

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.

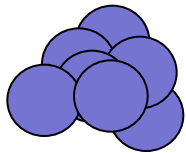
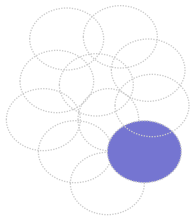
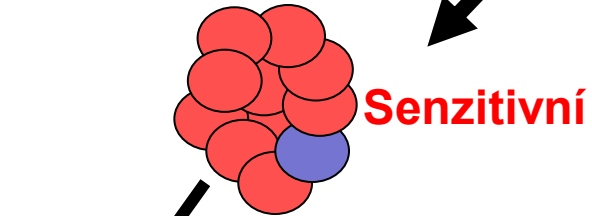
Vzniká rezistence „de-novo“ a/nebo je to selekce rezistentních klonů?

⇒ **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



Rezistentní

Selekce
rezistentního
klonu

Protinádorové látky

Nádorové buňky

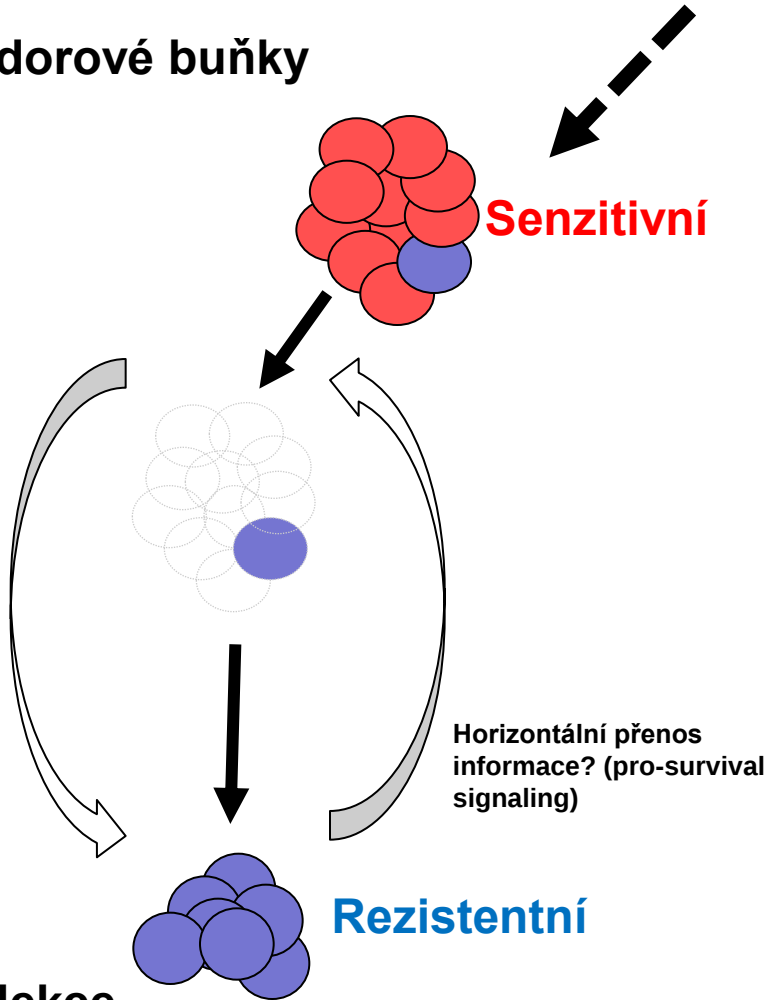
Senzitivní

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...)**

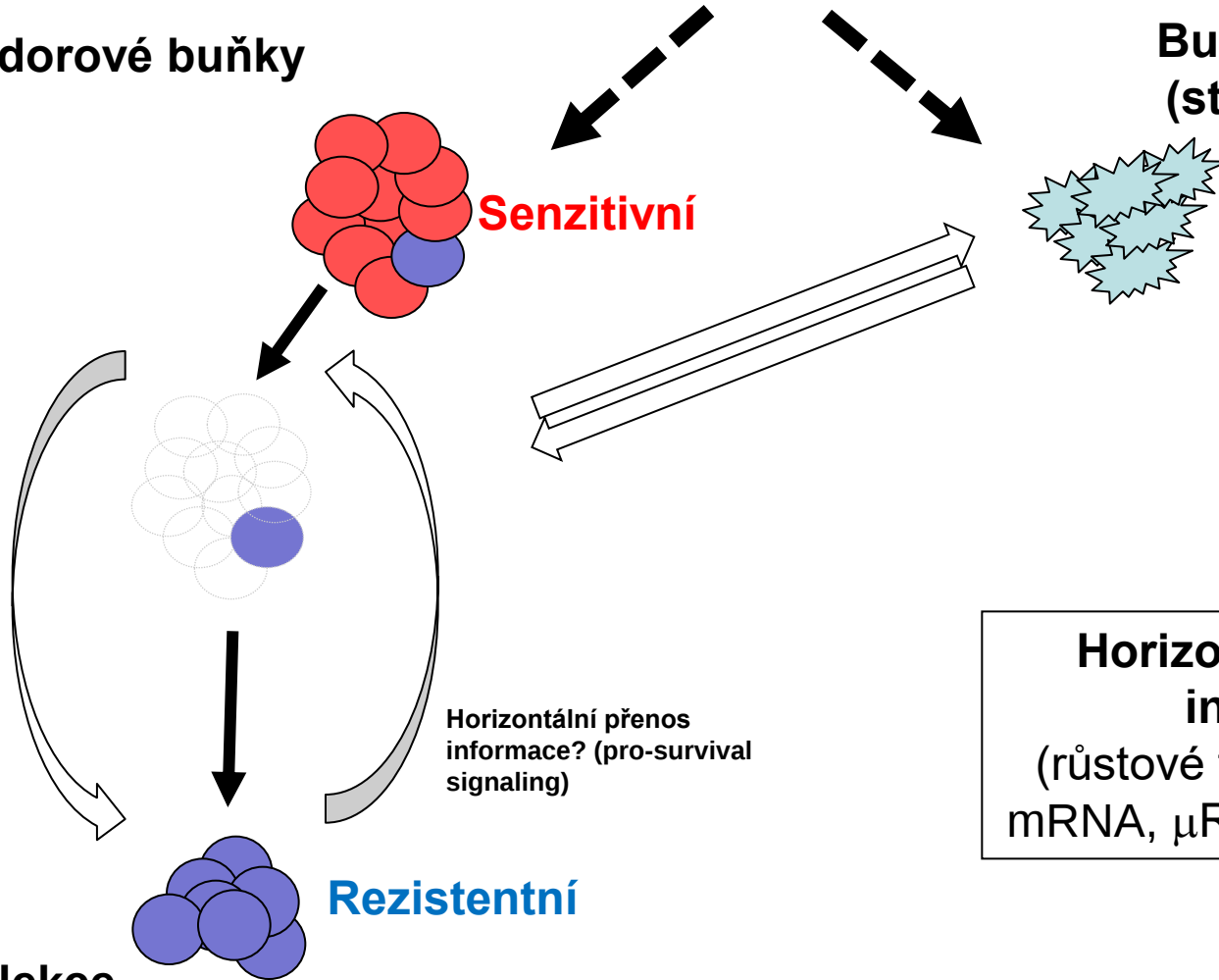
Senzitivní

Horizontální přenos
informace? (pro-survival
signaling)

Rezistentní

**Selekce
rezistentního
klonu**

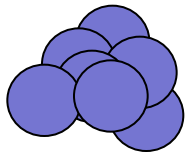
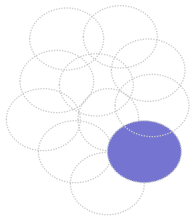
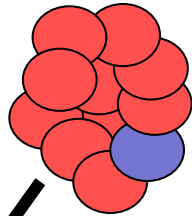
**Horizontální přenos
informace**
(růstové faktory, proteiny,
mRNA, μ RNA, exosomy....)



Protinádorové látky

Nádorové buňky

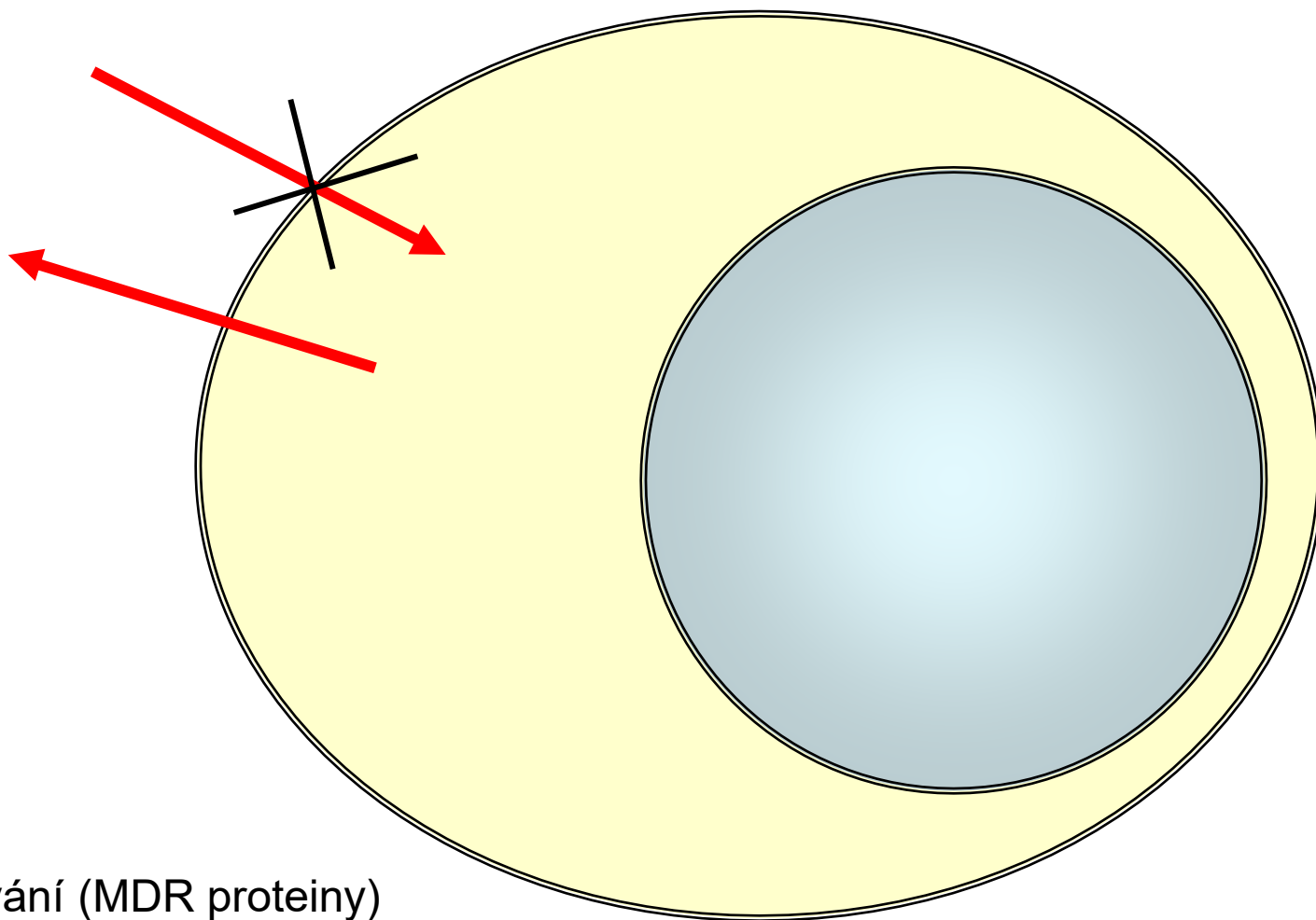
Senzitivní



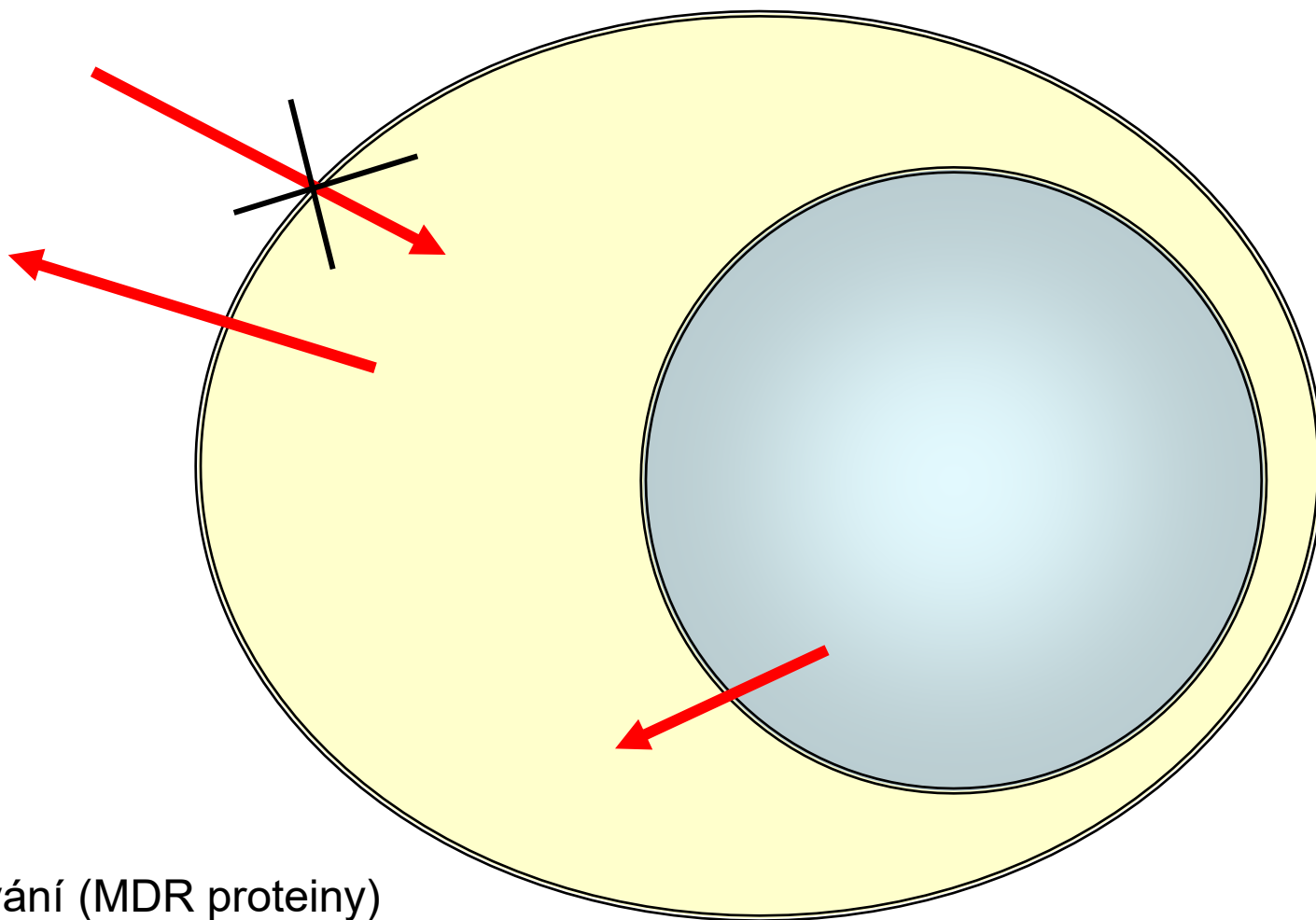
Rezistentní

Selekce
rezistentního
klonu

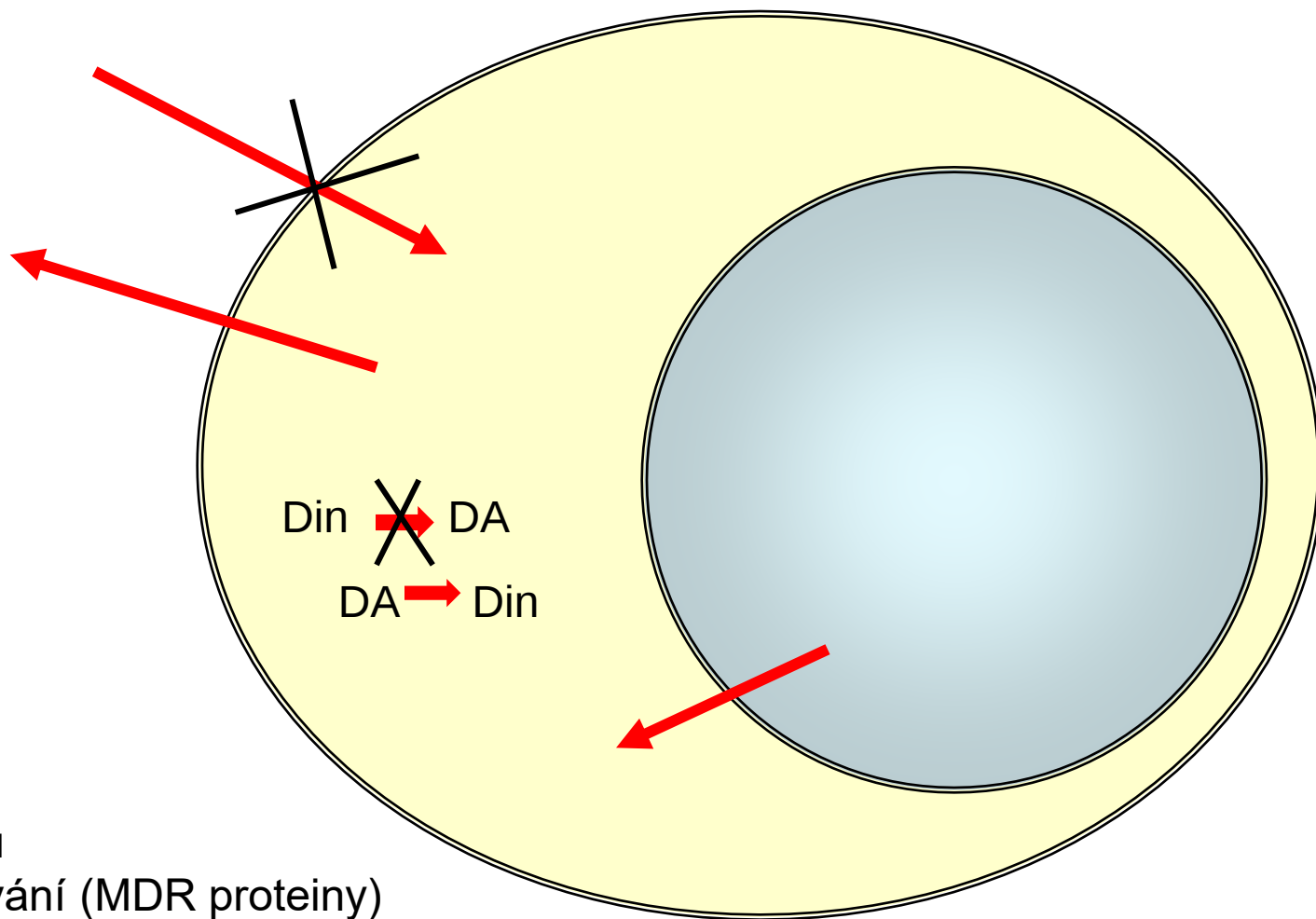
Jak se může buňka/buněčná
populace toxickým účinkům
protinádorové látky bránit?



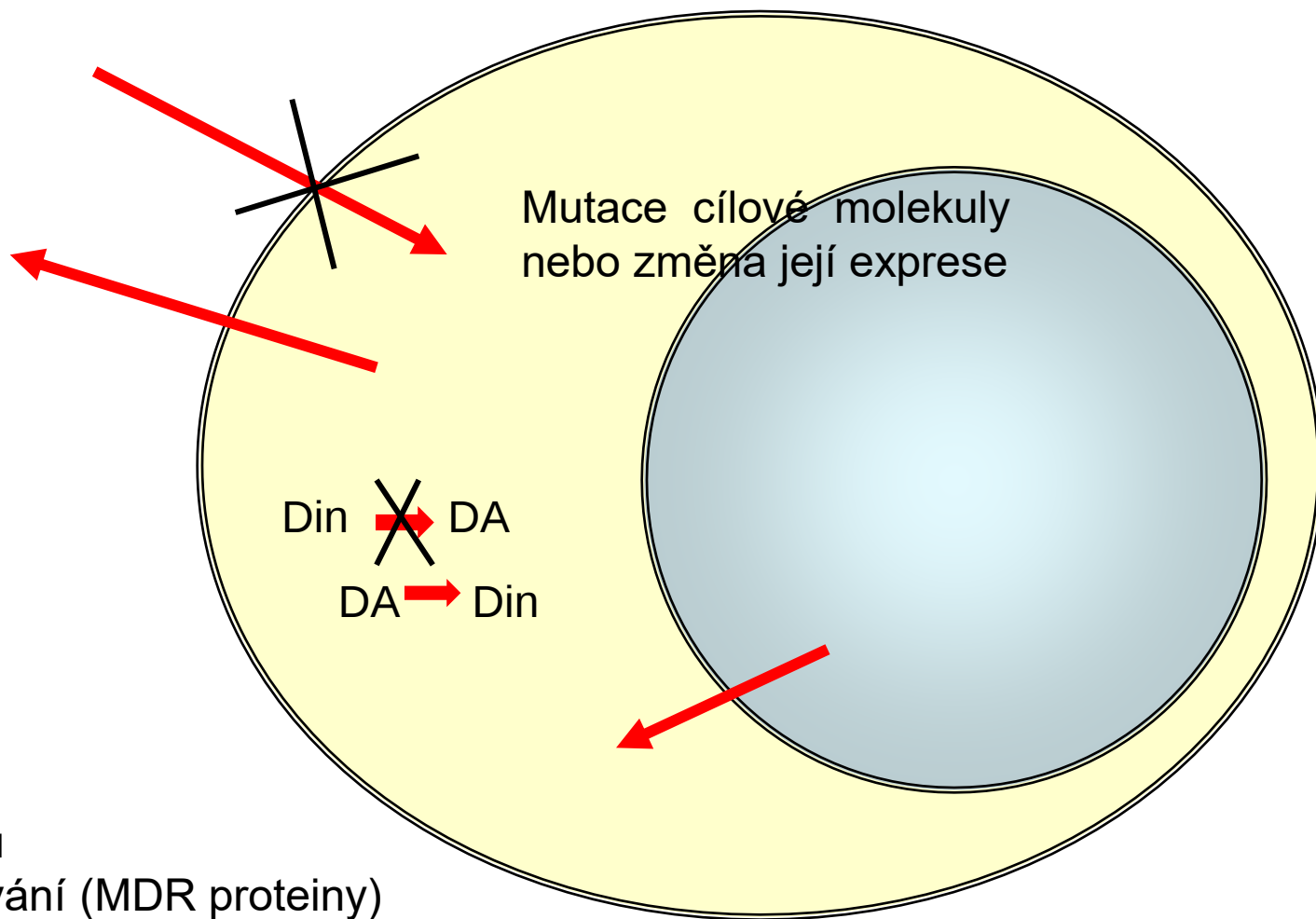
- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)



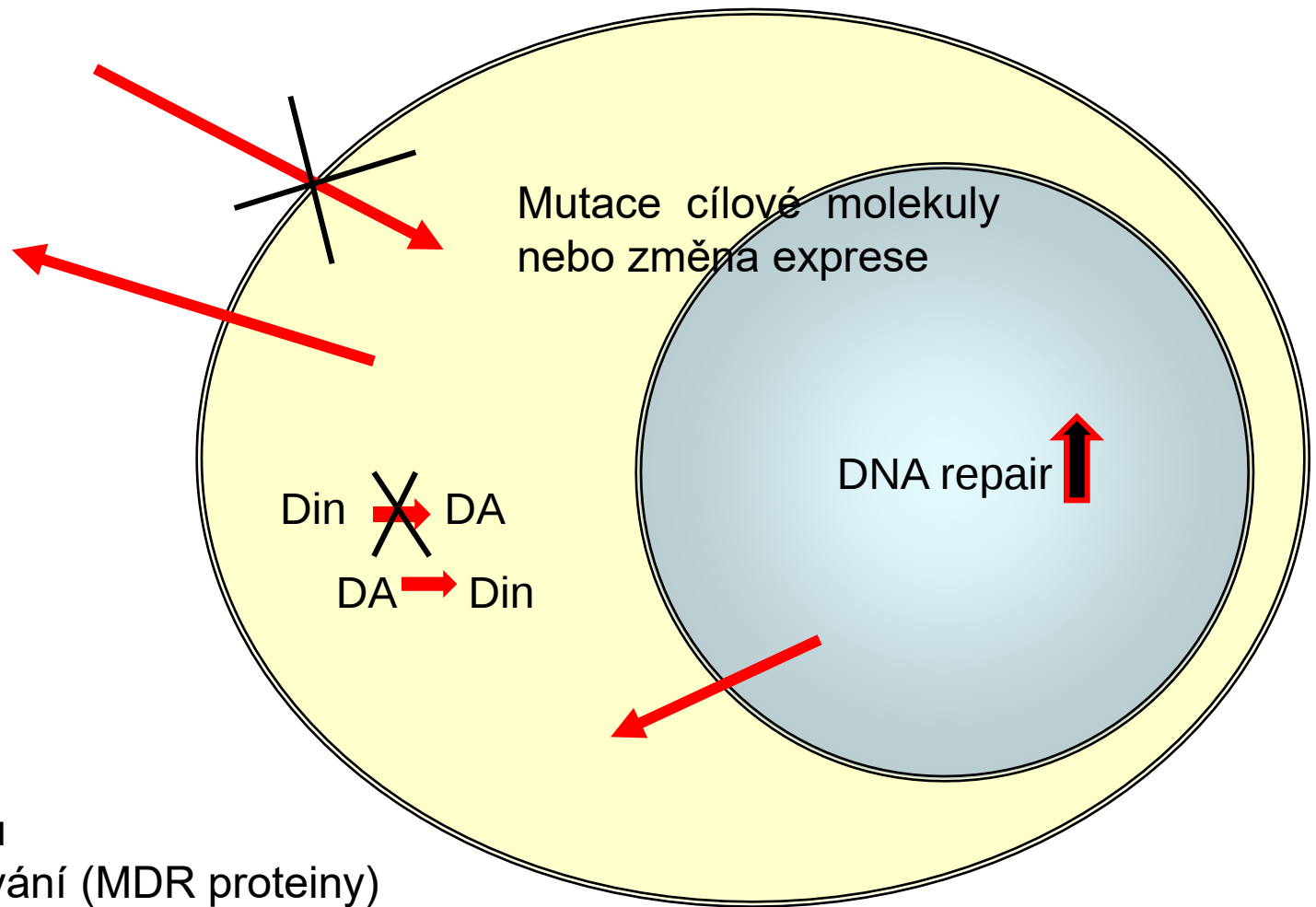
- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)
- porušení nitrobuněčného transportu



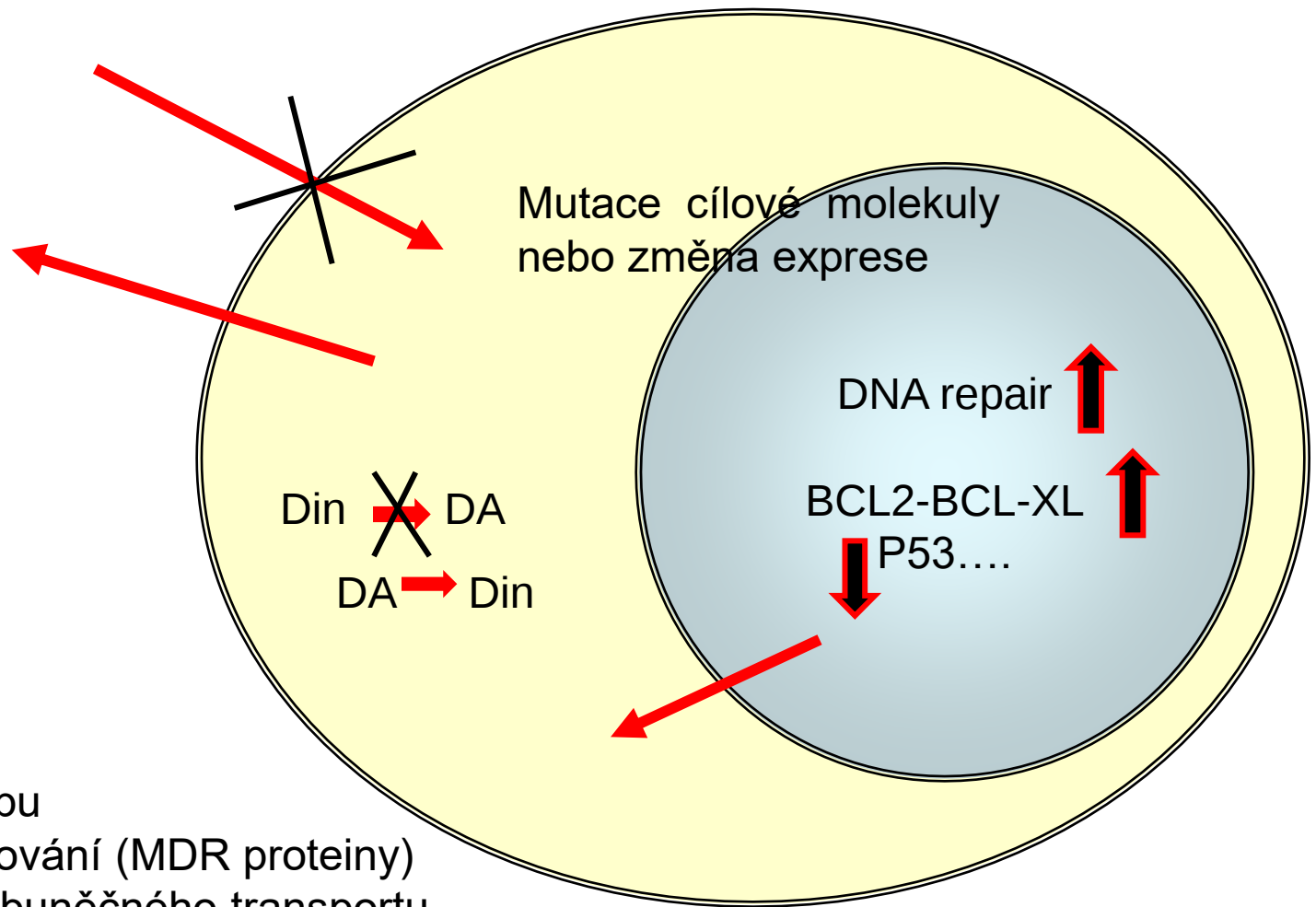
- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)
- porušení nitrobuněčného transportu
- snížení aktivace, zvýšení deaktivace



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

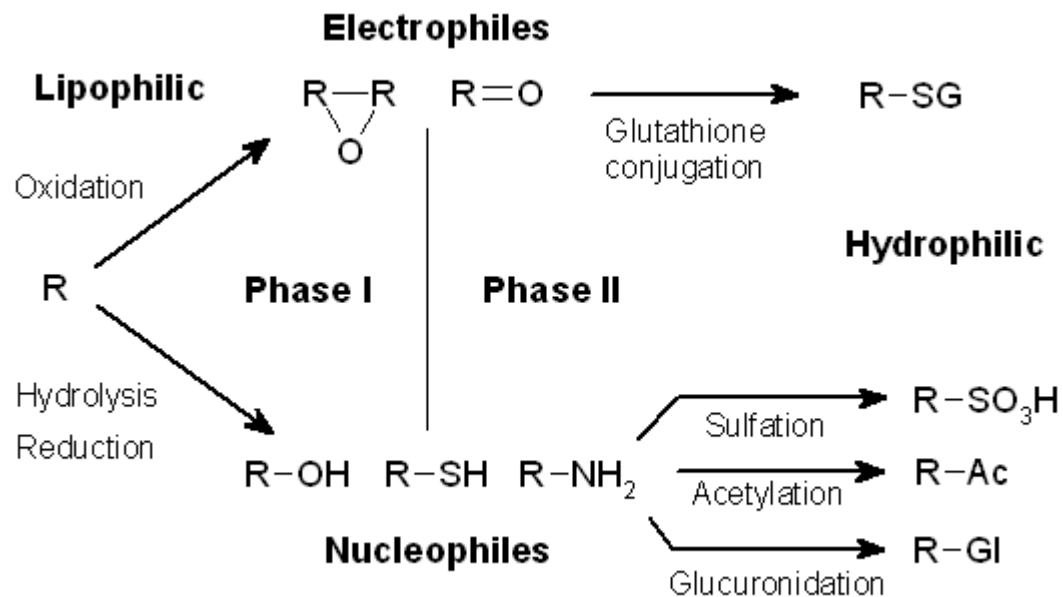


- omezení vstupu
- zesílení vylučování (MDR proteiny)
- porušení nitrobuněčného transportu
- snížení aktivace, zvýšení deaktivace
- mutace cílového proteinu
- **zvýšení kompenzačních mechanismů (DNA repair, antioxidantní ochrana...)**



- 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**

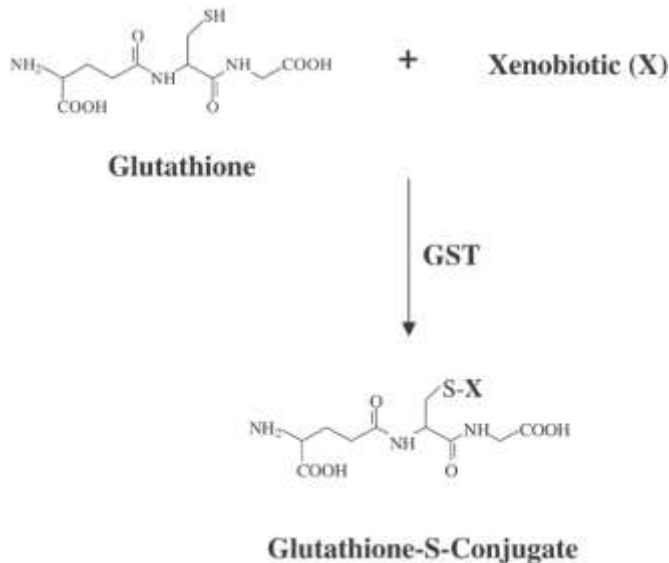
Detoxifikace xenobiotik (fáze I-II)



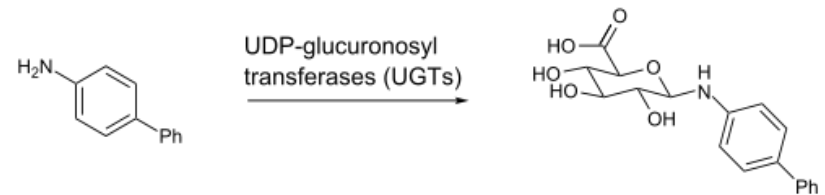
Detoxifikace xenobiotik (fáze I-III)

- 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**

Konjugace s glutathionem



Konjugace s kys. glukuronovou



Export xenobiotik z buňky

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

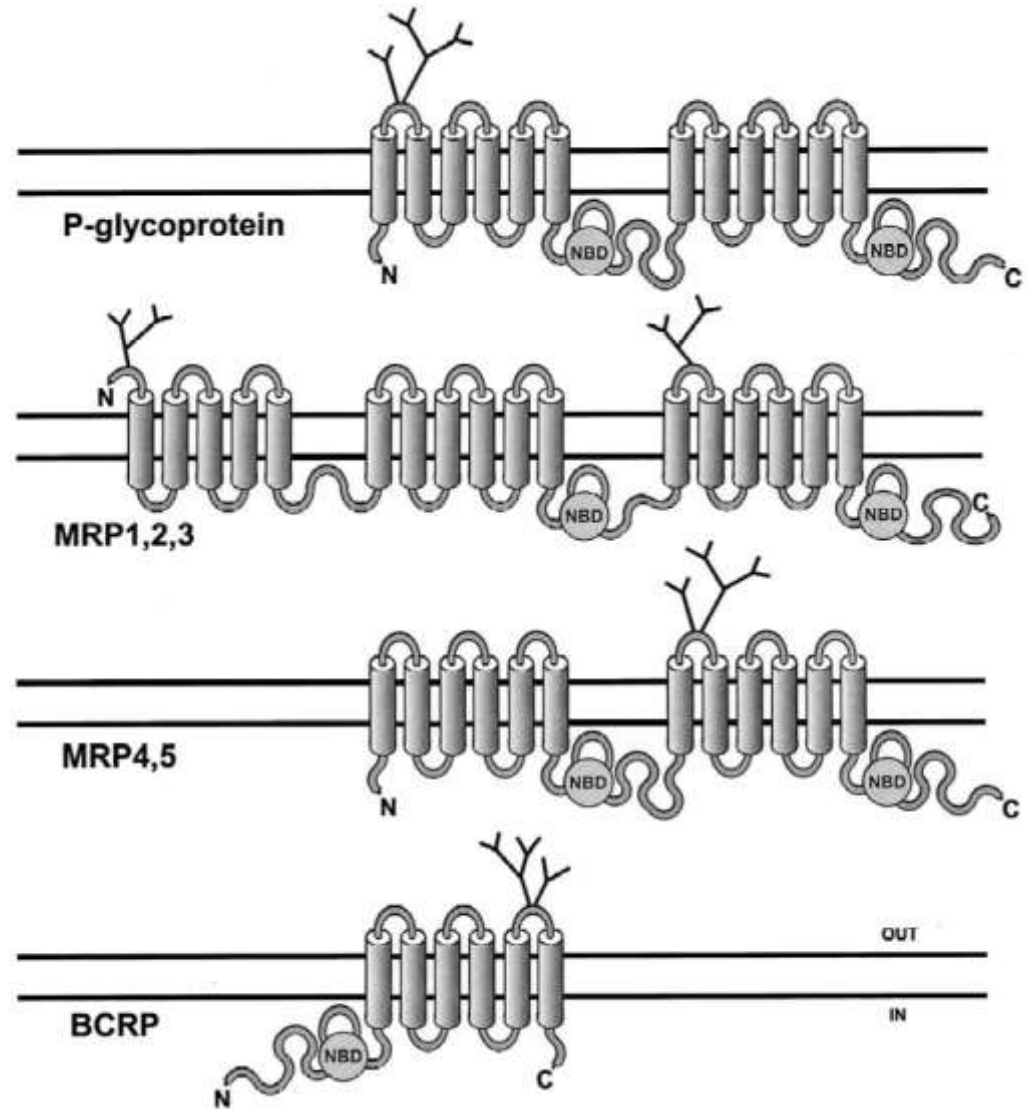
- ABC rodina — cca 50 proteinů
- na plazmatické membráně
- **exportují xenobiotika** (malé hydrofobní molekuly) a jejich konjugáty **ven z buňky** typicky antimitotika, antracykliny, TOPO inhibitory a další...
- overexprese je jednou z hlavních příčin rezistence na chemoterapii, MDR
- podílejí se na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

P-glykoprotein
(MDR1, ABCB1)

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

MRP 4-5
(ABCC4-5)

BCRP4
(ABCG2)
(breast cancer resistance protein)



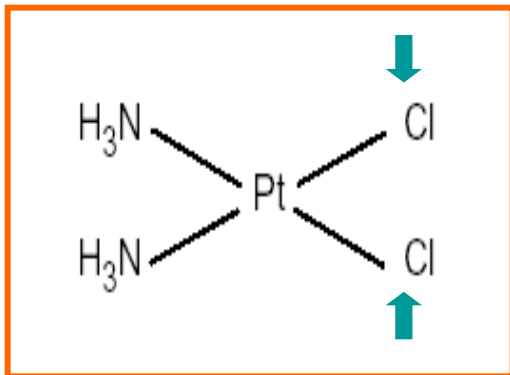
„half transporter“ asi funguje jako homodimer

Rezistence na deriváty platiny

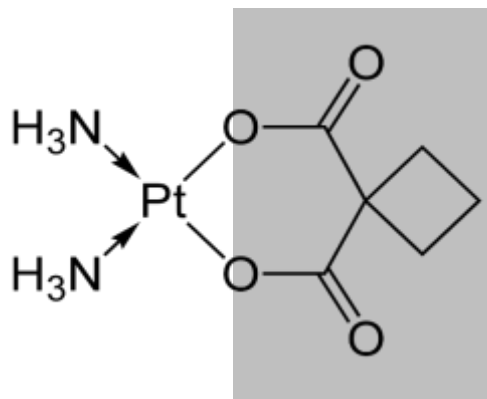
Deriváty platiny s protinádorovým účinkem

Vstupují do buňky pasivně
a/nebo transportérem CTR1

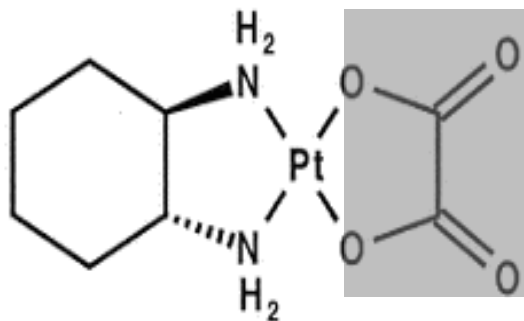
(trans G-G)
jen vzácně!



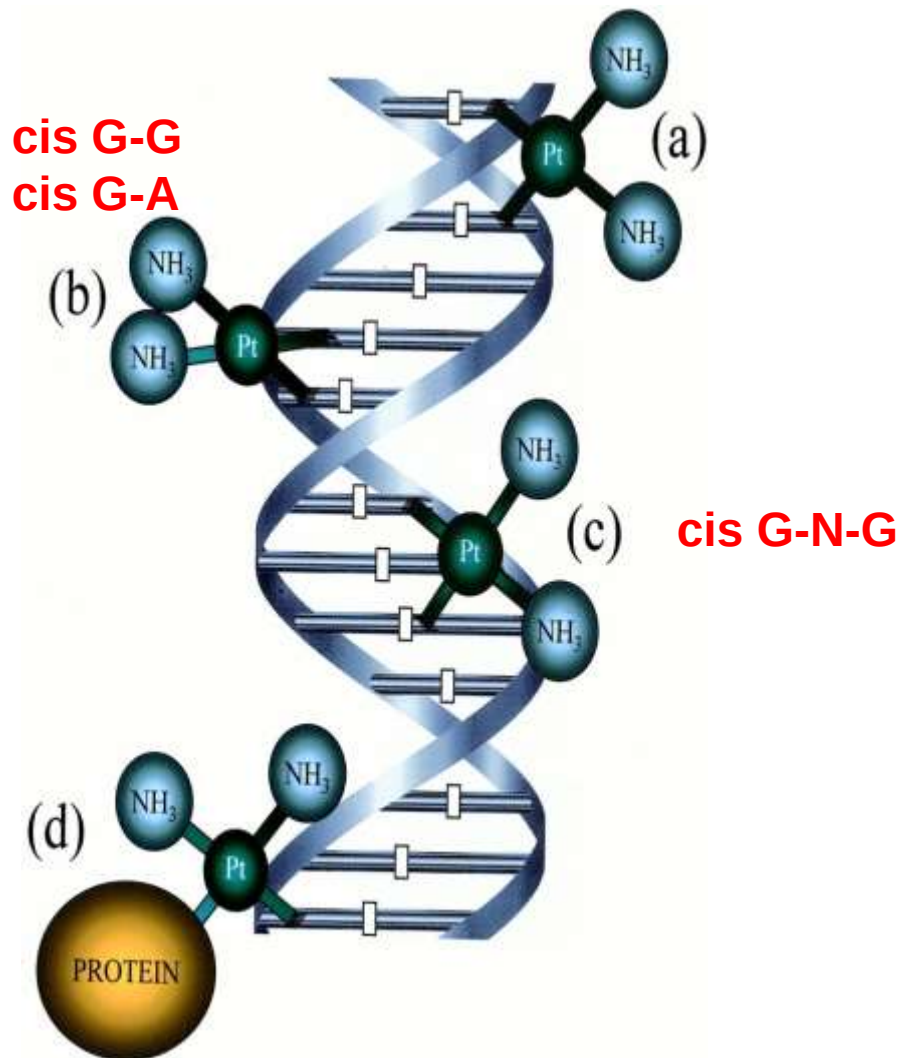
Cisplatina



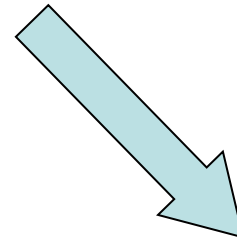
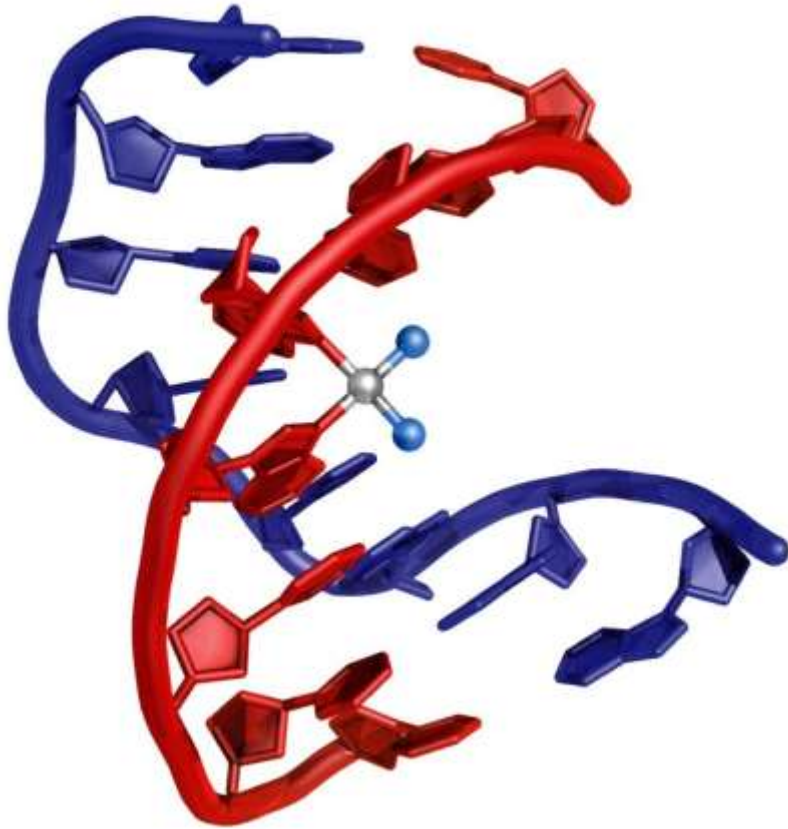
Karboplatina



Oxaliplatina



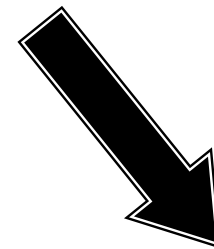
Pt-adukty (intrastrand) vedou k distorzi dvoušroubovice DNA (včetně mtDNA)



Inhibici replikace
Inhibici transkripce
Poškození telomer (bohaté na G)

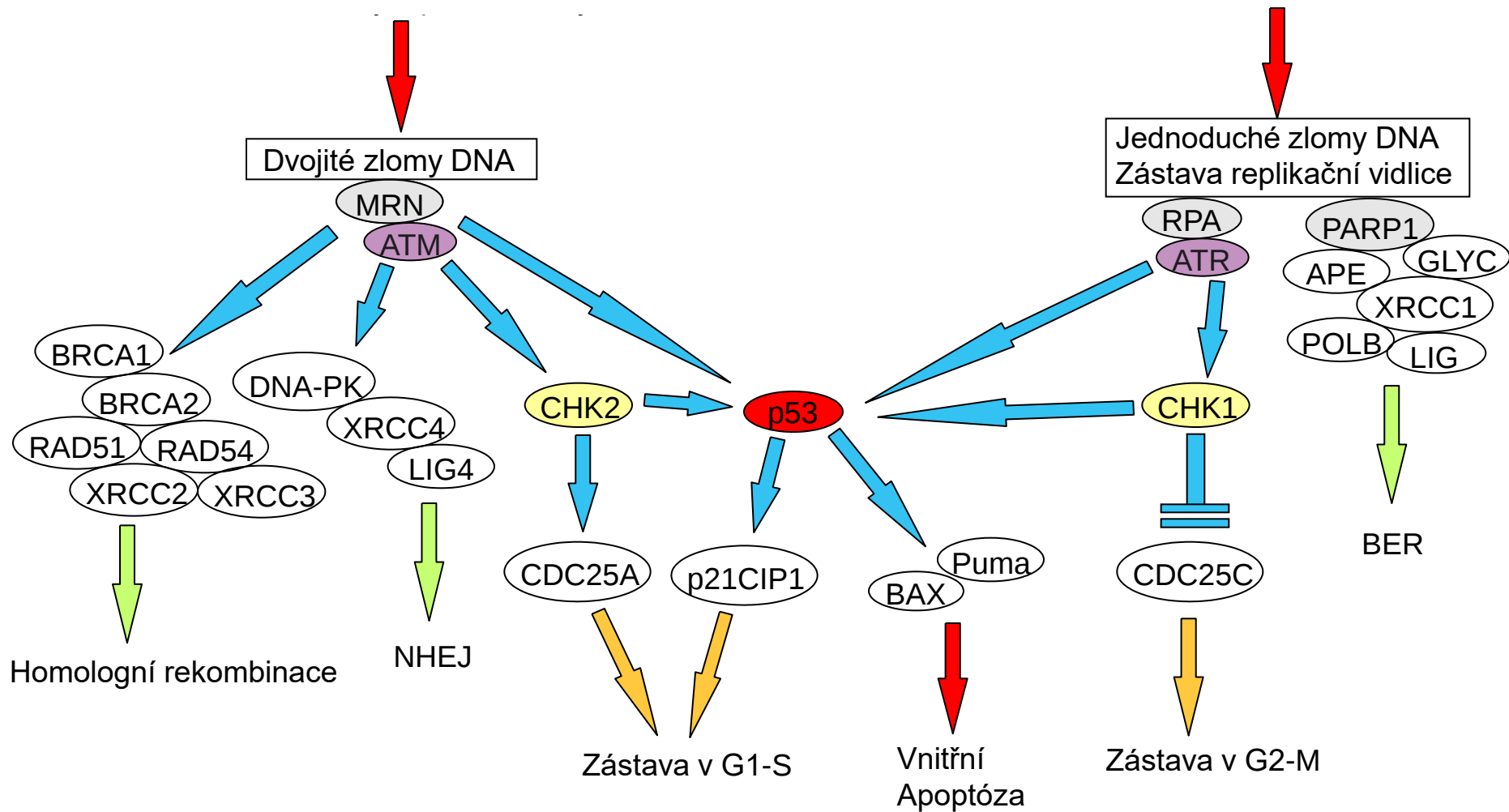


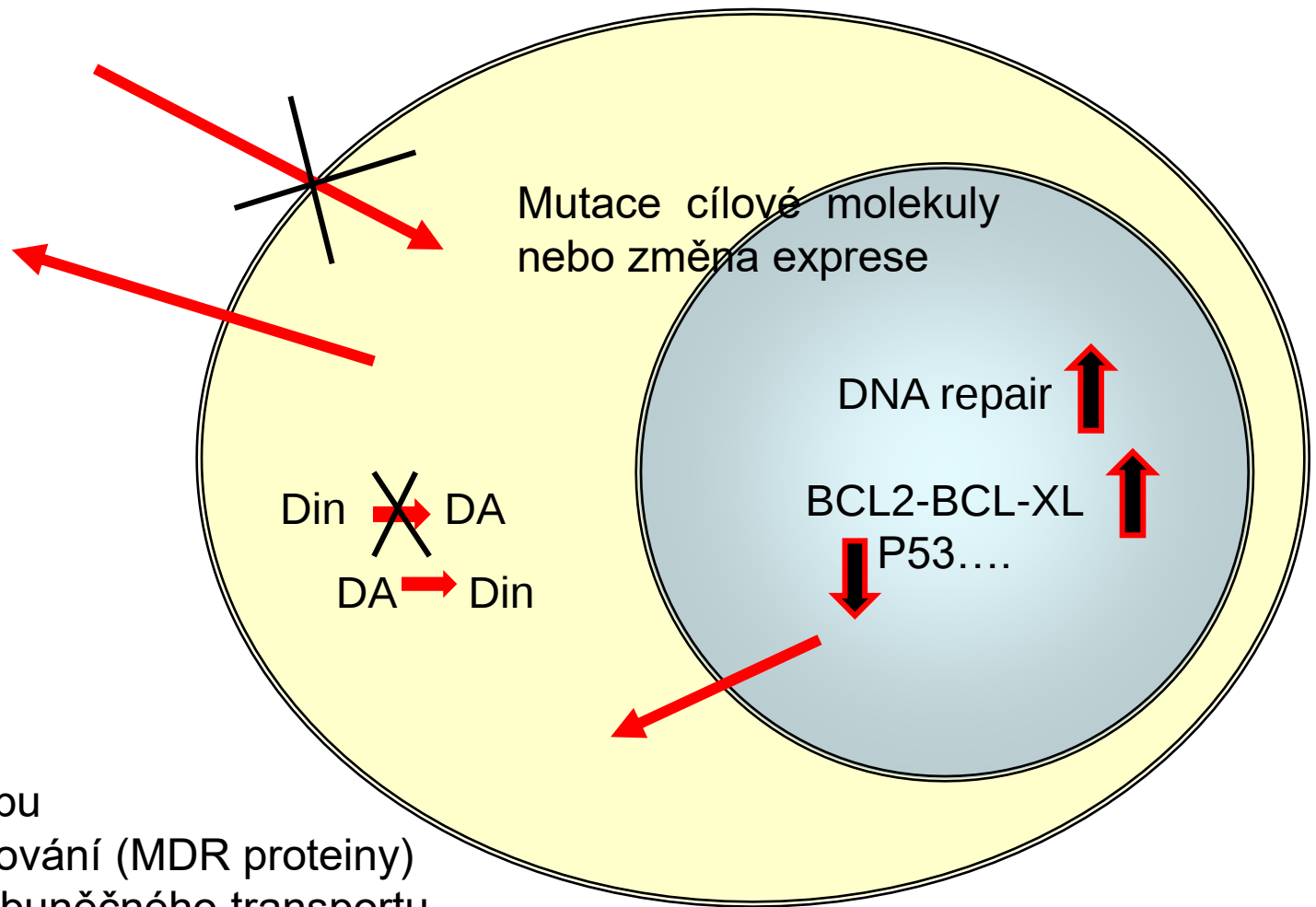
Aktivace DNA oprav



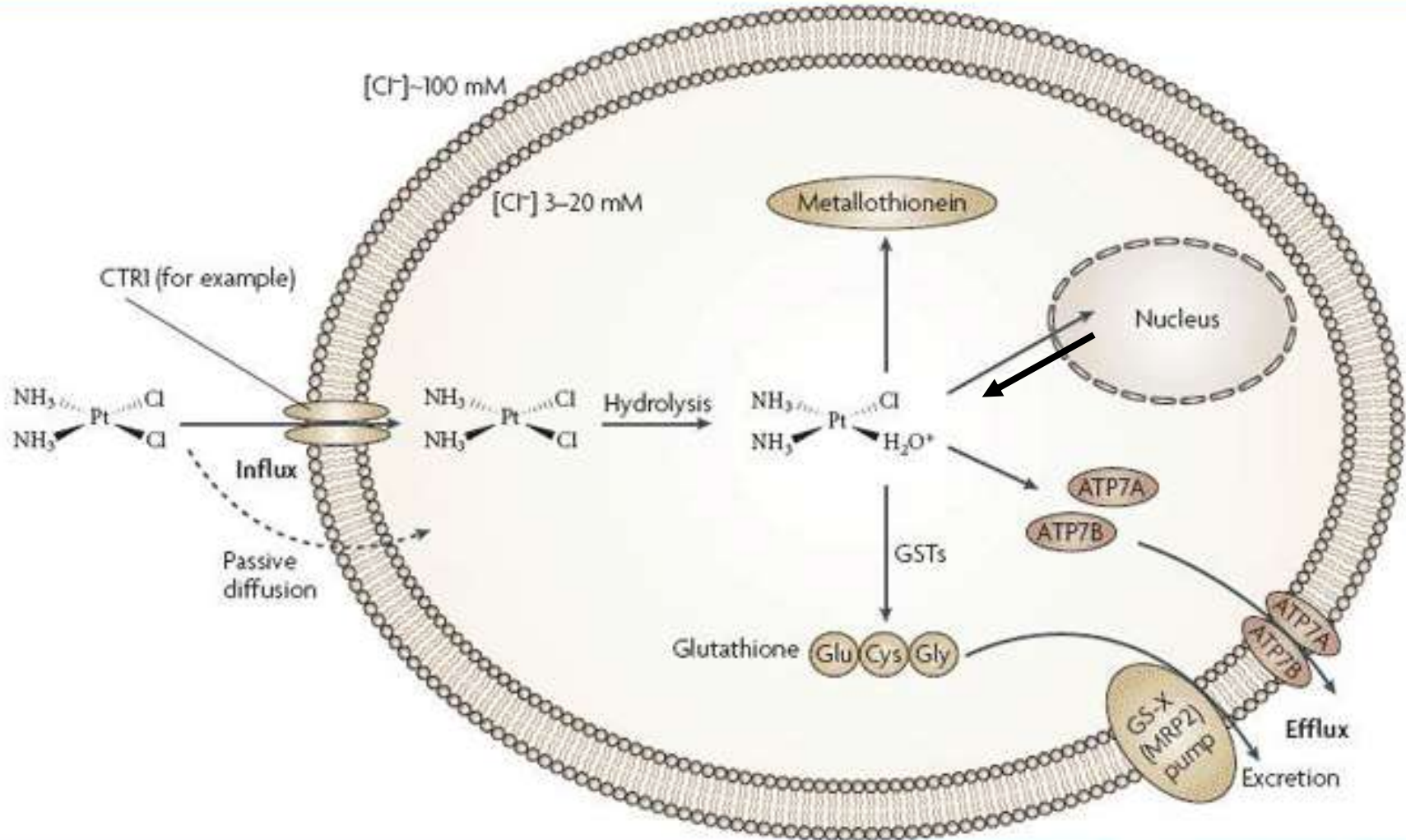
Apoptóza

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)



Snížení toxicity- konjugace s glutathionem nebo MT



MDR proteiny (ABCB2/4) (platina-glutathion komplex)



Změny v DNA opravách (nucleotide excision repair, NER)



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

Rezistence na alkylanty

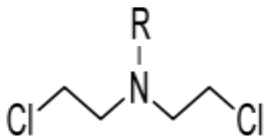
Alkylační činidla

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????

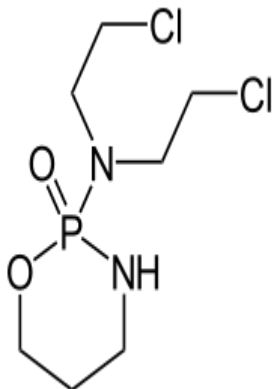
Oprava

APOPTÓZA

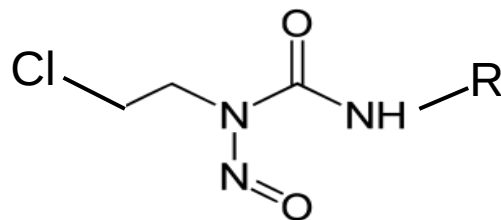


nitrogen mustard

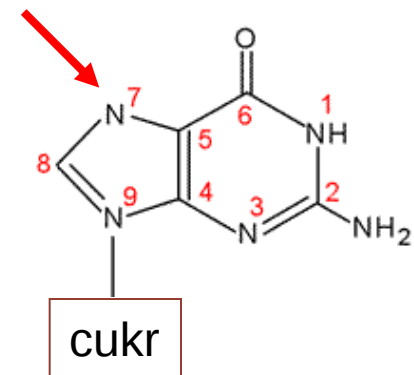
Cyklofosfamid



Chlorethyl nitrosourea



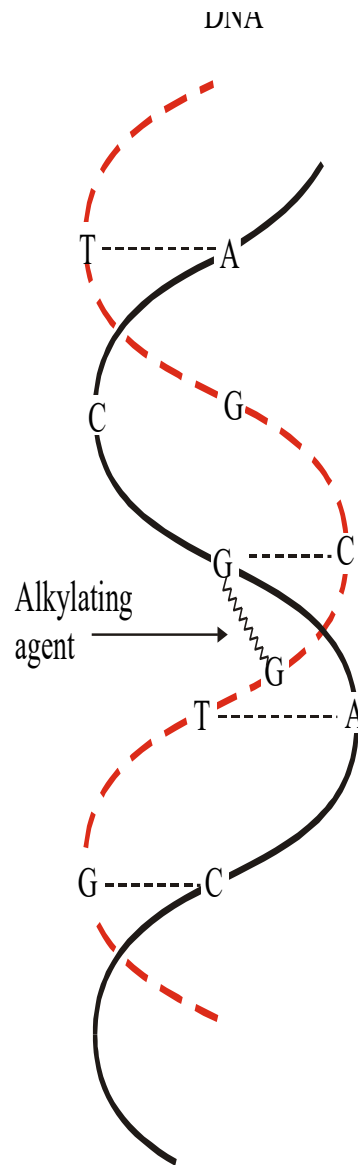
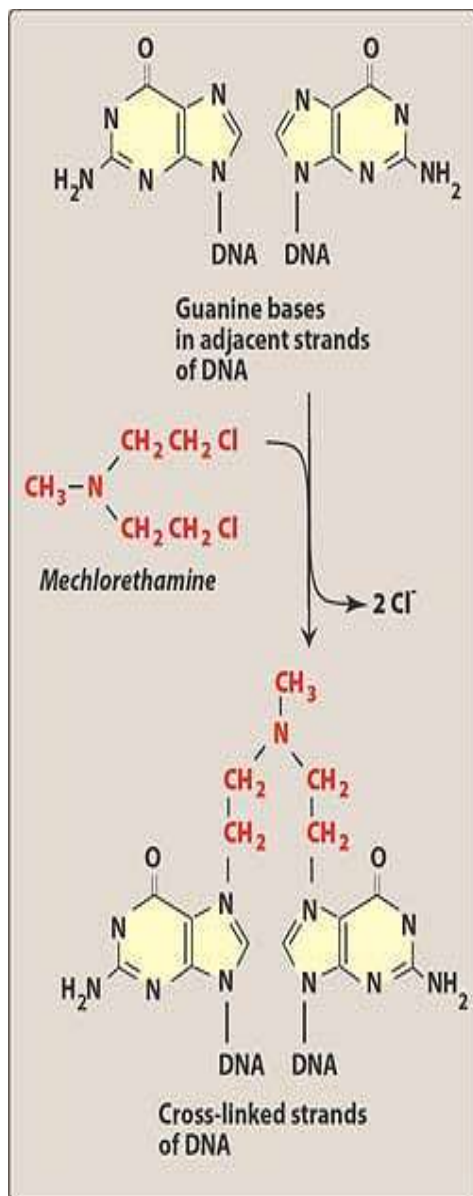
Adukty nejčastěji na G
(v poloze N7)



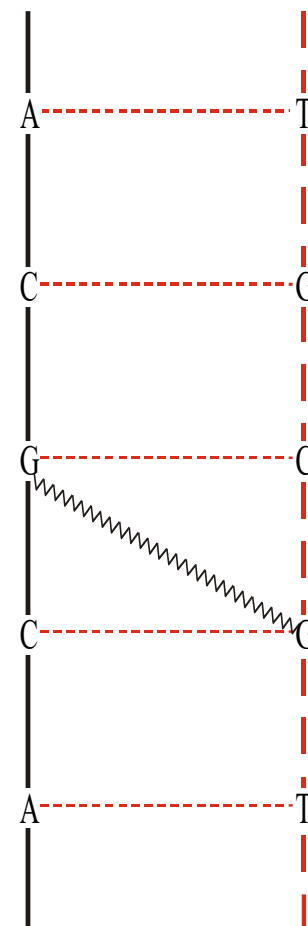
Alkylují ale také proteiny.

Mechanismus účinku alkylačních látek

Vznik INTERSTRAND (meziřetězcového) crosslinku

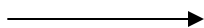


i.e.



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

Tvorba krosslinků
(intra- nebo inter-strand)



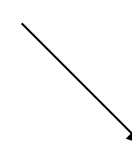
Rozeznání poškození
DNA



ATM/ATR

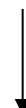


p53



Zástava buněčného cyklu

Bax, Puma...



Přežití a návrat
do cyklu



DNA repair

APOPTÓZA

Rezistence na alkylanty (cyklofosfamid)

Cyklofosfamid je prodrug – musí být nejprve aktivován cytochrom p450 oxidázou (snížení aktivace)



Aldehyd dehydrogenáza (cyklofosfamid a další)

Enzym který detoxifikuje aktivní metabolit cyklofosfamidu v buňkách



Detoxifikace (konjugace glutathionu - GST, GSH)



DNA repair (NER)

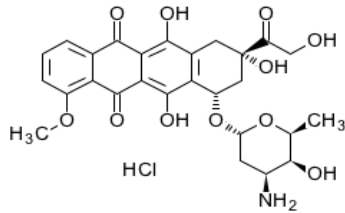
Není důkaz, že by byly substrátem pro MDR proteiny

Rezistence na antracykliny a inhibitory topoizomeráz

Interkalační látky (antracykliny)

Doxorubicin

(komerční název adriamycin,
idarubicin)

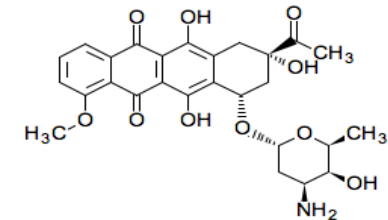


D01275



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

Daunorubicin

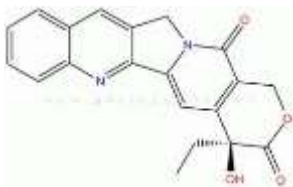


C01907

Inhibitory topoizomeráz

TOPOI

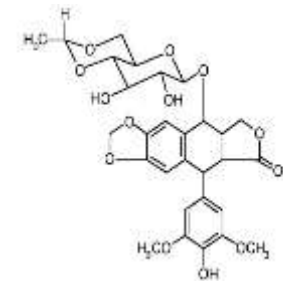
Irinotekan a topotekan



⇒ Jednořetězcové zlomy

TOPOII

Etoposid



⇒ Dvouřetězcové zlomy

Rezistence na inhibitory topoizomeráz a antracykliny

Irinotekan, topotekan
TOPOI

 glukuronidace

 TOPOI + mutace

 DNA repair

 MDR proteiny

 Antiapoptotické
procesy

etoposid
TOPOII

 glukuronidace

 TOPOII + mutace

 DNA repair

 MDR proteiny

 Antiapoptotické
procesy

antracykliny
TOPOII
+ generace radikálů

 glukuronidace

 TOPOII + mutace

 DNA repair

 MDR proteiny

 Antiapoptotické
procesy

 SOD, MnSOD, GSTs

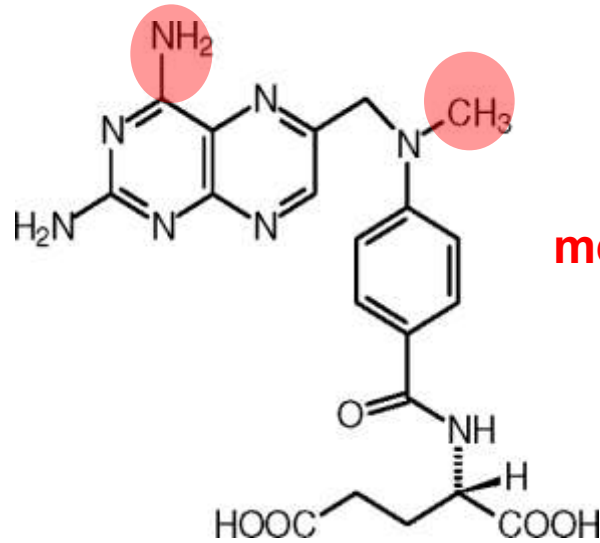
Rezistence na antimetabolity

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

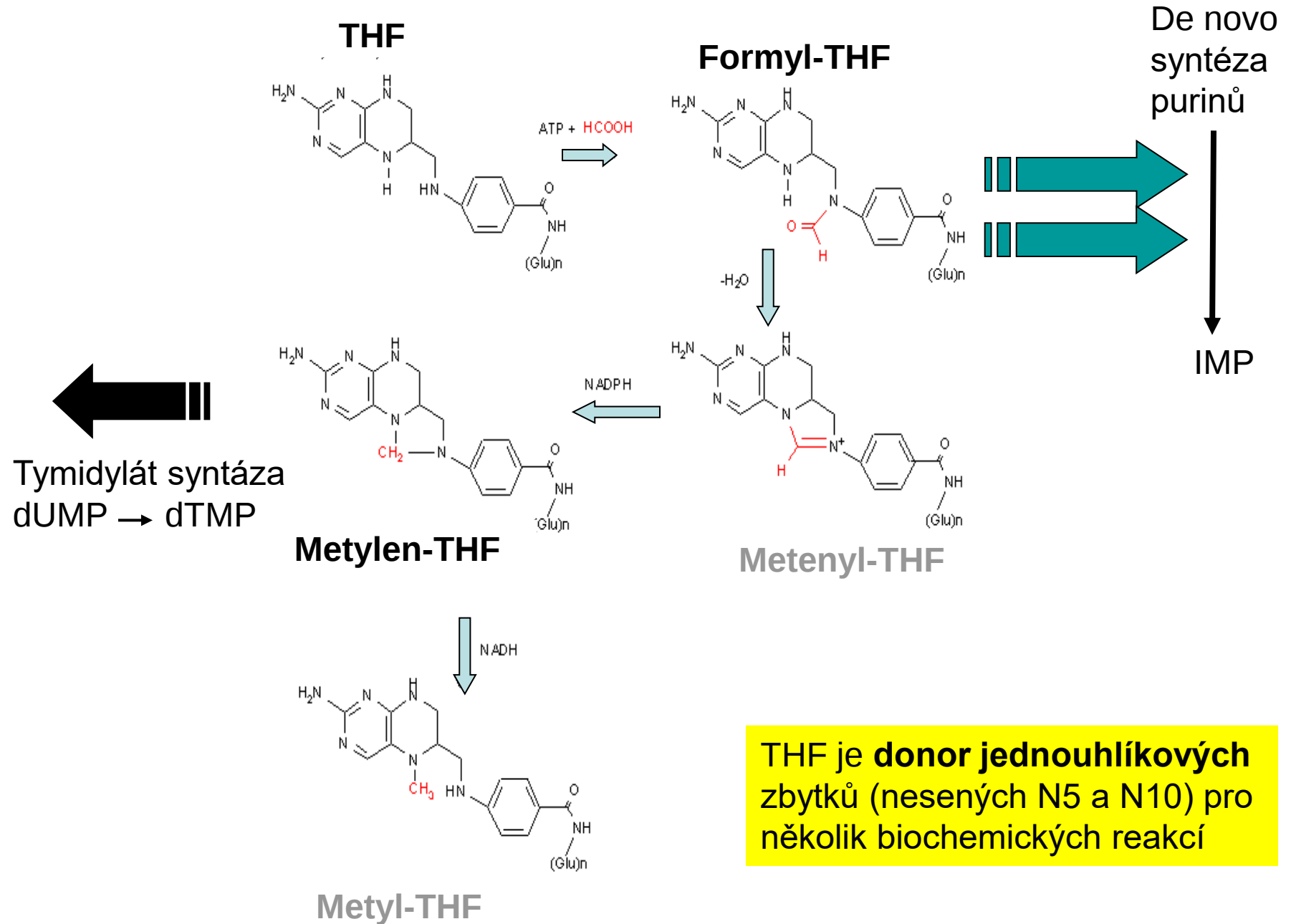
Antifoláty – inhibitory DHFR



Sidney Farber

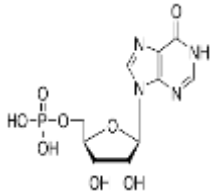


metotrexát (MTX)



PURINY

*Syntéza
De novo*



IMP

PRPP

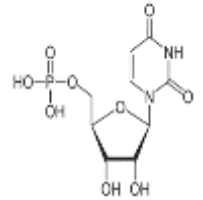
Ribózo 5-P

karbamoyl fofsát

PPI

UMP

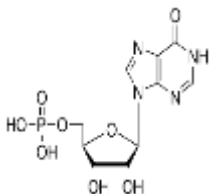
*Syntéza
De novo*



PYRIMIDINY

PURINY

Syntéza De novo



IMP

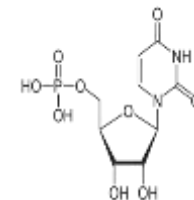
PRPP

Ribózo 5-P

karbamoyl fofsát

PYRIMIDINY

Syntéza De novo



PPi

UMP

Kys. listová

DHF

DIHYDROFOLÁT
REDUKTÁZA

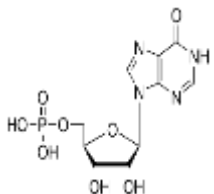
THF

Formyl-THF

Metylen THF

PURINY

Syntéza De novo



IMP

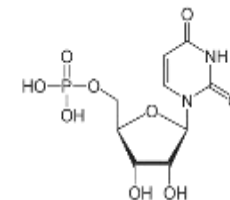
PRPP

Ribózo 5-P

karbamoyl fofsát

PYRIMIDINY

Syntéza De novo



UMP

P_Pi

Kys. listová

DHF

DIHYDROFOLÁT
REDUKTÁZA

THF

AMP

GMP

ADP

GDP

dGDP

RIBONUKLEOTID
REDUKTÁZA

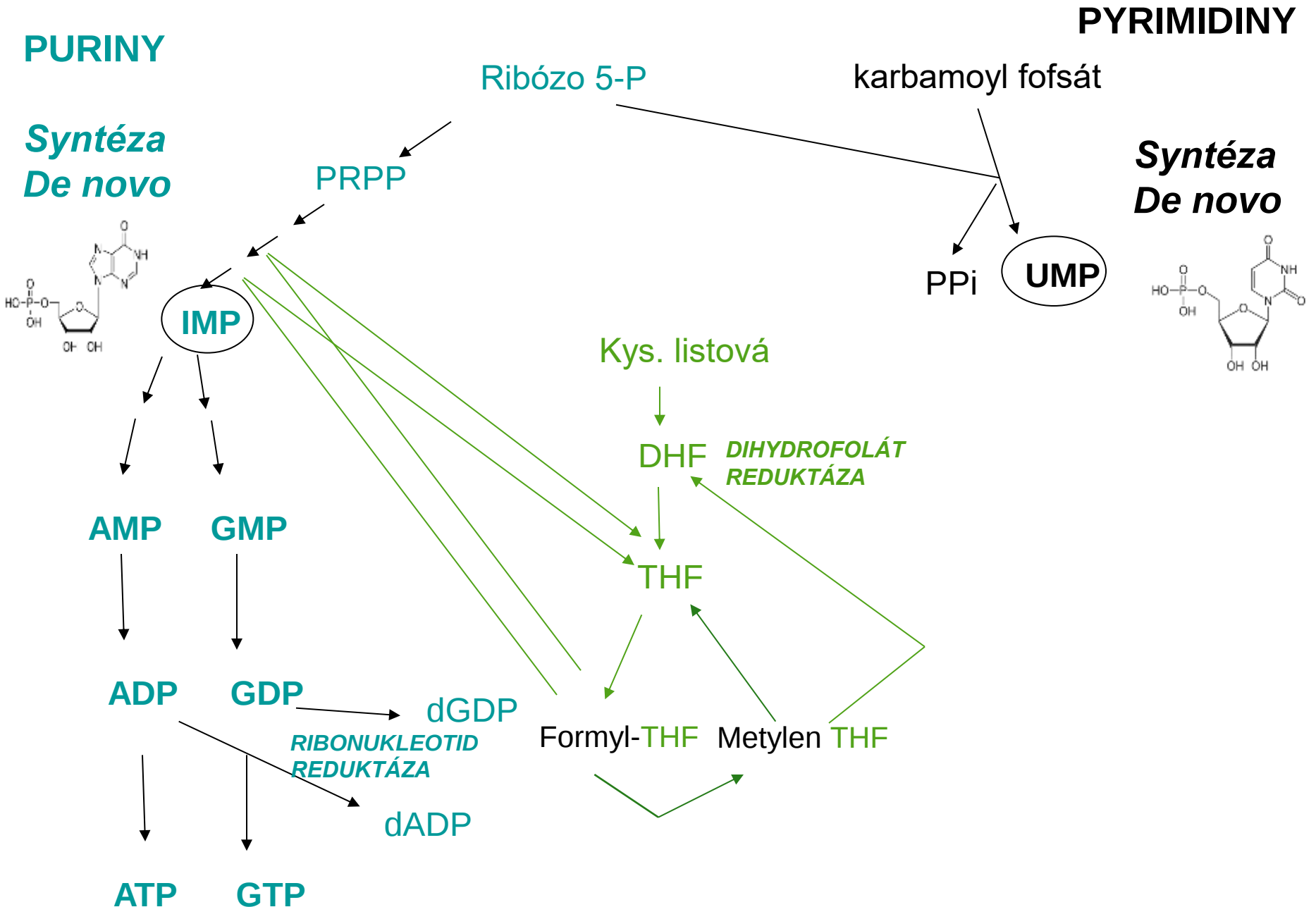
dADP

ATP

GTP

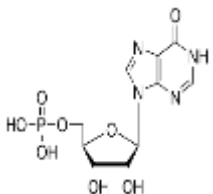
Formyl-THF

Metylen-THF



PURINY

Syntéza De novo



IMP

AMP

GMP

ADP

GDP

ATP

GTP

PRPP

Ribózo 5-P

Kys. listová

DHF

DIHYDROFOLÁT
REDUKTÁZA

THF

Formyl-THF

Metylen-THF

RIBONUKLEOTID
REDUKTÁZA

dGDP

dADP

karbamoyl fofsát

Pi

UMP

UDP

dUMP

UTP

CTP
SYNTÁZA

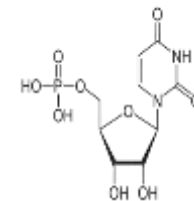
CTP

THYMIDYLÁT
SYNTÁZA

dTMP

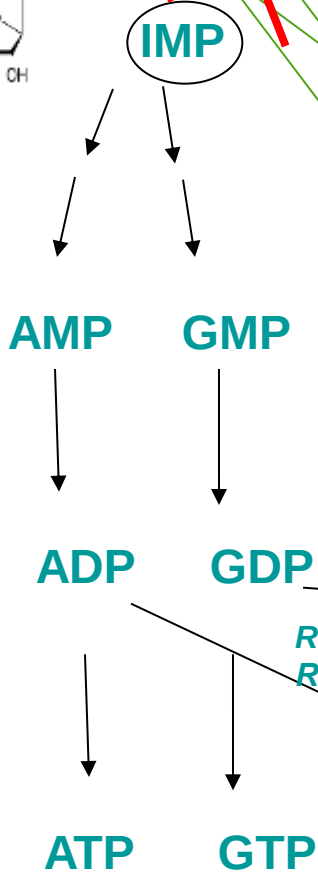
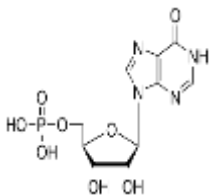
dTTP

Syntéza De novo



PURINY

Syntéza De novo



Ribózo 5-P

PRPP

IMP

AMP

GMP

ADP

GDP

ATP

GTP

dGDP

dADP

RIBONUKLEOTID
REDUKTÁZA

Kys. listová

DHF

DIHYDROFOLÁT
REDUKTÁZA

THF

Formyl-THF

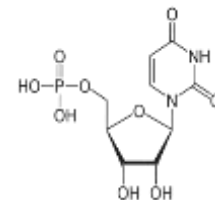
Metylen THF

dTMP

dTTP

PYRIMIDINY

Syntéza De novo



karbamoyl fofsát

PPi

UMP

UDP

dUMP

UTP

CTP
SYNTÁZA

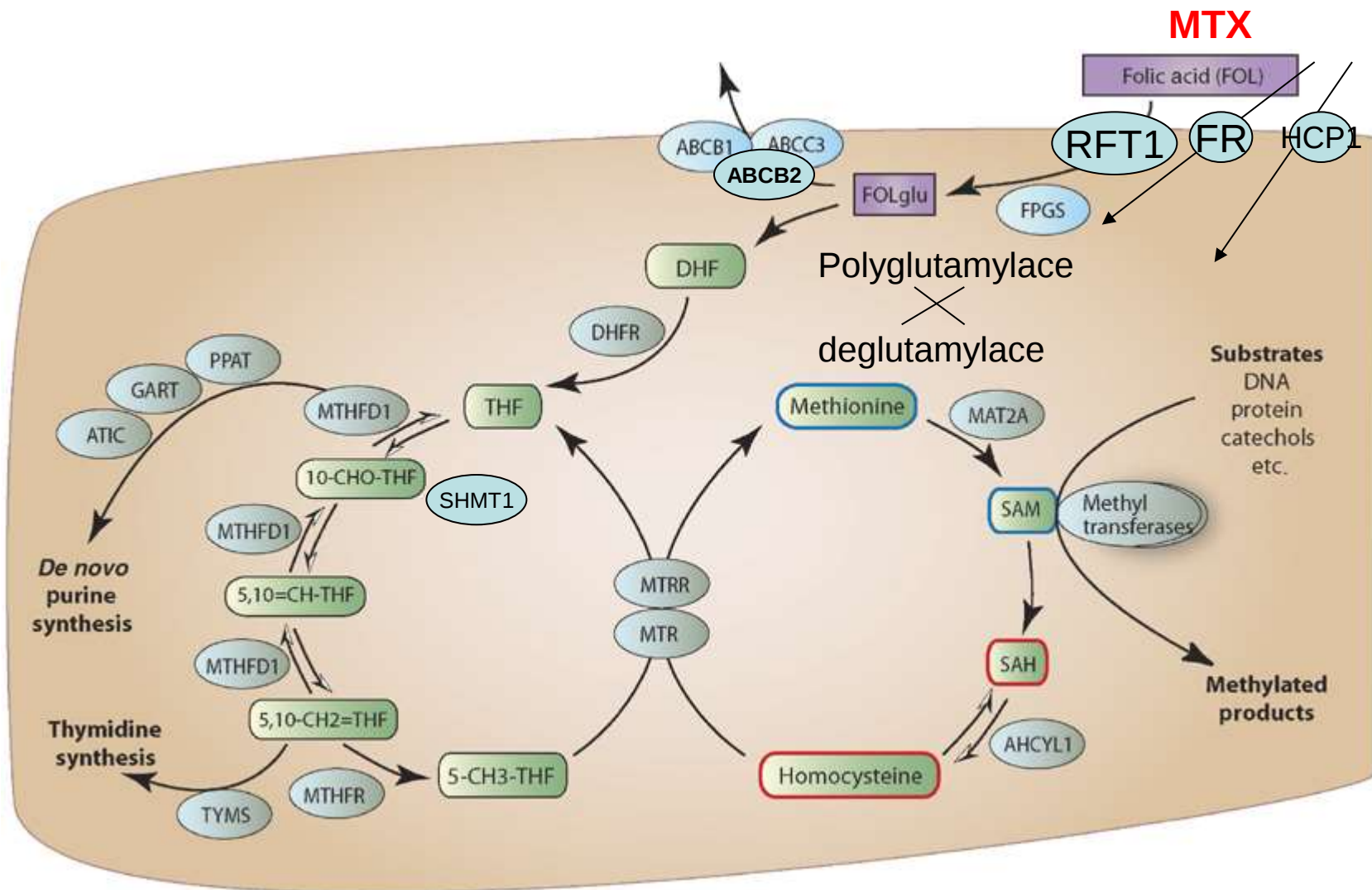
CTP

MTX



THYMIDYLÁT
SYNTÁZA

dTTP



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



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



DEGLUTAMYLACE lysozomálními **gamma-glutamyl hydrolázami**



MDR proteiny (export závisí na stupni glutamylace)



DHFR (amplifikace, overexprese, mutace)



TS (amplifikace, overexprese)

?

GARFT (AICAR) změny nenalezeny



Utilizace „salvage“ pathways



DNA repair

Rezistence na antimetabolity

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

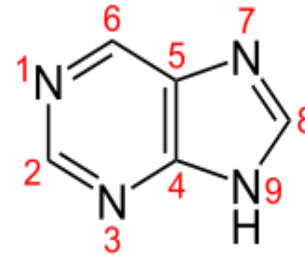
ANTIBÁZE (antipuriny)

6-merkaptopurin

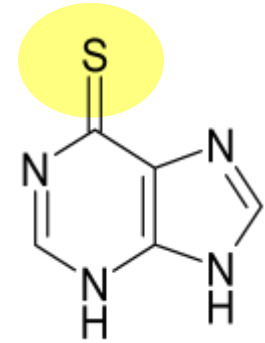
(analog **hypoxantinu**, inhibuje salvage dráhu)

Terapie ALL u dětí

1950s



PURIN



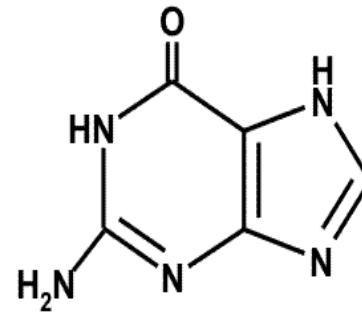
6-merkaptopurin

thioguanin

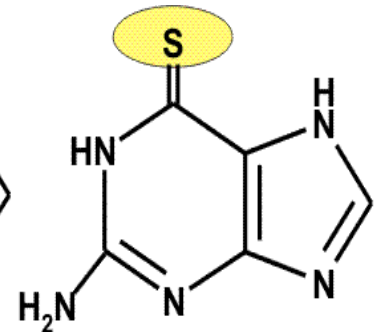
(analog **guaninu**, inhibuje salvage dráhu)

Terapie leukemii

1950s

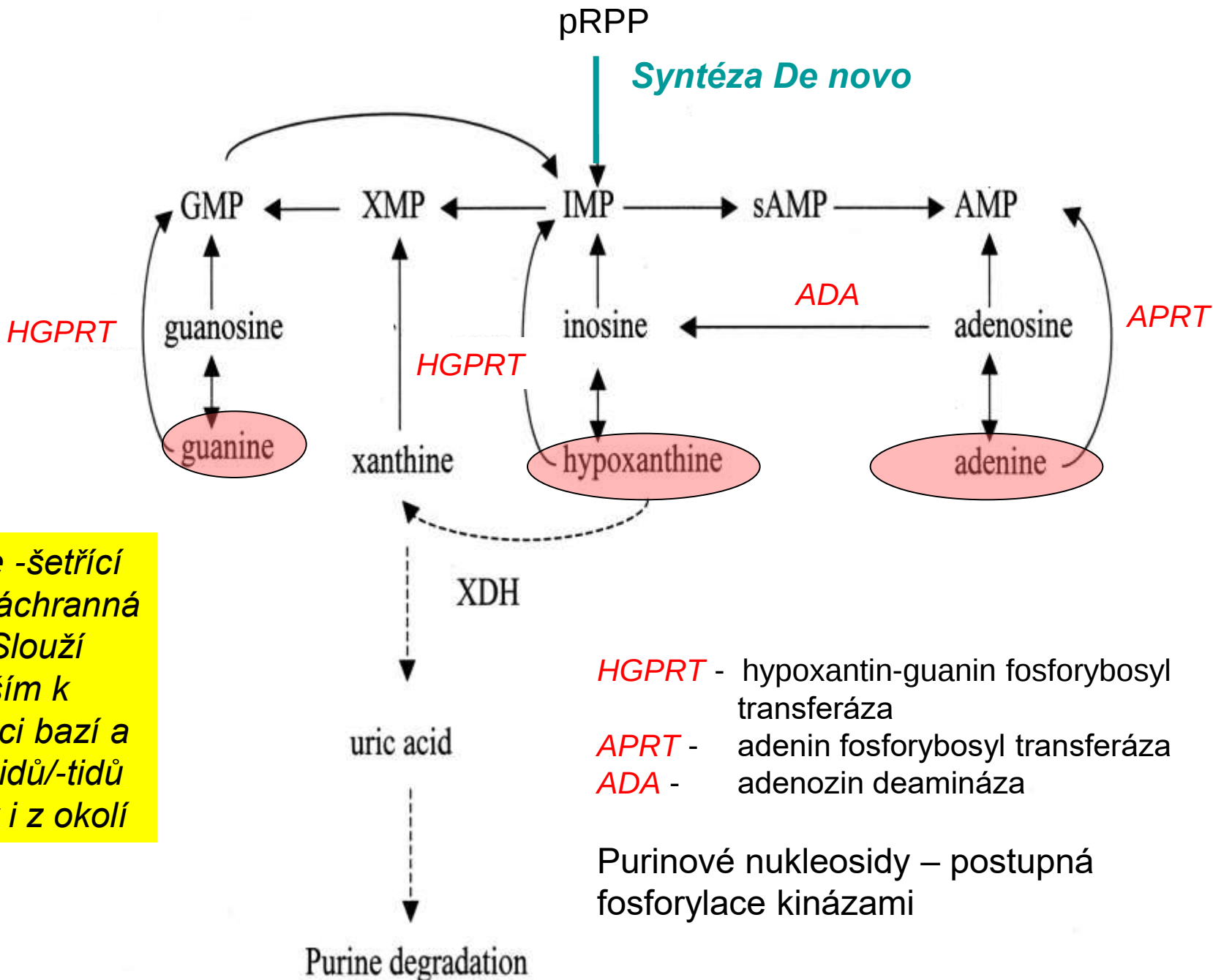


Guanine



6-Thio-Guanine

Purinová „salvage“ dráha



Salvage -šetřící dráha, záchranná dráha. Slouží především k reutilizaci bazí a nukleosidů/-tidů z buňky i z okolí

HGPRT - hypoxantin-guanin fosforybosyl transferáza
APRT - adenin fosforybosyl transferáza
ADA - adenozin deamináza

Purinové nukleosidy – postupná fosforylace kinázami

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

GMP
↕
guanosine
↕
guanine

HGPRT

xanthine

XDH

uric acid

Purine degradation

6-thio IMP

6-merkaptopurin

IMP
↕
inosine
↕
hypoxanthine

sAMP → AMP

ADA

adenosine

adenine

APRT

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)



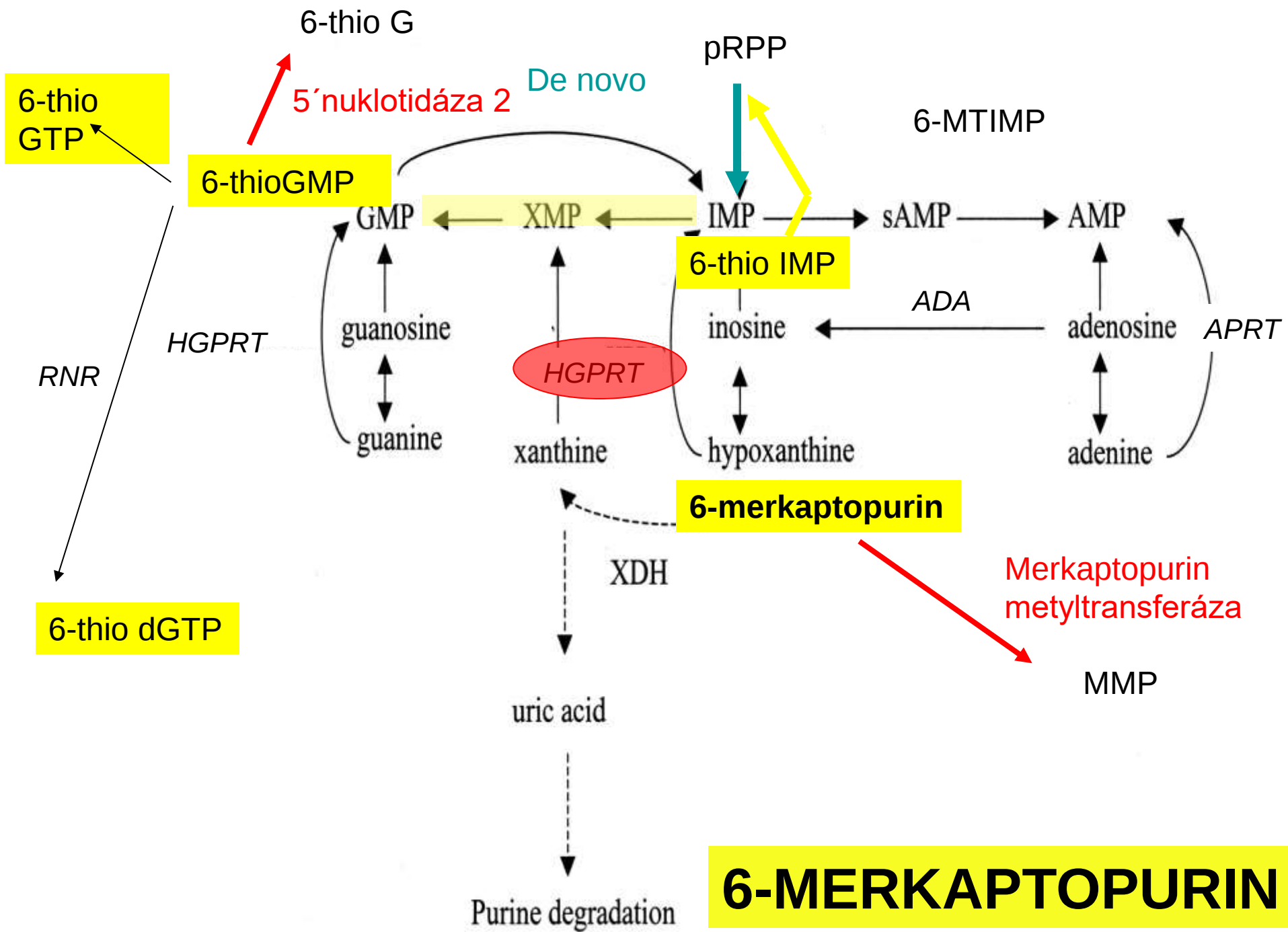
Hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza (HGPRT)



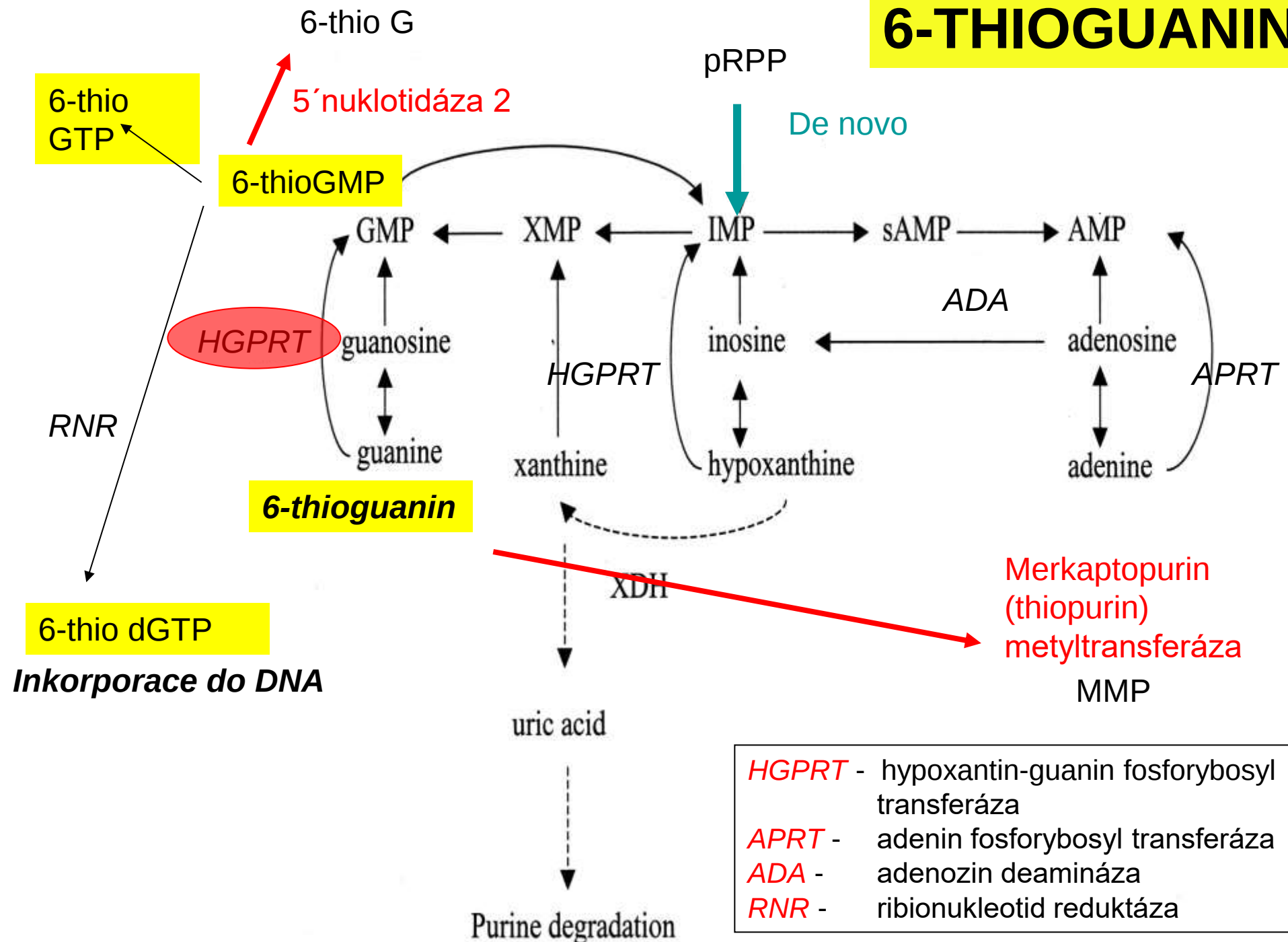
merkaptopurin (thiopurin) methyltransferáza
(S-metylace inaktivuje 6MP, ThioG)



5'Nukelotidáza 2



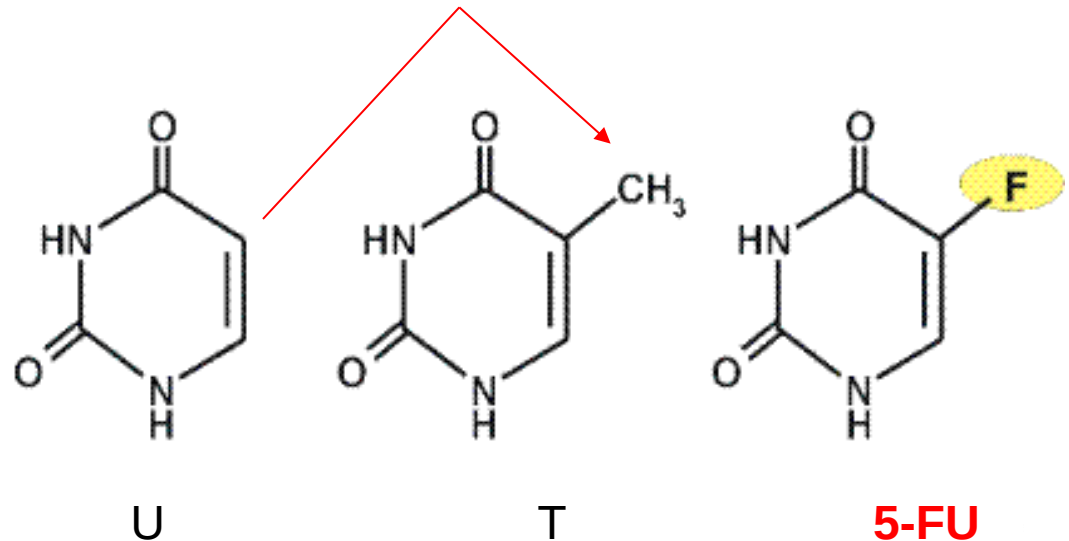
6-THIOGUANIN



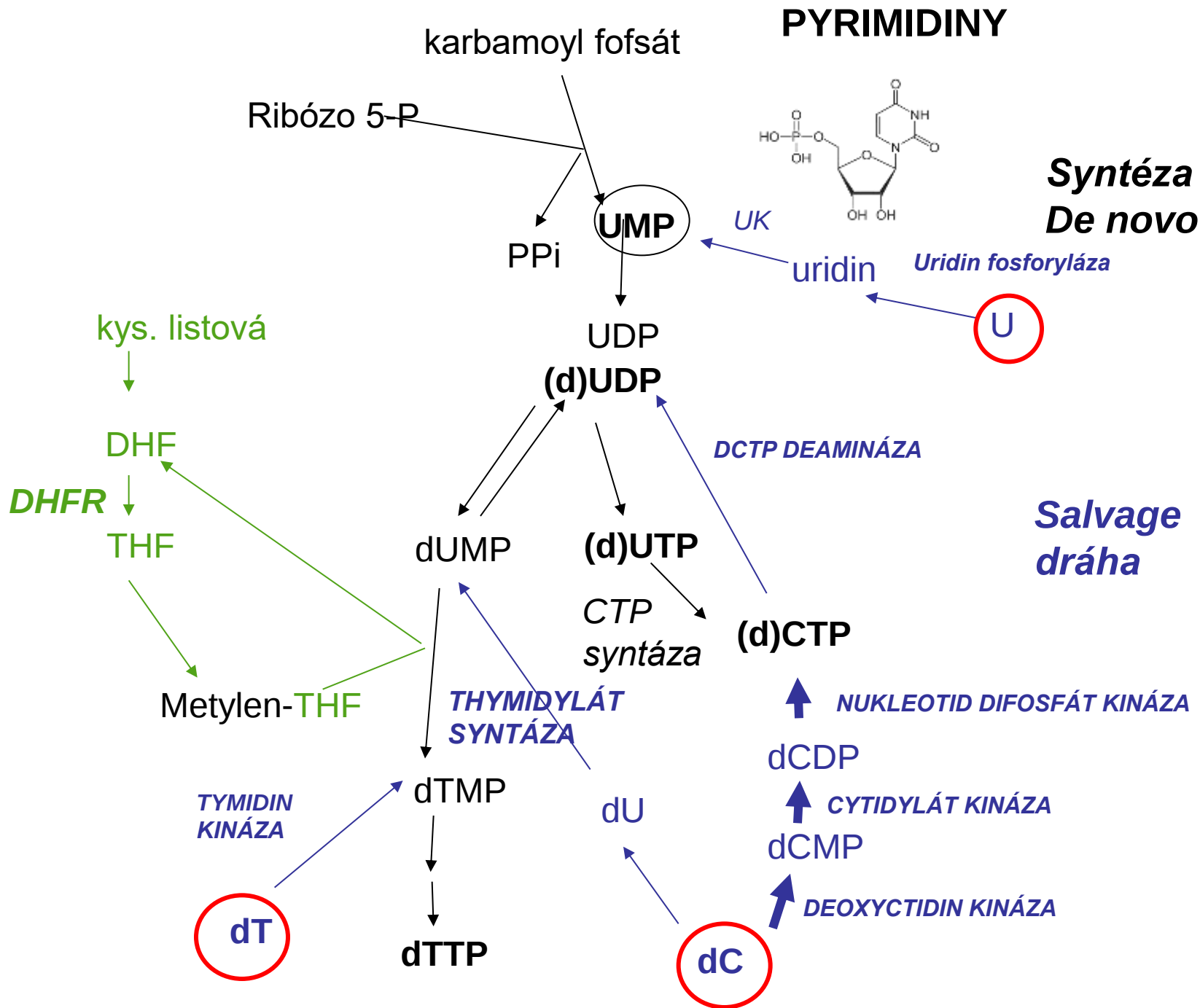
ANTIBÁZE (antipuriny)

5-FU (5-fluorouracil)

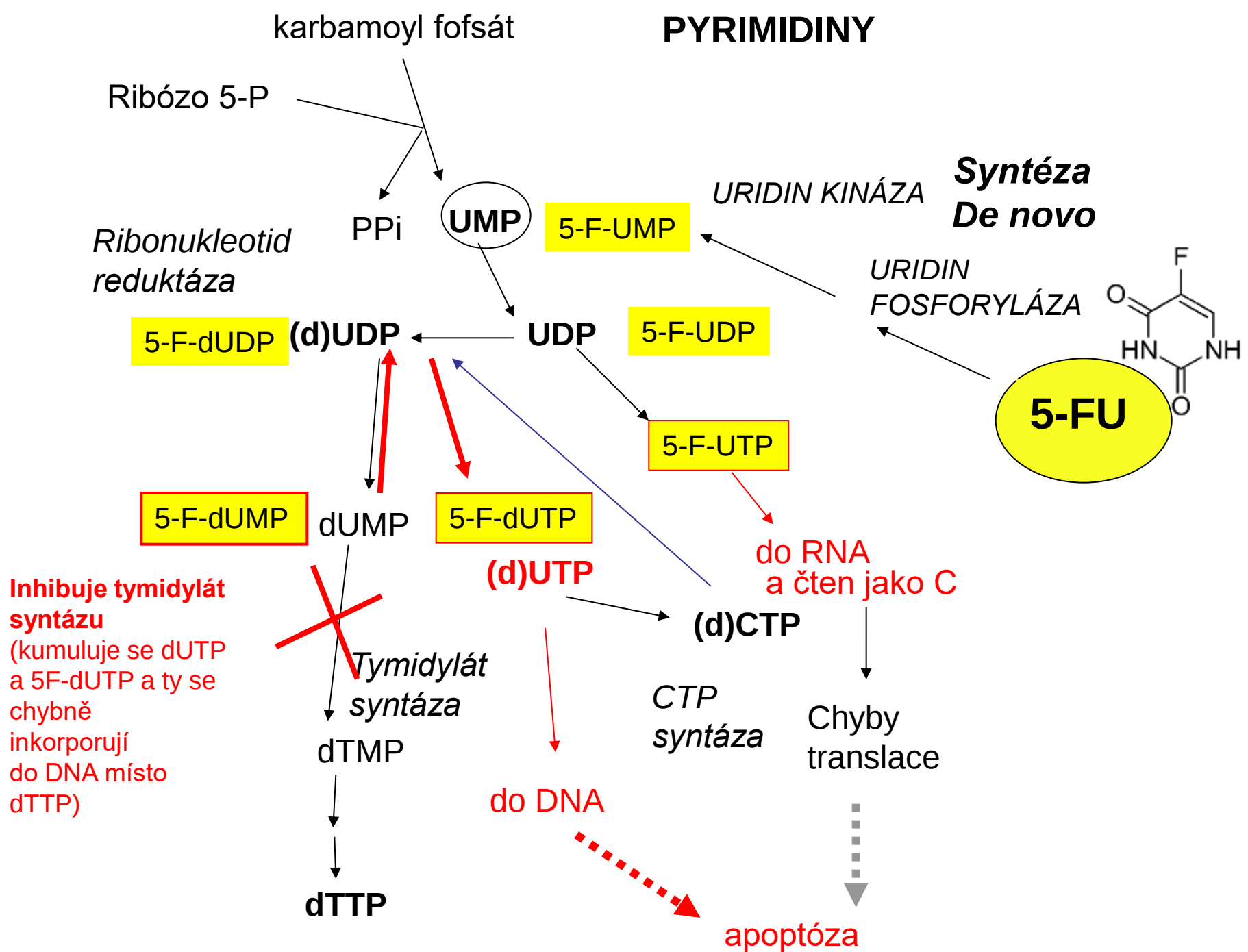
Funguje jako **Inhibitor tymidylát syntázy**, která při reakci dUMP na dTMP nahrazuje vodík na pozici 5 metylovou skupinou.



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)



Dihydropyrimidin dehydrogenáza (metabolizuje 5-FU)



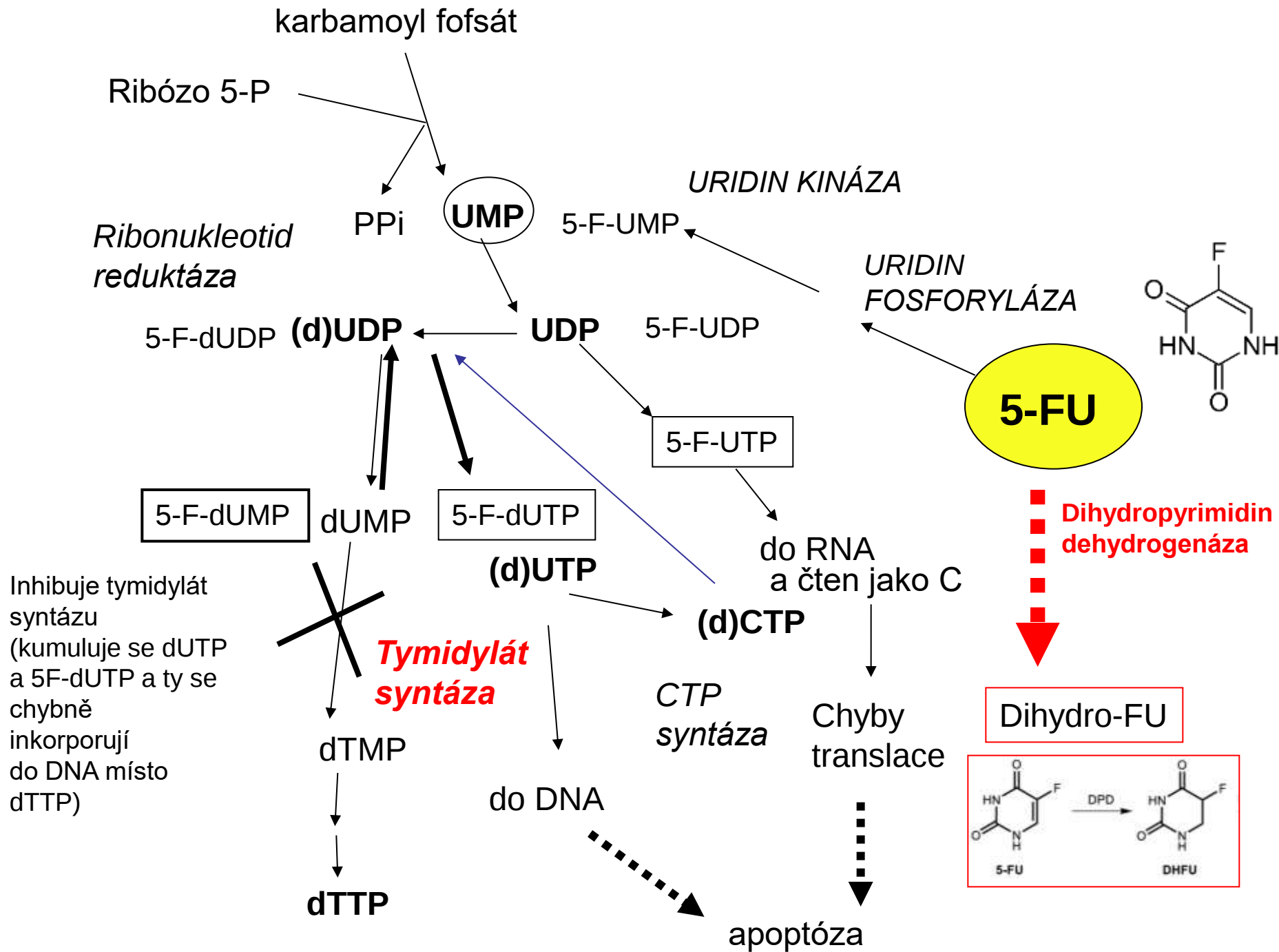
využití salvage drah, DNA repair



BCL2-/BCL-XL

?

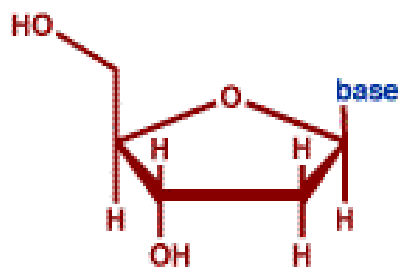
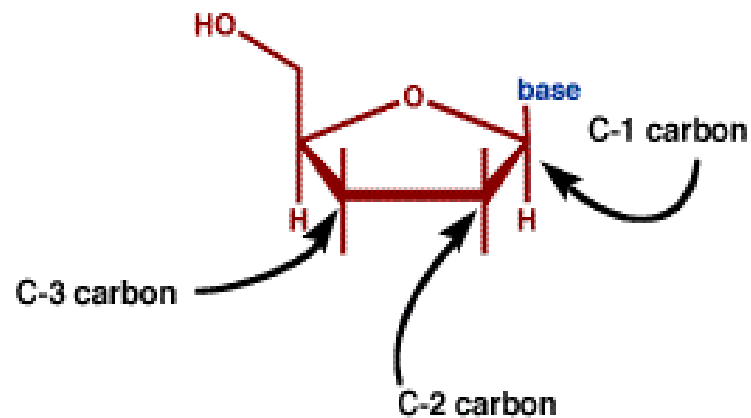
MDR proteiny ???



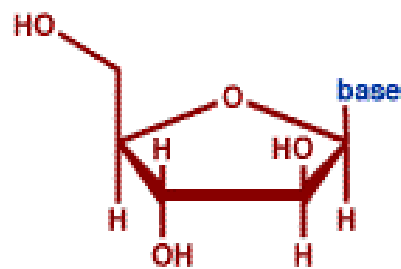
Rezistence na antimetabolity

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

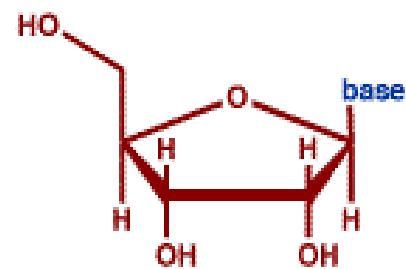
(DEOXY) NUKLEOSIDOVÉ ANTIMETABOLITY



deoxyribose
DNA backbone

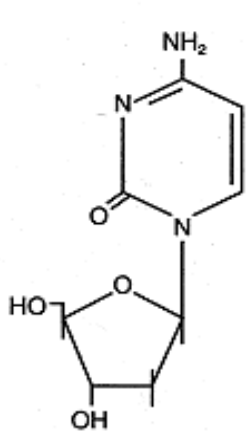


arabinose

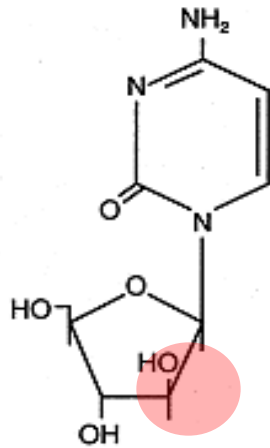


ribose
RNA backbone

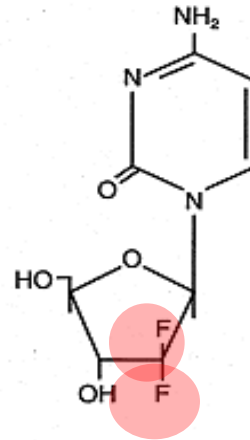
Pyrimidinové analogy cytarabin a gemcitabin



Deoxycytidine

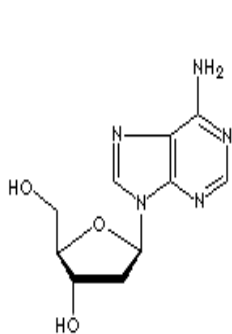


Cytarabin

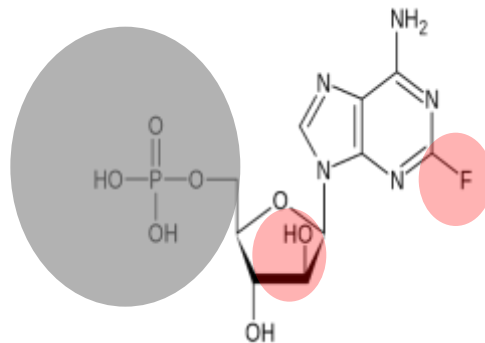


Gemcitabin

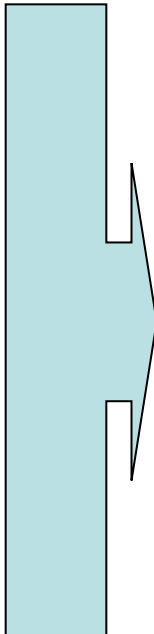
Purinový analog fludarabin



deoxyadenozin

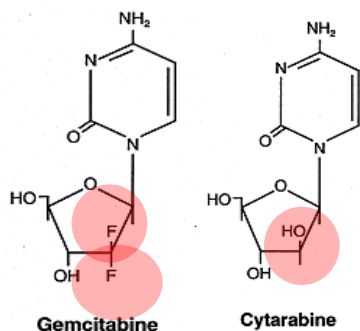


Fludarabin

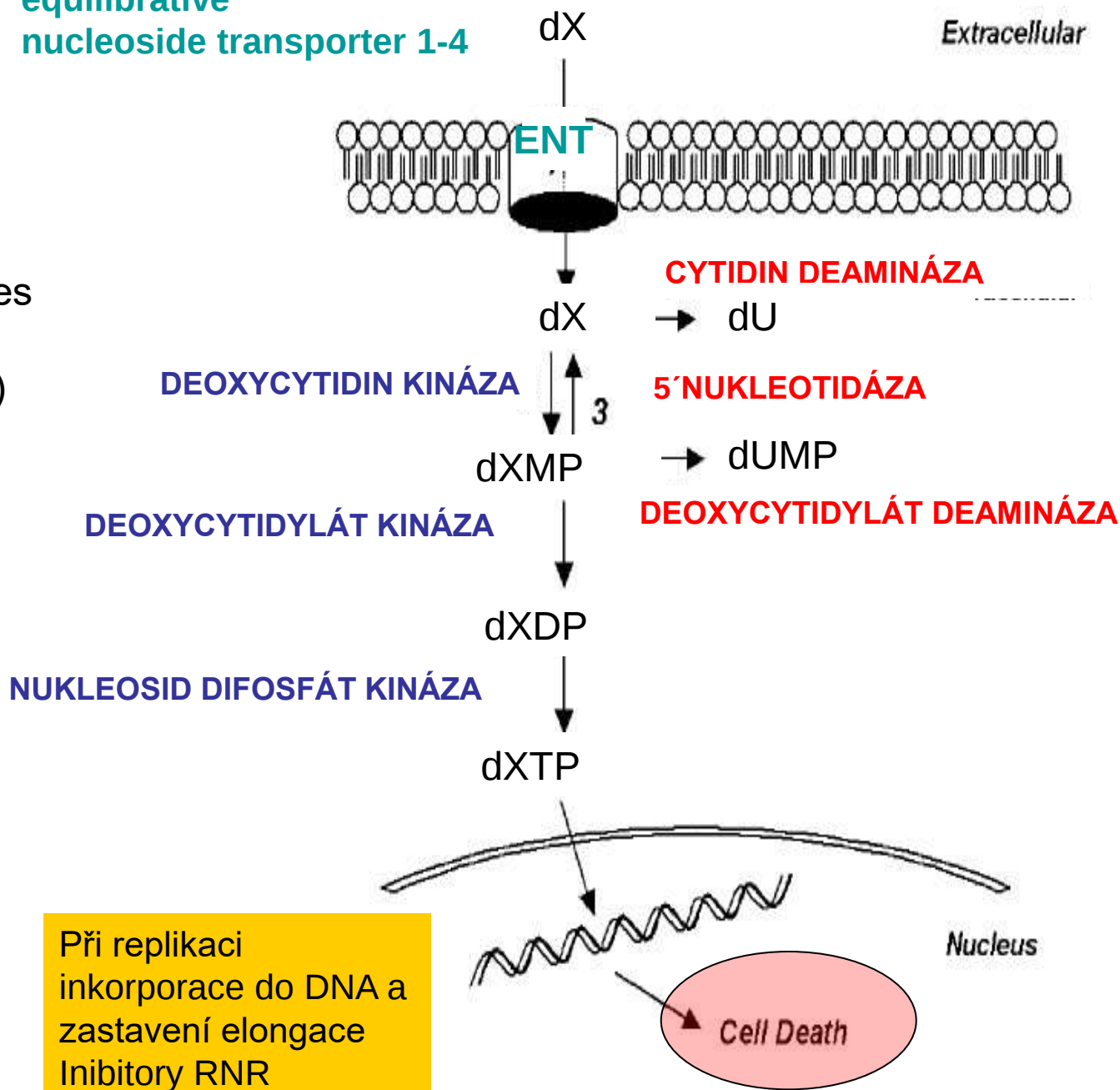
- 
- Inkorporace do DNA a zabránění elongace
 - Inhibice DNA pol
 - Různá míra inhibice RNR

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

?

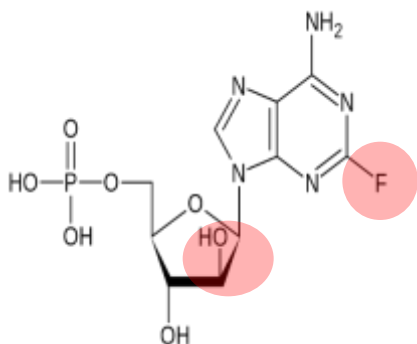
MDR proteiny

?

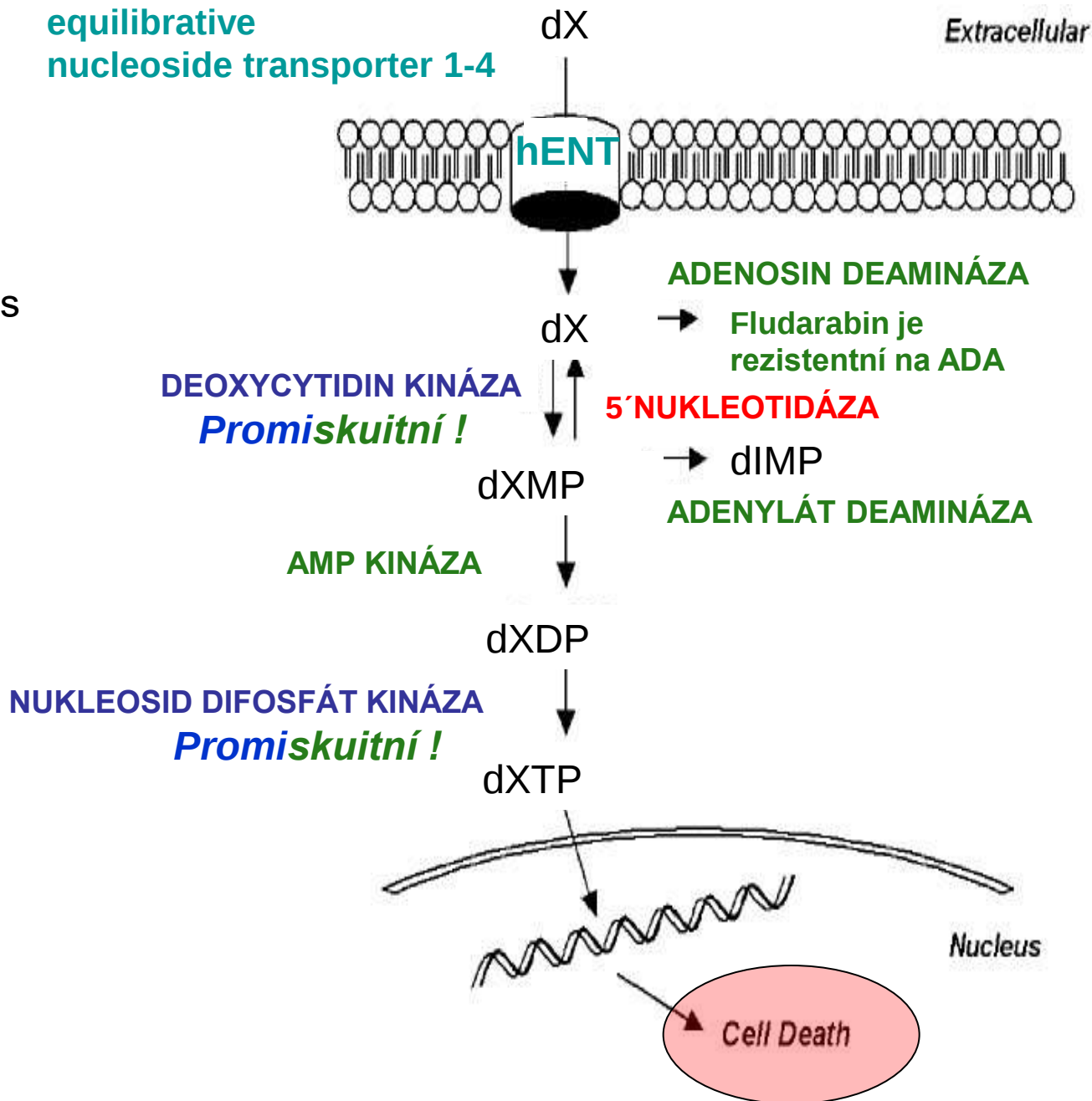
Změny v apoptotických drahách

Fludarabin (A)

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



equilibrative
nucleoside transporter 1-4



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)

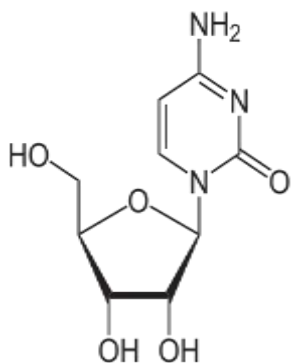
?

MDR proteiny?

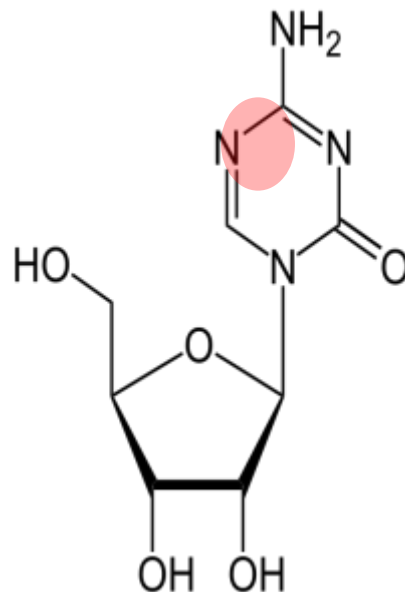
Rezistence na epigentická cytostaika

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

Aza-cytidin
(Vidaza)

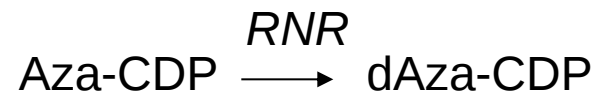


cytidin



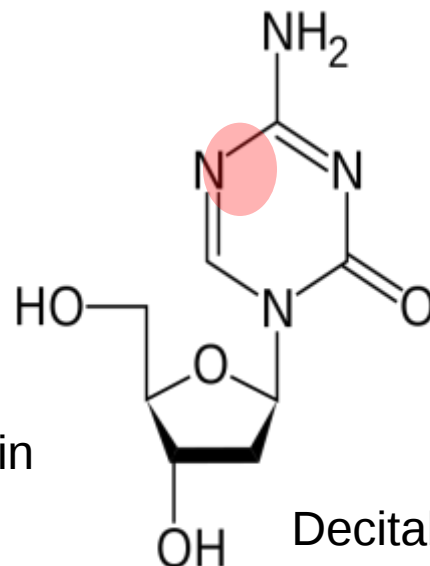
Aza-cytidin

Fosforylován
Inkorporovance 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)

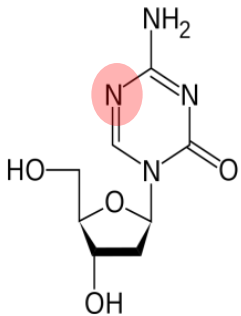
↓ hENTs

↓ DCK

↑ CDA

↑ DNMTs (mutace, amplifikace)

↑ BCL-2/BCL-XL



Aza-cytidin

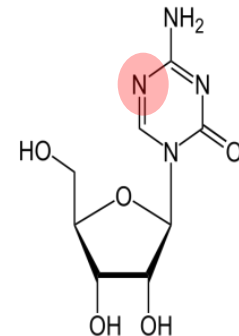
(je to ribonukleotid)

? hENTs

↓ Uridin-cytidin kináza (mutace)

↑ DNMTs (mutace, amplifikace)

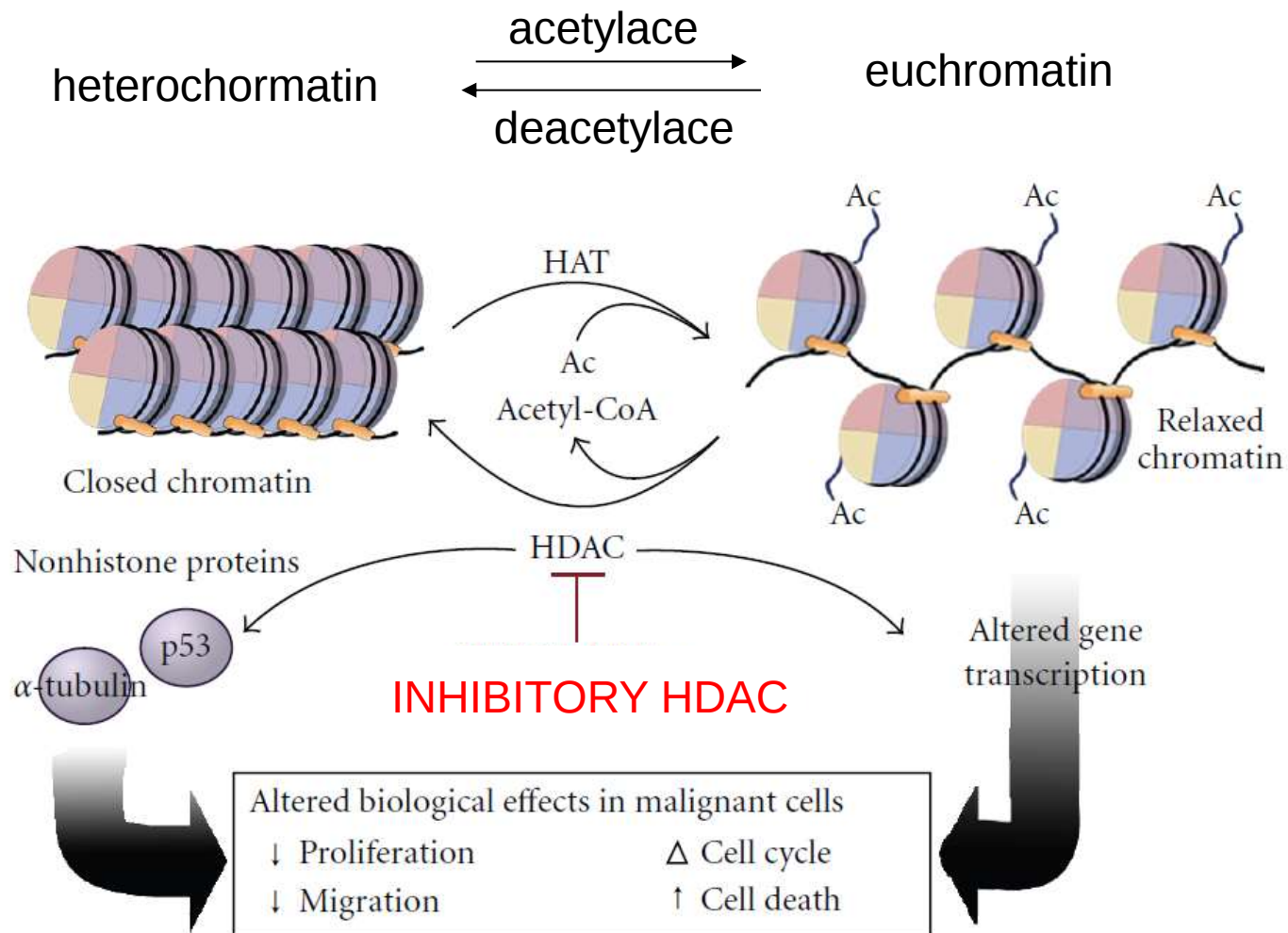
↑ BCL-2/BCL-XL



Rezistence na epigentická cytostaika

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

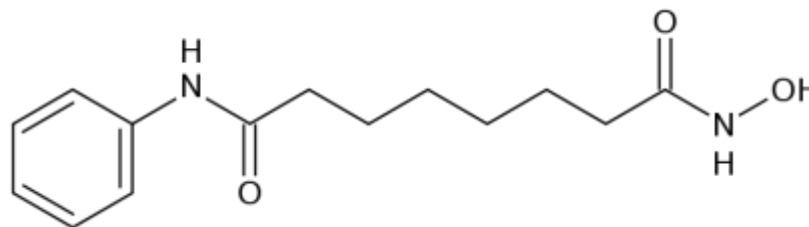
Inhibitory histondeacetyláz



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)



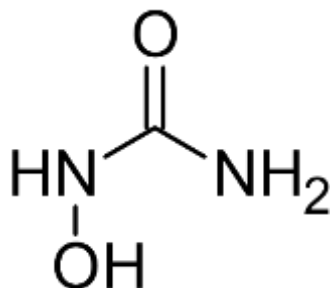
thioredoxin (scavenger ROS)
(deacetyluje i jiné cíle a přispívá k produkci ROS)



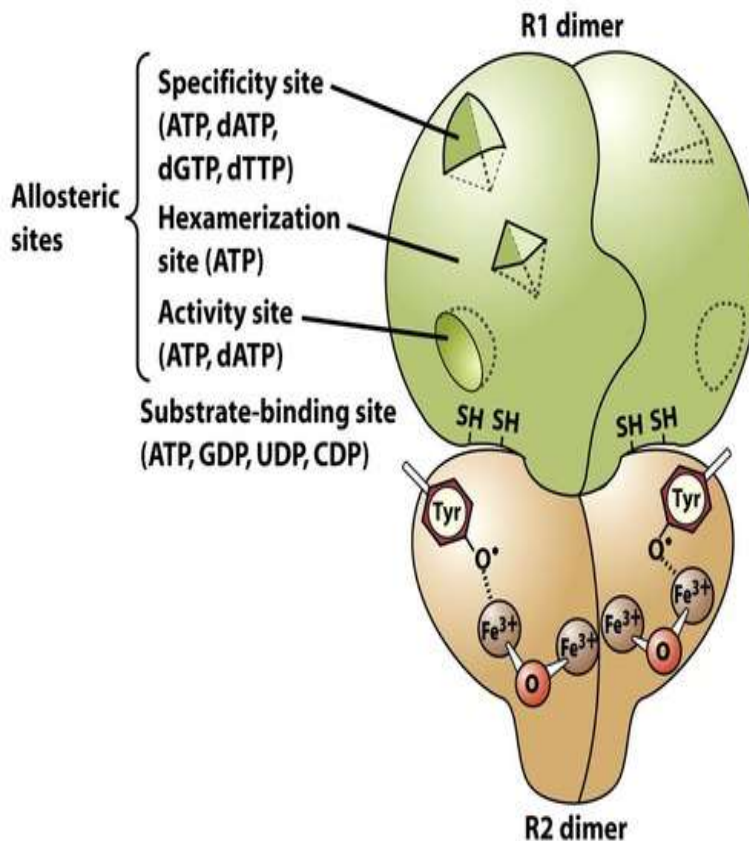
změny v apoptotických drahách - BCL2/BCL-XL, p21...

Rezistence na hydroxymočovinu

Hydroxyurea – inhibitor RNR



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



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

 RNR (R2 podjednotka - amplifikace, overexpres, mutace)

Rezistence na mitotické jedy

VINKA ALKALOIDY

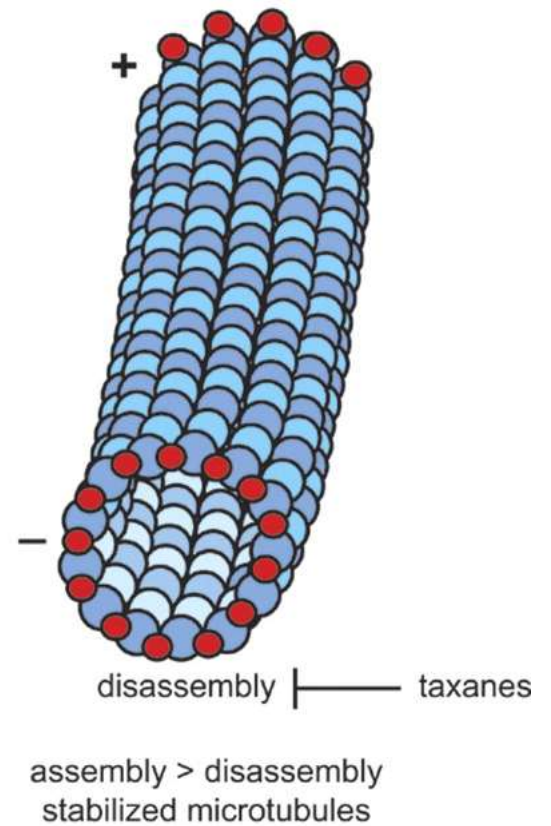
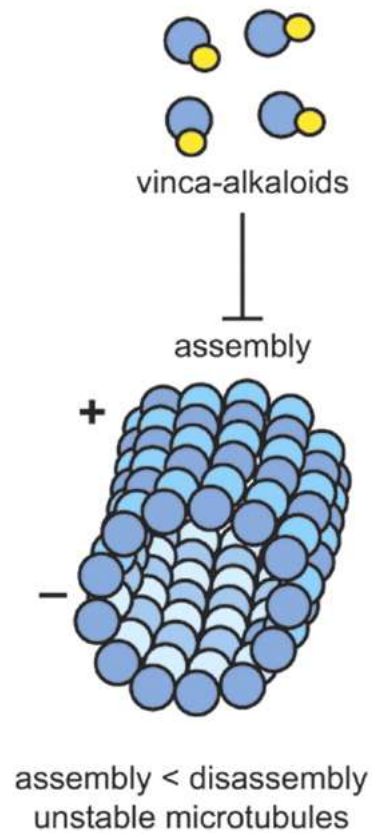
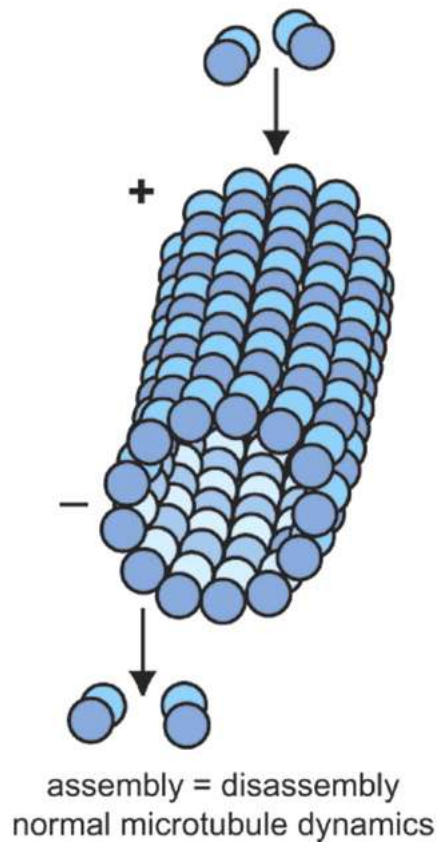
(vinkristin, vinblastin, vinorelbin)

Inhibitory polymerace MT

TAXANY

(Paclitaxel, docetaxel)

Inhibitory depolymerace MT



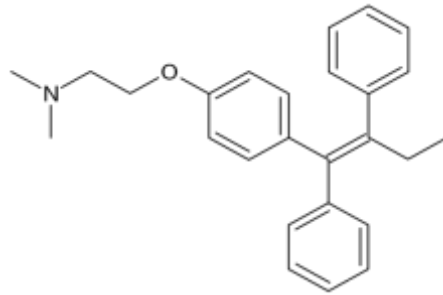
Rezistence na inhibitory dynamiky MT

Data nejasná a konfliktní (minimum z klinických dat)

MDR proteiny

- Mutace tubulinu ?
- **Expres různých tříd beta tubulinů** – (7-8 izotypů/tříd pro alfa i beta) mT složené z různých izotypů mají různou (nižší) afinitu pro inhibitory
- **Expres dalších proteinů podílejících se na dynamice MT (mikrotubule associated proteins)**
- down P53, p21, BAX
- up BCL-2/MCL-XL?

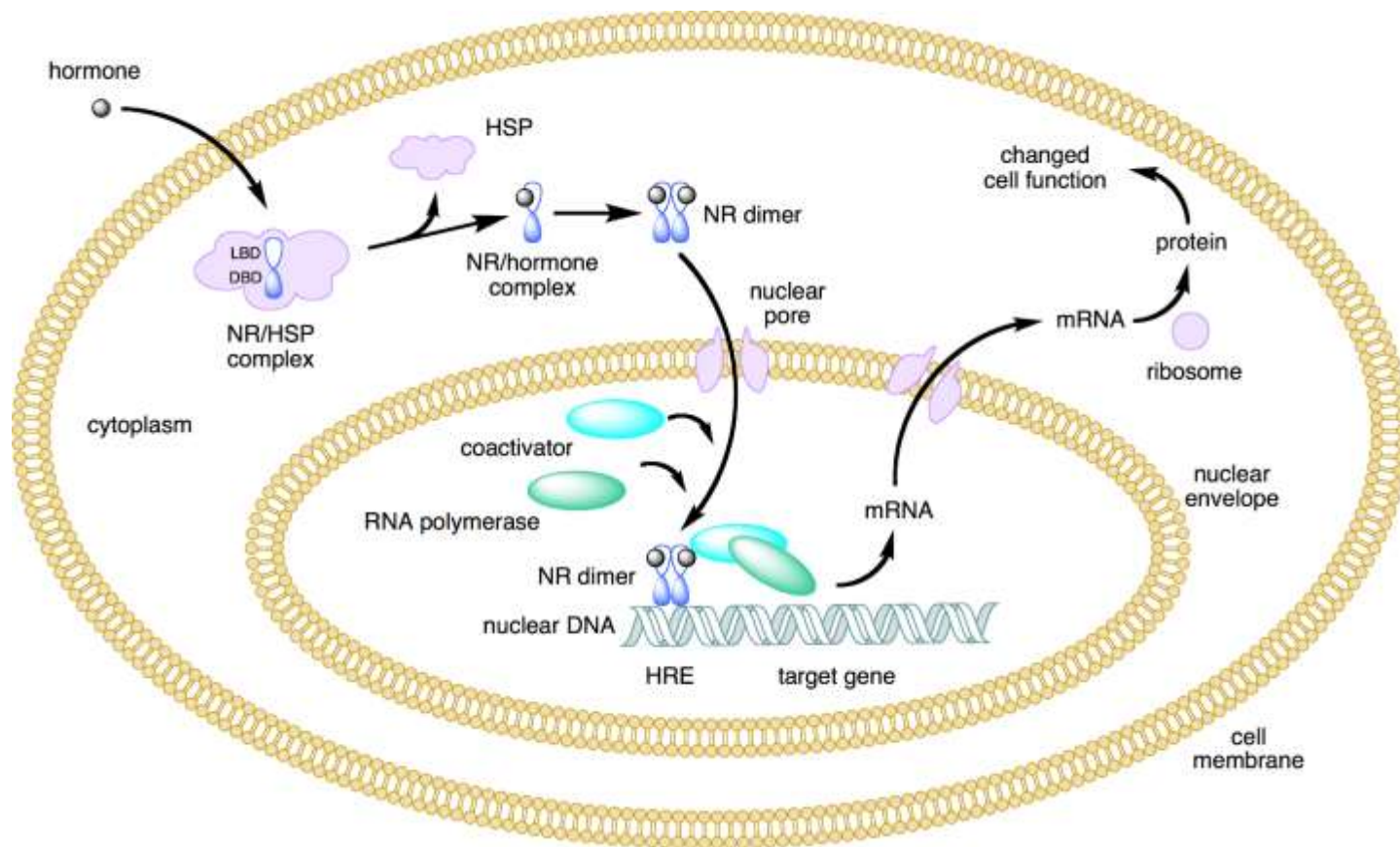
Rezistence na tamoxifen



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)

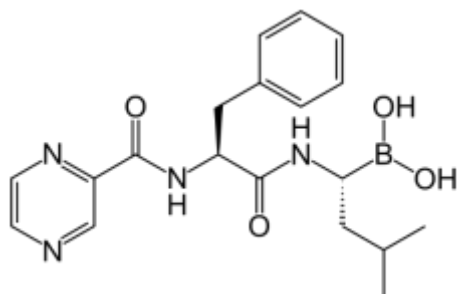
↑ ↓ Koaktivátory, korepresory (exprese, mutace)

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

Není substrátem pro MDR proteiny

Rezistence na bortezomib

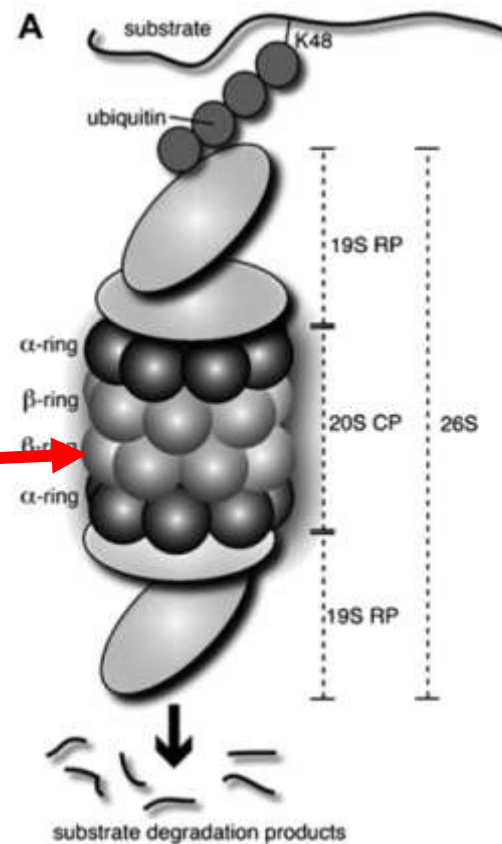
Bortezomib (Velcade, dipeptidový derivát kyseliny boronové)



Bortezomib

vazba na podjednotku $\beta 5$

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



Rezistence: Mutace a overexprese beta 5 podjednotky (PSBM5)

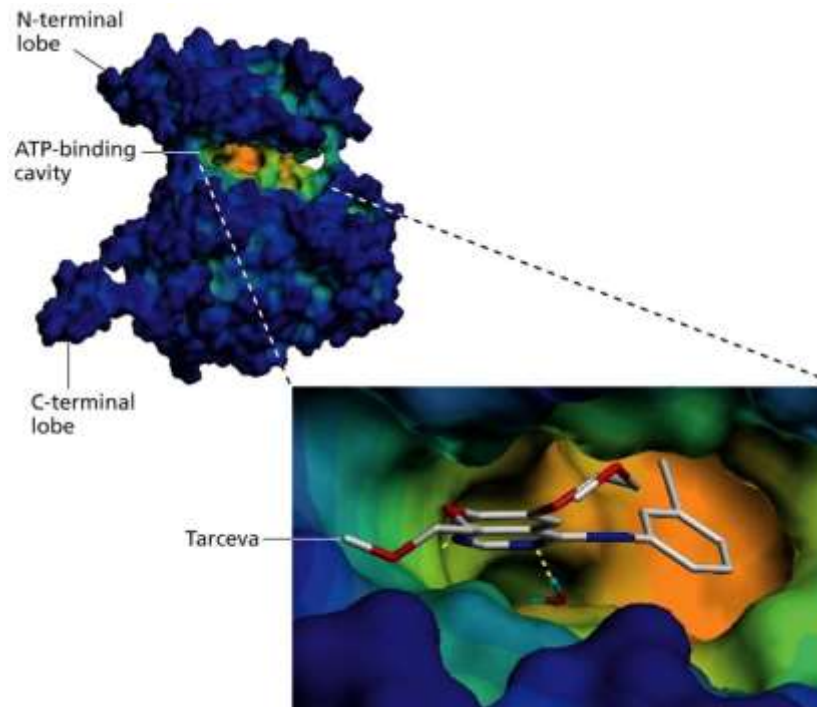
Rezistence na TKIs

Inhibitory tyrosine kinase

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)

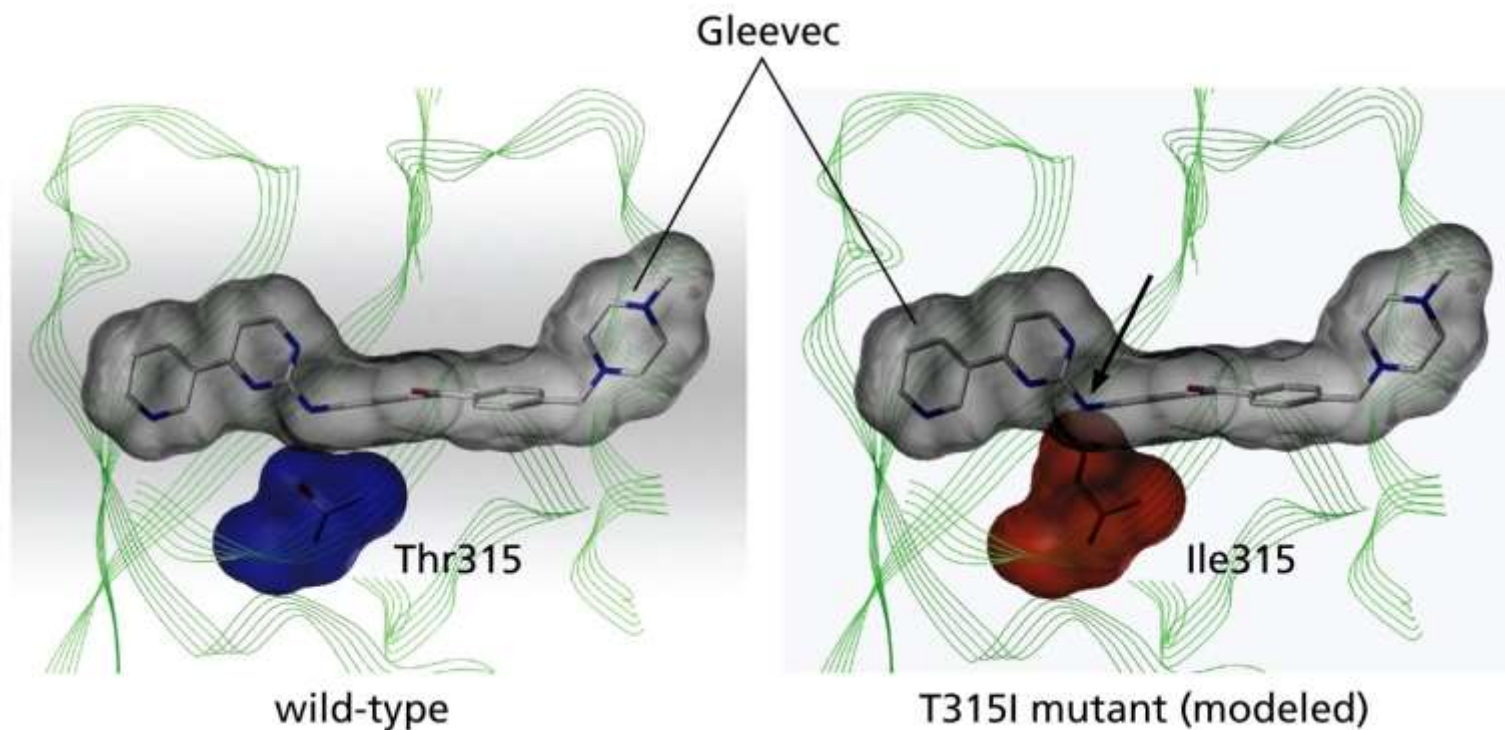


Figure 16.24b The Biology of Cancer (© Garland Science 2014)

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....)

