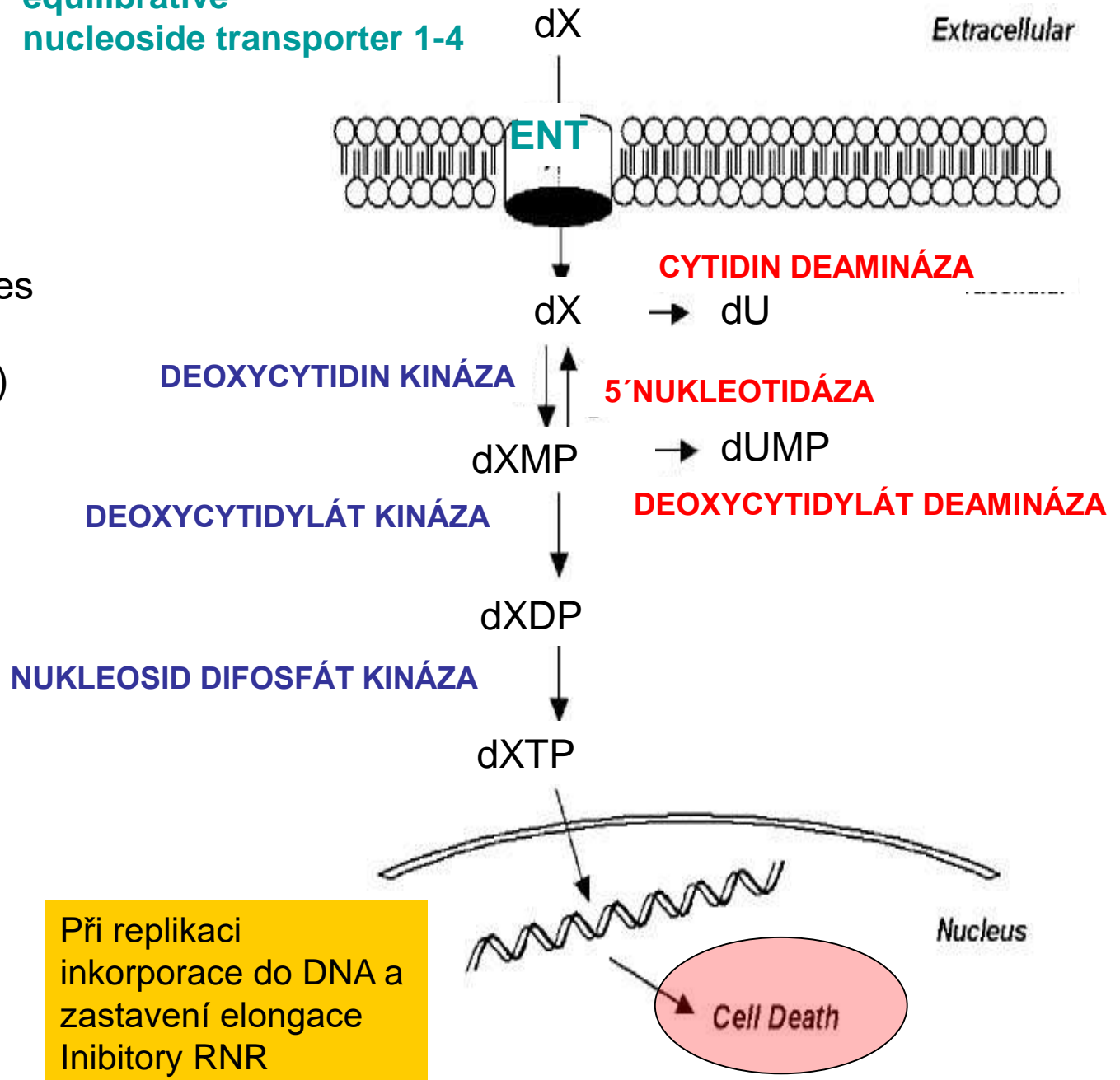
Fludarabin

- 
- Inkorporace do DNA a zabránění elongace
 - Inhibice DNA pol
 - Různá míra inhibice RNR

Cytarabin (C) Gemcitabin (C)

Vstup do buňky přes membránu (při vysokých dávkách) a/nebo hENT transportéry

equilibrative nucleoside transporter 1-4



Rezistence na nukleosidové analogy (CYTARABIN a GEMCITABIN)



transportéry ENT1-4
(ale vstup je i pasivní difuzí)



Deoxycytidin kináza



Cytidin deamináza a 5' nukleotidáza



Zvýšení DNA repairu

?

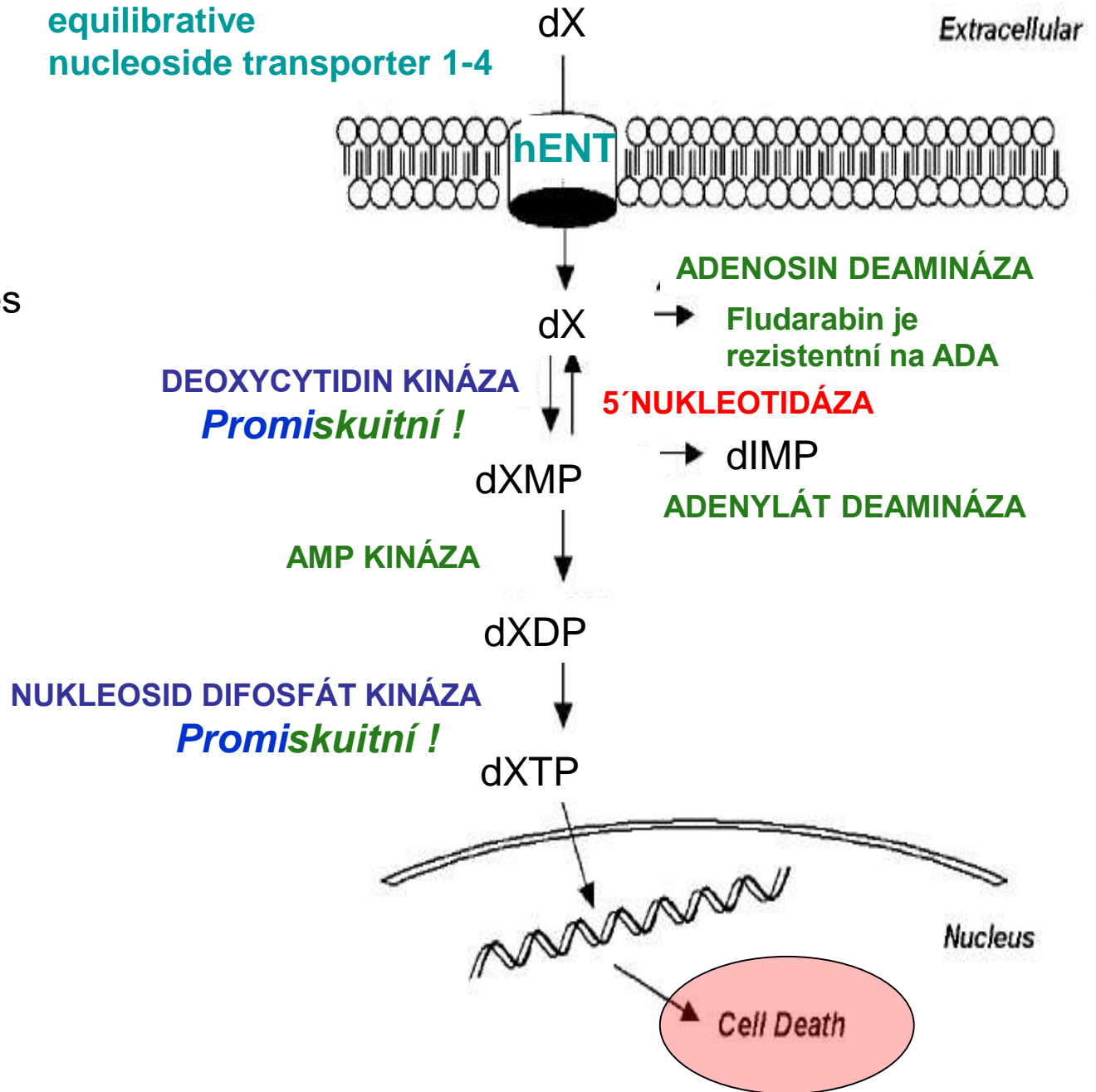
MDR proteiny

?

Změny v apoptotických drahách

Fludarabin (A)

Vstup do buňky přes membránu (při vysokých dávkách) a/nebo ENT 1-4 transportéry



Rezistence na nukleosidové analogy (FLUDARABIN)



transportéry ENT1-4
(ale vstup je i pasivní difuzí)



Deoxycytidin kináza



5' nukleotidáza



Zvýšení DNA repairu



Změny v apoptotických drahách (upreguace Bcl-2)

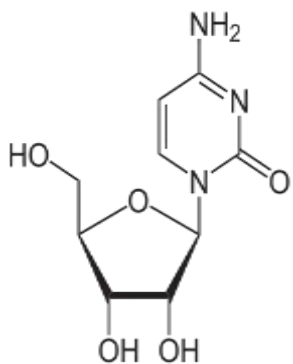
?

MDR proteiny?

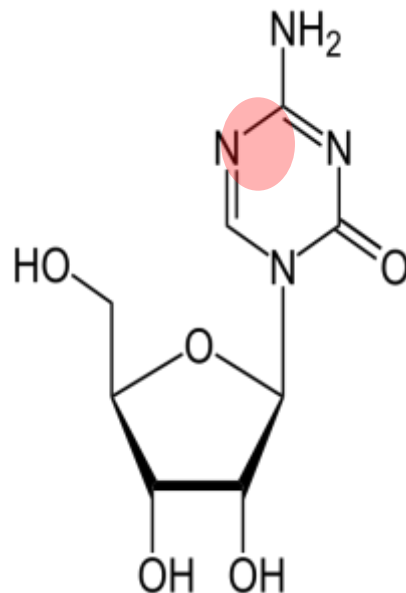
Rezistence na epigentická cytostaika

- **inhibitory DNMT**
- **inhibitory HDAC**

Aza-cytidin
(Vidaza)

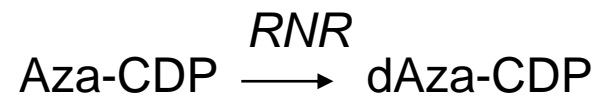


cytidin



Aza-cytidin

Fosforylován
Inkorporovávnce do RNA

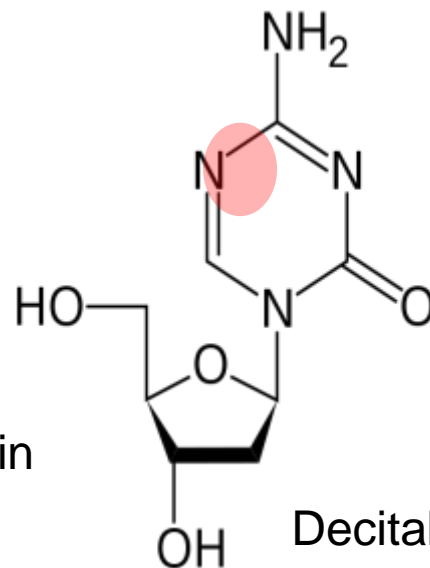


Inkorporace do DNA
nevede k inhibici replikace, ale k inhibici metylace DNA kovalentní vazbou DNA metyltransferáz (DNMT)



Decitabin

2' deoxy- 5' aza cytidin



Decitabin

Decitabine

(aktivace stejná jako cytarabin a gemcitabin)

↓ hENTs

↓ DCK

↑ CDA

↑ DNMTs (mutace, amplifikace)

↑ BCL-2/BCL-XL

Aza-cytidin

(je to ribonukleotid)

? hENTs

↓ Uridin-cytidin kináza (mutace)

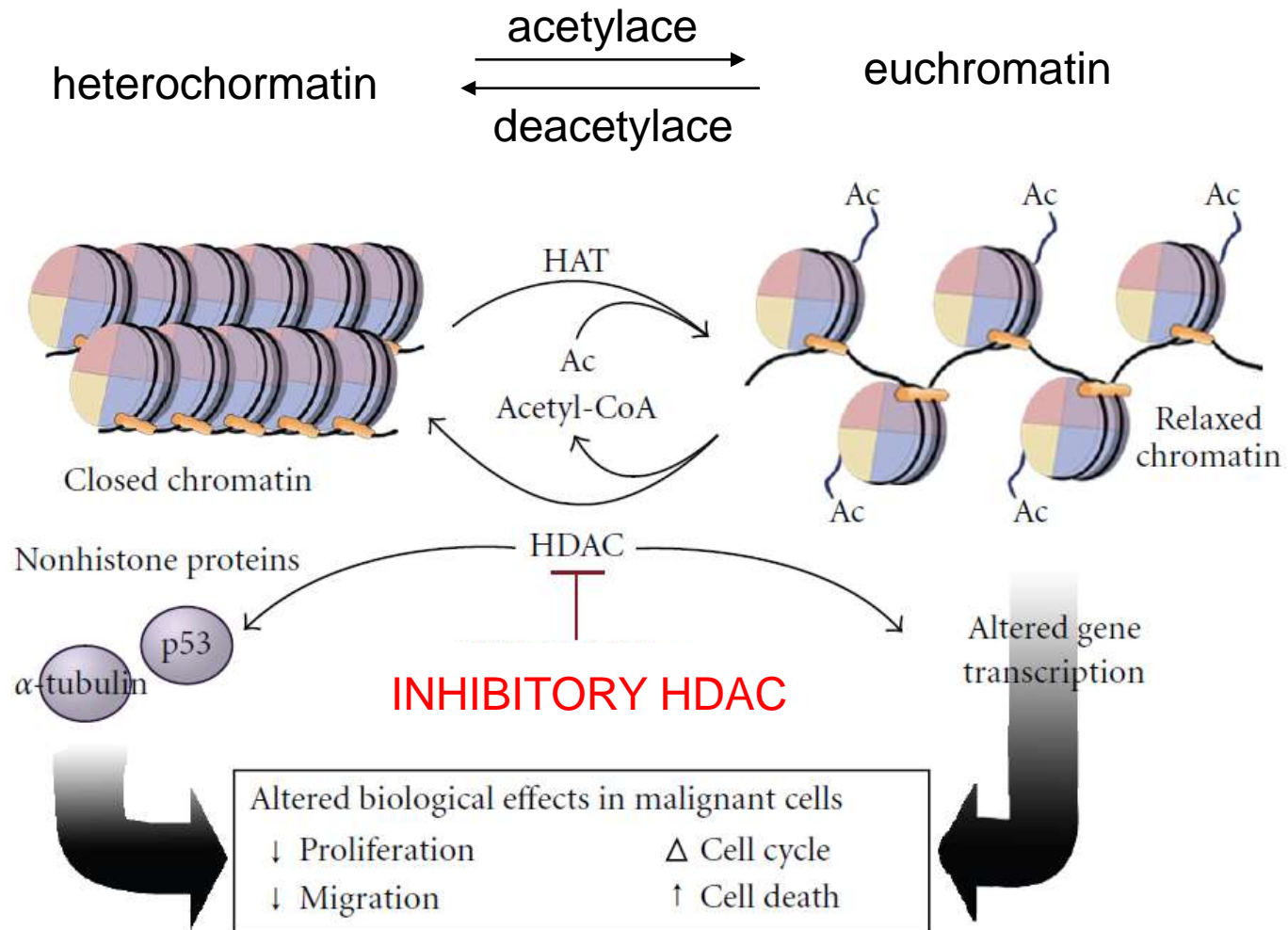
↑ DNMTs (mutace, amplifikace)

↑ BCL-2/BCL-XL

Rezistence na epigentická cytostaika

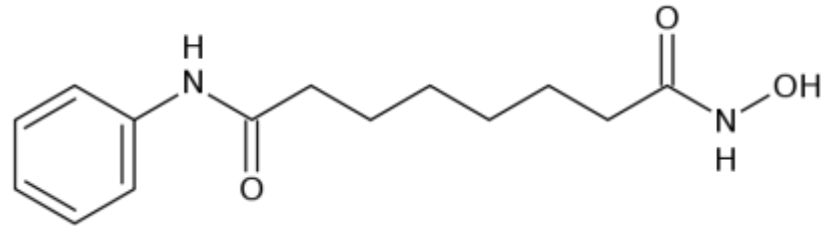
- **inhibitory DNMT**
- **inhibitory HDAC**

Inhibitory histondeacetyláz



Inhibitory histondeacetyláz (HDACi)

Vorinostat
(SAHA, kyselina
suberanilohydroxamová)



➡ Uvolnění exprese tumor supresorů

Vedlejší (off target) HDACi

„snížení“ hypoacetylace dalších (nehistonových) proteinů – **zvýšení jejich stability**
(p53, tubulin, HSP90...)

inhibice HDAC ➡ rozsáhlé změny transkripčních programů a aktivit proteinů ➡ Nespecifický a široký efekt na nádorovou buňku. (*indukce apoptózy, zástava cyklu, **indukce ROS**, indukce diferenciac*)

Rezistence na HDAC inhibitory (vorinostat)



MDR proteiny



Mutace a změny exprese (směr kontroverzní) HDAC



zesílení alternativních drah silencingu (DNMTs)



thioredoxin (scavenger ROS)
(deacetyluje i jiné cíle a přispívají k produkci ROS)

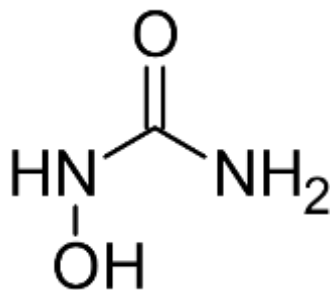


změny v apoptotických drahách - BCL2/BCL-XL, p21...

Rezistence na hydroxymočovinu

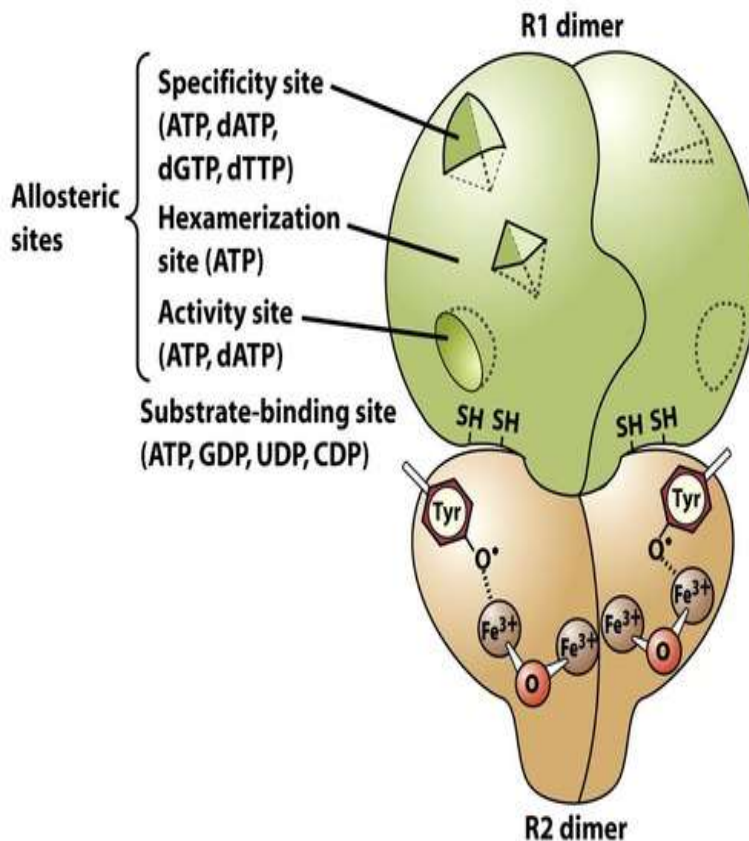
Rezistence na hydroxymočovinu

Hydroxyurea – inhibitor RNR



Hydroxymočovina

Váže Fe v RNR a inaktivuje tyrosylový radikál nutný pro redukci NDPs



© 2008 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

↑ RNR (R2 podjednotka - amplifikace, overexprese, mutace)

Rezistence na mitotické jedy

VINKA ALKALOIDY

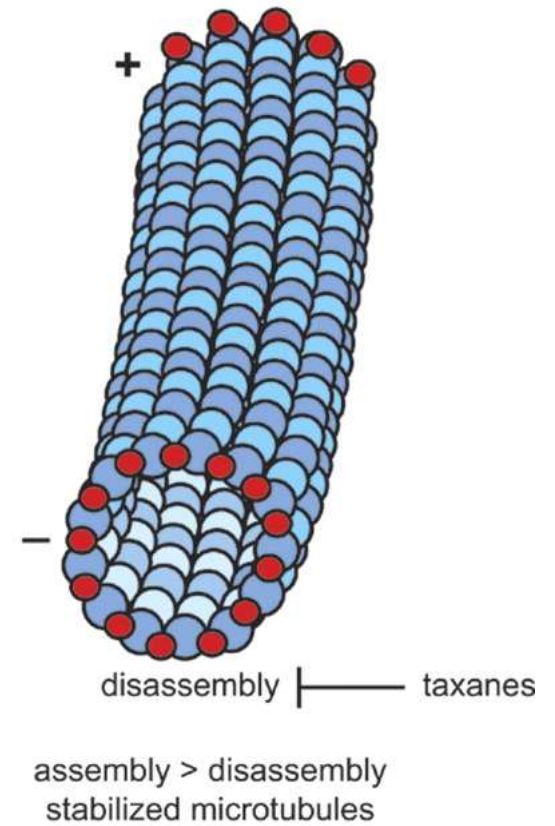
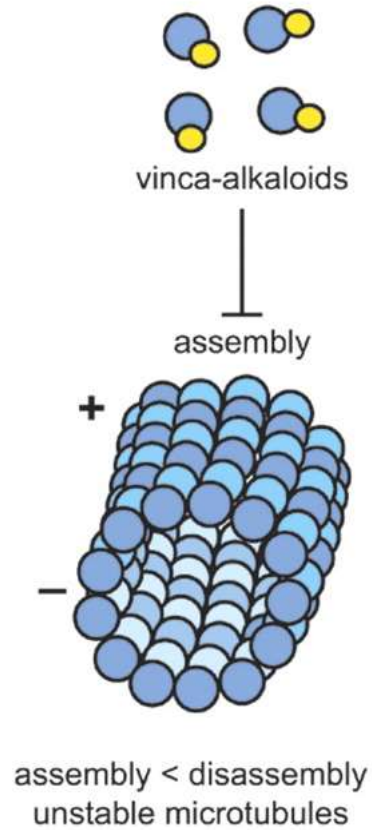
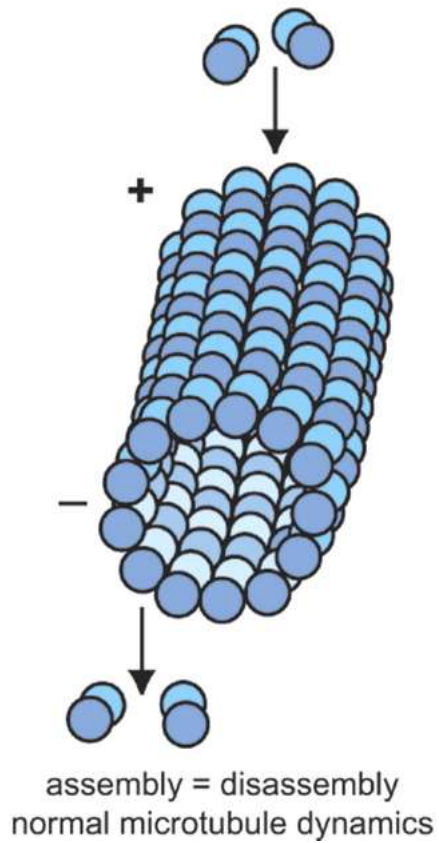
(vinkristin, vinblastin, vinorelbin)

Inhibitory polymerace MT

TAXANY

(Paclitaxel, docetaxel)

Inhibitory depolymerace MT

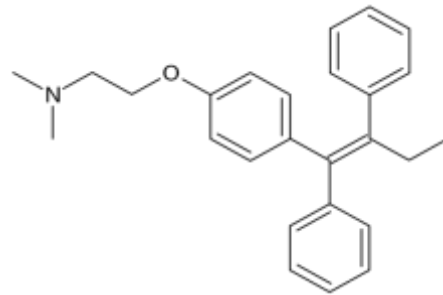


Rezistence na inhibitory dynamiky MT

Data nejasná a konfliktní (minimum z klinických dat)

- **Mutace tubulinu ?**
- **Expres různých tříd beta tubulinů** – (7-8 izotypů/tříd pro alfa i beta) mT složené z různých izotypů mají různou stabilitu, hlavně **beta3** a **beta 5** varianty (jejich overexpres způsobí rezistenci na paclitaxel).
- **Expres dalších proteinů podílejících se na dynamice MT**
- P53, BCL-2/MCL-XL?
- MDR?

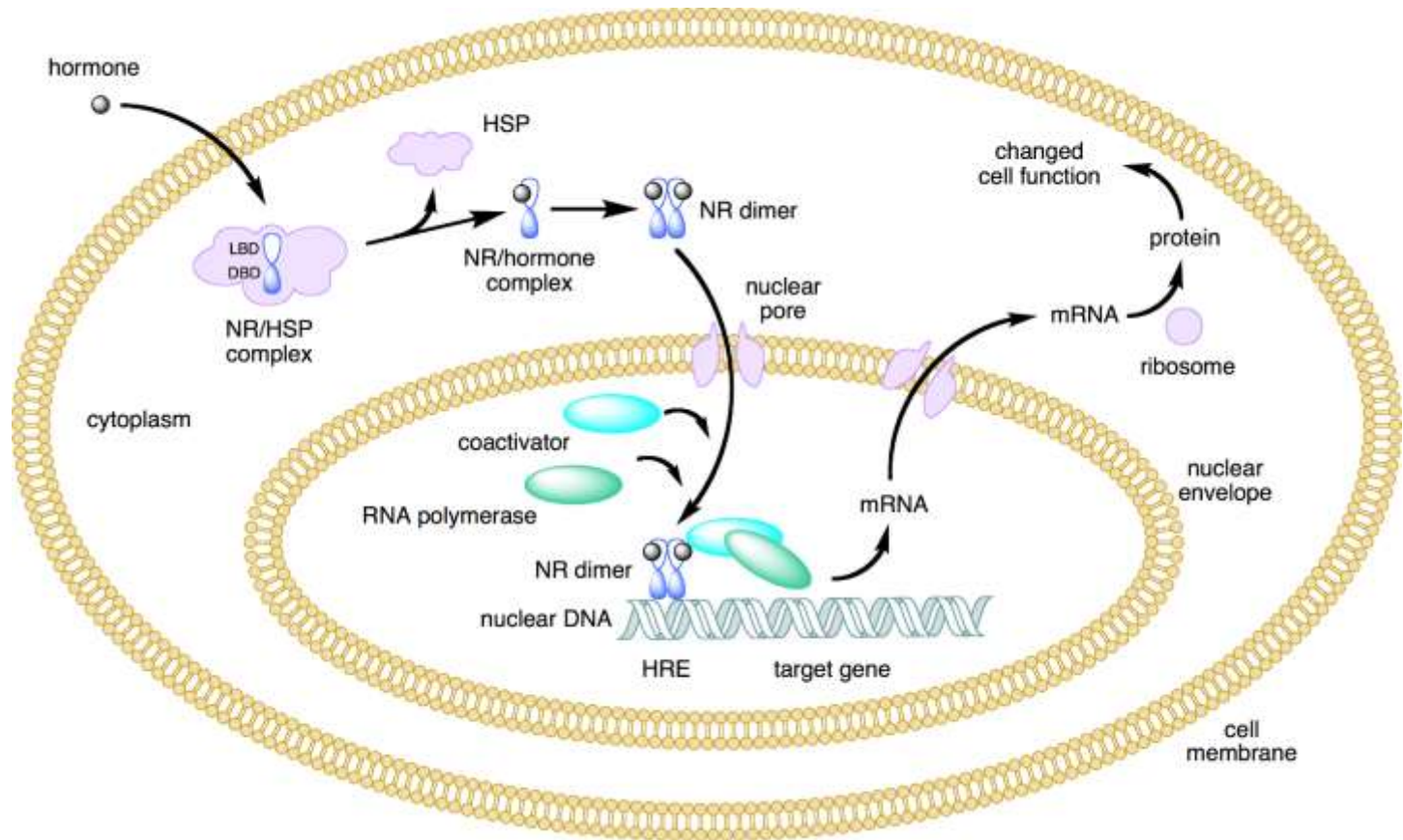
Rezistence na tamoxifen



Tamoxifen

Není to typický antiestrogen, ale **selektivní modulátor estrogenového receptoru**

Tamoxifen nebrání ER-regulované transkripci, ale komplex tamoxifen-ER spouští **jinou sadu genů** než komplex s estrogenem (nebo je odpověď tkáňově specifická)



↓ Estrogenový receptor (exprese, mutace)

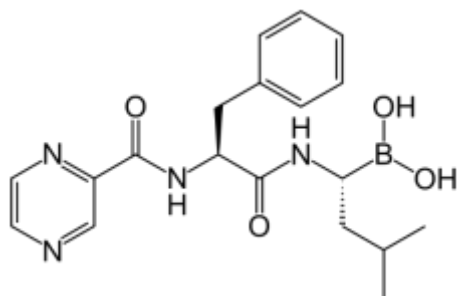
↑ ↓ Koaktivátory, korepresory (exprese, mutace)

↑ EGFR2/HER2 (crosstalk, ER aktivován v signální dráze HER2)

Není substrátem pro MDR proteiny

Rezistence na bortezomib

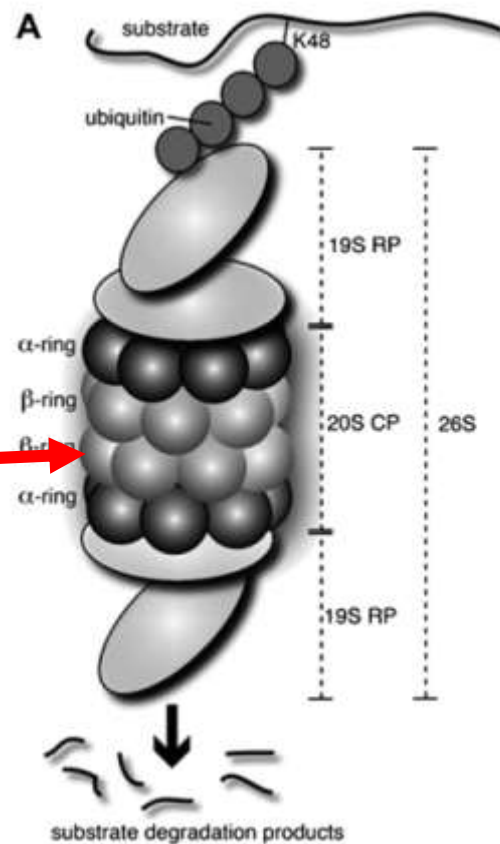
Bortezomib (Velcade, dipeptidový derivát kyseliny boronové)



Bortezomib

vazba na podjednotku $\beta 5$

Inhibuje chymotryosin-like aktivitu
(specificita - Tyr, Phe, Trp)



Rezistence: Mutace a overexpresie beta 5 podjednotky (PSBM5)

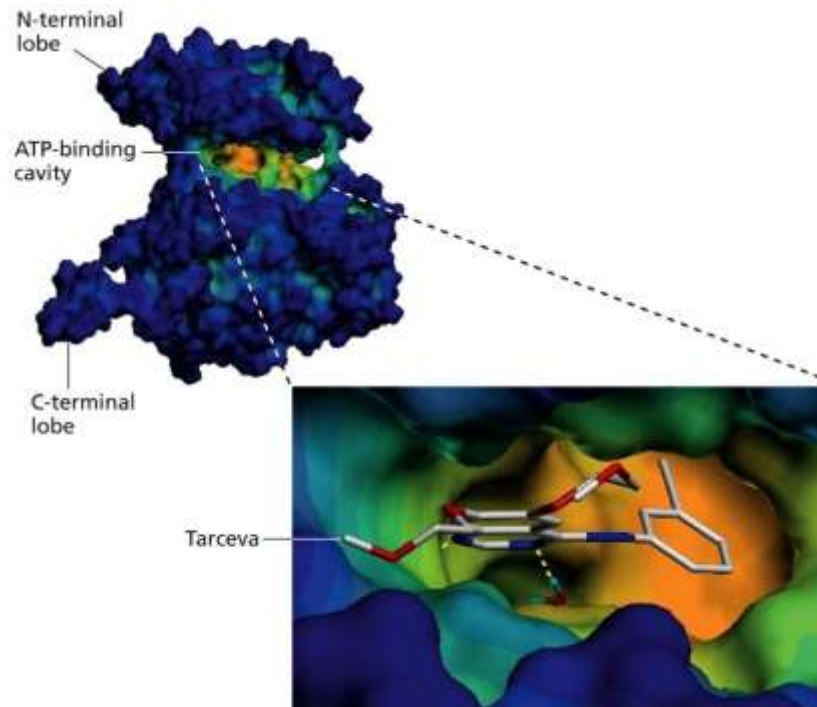
Rezistence na TKIs

Inhibitory tyrosinkináz

Cílená léčiva s jedním, nebo malým počtem cílů.
(katalytická kapsa, ATP vazebné místo)

Imatinib/Gleevec (BCR-ABL)

**Gefitinib/Iressa,
Erlotinib/Tarceva (EGFR/HER1)**



Gleevec (imatinib mesylate)

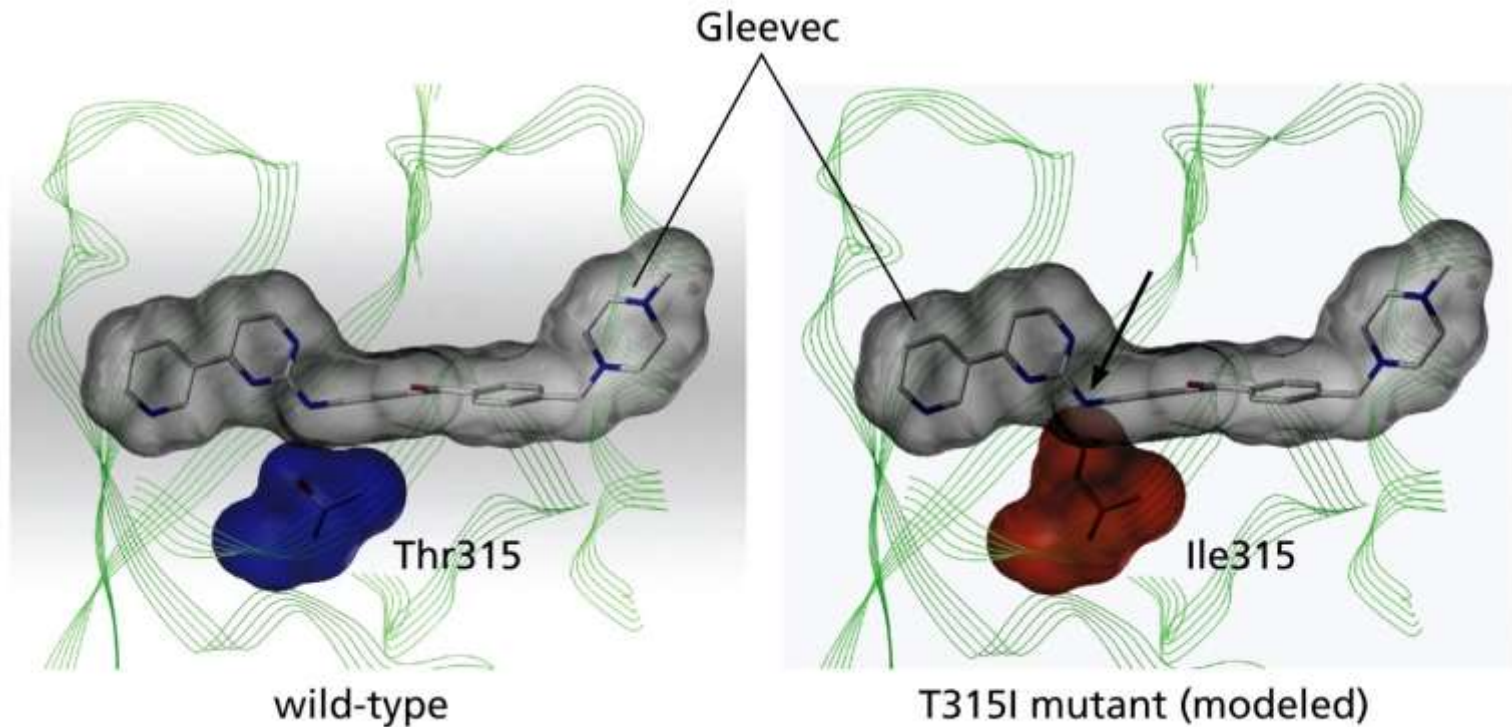


Figure 16.24b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

Část pacientů s CML získá rezistenci na imatinib, nejčastěji **mutací vazebného místa**
- Vyvinuta řada inhibitorů nových – nilotinib, dasatinib, bosutinib

Rezistence na imatinib/Gleevec (CML a GIST)



Mutace vazebného místa



overexprese BCR-ABL a Kit



MDR proteiny



**aktivace jiných kináz („kinázový crosstalk“)
(PI3/Akt kináza u CML, Axl u GIST)**

Rezistence na terapeutické protilátky



mutace cílového místa



overexprese cílového místa



aktivace jiných drah



vyhýbání se apoptóze

Protinádorové látky

Nádorové buňky

Buňky prostředí nádoru
(stroma, kostní dřeň...)

Senzitivní

Horizontální přenos
informace? (pro-survival
signaling)

Rezistentní

Selekce
rezistentního
klonu

**Horizontální přenos
informace**
(růstové faktory, proteiny,
mRNA, μ RNA, exosomy....)

